

## 実験的高眼圧家兎における視神経グリア細胞の変化 (図5, 表1)

古田 仁志・塚原 重雄 (山梨医科大学眼科学教室, \*第II病理学教室)  
 小林 槇雄\*

Glial Cell Changes of the Rabbit Optic Disc  
 in Experimental Glaucoma

Masashi Furuta, Shigeo Tsukahara, Makio Kobayashi\*

Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical College

Department of 2nd Pathology, Yamanashi Medical College

要 約

$\alpha$ -chymotrypsin により作製した高眼圧家兎の視神経乳頭部グリア組織 (神経膠細胞) の変化を, 神経膠細胞の中間径フィラメントである Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) をマーカーとした免疫組織化学にて検討した. それによると, 眼圧上昇により視神経乳頭部神経膠細胞に大きな変化が認められた. 最も著しい変化は乳頭部神経膠細胞の配列の乱れと増殖性変化であった. これらは眼圧上昇の程度と期間に相関的であり, 高眼圧の視神経乳頭部グリア細胞組織に対する反応の差異を反映しているものであった. (日眼 92: 1450—1455, 1988)

キーワード: 神経膠細胞, GFAP, 視神経乳頭, 実験的緑内障, 家兎

Abstract

The change of glial component (astroglia) in the optic nerve heads of rabbits in which experimental glaucoma had been induced by  $\alpha$ -chymotrypsin, was examined by immunohistochemical staining. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), an intermediate filament of glial cell, was used as the marker for astroglia. Astroglia of the optic nerve head was markedly affected by elevated intraocular pressure (IOP). Disarrangement and proliferative changes of the astroglia, at and under the optic nerve head, were conspicuous. These changes were closely related to the level and duration of abnormal IOP elevation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1450—1455, 1988)

Key words: Astroglia, GFAP, Optic nerve head, Experimental glaucoma, Rabbit

I 緒 言

緑内障における視神経障害の機序については, 乳頭部の病理組織, 形態, 機能的研究を元に Hayreh をはじめ<sup>1)</sup>, 多くの説が述べられてきている<sup>2)3)</sup>. しかし, 視神経乳頭部のグリア組織 (神経膠細胞) も, 神経線維, 血管, 篩板を構成する結合織と同じく大きな構成要素となっているにも拘らず, 何れもそれにはあまり言及

していない. 眼のグリア細胞の研究は Heinrich Muller に始まり (1851), 網膜ミュラー細胞, 神経膠細胞の染色法を Polyak<sup>4)</sup>, Pedler<sup>5) 6)</sup> が研究したがその手技と染色性に問題がありあまり用いられなかった. 更に, 病的状態におけるグリア細胞はその形態すらも多岐に変わり, 同定に困難を極めた. 最近になり, 神経膠細胞に GFAP と呼ばれる細胞骨格蛋白が特異的に存在していることが分かり, これをマーカーにして

別刷請求先: 409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110 山梨医大眼科 古田 仁志 (昭和63年1月18日受付)

Reprint requests to: Masashi Furuta, M.D. Dept. Ophthalmol., Yamanashi Medical College Shimokato 1110, Tamaho-cho, Nakakoma-gun Yamanashi Pref., Japan

(Accepted for publication January 18, 1988)

神経膠細胞を容易に、特異的に染色することが可能になった<sup>7)~9)</sup>。そこで今回、このGFAPによる免疫組織化学的染色を用いて、家兎の視神経乳頭部の眼圧上昇に伴う神経膠細胞の変化を捉え、これについて考察を加え報告する。

## II 実験方法

### 1) 高眼圧家兎の作製

体重2000~3200gの成熟家兎12羽を用いた。各々の家兎の右眼後房に、ネブタール(30mg/kg)麻酔下にて約0.2ml(250単位)の $\alpha$ -キモトリプシンを注入した。左眼はコントロールにした。 $\alpha$ -キモトリプシン注入後の眼圧はPneumatic Applanation Tonometer(Alcon laboratories, Fort Worth Texas, USA)にて週に3回、午後4~5時に測定した。コントロール眼に比べ明らかな眼圧上昇を示した4羽8眼につき以下の実験を行った。

### 2) 免疫組織化学染色

高眼圧が4週間以上持続した家兎を、過量のネブタール静注により屠殺し、直ちに両眼球を摘出、ゼンボニ液で固定後、型通りパラフィン包埋した。パラフィン切片は視神経乳頭が縦断面になるように髄翼をさけて4 $\mu$ mの厚さの試料を作製した。

免疫組織化学染色は酵素抗体間接法を用いた。脱パラした試料を0.01M PBS(pH7.2)で水洗後、3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼを阻止し、一次抗体(Anti-human GFAP mouse monoclonal antibody; 1/100: SANBIO)を室温で1時間反応させた。陰性対照として非標識マウス血清を用いた。更にPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体(Anti-mouse IgG; 1/100: BIOSYS COMPIEGNE)を1時間反応させた。最後に、PBSで水洗後DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液に浸し発色させ、ヘマトキシリンで核染色したのちニコン光学顕微鏡で観察した。

## III 結果

### 1) 高眼圧家兎の作製

$\alpha$ -キモトリプシン後房注入により12羽の右眼12眼中6眼に眼圧の上昇が見られたが、内2眼は2週間で正常化した。4眼は眼圧上昇が4週間以上持続し、コントロール(左眼)との間に明らかな差が見られた(図1)。これら4羽8眼の眼圧の上昇程度、期間は表1の様であった。

### 2) 酵素抗体間接法の結果

表1 高眼圧右眼(R)とコントロール左眼(L)の眼圧の差と期間

	IOP (R-L) (mean $\pm$ SD)	眼圧上昇期間
Rabbit-1	16.87 $\pm$ 2.38 (mmHg)	61 (days)
Rabbit-2	9.51 $\pm$ 2.36	72
Rabbit-3	9.37 $\pm$ 1.66	69
Rabbit-4	7.80 $\pm$ 2.66	45

Rabbit-1: 左右の眼圧差が16.87 $\pm$ 2.38mmHgと一番大きく、その眼圧上昇が61日持続したもので、その組織変化も著しく認められた(図2)。まずコントロールにおけるGFAP陽性部分は、硝子体に接する視神経乳頭の生理的陥凹部分では2~3層にわたって認められ、網膜面に移行するにつれ認められなくなっている。乳頭直下の実質では、GFAP陽性部分は全ての神経線維束を取り巻き、かつ分離させているネットワーク状に認められた。その突起も細かく、互いにつながりあっていた。網膜中心動静脈を始めとした血管系は、全周を神経膠細胞で覆われGFAP陽性となっていた。くも膜下軟膜と接する視神経乳頭外側も完全にGFAP陽性細胞で占められていた。

一方、高眼圧右眼においてはGFAP陽性細胞のマトリックスは、視神経乳頭の硝子体境界面、実質内、外側と何れの部分においても不明瞭で、ネットワーク構造は大きくみだれていた。そしてGFAP陽性の細胞数は増加し、消失した神経線維の部分に血管系、結合組織と共に占めているのが認められた。血管系、軟膜、結合組織と神経線維との境界はGFAP陽性組織により保持されていた。

Rabbit-2: コントロール眼(L)と、これに比べ9.51 $\pm$ 2.36mmHgの高眼圧が73日間持続した右眼(R)である(図3)。

高眼圧右眼はコントロール左眼に比べ、視神経乳頭の著明な陥凹を認め、片側の乳頭辺縁が極度に非薄化し、同部位に神経膠細胞の増殖によるGFAP陽性部分が疣状に認められた。神経線維を取り巻き神経膠細胞のネットワークも、薄くなった乳頭辺縁では著しく乱れていた。それに比べ、乳頭辺縁が厚く保たれていた反対側ではGFAP染色部分は整然となり、層状に神経線維を取り巻いていた。

コントロール眼においては、乳頭の生理的陥凹が認められ、同部位硝子体境界面にGFAP陽性組織が最も強く認められたが、何れの部分においても構成、配列の乱れはなく、神経膠細胞の秩序が保たれていた。

## IOP CHANGE

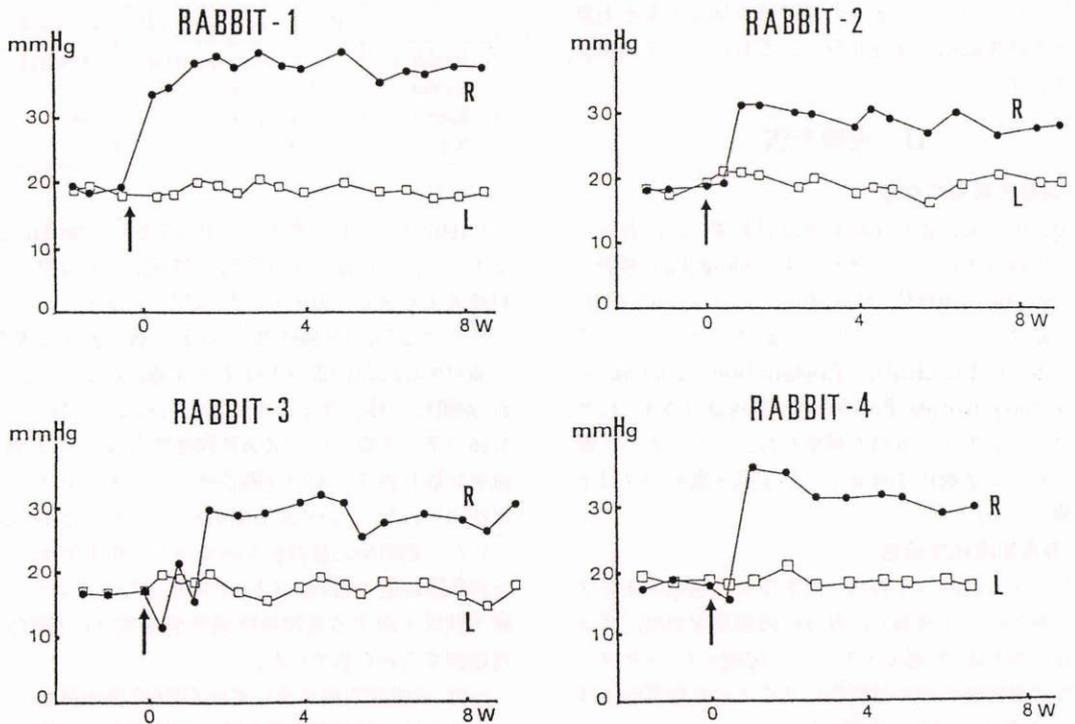


図1 実験的高眼圧右眼(R)とコントロール左眼(L)の眼圧の変化と期間(↑印は、 $\alpha$ -キモトリプシンを右眼後房注入した日)

Rabbit-3 (図4): 平均9.37mmHgの高眼圧が70日間持続したものであるが、高眼圧右眼(R)の乳頭陥凹はコントロール左眼(L)に比べやや大きくなっていた。GFAP染色では、Rの乳頭外側壁の軟膜と接する部分と乳頭直下に強く陽性細胞の分布が見られた。更に神経膠細胞によるネットワーク構造の歪みも認められた。

Rabbit-4 (図5): 平均7.80mmHgの高眼圧が45日間持続した乳頭の組織である。乳頭陥凹は高眼圧右眼にやや強く認められたが、GFAP染色ではあまり顕著な差が認められず、どちらもGFAP陽性部分によって神経線維、血管、結合組織が整然と包囲、隔絶されていた。ネットワーク構造もよく保たれていた。

## IV 考 按

視神経乳頭の組織形態から緑内障を解明しようとする研究は数多く見られ、幾つかの見解が出されているが未だ充分な一致は得られていない。それらも、視神

経乳頭部の軸索輸送、血管系、篩板が主な研究要素であり、視神経乳頭のグリア系の役割について報告したものは更に少ない。緑内障性乳頭陥凹時には神経膠細胞は減少することを示唆したAnderson<sup>10)</sup>、逆に、相対的にグリア組織が増加するとしたQuigleyの報告<sup>9)11)12)</sup>に見られる程度である。それは、これまで形態的にグリア組織を同定するのが困難であったことも大きく関係してきていると思われる。Quigleyの仕事も電子顕微鏡にてグリア細胞の変化を捉えたものである。

今回、我々はGFAPを用いた免疫組織化学染色により光学顕微鏡的に高眼圧家兎における視神経乳頭部の神経膠細胞の配列、構成異常について調べ以下の所見が得られた。

まず、高眼圧によって視神経乳頭部グリア組織も大きな影響を受け、障害されていることがコントロール他眼との比較により容易に分かった。硝子体に接する乳頭陥凹部では神経膠細胞層の肥厚と疣状性変化が認

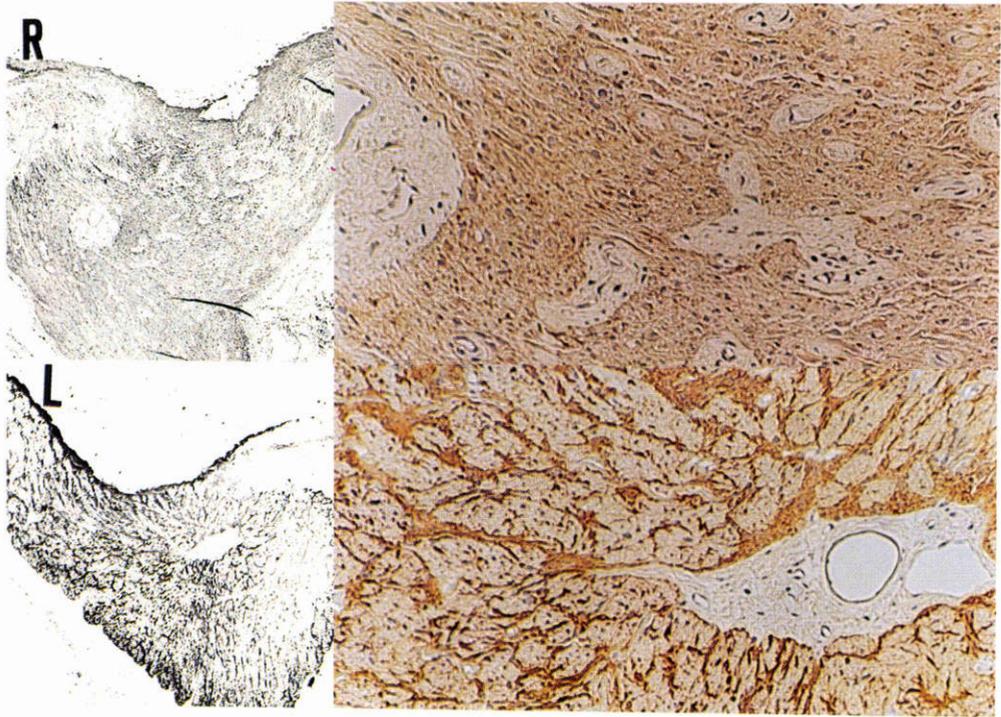


図2 Rabbit-1: Rは高眼圧により神経膠細胞のネットワーク構造が完全に破壊され、マトリックスも不明瞭となっている。Lはコントロールである。(酵素抗体間接法、左は×20、右は×50)

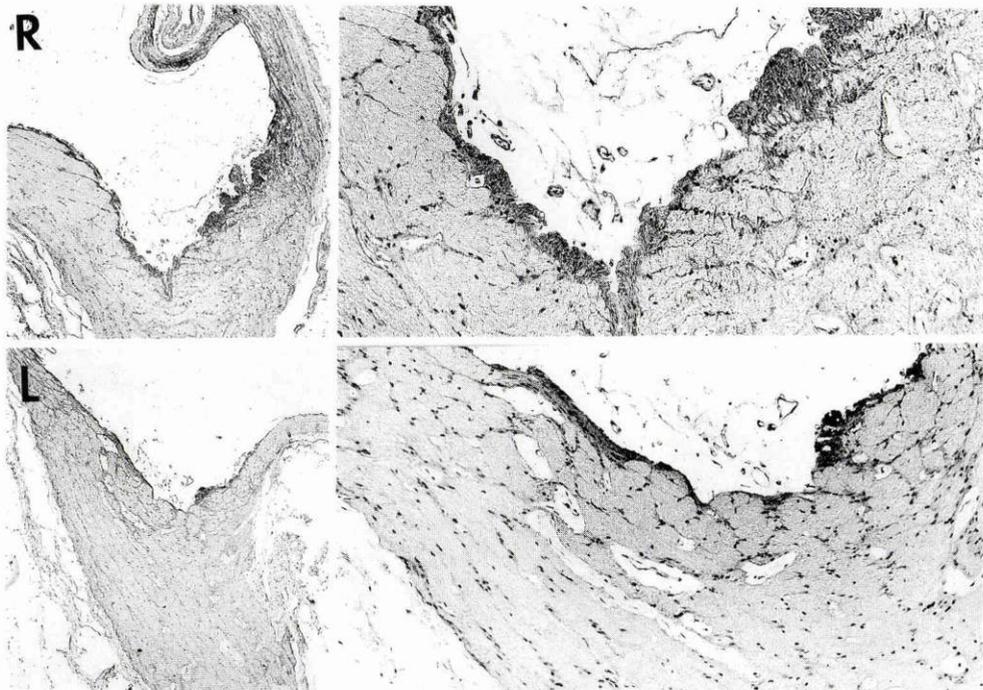


図3 Rabbit-2: Rは乳頭陥凹が著明で、菲薄化した外側壁でのGFAP陽性組織が疣状に隆起している。実質の神経膠細胞の配列も乱れている。Lはコントロールである。(酵素抗体間接法、左は×20、右は×50)

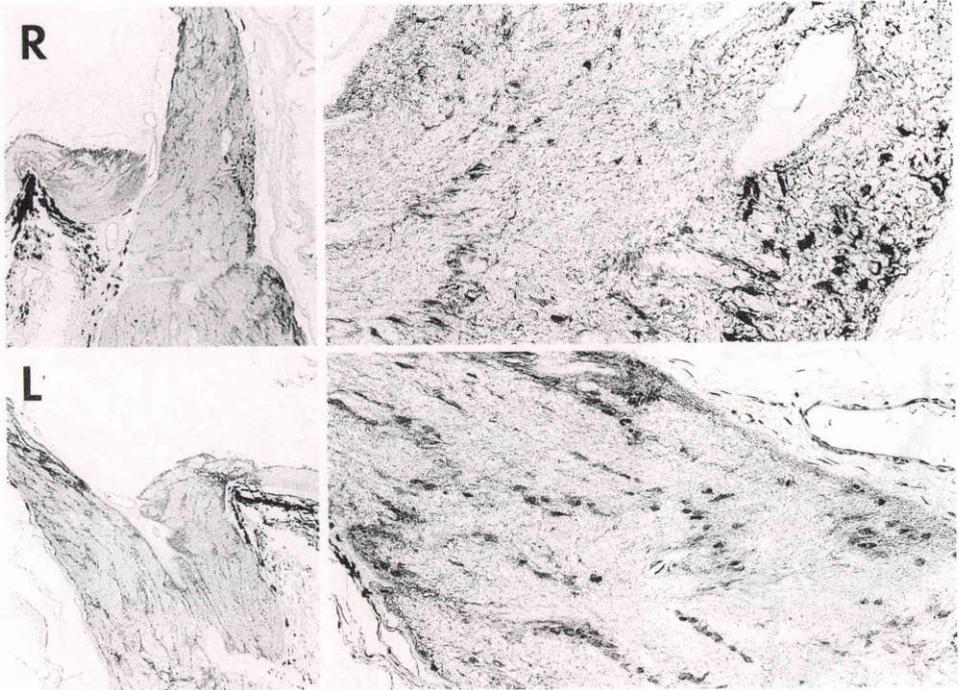


図4 Rabbit-3: Rの乳頭外側壁の軟膜に接する部分に胞体の豊富な神経膠細胞の増殖性変化が見られる。ネットワーク構造にも乱れが生じている。Lはコントロールである。(酵素抗体間接法、左は×20、右は×100)

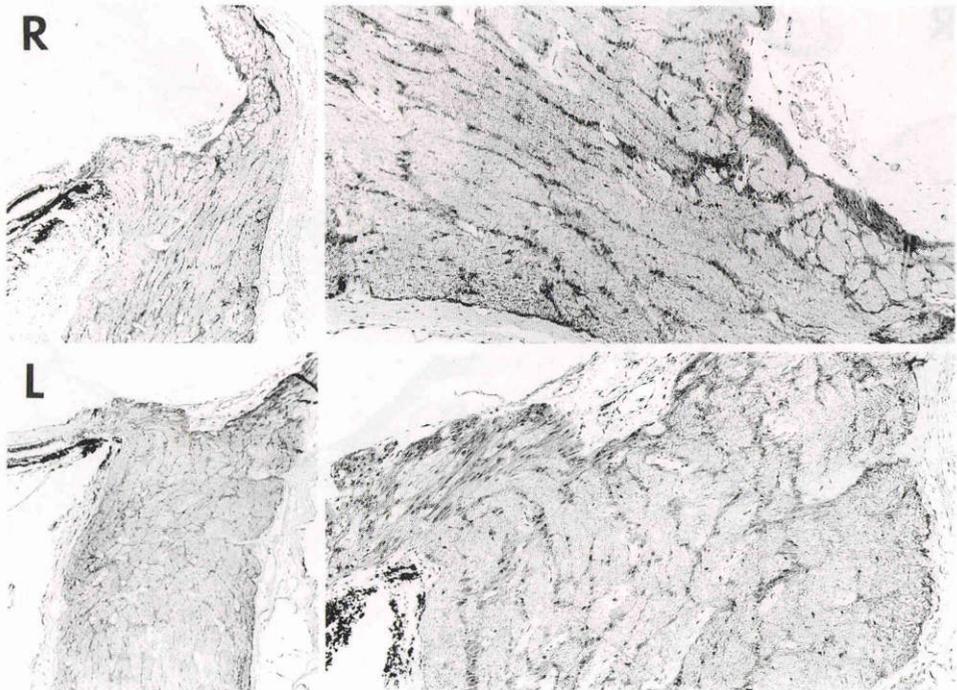


図5 Rabbit-4: RもLもGFAP陽性部分の差は余り認められず、神経膠細胞によるネットワーク構造が良く保たれている。(酵素抗体間接法、左は×20、右は×50)

められた。乳頭部直下の実質では神経膠細胞により神経線維を支持、包囲しているネットワーク構造の乱れが観察された。ことに、眼圧上昇の著しかった Rabbit-1 では、各々の神経膠細胞のマトリックスまで減少し、GFAP 陽性部分はその細胞の核が主で、分枝の詳細な分からなかった。しかし、神経膠細胞の核の数はコントロールにくらべ明らかに多く、ここでも神経膠細胞の増殖が起きているものと考えられた。又、緑内障性乳頭陥凹に伴い菲薄化している乳頭外側縁でも、眼圧に抗するかのように GFAP に強く染色される部分が見られた。しかし何れの組織においても、バリアーとしての機能も有していると考えられている神経膠細胞は、配列の乱れ、増殖性変化を伴いつつも神経線維を、血管、硝子体、軟膜その他の組織とは明瞭に境し、区画されていた。

次に、高眼圧の上昇程度と、持続期間による乳頭部神経膠細胞への影響の差を検討してみると、上記のような神経膠細胞の変化は Rabbit-1 が一番大きく、Rabbit-2, -3 から -4 に行くにつれ小さくなっていることから、高眼圧との持続期間に依存していることが示された。

以上より、家兎において高眼圧下でも視神経乳頭部の神経膠細胞は減少することなく、かえって増殖している所見がえられ、これは Quigley<sup>31)11)</sup>、Minckler<sup>ら<sup>13)14)</sup></sup>の報告と一致した。神経膠細胞は高眼圧下でもそれに抗する能力を有し、増殖しているものと思われた。そして高眼圧による緑内障性乳頭陥凹形成において、神経膠細胞は、神経線維が障害され消滅していくその後を増殖しながら補填、修復していくものと考えられた。今回の我々の実験結果では、その組織変化の時間的経過の一面を捉えたものとする。今後更に高眼圧に対し乳頭部グリア細胞組織がどのような眼圧上昇レベルで、いつごろから、どの様に変化して行くか、もっと詳細にとらえていく必要があると思われる。

なお、本研究には文部省科学研究費 (No 61771348) による援助を受けた。又本論文の要旨は昭和61年第90回日本眼科学会総会にて発表した。

#### References

- 1) Hayreh SS: Blood supply of the optic nerve head and its role in optic atrophy, glaucoma, and edema of the optic disc. *Br J Ophthalmol* 53: 721, 1969.
- 2) Maumenee AE, Brockhurst RJ, et al: The pathogenesis of visual field loss in glaucoma. In

*Controversy in Ophthalmology*, WB Saunders Co, 301—311, 1977.

- 3) Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE: Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 99: 635—640, 1981.
- 4) Polyak S: The vertebrate visual system. The University of Chicago Press, Chicago, 1957.
- 5) Pedler C: The radial fibers of the retina. *Docum Ophthalmol* 16: 208, 1962.
- 6) Wolter JR: The astroglia of the human retina and other glial elements of the retina under normal and pathologic conditions. *Am J Ophthalmol* 40: 88—99, 1955.
- 7) Bromberg JS, Schachner M: Localization of nervous system antigens in retina by immunohistochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 920—924, 1978.
- 8) Bignami A, Dahl D: The radial glia of muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28: 63—69, 1979.
- 9) Kumpulainen T, Dahl D, Konhonen LK, Nystrom SHM: Immunolabelling of carbonic anhydrase isoenzyme C and glial fibrillary protein in paraffinembedded tissue sections of human brain and retina. *J Histochem Cytochem* 31: 879—886, 1983.
- 10) Anderson DR: Pathogenesis of glaucomatous cupping: A new hypothesis, in Symposium on Glaucoma. *Trans New Orleans Acad Ophthalmol*, St Louis CV, Mosby, 81—94, 1975.
- 11) Quigley HA, Green WR: The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: Clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 86: 1803—1808, 1979.
- 12) Quigley HA, Addicks EM: Chronic experimental glaucoma in primates. II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve and axonal transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 137—142, 1980.
- 13) Minckler DS, Bunt AH, Klock IB: Radioautographic and cytochemical ultrastructural studies of axoplasmic transport in the monkey optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 33, 1978.
- 14) Gaasterland D, Tanishima T, Kuwabara T: Axoplasmic flow during chronic experimental glaucoma. I. Light and electron microscopic studies of the monkey optic nerve head during development of glaucomatous cupping. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 838, 1978.

(第90回日眼総会原著)