

## 実験サル緑内障における遅い軸索輸送の検討

沢口 昭一, 阿部 春樹, 福地 健郎, 須田生英子, 白柏 基宏, 岩田 和雄

新潟大学医学部眼科教室

### 要 約

緑内障性視神経萎縮に軸索輸送の障害が関与していることがこれまでに報告されてきた。これまでの報告は、正常サル眼について急性の眼圧上昇の影響を検討した実験が中心であった。今回の研究では、これまでに報告したレーザー隅角照射により慢性に眼圧上昇を発症させ、完成した緑内障性視神経乳頭を呈する状態での軸索輸送、特に、いわゆる slow axonal transport について組織オートラジオグラフを用いて検討した。乳頭篩状板の構築の乱れた部位に一致して軸索輸送の停滞の所見が散見された。また、乳頭篩状板後部のいわゆる球後視神経にも

所々、この軸索輸送の障害と考えられる感光銀粒子の集積の所見が観察された。正常では、この軸索輸送は pre-lamina, lamina, ratro-lamina ともほぼ均一であったが、軽度ながら停滞の所見と考えられる恐らく生理的な感光銀粒子の集積も観察された。(日眼会誌 100: 132-138, 1996)

キーワード: 遅い軸索輸送, 実験緑内障, 組織オートラジオグラフ

## Slow Axonal Transport in Primate Experimental Glaucoma

Shoichi Sawaguchi, Haruki Abe, Takeo Fukuchi,

Kieko Suda, Motohiro Shirakashi and Kazuo Iwata

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

### Abstract

Axonal transport abnormality has been reported to be deeply related to glaucomatous optic nerve injury. These reports mainly investigated the axonal transport blockage using the model of acute elevation of intraocular pressure in normal primates. We studied such axonal transport abnormality especially of slow flow in laser-induced glaucomatous monkey eyes by tissue autoradiography. Abnormal silver grain accumulation suggesting axonal transport damage was seen in the areas of distorted lamina cribrosa in glaucomatous eyes. Accumulation of

grains was also seen in the retro-laminar optic nerve in some areas. Normal control eyes showed almost homogenous grain distribution in the pre-lamina, lamina and post-lamina areas. Areas of slightly elevated, accumulation of grains were seen around the lamina cribrosa and disc margin suggesting physiological blockage of axonal transport. (Jpn Ophthalmol Soc 100: 132-138, 1996)

Key words: Slow axonal transport, Experimental glaucoma, Tissue autoradiography

## I 緒 言

軸索輸送の障害、特に乳頭篩状板における停滞は緑内障における視神経障害、萎縮に重要な役割を果たすであろうことが発表されて以来、これまでに我々を含め多くの報告<sup>1)~7)</sup>がなされてきた。わずかな例外を除いては、これらの報告のほとんどは正常眼において高度の眼圧上昇を短期間に与えて、組織学的あるいは組織オートラジオ

グラフを用いた検討がされてきた。一方、臨床的には緑内障性視神経障害と病期、あるいは正常眼圧緑内障などの様々な問題が提起されてきており、完成したあるいは進行した緑内障における視神経障害の進行の機序解明の必要が出てきている。今回、これまで我々が報告<sup>7,8)</sup>した手法、レーザー隅角照射による実験緑内障を作成し、標識アミノ酸を用いた組織オートラジオグラフを用いて完成した緑内障での軸索輸送障害の解明を試みた。

別刷請求先: 951 新潟県新潟市旭町通1-757 新潟大学医学部眼科教室 沢口 昭一

(平成7年8月15日受付, 平成7年9月29日改訂受理)

Reprint requests to: Shoichi Sawaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University, School of Medicine, 1-757 Asahimachi-dori Niigata-shi, Niigata-ken 951, Japan.

(Received August 15, 1995 and accepted in revised form September 29, 1995)

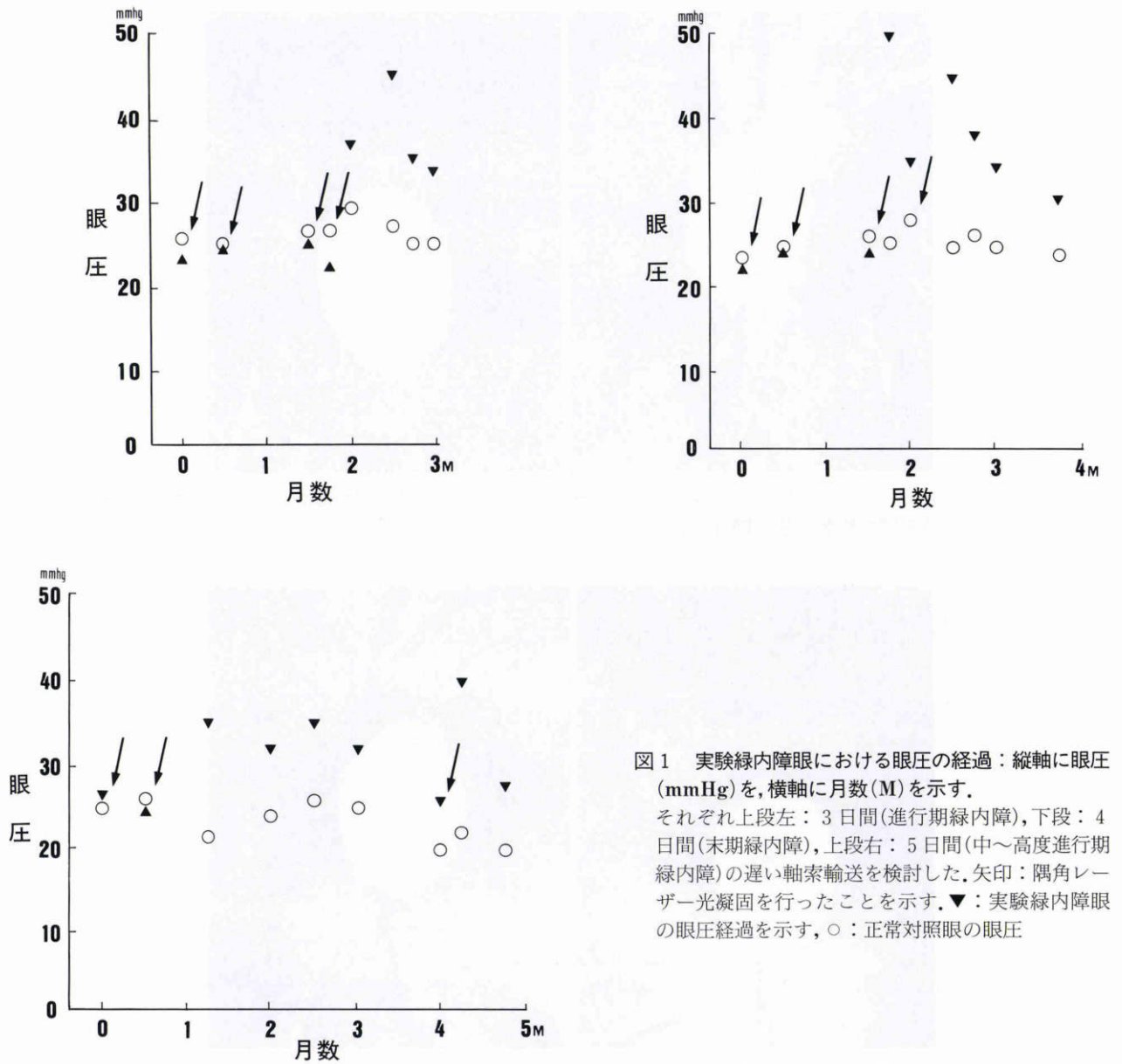


図1 実験緑内障における眼圧の経過：縦軸に眼圧 (mmHg)を、横軸に月数(M)を示す。  
 それぞれ上段左：3日間(進行期緑内障),下段：4日間(末期緑内障),上段右：5日間(中～高度進行期緑内障)の遅い軸索輸送を検討した,矢印：隅角レーザー光凝固を行ったことを示す.▼：実験緑内障の眼圧経過を示す,○：正常対照眼の眼圧

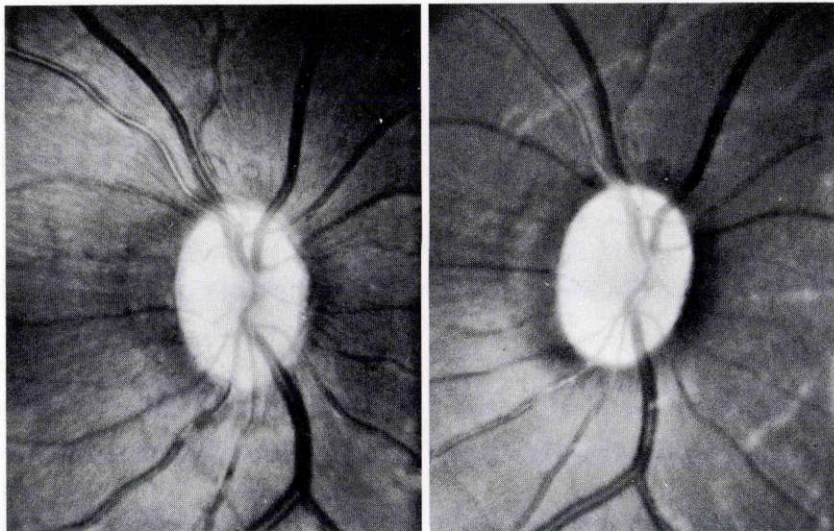


図2 左眼底写真はレーザー隅角照射前を右眼底写真は進行した緑内障性視神経乳頭の所見を呈している (3日間の軸索輸送の実験に用いた)。

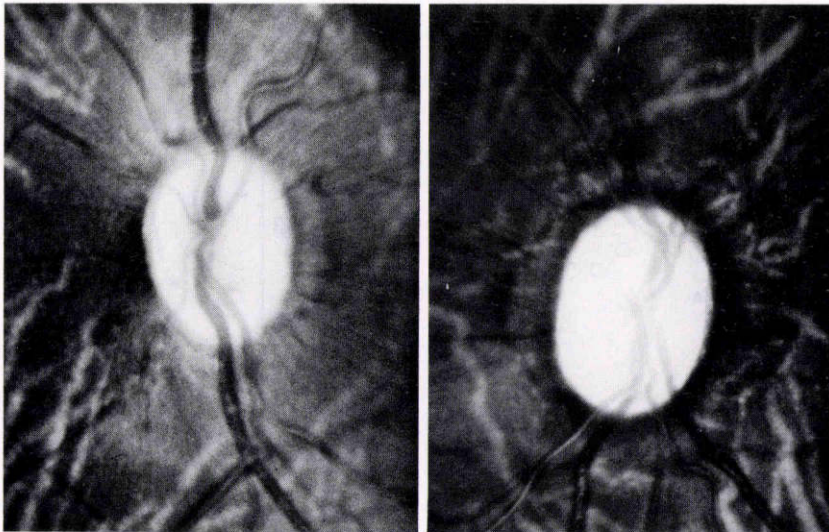


図3 左眼底写真は正常対照眼を右眼底写真はレーザー隅角照射による実験緑内障の視神経乳頭(末期)を示している(4日間の軸索輸送の実験に用いた)。

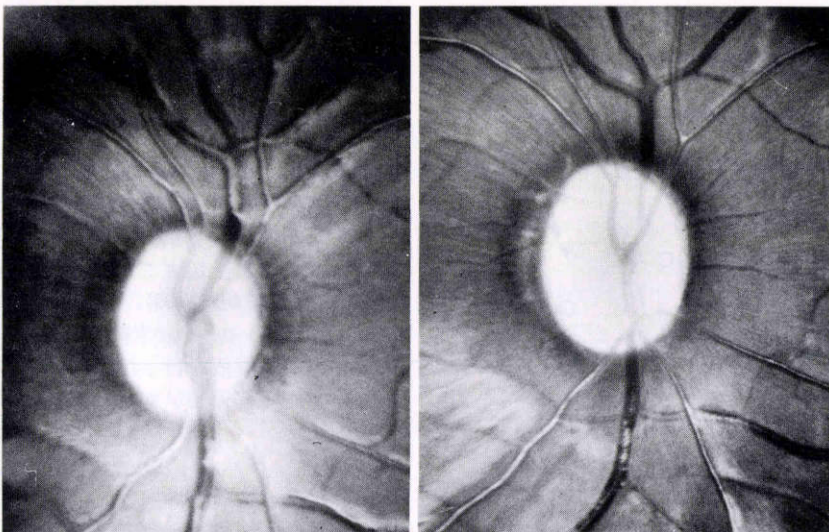


図4 左眼の眼底写真はレーザー隅角照射前を、右眼底写真はレーザー照射後の進行した緑内障視神経乳頭を呈している(5日間の軸索輸送の実験に用いた)。

## II 実験方法

実験動物には正常カニクイサル(Macaca irus monkey) 3匹を用いた。既に報告<sup>7)8)</sup>したように、右眼には反復レーザー隅角照射を行い、他眼は正常対照眼として使用した。麻酔には塩酸ケタミン(ケタラール®)を10 mg/kg用いた。

眼圧は Alcon Applanation Pneumatograph®を用い、点眼麻酔0.4%塩酸オキシプロカイン(ベノキシール®)を追加の上で測定した。また、視神経乳頭はトプコン社製立体眼底撮影を行い記録した。緑内障が完成した段階で全身麻酔、および点眼麻酔後、前房水を0.1 ml吸引した後、両眼にそれぞれ L-4, 5-<sup>3</sup>HLeucine (Amersham International, specific activity 161 Ci/mmol) 200 uCi/

40 ul を 27 ゲージマイクロシリンジで角膜輪部から約 5 mm 後方で硝子体腔に注入した。それぞれ標識アミノ酸注入後 3, 4, 5 日目に過剰の塩酸ケタミン(ケタラール®)とペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)投与により安楽的に屠殺し、次いで眼球を丁寧に摘出し固定液(10% 緩衝ホルマリン)で数日間固定した。視神経乳頭を上下方向に半切しパラフィンに包埋した。ポリリジンでコーティングしたスライドガラス上にマイクロームで6 μの切片を作成し、脱パラフィン後、オートラジオグラフ用の乳剤(Sakura NR-M 2, Konishiroku Co)を塗布し、4週間冷所、暗箱で露出し、現像、定着を行い、メチレンブルーで短時間(2~3分)染色し水洗の後、型のごとく脱水しカバーガラスで覆って顕微鏡下で観察した。

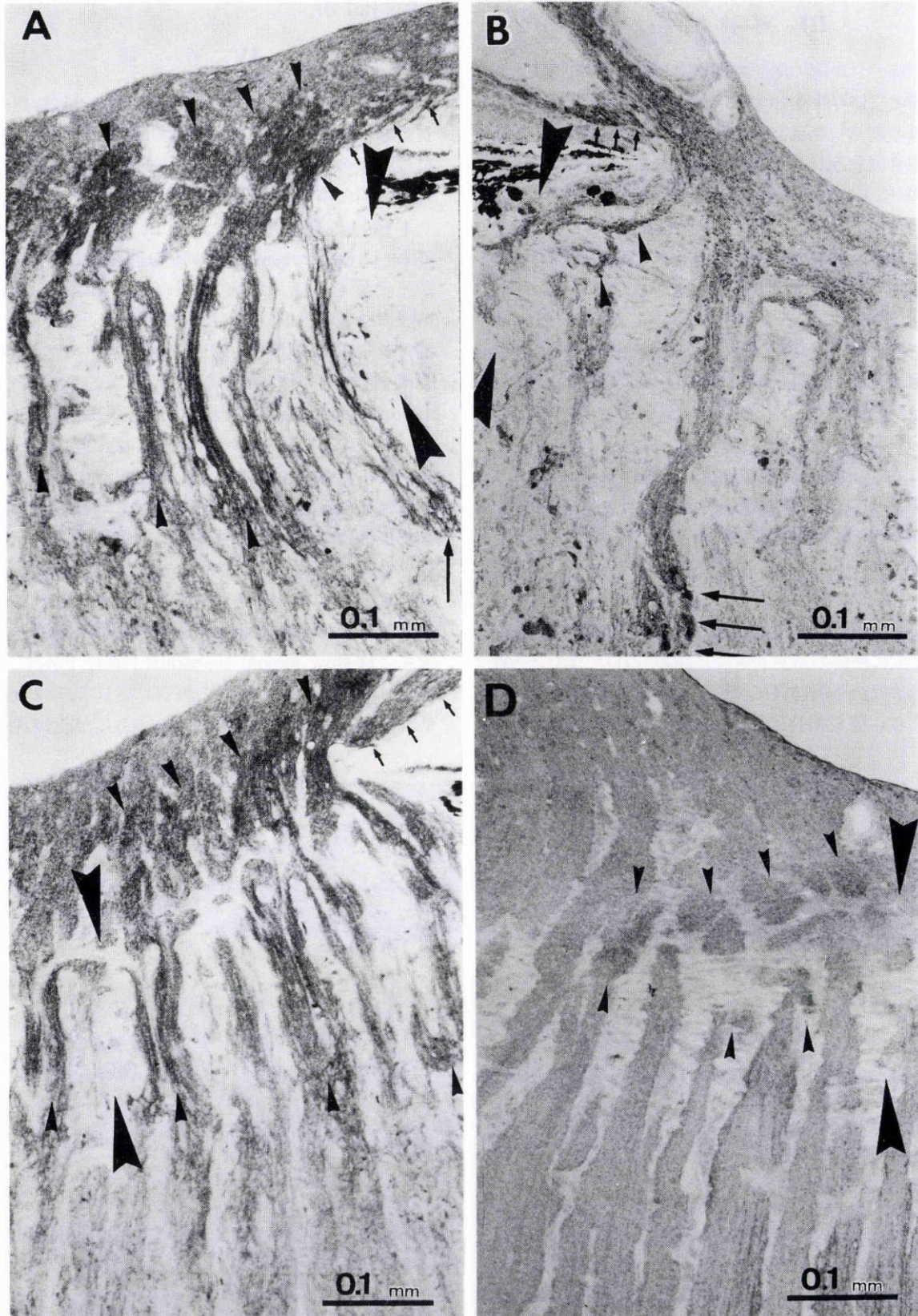


図5 実験緑内障視神経乳頭部位の軸索輸送のオートラジオグラフ(高倍).

A: 硝子体中に標識アミノ酸を注入後 3 日(高度進行期緑内障). B: 硝子体中に標識アミノ酸を注入後 4 日(末期緑内障). C: 硝子体中に標識アミノ酸を注入後 5 日(中~高度進行期緑内障). 乳頭篩状板(大矢じり), 前篩状板, 篩状板, 後篩状板には感光銀粒子の停滞が観察される(図 A, C, 小矢じり). 乳頭篩状板以後の視神経にも感光銀粒子の停滞が観察される(図 A, B, 大矢印). 乳頭縁にも感光銀粒子の集積が観察される(図 A, B, C, 小矢印). D: 正常対照眼の軸索輸送の所見を示す(標識アミノ酸注入後 4 日目). 正常眼では乳頭篩状板部位で軽度の停滞の所見が観察される(小矢じり).

### III 実験結果

それぞれのサル眼の眼圧の経過を図1に示す。また、視神経乳頭の立体写真を図2(3日間の軸索輸送)、図3(4日間に軸索輸送)、図4(5日間の軸索輸送)に示す。それぞれの視神経乳頭は進行期緑内障(図2, 4)あるいは末期緑内障(図3)の乳頭変化を示している。正常では3, 4, 5日のいずれにおいても多量の軸索輸送が視神経全長に前篩状板から観察された(図6A)。正常眼では乳頭篩状板部位での軸索輸送の障害が輸送量が多すぎるためか、あまり明らかではなかった。しかしながら、一部には軽度ながら篩状板部、篩状板前部に軸索輸送の停滞、ばらつきが観察された(図5D, 小矢印, 6A, 矢印)。また、一部に Bruch 膜の延長上に停滞の所見と考えられる感光銀粒子の集積も観察された(図6A, 小矢じり)。一方、実験緑内障眼では乳頭篩状板の変形に対応する軸索輸送の停滞と考えられる所見が認められた(図5A~C, 6B, 7A)。この所見は視神経障害の中等度以上に進行した3日目(図5A)、5日目(図5C)の視神経乳頭でも明らかに観察された。さらに、視神経障害の強い末期の4日目(図5B, 6B, 7A)の組織オートラジオグラフでは変形の強い篩状板部位に停滞の所見が所々に認められた。また、一部に後部篩状板から視神経に移行した部位に軸索輸送の停滞と考えられ得る銀粒子の集積が所々に観察された(図

5B, 6B, 7B)。

### IV 考 按

遅い軸索輸送(slow axonal transport)は、2~4 mm/日の速さを有し、量的には軸索輸送の大部分を占め、質的には軸索の主要構成要素である<sup>9)~11)</sup>。緑内障における視神経萎縮の本体に本輸送の関与が示唆されている。

本輸送の緑内障における研究としては、Levy<sup>2)</sup>が alpha-chymotrypsin をサル眼の前後房に注入し急性の眼圧上昇を発症させ、その際の slow axonal transport の障害を報告している。Gaasterland ら<sup>4)</sup>は今回の我々の報告と同様に、隅角レーザー光凝固を行い、比較的慢性の実験緑内障を作成し、その組織学的所見から slow axonal transport の障害、停滞が強膜篩状板に存在することを報告した。彼らの研究は光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いた主に形態を主体にした検討であり、それによると軸索輸送の停滞、異常は強膜篩状板に局在し、それ以外の篩状板前部、網膜、球後視神経には異常を認めていない。我々も生化学的手法を用いて白色家兎の前後房に alpha-chymotrypsin を注入し眼圧上昇を発症させ、その際の slow axonal transport の変化、異常を報告し、白色家兎では slow axonal transport は眼圧上昇により障害を受けた網膜神経節細胞の障害に応じて、その輸送量の低下が起こることを報告<sup>11)</sup>した。さらに、今回の報告でも

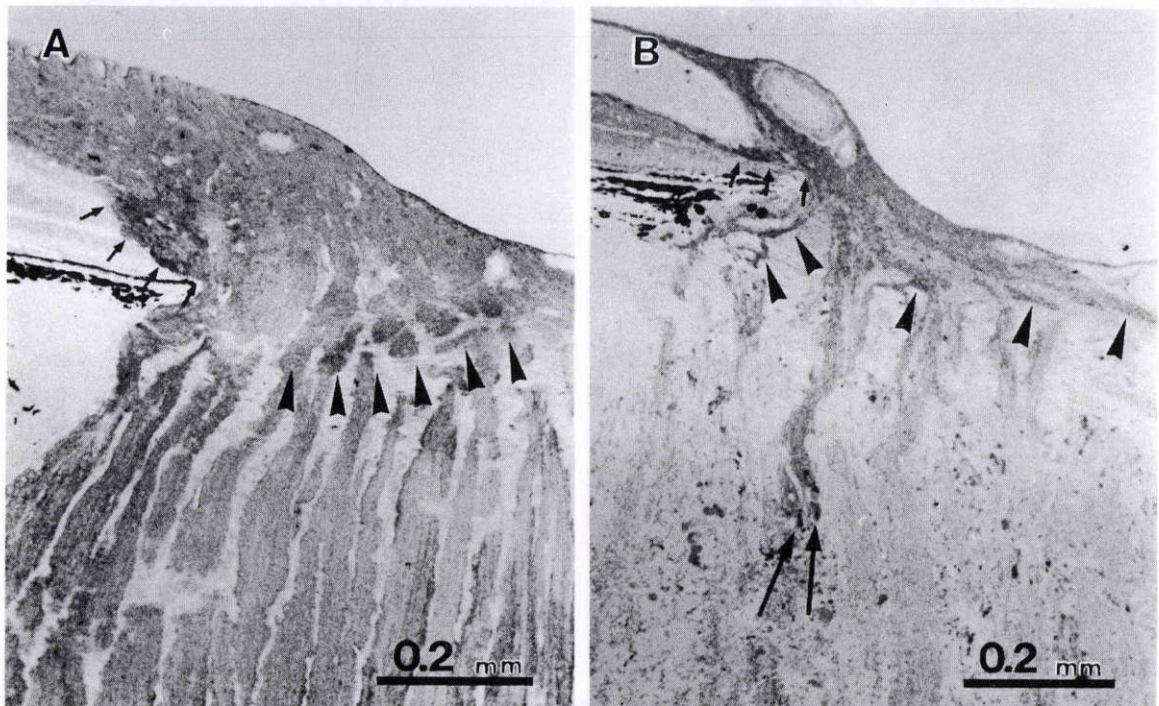


図6 硝子体中に標識アミノ酸注入後4日目の組織オートラジオグラフ(低倍)。

A: 正常眼では乳頭部、篩状板部、球後であまり軸索輸送を示す感光銀粒子の分布に差を認めない。しかしながら Bruch 膜、乳頭縁の付近(小矢印)、強膜篩状板部位(小矢じり)に軽度の感光銀粒子の集積と考えられる所見が観察される。B: 進行した緑内障眼では網膜神経節細胞層ならびに神経線維層の減少による軸索輸送量、すなわち感光銀粒子の減少が明らかである。変形した強膜篩状板の部位に軽度の感光銀粒子の集積が観察される(小矢じり)。また、乳頭篩状板後部の視神経に所々感光銀粒子の停滞の所見が観察される(大矢印)。

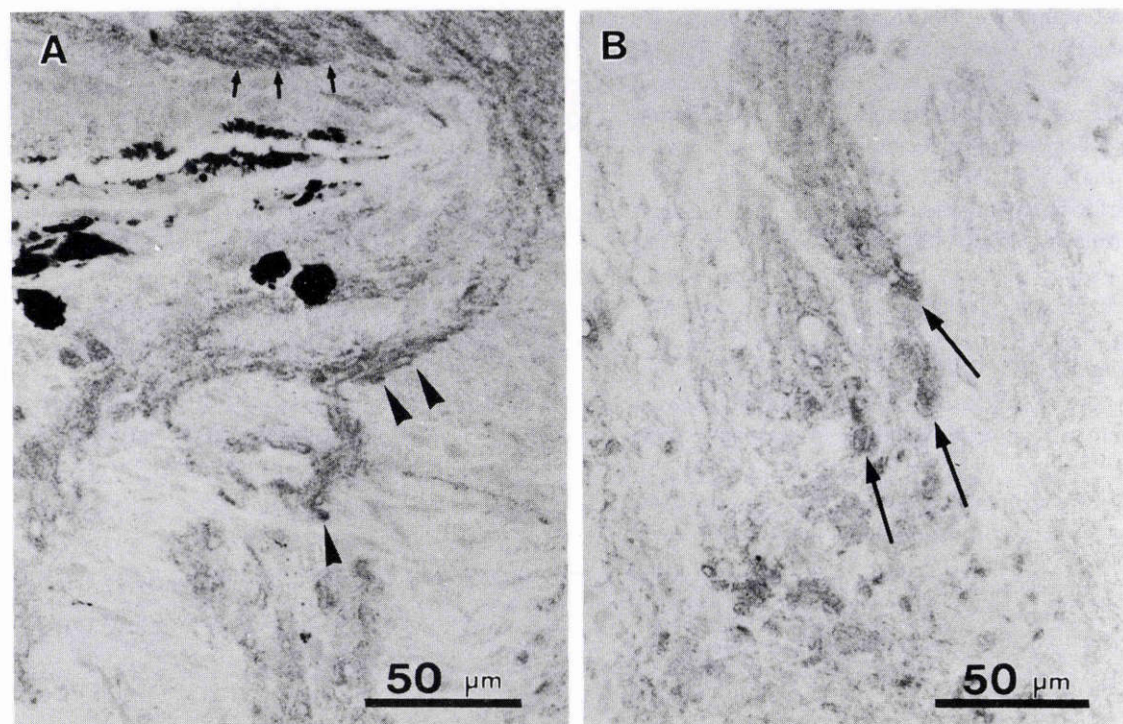


図7 図6Bの高倍所見.

A: 乳頭篩状板部位の軸索輸送の停滞所見(図6Bの拡大所見). 変形した強膜篩状板の所々に軽度ながら感光銀粒子の集積が観察される(小矢じり). 乳頭縁にBruch膜による感光銀粒子の停滞(小矢印)も観察される. B: 篩状板の後部, いわゆる retro-laminar の視神経部位にも感光銀粒子の集積が明らかである(矢印).

示したように, 組織オートラジオグラフはある程度, 軸索の動的な面を表しており, Gaasterland<sup>4)</sup>の報告に比べ, より鋭敏にその異常を検出できたものと考えられる. 近年, 临床上, 健常眼圧には非常に大きい個体差があること, あるいは, 病期の進行とともに健常眼圧がより低値になることが次第に明らかにされてきている. 一方, これまでの軸索輸送の研究は主に正常眼に急性, かつ一過性の眼圧上昇を負荷したり, あるいは薬剤による比較的急性の眼圧上昇を長期間負荷する, いわば正常眼における高眼圧負荷実験が中心であった. 病期の進行とともに変化すると考えられる健常眼圧の問題を考える場合, 既に緑内障を発症している状態での軸索輸送の病態の解明は, この観点からも重要と考えられる. Sakugawa<sup>6)</sup>は fast axonal transport が生理的にも停滞する部位が2か所あることを既に報告している. 今回の検討では, slow axonal transport の生理的停滞は fast axonal transport に比べ軽度であったが, 同様の部位に認められた. また, 実験緑内障の視神経乳頭の軸索輸送の停滞は, 特に乳頭篩状板の変形の強い部位により強く観察された. さらに, 後部乳頭篩状板以後の視神経にも所々軸索輸送の停滞が観察された. 軸索輸送は, 一般に虚血や圧迫, 拘束により容易に障害され, 停滞することが知られているが, この部位は一般に軸索輸送を機械的に障害する可能性は低いわけであるし, また, 乳頭篩状板と異なり血管に異常が起きているとは考えにくい. 今回の研究では,

正常で観察された Bruch 膜の延長上の乳頭縁部, ならびに乳頭篩状板の前部における生理的な軸索輸送の停滞は, より進行した実験眼でより強く現れる傾向があった. また, 正常ではほとんど観察されていない乳頭篩状板に近接した視神経に認められた軸索輸送の停滞は, 緑内障の病期の進行とともに一層明らかとなる傾向を示した. 既に述べたように球後視神経部位では眼圧の因子, あるいは血液の因子は考えにくく, 神経節細胞自身の病的状態を含めた何らかの他の因子が, この乳頭篩状板に近接する視神経部位における軸索輸送の停滞, さらに神経軸索の消耗に関与しているものと推定される.

なお, 本研究は文部省科学研究費補助金(一般研究 C-04671067)の援助を受けた. 記して謝意を表す.

#### 文 献

- 1) Minckler DS, Tso MOM, Zimmerman LE: A light microscopic autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic head during ocular hypotony, increased intraocular pressure and papilledema. *Am J Ophthalmol* 82: 741-757, 1976.
- 2) Levy NS: The effects of elevated intraocular pressure on slow axonal protein flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 691-695, 1974.
- 3) Anderson DR, Hendrickson A: Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 771-783, 1974.

- 4) **Gaasterland D, Tanishima T, Kuwabara T**: Axoplasmic flow during chronic experimental glaucoma. 1. Light and electron microscopic studies of the monkey optic nerve head during development of glaucomatous cupping. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 838—846, 1978.
- 5) **Quigley HA, Anderson DR**: The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15: 606—612, 1976.
- 6) **Sakugawa M, Chihara E**: Blockage at two points of axonal transport in glaucomatous eyes. *Graefe's Arch Clin Ophthalmol* 223: 214—218, 1985.
- 7) **Shirakasi M**: The effect of IOP elevation on optic nerve axonal transport in the monkey. *Acta Ophthalmologica* 68: 37—43, 1990.
- 8) **Fukuchi T, Sawaguchi S, Yue BYJT, Iwata K, Hara H, Kaiya T**: Sulfated proteoglycans in the lamina cribrosa of normal monkey eyes and monkey eyes with laser-induced glaucoma. *Exp Eye Res* 58: 231—244, 1994.
- 9) **Bruce SM, Grafstein B**: Fast and slow components in axonal transport of protein. *J Cell Biol* 38: 494—508, 1968.
- 10) 沢口昭一: 順行性高速軸索輸送の分析. 第1報 正常白色家兎視路における生化学的分析. *日眼会誌* 89: 285—293, 1985.
- 11) 沢口昭一: 実験的眼圧上昇の白色家兎視路の Slow Axonal Transport への影響. *日眼会誌* 90: 321—327, 1986.