

# 実験急性眼圧上昇の白色家兎視路の Fast Axoplasmic Transport への影響 (図1, 写真3, 表5)

沢 口 昭 一 (新潟大学医学部眼科学教室)

## The Effect of Acute Intraocular Pressure Elevation on Fast Axonal Transport in Adult Albino Rabbit Optic Pathway

Shoichi Sawaguchi

*Department of Ophthalmology, School of Medicine, Niigata University*

---

### 要 約

白色家兎硝子体腔に標識アミノ酸を注入し、1時間後に前房カニューレ法にて眼圧を40mmHg, 60mmHg, 70mmHg, 80mmHgの各眼圧レベルに設定し4時間維持し、それぞれの眼圧レベルの高速軸索輸送におよぼす影響を液体シンチレーションカウンティング、フルオログラフィーを用いて調べた。次に家兎のLamina Cribrosaの消化標本を作製し走査電顕で観察した。眼圧が40mmHgでは軸索輸送はコントロールと差がなかった。しかし60mmHg, 70mmHgでは中等度の軸索輸送の減少を認め、80mmHgでは、高度の障害を示した。この障害の発生には、家兎のLamina Cribrosaの解剖学的特異性が関与しているものと推定した。フルオログラフィーのパターンは実験群、コントロール群とも差を認めなかった。(日眼 91:487-493, 1987)

キーワード：高速軸索輸送, 急性眼圧上昇実験, 白色家兎, 走査電顕

---

### Abstract

The Orthograde rapid axoplasmic transport of the albino rabbit optic pathway under experimentally induced acute ocular hypertension was studied. Beginning 1hour after intravitreal injection of radio-labelled amino acids, intraocular pressure became elevated for 4hours at various levels of 40mmHg (5rabbits), 60mmHg (5rabbits), 70mmHg (4rabbits) and for 2hours at 80mmHg (2rabbits). In all rabbits the left anterior chamber was cannulated using a 19-gauge elastic tube connected to a heparinized saline reservoir and was maintained at the desired height. At an IOP level of 40mmHg, no quantitative difference in the transporting axoplasm was observed in comparison to controls. At IOP levels of 60mmHg, 70mmHg, however, moderately decreased radio-activity was observed along the total optic pathway compared to the contralateral controls. At the 80mmHg level, radio-activity was severely decreased along the total optic pathway. SDS-PAGE and its fluorography showed no qualitative difference along the optic pathway between control and experimental rabbits. Rabbit lamina cribrosa observed by scanning electron microscopy showed weak and fibrous beams at its region, and they might explain the unsusceptibility of rapid axoplasmic transport to intra ocular pressure under 40mmHg and the marked obstruction over 50mmHg. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 487-493, 1987)

Key words: Fast Axoplasmic transport, Experimental ocular hypertension, Adult albino rabbit, Scanning electron microscopy

---

別刷請求先: 951 新潟市旭町通一番町 新潟大学医学部眼科学教室 沢口 昭一

Reprint requests to: Shoichi Sawaguchi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Niigata Univ., School of Med.

Ichibancho, Asahimachidōri, Niigata 951, Japan

(昭和61年12月23日受付) (Accepted December 23, 1986.)

## I 緒 言

実験的急性眼圧上昇により軸索輸送に障害が起こり、その場合は Lamina Cribrosa にあることは既に多くの報告があり、Lamina Scleralis にその障害の中心が局在していることが明らかにされている<sup>1)~4)</sup>。しかしながら解剖学的にこのような Collagenous Septa を欠損している家兎においても軸索輸送の障害があるとの報告<sup>5)</sup>があり、更に逆行性の輸送の障害も Hooded rat で証明されている<sup>6)</sup>。

今回、この Collagenous Septa を欠いている白色家兎を用いて種々の眼圧レベルを設定して、その障害を定量的に測定し、又、家兎の Lamina Cribrosa の消化標本を作製し、その構造と軸索輸送障害との関係について検討を加えたので報告する。

## II 実験方法

1. 実験動物：成熟白色家兎(雄、体重2.5~3kg) 18羽を用い、40mmHgの眼圧に5羽、60mmHgの眼圧に5羽、70mmHgの眼圧に4羽、80mmHgの眼圧に2羽を用いた。更に Lamina Cribrosa の消化標本として2羽を使用した。

2. 方法：L-[<sup>35</sup>S]-Methionine (Amersham U.K., Specific activity > 1100Ci/mmol) 100 $\mu$ Ci/10 $\mu$ l を白色家兎両眼の硝子体腔へ注入し、左眼には1時間後に19ゲージのエラスト針を角膜輪部より前房へ刺入し、外筒を前房へ留置し、ヘパリン生食のボトルと接続し40, 60, 70, 80mmHgの各眼圧レベルに設定した。右眼はコントロールとした。麻酔は塩酸オキシプロカイン(ペノキシール®)点眼のみで行なった。

40, 60, 70mmHgの各眼圧レベルに設定した家兎は、高眼圧負荷後4時間後に過量のネブタール静注の後に屠殺した。

80mmHgに眼圧を設定した2羽は、眼圧上昇後約2時間後にチューブ刺入部の強角膜部より裂けたため、その時点で実験を中止し同様に屠殺した。屠殺後すみやかに開頭し、眼球・視路を取り出した。視神経・視索は2mm間隔で切り、外側膝状体・上丘はその一部を切り出して試料とした。切り出した試料は既報<sup>7)</sup>の方法により処理し、又、網膜も慎重に剝離し同様に処理し試料とした。

作製した試料は以下のように分析した。

(1) 液体シンチレーションカウンティング(以下LSC)：網膜及び視路の放射能の測定を既報<sup>7)9)</sup>の方法

により行なった。値は網膜の放射能値及び半減期で補正した。

(2) SDS-PAGE とフルオログラフィー<sup>7)8)</sup>：試料には眼圧を60mmHgに設定した2羽を用いた。

ホモジナイズした試料各20 $\mu$ lに2倍濃度のSDS試料緩衝液(20%(w/v)-glycerol, 4.6%(w/v) SDS, 125mM Tris-HCl, pH 6.8, 4%2-Mercapto Ethanol) 20 $\mu$ lを加え、よく攪拌した後boilし、分離用ゲルに5~15% gradient polyacrylamide gelを用いて電気泳動を行ない、次いでフルオログラフィーを行ない、デンストメトリーでそのパターンを計測し、輸送される蛋白質の質的・量的変化を調べた。

(3) 視神経乳頭部(ON1)の放射能測定：TCA法及びNCS法<sup>9)</sup>を用いて各眼圧レベルにおけるこの部位の放射能を測定した。

(4) 走査電顕による家兎のLamina Cribrosaの観察：正常白色家兎のLamina CribrosaをEmery<sup>10)</sup>の方法に準じて処理し、走査電顕で観察した。

## III 実験結果

(1) 視路の軸索輸送量の変化：表1, 2, 3, 4は各

表1 視路の高速軸索輸送蛋白の放射能を示した。40mmHgの眼圧上昇では対象群と殆んど輸送量の差を認めない。

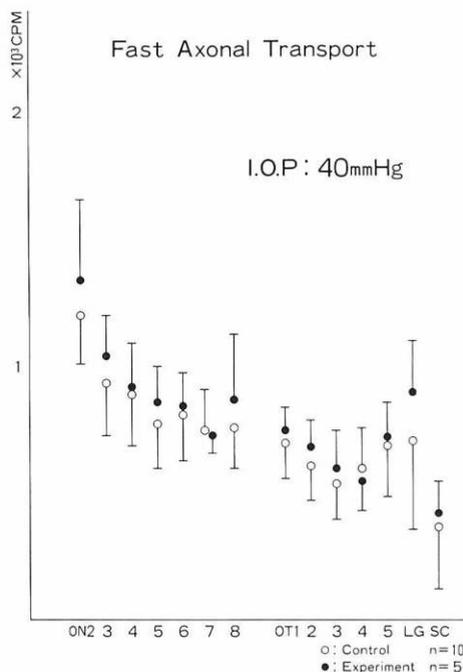


表2 視路の高速軸索輸送蛋白の放射能を示した、60 mmHgの眼圧上昇により対象群と比べて中等度の軸索輸送量の減少を認めた。

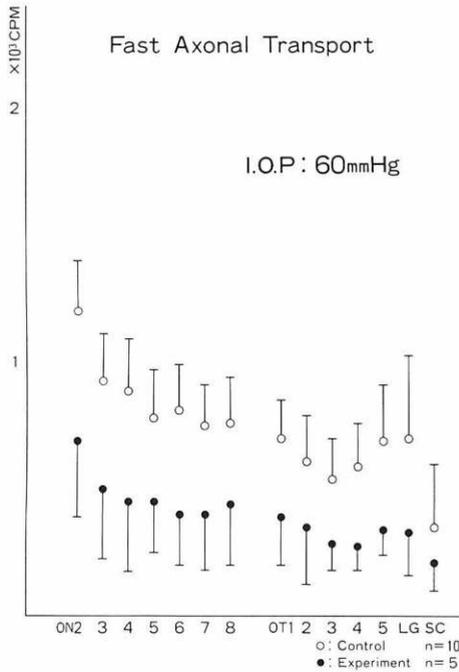


表4 視路の高速軸索輸送蛋白の放射能を示した、標識アミノ酸注入後3時間のために、対象群の軸索輸送量も少ない。又、80mmHgの眼圧上昇で軸索輸送量は著るしく障害された。

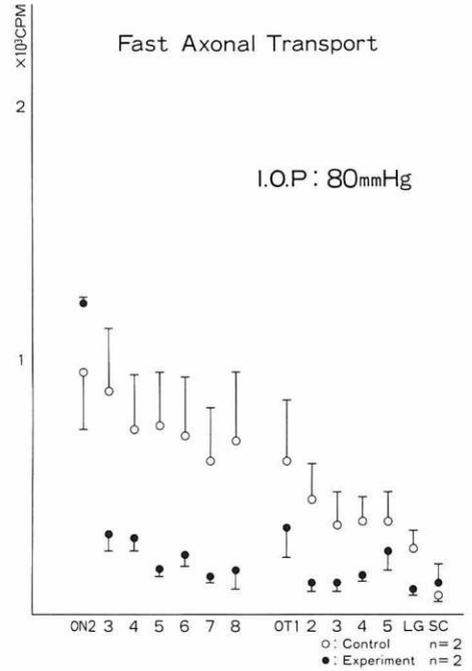
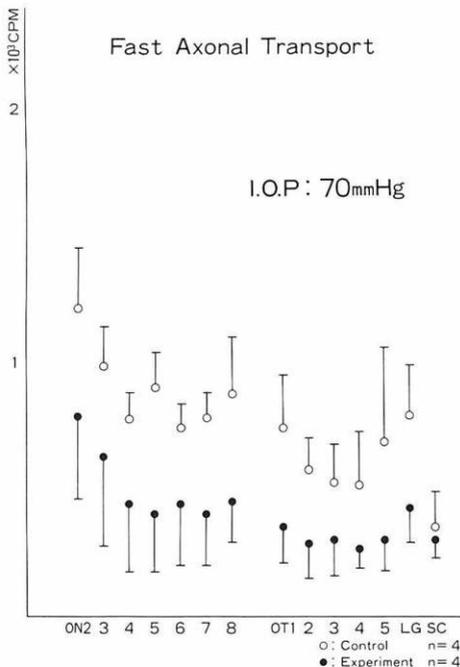


表3 視路の高速軸索輸送蛋白の放射能を示した、70 mmHgの眼圧上昇により対象群と比べて中等度の軸索輸送量の減少を認めた。



眼圧レベルにおける軸索輸送量の変化を TCA 法で定量的に測定したものである。表1に示したように眼圧を40mmHgに設定した群では視神経乳頭部(0N1)から上丘(SC)に至る視路における軸索輸送量は、コントロール群との間に殆んど差を認めなかった。表2、表3に示すように、眼圧を60, 70mmHgに設定した群では、球後部視神経(0N2)より上丘(SC)に至る視路において軸索輸送量は中等度に減少した。また、視神経・視索とも同程度に減少しており眼圧上昇とともに軸索輸送障害が生じたことを示している。表4には、80mmHgの眼圧を設定した状態での軸索輸送量を示した。眼圧上昇後約2時間後に強角膜部が裂け、実験をこの時点で中止したためコントロールの輸送量も他の実験群よりも少ないが、眼圧上昇の2羽では高度に輸送が障害されていることが示された。

(2) SDS-PAGE とフルオログラフィー：写真1, 2に示すように、眼圧上昇眼(60mmHg)では、LSCで示された放射能の減少が、フルオログラフィーでも同様に示された。しかしながら図1に示したようにデンストメトリーでは、ほぼ同様のパターンを示しており、

**Control**

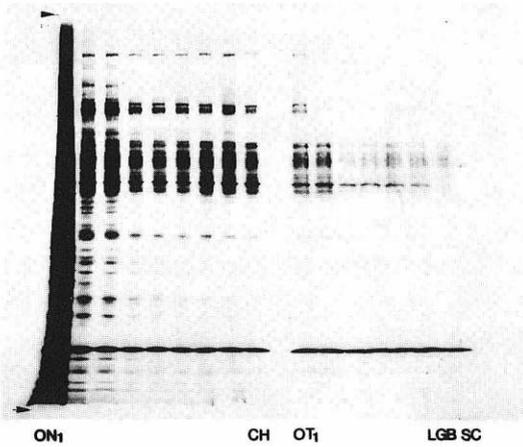


写真1 対象眼の視路のフルオログラフィーを示した。

**IOP 60 mmHg**

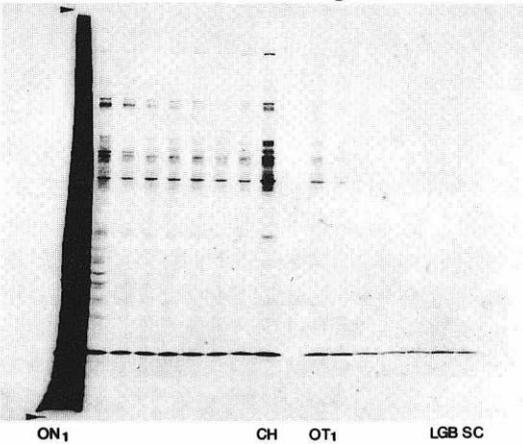


写真2 眼圧上昇(60mmHg)眼の視路のフルオログラフィーを示した。対象眼に比べON1は濃く、この部に軸索輸送蛋白の停滞があることが示されている。それ以後の視路では蛋白のバンドは薄く、輸送量の減少を示している。

明らかな質的变化を認めなかった。

(3) 視神経乳頭部における放射能：視神経乳頭部には、眼圧に対応した放射能の増加が認められる。表5に示すように眼圧が40mmHgでは、コントロール群との間に殆んど差を認めない。又、眼圧が80mmHgでは、硝子体腔へ標識アミノ酸注入後約3時間しか経っていない為、その放射能値は若干低値となっている。NCS-TCAのカウントも眼圧上昇とともに増加しており、この部に非軸索輸送成分の増加を認めている。

**Densitometry**

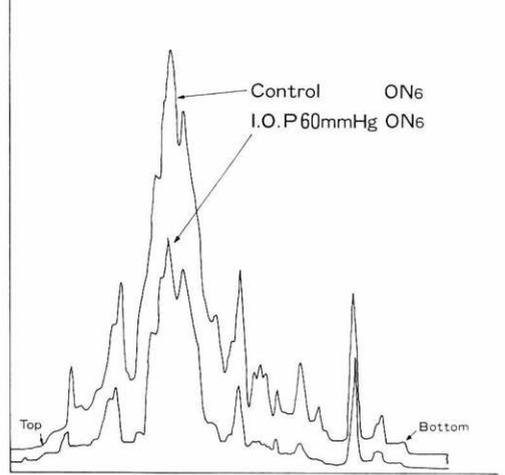
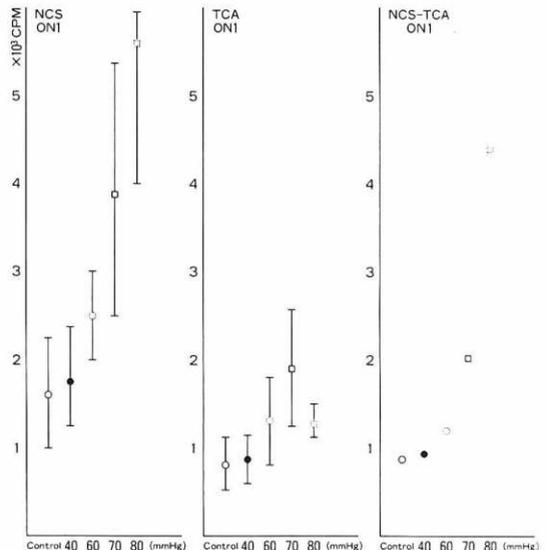


図1 フルオログラフィーで示した軸索輸送蛋白をデンストメトリーで測定した。対象眼と眼圧上昇眼(60 mmHg)では量的には異なるがほぼ同一のパターンを示している。

表5 視神経乳頭部(ON1)に集積する放射能を測定した。

NCS：全放射能値。TCA：主に軸索輸送蛋白成分の放射能値、NCS-TCA：主に非軸索輸送成分の放射能値。眼圧40mmHgではいずれも対象群との間に差は認めない。又眼圧の上昇に応じて各放射能値は増加している。80mmHgでは標識アミノ酸注入後約3時間の為TCA値は低値となっている。



(4) 白色家兎 Lamina Cribrosa の消化標本：写真3に示したように家兎の Lamina Cribrosa は、数層の

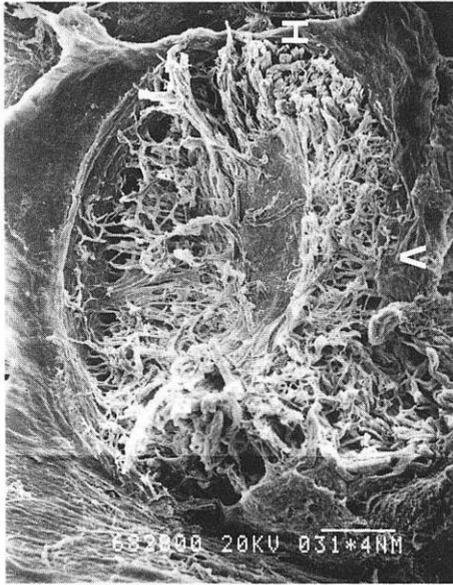


写真3 家兎の Lamina Cribrosa を示した, H: Horizontal, V: Vertical

不規則なひも状の線維構造からなり、Primate におけるような膠原線維の複数層の膜状の重なりからなる篩板孔に連なるチャンネル構造をもつ整然とした隔壁構造とは異なっていた。

#### IV 考 按

一般に順行性高速軸索輸送は、軸索輸送全体に占める量的割合は少ないが、神経機能の維持・シナプス小胞の輸送など質的には重要な役割りを果たしている<sup>8)11)~13)</sup>。

急性眼圧上昇の際に primate ではこの輸送が障害され、臨床的には視神経乳頭の腫脹、実験的には、標識蛋白の乳頭部への集積として認められる。そしてその障害部位は Lamina Cribrosa で、特に Lamina Scleralis に局在していることが種々の報告で明らかにされ<sup>1)~4)</sup>、眼圧上昇により Lamina の小孔を通り抜ける視神経束がしめつけられ、軸索輸送が障害されるものと推定されている。しかしながらこの輸送の障害が、Lamina Scleralis を欠損している白色家兎に発生していること<sup>5)</sup>や、又、逆行性の輸送も rat に同様に障害されている<sup>6)</sup>との報告もあり、Lamina Cribrosa の解剖学的構造と軸索輸送障害との関係について更に検討が必要と思われる。今回、この白色家兎を用いて種々の眼圧レベルを設定して、LSC を用いて定量的にこの

輸送の障害について調べた。

眼圧が40mmHg、4時間の持続では、輸送量はコントロール群とかかわらず、この程度の眼圧上昇及び持続時間では本輸送は殆んど障害されなかったものと考えてよい。

眼圧が60、70mmHg では、視神経・視索とも中等度の軸索輸送の減少が認められた。

Bill ら<sup>15)</sup>は、サルの実験で Perfusion Pressure が25 mmHg 以上に保たれた場合、乳頭部の循環血流量は十分に保たれると報告している。千原ら<sup>5)</sup>は、全麻下での白色家兎の平均血圧は約122±12mmHg と報告し、刺激状態では更に一過性に上昇すると述べている。今回使用した麻酔は塩酸オキシプロカイン (ペノキシル®)点眼のみで、全身血圧への影響は殆んどないとみてよく、この実験下では乳頭の循環血流量を十分に保つべき Perfusion Pressure は、60、70mmHg の眼圧下においても十分に確保されているものと考えられる。したがってこのレベルの眼圧負荷における軸索輸送量の減少は乳頭部の血液循環障害が原因とは考えにくい。

更に眼圧を著るしく高く80mmHg に設定した場合、軸索輸送は高度に障害された。

家兎では主に水平方向からの神経線維は、乳頭に侵入する前より有髄になっている。そしてこの髄鞘が、軸索及び軸索輸送を保護する可能性のあることについての報告<sup>5)</sup>もあるが、この80mmHg の眼圧では、この myelinated nerve fiber の輸送も強く障害を受けたものと考えられる。しかしながらこの眼圧レベルでは Perfusion Pressure もかなり減少しており、このレベルでの輸送の障害に Vascular な影響が関与している可能性は否定できない。

眼圧上昇の程度と視神経乳頭部(ON1)に集積する放射能を定量し比較したところ表5に示すように40 mmHg より高い眼圧では、眼圧上昇のレベルに応じた放射能の蓄積増加を認め、40mmHg ではコントロールと差がなかった。このことは家兎においても強い眼圧上昇により Lamina Cribrosa の部位で視神経が押しつけられ、その強さに応じた軸索輸送の停滞が、この部位におこっていることを示すものといえる。又、NLS-TCA 値も乳頭部において眼圧上昇に応じて増加しており、Non Axonal Transport<sup>5)</sup>も眼圧上昇レベルに応じて増加していることが示された。

千原ら<sup>5)</sup>は、白色家兎で眼圧が50mmHg では、軸索輸送の障害は軽度であると報告している。今回の家兎

実験でも40mmHgの眼圧レベルでは、軸索輸送量は殆んどコントロール群と差を認めなかった。一方それをこえた60, 70mmHgでは、中等度の軸索輸送の障害をきたした。このことは家兎 Lamina Cribrosa の解剖学的特性が関与する可能性が大きい。そこで家兎の Lamina Cribrosa の観察を行なってみた。

写真3に示したように、家兎の Lamina Cribrosa は、高等動物の規則的な孔あきシートの多層の重なりからできているものと異なり、線維状・ひも状の構造が不規則に数層配列して構成されているにすぎない。上下方向の神経線維はよく消化され、その構造もわかり易く、ひも状ビームがルーズに張られている。一方、水平方向の有髄線維は消化されにくく、大部分が残ったままであるが、同様に細いルーズなビームが張られている。これらのことは、眼圧上昇が著るしくない場合、このルーズなビームが緊張せず、50mmHg 程度までの眼圧上昇では軸索を絞扼する力が弱い、60 mmHg 以上の眼圧上昇では、その眼球壁の易可塑性とともに、この線維状・ひも状の Lamina Cribrosa は強く伸展され軸索を絞扼し軸索輸送を障害してしまうものと考えられる。

又、myelinated nerve fiber は、この程度の絞扼に対してかなり抵抗性があり、全体としてもかなり軸索輸送が維持される。しかし80mmHg 以上の眼圧では、この myelinated nerve fiber の軸索輸送も障害され全体として高度の輸送量の減少をきたしたものと考えられる。

一方、Quigley<sup>4)</sup>の Primate での定量実験では、Perfusion Pressure は25mmHg に設定され、この際の眼圧は75~125mmHg と極めて高眼圧である。このような異常な Perfusion Pressure にもかかわらず、眼圧上昇3時間以内では、軸索輸送は量的には殆んど障害を受けず、それ以後に障害が著るしくなっている。このことは Sheet 状の Lamina Cribrosa では Axonal flow は眼圧上昇により圧迫を受けても短時間では障害されにくく、明らかな障害の発生には一定以上の時間が必要になることがわかる。また、球後の視神経では3時間後より軸索輸送が減少し、時間経過とともに減少が著るしくなるので、この減少は単なる Slow down ではなく、輸送のブロックが起こっているとしている。

Beagle 犬では、今回の家兎に近い障害のパターンを示すとの報告<sup>4)</sup>があり、Primate に比べてその Lamina Cribrosa は脆弱なものと推定される。今回、更にこの輸送の障害をフルオログラフィーを用いて、その輸送

蛋白の質的な変化の有無について調べた。その結果では図1のデンストメトリーで示したように、輸送蛋白には明らかな質的变化を認めず、縁内障における軸索輸送障害は、障害される蛋白に関しては非特異的であることが示された。

## V 要 約

白色家兎硝子体腔に標識アミノ酸を注入し、その後前房内にカニューレを留置し実験的に急性に眼圧を上昇させ、各眼圧レベルの軸索輸送に与える影響を液体シンチレーションカウンターを用いて調べた。また、家兎の Lamina Cribrosa の消化標本を作製し走査電顕で観察した。

1) 軸索輸送量は眼圧が40mmHg ではコントロール群と差がなく、60, 70mmHg では中等度に減少し、80 mmHg では高度に減少した。

2) 視神経乳頭部には眼圧上昇レベルに応じた放射能の集積を認め、この部に軸索輸送の停滞を認めた。

3) 軸索輸送蛋白に質的な差を認めなかった。

4) 家兎の Lamina Cribrosa の消化標本を作製しその単純な構造から40mmHg 以下では軸索流は障害をみず、50mmHg 以上の眼圧で初めて圧迫による障害がおこるものと推定した。

岩田和雄教授の御校閲に深謝致します。

また走査電顕で御協力いただきました荒木幸雄技官および実験に協力していただいた新潟大学脳研究所神経薬理の諸兄に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Anderson DR, Hendrickson A: Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. Invest Ophthalmol Vis Sci 13: 771—783, 1974.
- 2) Minckler DS, Tso MOM, Zimmerman LE: A light microscopic, autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic nerve head during ocular hypotony, increased intraocular pressure, and papilledema. Am J Ophthalmol 82: 741—757, 1976.
- 3) Quigley HA, Anderson DR: Distribution of axonal transport blockade by acute I.O.P. elevation in the primate optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 640—644, 1977.
- 4) Quigley HA, Guy J, Anderson DR: Blockade of rapid axonal transport: Effect of intraocular pressure elevation in primate optic nerve. Arch Ophthalmol 97: 525—532, 1979.
- 5) Chihara E, Honda Y: Analysis of orthograde

- fast axonal transport and non axonal transport along the optic pathway of albino rabbits during increased and decreased intraocular pressure. *Exp Eye Res* 32: 229—239, 1981.
- 6) **Johansson JO**: Inhibition of retrograde axoplasmic transport in rat optic nerve by increased I.O.P. in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1552—1558, 1983.
  - 7) 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* 90: 321—327, 1986.
  - 8) 沢口昭一: 順行性高速軸索輸送の分析. I. 正常白色家兎視路における生化学的分析. *日眼* 89: 285—293, 1985.
  - 9) 池田直子, 沢口昭一: 高速軸索輸送蛋白の直接測定法について. *眼紀* 36: 395—400, 1985.
  - 10) **Emery JM, Landis D, Boniuk M**, et al: The lamina cribrosa in normal and glaucomatous human eyes. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 78: 290—297, 1974.
  - 11) **Bruce SM, Grafstein B**: Fast and slow components in axonal transport of protein. *J Cell Biol* 38: 494—508, 1968.
  - 12) **Karlsson JD, Sjöstrand J**: Synthesis, migration and turn over of protein in retinal ganglion cells. *J Neurochem* 18: 749—767, 1971.
  - 13) **Droz B**: Renewal of synaptic protein. *Brain Res* 62: 384—394, 1973.
  - 14) **Leslie W, Williams DVM, Kink N**, et al: Orthograde rapid axoplasmic transport and ultrastructural change of the optic nerve. Part 1. Normotensive and acute ocular hypertensive beagles. *Glaucoma* 5: 117—128, 1983.
  - 15) **Geiger C, Bill A**: Effect of raised intra ocular pressure on retinal, prelaminar, laminar, and retrolaminar optic nerve blood flow in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 1030—1042, 1979.
-