

## 実験的網膜上膜形成におけるミュラー細胞の動態に関する 免疫組織学的研究

向野 利寛<sup>1)</sup>, 加藤 博彦<sup>2)</sup>, 大島 健司<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>福岡大学筑紫病院眼科, <sup>2)</sup>福岡大学医学部眼科学教室

### 要 約

家兎硝子体腔内へ自家全血液を注入すると, Müller (ミュラー)細胞から成る網膜上膜が注入2週後から形成される。増殖細胞核抗原(PCNA), グリア線維酸性蛋白(GFAP)による免疫染色と電子顕微鏡的所見で, この網膜上膜形成過程の早期におけるミュラー細胞の動態を検討した。PCNA 陽性細胞は血液注入3日後に網膜内層で観察されたが, この陽性細胞は電子顕微鏡的に網膜内層に移動したミュラー細胞と同定できた。その後, 7日後までPCNA 陽性細胞が観察された。しかし, 血液注入14日後ではPCNA 陽性細胞は観察されなかった。GFAP 陽

性所見は, 血液注入3日後に網膜内層で観察された。その後, 実験期間中, 網膜全層にわたってミュラー細胞はGFAP 陽性を示し, 形成された網膜上膜でも陽性所見がみられた。以上から, 硝子体内に血液が注入されると, ミュラー細胞は極めて早期に活性化されて増殖し, その細胞活性を維持して網膜上へ伸展すると考えられた。(日眼会誌 102: 22—27, 1998)

キーワード: ミュラー細胞, 網膜上膜, 自家全血液, 家兎, 免疫組織学

## Immunohistochemical Study of Retinal Müller Cell Response in Experimental Epiretinal Membrane Formation

Toshihiro Kono<sup>1)</sup>, Hirohiko Kato<sup>2)</sup> and Kenji Oshima<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Fukuoka University Chikushi Hospital

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University

### Abstract

Experimental epiretinal membranes (ERM) composed of Müller cells were formed by injecting autologous whole blood into the vitreous cavity of rabbits. Müller cell responses at the early stages of epiretinal membrane formation were studied using immunostaining of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) (for identification of the proliferating cells) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (as an appropriate marker for glial cell response), and the electron microscope in the experimental rabbit model. Three days after the injection, nuclei of Müller cells were found in the inner part of the retina and were PCNA positive. PCNA positive staining was seen from day 3

to day 7. No PCNA-positive nuclei were seen at day 14 in the retina or ERM. A GFAP-positive reaction was first seen in the inner retina at day 3. Afterwards, the retina and the ERM were GFAP-positive in the experimental period. We concluded that activation and proliferation of Müller cells began at an early stage after the blood injection. Müller cells remained active and expanded onto the retinal surface. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 22—27, 1998)

Key words: Müller cell, Epiretinal membrane, Autologous whole blood, Rabbit, Immunohistochemistry

### I 緒 言

ぶどう膜炎や硝子体出血, 網膜剥離術後に網膜上膜が形成されることが知られている<sup>1)2)</sup>。網膜上膜が黄斑部に形成されると, 視機能に障害を与える。我々は, 家兎硝子体中に自家全血液を注入することにより, Müller (ミュ

ラー)細胞から成る網膜上膜が形成されることを報告<sup>3)</sup>した。この場合, 硝子体腔に注入された血液は注入7日後に網膜表面へ達し, さらに, 血液注入14日後にはミュラー細胞が細胞分裂を起こし, その突起が内境界膜を貫いて網膜表面へでて網膜上膜が形成された<sup>4)5)</sup>。

細胞が増殖するには細胞分裂を起こし, 細胞が活性化

別刷請求先: 818 福岡県筑紫野市大字俗明院 377—1 福岡大学筑紫病院眼科 向野 利寛  
(平成9年5月2日受付, 平成9年8月11日改訂受理)

Reprint requests to: Toshihiro Kono, M.D. Department of Ophthalmology, Fukuoka University Chikushi Hospital, 377—1 Zokumyoin, Chikushino-shi, Fukuoka-ken 818, Japan

(Received May 5, 1997 and accepted in revised form August 11, 1997)

されることが必要である。ミュラー細胞の細胞分裂は、光凝固や網膜外傷などの実験的研究で観察されている<sup>6)7)</sup>。しかし、細胞の活性化状態や細胞分裂像を形態学的に把握することは容易ではない。

グリア線維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)は種々の病的状態でミュラー細胞に陽性反応を示すことが報告<sup>8)~10)</sup>されている。GFAP陽性はミュラー細胞が活性化したことを示すと考えられる。増殖細胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA)は細胞分裂期のS1からP期までの細胞核で陽性に染まることが明らかにされ<sup>11)</sup>、PCNA陽性であることはその細胞が増殖期にあることを示す。

ミュラー細胞による網膜上膜形成には、まず、ミュラー細胞が活性化され増殖することが必要と考えられる。そこで今回は、硝子体内への血液注入による網膜上膜形成過程におけるミュラー細胞の早期の反応を検索するために、GFAP、PCNAを免疫組織学的に染色して観察した。

## II 実験方法

実験材料として、体重約3kgの白色家兎14匹28眼を使用した。実験方法は前回の実験<sup>3)</sup>と同様に、耳静脈から採取したヘパリン添加自家全血液0.3mlを角膜輪部後方1mmの部から硝子体腔内に注入した。処置後、翌日、3、5、7、10、14日および28日後に眼球摘出を行った。摘出眼球は直ちに10%ホルマリンに浸した後、毛様体部に小切開を入れ、再度10%ホルマリンに浸した。その後、毛様体部で眼球を前後に半切し、さらに、眼球後半部を乳頭を通る垂直面で半切した。そして、48時間以内にパラフィンに包埋した。対照として、同様の方法で生理食塩水0.3mlを硝子体腔内に注入した。各時期毎に実験眼3眼、対照眼1眼とした。

実験眼のうちの1眼では、半切後、眼球外側半分は3%グルタルアルデヒド・0.1Mカコジル酸緩衝液に浸し、3×1mmに細切して再度前固定した後、1%オスミウム酸・0.1Mカコジル酸緩衝液で後固定を行った。アルコール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超ミクロームで薄切片を作製し、アズールII染色を行い、光学顕微鏡観察を行った。また、必要に応じて超薄切片を作製し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で二重染色を行って電子顕微鏡で観察した。パラフィン封入試料の一部はヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡観察を行った。

免疫染色法としてはavidin biotin complex(ABC)法の変法であるlabelled strept-avidin biotin(LSAB)法を用いた。パラフィン封入試料から厚さ3μmの切片を作製した。この切片を脱パラフィンし、内因性ペルオキシダーゼ活性阻害を行った後、1%ウマ血清で10分間ブロッキングを行った。その後、それぞれモノクローナルマウス抗PCNA抗体(DAKO社製)、モノクローナルマウス抗

GFAP抗体(DAKO社製)を60分間反応させ、さらに二次抗体として、ビオチン化標識ウマ抗マウスIgGを室温で30分間反応させた。ストレプトアビジン-ビオチン複合体を30分間反応させた後、ニューフクシンで発色させた。各々の反応の間はすべて燐酸緩衝液で3回洗浄した。一連の実験操作はすべて室温下で行った。免疫染色の対照として、一次抗体の代わりに燐酸緩衝液を使用した。

## III 結果

今回は主に赤道部網膜を中心に観察した。血液注入翌日にはGFAP陽性所見は観察されなかった。内境界膜直下に細胞核がみられたが、PCNA染色は陰性であった(図1)。血液注入3日後になると、GFAP陽性所見が網膜内層でミュラー細胞の走行に一致して観察されたが、時に外網状層でも陽性所見が存在した(図2)。PCNA陽性所見は神経節細胞層と内顆粒層の細胞核で観察された(図3)。血液注入5日後も同様の所見であった。血液注入7日後では、GFAPは網膜内層から網膜外層までミュラー細胞の分布に一致して陽性所見がみられた(図4)。網膜内層と内顆粒層でPCNA陽性細胞が散見されたが、時に外顆粒層でも陽性細胞がみられた(図5A,B)。血液注入14日後では、網膜上に増殖膜が形成された。網膜内層にも細胞核がみられたが、PCNA陽性細胞は観察されなかった。この時期、GFAP陽性反応は網膜上膜も含めて網膜全体でミュラー細胞の分布に沿って広範囲に観察された(図6)。血液注入10日後も同様にPCNA陽性所見は観察されなかった。血液注入28日後では、網膜上膜と網膜全層でGFAP陽性所見がみられた(図7)。PCNA陽性細胞は極めて稀であったが、内顆粒層や外顆粒層で観察された(図8)。

血液注入3日後の網膜内層を電子顕微鏡で観察すると、神経節細胞とともにクロマチンに富む核があり、細胞質内には、多数のリボゾーム、グリコーゲン顆粒、フィラメントを有し、細胞間には接着装置を持つ細胞がみられたが、ミュラー細胞と同定した(図9)。血液注入7日後にも同様の細胞が網膜内層や外顆粒層でみられ、ミュラー細胞と同定した。

実験対照眼では、処置翌日に網膜内層で部分的にGFAP陽性所見が観察されたが、処置3日以降は陽性所見は観察されなかった。実験期間を通してPCNA陽性所見は観察されなかった。免疫染色の対照には陽性所見は観察されなかった(図10,11)。

## IV 考 按

硝子体内血液注入後のミュラー細胞の変化をPCNA、GFAPをマーカーとして免疫組織学的に1か月後まで経時的に観察した。家兎眼網膜では、有髄部を除くとミュラー細胞のみが存在し、星状膠細胞は存在しないことが知られている<sup>12)</sup>。今回観察したグリア細胞もすべてミュ

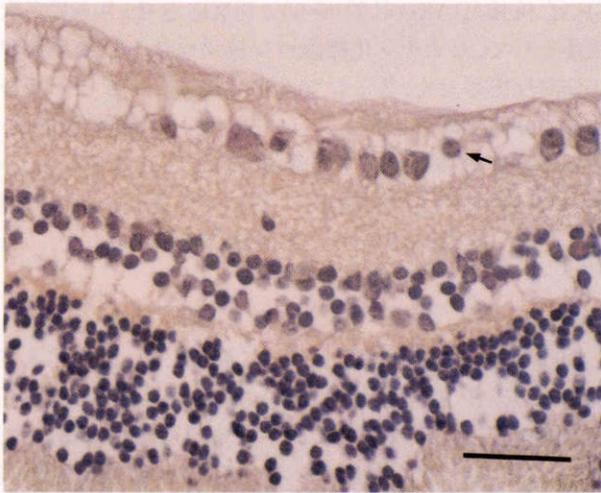


図1 血液注入翌日の増殖細胞核抗原(PCNA)免疫染色光学顕微鏡写真。  
網膜内層に多数の細胞核(矢印)がみられるが、陽性所見は観察されない。バーは50µm

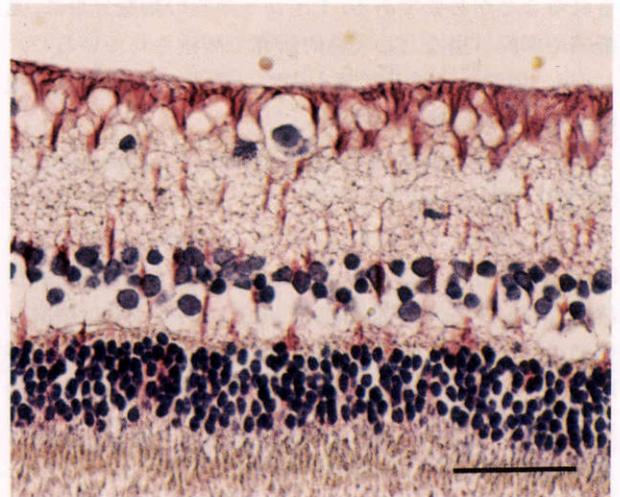


図4 血液注入7日後のGFAP免疫染色光学顕微鏡写真。  
陽性所見が内境界膜から外顆粒層まで Müller(ミュラー)細胞の分布に沿って観察される。バーは50µm

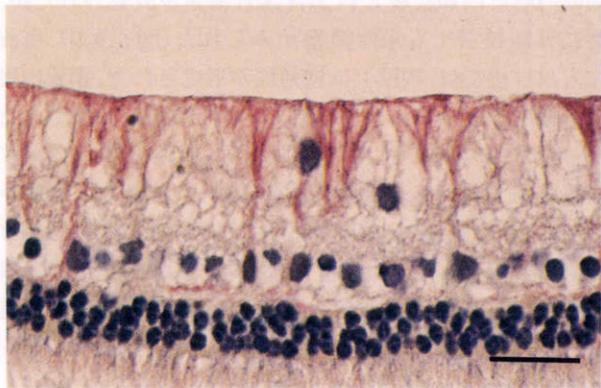
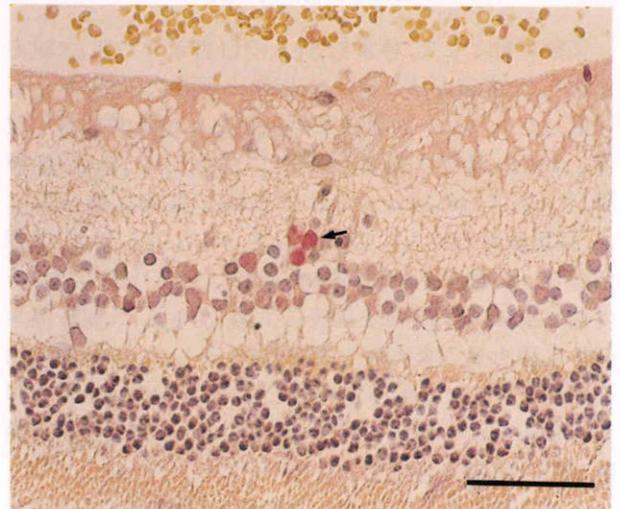


図2 血液注入3日後のグリア線維酸性蛋白(GFAP)免疫染色光学顕微鏡写真。  
網膜内層で束状に陽性所見が観察される。この陽性所見は所々で外網状層まで続いている。バーは50µm



A

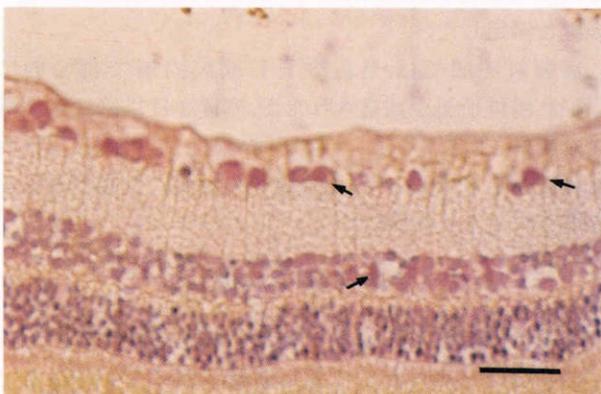
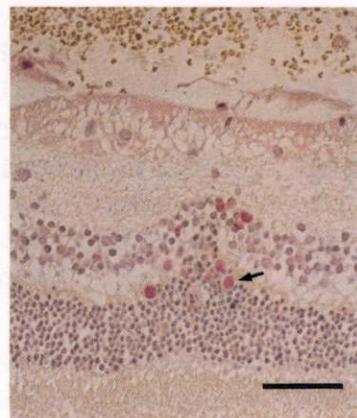


図3 血液注入3日後のPCNA免疫染色光学顕微鏡写真。  
網膜内層と内顆粒層で陽性所見(矢印)が観察される。バーは50µm



B

図5 A, B 血液注入7日後のPCNA免疫染色光学顕微鏡写真。  
神経節細胞層,内網状層,内顆粒層とともに外顆粒層にも陽性所見(矢印)が観察される。バーは50µm

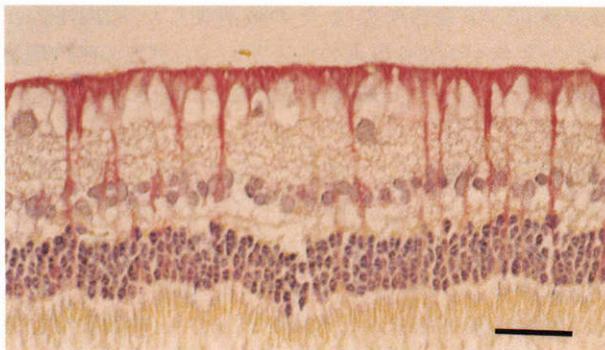


図 6 血液注入14日後の GFAP 免疫染色光学顕微鏡写真.  
内境界膜から内顆粒層まで陽性所見が観察される. バーは  
50  $\mu$ m

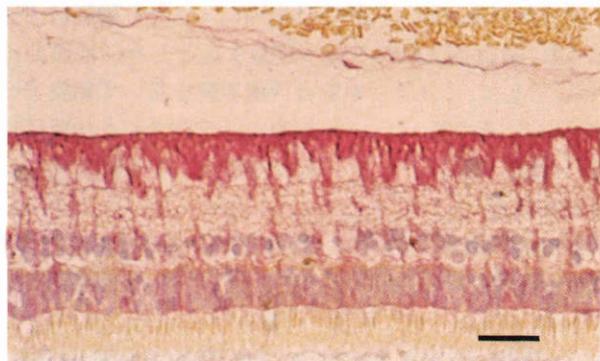


図 7 血液注入28日後の GFAP 免疫染色光学顕微鏡写真.  
網膜上膜と神経網膜全体に陽性所見が観察される. バーは  
50  $\mu$ m

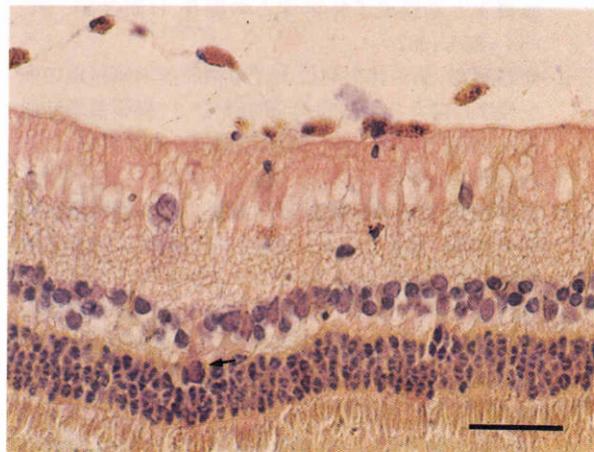


図 8 血液注入28日後の PCNA 染色光学顕微鏡写真.  
稀に網膜外層で陽性細胞(矢印)がみられる. バーは50  $\mu$ m

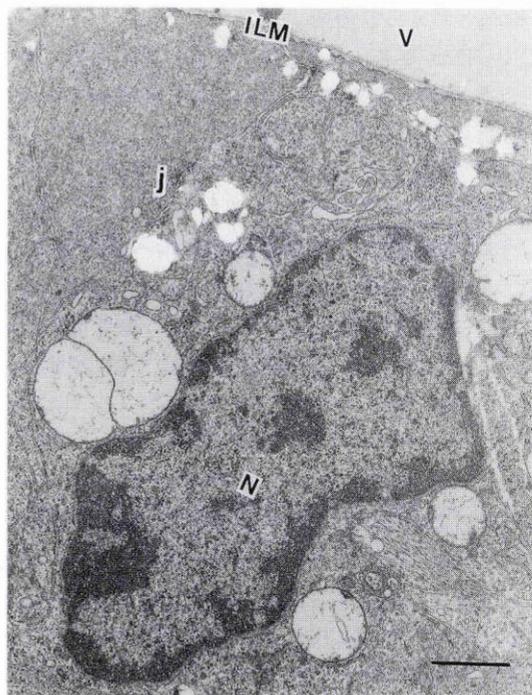


図 9 血液注入 3 日後の電子顕微鏡写真.  
網膜内層の細胞はクロマチンに富む核(N)を有し, 細胞  
質内に多数グリコーゲン顆粒, 滑面および粗面小胞体が  
みられる. 隣接細胞と接着装置(j)を持ち, ミュラー細胞  
と同定できる. V: 硝子体, ILM: 内境界膜. バーは 1  $\mu$ m

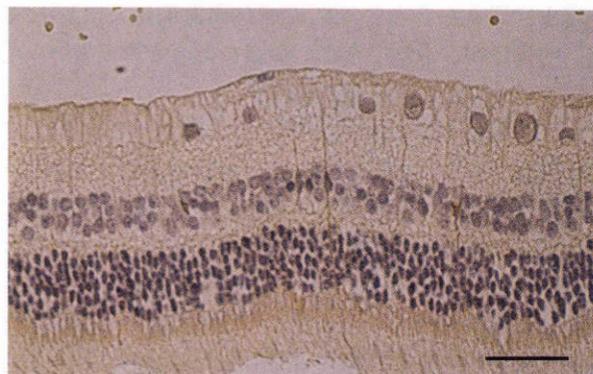


図10 血液注入 3 日後の PCNA 免疫染色の対照.  
陽性反応はみられない. バーは50  $\mu$ m

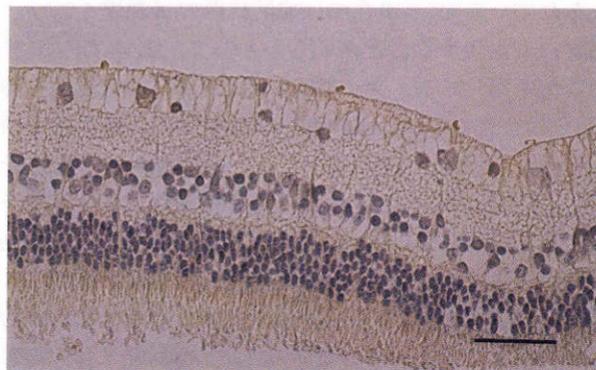


図11 血液注入 3 日後の GFAP 免疫染色の対照.  
陽性反応はみられない. バーは50  $\mu$ m

ラー細胞と考えられる。

PCNA は非ヒストン核蛋白質(分子量 36kD, 等電点 4.8)で, 増殖サイクルの主として G1 後期から S 期にかけて細胞核内に蓄積し, DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の補助因子として機能している。PCNA を検出することにより, 細胞が細胞分裂 S1 期から P 期にあることを判定できる<sup>11)</sup>。今回の研究では, 血液を硝子体内へ注入すると, 3 日後には正常の網膜ではみられない細胞が網膜内層で観察され, PCNA 陽性所見を呈した。この陽性反応は処置 7 日後までみられた。電子顕微鏡観察では, 網膜内層にミュラー細胞の核が確認できており, この PCNA 陽性細胞はミュラー細胞と考えた。これまでの研究<sup>4)</sup>ではミュラー細胞核の網膜内層への移動は観察できていたが, ミュラー細胞の細胞分裂は血液注入 2 週後まで観察されなかった。今回の結果から, ミュラー細胞は血液の硝子体内注入に敏速に反応し, 早期に細胞増殖を開始することが明らかとなった。我々は, 電子顕微鏡的にミュラー細胞の細胞分裂像を網膜内層のみでなく外顆粒層でも観察した<sup>4)</sup>が, 今回の研究でも網膜内層のみでなく, 網膜外層へ移動したミュラー細胞の核でも PCNA 陽性所見が観察された。実験的に網膜光凝固などでみられたミュラー細胞の細胞分裂像は, 主に網膜外層でみられる<sup>6)</sup>。網膜外層への直接障害を与えない硝子体内血液注入でもミュラー細胞は網膜内層と網膜外層で細胞増殖を行っていた。この理由は明らかではないが, 硝子体内血液注入により, 組織学的には明らかにできない微細な影響が網膜外層にも及んでいることが考えられる。

今回の観察では血液注入 28 日後に再度 PCNA 陽性所見が観察された。以前の研究<sup>4)</sup>では細胞分裂像は血液注入 14 日後と 28 日後でみられている。ミュラー細胞の分裂が 28 日目まで持続したのか, あるいは一度休止した後, 再度増殖が生じたのか明らかではないが, 前回の研究結果と合わせて硝子体内への血液注入によるミュラー細胞の細胞活性亢進の持続と関係するかも知れない。

GFAP は線維性グリオージスのある脳組織から抽出された脳特異蛋白の一種で, 網膜では星状膠細胞に存在する 10 nm フィラメントを構成する主要蛋白の一つと考えられている<sup>12)14)</sup>。現在では病的状態では網膜ミュラー細胞にも出現することが明らかとなっており, GFAP 免疫染色を用いてミュラー細胞の反応をみる研究は多く報告<sup>20)~10)15)</sup>されている。Yoshida ら<sup>16)</sup>は家兎眼で硝子体手術を行うと, 長期にわたってミュラー細胞が GFAP 陽性を示し, 硝子体内環境の変化がミュラー細胞に強い影響を与えると報告している。今回の研究でも血液を硝子体内中央へ注入すると, GFAP 陽性所見が PCNA と同様に 3 日後には観察された。血液注入 3 日後には赤血球はまだ内境界膜まで到達していない。このことは, 硝子体内の環境の変化によってミュラー細胞が活性化される可能性を示唆している。しかし, 対照実験で処置の翌日にみられた

部分的 GFAP 陽性所見は, その後消失した。眼内圧の一時的な変化や生理食塩水の注入といった程度の眼内環境の変化では, ミュラー細胞の活性化は持続しないと思われる。

網膜上膜の形成には, 血液注入後 2 週間という時間の経過が必要であった。この実験モデルでの網膜上膜形成には, 硝子体内環境の変化とともにミュラー細胞活性化が持続することが必要と考えられる。眼内に異物を注入して網膜上膜形成をみた実験モデルでも, 網膜表面に異物が到達した後ミュラー細胞が網膜上へ伸展して網膜上膜が形成されている<sup>17)18)</sup>。網膜上膜形成には, 活性化されたミュラー細胞の存在, 硝子体内環境の変化の持続といった因子とともに異物の存在といったもう一つの因子が必要と考えられた。

以前報告<sup>19)</sup>したように, 一度形成された網膜上膜は, 1 年後には極めて肥厚していた。これは, 硝子体環境の変化が持続する限りミュラー細胞の活性化状態が維持されることによると考えられる。

硝子体内血液注入実験では早期にミュラー細胞は活性化され, 細胞核は網膜内層へ移動するとともに増殖期に入る。そして, ミュラー細胞は内境界膜を貫いて網膜上へ伸展する。その後, ミュラー細胞の活性化された状態は持続し, 網膜上膜はミュラー細胞の肥大により肥厚すると考えられる。

稿を終えるに当たり, ご校閲いただいた向野利彦先生に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Bellhorn MB, Friedman AH, Wise GN, Henkind P: Ultrastructure and clinicopathologic correlation of idiopathic preretinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol* 79: 366—373, 1975.
- 2) Clarkson GJ, Green WR, Massof D: A Histopathologic review of 168 cases of preretinal membrane. *Am J Ophthalmol* 84: 1—17, 1977.
- 3) 向野利寛: 硝子体出血における網膜前増殖組織の発生機序に関する実験病理学的研究 1. 硝子体内注入血液量と網膜硝子体病変との関係. *日眼会誌* 91: 853—859, 1987.
- 4) 向野利寛: 硝子体出血における網膜前増殖組織の発生機序に関する実験病理学的研究 2. 網膜前増殖組織の形成とミュラー細胞の反応. *日眼会誌* 91: 911—922, 1987.
- 5) 向野利寛, 古川 博, 東真千子, 秋谷 忍, 向野利彦: 硝子体出血に伴うミュラー細胞の初期動態に関する実験的研究. *日眼会誌* 94: 333—339, 1990.
- 6) 石川祐二郎: クセノン光凝固が施されたサル網膜の修復機転に関する組織学的研究 1. 初期修復過程にみられる細胞反応の電子顕微鏡的研究. *日眼会誌* 78: 606—622, 1974.
- 7) 石川祐二郎: クセノン光凝固が施されたサル網膜の修復機転に関する組織学的研究 2. 後期修復過程にみられた細胞反応の電子顕微鏡的研究. *日眼会誌*

- 79: 1568—1584, 1975.
- 8) **Bignami A, Dahl D**: The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28: 63—69, 1979.
  - 9) **Erickson PA, Fisher SK, Guerin CJ, Anderson DH, Kaska DD**: Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment. *Exp Eye Res* 44: 37—48, 1987.
  - 10) **Ekstrom P, Sonyal S, Narfstrom K, Chader GJ, Veen TV**: Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Müller radial glia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1363—1371, 1988.
  - 11) **松野吉宏, 向井 清**: 増殖細胞核抗原(PCNA). *病理と臨床* 9: 879—883, 1991.
  - 12) **Schnitzer J**: Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J Comp Neurol* 240: 128—142, 1985.
  - 13) **Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B**: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351—354, 1971.
  - 14) **Bromberg JS, Schachner M**: Localization of nervous system antigens in retina by immunohistology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 920—924, 1978.
  - 15) **Bignami A, Dahl D**: The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *Exp Eye Res* 28: 63—69, 1979.
  - 16) **Yoshida A, Ishiguro S, Tamai M**: Expression of glial fibrillary acidic protein in rabbit Müller cells after lensectomy-vitreotomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3154—3160, 1993.
  - 17) **Ehrenberg M, Thresher R, Macheimer R**: Vitreous hemorrhage nontoxic to retina as a stimulator of glial and fibrous proliferation. *Am J Ophthalmol* 97: 611—626, 1984.
  - 18) **Algere P, Kock E**: Experimental epiretinal membranes induced by intravitreal carbon particles. *Am J Ophthalmol* 96: 345—353, 1983.
  - 19) **向野利寛, 東真千子**: 硝子体出血に伴う網膜前増殖組織形成後長期の変化についての実験的研究. *日眼会誌* 92: 857—863, 1988.
-