

## 網膜前増殖膜の免疫電子顕微鏡的検討

—Glial fibrillary acidic protein について—(図5, 表1)

岡田 守生・松村 美代・山川 良治 (京都大学医学部眼科学教室)  
白川 弘泰・吉村 長久・荻野 誠周Immunoelectron microscopic study on glial fibrillary  
acidic protein (GFAP) containing cells  
in preretinal proliferative tissueMorio Okada, Miyo Matsumura, Ryoji Yamakawa, Hiroyasu Shirakawa,  
Nagahisa Yoshimura, and Nobuchika Ogino*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University.*

## 要 約

手術的に切除した11例の網膜前増殖膜組織 (Macular pucker 5例, 増殖性硝子体網膜症 6例) 中の神経膠細胞について, 神経膠細胞に特異的に含まれる Glial fibrillary acidic protein (GFAP) を細胞マーカーとして, 金コロイド法による免疫電子顕微鏡的観察をおこなった。11例の網膜前増殖膜組織の内, Macular pucker では5例中4例, 増殖性硝子体網膜症では6例中3例に GFAP 陽性の細胞がみられた。GFAP 陽性細胞は症例により異なった形態をとっていたが, 抗 GFAP 抗体, プロテイン A-ゴールドで処理するといずれも細胞質内の中間径フィラメントの線維束に一致して金粒子の付着がみられ, 神経膠細胞が増殖組織の形成に高率に関与していることが確かめられた。(日眼 91: 657—664, 1987)

キーワード: 増殖性硝子体網膜症, GFAP, 免疫金コロイド法, 網膜前増殖膜

## Abstract

Resected preretinal proliferative specimens from 11 cases were examined for glial fibrillary acidic protein (GFAP)-containing cells by immunocolloidal gold electron microscopy. Tissues were fixed with glutaraldehyde and paraformaldehyde and embedded in Lowicryl K4M. Thin sections were treated with rabbit anti GFAP antiserum followed by protein A-coated colloidal gold. GFAP-positive cells were observed in 4 of 5 cases of macular pucker and 3 of 6 cases of proliferative vitreoretinopathy. These cells contained bundles of intermediate filaments which were specifically tagged with gold particles. These observations clearly show that these cells are of neuroglial origin. Other cell types such as retinal pigment epithelial cells, fibroblasts and macrophages were also observed, and some of them had intermediate filaments which, however, were not significantly tagged with gold particles. Thus the present study showed that many cases of preretinal proliferative tissues result from pathological proliferation of neuroglia. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 657—664, 1987)

Key words: Proliferative vitreoretinopathy, GFAP, Immunocolloidal gold method, preretinal proliferative membrane.

別刷請求先: 606 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学医学部眼科学教室 岡田 守生

Reprint requests to: Morio Okada, M.D. Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.

53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(昭和62年2月23日受付) (Accepted February 23, 1987)

## I 緒 言

Macular pucker (MP) や、増殖性硝子体網膜症 (PVR) 等の増殖組織を構成する細胞は、形態学的観察によって網膜色素上皮細胞、神経膠細胞、線維芽細胞、その他の細胞から由来すると考えられている<sup>1)~9)</sup>。典型的な色素上皮細胞と線維芽細胞は、形態学的特徴から比較的同一しやすいが神経膠細胞は、多様な形態をとるために同一しにくく、しかも、増殖組織を構成する細胞は本来の形態を失って異型化していることもあり、単なる形態学的観察のみでは細胞由来を同一することが困難な場合も多い。近年、神経膠細胞には、細胞骨格の中間径フィラメント蛋白質の一つである glial fibrillary acidic protein (GFAP) が特異的に存在していることが分かり、これをマーカーとして神経膠細胞の同一が可能になった<sup>10)11)</sup>。しかし、網膜前、後増殖膜を培養し、これに抗 GFAP 抗体による間接蛍光抗体法を用いても、GFAP 陽性細胞が明確に認められなかった<sup>12)</sup>。そこで今回、手術的に摘出した11例の網膜前増殖膜 (MP 5 例、PVR 6 例) をそのまま標本として、免疫金コロイド法による電子顕微鏡観察を行い網膜前増殖膜中の GFAP 陽性細胞の有無を検索した。

## II 症例および実験方法

### 1. 症例

網膜剥離手術後に発生した MP 5 例 (表 1, 症例 1 から症例 5, ただし症例 5 は症例 4 の再発) と PVR 6 例 (表 1, 症例 6 から症例 11) から手術的に切除した網膜前増殖膜、計11例を対象とした。

### 2. 試料の作成

硝子体手術で得た網膜前増殖膜を、0.1%グルタルアルデヒド及び3%パラホルムアルデヒドを含む  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ -free Dulbecco リン酸緩衝液 (pH 7.2) (PBS) をもちいて室温で1時間固定した。PBS で洗浄し、0℃の50%エタノールにて30分間脱水した後、-35℃でエタノール系列の脱水を行い Lowicryl K4M (Polaron Equipment Ltd. England) に包埋し、紫外線照射 (320nm) で重合した。包埋した試料は、ウルトラミクロトーム (LKB-produkter A B Bromma, Sweden) で薄切し染色に供した。対照として、ヒト視神経、ヒト網膜、ヒト網膜色素上皮、ラット脳をもちいて同様に処理した。

### 3. 免疫金コロイド法

薄切した切片を、1%牛血清アルブミンを含む PBS

表 1

| 症例 | 増殖組織           | 年齢 性別  | GFAP陽性細胞 |   |
|----|----------------|--------|----------|---|
| 1  | Macular pucker | 34歳 男性 | +        |   |
| 2  | Macular pucker | 56歳 男性 | +        |   |
| 3  | Macular pucker | 17歳 男性 | +        |   |
| 4  | Macular pucker | 58歳 女性 | -        |   |
| 5  | Macular pucker | 58歳 女性 | +        | * |
| 6  | PVR            | 17歳 女性 | +        |   |
| 7  | PVR            | 50歳 女性 | -        |   |
| 8  | PVR            | 12歳 女性 | +        |   |
| 9  | PVR            | 60歳 女性 | +        |   |
| 10 | PVR            | 64歳 男性 | -        |   |
| 11 | PVR            | 52歳 男性 | -        |   |

(\* 症例 4 の再発)

(BSA-PBS) で5分間処理して非特異的反応の可能性を除いた後、ウサギ抗 GFAP 抗体 (DAKO Corp. Santabarbara, USA) を室温で30分反応させた。BSA-PBS で3回洗浄の後、プロテイン A-ゴールド (金コロイド (直径5-10nm) は、Mühlpfordt<sup>13)</sup>の方法にしたがって調製し、プロテイン A と結合させた。) と室温で30分反応させた。BSA-PBS で3回、蒸留水で3回洗浄の後、酢酸ウラニールで染色し、日立 HS-9 透過型電子顕微鏡にて観察した。

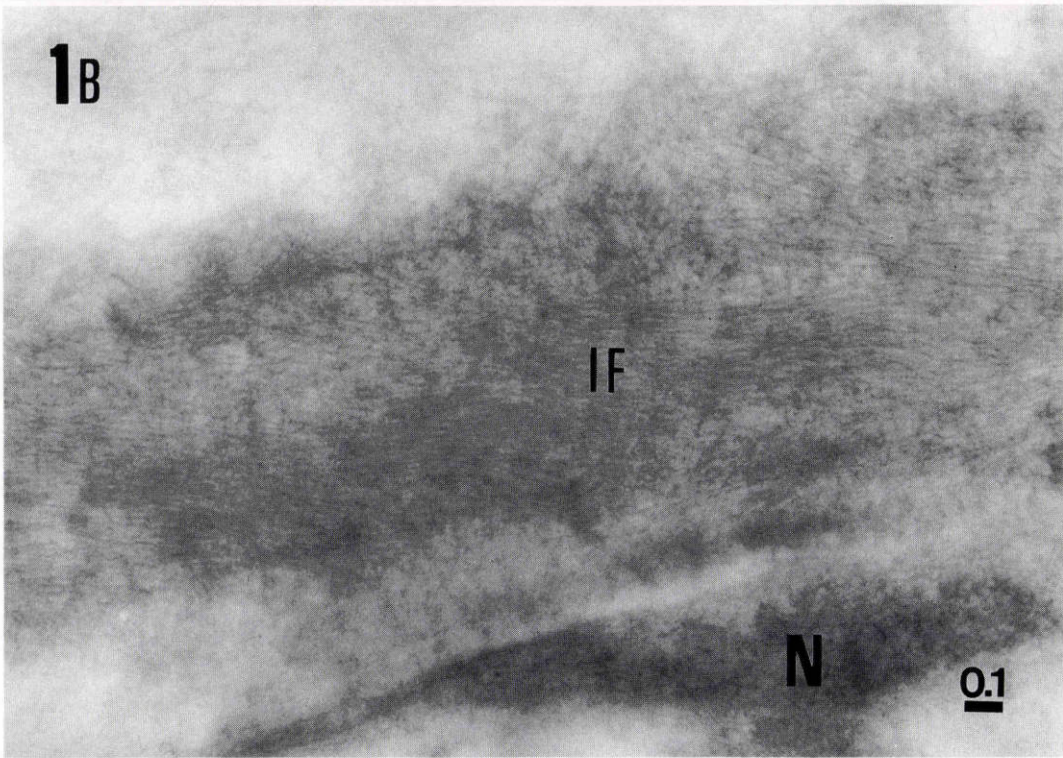
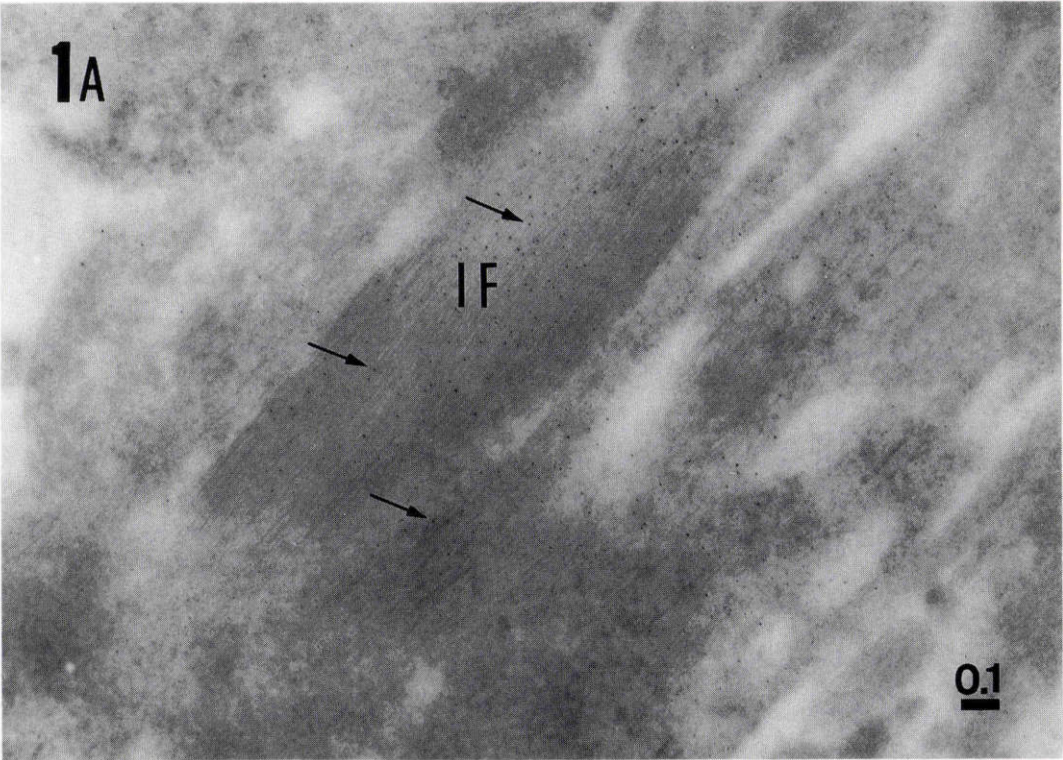
Negative control は、一次抗体にかえて正常家兎血清を反応させ、以下同様に処理した。

## III 結 果

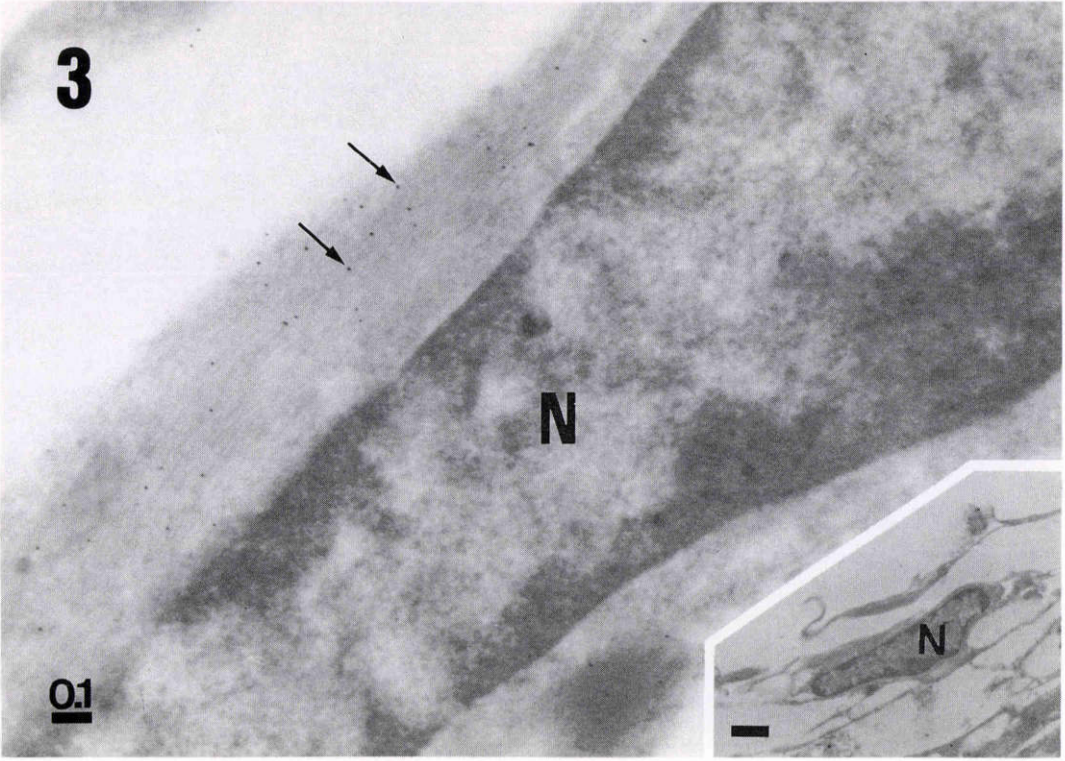
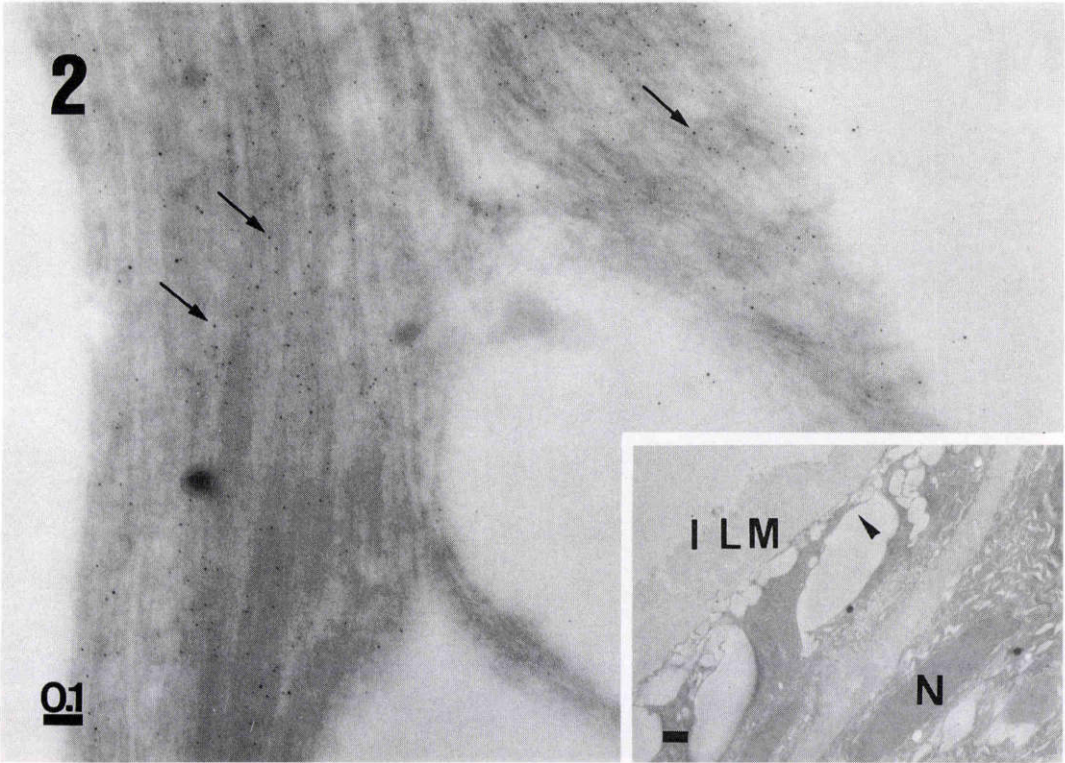
GFAP は細胞質内で直径約10nm の中間径フィラメントとして線維状構造をとって存在するが、positive control としたヒト視神経では、細胞質内に中間径フィラメントの束を持つ神経膠細胞が存在し、その線維に金粒子の付着している像が観察された (第1図 A)。ラット脳の神経膠細胞に同様の GFAP 陽性所見が観察され、ヒト神経網膜では網膜内層の星状膠細胞のみに GFAP 陽性所見がみられた。ヒト網膜色素上皮は GFAP 陰性であった。一次抗体にかえて正常家兎血清を反応させた negative control では、いずれの場合も金粒子は観察されなかった (第1図 B)。

検索した11例の増殖膜組織のうち、MP 5 例中4例、PVR 6 例中3例に GFAP 陽性の細胞がみられた。表 1 に GFAP 陽性細胞を認めた症例を示した。GFAP 陽性細胞は、症例により多数の突起を持ち内境界膜に接する細胞 (第2図)、紡錘形の核を持つ細長い細胞 (第

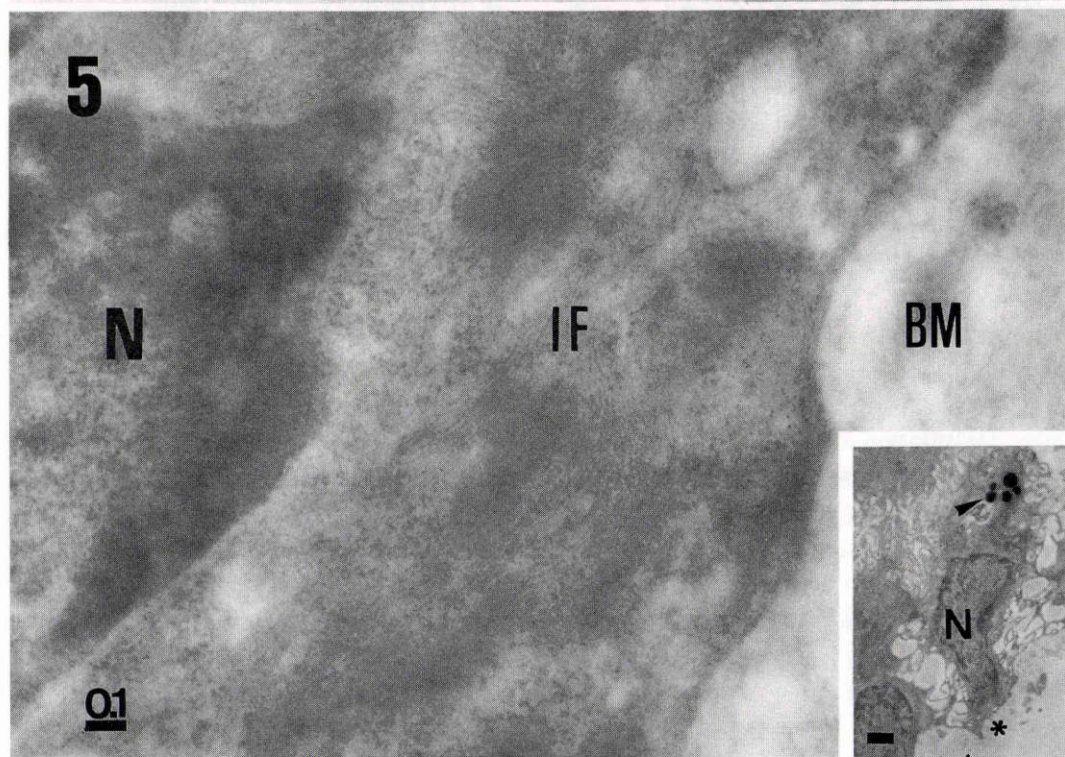
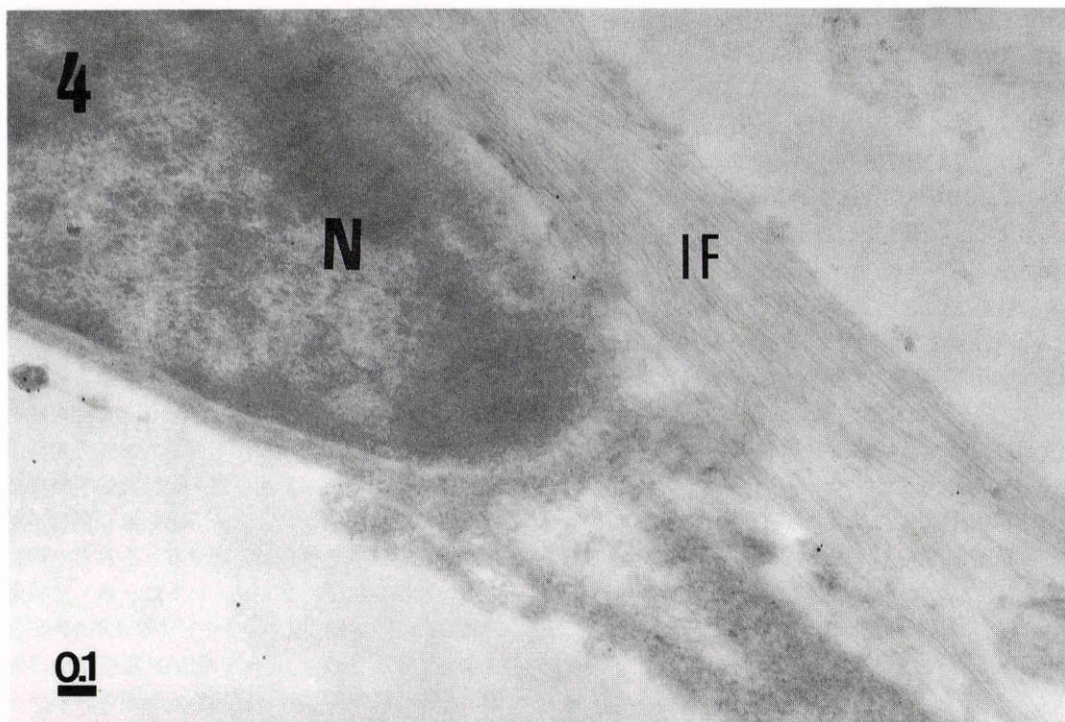














3図)等の形態をとっていた。いずれの場合も、金粒子は細胞質内の線維状構造に一致して付着しており、他の部分にはほとんどみられなかった。一次抗体にかえて正常家兎血清を反応させた negative control では金粒子はほとんど観察されなかった(第4図)。GFAP陽性細胞は、GFAP陰性細胞の中に孤立して存在することは少なく、数個ないし数十個がかたまって存在する 경우가多くみられた。またGFAP陽性細胞の周囲には膠原線維が比較的少ない傾向がみられた。

GFAP陰性細胞としては、細胞質内に色素顆粒を持ち、microvilliが発達した極性のある網膜色素上皮細胞様細胞、膠原線維に取り囲まれるように存在する紡錘形で極性を持たない線維芽細胞様細胞、細胞内にphagosomeを持ち極性のないマクロファージ様細胞等が含まれていた。これらGFAP陰性細胞にも、GFAP陽性細胞に見られたと同様の中間径フィラメントが見られるものがあったが、GFAP抗体を作用させても金粒子の付着は認められなかった(第5図)。

#### IV 考 按

増殖膜組織を構成する細胞由来を分析することは増殖膜形成の病理を理解するうえで重要であるが、形態学的な検索のみでは限界がある。これまでの多くの形態学的観察から網膜前増殖膜に神経膠細胞の関与していることが示されているが<sup>11)~9)</sup>、神経膠細胞は病的な状況下で典型的な形態を失っているため神経膠細胞と同定された細胞の特徴は個々の報告により異なっている。すべての報告が認めている神経膠細胞の特徴は、細胞質内に中間径フィラメントをもつ点であるが、形態学的に同様な中間径フィラメントは神経膠細胞だけでなく他の細胞においても存在することが知られている<sup>11)</sup>ので、単に中間径フィラメントが存在するというだけでは、神経膠細胞のマーカーとして不充分であろう。しかし、これらの中間径フィラメントを構成する蛋白は細胞の種類によって異なるので、免疫組織学的手法を用いればこれをマーカーとして細胞を同定することが可能である。GFAPは中間径フィラメントを構成する蛋白の一つであり神経膠細胞に特異的に存在するのでこれをマーカーとすれば免疫組織学的に神経膠細胞を同定することができる<sup>10)11)</sup>。GFAPをマーカーとして光学顕微鏡の観察によって増殖膜中の神経膠細胞を同定したとの報告<sup>14)~16)</sup>があるが、光学顕微鏡の観察ではGFAPが細胞内でどのような形態をとっているか明確でない。また、光学顕微鏡の観察には、多く

の試料が必要であるため手術試料を培養して標本としなければならない場合がある。われわれは培養した増殖組織を検索したが、明らかなGFAP陽性細胞を認めなかった<sup>12)</sup>。これは症例及び観察方法の違いの他、培養による細胞の性質変化が大きく関与しているものと考えられる。したがって、増殖膜組織の細胞由来を決定するためには小さな試料で標本が作成でき、形態学的観察と同時に種々の細胞マーカーを用いた免疫組織学的観察が可能な手法の導入が必要である。以上の点を考慮して免疫電子顕微鏡的手法を用いたが、これにより非常に小さな手術試料をそのまま標本として用いても十分な数の切片が作成可能となり、免疫組織学的観察と同時に光学顕微鏡では不可能であった超微構造の観察が可能となった。免疫電子顕微鏡の観察により増殖膜組織中に中間径フィラメントをもつ細胞が認められたが、抗GFAP抗体で処理するとそれらの細胞のあるものでは金粒子がフィラメントに一致して特異的に観察され、その中間径フィラメントにGFAPが含まれることが確認された。これらGFAP陽性細胞は形態学的、免疫組織学的に神経膠細胞と同定される。一方、抗GFAP抗体に反応しない中間径フィラメントを持つ細胞も同時に存在していたが、これらは免疫組織学的にみて神経膠細胞ではないと考えられる。今回の検索の結果、11例中7例にGFAP陽性細胞を認め、多くの増殖膜組織において神経膠細胞が関与していることが明らかとなった。さらにMPでは5例中4例とほとんどの増殖膜組織でGFAP陽性細胞を認めたが、PVRでは、GFAP陽性細胞が6例中3例にみられ、MPとPVRでは細胞構成に違いがある可能性が示唆された。またGFAP陰性のMPの再発例でGFAPが陽性となったものがあり、同一症例であっても初発と再発で構成細胞に変化がおこる可能性が示された。

GFAP陽性の神経膠細胞としては星状膠細胞があげられるが、神経網膜では主として特殊な状況において、Müller細胞もGFAP陽性となることが報告<sup>14)17)</sup>されている。もしMüller細胞が増殖膜の構成細胞となっていれば、GFAP陽性となることも充分考えられる。今回の検索でGFAP陽性となった細胞は症例によって非常に異なった形態をとっていたが、これらGFAP陽性細胞すべてが星状膠細胞由来なのか、Müller細胞の関与があるのかを確かめるため、それぞれの細胞を区別し得るマーカーを用いた検索が必要であろう。

検索した11例すべての症例でGFAP陰性細胞を認



めたが、それらは網膜色素上皮細胞、線維芽細胞、マクローファージ等の形態をとっていた。神経膠細胞以外の細胞にも中間径フィラメントが存在することが知られている<sup>11)</sup>が、これら GFAP 陰性細胞のなかにも中間径フィラメントを持つ細胞が存在した。GFAP 陽性細胞の中間径フィラメントは太い線維束をなしていることが多いが、GFAP 陽性細胞も GFAP 陰性細胞も、ともに同様な中間径フィラメントを持っており、両者のフィラメントそのものを形態学的に区別することは困難であった。増殖膜組織中の神経膠細胞の同定には形態学的に中間径フィラメントを証明するだけでなく GFAP の存在を証明することが必要であり、免疫電子顕微鏡的観察が有用であると考えられる。

本研究は、京都大学医学部眼科学教室眼細胞生物学研究室において行われたものであり、京都大学ウイルス研究所物理部門田中春高教授よりプロテイン A ゴールドの供与を受けるとともに、金コロイド法に関して御指導を頂いた。また同研究所藤原栄一氏、芳賀敏実氏にも併せて御指導を受けた。記して謝意を表する。本研究は、文部省科学研究費補助金一般研究の援助を受けた。終わりに、本田孔土教授の御校閲に深謝します。

#### 図の説明

図1 ヒト視神経の免疫電子顕微鏡像。1A: 抗 GFAP 抗体、プロテイン A-ゴールドを作用させた、神経膠細胞の胞質内に中間径フィラメントの束(IF)が存在し、フィラメントに金粒子(矢印)が付着している。フィラメント以外の部位には金粒子の付着はほとんど見られない。47,000倍。1B: 抗 GFAP 抗体にかえて、正常家兎血清を作用させた。金粒子はほとんど見られない。47,000倍。

図2 Macular pucker(症例2)の免疫電子顕微鏡像。内境界膜(ILM)に接する多数の突起を持つ細胞で、挿入図矢頭部分の拡大を示す。細胞質内に多数の中間径フィラメントを持ち、フィラメントに一致して金粒子(矢印)が付着している。50,000倍。挿入図3,000倍。(Nは細胞核を示す。)

図3 PVR(症例9)の免疫電子顕微鏡像。紡錘形の核(N)を持つ細胞(挿入図)で細胞質内に中間径フィラメントの束がみられ、フィラメントに金粒子(矢印)が付着しているが、細胞核(N)をはじめフィラメント以外の部位には金粒子はほとんど見られない。47,000倍。挿入図4,500倍

図4 PVR(症例9)の免疫電子顕微鏡像。抗 GFAP 抗体にかえて正常家兎血清を作用させた。細胞質内に中間径フィラメントの束がみられるが、金粒子はほとんど付着していない(Nは細胞核)。47,000倍。

図5 PVR(症例9)の免疫電子顕微鏡像。多数の細胞質の突起と基底膜(\*)を持ち色素顆粒(矢頭)を

含む細胞(挿入図)は細胞質内に中間径フィラメント(IF)を持つが、抗 GFAP 抗体、プロテイン A-ゴールドを作用させても金粒子の付着は認められない。(Nは細胞核、BMは基底膜をしめす。)47,000倍。挿入図3,000倍。

#### 文 献

- 1) Kenyon KR, Michels RG: Ultrastructure of epiretinal membrane removed by pars plana vitreoretinal surgery. *Am J Ophthalmol* 83: 815—823, 1977.
- 2) Clarkson JG, Green WR, Massof D: A histopathologic review of 168 cases of preretinal membrane. *Am J Ophthalmol* 84: 1—17, 1977.
- 3) Green WR, Kenyon KR, Michels RG, et al: Ultrastructure of epiretinal membranes causing macular pucker after retinal reattachment surgery. *Trans Ophthalmol Soc UK* 99: 65—77, 1979.
- 4) Van Horn DL, Aaberg TH, Machemer R, et al: Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 184: 383—393, 1977.
- 5) Kampik A, Kenyon KR, Michels RG: Epiretinal and vitreous membrane. Comparative study of 56 cases. *Arch Ophthalmol* 99: 1445—1454, 1981.
- 6) Newsome DA, Rodrigues MM, Machemer R: Human massive periretinal proliferation. In vitro characterization of cellular components. *Arch Ophthalmol* 99: 873—880, 1981.
- 7) Harada T, Chauvaud D, Pouliquen Y: An electrone microscopic study of the epiretinal membrane of human eyes. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol* 215: 327—339, 1981.
- 8) Trese M, Chandler DB, Machemer R: Macular pucker II. Ultrastructure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221: 16—26, 1983.
- 9) 松村美代, 岡田守生, 山川良治他: Epiretinal membraneの構成要素, 臨眼 40: 715—720, 1986.
- 10) Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, et al: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351—354, 1971.
- 11) Lazarides E: Intermediate filament as mechanical integrator of cellular space. *Nature* 283: 249—256, 1980.
- 12) 白川弘泰, 山川良治, 吉村長久他: 増殖性硝子体網膜症(網膜前および後増殖膜)の免疫組織学的検討. 日眼 90: 349—355, 1986.
- 13) Mühlfordt H: The preparation of colloidal gold particles using tannic acid as an additional reducing agent. *Experimentia* 38: 1127—1128, 1982.

- 14) **Hiscott PS, Grierson I, Trombetta CJ, et al:** Retinal and epiretinal glia—An immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 68: 698—707, 1984.
  - 15) 大平明弘, 大島健司, 菊地昌弘: 眼内増殖膜の免疫組織学的研究 PAP 法によるグリア染色. *日眼* 86: 803—809, 1982.
  - 16) **Yamashita H, Hori S, Kitano S, et al:** Glial cells in culture of preretinal membrane of proliferative vitreoretinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 29: 42—53, 1985.
  - 17) **Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy V:** Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1321—1328, 1984.
-