水晶体胞分離過程の組織化学的検索

水野 晋一¹),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

マウスの水晶体胞分離過程におけるグリコサミノグリ カン分子種の分布を組織化学的に検索した、妊娠10.5日 および11日にJcl: ICR マウスの母獣を屠殺し、得られ た胎芽を使用した、前頭断連続切片を作成し、ヘマトキシ リン・エオジン染色および増感高鉄ジアミン染色を行っ た.また、組織に分布するグリコサミノグリカン分子種を 同定するために増感高鉄ジアミン染色に酵素消化法 (chondroitinase B, testicular hyaluronidase 二重酵素 消化法)および化学修飾法(亜硝酸処理法)を併用した、水 晶体胞分離前には、将来の角膜上皮基底膜および前眼部 約

間葉細胞の間質にはコンドロイチン硫酸 A/C と B が, 水晶体嚢にはコンドロイチン硫酸 A/C が存在した.分離 後には,将来の角膜上皮基底膜および前眼部間葉細胞の 間質にはヘパラン硫酸も出現した.これらの所見から,水 晶体胞分離過程にはグリコサミノグリカン分子種の変化 が重要な役割を果たしていると考えられた.(日眼会誌 101:46-51,1997)

キーワード:水晶体胞分離,組織化学,グリコサミノグリ カン, ICR マウス,光学顕微鏡

Histochemical Studies on the Separation of the Lens Vesicle

Shin-ichi Mizuno¹⁾, Kozo Ikeda¹⁾, Akio Majima¹⁾, Yoshifumi Hirabayashi²⁾ and Kazuyori Yamada²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School ¹⁾Department of Anatomy, Nagoya City University Medical School

Abstract

We studied histologically the changes and distribution patterns of glycosaminoglycan molecular species during the separation of the lens vesicle in the mouse. Embryos were obtained by sacrificing pregnant mice of the Jcl: ICR strain on day 10.5 and 11 of pregnancy. Serial frontal sections were stained with hematoxylin-eosin and a sensitized high iron diamine method. To identify glycosaminoglycan molecular species in tissues, enzyme digestion (double digestions with chondroitinase B and testicular hyaluronidase) and chemical modification (nitrous acid treatment) were performed in combination with the sensitized high iron diamine method. Before separation of the lens vesicle, the glycosaminoglycan molecular species, identified in the basement membrane of the presumed corneal epithelium and intercellular matrices between the

I 緒 言

前眼部は,表面外胚葉から水晶体胞が分離した後,両者

presumed corneal epithelium and lens vesicle, were chondroitin sulfate A/C and B, and those in the lens capsule were chondroitin sulfate A/C. After separation of the lens vesicle, heparan sulfate emerged in the basement membrane of the presumed corneal epithelium and intercellular matrices between the presumed corneal epithelium and lens vesicle. These results are thus taken to indicate that the changes and distribution patterns of glycosaminoglycan molecular species play an important role during separation of the lens vesicle. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 46-51, 1997)

Key words : Separation of lens vesicle, Histochemistry, Glycosaminoglycans, ICR mice, Light microscopy

の間に遊走する神経提由来の細胞,表面外胚葉,神経外胚

葉および中胚葉が相互に作用を及ぼしながら分化,発育

して形成される".水晶体胞の分離は、ヒトでは胎生33

別刷請求先:467 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 水野 晋一 (平成8年2月6日受付,平成8年9月11日改訂受理)

Reprint requests to: Shin-ichi Mizuno M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School. 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan (Received February 6, 1996 and accepted in revised form September 11, 1996)

日¹,マウスでは胎生11日²に起こり,前眼部の形成に重 要な過程の一つである.この水晶体胞の分離過程は,従来 から細胞学的³⁾および複合糖質の組織化学的⁴⁾に検索さ れてきたが,十分には解明されていない.

細胞外マトリックスを構成する重要な分子の一つであ るグリコサミノグリカン分子種(GAGs)は胎生期から 種々の組織に広く分布し,細胞や組織の接着,分離,遊走, 分化などに重要な役割を果たしていることが明らかにさ れてきた⁵⁾⁶⁾しかし,水晶体胞分離過程における GAGs の変化を詳細に検討した報告はない.

今回,我々は水晶体胞分離過程の機序を解明するため に,眼部発生過程が比較的よく知られており,ヒトとの比 較が容易な Jcl: ICR マウスを用いて,水晶体胞分離前後 の前眼部組織における GAGs の分布とその変化を光学 顕微鏡を用い組織化学的に検索した.

II実験方法

1. 実験動物

実験動物として, Jcl: ICR マウスを用いた.発情期の 健康な雄と未経産で発情期の雌各一匹を同一飼育箱に一 晩入れ,翌朝膣栓を認めたものを妊娠0日とした.水晶体 胞分離前後の胎芽を観察するために妊娠10.5日および 11日の母獣を屠殺し,胎芽(水晶体胞分離前の20胎芽と 分離後の20胎芽)を摘出後直ちにBouin液に浸漬して 室温(18~20°C)で一週間固定した後,頭部を切断した.組 織塊をエタノール系列で脱水後,キシレンで透徹してパ ラフィンに包埋した.厚さ2μmの前頭断連続切片を作 成し,ゼラチンスライドに貼付した.切片を脱パラフィン し水和した後,以下の染色を施した.

2. 染色法

1) ヘマトキシリン·エオジン(HE)染色

水和切片を Hansen のヘマトキシリン液で室温で10 分浸漬した後,15分流水で水洗した.次に,同切片をエオ ジン液に室温で10分浸漬して染色し,エタノール系列で の脱水およびキシレンでの透徹の後,Harleco synthetic resin(HSR)液(国際試薬,神戸)を用いて封入した.

2) 増感高鉄ジアミン(sensitized high iron diamine: S-HID)染色⁷⁾

水和切片を高鉄ジアミン液に36℃で60分浸漬した 後,0.5 mMトリクロロ(エチレン)白金酸カリウム溶液 に室温で60分浸漬した.続いて,同切片を0.2%水素化 ホウ素ナトリウム溶液で10~30秒還元した後,物理現像 液に20℃で3~10分反応させた.染色した切片を水洗し てエタノール系列で脱水し,キシレンで透徹した後, HSR 液で封入した.

3. 選択的方法

一部の組織切片には,S-HID染色に先立って,酵素消 化法または化学修飾法を併用した. 1) 酵素消化法

Chondroitinase (Chase) B/testicular hyaluronidase (T-hylase) 二重消化法⁸⁾⁹⁾を行った.水和切片を 0.1 U/ ml の濃度で Chase B(Flarobacterium heparinum, 生化 学工業)を含む 0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に 30°Cで 18~22 時間浸漬し,次いで, 1 mg/ml の濃度で T-Hylase (Bovine testis, Type VIII, Sigma Chem., St Louis, 米国)を含む 0.1 Mリン酸塩緩衝液 (pH 5.5)に 36°Cで 18~22 時間浸漬した (Chase B 消化/T-hylase 消 化/S-HID).また対照群として,連続する 2 枚の切片を準 備し, 1 枚は Chase B 消化後に T-Hylase を含まないト リス塩酸緩衝液に (Chase B 消化/S-HID), 1 枚は Chase B または T-Hylase のいずれも含まない緩衝液に同温度 で同時間浸漬した (Buffer/S-HID).

2) 化学修飾法

亜硝酸(HNO₂)処理法¹⁰⁾を行った.水和切片を 0.24 M 亜硝酸ナトリウム含有 1.8 M 酢酸溶液に室温で 100 分 浸漬した(HNO₂/S-HID).また対照群として,連続した 切片を亜硝酸塩を含まない 1.8 M 酢酸溶液に HNO₂処 理法と同温度で同時間浸漬した(Control/S-HID).

III 結 果

1. HE染色結果

胎生10.5日の胎芽では、一層の扁平細胞から成る将来 の角膜上皮と高円柱細胞で構成される水晶体胞が水晶体 茎で連続していた(図1).水晶体胞の内腔には、少数の変 性した細胞がみられた(図1).将来の角膜上皮と水晶体 胞の間には、少数の紡錘型の細胞が観察された(図1).

胎生11日の胎芽では水晶体茎が消失し,多層化した将 来の角膜上皮と水晶体胞は分離していた(図7).分離後 には胎生10.5日の胎芽で少数みられた紡錘形の細胞は 増加し,将来の角膜上皮と水晶体胞の間に密に分布して いた(図7).水晶体胞の内腔には,胎生10.5日の胎芽で 観察されたのと同様に少数の変性した細胞が存在した (図7).

2. S-HID の染色結果

胎生10.5日の胎芽にS-HID 染色を行うと,将来の角 膜上皮基底膜と水晶体囊は黒色に染色された.また,将来 の角膜上皮と水晶体胞の間の間質は網状を呈する黒褐色 から黒色の強い染色性を示した(図2).Chase B 消化法 を施すと,将来の角膜上皮基底膜および同基底膜と水晶 体胞の間の間質のS-HID 染色性は中等度から顕著に減 弱したが,水晶体囊のS-HID 染色性に変化はみられな かった(図3).Chase B/T-Hylase 二重消化法を施すと, 上述のS-HID 陽性組織構造の同染色性は顕著に減弱す るか,または陰性化した(図4).同組織に HNO₂処理法 を施しても将来の角膜上皮基底膜,水晶体囊および角膜 上皮と水晶体胞の間の間質の同染色性には顕著な変化は みられなかった(図5,6).

日眼会誌 101巻 1号

Chase B 消化法を施すと,将来の角膜上皮基底膜および 同上皮と水晶体胞の間の間質の S-HID 染色性が中等度 から顕著に減弱し,水晶体嚢の同染色性は軽度から中等 度に減弱した(図9).同組織に Chase B/T-Hylase 二重 消化法を行うと,上述のすべての S-HID 陽性組織構造の

胎生11日の胎芽にS-HID 染色を施すと,将来の角膜 上皮基底膜,水晶体囊ならびに将来の角膜上皮と水晶体 胞の間の間質は黒褐色から黒色の強い染色性を示した (図8).将来の角膜上皮と水晶体胞の間の網状を呈する 間質の染色性は胎生10.5日に比較して増加していた.



図 1~6 は胎生 10.5 日の胎芽の前眼部を示す. バーは 30 μm

- 図1 ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色.
- A:将来の角膜上皮, B:将来の角膜上皮と水晶体胞の間の間質, C:水晶体胞, D:水晶体茎
- 図 2 Buffer/S-HID (sensitized high iron diamine) 染色.
- 図3 Chase B 消化/S-HID 染色.
- 図4 Chase B 消化/T-Hylase 消化/S-HID 染色.
- 図5 Control/S-HID 染色.
- 図6 HNO₂処理/S-HID 染色.

平成9年1月10日

同染色性は顕著に減弱するか,または陰性化した(図 10).胎生11日の眼部組織にHNO₂処理法を行うと,将 来の角膜上皮基底膜のS-HID染色性は中等度から顕著 に減弱し,将来の角膜上皮と水晶体胞の間の間質の同染 色性も軽度から中等度に減弱したが,水晶体囊の同染色 性に変化は認められなかった(図11,12).

IV 考 按

Silver ら¹¹は胎生期ラットの眼茎, 眼胞, 表面外胚葉お よび水晶体胞などに出現する変性細胞の局在を観察し, 眼の発生過程における細胞死の分布とその経時的変化に ついて検討した. その後, Garcia ら³¹はニワトリ胚の水晶



図7~12は胎生11日の胎芽の前眼部を示す.

- バーは 30 µm
- 図7 HE 染色.
- 図 8 Buffer/S-HID 染色.
- 図 9 Chase B 消化/S-HID 染色.
- 図 10 Chase B 消化/T-Hylase 消化/S-HID 染色.
- 図11 Control/S-HID 染色.
- 図12 HNO₂処理/S-HID 染色.

体胞分離過程で観察された細胞死の分布について報告し た.これらの報告は,水晶体胞分離過程で,水晶体茎なら びに同組織に連続した角膜および水晶体胞の上皮細胞に 細胞死が起きるとともに,周囲の正常な上皮細胞が死細 胞を貪食することによって水晶体茎が消失することを示 した.しかし、本研究では水晶体胞分離過程で、核の濃縮、 崩壊,空胞化などの細胞変性を示唆する所見は確認でき なかった.本研究で細胞変性が確認できなかった理由と しては,水晶体茎の消失の直前と直後の観察しか行わな かったためと考えられる.マウスで細胞変性を確認する ためには、このような限定した時期での観察ではなく、さ らに幅広い時期を細かく観察することが必要と思われ 3.

近年,毛様体の発生過程や胎生裂の閉鎖過程などで組 織,細胞の分化に細胞外マトリックスが重要な役割を果 たしていること12)13)が示されたが,水晶体胞分離過程と 細胞外マトリックスの関係を示した報告は少ない. Meier¹⁴⁾はニワトリ胚を用いて水晶体胞が角膜上皮から 分離する前に角膜上皮下にヒアルロン酸が局在すること を指摘したが、水晶体胞分離過程における GAGs の役割 については言及していない. Cook ら⁴は水晶体胞の分離 する時期に変性細胞がコラゲナーゼを分泌し、また、同時 期にラミニンとフィブロネクチンが分離面に介在して水 晶体茎と水晶体胞を分離させるように作用することを示 した.

本研究で使用した,S-HID 法は硫酸酸性複合糖質の鋭 敏な検出法であり, Chase B/T-Hylase 二重消化法また はHNO2処理法との併用により、組織中に含まれるコン ドロイチン硫酸(CHS)A/C,Bおよびヘパラン硫酸 (HS)の局在を特異的に検出することができる.これら の反応特異性および本研究の結果を表1に示す.

CHS 異性体には細胞―間質間の接着阻害作用15, コ ラーゲン線維の結合作用16)ならびに神経堤細胞の移動阻 害作用¹⁷⁾などがあることが知られている。一方, HS は細 胞一間質間の接着作用に促進的に働く18)とともに,早期 の神経堤細胞の遊走を惹起することいなどが報告されて

反

いる.現在までに知られているこれらの GAGs の機能に 基づいて本研究で得られた結果を考察すると,水晶体胞 分離過程の機序は以下のように考えられる.水晶体胞分 離直前には,将来の角膜上皮基底膜,水晶体嚢および前眼 部間葉細胞の間質に細胞接着阻害作用と神経堤細胞の遊 走阻害作用のある CHS 異性体が存在する、水晶体胞が 分離する前の前眼部に細胞接着阻害作用を示す CHS 異 性体が存在することは,表面外胚葉から水晶体胞が分離 するために好適な環境となっていると推測される.また、 水晶体胞分離後には角膜内皮を形成する神経堤細胞の第 一波が遊走するが,この時期に一致して将来の角膜上皮 基底膜および前眼部間葉細胞の間質に神経堤細胞の早期 の遊走を惹起する HS が出現することは,前眼部の形成 過程の中で組織発生が適切な順序で進行するために重要 な役割を果たしていると考えられる.

また,成熟水晶体囊の主要な構成成分としてIV型コ ラーゲンとHSが確認されている19)が、本研究では、水晶 体胞分離前の水晶体囊にはCHS-A/Cが,分離後には CHS-A/Cの他にCHS-BもみられたがHSは存在しな かった.水晶体嚢は水晶体板が誘導される時期から形成 が始まり,水晶体の形成後も肥厚を続けて成熟する20).し たがって,水晶体胞が分離する時期は水晶体嚢が形成さ れる初期の段階と考えられ,本研究でHSが存在しな かったことは、この時期の水晶体嚢の未熟性と関連して いると推察される.また,この時期は神経堤細胞の遊走や 組織相互作用が活発な時期であり¹⁾,水晶体囊に CHS 異 性体が存在することは,水晶体胞に他の組織や間葉細胞 が接着しないように作用していると考えられる。

以上から,水晶体胞の分離とそれに続く神経堤細胞の 遊走および他の組織との組織相互作用が円滑に進行し前 眼部が形成されるために,水晶体胞分離前後に前眼部に 存在する GAGs が重要な役割を果たしていると考えら れる

本論文の要旨は第99回日本眼科学会総会で発表した.本研 究は,平成7年度文部省科学研究費一般研究(課題番号 05404059)の援助を受けたことを付記し、感謝の意を表しま

度に減弱

		Chase B/S-HID		Chase B/T-Hylase S-HID		HNO ₂ /S-HID	
反応特異性		コンドロイチン硫酸Bを 除去		コンドロイチン硫酸 ABCを除去		ヘパラン硫酸を除去	
		胎生 10.5 日	胎生 11 日	胎生 10.5 日	胎生 11 日	胎生 10.5 日	胎生 11 日
a.	将来の角膜 上皮基底膜	中等度~ 顕著に減弱	中等度~ 顕著に減弱	顕著に減弱	顕著に減弱	変化なし	中等度~ 顕著に減弱
b.	水晶体囊	変化なし	軽度~中等 度に減弱	顕著に減弱	顕著に減弱	変化なし	変化なし
a z	: b の間の 間質	中等度~ 顕著に減弱	中等度~ 顕著に減弱	顕著に減弱	顕著に減弱	変化なし	軽度~中等

表1 水晶体胞分離過程における前眼部の組織化学的検索

Chase B: chondroitinase B消化, S-HID: sensitized high iron diamine 染色, T-Hylase: testicular hyaluronidase 消化, HNO2: 亜硝酸処理.

平成9年1月10日

す.また,本研究の英語論文はJpn J Ophthalmol 39: 340-346,1995に掲載されている.

This paper was published in the Japanese Journal of Ophthalmology, Vol. 39: 340-346, 1995. The copyright to this paper is owned by the Japanese Journal of Ophthalmology. For permission to reproduce any portion of the text or any photos or data charts, contact the above publication at Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School. 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan.

Fax: 052-841-9490

文 献

- Cook CS, Ozanics V, Jakobiec FA: Prenatal development of the eye and its adnexa, In: Tasman W, et al (Eds): Foundation of Clinical Ophthalmology, Vol 1, Ocular Anatomy, Embryology and Teratology, Chap 2, Philadelphia, JB Lippincott Company, 1—93, 1991.
- Pei YF, Rhodin JAG: The prenatal development of the mouse eye. Anat Rec 168: 105-126, 1970.
- 3) Garcia-Porrero JA, Colvee E, Ojeda J: The mechanism of cell death and phagocytosis in the early chick lens morphogenesis: A scanning electron microscopy and cytochemical approach. Anat Rec 208: 123–136, 1984.
- Cook CS, Sulik KK: Laminin and fibronectin in rentio-induced keratolenticular dysgenesis. Invest Ophthalmol Vis Sei 31: 751-757, 1990.
- 5) 大平敦彦:細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテ オグリカンの構造と機能.代謝 21:305-313,1984.
- Ruoslahti E: Proteoglycans in cell regulation (minireview). J Biol Chem 264: 13369-13372, 1989.
- Hirabayashi Y: Light-microscopic detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedures. Histochem J 24: 409-418, 1992.
- Ototani N, Yoshizawa Z: Purification of chondroitinase B and chondroitinase C using glycosaminoglycan-bound AH-Sepharose 4B. Carbohyd Res 70: 295-306, 1979.
- Leppi TJ, Stoward PJ: On the use of testicular hyaluronidase for identifying acidic mucins in tissue sections. J Histochem Cytochem 13: 406—

407, 1965.

- 10) Hirabayashi Y, Shimizu S, Yamada K: A nitrous acid procedure as a selective histochemical means of eliminating the N-sulphates of glycoconjugates. Histochem J 21: 687-692, 1989.
- Silver J, Hughes AWF: The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. J Morph 140: 159-170, 1973.
- Ikeda K, Hirabayashi Y: Histological and histochemical studies on developing ciliary body in eye of ICR mouse. Jpn J Ophthalmol 36: 388-400, 1992.
- 13) Ikeda K, Shirai S, Majima A, Hirabayashi Y, Yamada K: Histological and histochemical studies of the normal and faulty closure of the embryonic fissure in the eye of ICR mouse. Jpn J Ophthalmol 39: 20-29, 1995.
- Meier S: Initiation of corneal differentiation prior to cornea-lens association. Cell Tiss Res 184: 255-267, 1977.
- 15) Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K: Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans by proteoglycans immobilized on extracellular substrares. J Biol Chem 264: 8012-8018, 1989.
- 16) Scott JE, Orford CR, Hughes EW: Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. Biochem J 195: 573-581, 1981.
- 17) Perris R, Johansson S: Amphibian neural crest cell migration on purified extracellular matrix components: A chondroitin sulphate proteoglycan inhibits locomotion on fibronectin substrates. J Cell Biol 105: 2511-2521, 1987.
- 18) Lark MW, Colp LA: Turnover of heparan sulphate proteoglycans from substratum adhesion sites of murine fibroblasts. J Biol Chem 259: 212– 217, 1984.
- 19) Laurent M, Romquin N, Regnault F: Purification and identification of a glycosaminoglycan in the lens capsule of bovines: Its variation during aging. Interdiscipl Topics Geront 12: 71-79, 1978.
- 20) Silver PHS, Wakely J: The initial stage in the development of the lens capsule in the chick and mouse embryos. Exp Eye Res 19: 73-77, 1974.