

連続光照射により網膜に引き起こされるアポトーシスおよび 細胞増殖反応に対するラット週齢の影響

上原 文行, 柳田 豊子, 大庭 紀雄

鹿児島大学医学部眼科学教室

要 約

3日間連続光照射したラットの網膜にみられる視細胞のアポトーシス反応に対するラットの週齢(5~13週)の影響について、TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)法を用いて検索した。一方、同ラット網膜におけるKi67抗原(細胞増殖のマーカー)の分布に対するラットの週齢の影響について、免疫組織化学的手法を用いて検索した。眼球下側に比べ上側の網膜外顆粒層に、より多くのTUNEL陽性細胞とKi67抗原陽性細胞が観察され、一般に週齢が高いラットほど、これらの陽性細

胞は多く観察される傾向がみられた。視細胞が変性したアポトーシス小体を貪食処理するために、単球・マクロファージ系の細胞が網膜局所で増殖反応を起こしたものであろうと推定された。本研究によって、これらの反応の程度は、一般的に週齢が高くなるほど強くなるらしいことが判明した。(日眼会誌 101:788-793,1997)

キーワード：ラット, 網膜, アポトーシス, Ki67抗原, 組織化学

Effects of the Age on the Apoptotic and Proliferative Reactions in the Constant Light-exposed Rat Retina

Fumiyuki Uehara, Toyoko Yanagita and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

Abstract

The effects of age (5~13 weeks old) on apoptotic changes in the rat photoreceptor cells induced by 3 days of constant light exposure were examined using TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling). The effects on the expression of the Ki67-antigen, which is a proliferative marker, in these photoreceptor cells were also examined by immunohistochemistry. The results suggested that the number of positive cells in the outer nuclear layer of the superior hemisphere is higher than in the inferior nuclear layer in both the TUNEL reaction and the distribution of the Ki67 antigen, and that the num-

ber of positive cells increases with age in general. The cells of monocytes/macrophages may locally proliferate in the retina to phagocytose the apoptotic bodies owing to the degeneration of photoreceptor cells. The present findings revealed that the rates of these reactions may generally increase with age. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 788-793, 1997)

Key words: Rat, Retina, Apoptosis, Ki67 antigen, Histochemistry

I 緒 言

ラットを連続光照射のもとに飼育すると、網膜視細胞が変性する¹⁾。光による変性では、視細胞がアポトーシスに陥ることが報告²⁾されており、アポトーシスは様々な型の視細胞変性に共通にみられる現象である³⁾。著者らは先に、連続光照射によってラット網膜の視細胞の変性

が引き起こされつつある部位に、細胞分裂期に細胞核に出現するとされているKi67抗原⁴⁾が、免疫組織化学的に陽性に検出される細胞が多数出現することを見出した⁵⁾。これらの細胞は、視細胞変性に先立って網膜細胞が増殖性の変化を起こしたものであるというよりも、むしろ変性してアポトーシスに陥った視細胞を貪食処理するために単球・マクロファージ系の細胞が網膜局所で増殖反応を

別刷請求先：890 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行

(平成9年3月21日受付,平成9年5月29日改訂受理)

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken 890, Japan

(Received March 21, 1997 and accepted in revised form May 29, 1997)

起こしたものと推定された⁵⁾。

ところで、ラットが高週齢になるにつれて、視細胞の光に対する感受性が高まって変性しやすくなると報告⁶⁾されている。この場合、アポトーシスを起こした細胞や Ki 67 抗原陽性の細胞も、より多く検出されるようになる可能性が高い。そこで本研究では、ラットが高週齢になるにつれて、実際に連続光照射によってアポトーシスを引き起こす細胞が増加するのcaという点について、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法⁷⁾を用いて検索するとともに、Ki 67 抗原陽性の細胞が増加するのcaという点について免疫組織化学的手法を用いて検索した。著者らは先に、8週齢のラットについて、本研究に使用した光源のもとでは、3日間連続光照射した網膜に TUNEL 陽性細胞および Ki 67 抗原陽性細胞が最も多数集積する像を観察しているため、今回の研究では4種類の週齢のラットに関し、3日間連続光照射した網膜についてのみ、TUNEL 陽性細胞と Ki 67 抗原陽性細胞の分布をそれぞれ調べて、眼球の部位および週齢間の差異について比較検討することにした。

II 方 法

4, 6, 8 および 12 週齢の白色 Wistar ラット(雄: 九動株式会社, 熊本から購入)を、それぞれ4匹ずつ通常の光環境下(12時間明(10 lux)/12時間暗)に1週間飼育した。36 W の蛍光灯を2本、ケージの床面から50 cm の位置に固定し、ケージ内が1,100~1,500 lux になるようにして、5, 7, 9, および13週齢となったラットに連続光照射しながら、さらに3日間飼育した。正常対照として、7週齢のラットを2匹、通常の光環境下に飼育した。これらのラットを午前10~11時の間に炭酸ガスを吸引させて安楽死させ、摘出した眼球を10% パッファーホルマリン液/燐酸緩衝液(PBS, pH 7.4)を用いて約3時間浸漬固定した。眼球を角膜側から網膜側に向かって縦方向に切開することによって、鼻側と耳側半球に2分割した後、さらに一晚浸漬固定した。それぞれのラットの片眼(右眼)の鼻側半球をアルコール脱水、パラフィン包埋した後、5 μ m の組織切片を作製した。

1. TUNEL の方法⁷⁾

組織切片を脱パラフィン後、あらかじめプロテナーゼ K (Nacalai tesque, 京都: 20 μ g/ml に PBS に溶解)を用いて37°C, 15分間消化した後、TUNEL 反応混合液 (Boehringer Mannheim, Mannheim, ドイツ)を37°C, 60分間反応させた。対照としては、あらかじめ酵素 (TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase) だけを除いておいた TUNEL 反応混合液を同様に反応させた。DNA の切断部が蛍光標識された TUNEL 陽性の細胞核を有する細胞の、それぞれの週齢のラットの上方と下方の眼球赤道部の網膜組織における分布について、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2. 免疫組織化学の方法

組織切片を脱パラフィン後、クエン酸緩衝液に浸漬、加圧・加熱処理して抗原賦活した後、0.2% 過酸化水素/メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ活性を、3% ウマ血清/PBS を用いて抗体の非特異的吸着をそれぞれ抑制した。一次抗体として、3% ウマ血清/PBS を用いて100倍希釈溶解した Ki 67 抗原に対するマウスモノクローナル抗体 (MM 1: Novocastra 社, Newcastle, 英国)を室温で1時間反応させた。対照としては、非免疫マウス血清 (PBS を用いて100倍希釈溶解)を同様に反応させた。組織切片を PBS を用いて洗浄した後、二次抗体として、3% ウマ血清/PBS を用いて100倍希釈溶解したビオチン標識した抗マウス IgG (免疫グロブリン G: Vector Laboratories 社, Burlingame, CA, 米国)を室温で1時間反応させた。Vectastain Elite ABC Kit (Vector 社)とジアミノベンチジンをを用いてペルオキシダーゼ発色させた。光学顕微鏡を用いて、それぞれの週齢のラットについて、上方と下方の眼球赤道部の外顆粒層から視細胞層の Ki 67 抗原陽性細胞の分布について観察した。

III 結 果

図1 (A~H)に、4種類の週齢のラット網膜の TUNEL 反応像を示した。いずれの週齢においても、主に外顆粒層に TUNEL 陽性細胞が観察された。上半球に関しては、5週齢では散在性に陽性細胞が観察された(図1 A)のに対し、7週齢(図1 C), 9週齢(図1 E)および13週齢(図1 G)では、陽性細胞が外顆粒層全体をほぼびまん性に近く埋め尽くすように観察された。一方、下半球に関しては、5週齢(図1 B), 7週齢(図1 D), 9週齢(図1 F)および13週齢(図1 H)とも、散在性に陽性細胞が観察された。

図2 (A~H)に、4種類の週齢のラット網膜の抗 Ki 67 抗原抗体の反応分布像を示した。いずれの週齢においても、網膜の後極部から周辺部まで、Ki 67 抗原陽性細胞が内顆粒層の内境界膜寄りに1~2層が比較的密に配列している像と、内顆粒層の外境界膜寄りに1層が散在性に配列している像が共通に観察された。一方、視細胞層から外顆粒層にかけて Ki 67 抗原陽性細胞が分布している像も観察されたが、その数は眼球の部位およびラットの週齢によって異なってみえた。すなわち、上半球に関しては、Ki 67 抗原陽性細胞が、5週齢では視細胞層に散在性に観察された(図1 A)のに対し、7週齢では視細胞層から外顆粒層まで散在性に観察され(図1 C), 9週齢(図1 E), 13週齢(図1 G)と週齢が高くなるにつれて、これらの網膜層における陽性細胞の割合が増加するように観察された。一方、下半球に関しては、Ki 67 抗原陽性細胞が、5週齢ではほとんど目立たなかった(図1 B)のに対し、7週齢(図1 D), 9週齢(図1 F)および13週齢(図1 H)では散在性に視細胞層から外顆粒層に観察された。

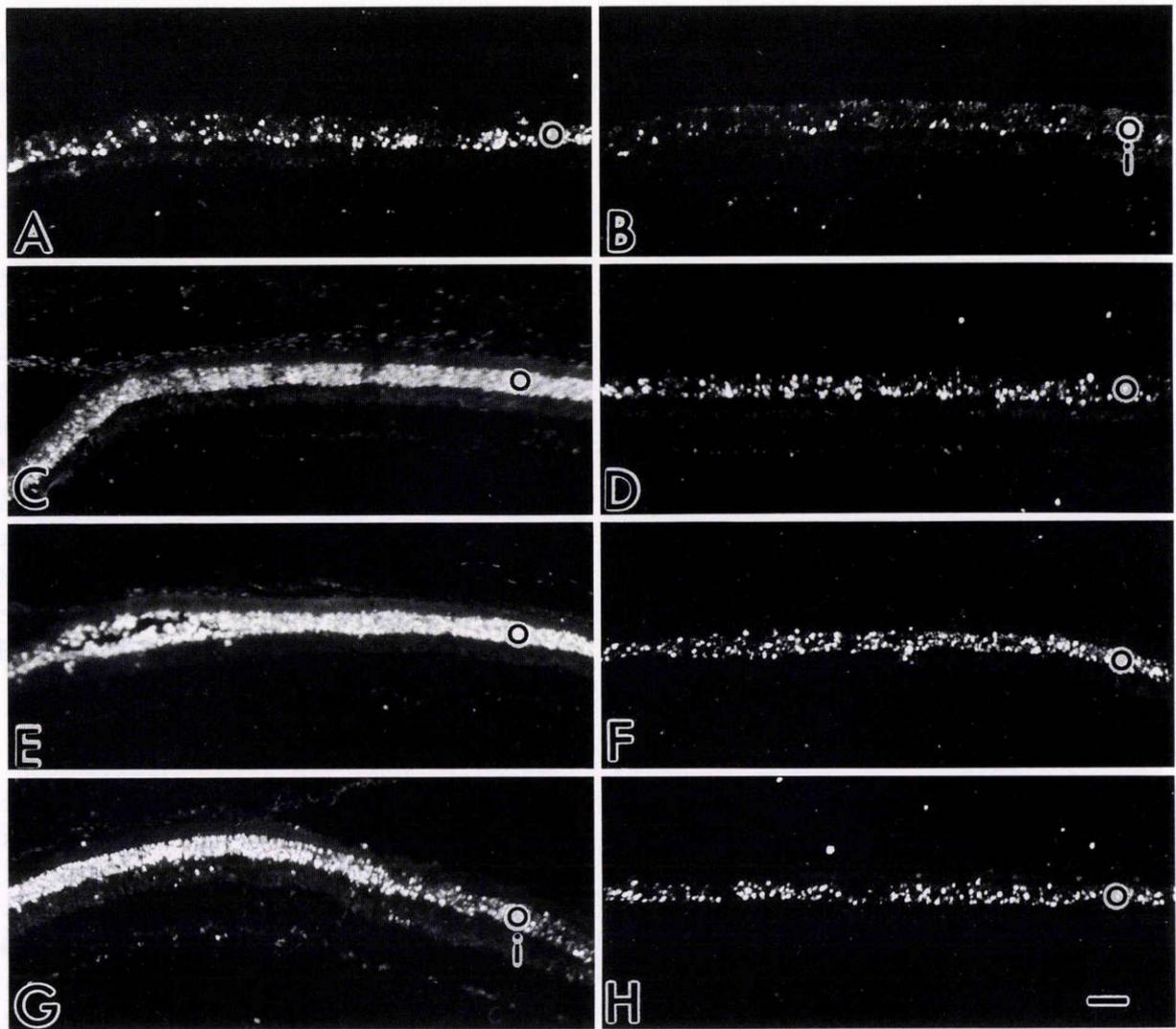


図1 3日間連続光照射した4種類の週齢のラット網膜のTUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)反応像。

A: 5週齢の眼球上方赤道部, B: 5週齢の眼球下方赤道部, C: 7週齢の眼球上方赤道部, D: 7週齢の眼球下方赤道部, E: 9週齢の眼球上方赤道部, F: 9週齢の眼球下方赤道部, G: 13週齢の眼球上方赤道部, H: 13週齢の眼球下方赤道部。O: 外顆粒層, i: 内顆粒層。バーは50 μm

図3Aに, 3日間連続光照射した7週齢ラット網膜のTUNEL反応像の強拡大像を示した。弱拡大像と同様に, TUNEL陽性細胞が外顆粒層全体をほぼびまん性に近く埋め尽くすように観察されたが, それらの陽性細胞の蛍光群の間に暗く抜けてみえる部分(Ki 67抗原陽性細胞に相当すると考えられる)が散在性に観察された(図3A)。図3Bに, その陰性対照像を示したが, ほとんど微弱な蛍光しか観察されなかった。図3Cに, 3日間連続光照射した7週齢ラット網膜の抗Ki 67抗原抗体反応像の陰性対照像を示したが, ほとんど微弱な反応像しか観察されなかった。図3Dに, その陽性網膜組織を光学顕微鏡の光コンデンサーをスライドガラスから遠ざけることによって, 外顆粒層の小細胞の輪郭が現れるようにして撮影した強拡大像を示した。TUNEL陽性細胞に対応するものと考えられる小細胞に比べ, 視細胞層から外顆粒層にかけて分布しているKi 67抗原陽性細胞は大きくみえ

るとともに, 近傍の小細胞が一部重なって観察された(図3D)。図3Eに, 光を連続照射していない7週齢ラット網膜の抗Ki 67抗原抗体反応の強拡大像を示した。内顆粒層の内境界膜寄りに1~2層が比較的密に配列している像と, 内顆粒層の外境界膜寄りに1層が散在性に配列している像が観察された(図3E)。

IV 考 按

本研究で外顆粒層に検出されたTUNEL陽性細胞は, 形態学的に正常の外顆粒層の細胞よりも小さく, それらの表面が何種類かのレクチン(jacalinなど)で染色される像を著者らは観察しており⁹⁾, 細胞膜は保存されているものとみなされることから, アポトーシス小体であろうと考えられる。一方, 外顆粒層に検出されたKi 67抗原陽性細胞は, これらのアポトーシス小体に対応すると考えられる細胞よりも大きい傾向がみられ(図3D), 単球・

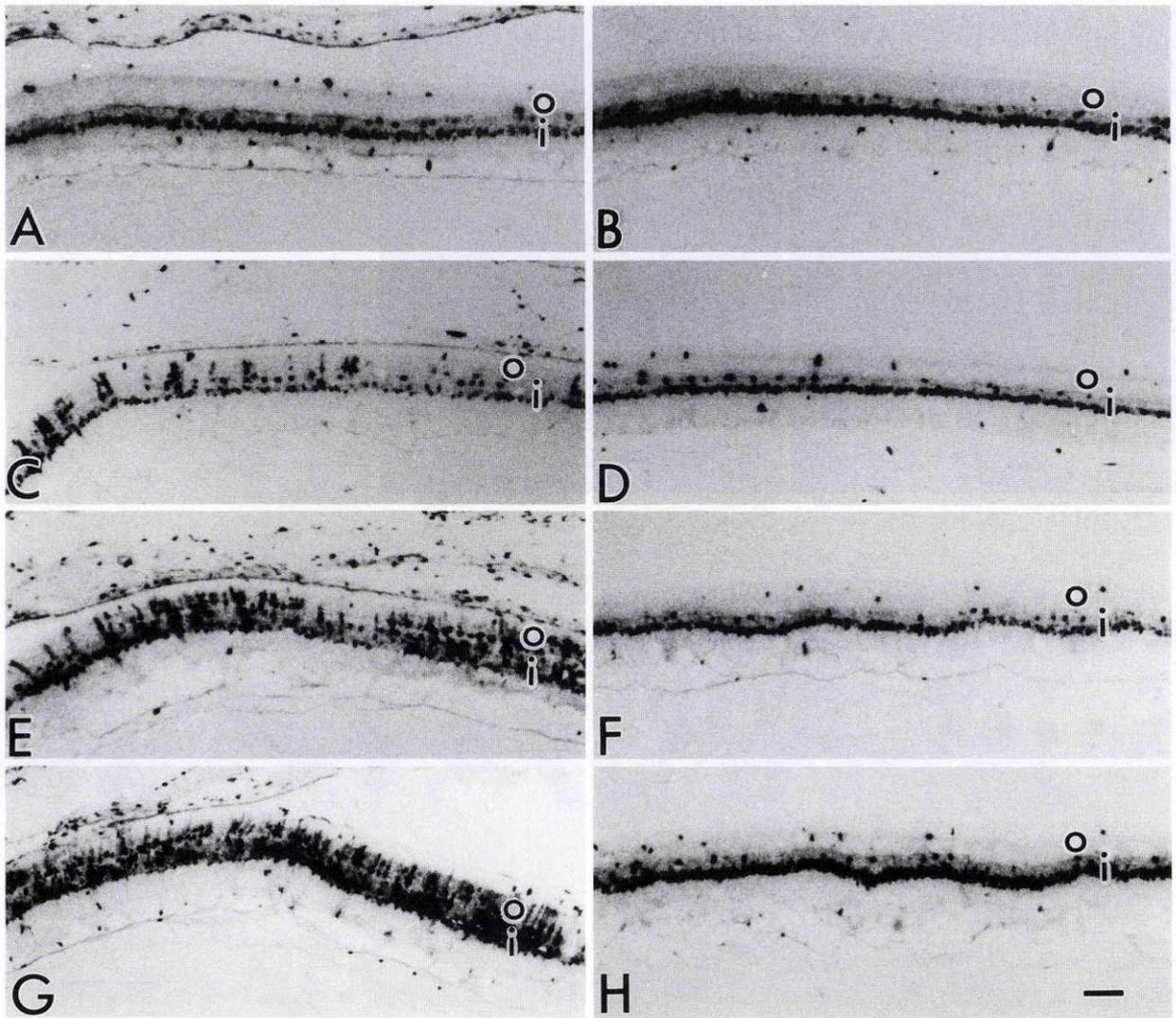


図2 3日間連続光照射した4種類の週齢のラット網膜の抗 Ki 67 抗原抗体の反応像。

A: 5週齢の眼球上方赤道部, B: 5週齢の眼球下方赤道部, C: 7週齢の眼球上方赤道部, D: 7週齢の眼球下方赤道部, E: 9週齢の眼球上方赤道部, F: 9週齢の眼球下方赤道部, G: 13週齢の眼球上方赤道部, H: 13週齢の眼球下方赤道部. O: 外顆粒層, i: 内顆粒層. バーは50 μm

マクロファージに対する抗体が反応する細胞と同じような大きさであることを著者らは観察していることから⁵⁾, 変性してアポトーシスに陥った TUNEL 陽性の視細胞を貪食処理するために, 単球・マクロファージ系の細胞が網膜局所で増殖反応を起こしたものである可能性がある. この観点からすれば, Ki 67 抗原陽性細胞の集積は, 外顆粒層の細胞の TUNEL 反応よりも後に生じたものであろうと推定される. 本研究では, 光を3日間連続照射したラットしか検索していないので, 厳密なことはいえないのであるが, 7週齢以上のラットにおいては, いずれも TUNEL 陽性細胞が外顆粒層全体をほぼびまん性に近く埋め尽くすように観察されたのに対し, Ki 67 抗原陽性細胞はまだ高週齢ラットほど多いように観察されたことも, TUNEL 反応の方が Ki 67 抗原陽性細胞の集積よりも先に起こり, 飽和状態に陥ることを支持する所見ではないかと考える.

一方, アポトーシスは, 細胞周期の M 期への移行が障害されたときに起きる現象ではないかと考えられている⁸⁾. 特に癌細胞で, 細胞周期が G 2 期から M 期へ入らずに, S 期に戻り DNA 合成を繰り返すことによって核の多倍体化が起こり, 多倍体細胞がアポトーシスによって排除されるのではないかと考えられている. Ki 67 抗原は, 細胞周期の G 1, S, G 2 と M 期に細胞核に出現することから, これらの DNA 合成を繰り返している細胞にも検出されるものと考えられる. したがって, 本研究においてもアポトーシスを起こす前段階の細胞が Ki 67 抗原陽性となった可能性も否定はできない. しかしながら, 前項で述べたように Ki 67 抗原陽性細胞の集積よりも TUNEL 反応の方が先に起こっているのではないかと推定されることから, この可能性は低いのではないかと考える.

ところで, 本研究の実験条件下では, いずれの週齢の

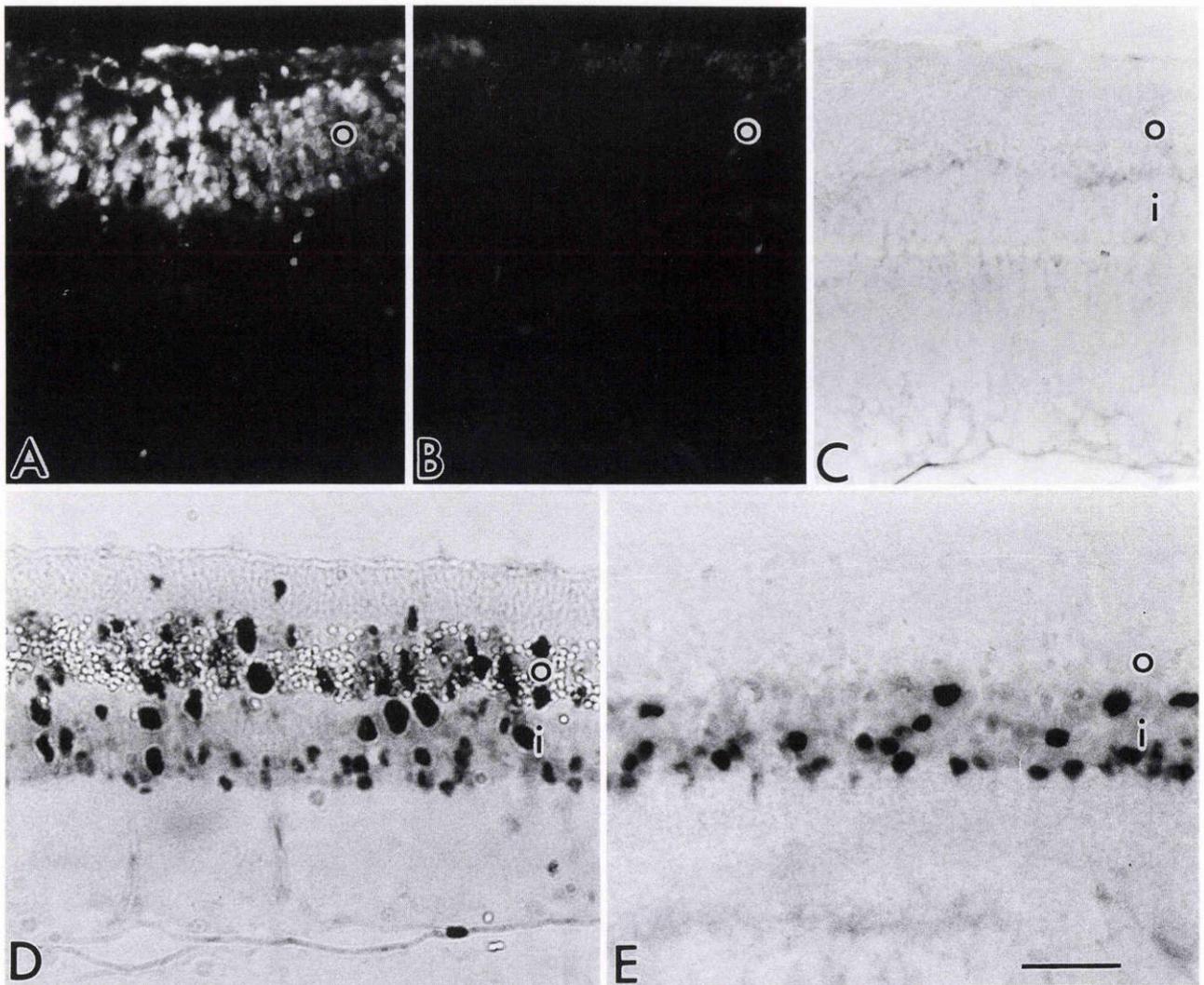


図3 7週齢のラット網膜の組織像(A~D: 3日間連続光照射, E: 通常の光環境下に飼育)。

A: TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 反応像, B: Aの陰性対照, C: Dの陰性対照, D, E: 抗 Ki 67 抗原抗体の反応像. O: 外顆粒層, i: 内顆粒層. バーは 50 μ m

ラットにおいても眼球赤道部の上方が下方よりも光感受性が高く, より多くの TUNEL 陽性細胞と Ki 67 抗原陽性細胞が外顆粒層に観察された. これらの網膜変化の上・下半球による違いは, 連続光照射による網膜変性が下半球よりも上半球に強く引き起こされるという過去の研究報告¹⁾に一致している. それぞれの週齢のラット網膜の上半球と下半球に分けて, 外顆粒層に分布する TUNEL 陽性細胞と Ki 67 抗原陽性細胞の定量を行った方が, より厳密にこれらの陽性細胞出現に対する週齢の影響について考察できるのであるが, その場合, 陽性細胞数の全細胞数に対する割合を求める必要があった. 陽性細胞数だけなら, 顕微鏡下に比較的容易に計測できたが, 全細胞数については, 図3Dに示したように外顆粒層に分布する大細胞と小細胞が重なり合ったりしていたため, 厳密な計測が困難であった. したがって, 本研究においては統計学的な有意差検定は行わずに, 単純に陽性細胞数だけを比較してみた. この場合, TUNEL 陽性細胞数と Ki 67 抗原陽性細胞数がラットが高週齢になるにつ

れて一般的に増加する傾向がみられた. これは, 高週齢のラットほど網膜視細胞の光感受性が高いという Rapp らの過去の研究報告⁶⁾に一致している. 彼らは, 生後 90 日と 60 日のラットの間よりも, 生後 60 日と 30 日のラットの間で, はるかに大きな光感受性の違いがみられると報告している. 著者らの研究結果では, 上半球の外顆粒層の TUNEL 陽性細胞に関しては, 5 週齢のラットと 7 週齢以上のラットの間では明らかに差があるようにみえたが, 7 週齢以上同士の間では, いずれも外顆粒層全体を埋め尽くすように TUNEL 陽性細胞が観察され, ほとんど差はないようにみえたことから, Rapp らの結果と同様の傾向を示していると考えられる. 5 週齢と 7 週齢以上のラットの網膜間, および上・下半球の網膜間の解剖学的, 生化学的差異について明らかにすることによって, 光による視細胞変性の仕組みと網膜変性の抑制のためのヒントが得られる可能性がある.

また, 内顆粒層に層状に配列しているのが観察された Ki 67 抗原陽性細胞は, 図3Eにも示したように連続光

照射していないラットや家兎の網膜にも観察される⁵⁾⁹⁾。したがって、ラット網膜の内顆粒層には層状に配列する分裂しつつある細胞が普通の状態でも存在し、その中にはミューラー細胞などが含まれているものと考えられる。今後、免疫組織の二重染色法などを用いて、具体的にどのような細胞が網膜内顆粒層で分裂し続けているのかという点についても明らかにしていく必要がある。

本研究は、文部省科学研究費(基盤C 09671809)の補助によって行った。

文 献

- 1) **Rapp LM, Williams TP**: A parametric study of retinal light damage in albino and pigmented rats. In: Williams TP, et al (Eds): The Effects of Constant Light on Visual Processes. Plenum Press, New York, 135—159, 1980.
- 2) **Abler AS, Chang CJ, Ful J, Tso MO, Lam TT**: Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 92: 177—189, 1996.
- 3) **梶原一人**: 網膜神経細胞の変性とアポトーシス. 三浦正幸, 他(編): Bio Science用語ライブラリー(アポトーシス). 羊土社, 東京, 196—197, 1996.
- 4) **上原文行, 大庭紀雄**: 眼瞼腫瘍の Ki 67 抗原発現分布の免疫組織化学. あたらしい眼科 13: 1411—1413, 1996.
- 5) **Uehara F, Ohba N, Sameshima M, Yanagita T, Okubo A, Iwakiri N, et al**: Glycohistochemical study of light-induced retinal degeneration. In: LaVail MM, et al (Eds): Degenerative Retinal Diseases. Plenum Press, New York, in press.
- 6) **Rapp LM, Tolman BL, Koutz CA, Thum LA**: Predisposing factors to light-induced photoreceptor cell damage: Retinal change in maturing rats. Exp Eye Res 51: 177—184, 1990.
- 7) **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA**: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493—501, 1992.
- 8) **口野嘉幸**: 癌・細胞周期とアポトーシス. 三浦正幸, 他(編): Bio Science用語ライブラリー(アポトーシス). 羊土社, 東京, 102—105, 1996.
- 9) **Sharma RK, Ehinger B**: Mitosis in developing rabbit retina: An immunohistochemical study. Exp Eye Res 64: 97—106, 1997.