

硝子体収縮のモデル系としてのコラーゲン内細胞培養

第1報 ゲル内の細胞の種類とゲル収縮との関係 (図10)

唐沢 容子・矢島 保道・沖坂 重邦 (防衛医科大学校眼科学教室)

The Relation Between the Type of Cell and the Collagen Gel Contraction in a Model System of Vitreous Contraction

Yoko Karasawa, Yasumichi Yajima and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defence Medical College

要 約

硝子体収縮のモデル系として、硝子体ゲルの代りにコラーゲンゲルを用いて細胞をゲル内培養し、コラーゲンゲルの収縮を定量的に測定した。上皮系細胞3種類(水晶体上皮細胞、網膜色素上皮細胞、毛細血管内皮細胞)と血球系細胞3種類(赤血球、リンパ球、マクロファージ)について、ゲル内の細胞数を変化させて経時的にゲルの収縮の程度を測定するとともに、細胞の形態変化を観察した。上皮系細胞では、ゲル内で細胞の伸長のみられたものは全てゲルを収縮させ、また、ゲル内の細胞が多いほどゲルの収縮体積も大きい傾向があったが、血球系の細胞は細胞数にかかわらず全くゲルの収縮を起こさなかった。上皮系細胞はコラーゲン線維を足場として偽足を伸ばし、コラーゲン線維を集束しながら伸長、移動していく過程でゲルの収縮を引き起こすものと考えられた。(日眼 92:2053—2062, 1988)

キーワード: 硝子体, コラーゲンゲル内細胞培養, ゲル収縮, 上皮系細胞, 血球系細胞

Abstract

The vitreous body contracts under certain pathological conditions and some cells infiltrating into the vitreous are considered to cause the contraction. In order to investigate the relationship between the type of cells and vitreous contraction, we cultured cells embedded in an artificial collagen gel which was a substitute for vitreous collagen. Three types of epithelial cells (lens epithelium, retinal pigment epithelium, and capillary endothelium) and three types of blood cells (erythrocytes, lymphocytes, and macrophages) were used in this study. The cells were suspended in collagen solution and cultured after gelation of the collagen solution. The change of the gel volume was measured at 2—3 days intervals for 2—3 weeks and the morphological changes of the cells in the collagen gel were observed by a phase contrast microscopy during the culture period. All epithelial cells caused contraction of the collagen gels and the increase of the cells was obviously related to the reduction of the gel volume. However, the blood cells did not reduce the volume of the gels even when the number of the cells increased. In addition, it was suggested morphologically that the elongation of the epithelial cells cultured in collagen gel played an important role in the contraction of the collagen gel. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:2053—2062, 1988)

Key words: Vitreous body, Cell culture in collagen gel, Gel contraction, Epithelial cells, Blood cells

別刷請求先: 359 所沢市並木3—2 防衛医科大学校眼科学教室 沖坂 重邦

(昭和63年7月15日受付, 昭和63年9月10日改訂受理)

Reprint requests to: Shigekuni Okisaka, M.D. Dept. of Ophthalmol., National Defense Medical College
3-2 Namiki, Tokorozawa-shi 359, Japan

(Received July 15, 1988 and accepted in revised form September 10, 1988)

I 緒 言

増殖性硝子体網膜症および牽引性網膜剝離の原因の一つとして、硝子体中に細胞が侵入し増殖して硝子体収縮を起こすことが挙げられる。今日までに、これら硝子体中の細胞の挙動の解明のために行われた、*in vivo*でのモデル実験がある。それらの多くは眼球に穿孔性の傷害を与えたり、硝子体内に血液や細胞を注入した後、眼内の変化を経時的に調べるものであった^{1)~8)}。しかしこの方法には、直接細胞の行動を観察できないこと、炎症等の目的以外の細胞の関与を排除できないこと、一つの眼について経時的に観察することが困難であることなどの欠点があった。

近年、*in vitro*で、細胞を硝子体上で、あるいは硝子体を重層して培養し、細胞の形態や硝子体の体積変化を調べた実験が報告された⁹⁾¹⁰⁾。これに上皮細胞を用いた場合、硝子体表面の細胞は細胞層を形成し上皮の形態を保っているが、硝子体内に侵入した上皮細胞は伸長して間葉系細胞様形態をとっていた。また、コラーゲンゲルを用いて上皮細胞を培養した場合も同様に、細胞はゲル上では上皮構造をとるが、ゲル内に懸濁されると伸長し間葉系細胞様になることが報告されている¹¹⁾。

私たちは、硝子体の代りにコラーゲンゲルを用いても上皮細胞は同じ挙動を示すものと仮定し、硝子体の収縮機構を調べるために、コラーゲンゲル内細胞培養を利用した実験を行った。この実験は、不均一なゲルである硝子体の代りに、均一な人工コラーゲンゲル内で細胞を懸濁培養し、ゲルの収縮体積を調べるものである。この方法を用いて上皮系の細胞と血球系の細胞を培養し、ゲル収縮とゲル内の細胞の種類の関係を検討したので報告する。

II 実験方法

1. 細胞と培養液

水晶体上皮細胞は、屠殺されたウシ眼球より水晶体を摘出し、水晶体上皮細胞を水晶体嚢とともに切り出し細切し、0.2%コラーゲナーゼで37℃で10分間処理した後、MEM—8%牛胎児血清(FBS)で培養した。培養2代目から4代目の細胞を実験に用いた。網膜色素上皮細胞は、ウシ眼球後極部を0.2%コラーゲナーゼで37℃で1~2時間処理し、解離された細胞をDMEM—20%FBSで培養し、3代目の細胞を用いた。毛細血管内皮細胞は、牛副腎皮質より単離し、DMEM—10%

FBSで継代培養したものを用いた¹²⁾。

リンパ球はヒトのヘパリン加末梢血よりヒトリンパ球比重分離液[®](日本抗体研究所)を用いて分離した。赤血球はヒト末梢血由来のものを用いた。ともに初代培養を用い、MEM—8%FBSで培養した。マクロファージは、マウスにチオグリコール酸培地を腹腔注射し、4日後に腹腔洗浄により得られた細胞から培養皿付着法によりマクロファージを分離した¹³⁾。マクロファージの純度は、ラテックス粒子貪食検査で98%以上であった。マクロファージは、初代培養を用い、MEM—8%FBSで培養した。

2. コラーゲンゲル内培養法

コラーゲン溶液は、新田ゼラチン社製セルマトリックス type I—A[®](3mg/ml)を用いた。コラーゲン溶液：10倍濃度 MEM(炭酸水素ナトリウム未添加)：20 mM HEPES—0.08N NaOH：培養液=8：1：1：10で冷却混和したものを、コラーゲン混合溶液とした。35mmの培養皿に0.7mlのコラーゲン混合溶液を加えゲル化させ基底層とした後、コラーゲン混合溶液に細胞を懸濁したもの1mlを重層し細胞層とした。さらに2mlの培養液を加えて培養した。基底層は細胞が沈んで培養皿の底に直接接着するのを防ぐために用いた。用いた細胞の密度は培養皿あたり、赤血球で $5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^6$ 、リンパ球で $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4$ 、その他の細胞で、 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$ で、一桁ずつ細胞密度を変えて培養した。一つの細胞密度に対して2枚ずつの培養を行った。同時に、細胞を加えない対照の培養皿も同様に作製、培養した。培養は37℃、5%CO₂で行い、位相差顕微鏡で細胞の形態を観察した。培養液は培養後1日目とそれ以降2~3日ごとに交換し、2~3週間培養を継続した。

3. ゲルの体積の測定

培養開始時に各培養皿の重量(W_d)を測定した。培養中にゲルが収縮するとゲル中の液体が培養液に移行し培養液の体積が増加する。図1の如く、培養後n日目の培養液交換時に各培養皿について培養液の比重(d_n)を測定した後、培養液を全て除き、新しく2mlの培養液を加え、培養皿の総重量、すなわち培養皿、ゲル、培養液の重量をあわせたものを測定した。この時新しく加えた培養液の重量(W_{mn})、総重量(W_{tn})より、ゲルの重量(W_{gn})を(1)式より求めた。

$$W_{gn} = W_{tn} - W_{mn} - W_d \quad (1)$$

培養液交換前の培養液の比重とゲル中の液体の比重が等しいと仮定すると、ゲルの体積(V_{gn})は(2)式で

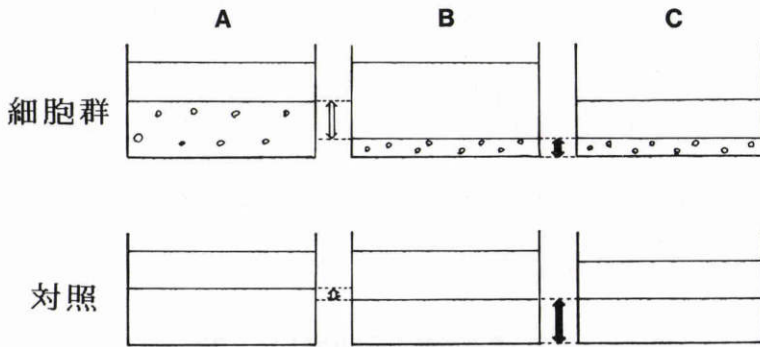


図1 測定法。A：培養前，細胞群，対照ともゲルの体積，培養液の量は等しい。B：培養後，培養液交換前，培養中にゲルが収縮すると白矢印のゲル中の液体が押し出され，培養液の体積が増加する。培養液の比重を測定した後培養液を全て除く。C：新しく培養液を一定量ずつ加えて重量を測定する。ゲルの収縮体積は対照の黒矢印から細胞群の黒矢印を引いたもの。

求められる。(ただし、ゲル中のコラーゲンの重量と細胞の重量は無視する。)

$$V_{gn} = W_{gn} / d_n$$
$$= (W_{tn} - W_{mn} - W_d) / d_n \quad (2)$$

対照の培養皿と各細胞密度の培養皿それぞれ2枚についてゲルの体積の平均 ($\bar{V}_{gn}$) を求め、その差を(3)式より求めゲルの収縮体積とし、経時的に表した。

$$\Delta \bar{V}_{gn} = \bar{V}_{gn(blank)} - \bar{V}_{gn(cell)} \quad (3)$$

4. 培養細胞の電子顕微鏡による観察

培養細胞はコラーゲンゲルとともに経時的に2%グルタルアルデヒド液(0.1M 磷酸緩衝液 pH 7.4)に

て室温で2時間固定した。その後1%四酸化オスミウム液で後固定し、エタノール系列で脱水を行い、Poly/Bed 812に包埋した後、超薄切片作製後、ウラン・鉛で二重染色を施し、透過型電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

1. ゲルの体積変化

種々の細胞を細胞密度を変えてコラーゲンゲル中で懸濁培養し、ゲルの体積変化を経時的に測定した。培養初期では、水晶体上皮細胞で 5×10^4 細胞以上で、細胞密度が高くなるにつれてゲルの収縮体積が大きく、

Lens Epithelial Cells

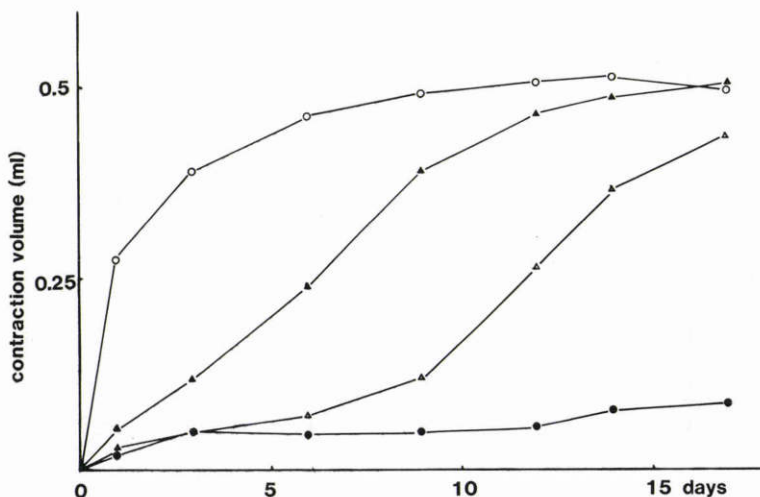


図2 水晶体上皮細胞のゲルの収縮体積。培養皿あたりの細胞数は—●— 5×10^2 ，—△— 5×10^3 ，—▲— 5×10^4 ，—○— 5×10^5 。

5×10^4 細胞, 5×10^3 細胞では, 培養期間中徐々にゲルの収縮体積が増加した(図2).

網膜色素上皮細胞では, 培養初期では, 細胞密度が高いほどゲルは収縮し, それ以降はゲルの体積に大きな変化はみられなかった(図3).

毛細血管内皮細胞では, 5×10^2 , 5×10^3 の細胞密度でゲルはほとんど収縮しなかったが, 5×10^4 , 5×10^5 では細胞密度の高い方がゲルはより収縮した(図4).

以上の3種の上皮系細胞では, ゲルの収縮の程度は, 用いた細胞の継代数や動物の個体差により, 多少の差異がみられたが, いずれの場合も細胞密度が高いほど, ゲルの収縮体積が大きくなる傾向が認められた. また, ゲルが収縮するにつれてゲルが培養開始時よりも硬化していった.

血球系の細胞では, 赤血球(図5), リンパ球(図6), マクロファージ(図7)のどの場合も, 細胞密度とゲ

Pigment Epithelial Cells

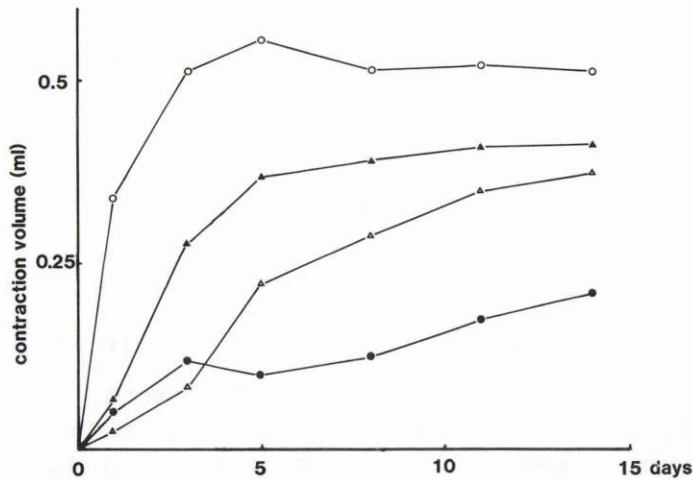


図3 網膜色素上皮細胞のゲル収縮体積. 培養皿あたりの細胞数は—●— 5×10^2 , —△— 5×10^3 , —▲— 5×10^4 , —○— 5×10^5 .

Capillary Endothelial Cells

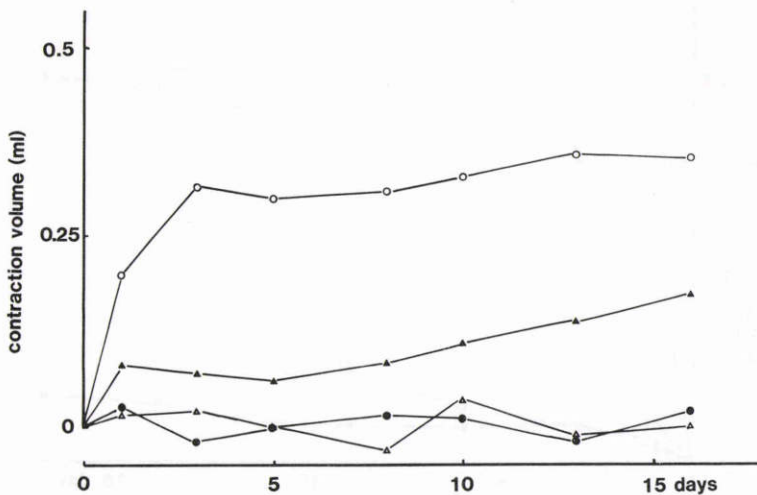


図4 毛細血管内皮細胞のゲルの収縮体積. 培養皿あたりの細胞数は—●— 5×10^2 , —△— 5×10^3 , —▲— 5×10^4 , —○— 5×10^5 .

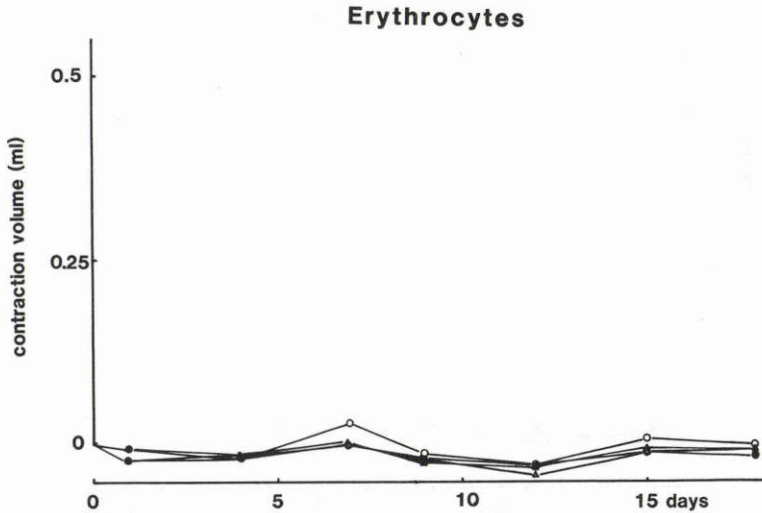


図5 赤血球のゲルの収縮体積，培養皿あたりの細胞数は—●— 5×10^3 ，—△— 5×10^4 ，—▲— 5×10^5 ，—○— 5×10^6 。

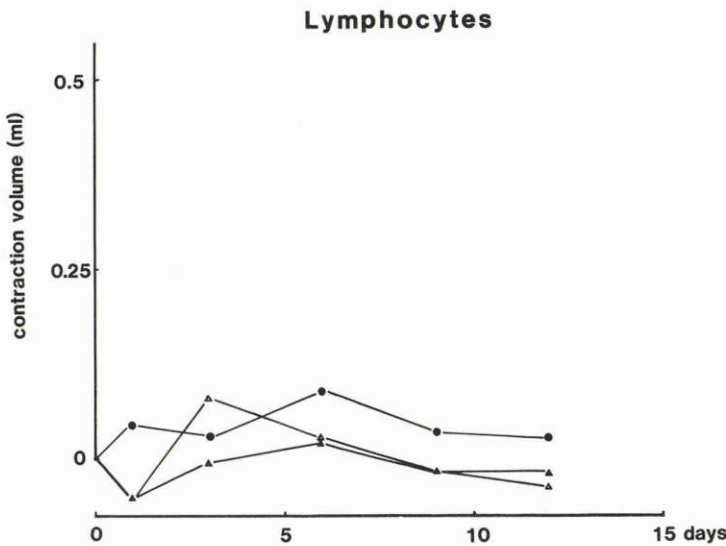


図6 リンパ球のゲルの収縮体積，培養皿あたりの細胞数は—●— 5×10^2 ，—△— 5×10^3 ，—▲— 5×10^4 。

ルの収縮体積は関係していなかった。

2. 形態

水晶体上皮細胞，網膜色素上皮細胞，毛細血管内皮細胞ともに，ゲルの収縮を起した細胞密度では，ゲル中での細胞の伸長が観察された(図8)。この伸長は培養後1日目から4日目にかけて進行し，ゲルの収縮体積の増加する時期と一致していた。ゲルの収縮がみられなかった毛細血管内皮細胞の 5×10^2 ， 5×10^3 の細胞

密度ではゲル中の細胞は伸長していなかった。

細胞の伸長がみられた水晶体上皮細胞，網膜色素上皮細胞，毛細血管内皮細胞では，細胞の偽足がコラーゲン線維を集めている像が位相差顕微鏡で観察された。細胞の偽足を中心に放射上にコラーゲン線維が集合した像や，細胞の移動した跡を示すと思われるコラーゲン線維の集束した部分が観察された(図9)。また水晶体上皮細胞ではゲル中での細胞分裂像も頻繁に

Macrophages

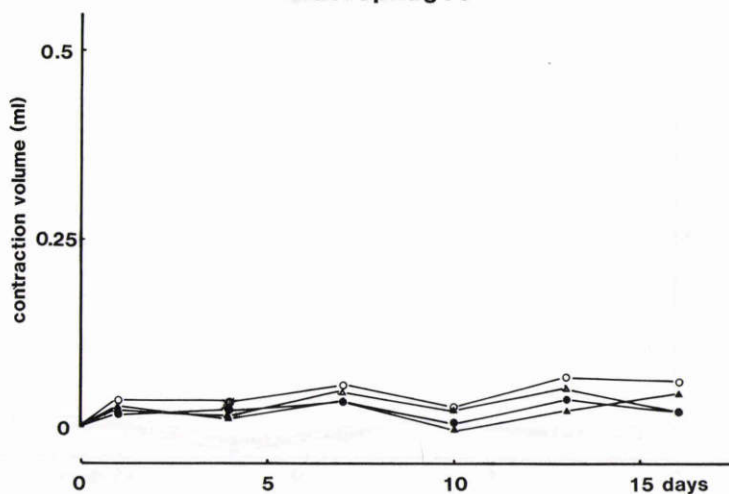


図7 マクロファージのゲルの収縮体積。培養皿あたりの細胞数は—●— 5×10^2 , —△— 5×10^3 , —▲— 5×10^4 , —○— 5×10^5 .

観察された。

赤血球、リンパ球の、ゲル中での形態学的変化は位相差顕微鏡では観察されなかった。しかし、マクロファージを透過型電子顕微鏡で観察したところ、多くの偽足を伸ばして活発に運動している像が得られた(図10)が、マクロファージの周囲にはコラーゲン線維の集束はみられなかった。

以上の観察結果より、上皮系細胞はコラーゲン線維を足場として偽足を伸ばし、コラーゲン線維を集束しながら伸長、移動していく過程でゲルの収縮をひきおこすものと考えられた。

IV 考 按

コラーゲンゲルの体積減少の原因として、ゲルの収縮の他に細胞がコラーゲナーゼを分泌し、コラーゲンを溶解する可能性もある。しかし、ここで用いた培養では、ゲルの体積が減少したものは、例外なく体積の減少に応じてゲルが培養開始時より硬くなったこと、細胞の周囲にコラーゲン線維の集束が観察されたことから、ゲルの体積の減少はその大部分がゲルの収縮によるものであり、コラーゲナーゼによる分解はたとえ関与していたとしても極めて僅かであると考えられた。

今回の実験では、上皮系細胞は用いた全ての細胞がゲル内で伸長し、細胞数に対応したゲルの収縮を起こした。水晶体上皮細胞の場合は少ない細胞数のものも

培養後期には大きなゲル収縮を起こしたが、これは培養期間中に細胞の分裂増殖が起こり、ゲル内の細胞数が増加したために、多くの細胞をゲル内培養したものと同一程度のゲル収縮体積が得られたものと考えられた。一方、線維芽細胞をコラーゲンゲル内培養した場合も、細胞数に応じたゲルの収縮がおけるとされる¹⁴⁾。この時線維芽細胞はコラーゲン線維を細胞のまわりに集束させ引き寄せながら、細胞自身が伸長して移動していた¹⁵⁾。これらの現象は上皮系細胞をコラーゲンゲル内培養した場合と酷似している。また上皮細胞をコラーゲンゲル内培養すると、間葉系細胞様に変化するという報告がある¹⁵⁾。線維芽細胞も上皮系細胞もコラーゲンを接着伸展の基質として利用していることが知られている¹⁶⁾。従って、コラーゲンゲル内で培養した上皮系細胞は線維芽細胞と同様の機構でコラーゲン線維を引き寄せ、集束させながらゲルを収縮させていると考えられた。一方、血球系細胞はマクロファージのように活発に運動している細胞でもゲルを収縮させなかった。マクロファージは腹腔洗浄により容易に得られることから、コラーゲンに接着しないと予想され、この接着性の欠如のためにゲルの収縮を起こさないと考えた。

この実験に用いたコラーゲンはI型であるのに対し、硝子体のコラーゲンは主にII型である。しかし水晶体上皮細胞に関しては硝子体内およびI型コラーゲンゲル内で同じような形態、行動をとること¹⁷⁾、網膜色

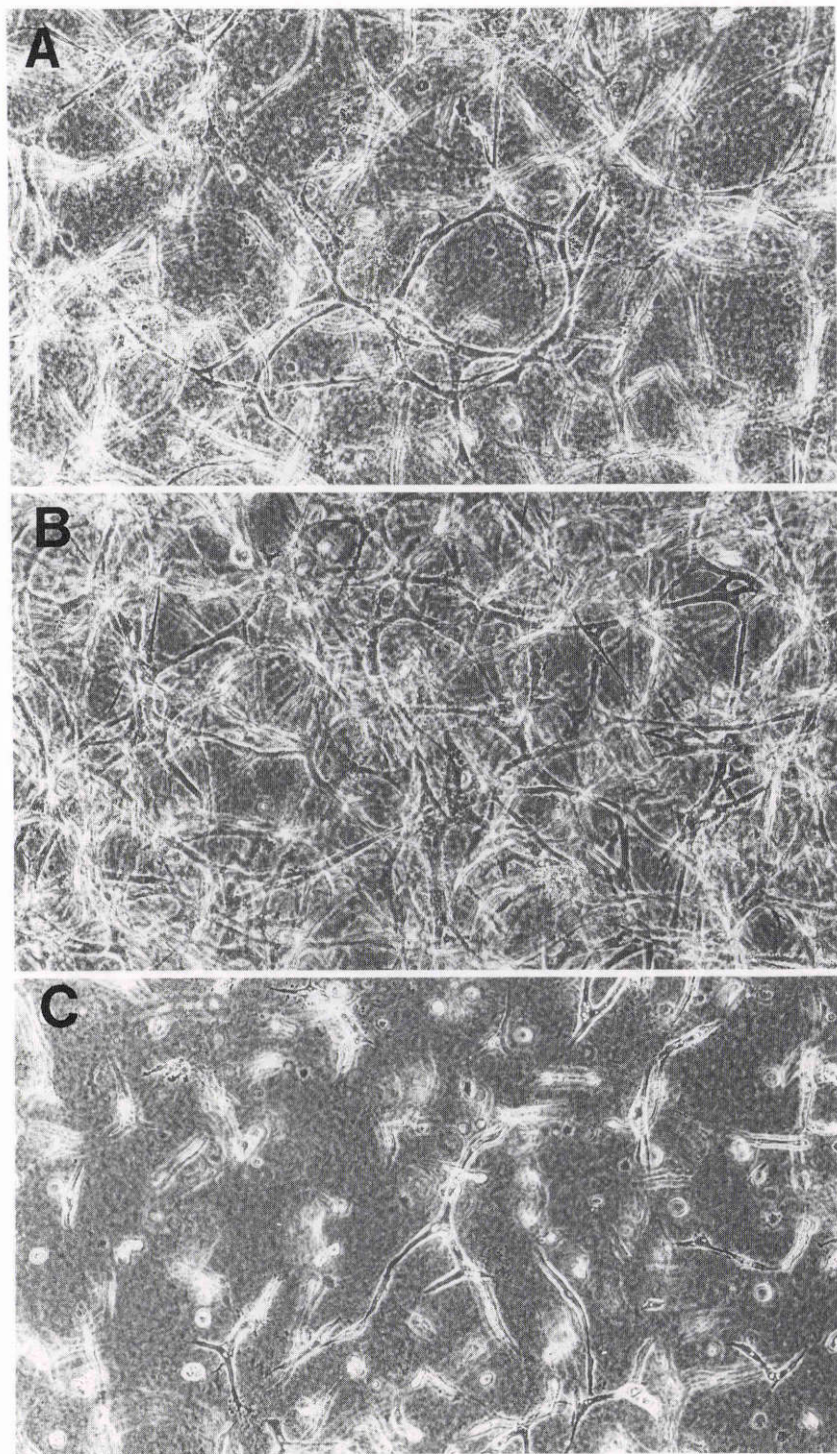


図8 コラーゲンゲル内培養した上皮系細胞の位相差顕微鏡写真, A: 水晶体上皮細胞, B: 網膜色素上皮細胞, C: 毛細血管内皮細胞, 5×10^5 細胞/培養皿, コラーゲンゲル内培養後4日目, $\times 77$ (撮影倍率 $\times 25$).

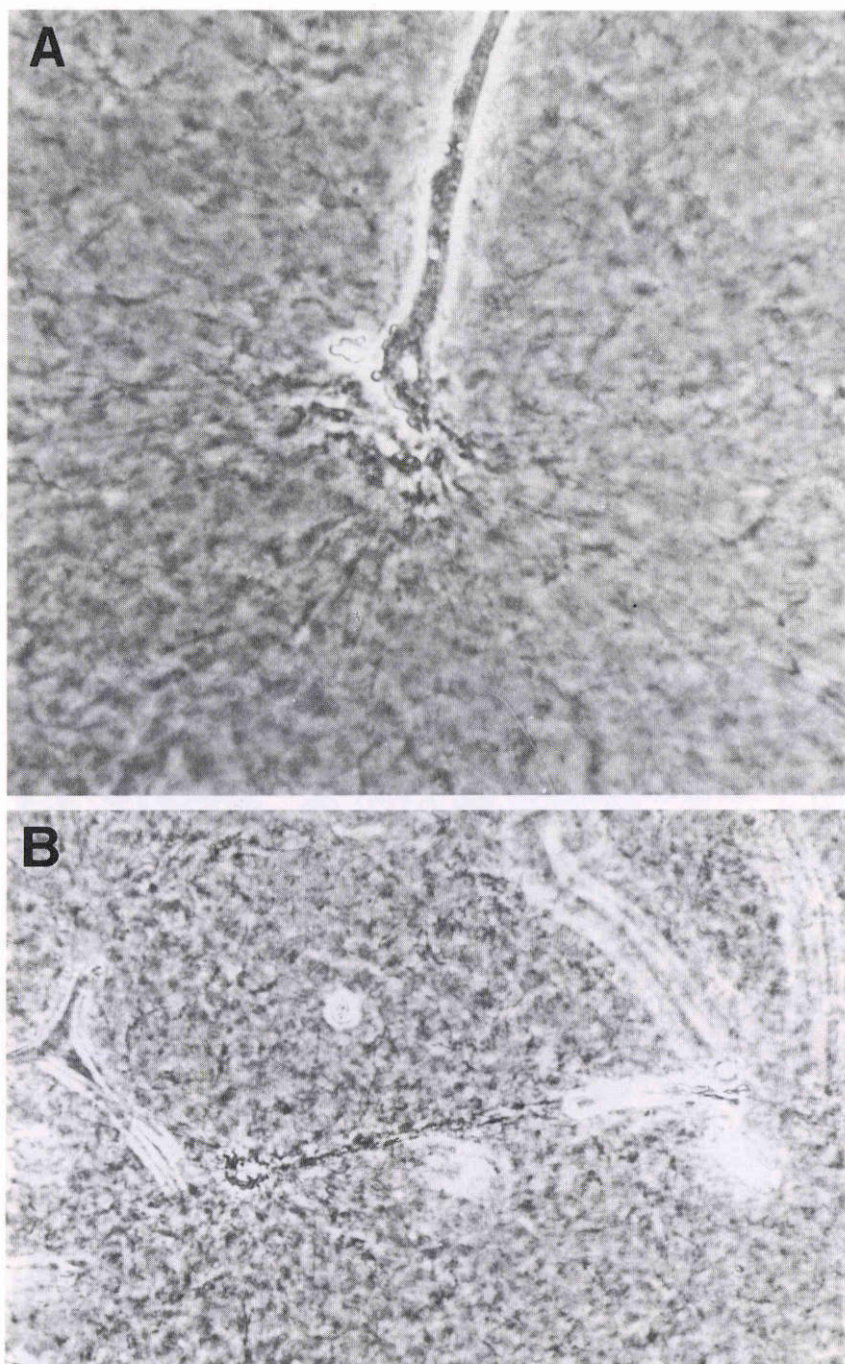


図9 コラーゲンゲル内培養5日目の水晶体上皮細胞の位相差顕微鏡写真. A: 伸長した細胞の先端の偽足がコラーゲン線維を放射状に集束させている, $\times 380$ (撮影倍率 $\times 75$). B: 細胞が移動した跡に沿ったコラーゲン線維の集束, $\times 190$ (撮影倍率 $\times 37.5$).

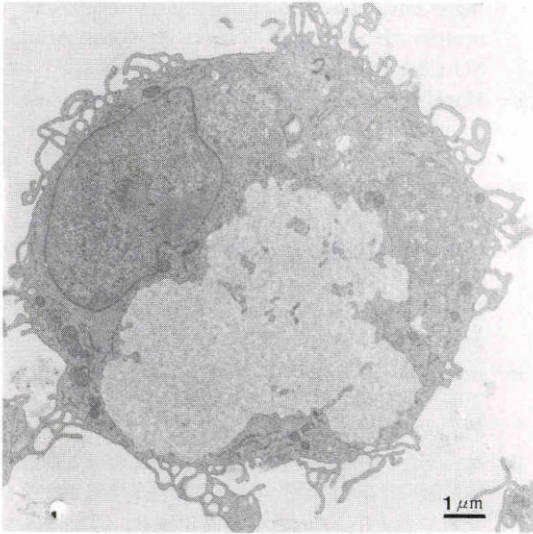


図10 マクロファージの透過型電子顕微鏡写真。多くの偽足を伸ばしている。

素上皮細胞もⅠ型コラーゲングル内でも軟骨由来のⅡ型コラーゲングル内でも同様に線維細胞様に変化することが報告されている⁹⁾。従ってⅡ型コラーゲンの代りにⅠ型コラーゲンを用いても上皮系細胞に関しては大きな相異はないと考えている。

硝子体の主な成分としては、コラーゲンの他にヒアルロン酸がある。ゲルの体積維持の観点からは多荷の陰イオン高分子であるヒアルロン酸がその粘稠性、保水性により何らかの役割を果たしていると予想されている。今回用いた細胞のうち、網膜色素上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージについては、動物種や由来は異なるが、*in vitro*で硝子体上で培養し、硝子体の体積変化を測定した報告がある¹⁰⁾。その結果は今回の結果と同様に、上皮系細胞は硝子体の収縮を起こしているがマクロファージはほとんど硝子体を収縮させていない。従って、コラーゲンの型、ヒアルロン酸の有無の相異はあるが、ここで用いたⅠ型コラーゲングルは十分硝子体の代用として利用できると考えられた。

一方、赤血球が硝子体内で溶血する場合、放出された鉄イオンが硝子体コラーゲンの網目の中のヒアルロン酸の安定性を低下させ、硝子体の液化の原因となるとする説がある¹⁸⁾。今回の実験条件では、赤血球はほとんど溶血せず、コラーゲングルの収縮も起こしていないが、溶血した際のコラーゲングルの収縮とヒアルロン酸の有無との関係については検討する必要があると考えている。また、硝子体液中に含まれる様々な成長

因子が細胞に及ぼす影響についても検討の必要があると考えられた¹⁹⁾。

硝子体自体を用いるのに比べこの培養法の利点は、ゲル濃度が不均一な硝子体に対し均一な濃度のゲルが得られること、細胞を均等にゲル内に分布させることが可能なことから、定量性に優れていることが挙げられる。またゲルの濃度を任意に変えられること、薬品の添加が容易であることなどから、解析的な実験目的に有用な系であると考えられる。

稿を終るにあたり、牛毛細血管内皮細胞を提供して下さい、また細胞培養の便宜を計って下さいました防衛医科大学校第2生化学教室の後藤完教授および同研究室の皆様へ感謝いたします。

文 献

- 1) 向野利寛：硝子体出血に伴う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)硝子体注入血液量と網膜硝子体病変との関係。日眼 91: 853—859, 1987.
- 2) 向野利寛：硝子体出血に伴う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)網膜グリア細胞の反応と網膜前増殖組織の形成。日眼 91: 911—922, 1987.
- 3) Cleary EC, Ryan SJ: Histology of wound, vitreous, and retina in experimental posterior penetrating eye injury in the rhesus monkey. Am J Ophthalmol 88: 221—231, 1979.
- 4) Sugita G, Tano Y, Machemer R: Intravitreal autotransplantation of fibroblasts. Am J Ophthalmol 89: 121—130, 1980.
- 5) Radtke ND, Tano Y, Chandler D, et al: Stimulation of massive periretinal proliferation by autotransplantation of retinal pigment epithelial cells in rabbits. Am J Ophthalmol 91: 76—87, 1981.
- 6) Fastenberg DM, Diddle KR, Sorgente N, et al: A comparison of different cellular inocula in an experimental model of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 93: 559—564, 1982.
- 7) Fastenberg DM, Diddle KR, Dorey K, et al: The role of cellular proliferation in an experimental model of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 93: 565—572, 1982.
- 8) Ussmann JH, Lazarides E, Ryan SJ: Traction retinal detachment. A cell-mediated event. Arch Ophthalmol 99: 869—872, 1981.
- 9) Vidaurri-Leal J, Hohman R, Glaser BM: Effect of vitreous on morphologic characteristics of retinal pigment epithelial cells. A new

- approach to the study of proliferative vitreoretinopathy. Arch Ophthalmol 102: 1220—1223, 1984.
- 10) **Forrester JV, Docherty R, Kerr C, et al:** Cellular proliferation in the vitreous: The use of vitreous explants as a model system. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1085—1094, 1986.
 - 11) **Greenberg G, Hay ED:** Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. J Cell Biol 95: 333—339, 1982.
 - 12) **Folkman J, Haudenschild C, Zetter BR:** Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5217—5221, 1979.
 - 13) **増田 徹:** 免疫に関する細胞の調整. 村松 繁, 増田 徹, 桂 義元 編, 実験生物学講座14, 免疫生物学, 東京, 丸善(株), 221—236, 1985.
 - 14) **Bell E, Iversson B, Merrill C:** Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1274—1278, 1979.
 - 15) **Harris KA, Stopak D, Wild P:** Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. Nature 290: 249—251, 1981.
 - 16) **永田和弘:** コラーゲンレセプターとレセプター間相互作用. 蛋白質・核酸・酵素 32: 227—238, 1987.
 - 17) **矢島保道, 唐沢容子, 沖坂重邦:** ウシ水晶体上皮細胞化生とコラーゲンの役割について—前嚢下白内障の発生と進行について—, 日眼 92: 2110—2119, 1988.
 - 18) **上野明広:** 硝子体出血についての実験的研究. 第1報. 硝子体内にみられる変化について, 日眼 84: 257—269, 1980.
 - 19) **林 英之:** 眼内無血管性線維性増殖における細胞成長因子の役割. 塚原 勇 編: 眼科領域における最新の進歩, 東京, 医学教育出版社, 332—345, 1985.