

小眼球症マウス Bruch 膜に分布するグリコサミノグリカン 分子種の組織化学的検討

宇野 真¹⁾, 池田 晃三¹⁾, 馬嶋 昭生¹⁾, 平林 義章²⁾, 山田 和順²⁾

¹⁾名古屋市立大学医学部眼科学教室, ²⁾名古屋市立大学医学部第二解剖学教室

要 約

Cts マウスは Jcl: ICR マウスの突然変異種で, そのホモ接合体 (*Cts/Cts*) は胎生期から白内障と小眼球を呈する。これは, 人間で発症する常染色体優性遺伝を示す先天白内障を伴う小眼球症のモデルと考えられる。今回, 正常マウス (+/+) とホモ接合体を用い, 胎生 14, 16, 18 日および生後 0, 4, 7 日の Bruch 膜に含まれるグリコサミノグリカン (GAG) 分子種を検索した。染色法は増感高鉄ジアミン染色法を用い, 辜丸ヒアルロニダーゼによる酵素消化法を組み合わせ, 光学顕微鏡的に観察した。観察したすべての時期において, 正常マウスの Bruch 膜で

はコンドロイチン硫酸 A/C がほとんど認められないのに対し, ホモ接合体の Bruch 膜にはコンドロイチン硫酸 A/C が多量に存在していた。本研究の結果から, Bruch 膜に分布する GAG 分子種の異常が, ホモ接合体でみられる小眼球症の成立過程に関与していることが示唆された。(日眼会誌 100: 126-131, 1996)

キーワード: *Cts* マウス, 小眼球症, Bruch 膜, グリコサミノグリカン, コンドロイチン硫酸 A/C, 光学顕微鏡組織化学

Histochemical Studies on Glycosaminoglycans in Bruch's Membrane of Experimental Microphthalmic Mice

Makoto Uno¹⁾, Kozo Ikeda¹⁾, Akio Majima¹⁾,
Yoshifumi Hirabayashi²⁾ and Kazuyori Yamada²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

²⁾Department of Anatomy, Nagoya City University Medical School

Abstract

The *Cts* mouse is a mutant mouse of the Jcl: ICR strain which has congenital cataracts and small eyes in homozygotes. Therefore, this mouse could be a model for autosomal dominant cataract with microphthalmia in humans. In the present study, attempts were made to demonstrate light-microscopically the molecular species of glycosaminoglycans (GAG) in Bruch's membrane of *Cts* mice on day 14, 16, and 18 of gestation and at 0, 4, and 7 days after birth by means of combined sensitized high iron diamine staining and testicular hyaluronidase digestion procedures. In Bruch's membrane of the unaffected mice at all stages examined, no substantial amount of chondroitin sulfate A/C could be

detected. In homozygous mice, however, a large amount of chondroitin sulfate A/C was contained in Bruch's membrane. These results indicate that the abnormal change in GAG molecular species induced the functional disorder of Bruch's membrane and could play a certain role in the etiology of microphthalmia in homozygotes. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 126-131, 1996)

Key words: *Cts* mouse, Microphthalmia, Bruch's membrane, Glycosaminoglycans, Chondroitin sulfate A/C, Light-microscopic histochemistry

I 緒 言

小眼球症はさまざまな原因で発症することが知られて

いる。その一つとして, 常染色体性優性遺伝を示す先天白内障を伴う小眼球症が報告¹⁾されている。大鳥ら²⁾は Jcl: ICR マウスに発生した白内障マウスを用いて, ある単一

別刷請求先: 467 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 宇野 真
(平成 6 年 8 月 15 日受付, 平成 7 年 9 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to: Makoto Uno, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School,
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan.

(Received August 15, 1994 and accepted in revised form September 28, 1995)

遺伝子のホモ接合体で先天白内障と小眼球症を、ヘテロ接合体で先天白内障をそれぞれ発症するマウスの系統を確立した。現在、この遺伝子に記号として *Cts* が与えられている。このマウスは、ヒトにおける小眼球症の成立過程を解明する実験モデルとして利用できる。1993年に Ozeki ら³⁾は *Cts* ホモ接合体マウスの強膜に含まれるグリコサミノグリカン(GAG)分子種が正常マウスの強膜に含まれる同糖質の分子種と異なることを報告し、このGAG分子種の異常が小眼球症の成立に関与していると考えた。結合組織の主要な成分であるGAGは、組織の細胞間を充填して、組織細胞の支持および結合などの物理的ないし機械的役割を果たしているだけでなく、組織細胞の増殖・分化・移動・代謝などに関与して重要な役割を演じていることが判明している^{4)~6)}。一方、Bruch膜は網膜の支持組織として眼球壁を構成し、脈絡膜毛細血管と網膜色素上皮の間で物質移動に関与していると考えられており⁷⁾、発達期Bruch膜におけるGAG分子種の異常が、網絡膜の成長に影響を及ぼして小眼球症の発症に関与している可能性が考えられる。本研究において、著者らは *Cts* マウスにおける小眼球症の成立過程を解明するために、胎生期ならびに生後の *Cts* マウスのBruch膜に含まれるGAG分子種を、光学顕微鏡を用いて組織化学的に検索した。

II 方 法

1. 実験動物

Cts マウスを交配した子孫のうち、ホモ接合体(*Cts/Cts*)を用い、正常マウス(+ / +)を対照とした。発情期の健康な雄1匹と末経産で発情期の健康な雌1匹を、午後8時から午前8時まで同一の飼育箱に入れ、翌朝腔栓を認めたものを妊娠0日とした。妊娠14, 16, 18日の母獣それぞれ5匹を頸椎脱臼により屠殺して胎仔を剖出し、胎生14, 16, 18日齢として実験に使用した。出生仔は、出生日を0日とし、生後0, 4, 7日の動物それぞれ5匹を屠殺して実験に使用した。

2. 試料調製法

得られた動物を直ちに室温で Bouin 液に浸漬し、約24時間固定した後に眼部組織塊を切り出し、さらに室温で1週間同液中に浸漬して再固定した。その後、固定組織を上昇エタノール系列で脱水し、型のごとくパラフィンに包埋して厚さ2.0 μm の前頭断連続切片を作成して、ゼラチン処理を施したスライドガラスに貼付した。

3. 増感高鉄ジアミン(sensitized high iron diamine)染色

脱パラフィンした後水和した切片に、Hirabayashi ら⁸⁾⁹⁾の方法に従って硫酸基検出反応である増感高鉄ジアミン(以下、S-HID)染色を行い、エタノールで脱水し、キシレンで透徹して Harleco synthetic resin(HSR)液を用いて封入した。また、一部の切片にはS-HID染色を

行う前に、GAG分子種の同定を行うため酵素消化法を施した。

4. 睾丸ヒアルロニダーゼ(testicular hyaluronidase)消化法

睾丸ヒアルロニダーゼ(以下、T-Hylase)はコンドロイチン硫酸A/C、コンドロイチンおよびヒアルロン酸を分解する酵素である。本酵素消化とS-HID染色とを組み合わせること(T-Hylase/S-HID染色)によって、コンドロイチン硫酸A/Cの局在を検出することができる。S-HID染色に先立ち Leppi ら¹⁰⁾の方法に準じて、T-Hylase(1 mg/ml)を含む0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH 5.5)に、脱パラフィン後に水和した切片を37°Cで22時間浸漬した。対照切片は酵素を含まないリン酸塩緩衝液に37°Cで22時間浸漬した。

III 結 果

1. 正常マウス

胎生14日および16日のBruch膜は、S-HID染色により黒色の強陽性反応を示し(図1A)、T-Hylase/S-HID染色を行ってもその染色性には明瞭な変化はみられなかった(図1B)。脈絡膜は、S-HID染色により黒色から褐色の中等度陽性反応を示し(図1A)、T-Hylase/S-HID染色によってその染色性は中等度に減弱し、褐色の陽性反応が得られた(図1B)。胎生18日のBruch膜においては、S-HID染色によって黒色の強陽性反応が観察され(図2A)、T-Hylase/S-HID染色を施してもその染色性には変化はなかった(図2B)。脈絡膜にS-HID染色を行うと、黒色を示す強陽性反応が得られ(図2A)、T-Hylase/S-HID染色によりこのような染色性は明らかに減弱して、褐色の弱いし中等度陽性反応がみられた(図2B)。生後0日のBruch膜は、S-HID染色により黒色の強陽性反応を示し(図3A)、T-Hylase/S-HID染色を施すと、このような染色性はわずかに減弱して中等度陽性反応となった(図3B)。脈絡膜は、S-HID染色を行うと強陽性反応が観察され(図3A)、T-Hylase/S-HID染色により、この染色性は顕著に減弱して弱陽性反応となった(図3B)。生後4日ならびに7日のBruch膜においては、S-HID染色により黒色を示す強陽性反応が得られ(図4A)、T-Hylase/S-HIDを行うと褐色から黒色を示す中等度ないし強陽性反応がみられた(図4B)。脈絡膜は、S-HID染色によって黒色の強陽性反応を示し(図4A)、T-Hylase/S-HID染色を行うと、その染色性は減弱して褐色ないし黒色の中等度陽性反応となった(図4B)。以上の結果を表1にまとめる。

2. *Cts* ホモ接合体マウス

S-HID染色を行うと、胎生14日および16日のBruch膜は、褐色から黒色の中等度ないし強陽性反応を示した(図5A)。同組織にT-Hylase/S-HID染色を施すと、染色性は顕著に減弱して陰性ないし弱陽性反応となった

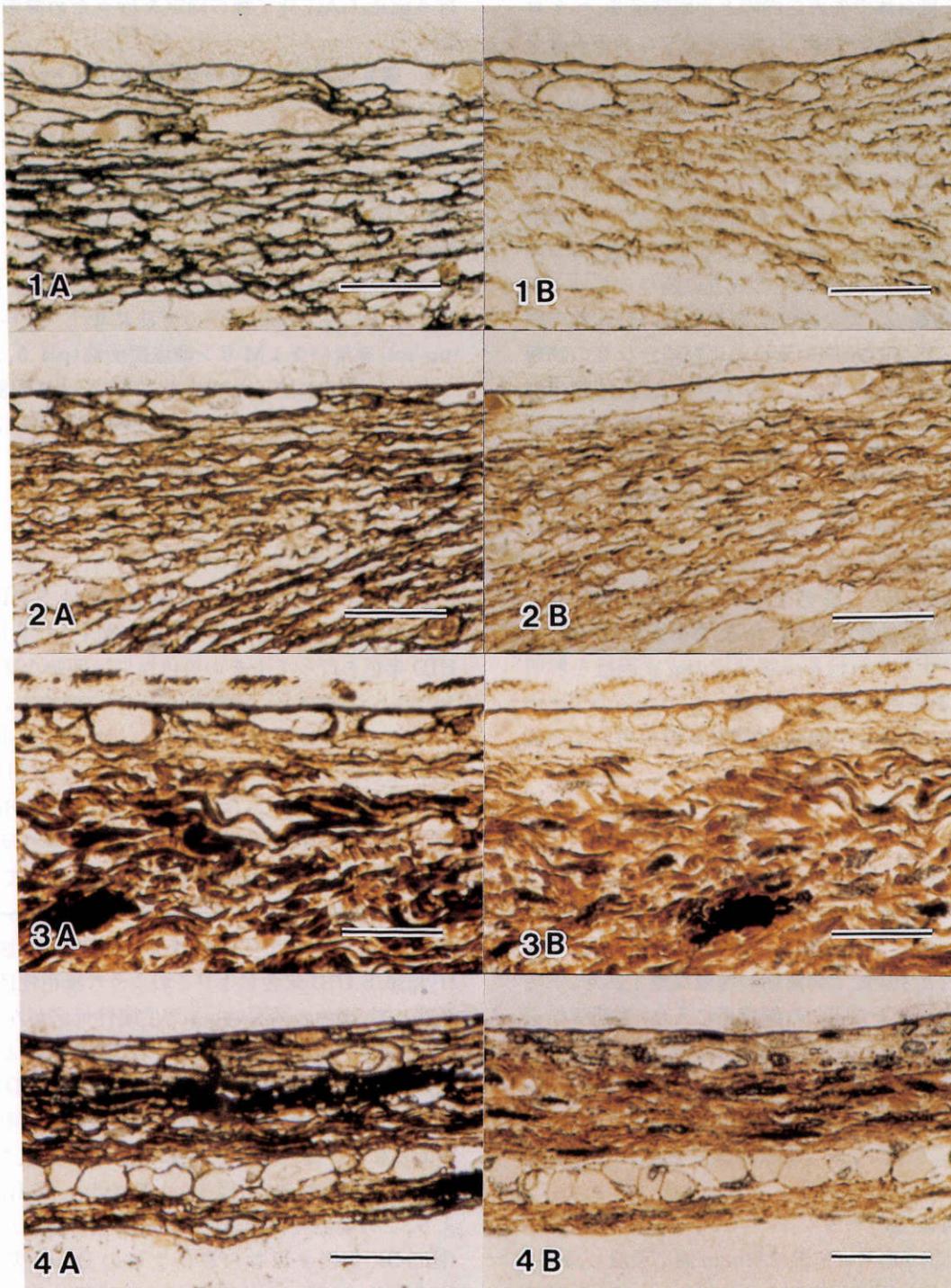


図1 正常マウス(+/+),胎生14日の網脈絡膜.

Sensitized high iron diamine(S-HID)染色(A)および testicular hyarulonidase(T-Hylase)/S-HID 染色(B). Bruch 膜は黒色の強陽性反応を示し(A),酵素処理による変化をほとんど認めない(B). 脈絡膜は黒色から褐色の中等度陽性反応を示し(A),酵素処理によってその染色性が中等度に減少する(B). バーは 20 μm

図2 正常マウス(+/+),胎生18日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜は黒色の強陽性反応が観察され(A),酵素処理による染色性の変化を認めない(B). 脈絡膜は黒色の強陽性反応を示し(A),酵素処理によりその染色性が減弱する. バーは 20 μm

図3 正常マウス(+/+),生後0日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜は黒色の強陽性反応を示し(A),酵素処理によって染色性が軽度減弱して中等度陽性反応となる(B). 脈絡膜は黒色の強陽性反応を示し(A),酵素処理によりその染色性は明らかに減弱する(B). バーは 20 μm

図4 正常マウス(+/+),生後7日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜は黒色の強陽性反応が得られ(A),酵素処理後は中等度ないし強陽性反応となる(B). 脈絡膜は黒色の強陽性反応を示し(A),酵素処理によってその染色性が減弱する(B). バーは 20 μm

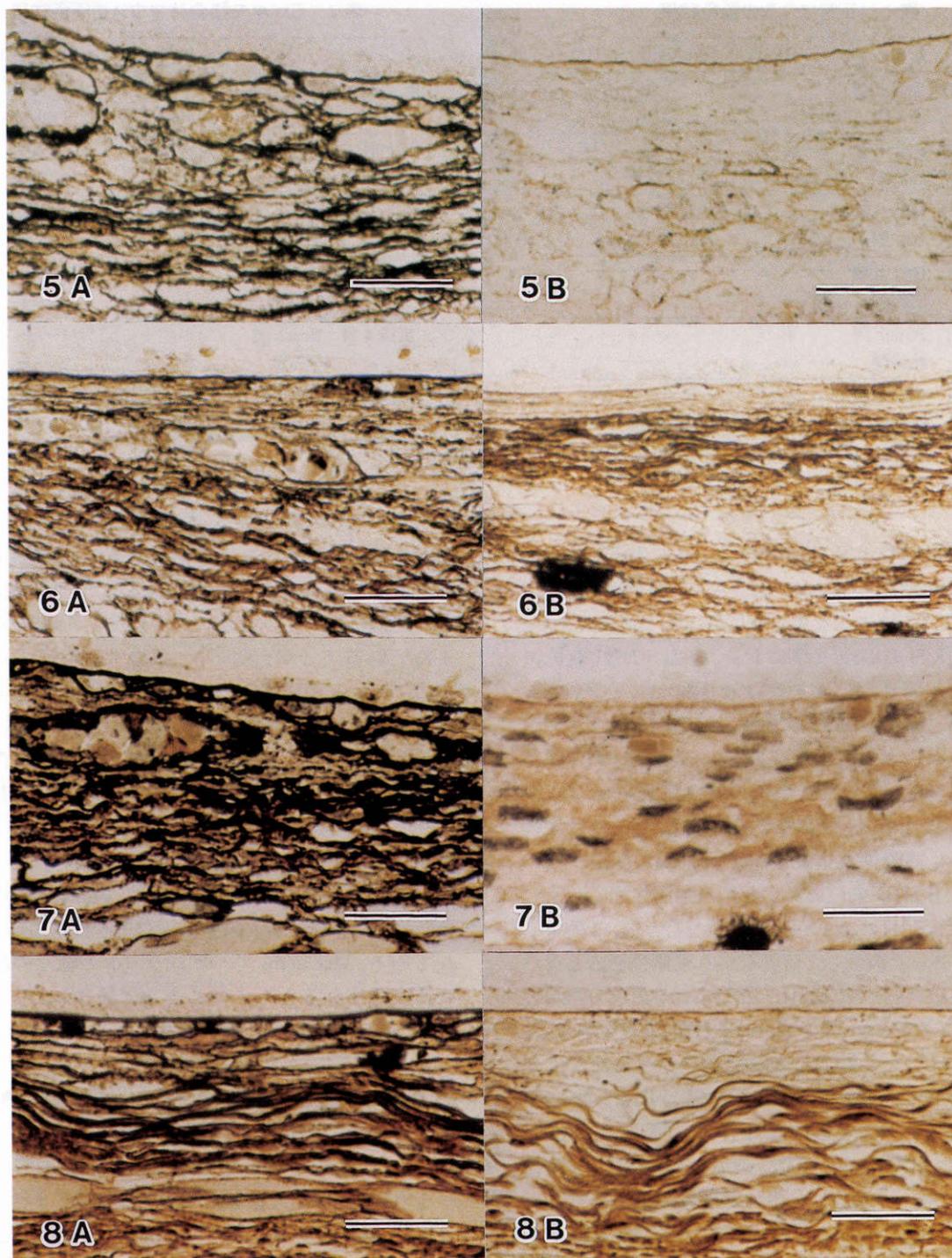


図 5 ホモ接合体(*Cts/Cts*), 胎生 14 日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜は褐色から黒色の中程度ないし強陽性反応を示し(A), 酵素処理により染色性が顕著に減弱して陰性ないし弱陽性反応になる(B). 脈絡膜では中程度陽性反応がみられ(A), 酵素処理によって染色性がほとんど消失する(B). バーは 20 μm

図 6 ホモ接合体(*Cts/Cts*), 胎生 18 日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜では黒色の強陽性反応が観察され(A), 酵素処理によりその染色性が減弱し中程度ないし弱陽性反応を示す(B). 脈絡膜では黒色の強陽性反応がみられ(A), 酵素処理により弱陽性ないし陰性反応となる(B). バーは 20 μm

図 7 ホモ接合体(*Cts/Cts*), 生後 0 日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜は黒色の強陽性反応を示し(A), 酵素処理によりその染色性は顕著に減弱して弱陽性ないし陰性反応となる(B). 脈絡膜で強陽性反応が得られ(A), 酵素処理により弱陽性ないし陰性反応となる(B). バーは 20 μm

図 8 ホモ接合体(*Cts/Cts*), 生後 7 日の網脈絡膜.

S-HID 染色(A)および T-Hylase/S-HID 染色(B). Bruch 膜は黒色の強陽性反応を示し(A), 酵素処理によりその染色性は減弱し中程度ないし弱陽性反応が得られる(B). 脈絡膜では強陽性反応が得られ(A), 酵素処理により弱陽性反応を示す(B). バーは 20 μm

表1 正常マウスの染色結果

	S-HID	T-Hylase/S-HID
胎生 14 日 Bruch 膜	++	++
脈絡膜	++	0~+
胎生 16 日 Bruch 膜	++	++
脈絡膜	++	0~+
胎生 18 日 Bruch 膜	++	++
脈絡膜	++	+~++
生後 0 日 Bruch 膜	++	++
脈絡膜	++	+
生後 4 日 Bruch 膜	++	++~+++
脈絡膜	++	+~++
生後 7 日 Bruch 膜	++	++~+++
脈絡膜	++	+~++

S-HID: 増感高鉄ジアミン, T-Hylase: 鞣丸ヒアルロニダーゼ

(図5B). 脈絡膜では, S-HID 染色によって黒色から褐色の中等度陽性反応がみられ(図5A), T-Hylase/S-HID 染色を行うと, このような染色性はほとんど消失した(図5B). 胎生18日のBruch膜においては, S-HID 染色により黒色の強陽性反応が観察され(図6A), T-Hylase/S-HID 染色を施すと, S-HID 染色の染色性が明らかに減弱して弱いし中等度陽性反応となった(図6B). 脈絡膜に S-HID 染色を行うと, 黒色の強陽性反応がみられ(図6A), T-Hylase/S-HID 染色を施すと, 染色性は減弱し陰性ないし弱陽性反応となった(図6B). 生後0日のBruch膜は, S-HID 染色により黒色の強陽性反応を示したが(図7A), T-Hylase/S-HID 染色を行うと, このような染色性は著しく減弱して陰性ないし弱陽性反応となった(図7B). 脈絡膜では, S-HID 染色により黒色の強陽性反応が得られ(図7A), T-Hylase/S-HID 染色を施すと, この染色性は著しく減弱して陰性ないし弱陽性反応となった(図7B). 生後4日ならびに7日のBruch膜に S-HID 染色を行うと, 黒色の強陽性反応を示した(図8A). 同組織に T-Hylase/S-HID 染色を施すと, この染色性は減弱し, 褐色の弱いし中等度陽性反応が得られた(図8B). 脈絡膜では, S-HID 染色により強陽性反応が観察され(図8A), T-Hylase/S-HID 染色によってこのような染色性は著しく減弱して弱陽性反応を示すようになった(図8B). 以上の結果を表2にまとめる.

IV 考 按

従来, Bruch 膜に含まれるプロテオグリカン(PG)に関しては, 免疫組織化学的方法, 酵素消化法および化学修飾法などの選択的方法を併用した酸性基検出法などによって, ヘパラン硫酸 PG^{10)~14)}, コンドロイチン硫酸 PG¹¹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾ およびデルマトン硫酸 PG¹⁴⁾ などが報告されている. 本研究において用いた S-HID 染色法の特異性⁸⁾⁹⁾ と T-Hylase 消化法の基質特異性¹⁰⁾ によれば, 今回検討

表2 Cts ホモ接合体マウスの染色結果

	S-HID	T-Hylase/S-HID
胎生 14 日 Bruch 膜	++~+++	0~+
脈絡膜	++	0
胎生 16 日 Bruch 膜	++~+++	0~+
脈絡膜	++	0
胎生 18 日 Bruch 膜	++	+~++
脈絡膜	++	0~+
生後 0 日 Bruch 膜	++	0~+
脈絡膜	++	0~+
生後 4 日 Bruch 膜	++	++~+++
脈絡膜	++	+~++
生後 7 日 Bruch 膜	++	+~++
脈絡膜	++	+

したすべての時期において, 正常マウス(+/+)のBruch膜にはコンドロイチン硫酸 A/C の局在は認められなかったが, Cts ホモ接合体(Cts/Cts) の同膜にはすべての時期において多量のコンドロイチン硫酸 A/C が含まれていることが判明した. 正常マウス(+ / +)において, T-Hylase 消化後に残存する S-HID 染色性はヘパラン硫酸ないしコンドロイチン硫酸 B(デルマトン硫酸)によるものと考えられる. コンドロイチン硫酸 A/C は軟骨, 骨, 腱などに広く分布する GAG であり, 基底膜の主成分であるヘパラン硫酸と比較すると, 構成糖ならびに単糖当たりの硫酸基の密度や種類が相違する. コンドロイチン硫酸 A/C の生理活性として, 組織細胞の構造維持機能の他に細胞接着の阻害および細胞分化の作用が知られている. McCarthy ら¹⁷⁾¹⁸⁾ はラットの種々の組織の基底膜に含まれるコンドロイチン硫酸 PG について報告し, それが基底膜の安定性に関与している可能性を考察している. Platt ら¹⁹⁾ や Klein ら²⁰⁾ は胎生期マウスにおいて, 尿管芽の分枝形成が, コンドロイチン硫酸 PG 合成が阻害されることによって障害されたことを報告している. これらの結果は, 発生期のBruch膜におけるコンドロイチン硫酸が上皮組織ならびに基底膜の発生に影響を及ぼし, 眼球の発育を妨げる可能性を示唆している. また, 基底膜においては, それに含まれるヘパラン硫酸 PG のもつ電荷が物質の膜透過性に関与していることが知られている²¹⁾²²⁾. Bruch 膜においてもヘパラン硫酸 PG がコンドロイチン硫酸 PG に置き換わることによって, 同膜の電荷および性状が変化して, 同膜における物質の透過性に障害を生ずる可能性が考えられる. このような障害によって脈絡膜から網膜への栄養物質の透過が制限されるか, 逆に眼球内から眼球外への水や電解質の流出によって眼球内圧の維持が困難になり, 眼球の成長に障害を来すことが推測される. 電子顕微鏡的には, Bruch 膜は網膜色素上皮細胞基板, 内膠原線維層, 弾性線維層, 外膠原線維層, および脈絡膜毛細血管内皮細胞基板の

5層から構成される。Braekeveltら²³⁾によるラットの Bruch 膜の組織発生過程についての研究では、胎生 15 日までに網膜色素上皮細胞基底板が形成され、次いで、膠原線維層と脈絡膜毛細血管内皮細胞基底板が形成され、生後に弾性線維層が形成される。本研究の結果と Bruch 膜の発生過程を考慮すると、*Cts* ホモ接合体においては、Bruch 膜を構成する全 5 層の発生過程において、初期の網膜色素上皮細胞基底膜形成期からすでにコンドロイチン硫酸 A/C が産生されていたことが考えられ、このことは網膜色素上皮細胞から脈絡膜毛細血管内皮細胞までの広範囲にわたる細胞の質的異常が存在することを示唆している。今回の実験においては生後 8 日以降の個体の観察はしていないので、Bruch 膜の GAG 分子種が眼球の成熟に従ってどのように変化していくかについては、今後検討する。

文 献

- 1) Warburg M: Genetics of microphthalmos. *Int Ophthalmol* 4: 45-65, 1981.
- 2) 大鳥 寛, 吉田豊彦, 狗田忠義: マウスの小眼球症をともなう遺伝的白内障について. *実験動物* 17: 91-96, 1968.
- 3) Ozeki H, Hirabayashi Y: Histochemical studies on glycosaminoglycans in the developing sclera of experimental microphthalmic (*Cts*) mice. *Nagoya Medical Journal* 38: 89-97, 1993.
- 4) Ruoslahti E: Proteoglycans in cell regulation. *Biological Chemistry* 264: 13369-13372, 1989.
- 5) Kjellen L, Lindahl U: Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann Rev Biochem* 60: 443-475, 1991.
- 6) Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD: Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiological Reviews* 71: 481-539, 1991.
- 7) 松岡 徹, 松尾信彦: Bruch 膜—その三次元的構造. *あたらしい眼科* 8: 1377-1388, 1991.
- 8) Hirabayashi Y, Yamada K: Efficient histochemical methods for the detection of acidic glycoconjugates by means of sensitized diamine procedures. *Connective Tissue* 22: 39-40, 1991.
- 9) Hirabayashi Y: Light-microscopic detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedures. *Histochem J* 24: 409-418, 1992.
- 10) Leppi TJ, Stoward PJ: On the use of testicular hyaluronidase for identifying mucins in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 13: 406-407, 1965.
- 11) Pino RM, Essner E, Pino LC: Location and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. *J Histochem Cytochem* 30: 245-252, 1982.
- 12) Turksen K, Aubin JE, Sodec J, Kalnis VI: Localization of laminin, type IV collagen, fibronectin, and heparan sulfate proteoglycan in chick retinal pigment epithelium basement membrane during embryonic development. *J Histochem Cytochem* 33: 665-671, 1985.
- 13) Lin W: Immunogold localization of extracellular matrix molecules in Bruch's membrane of the rat. *Curr Eye Res* 8: 1171-1178, 1989.
- 14) Call TW, Hollyfield JG: Sulfated proteoglycans in Bruch's membrane of the human eye: Localization and characterization using cupromeronic blue. *Exp Eye Res* 51: 451-462, 1990.
- 15) Das A, Frank RN, Zhang NL, Turczyn TJ: Ultrastructural localization of extracellular matrix components in human retinal vessels and Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol* 108: 421-429, 1990.
- 16) Lin W, Essner E, McCarthy KJ, Couchman JR: Ultrastructural immunocytochemical localization of chondroitin sulfate proteoglycan in Bruch's membrane of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2072-2075, 1992.
- 17) McCarthy KJ, Couchman JR: Basement membrane chondroitin sulfate proteoglycans: Localization in adult rat tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 1479-1486, 1990.
- 18) McCarthy KJ, Horiguchi Y, Couchman JR, Fine JD: Ultrastructural localization of the core protein of a basement membrane-specific chondroitin sulfate proteoglycan in adult rat skin. *Arch Dermatol Res* 282: 397-401, 1990.
- 19) Platt JL, Brown DM, Granlund K, Oegema TR, Klein DJ: Proteoglycan metabolism associated with mouse metanephric development; morphologic and biochemical effects of β -D-xyloside. *Dev Biol* 123: 293-306, 1987.
- 20) Klein DJ, Brown DM, Moran A, Oegema TR Jr, Platt JL: Chondroitin sulfate proteoglycan synthesis and reutilization of β -D-xyloside-initiated chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycans in fetal kidney branching morphogenesis. *Dev Biol* 133: 515-528, 1989.
- 21) Caldwell R, Splanick SM, McLaughlin BJ: Decreased anionic sites in Bruch's membrane of spontaneous and drug-induced diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1691-1697, 1986.
- 22) Shimomura H, Spiro RG: Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. *Diabetes* 36: 374-381, 1987.
- 23) Braekevelt CR, Hollenberg MJ: Development of the retinal pigment epithelium, choliocapillaris and Bruch's membrane in the albino rat. *Exp Eye Res* 9: 124-131, 1970.