

眼球拡大, 眼軸延長に伴う強膜プロテオグリカン

山本 晋, 沢口 昭一, 市辺 幹雄, 須田生英子, 福地 健郎, 阿部 春樹

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

眼球拡大に伴った強膜のプロテオグリカンの形態学的所見を銅色素の cuprolinic blue (CB) で染色し, 電子顕微鏡組織化学的に検討した. 幼弱白色家兎の片眼に alpha-chymotrypsin を注入し, 眼軸延長, 眼球拡大を認めた実験眼と対象の正常眼の赤道部強膜を CB で染色した. また, プロテオグリカン分解酵素の chondroitinase ABC, AC, B を作用させた後, 同様に CB で染色し電子顕微鏡で観察した. 正常眼ではデルマタン硫酸, コンドロチン硫酸の特性を示すプロテオグリカンのフィラメント

構造が観察された. 一方, 実験眼ではコンドロイチン硫酸の特性を示す硫酸基の豊富な大型で異常なフィラメントが多数観察された. 眼球拡大, 眼軸延長に伴う強膜に細胞外マトリックスの一つであるプロテオグリカンに異常が起こることを形態学的に証明した. (日眼会誌 100: 230-234, 1996)

キーワード: 眼球拡大, 眼軸延長, 強膜, プロテオグリカン, キュプロリニックブルー

Proteoglycan Molecules in Scleral tissue of Enlarged Eyeball

Susumu Yamamoto, Shoichi Sawaguchi, Mikio Ichibe,
Kieko Suda, Takeo Fukuchi and Haruki Abe

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

Abstract

We studied scleral specimens from experimentally induced enlarged eyeball with axial elongation by the transmission electron microscopy following cationic dye (cuprolinic blue) staining. The animal model was prepared by the injection of alpha-chymotrypsin into the posterior chamber of young albino rabbits. Cuprolinic blue staining was applied to scleral specimens obtained from equatorial lesion and portions of the scleral tissues were subjected to enzyme digestion by chondroitinase ABC, AC and B before cuprolinic blue staining. In control eyes, dermatan and chondroitin type sulfated proteoglycan filaments were identified. Large, electron dense, and abnormal by shaped proteoglycan

filaments were seen in the transmission electron microscopy. Such abnormal proteoglycan filaments were susceptible to enzyme chondroitinase ABC and AC digestion but resistant to chondroitinase B, suggesting that they are chondroitin sulfate dominant proteoglycans. Our morphological data corroborated a previous biochemical report of abnormally induced proteoglycan molecules in sclera with enlarged, axially elongated eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 230-234, 1996)

Key words: Enlarged eye, Axial elongation, Sclera, Proteoglycan, Cuprolinic blue

I 緒 言

Wiesel ら¹⁾のサルの実験近視モデル以後, 実験近視における眼軸延長機序の解明が進められている. 近年, 細胞外マトリックスの一つであるプロテオグリカンの強膜での異常と近視の発生との関連が報告されている. Rada ら²⁾は雛鳥の眼軸延長に伴う近視の実験モデルにおいて, 強膜プロテオグリカンの異常な増加を生化学的に証

明し報告した. 今回, 我々は幼弱白色家兎を用いた眼球拡大モデルにおける強膜プロテオグリカンの形態学的所見を銅色素の cuprolinic blue (CB) を用いて染色し, 電子顕微鏡組織化学的に検討した.

II 実験方法

実験には幼弱白色家兎(生後約2か月)を用いた. ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)を耳静脈か

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学教室 山本 晋
(平成7年8月15日受付, 平成7年10月30日改訂受理)

Reprint requests to: Susumu Yamamoto, 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 October 1995)

ら静注し、0.4% オキシプロカイン(ペノキシル®)を点眼後に右眼前房に27 G 針を刺入し、前房水約0.3 mlを吸引した後、アルファキモトリプシン(ゾノリジン®)250単位を含む生理食塩水0.5 mlを瞳孔縁から後房内に向かって注入し、吸引と注入を数回繰り返す、全量を注入して終了した。アルファキモトリプシン(ゾノリジン®)注入1か月後に眼球拡大、眼軸伸長を認めた実験家兎を過剰のベントバルビタールナトリウム(ネンブタール®)を耳静脈から注入し、安楽的に屠殺し、眼球を摘出した。正常強膜、実験眼強膜の各々赤道部組織片を採取した。強膜組織は既報³⁾⁻⁵⁾のごとく、2% formaldehyde, 2.5% glutaraldehyde(0.1 M Sorenson's phosphate buffer)で固定し、さらに、細切の後、25 mM sodium acetate, 0.1 M magnesium chloride, 2.5% glutaraldehyde(pH 5.7)で数回洗浄、平衡化した。その後、上記平衡化に用いた固定液で0.05% CB溶液を作成し、室温で一昼夜染色し、0.5% sodium tungstateで洗浄、アルコール系列で脱水した。組織をepon/propylene oxideで浸透、重合後、超薄切片を作成し、酢酸ウランの単染色を施し電子顕微鏡(Hitachi H-7000)で観察した。また、一部の組織片は0.1 M phosphate bufferで洗浄し、CB染色前にグリコサミノグリカン分解酵素のchondroitinase ABC, AC, およびBを用いて酵素消化を行い、プロテオグリカンの生化学的特性についても検討した。それぞれの酵素の反応条件を示す。

(1) Chondroitinase ABC, AC(生化学工業)：まず、トリス緩衝液(0.25 M Tris-HCl, 0.18 M NaCl, 0.05% BSA, 5 mM benzamidine-HCl, 0.1 M 6-aminocaproic acid, pH 8.0)で一昼夜浸透し、次いで同じトリス緩衝液で作成した0.1 unit/ml chondroitinase ABC(37°C)で24時間反応。反応終了後に0.1 モル燐酸緩衝液で洗浄しCB染色を行った。

(2) Chondroitinase B(生化学工業)：同様のトリス緩衝液を用いた。反応温度は30°Cで同様に24時間反応させた。0.1 モル燐酸緩衝液で洗浄後、同様にCB染色し、電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

正常眼強膜(図1 A, B)ではコラーゲン周囲に比較的規則正しく配列した、電子密度のやや低い小型のプロテオグリカンが観察された。また、これよりやや大型、中等度大の電子密度の大きいプロテオグリカンのフィラメント構造が観察された。このプロテオグリカンのフィラメントはchondroitinase ABCではほとんどすべてきれいに消化された(図1 C)。

また、ACでは電子密度の高い中等度大のフィラメントは消失し(図1 D)、Bでは逆に電子密度の高い中等度のフィラメントは残存し、小型のプロテオグリカンのフィラメント構造はほとんど消化されたことがわかる

(図1 E)。このことから、小型の電子密度の低いプロテオグリカンは主にデルマトン硫酸が主成分であり、中等度の大きさの、比較的電子密度の高いプロテオグリカンはコンドロイチン硫酸が主成分であることが示された。

一方、実験眼では小型のプロテオグリカンのフィラメントの配列は乱れ、大型で、極めて電子密度の高い異常なプロテオグリカンのフィラメント構造が観察された(図2 A, B)。また、実験眼の線維芽細胞は、胞体内に活性の亢進と考えられる小胞体が豊富に出現し、また、線維芽細胞内にもこの異常なプロテオグリカンの構造物が観察された(図2 E)。この異常なプロテオグリカンは、そのグリコサミノグリカン酵素消化に対する反応から、主にコンドロイチン硫酸が主成分であることが明らかとなった(図2 C, D, E)。

IV 考 按

プロテオグリカンは結合組織の細胞や線維成分の間を満たしているゲル状の無定形物質、礎質の主要な構成要素の一つである。その構造は二糖類の巨大な重合体(グリコサミノグリカン)が非コラーゲン性タンパク質と結合した巨大分子であり、組織の弾性や柔軟性の維持に重要である。また、コラーゲンやエラスチンの沈着の場を提供し、線維の形成、配列、または、その安定性の維持にはならない⁶⁾。これまでグリコサミノグリカンは多価アニオンであるので、アルシアンブルー、トルイジンブルー、コロイド鉄法などの塩基性色素が組織化学的に用いられ検討されてきた。しかしながら、これらの色素は他の糖蛋白、糖脂質なども染色するため、特異性に乏しい欠点があった。近年、銅色素であるCBによる染色と透過型電子顕微鏡、さらにグリコサミノグリカン分解酵素との組み合わせにより、このプロテオグリカンの生化学的特性とその形態を同時に観察、検討することが可能となった。CBを用いた強膜プロテオグリカンの研究はまだその数は少なく、Young⁷⁾が人間と家兎の強膜を比較検討し、形態に大きな差はなかったと報告している。沢口ら⁸⁾は、さらにchondroitinase ABCとkeratanaseを用いて酵素消化し、家兎のプロテオグリカンはコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸が主な構成要素であり、ケラタン硫酸は証明できなかったと報告した。このプロテオグリカンの強膜における異常として、福地ら⁹⁾はnanophthalmosについて検討し、プロテオグリカンの量的な変化が本症の発症あるいは本症における種々の眼合併症を説明するのに好都合であると報告している。しかしながら、これまでのところ、眼球拡大、眼軸延長を伴う実験近視眼についてCBを用いて検討した報告は我々の知る限りではない。Radaら²⁾は雛鳥の実験近視眼においてプロテオグリカンの異常を生化学的に証明し報告しており、後極部強膜においてグリコサミノグリカンが34%増加したとしている。今回、我々は眼軸の延長に眼圧が大きく関与し

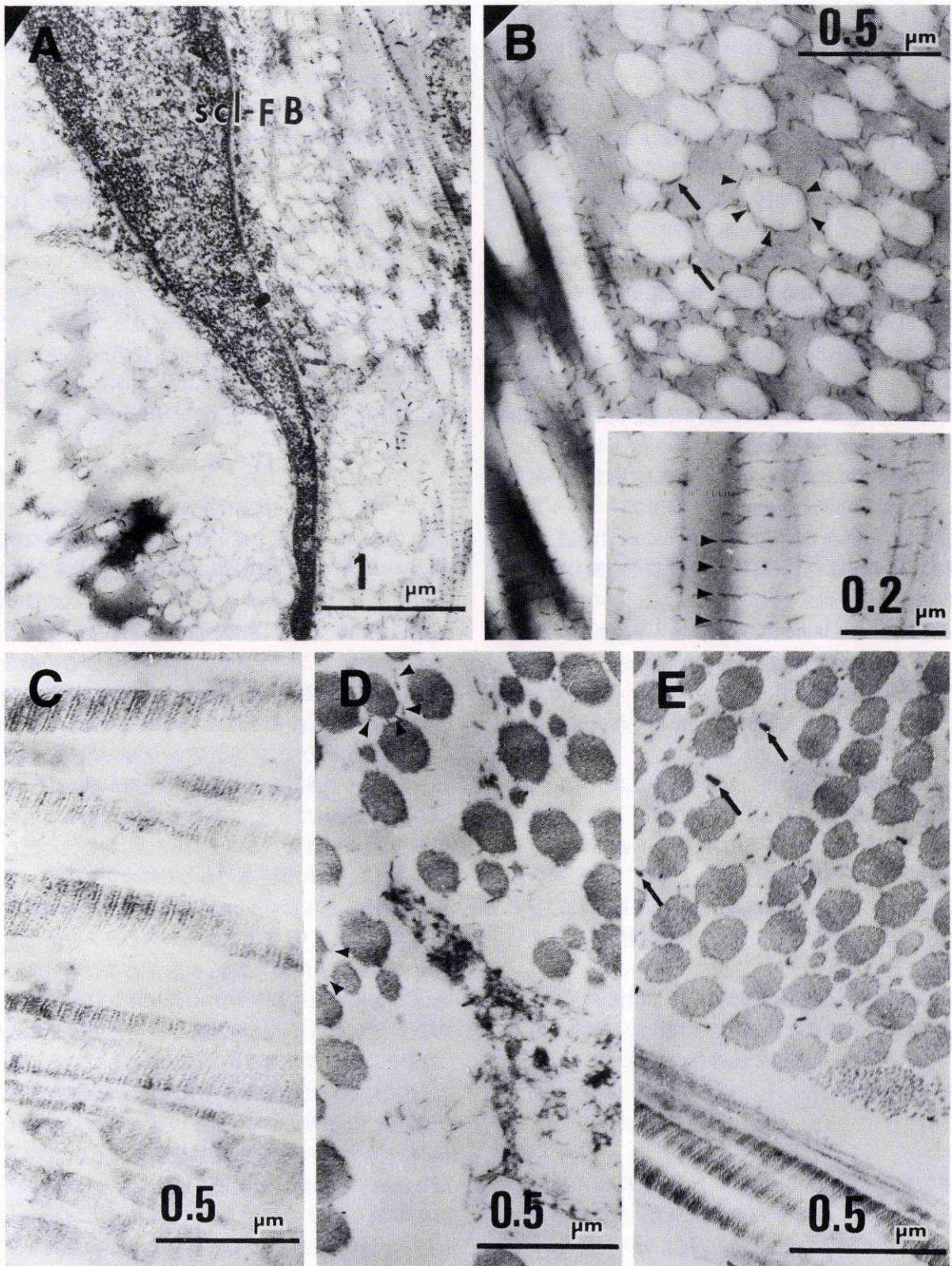


図 1

A: 正常眼強膜を cuprolinic blue (CB) 染色した電子顕微鏡写真, scl-FB: 強膜線維芽細胞. B: 同左の高倍所見, コラーゲン線維の周囲に規則的に配列する小型のプロテオグリカン(矢じり), 散在するコラーゲン線維間を連絡する中等度の大きさで電子密度のやや高いプロテオグリカン(矢印)が観察される. C: Chondroitinase ABC で消化した後に CB で染色した, 小型, 中等度の両者のプロテオグリカンはほとんど完全に消化, 除去されている. D: Chondroitinase AC で前処理した後に CB で染色した, 小型で電子密度の低いプロテオグリカンが観察され(矢じり), 中等度の大きさで電子密度の高いプロテオグリカンはほとんど観察されない. E: Chondroitinase B で消化し CB で染色した, 中等度の大きさで電子密度のやや高いプロテオグリカンが観察される(矢印), また, 小型のプロテオグリカンも完全には消化されずにわずかながら観察される.

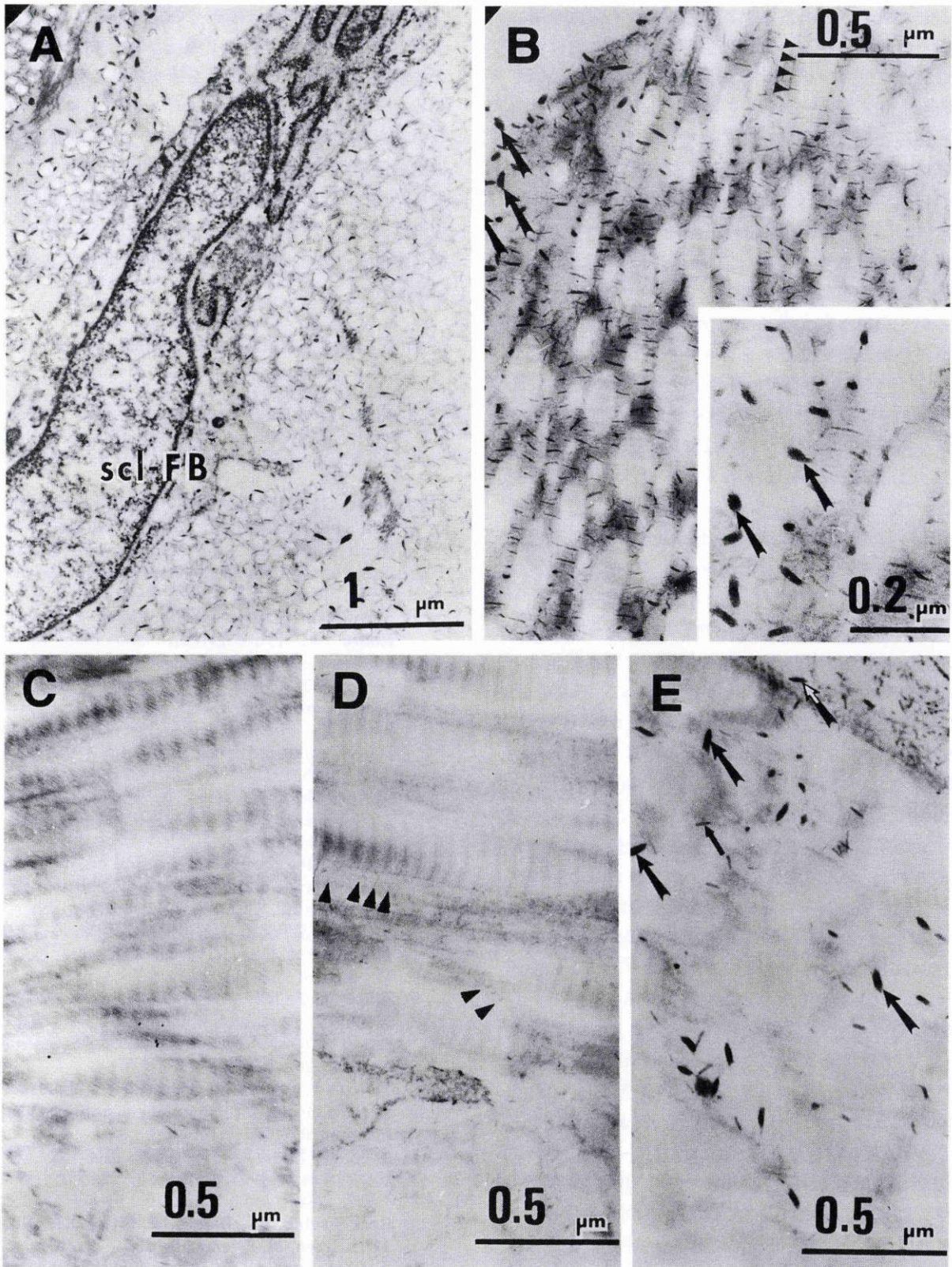


図 2

A: 実験眼強膜の CB 染色所見. 強膜線維芽細胞 (scl-FB) 内には小胞体が豊富に観察される. 大形で電子密度の高いプロテオグリカンのフィラメントが多数観察される. B: 小型のプロテオグリカンは配列が乱れ, またやや大形化, さらに電子密度の亢進がみられる. 異常に大形で高電子密度のプロテオグリカンが多数観察される (大矢印). C: Chondroitinase ABC で消化し CB で染色した. 正常眼 (図 1 C) と同様ほぼすべてのプロテオグリカンのフィラメントは消失している. D: Chondroitinase AC で処理し, 次いで CB で染色した. 小型で低電子密度のプロテオグリカンが観察される (矢じり). 大形, あるいは中等度の大きさのプロテオグリカンはすべて消化され観察されない. E: Chondroitinase B で消化し, 次いで CB 染色した. 中等度のプロテオグリカン (小矢印) と異常で大形のプロテオグリカン (大矢印) が消化されずに観察される. また, 線維芽細胞内にも異常なプロテオグリカンが観察される (白抜き矢印).

ているとの報告¹⁰⁾もあることから、幼若白色家兎を用いた眼圧上昇による眼球拡大、眼軸延長モデルにおける強膜プロテオグリカンの生化学的、形態学的変化についてCB染色およびグリコサミノグリカン分解酵素処理により電子顕微鏡(電顕)組織化学的に検討した。実験には眼圧上昇における眼球の伸展、変化は赤道部において著しいとの報告¹¹⁾に基づいて赤道部強膜を用いた。Young⁷⁾、沢口ら⁸⁾は正常家兎の強膜の構築を我々と同様にCBを用いて電顕的に観察し報告している。それによると、コラーゲン線維間を放射状に連絡するプロテオグリカン、コラーゲン線維を取り巻くプロテオグリカン、コラーゲン線維の長軸方向に位置するプロテオグリカンが観察されている。今回我々は前者の2つのタイプ、すなわち、多数の小型のプロテオグリカン、散在する中等度大のプロテオグリカンを観察できた。さらに、この研究ではプロテオグリカンの分解酵素を作用させた後、同様の観察を行った。

今回用いた分解酵素はchondroitinase ABC, AC, Bの3種類であるが、ABCはコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸を、ACは主にコンドロイチン硫酸を、また、Bはデルマトン硫酸を比較的特異的に分解する作用を有する。これらの分解酵素の組み合わせでプロテオグリカンの生化学的特性を同定することが可能である。その結果、正常強膜では小型のプロテオグリカンはchondroitinase ABCおよびchondroitinase Bで消化分解され、中等度大のフィラメントはchondroitinase ABCとchondroitinase ACで消化された。このことから、前者はデルマトン硫酸が、後者はコンドロイチン硫酸が主成分と考えられた。過去に強膜のプロテオグリカンとしてデルマトン硫酸とコンドロイチン硫酸が生化学的に証明されており¹²⁾、また、沢口ら⁸⁾の研究でも同様の結果であった。今回の結果は、さらに詳細にプロテオグリカンの形態と生化学的特性を明らかにしたものである。

実験眼では大型で、異常なプロテオグリカンが観察された。このプロテオグリカンはchondroitinase ABC, ACで消化されコンドロイチン硫酸の性質を示した。また、小型のプロテオグリカンにも配列の乱れ、大形化などの異常が観察された。また、一部にはコラーゲン線維の細小化の所見も散見された。これまでも実験近視眼でコラーゲン線維の細小化および、線維間隙の拡大などが報告¹³⁾されてきたが、線維間をつなぎ合わせているプロテオグリカンの異常がこれらのコラーゲン線維の異常に関与している可能性がある。須田ら¹⁴⁾は同一実験系において細胞外マトリックス分解酵素の発現について検討し、眼球拡大、眼軸延長などの際には強膜組織における組織修復に関与する酵素群に種々の変化、異常が発現されることを報告した。今回、実験眼においては正常では認められない線維芽細胞内にもプロテオグリカンが観察され

た。プロテオグリカンは線維芽細胞で合成され、分泌されるが、この所見はプロテオグリカンの代謝過程で何らかの異常、変化が起こったことを示す所見と考えられる。今回我々は眼球拡大、眼軸延長に伴う強膜プロテオグリカンの変化、異常について、これまでの生化学的な報告を電顕組織化学的手法を用いて形態学的にも証明することができた。プロテオグリカンのこのような変化、異常は組織の弾性、強度に影響を与え、強膜組織の一層の脆弱化を惹起し眼軸延長などの病的近視の進展に関与する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Wiesel TN, Raviola E: Myopia and eye enlargement after neonatal lid fusion in monkeys. *Nature* 266: 66-68, 1977.
- 2) Rada JA, Thoft RA, Hassell JR: Increased aggrecan (cartilage proteoglycan) production in the sclera of myopic chicks. *Dev Biol* 147: 303-312, 1991.
- 3) Scott JE, Haigh M: "Small"-proteoglycan: Collagen interactions: Keratan sulfate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the "a" and "c" bands. *Biosci Rep* 5: 765-766, 1985.
- 4) Sawaguchi S, Yue BYJT, Chang I, Sugar J, Robin J: Proteoglycan molecules in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1846-1853, 1991.
- 5) Sawaguchi S, Yue BYJT, Fukuchi T, Iwata K, Kaiya T: Sulfated proteoglycans in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2388-2398, 1992.
- 6) 梶川鉄一郎: 礎質. 清寺 眞, 他(編): 人体組織学 2. 結合組織. 皮膚とその付属器. 朝倉書店, 東京, 45-50, 1984.
- 7) Young RD: The ultrastructural organization of proteoglycans and collagen in human and rabbit scleral matrix. *J Cell Sci* 74: 95-104, 1985.
- 8) 沢口昭一, 福地健郎, 阿部春樹, 岩田和雄, 海谷忠良: 強膜プロテオグリカンの分布と特性. *あたらしい眼科* 9: 1561-1564, 1992.
- 9) 福地健郎, 沢口昭一, 本田徳弼, 斎藤達也, 飯塚裕子, 岩田和雄, 他: Nanophthalmosの1例の強膜に見られたプロテオグリカンの異常について. *日眼会誌* 97: 260-267, 1993.
- 10) Tokoro T, Funata M, Akazawa Y: Influence of intraocular pressure on axial elongation. *J Ocular Pharmacol* 6: 285-291, 1990.
- 11) 山名敏子, 西村みえ子, 石橋達明, 猪俣 孟: 眼軸伸展に伴う網膜変性の実験的研究. *日眼会誌* 88: 764-772, 1984.
- 12) Borcherdig MS, Black LJ, Sittig RA, Bizzell JW, Breen M, Weinstein HG: Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneal scleral tissue. *Exp Eye Res* 21: 59-70, 1975.
- 13) 所 敬: 強度近視の眼軸延長機転と網膜脈絡膜萎縮. *日眼会誌* 98: 1213-1237, 1994.
- 14) 須田生英子, 沢口昭一, 市辺幹雄, 岩田和雄, 阿部春樹: 眼軸伸展に伴う強膜のmatrix metalloproteinaseならびにtissue inhibitor of metalloproteinaseの発現の変化. *日眼会誌* 99: 23-28, 1995.