

眼圧亢進時の視神経乳頭 Peroxidase Diffusion (図12)

荒 木 實・高 橋 広 (慶応義塾大学医学部眼科学教室)

Peroxidase Diffusion in the Optic Disc Following
Acute Elevation of Intraocular Pressure

Minoru Araki and Hiroshi Takahashi

Dept of Ophthalmol, School of Med, Keio Univ.

要 約

生理学的範囲内において、細胞容積に最も大きな影響を与えるものは細胞膜内外の浸透圧差である。約100万の axon が分割され、篩状板細孔を通過するとき、もし、前篩状板部における axon がその細胞膜内外の液性環境の変化によって腫脹するようなことが起れば、axon は篩状板細孔部で圧迫障害を受けるであろう。Cynomolgus monkey を用い、protein tracer として静注された horseradish peroxidase の視神経乳頭内における局在について、灌流固定により電子顕微鏡観察を行った。正常眼の前篩状板部の axon 間隙に明らかに認められる tracer は眼圧上昇眼では激減した。眼圧上昇による axon の細胞外液性環境の変化と緑内障性視神経障害発現の関連について論じた。(日眼 91: 589—598, 1987)

キーワード：視神経乳頭，眼圧，血液—脳関門，ペリオキシダーゼ，浸透圧

Abstract

Within the limits of the physiological state, cell volume is seriously affected by the osmotic pressure both of extracellular and intracellular fluid environment. One million axons pass through pores in the scleral lamina cribrosa. On the assumption that the individual axons of the optic disc are swollen by changes in the extracellular or intracellular fluid environment, these axons may be damaged at the site of the scleral pores. Using an intravenous injection of horseradish peroxidase (HRP) as a tracer for electron microscopy with perfusion fixative, we have demonstrated that the blood-brain barrier is absent in the optic disc of normal cynomolgus monkeys. HRP extensively infiltrated the border tissues of Erschnig and surrounded axons of the optic disc, while the diffusion of HRP in the optic disc following acute elevation of intraocular pressure decreased markedly, suggesting that the bulk flow of fluid from the vitreous into the optic nerve head through the perivascular space of the radial peripapillary capillaries retards the movement of HRP from the choriocapillaries. The relationship between the changes of extracellular fluid environment of the axons in the lamina choroidaris and pathogenesis of glaucoma was discussed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 589—598, 1987)

Key words: Optic disc, Intraocular pressure, Blood-brain barrier, Peroxidase, Osmotic pressure

I 緒 言

緑内障性視神経障害の原因として、篩状板細孔の形

態変化による axon の圧迫を提唱する研究者が多いが^{1)~5)}、眼圧上昇による一次的な axon 自身の容積変化の可能性についての考察が全く行われていないのは甚

別刷請求先：160 東京都新宿区信濃町35 慶応義塾大学医学部眼科学教室 荒木 實

Reprint requests to: Minoru Araki, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Keio Univ.

35 Shinano-Machi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(昭和62年1月13日受付) (Accepted January 13, 1987)

だ問題である。硬い結合組織からなる篩状板の細孔の形態変化がおこると仮定しても、それはまず緑内障に特異的な視神経障害が発現する乳頭の特定位位におこるべきである。そのような病理組織学的な証明はない。末期緑内障眼に認められる篩状板細孔部の形態変化は、生理学的範囲内の眼圧上昇そのものによるよりも、むしろ axon 群の病理学的変化に対する二次的な変化であることの可能性が大きい。

生理学的範囲内で、細胞の容積に最も大きな影響を与えるものは膜内外の浸透圧差である。眼圧の変化に対する乳頭部における axon の細胞膜内外の液性環境の変化は axon の容積変化を招来し、細孔通過の axon の生理学的機構に影響があると考えられ、緑内障視神経障害の発現に重要な意義を有する。

axon 内の液性環境の変化は神経興奮伝達機能維持のエネルギー代謝障害に起因し、主として眼圧上昇による乳頭部毛細血管の循環障害が主役を演ずる。一方 axon 外の液性環境の変化は脈絡膜毛細血管からの protein diffusion の変動に由来する。緑内障性視神経障害と乳頭毛細血管の循環障害の関連については、さきにその詳細を報告した⁶⁾。本研究は眼圧上昇に対する axon 外液性環境変化観察を主目的として、脈絡膜毛細血管から乳頭への protein diffusion について検討を行った。

II 実験方法

Cynomolgus monkey を用い、前房に接続したマンノメーターにより、左眼を50mmHg、右眼を15mmHg の眼圧に2時間30分維持したのち、眼圧を同じ状態に保ったまま、horseradish peroxidase Sigma Typ. II. (HRP)200mg/kg を静注した。静注後30分を経て4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde の phosphate buffer 混合液 (pH 7.4) 1,000ml にて心臓より灌流固定を行った。眼球および視神経を注意深く摘出し、前記固定液でさらに3時間の浸漬固定を追加し、15% sucrose を加えた phosphate buffer 内で12時間水洗、次いで sucrose を20% とし、これに10% glycerin を加えたものに3時間浸漬した。視神経は radial peripapillary capillaries (RPC) を含む面で厚さ3 μ の凍結縦断切片とし、Karnovsky の方法⁷⁾で DAB 反応を実施し、光顕および電顕観察を行った。

III 実験結果

視神経乳頭の縦断切片の光顕全体像により、正常眼

圧眼 (Fig. 1) と高眼圧眼 (Fig. 3) の DAB 反応産物の濃染度を比較すると、両者に明らかな差を認め、脈絡膜毛細血管からの tracer の拡散は後者において著しく抑制された。電顕観察では脈絡膜毛細血管から拡散された tracer の DAB 反応産物は Bruch 膜を濃染し、視神経外周の Elschnig の結合組織を経て lamina choroidalis の結合組織を濃染し、glia, axon 間隙に拡散するが (Fig. 2)、高眼圧眼ではこれら拡散は著しく減弱した (Fig. 4)。電顕像上の tracer の確認のために、最も拡散度の強い lamina choroidalis の無染色電顕像 (Fig. 5, Fig. 6) では、正常眼の axon の細胞間隙の DAB 反応産物は確実であり (Fig. 5)、高眼圧眼では著しい減弱が認められた (Fig. 6)。高倍率観察では、glia 細胞膜に DAB 反応産物に濃染した pinocytotic vesicle が認められ (Fig. 7)、axon 周囲に拡散した tracer の glia 細胞内への取込み所見がみられる。Fig. 8 に lamina choroidalis の毛細血管外壁の astrocytic processes 内の phagosome を示すが、endothelium, astrocyte の基底膜間に集積した tracer を貪食している所見が認められる。Fig. 9, Fig. 10 に夫々 HRP を硝子体内に注入した場合と静脈内に注入した場合の lamina choroidalis の静脈性毛細血管外壁の tracer の集積状態を示す。両者の電顕所見は極めて類似し、毛細血管の endothelium, pericyte およびこれらを取囲む astrocytic processes の基底膜間に集積した tracer を含有した多数の vesicular transport が血管内腔に向い、また astrocyte 内に取込まれているのが観察される。乳頭内に順次に拡散してくる tracer がどのような経路で消退するかは重要であって、glia 細胞の貪食と静脈性毛細血管内への排泄がその主要な経路と考えられる。Fig. 11, Fig. 12 に夫々正常眼、高眼圧眼の lamina scleralis の電顕像を示す。前者の axon 細胞間隙にはその一部に僅かながら tracer の存在を認めるが、lamina choroidalis の部位に較べ、tracer の拡散度は極めて低い。後者ではそれらは全く認められない。

IV 考 按

網膜の ganglion cell に発して乳頭に集合する全 axon は、lamina choroidalis の glial colum によって分割され、引続き lamina scleralis の細孔に細分割されて通過する。一つの細孔に対する axon の数量が多すぎるとき、正常眼でも一部の axon に障害が起り得るであろう。また、その数量が細孔通過に適正であっ

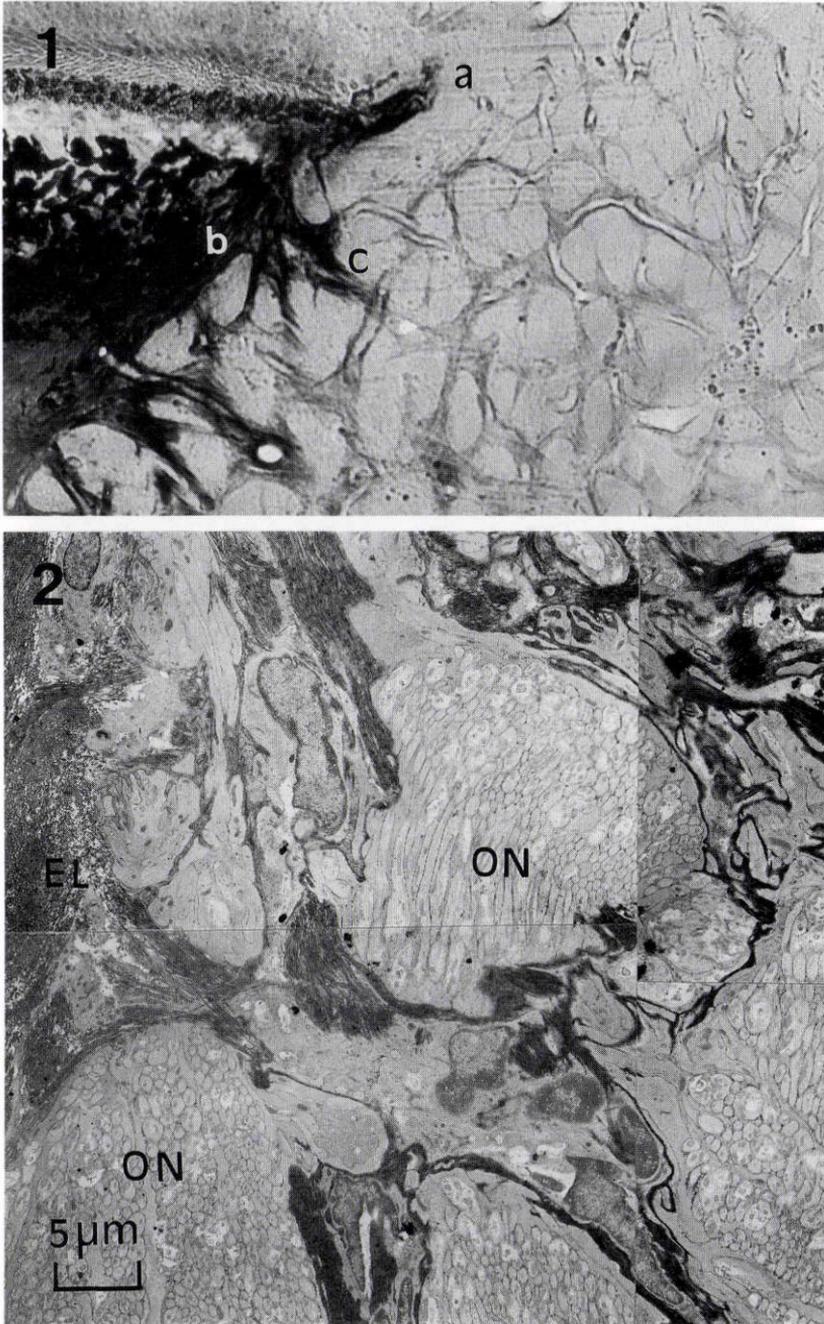


Fig. 1 Light microscopical section of right optic disc of normal cynomolgus monkey 30 minutes after injection of HRP. HRP extends through glial and connective tissue (magnification $\times 100$). a, end of Bruch's membran ; b, choroidalportion of the canal ; c, the prelaminar glial septae.

Fig. 2 Electron microscopical section of lamina choroidalis of the same specimen shown in Fig. 1. HRP extensively infiltrates border tissue of Erschnig (EL), extends through glial tissues and surrounds axons of optic nerve (ON).

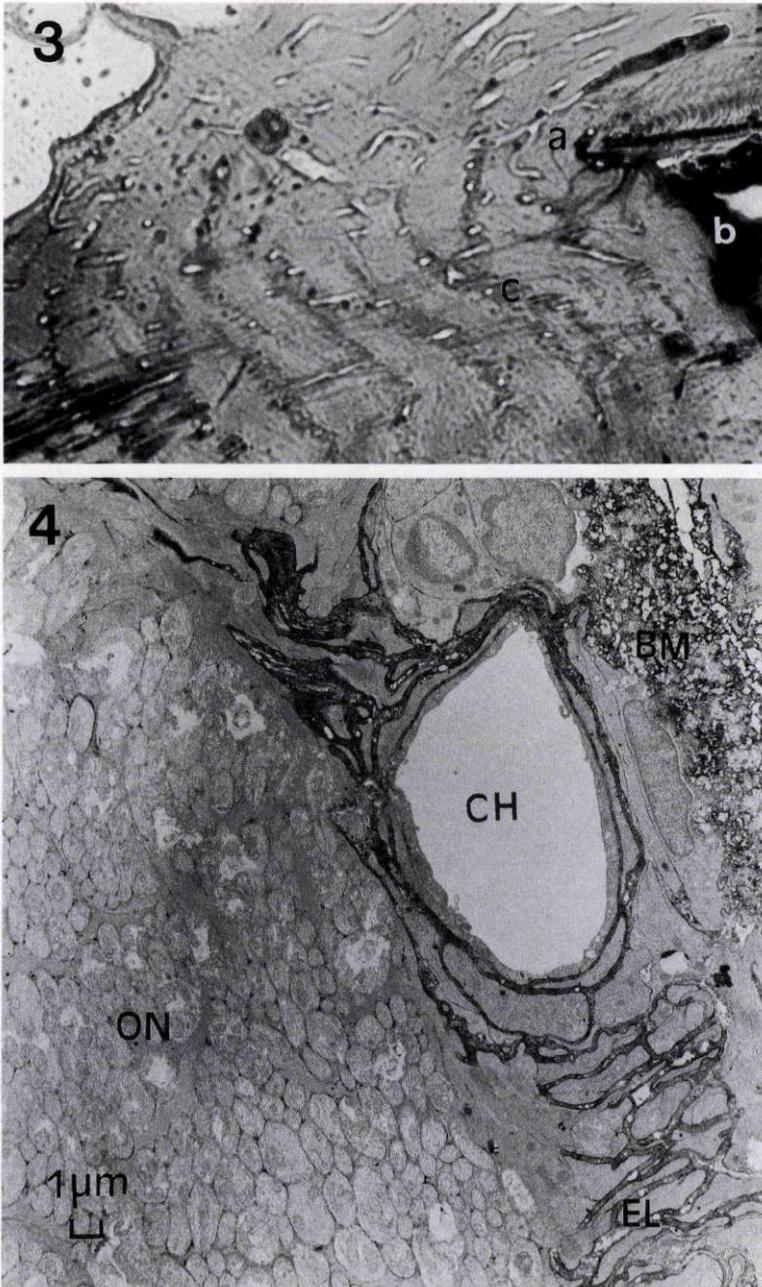


Fig. 3 Light microscopical section of left optic disc in the same monkey shown in Fig. 1. The intraocular pressure was maintained at 50mmHg level for 3 hours. HRP was injected into vein 30 minutes before the sacrifice of the animal (magnification $\times 100$). Tracer material infiltrates border tissue (b) but extremely less extensively than that of normal right eye; a, end of Bruch membrane.

Fig. 4 Electron microscopical section of lamina choroidalis of the same specimen shown in Fig. 3. Bruch membrane (BM) and border tissue of Elschnig (EL) are densely permeated by tracer, which extremely less extends to axons of optic nerve than that of normal eye; CH, choriocapillary lumen.

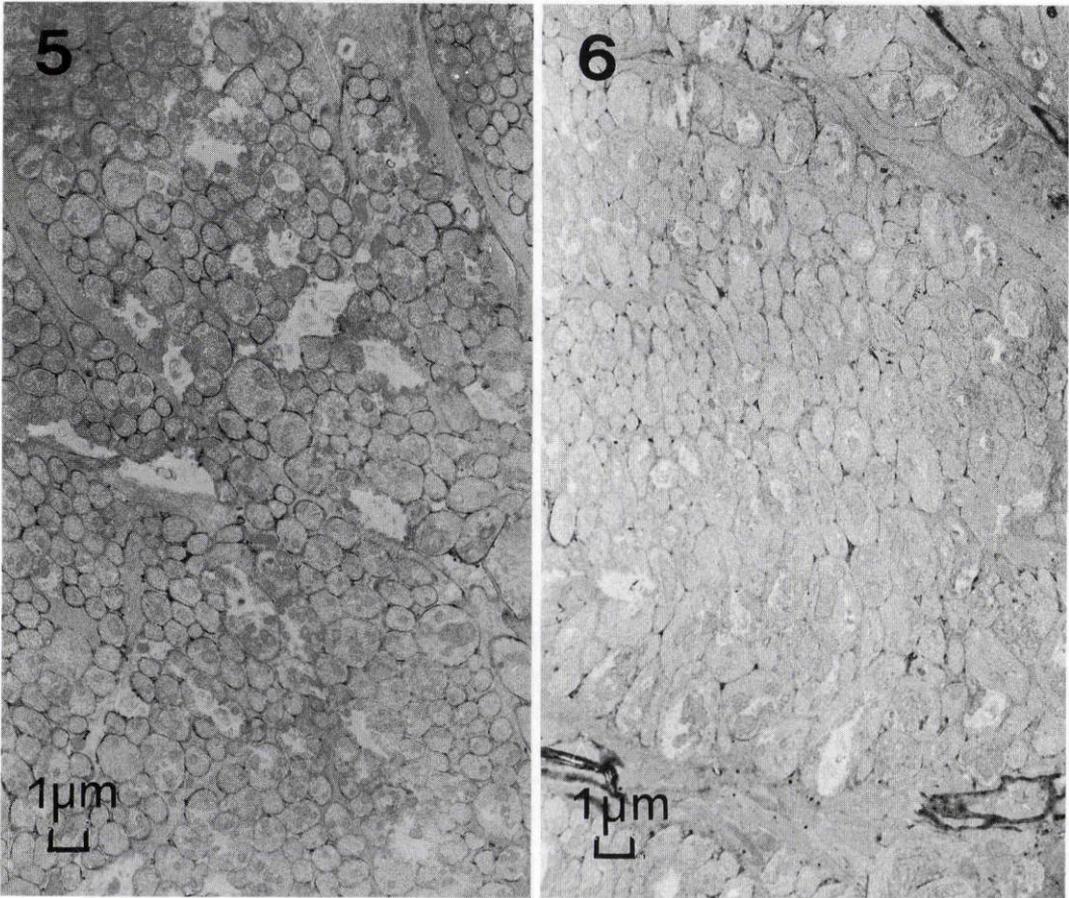


Fig. 5 Unstained electron microscopical section of region of lamina choroidalis 30 minutes after injection of HRP in normal eye. HRP extensively infiltrates around axons of optic disc.

Fig. 6 Unstained electron microscopical section of same area as shown in Fig. 5. Thirty minutes after injection of HRP following acute elevation of IOP at 50mmHg levels for 3 hours. HRP extremely less permeated around axons than normal eye.

でも、循環障害などにより axon の代謝に異常がおこり、細胞内粒子が増大して浸透圧が上昇するか、あるいは眼圧の上昇により、脈絡膜から乳頭内への protein diffusion が減少し、axon をとりまく外部液性環境に変化が発生して、その浸透圧が低下するような事態がおこれば、乳頭部の axon はその容積を増加する可能性がある。Lamina choroidalis の部の axon は腫脹しても圧迫障害はおこり得ないが、これら腫脹した axon 群が篩状板細孔に入る場合には、axon の細胞膜にくびれが生じ、また polarity のある axon 内の microtubules⁸⁾ の走行の乱れやくびれが生じ、それら

に応じて axonal flow は細孔の入口から出口までの間において色々な程度に停滞するものと考えられ、axonal flow が停滞すれば、axon は二次的に更に腫脹するという悪循環がおこる。眼圧上昇時の axonal flow の遮断の状態から、緑内障性視神経障害の障害部位は lamina scleralis にあることが定説となっているが、axon が細孔に入る直前の lamina choroidalis における生理学的状態が極めて重要な意義を有するものと考えられる。

中枢神経系の一部と考えられる網膜、視神経に Blood-Brain Barrier が存在するか否かについて極め

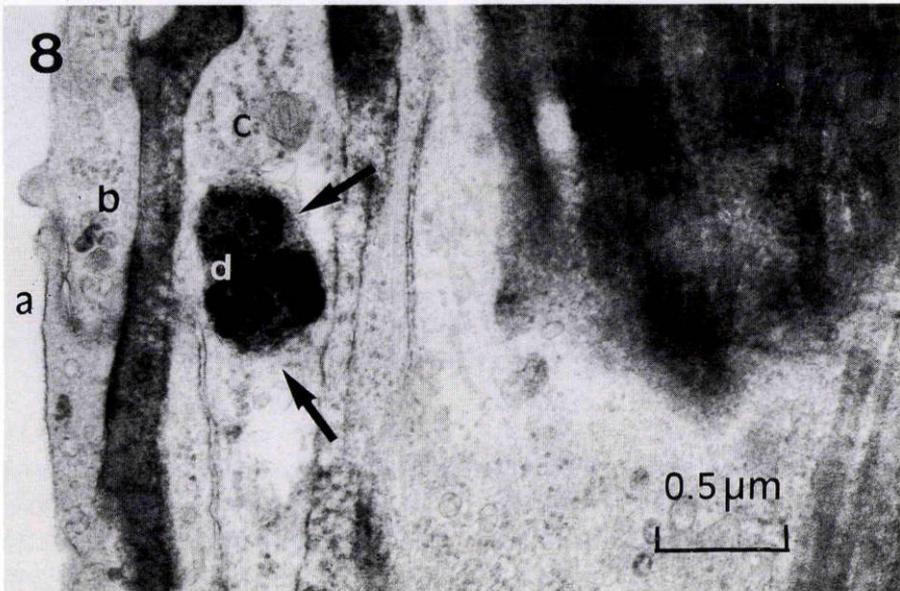
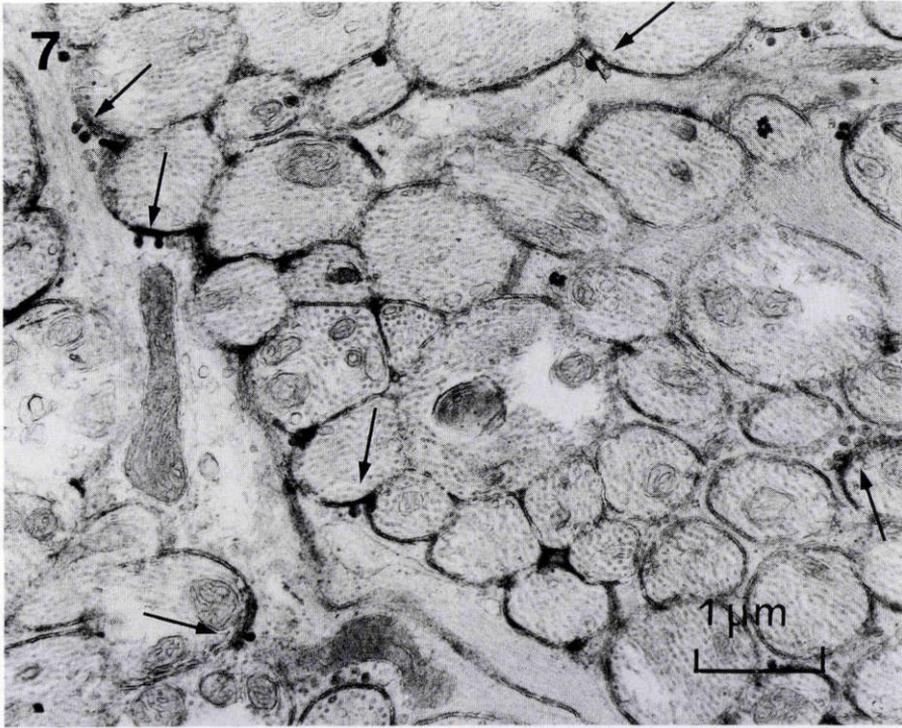


Fig. 7 Large magnification of lamina choroidea of normal eye. HRP is definitely present around axons, and pinocytotic vesicles containing HRP (arrows) in the astrocytic processes are on the axonal side of the cells showing phagocytosis of the glia cells.

Fig. 8 A capillary lumen (a) with its endothelium (b), astrocytic process (c) and phagolysosomes (d) in the same specimen shown in Fig. 7. Basement membrane of astrocytic processes are densely permeated by HRP, which moves into the phagosomes (arrows).

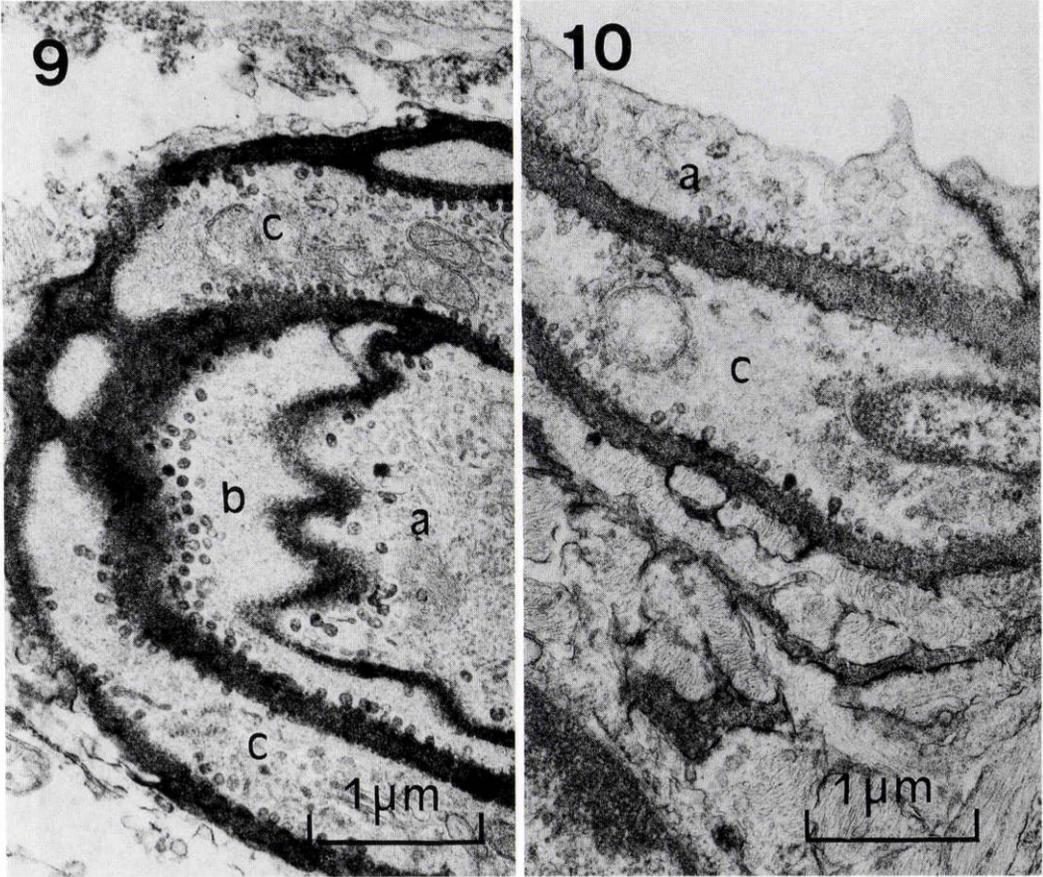


Fig. 9 Basement membrane of endothelial cell (a) as well as of pericyte (b) and astrocytic processes (c) of a capillary in the lamina choroidalis 30 minutes after HRP injection into vitreous. Many pinocytotic vesicles carrying HRP in the endothelial cell or pericyte are mostly on the contraluminal side of the cell, and phagocytosis are seen in the astrocytic processes.

Fig. 10 Basement membrane of endothelial cell (a) as well as of astrocytic process (c) of a capillary in the lamina choroidalis 30 minutes after HRP injection into vein. Vesicular transport are present just same as shown Fig. 9.

て多くの研究があり⁹⁾⁻¹⁷⁾、いずれも毛細血管からの protein あるいは色素の漏出は認められず、barrier の存在は肯定されている。問題は視神経乳頭部という極めて限局した部位にあり、これに関する代表的研究として、Tso et al¹¹⁾、および Radius et al¹⁶⁾¹⁷⁾のそれをあげることができる。前者は正常眼圧の rhesus monkey を実験動物とし、tracer として HRP を用いた電顕観察であり、後者は owl monkey を用い、serum albumin と強い親和性を有する evans blue を tracer した光顕観察である。前者は乳頭血管からの tracer の漏出は認められないが、脈絡膜毛細血管から glia,

axon 周囲間隙に生理学的な拡散が認められるとし、Blood-Brain Barrier は乳頭部のみ欠如しているとするものであり、この報告の意義は大きい。ただ用いた組織固定法が浸漬固定であり、その artifact が問題視されている。Radius は主として血管からの漏出観察を目的とした光顕レベルの研究において、浸漬固定法では脈絡膜、網膜、視神経に tracer の出現を認めるのみか乳頭血管系からの漏出も観察されるが、灌流固定では脈絡膜、視神経乳頭内にも tracer の存在をみないとし、浸漬固定法における artifact を強調している。眼圧の影響に関する研究には fluorescein を用いた

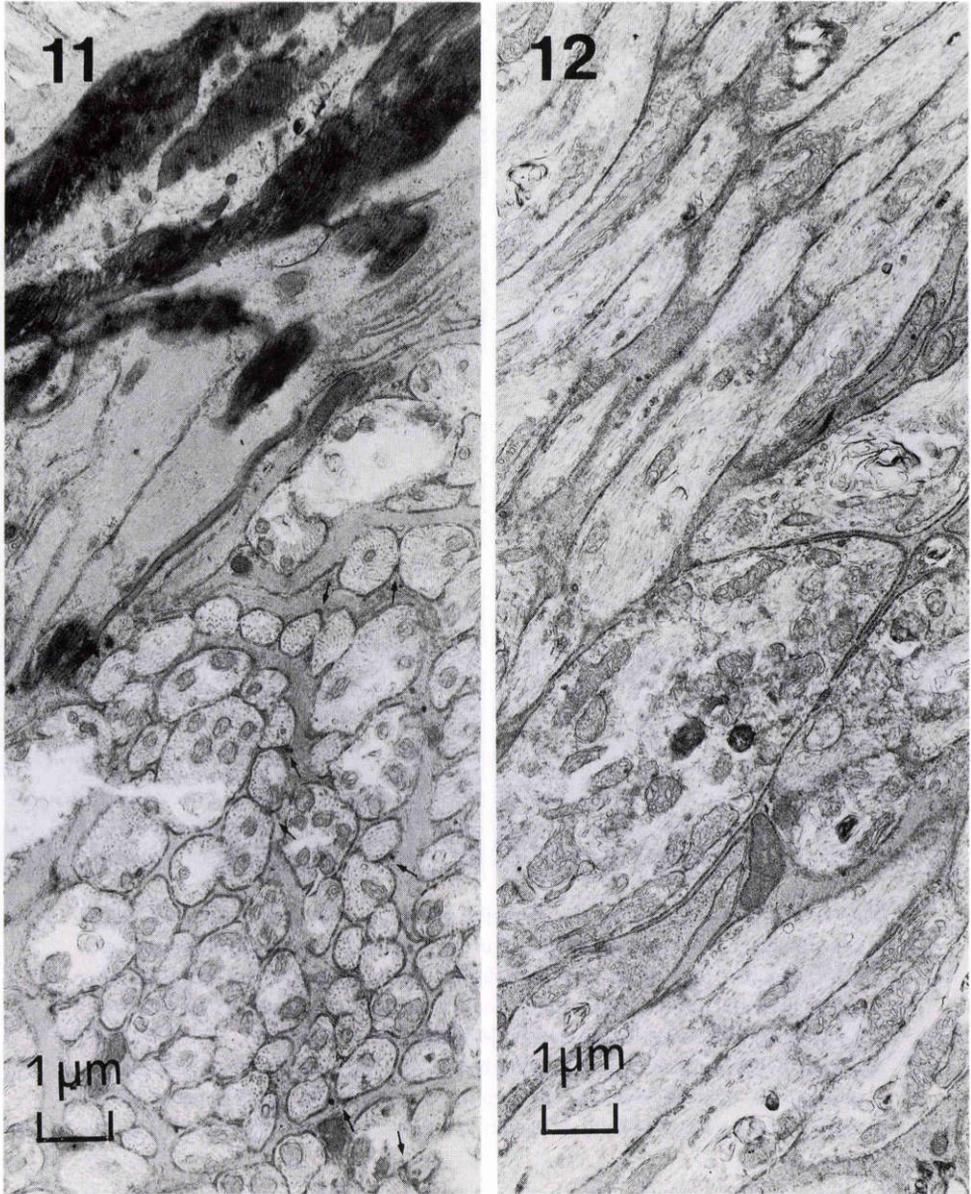


Fig. 11 Lamina scleralis of right normal eye 30 minutes after injection of HRP. Tracer materials infiltrates connective tissue and some of extracellular space between axons and glia cells (arrows), but extremely less extensively than that of region of lamina choroidalis.

Fig. 12 Lamina scleralis of the left glaucomatous eye 30 minutes after injection of HRP. No tracer materials are seen at the extracellular space between axons.

Laties et al¹⁶⁾および Radius et al¹⁷⁾の光顕観察報告がある。前者は上昇眼圧を正常にもどした直後の成績であるが、乳頭血管系からの漏出を認めず、後者は正常

眼圧にもどしたあと1時間後の観察であり、乳頭血管からの漏出を認めるが、その漏出部位と axonal flow 遮断部位との間に何等関連を認めないとしている。血

管からの漏出は axon の腫脹回復という観点からかえって好結果をもたらすものと考えられる。著者らの今回の実験は灌流固定法を採用したものであるが、その正常眼における成績は Tso らの成績と同様であって、axon が密集して篩状板細孔を通過するその直前の axon 周囲間隙に、選択的に脈絡脈毛細血管から protein を拡散して、その部の axon 群の容積増加を抑制し、正常の視神経機能を維持しようとする生理学的機構があるのではないかと考える。Lamina choroïdalis の axon の細胞外液性環境を支配する主要な bulk flow として二つが考えられる。その一つは硝子体からの flow であり、他は有窓性の脈絡膜毛細血管からの flow である。前者は網膜の Müller 細胞間隙を通過して axon 間隙を満し、網膜毛細血管特に RPC の血管周囲腔に集合し²⁰⁾、引続き視神経乳頭の上下から、lamina retinalis の axon 間隙に流入する¹⁹⁾。その protein 濃度は脳脊髄液と同様に極めて低く、眼圧の上昇によってこれらの flow は lamina choroïdalis へと拡大する⁹⁾。一方後者は脈絡膜毛細血管から前述のように視神経外周の Elschnig の結合組織を経て乳頭内の結合組織に入り、さらに glia, axon 間隙へと流入する。その protein 濃度は前者のそれに比較してはるかに高いものと考えられる。これらの bulk flow は何れも主として乳頭内静脈性毛細血管に流入する。眼圧の上昇に際しては、特に乳頭の上下の方向において、前者が優勢となり、後者が抑制され、lamina choroïdalis の axon の細胞外液性環境はその浸透圧において正常眼よりも低下するであろうことが考えられる。なお、乳頭微小循環に重大な影響をおよぼす chemical mediators の拡散の可能性については現在研究中である。

さらに、axon がその容積を増大する重要な生理学的現象として、神経興奮伝達時にその容積を増加することが報告されている^{19)~22)}。その個々の axon の腫脹は極めて僅かであっても、axon 群が一団となって細孔を通過するような場合、axon の機能にどのような影響が生ずるものか、またその影響を防止するどのような生理学的機構が存在するか、今後の研究にまたなければならぬが、乳頭部への protein 拡散もその一つであろうことが推測される。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました植村恭夫教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、技術的援助をいただいた本塾医学部病理学教室榎本康弘先生に深く感謝いたします。本論文の要旨は昭和61年第90回日本眼科学会総

会にて講演した。

文 献

- 1) **Maumenee AE**: Causes of optic nerve damage in glaucoma (Shaffer Lecture). *Ophthalmology* 90: 741—752, 1983.
- 2) **Quigley HA, Hohman RM, Addicks EM, Massof RW, Green WR**: Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 95: 673—691, 1983.
- 3) **Radius RL, Anderson DR**: Reversibility of optic nerve damage in primate eyes subjected to intraocular pressure above systolic blood pressure. *Br J Ophthalmol* 65: 661—672, 1981.
- 4) **岩田和男**: 原発開放隅角緑内障の初期病態. *臨眼* 39: 407—424, 1985.
- 5) **千原悦夫**: 軸索輸送障害の立場からみた緑内障性視神経萎縮、機械的障害説について. 眼科領域における最新の進歩. 編集企画 塚原 勇, 医学教育出版社, 84—95, 1985.
- 6) **荒木 實**: 血管構築を基本とした緑内障視神経障害の解明. 眼科領域における最新の進歩. 編集企画 塚原 勇, 医学教育出版社, 69—83, 1985.
- 7) **Graham RC Jr, Karnovsky MJ**: The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291—302, 1966.
- 8) **Burton PR, Paige JL**: Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3269—3273, 1981.
- 9) **Machemer R**: Angiographic-histologic correlation of eye vessel permeability with protein-bound fluorescent dye. *Am J Ophthalmol* 69: 27, 1970.
- 10) **Olsson Y, Kristensson K**: Permeability of blood vessels and connective tissue sheaths of retina and optic nerve. *Acta Neuropathol* 26: 147, 1973.
- 11) **Tso MOM, Shih CY, Mclean IW**: Is there a blood-brain barrier at the optic nerve head? *Arch Ophthalmol* 93: 815—825, 1975.
- 12) **Shiose Y**: Electron microscopic studies on blood-retinal and blood-aqueous barriers. *Jpn J Ophthalmol* 14: 73, 1970.
- 13) **Grayson MC, Laties AM**: Ocular localization of sodium fluorescein. Effects of administration on rabbits and monkeys. *Arch Ophthalmol* 85: 600, 1971.

- 14) **Peyman GA, Apple D**: Peroxidase diffusion processes in the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 88: 650—654, 1972.
- 15) **Ernest JT, Archer D**: Fluorescein angiograph of the optic disc. *Am J Ophthalmol* 75: 973—978, 1973.
- 16) **Radius RL, Anderson DR**: Distribution of albumin in the normal monkey eye as revealed by evans blue fluorescence microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 238—243, 1980.
- 17) **Radius RL, Anderson DR**: Breakdown of normal optic nerve head blood-brain barrier following acute elevation of intraocular pressure in experimental animals. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 19: 244—255, 1980.
- 18) **Laties A, Armaly M, Rao R, Rapoport S**: The blood ocular barrier under stress. In *Vitreous Surgery and Advances in Fundus Diagnosis and Treatment*, Freeman HM, Hirose T, Schepens CI, editors, New York, 1977, Appleton-Century-Crofts, pp559—568.
- 19) **Araki M**: The effect of the intraocular pressure on the vascularization of the optic nerve. *Acta Soc Ophthalm Jap* 79: 981—996, 1975.
- 20) **Araki M**: Dynamics of vitreous humor, Drainage of the vitreous humor through the retinal capillaries. *Acta Soc Ophthalm Jap* 80: 1276—1284, 1976.
- 21) **Iwasa K, Tasaki I, Gibbons RC**: Swelling of nerve fibers associated with action potentials. *Science* 210: 338—339, 1980.
- 22) **Tasaki I, Byrne PM**: Swelling of frog dorsal root ganglion and spinal cord produced by afferent volley of impulses. *Brain Research* 272: 360—363, 1983.
- 23) **Tasaki I, Nakaye T, Byrone PM**: Rapid swelling of neurons during synaptic transmission in the bull frog sympathetic ganglion. *Brain Research* 331: 363—365, 1985.
- 24) **Terakawa S**: Changes in intra cellular pressure in squid giant axons associated with production of action potentials. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 1006—1010, 1983.

(第90回日眼総会原著)