

ウシ水晶体上皮細胞化生とコラーゲンゲルの役割について

—前嚢下白内障の発生と進行について—(図6)

矢島 保道・唐沢 容子・沖坂 重邦 (防衛医科大学校眼科学教室)

Role of Collagen Gels for the Transformation of Bovine Lens Epithelium to Mesenchyme-Like Cells in Vitro in Relation to the appearance and Development of Anterior subcapsular cataract

Yasumichi Yajima, Yoko Karasawa and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

要 約

ウシ水晶体上皮細胞をコラーゲンゲルの内層で培養すると、細胞は間葉系様細胞の構造と性質を有するようになる。このことを調べる目的で、I型、II型、I型とIII型、I型とIV型コラーゲンをゲル化して、その内層でウシ水晶体上皮細胞を培養した。このような方法で培養を行なうと、水晶体上皮細胞は直ちに形を線状に変化させた。形状を変化した細胞を電子顕微鏡で観察すると、偽足を持ち、細胞質には粗面小胞体やゴルジ装置が豊富で、繊毛も認められた。すなわち形態学的には、細胞は水晶体上皮細胞の特徴よりも間葉系細胞に類似した構造を示した。またウシ硝子体(II型コラーゲン)内で2週間ウシ水晶体上皮細胞を培養した場合には、変性した細胞の部分に硝子体コラーゲン線維とは異なる太さ25~35nmのコラーゲン線維が出現した。さらにこの組織を免疫学的に検索すると、I型コラーゲンに対する反応が検出された。したがって、ウシ水晶体上皮細胞はコラーゲンゲル内で培養すると、急速に間葉系様細胞に構造、性質を変化させたものと判断した。これらのことから、前嚢下白内障の発生と進行様式について考察を加えた。(日眼 92:2110—2119, 1988)

キーワード：ウシ水晶体上皮細胞、化生、間葉系様細胞、コラーゲンゲル、前嚢下白内障

Abstract

We investigated whether bovine lens epithelial cells cultured within collagen gels express the structure and nature of mesenchyme-like cells in vitro. Type I, type II, type I and type III, type I and type IV collagen gels respectively were used as the extracellular matrices of lens cells. The lens epithelia, suspended within the collagen gels, become immediately linear shaped. The elongated cells had pseudopodia and cilium, the cytoplasm was rich in rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. The structure differed from that of the structure of the original bovine lens epithelium. Morphologically, the lens cells cultured within collagen gels closely resembled mesenchyme-like cells. When the lens cells were cultured in a bovine vitreous collagen gel for 2 weeks, 25—35nm in diameter collagen fibers that differed from bovine vitreous collagen fibers (type II collagen) appeared in a degenerative cell zone. Immunochemically, type I collagen was detected in the tissue. It seemed clear that the bovine lens cells cultured within the collagen gels rapidly transformed to mesenchyme-like cells. Based on

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 矢島 保道

(昭和63年8月23日受付, 昭和63年9月13日改訂受理)

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

(Received August 23, 1988 and accepted in revised form September 13, 1988)

these results we discussed to the appearance and the development of anterior subcapsular cataract. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 2110—2119, 1988)

Key words: bovine lens epithelial cells, metaplasia, mesenchyme-like cell, collagen gel, anterior subcapsular cataract

I 緒 言

前嚢下白内障は前極部水晶体嚢直下に板状の混濁を形成する。この混濁部分を病理組織学的に検索すると^{1)~3)}、紡錘形をした線維芽細胞様細胞とコラーゲン線維が観察される。これは水晶体上皮細胞が線維芽細胞に化生して、水晶体嚢を構成するIV型コラーゲン⁴⁾⁵⁾とは異なる新しいコラーゲン線維を産生するようになった所見であると推論されてきた。

最近、Greenberg⁶⁾は鳥類胚の水晶体上皮細胞をI型コラーゲンゲル内に埋没して培養すると、極めて速やかに上皮細胞が間葉系様細胞に変化したと報告した。このことから、ウシ水晶体上皮細胞の培養に extracellular matrix としてコラーゲンゲルを用いると、細胞は化生して、その構造や機能を急激に変化させるのではないかと考えられた。そこでゲル化したコラーゲンを用いて、ウシ水晶体上皮細胞のコラーゲンゲル内培養を試み、上皮細胞の間葉系様細胞への化生とそれに関係するコラーゲンゲルの役割について調べた。さらに前嚢下白内障の発生および進行のメカニズムについても若干の考察を加えたので報告する。

II 実験方法

ウシ水晶体上皮細胞の培養：屠殺したウシから直ちに眼球を摘出した後、ウシ水晶体から上皮細胞の付着した前嚢を取り出して、これを細切した。0.2%コラーゲナーゼで処理をした後、上皮細胞は8%ウシ胎児血清を含むイーグル MEM 液で5~7日間初代培養を行った。さらにトリプシン-EDTA で解離して植え継ぎ、培養2代目から5代目の細胞を実験に用いた。上皮細胞はI型、II型、I型とIII型、I型とIV型として濃度を0.6mg/ml から2.4mg/ml に変化したコラーゲンゲル*の上面、内層、直下で培養を行ない、その形態の変化を位相差顕微鏡で経時的に観察した。

*I型コラーゲンはラット尾の腱およびウサギのアキレス腱から酢酸抽出後、ゲル化して用いた⁷⁾。II型コラーゲンはウシ硝子体を用いた。この時混入している細胞や液体成分の影響を除くために、硝子体を1時間

紫外線照射した後、10倍量のイーグル MEM 液で洗浄を3回行った。またI型とIII型コラーゲンからなる vitrogen®はコラーゲン社、IV型コラーゲンは新田ゼラチン社より購入してこれをゲル化して使用した。

培養細胞の組織学的検査：組織は2%グルタルアルデヒド(0.1M 燐酸緩衝液, pH 7.4) ないしは2%グルタルアルデヒド-1%タンニン酸⁸⁾(0.1M カゴジレイト緩衝液, pH 7.4)にて室温で2時間固定した。その後1%四酸化オスミウムで6時間後固定を行ない、エタノール系列で脱水してエポン Poly/Bed 812に包埋した。超薄切片作製後、ウラン-鉛の二重染色ないしは10%リンタングステン酸の染色⁹⁾を行ない電子顕微鏡で観察した。

I型コラーゲンの免疫学的検出¹⁰⁾：II型コラーゲンからなるウシ硝子体ゲルを用いて培養したウシ水晶体上皮細胞に、I型コラーゲンの存在をイムノブロット法を用いて検出した。先ず培養上皮細胞を0.5N 酢酸中でホモジナイズした後に、遠心を行なって上清を採取した。上清をメンブランフィルターにブロッティングした後、IV型コラーゲンで吸収したウサギ抗ウシI型コラーゲン抗体(アドバンス社)を用いてアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合法(VECTOR 社 ABC キット, フナコシ薬品株式会社販売)でクロロナフトール発色を行なった。

III 結 果

位相差顕微鏡所見：コラーゲンを用いない培養の場合には、ウシ水晶体上皮細胞は培養皿に接着、伸展して円形や紡錘形の細胞として観察された(図1A, B)。しかしI型およびIII型コラーゲンからなる vitrogen®を0.6mg/ml の割合にゲル化して、そのゲルの上面、内層および直下でウシ水晶体上皮細胞を培養すると、上皮細胞は培養1日目から急速に線状に変化した(図1C, D, E)。しかし vitrogen®を2.4mg/ml の割合にゲル化してその上面で培養した場合は、vitrogen® 0.6mg/ml の場合と比較すると細胞の形態変化は少なかった(図1F)。また細胞をウシ硝子体の直下で培養した場合にも、細胞は急速に形状を変化させた。培養1

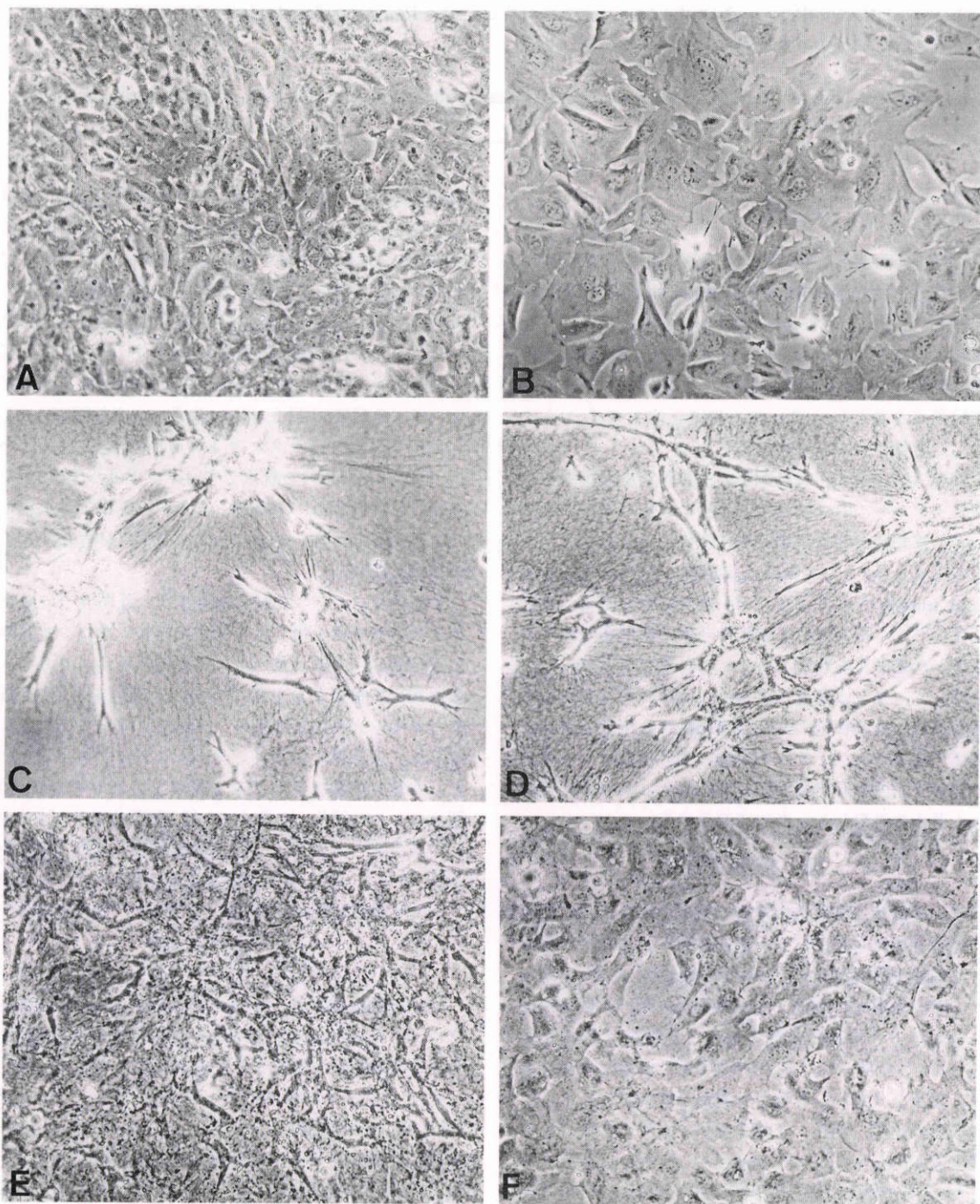


図1 コラーゲンゲルを用いない培養の場合、ウシ水晶体上皮細胞は円形や紡錐形の細胞として観察された (A は培養皿の細胞が confluent な状態, B は粗な状態). Vitrogen®を0.6mg/mlの割合にゲル化して, 細胞をそのゲルの上(C), 内層(D), 下(E)で培養すると, 線状の細胞が観察された. しかしゲルの割合が2.4mg/mlの場合(F)は細胞の形態変化は少なかった. 全て培養1日目, $\times 100$.

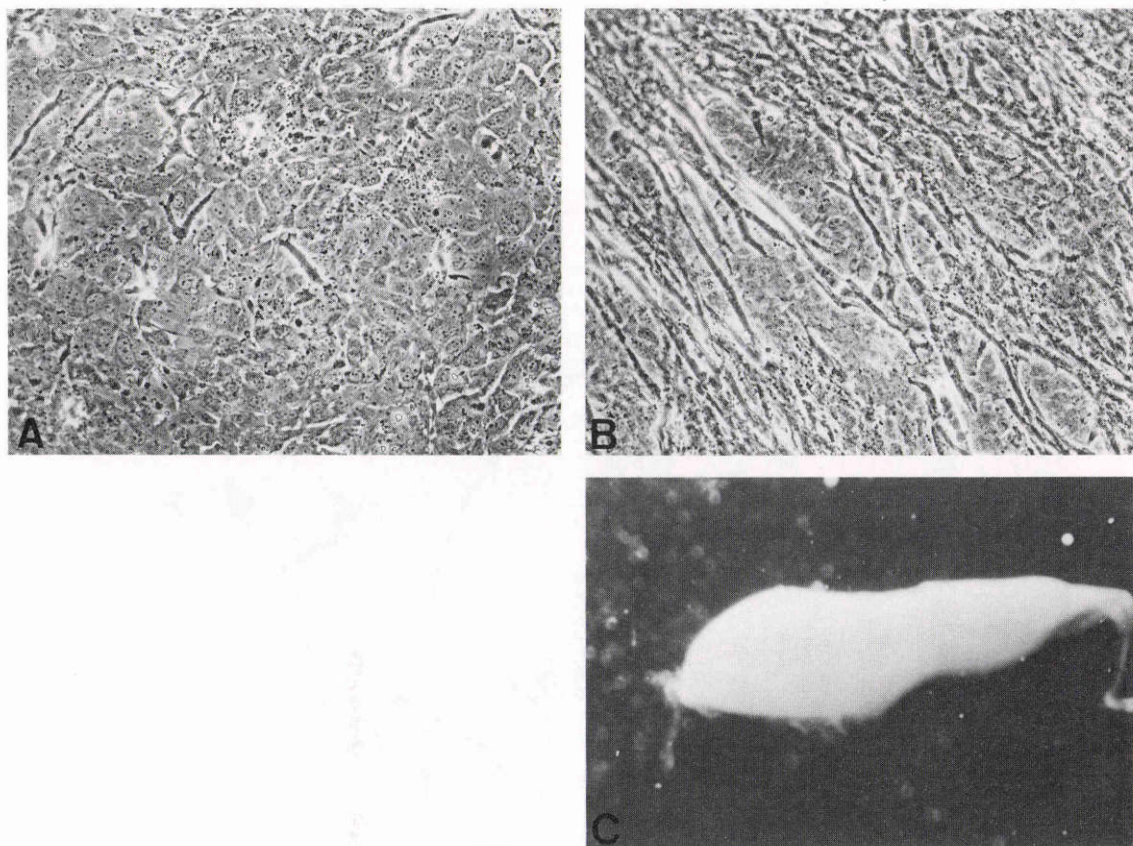


図2 ウシ硝子体直下で培養しても、細胞は線状化した、培養時間が長い程細胞の形態変化は著しかった(1日目(A), 4日目(B)), 2週間を(C)経ると、硝子体は収縮、白濁して細胞の観察ができなくなった、A, Bは×100, Cは×7.

日目(図2A)では形態変化を示した細胞は少なかったが、4日目(図2B)になると多くの細胞は硝子体に侵入して線状になった、2週間目(図2C)では培養皿の硝子体は著しく収縮して白濁し、硝子体内の細胞観察は困難になった。一方、IV型コラーゲンは単独ではゲル化できず、I型コラーゲンを混入してゲル化させて実験に用いた。培養上皮細胞は他のコラーゲンゲルを使用した場合と同様な形態変化を示した。

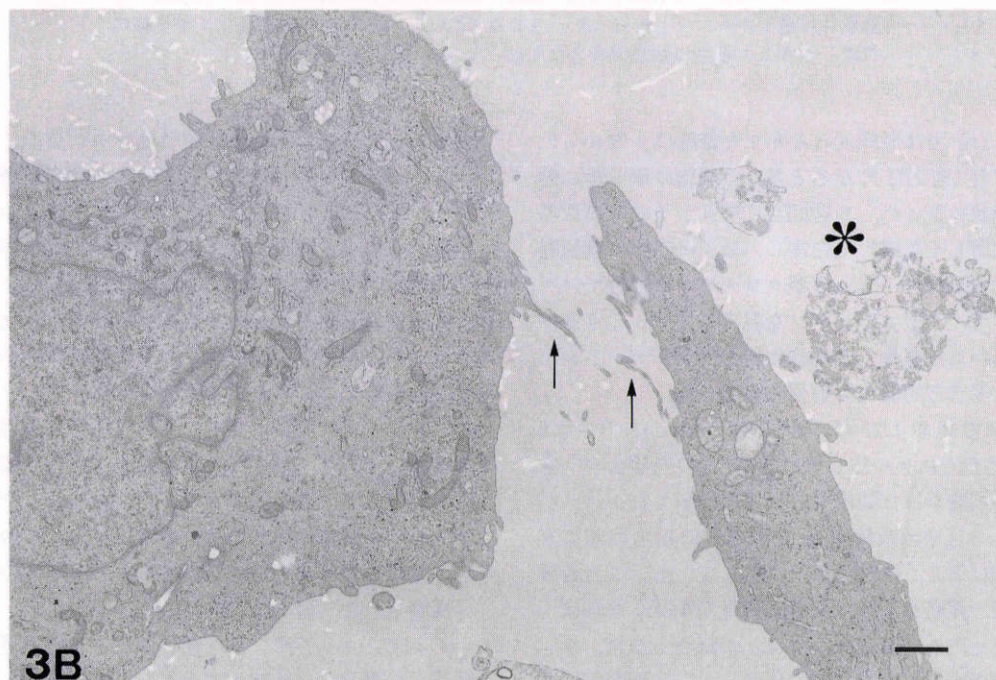
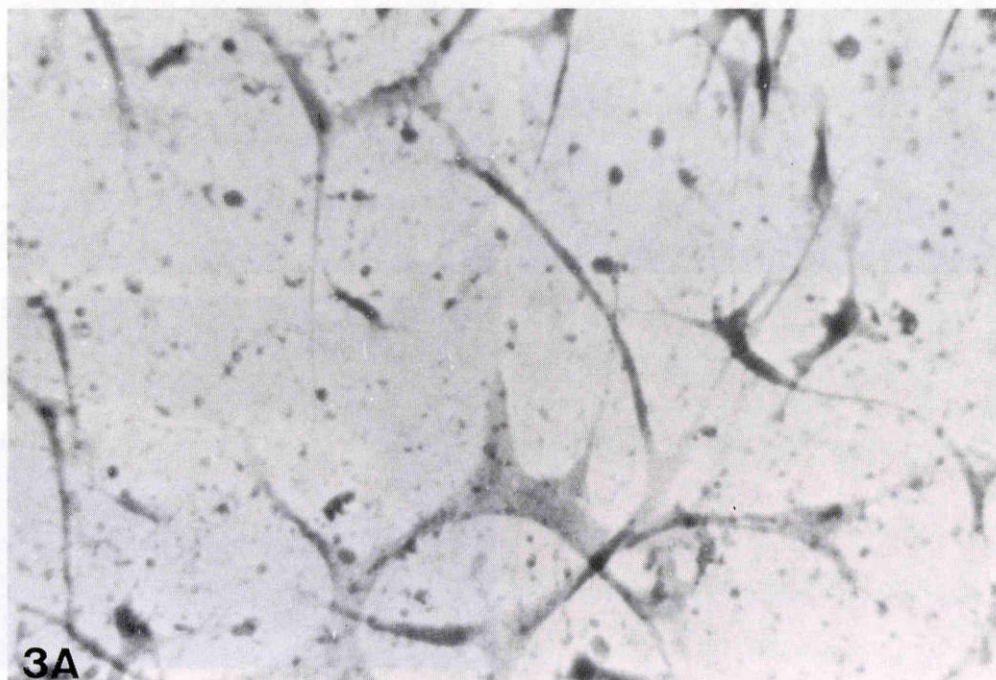
光学顕微鏡および電子顕微鏡：vitrogen®を0.6 mg/mlの割合にゲル化して、そのゲルの内層でウシ水晶体上皮細胞を11日間培養した後に作製したトルイジン青染色の光学顕微鏡標本(図3A)にみられるように、細胞は著しく線状化し、伸長していた。これを電子顕微鏡で観察すると、細胞が偽足(図3B)を伸ばす所見や細胞内外に細線維(図3C)が認められた。ウシ硝子体の直下で4日間細胞を培養して電子顕微鏡で観

察すると(図4A, B)、細胞質にはゴルジ装置、粗面小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官が豊富にみられ、また繊毛なども認められた。同様の条件で2週間細胞を培養すると、ウシ硝子体は著しい収縮を呈した(図2C)。その光学顕微鏡標本(図5A)ではウシ硝子体上面に移動してきた上皮細胞の形態的变化は少なかったが、硝子体中に侵入した上皮細胞は変性、壊死を呈していた。これを電子顕微鏡で観察すると、硝子体のコラーゲン線維は変性した上皮細胞の周囲に著しく集積していた(図5B)。また変性、壊死に陥った細胞の部分には、硝子体のコラーゲン線維よりやや太いコラーゲン線維(25~35nm)が出現した。このコラーゲン線維を高倍率にして観察すると、周期性の縞模様が観察された(図5C, D)。

イムノブロット法：ウシ硝子体とともに2週間細胞培養した場合と、コラーゲンゲルを用いなかった通常

培養の場合のウシ水晶体上皮細胞の酢酸抽出物の遠心後に得られた蛋白質を用いて、I型コラーゲンの検出を行なった。前者では蛋白量が $10\mu\text{g}$ でクロロナフトー

ル発色が生じ、後者では不変であった。この方法ではI型コラーゲン量が 0.6ng まで反応が確認された(図6)。



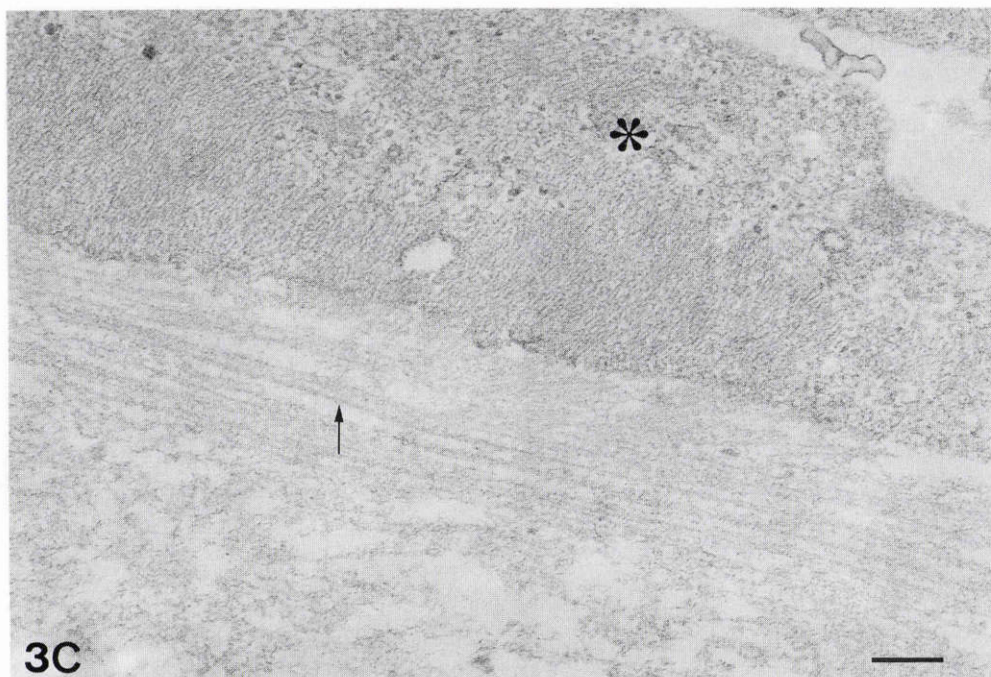


図3 Vitrogen®の内層で細胞を11日間培養後のトルイジン青染色の光学顕微鏡標本(A). 細胞は線状化し, 周囲には破壊して点状と化した細胞を認める. 電子顕微鏡で観察すると, 細胞は偽足(矢印)をのばし(B, *は壊死した細胞), 高倍率では細胞(*)周囲に細線維(矢印)が認められた(C). Aは $\times 240$, Bのbarは $1\mu\text{m}$, Cは $0.2\mu\text{m}$.

IV 考 按

Greenberg⁶⁾は鳥類胚の水晶体上皮細胞をI型コラーゲンゲル内に埋没して培養すると, 極めて速やかに間葉系様細胞に変化したと報告した. これについて, 先ずI型とIII型コラーゲンからなるvitrogen®をゲル化して, このコラーゲンをウシ水晶体上皮細胞に対してどのような条件のextracellular matrixとして用いると, 細胞の形態的变化が著しいのかを調べた(図2~4). ウシ水晶体上皮細胞は, コラーゲンゲルの上面, 内層, 直下のいずれの位置で培養しても, 著しく線状化して伸長した. しかし細胞をゲル内に埋没した場合に, 特に形状の変化が顕著であった. またコラーゲンゲルの濃度の差は細胞の形態変化の速度に影響することが確認された. 施行した実験ではvitrogen®を 0.6mg/ml の割合でゲル化して, そのゲルの内層でウシ水晶体上皮細胞を培養した場合に, 細胞の形態変化は最も著しかった. 同様にI型, II型, I型とIV型コラーゲンゲルを用いてウシ水晶体上皮細胞を培養して

も, 形態変化が生じた.

コラーゲンゲル内で培養したウシ水晶体上皮細胞を組織学的に検索すると, 細胞は偽足 pseudopodium を持ち, 活発な運動を行っていることが示唆された. 細胞内は粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内小器官が豊富で, 繊毛も確認された. 一般に, 水晶体上皮細胞の細胞内小器官としては, 粗面小胞体やゴルジ装置よりもミトコンドリアが多く観察される¹¹⁾. しかしコラーゲンの合成能を持つ結合組織の固有細胞である線維芽細胞は, 形態学的には粗面小胞体とゴルジ装置の良好な発育を特徴とする紡錘形の細胞で, 時に繊毛なども観察されることが知られている¹²⁾. したがってコラーゲン内で培養したウシ水晶体上皮細胞は形態学的にはむしろ線維芽細胞に類似していた. ウシ硝子体コラーゲンゲル内でウシ水晶体上皮細胞を2週間培養した場合, 上皮細胞が変性, 壊死に陥った部分に, 比較的周期性横紋の明瞭な硝子体コラーゲンとは異なるコラーゲン線維を認めた. ウシ硝子体コラーゲン線維は太さ $12\sim 14\text{nm}$ で¹³⁾, 観察されたコラーゲン線維は

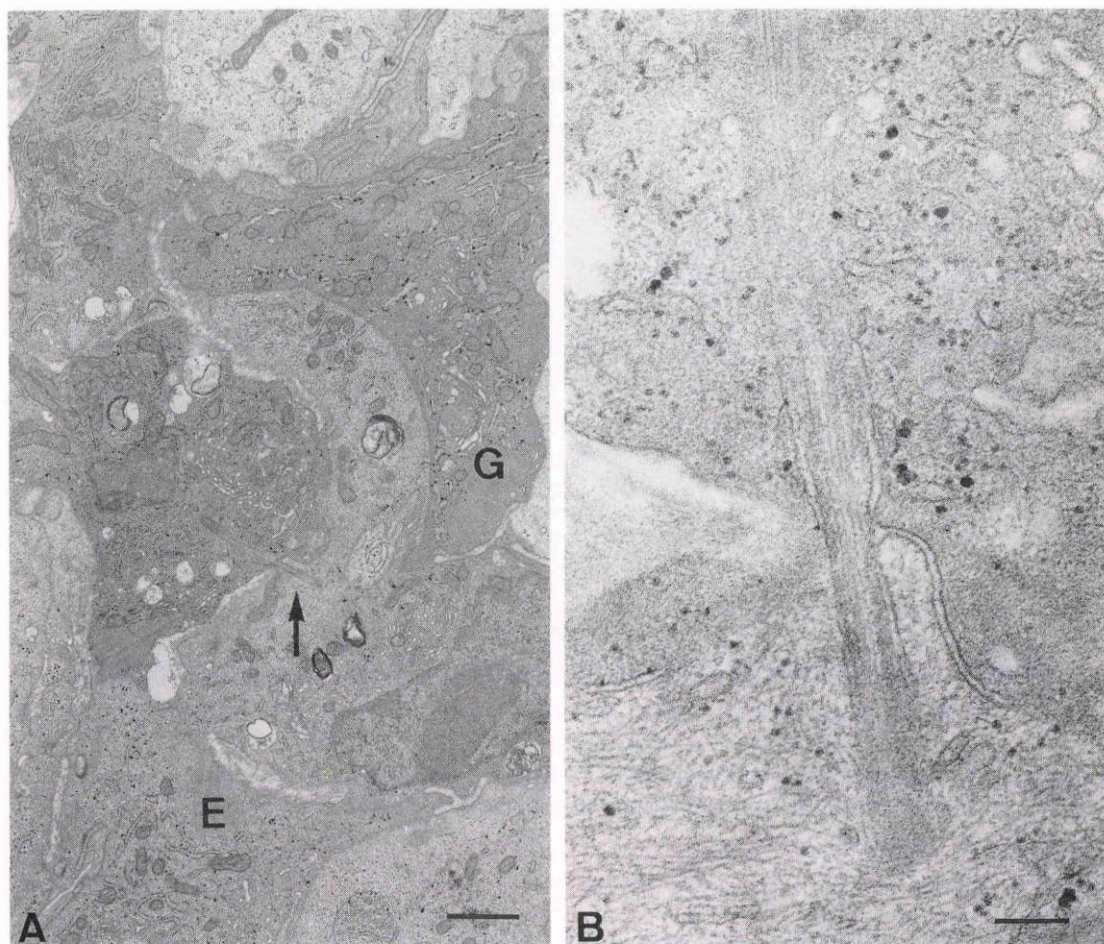
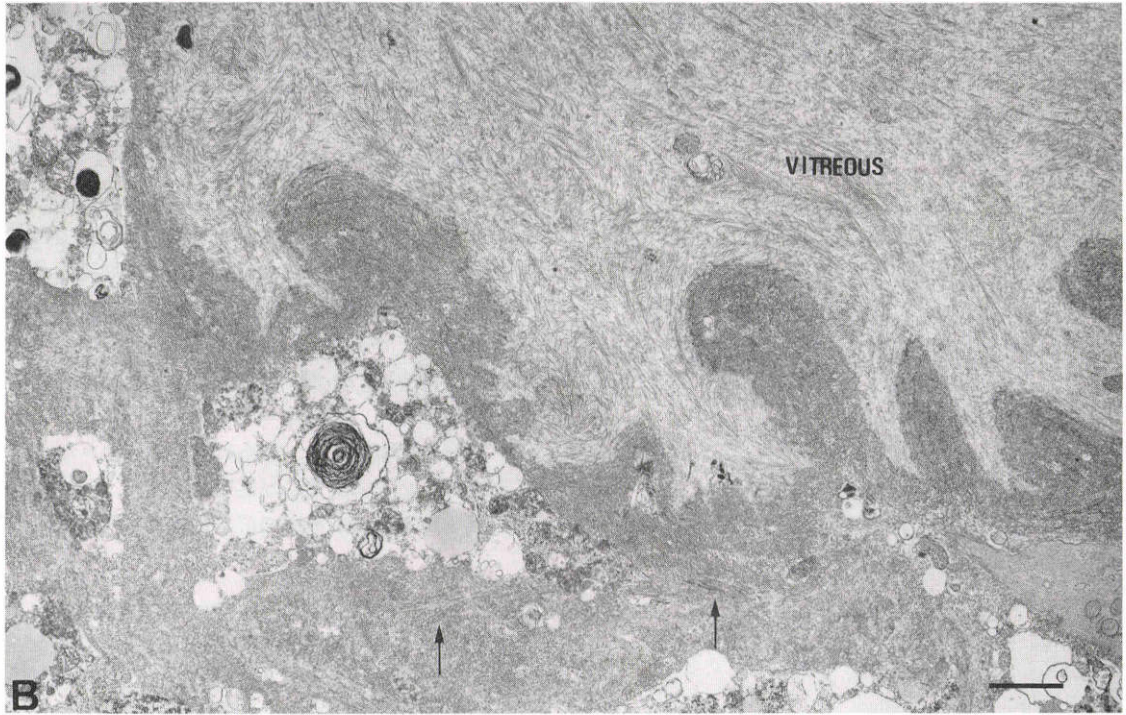
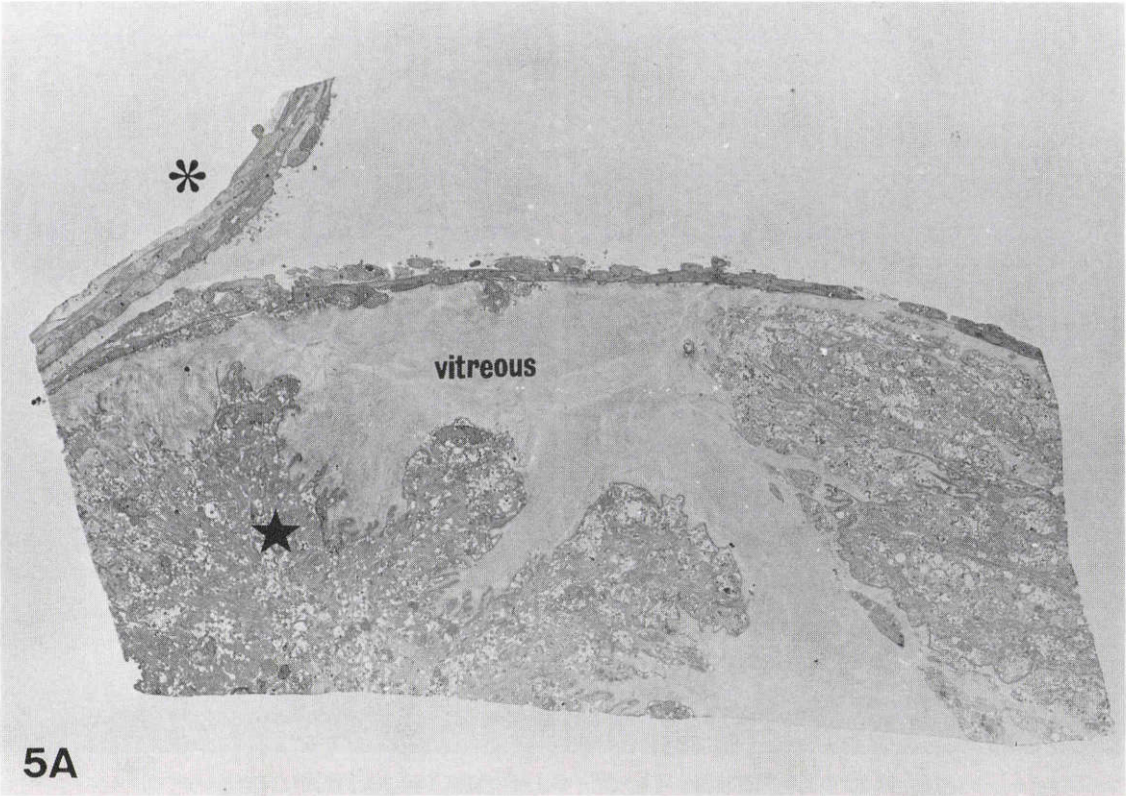


図4 ウシ硝子体直下で4日間細胞を培養して電子顕微鏡で観察すると、細胞質にはゴルジ装置(G), 粗面小胞体(E)などが多数みられ、繊毛(Aの矢印, Bはその拡大)も認められた。Aのbarは $1\mu\text{m}$, Bは $0.2\mu\text{m}$ 。

25~35nmの太さを持っていた。電子顕微鏡的に、このコラーゲン線維がどの型のコラーゲン線維に属しているかを同定することはできないが、周期性横紋の存在はコラーゲン線維であることを証明している¹⁴⁾。さらにイムノプロット法により、硝子体コラーゲンをを用いた培養上皮細胞の酢酸抽出物の中に、I型コラーゲンに対する反応が確認できたことから、ウシ水晶体上皮細胞はコラーゲングル内で培養を行なうと、間葉系の細胞に類する構造、性質を有するようになったと考えられた。

Font³⁾は幾つかの異った時期の前囊下白内障を形態学的に観察することで、前囊下白内障の発生と進行様式について仮説を述べた。それによると、前囊下白内障の初期には前囊直下の上皮細胞が増殖する時期(増殖期)があり、病期がさらに進行するところの上皮細胞が変性を生じて、そこに紡錘形の細胞が出現してくるとした(変性期)。さらにこの部分を電子顕微鏡で観察すると、60~70nmの周期性横紋を持つコラーゲン線維が認められたと報告した。またラットに放射線を照射して、突然変異の発生から前囊下白内障が生じた場合でも、初期には上皮細胞の増殖があり、続く細胞の変性が認められている¹⁵⁾。このような前囊下の上皮細胞増殖は、前囊下白内障の初期の形態学的所見と考えられる。一方、ウシ水晶体上皮細胞を confluent な状態で培養すると、直ちに細胞の内外に細線維が形成され¹⁶⁾、さらにこれを長期に培養すると、IV型の他にI

障の初期には前囊直下の上皮細胞が増殖する時期(増殖期)があり、病期がさらに進行するところの上皮細胞が変性を生じて、そこに紡錘形の細胞が出現してくるとした(変性期)。さらにこの部分を電子顕微鏡で観察すると、60~70nmの周期性横紋を持つコラーゲン線維が認められたと報告した。またラットに放射線を照射して、突然変異の発生から前囊下白内障が生じた場合でも、初期には上皮細胞の増殖があり、続く細胞の変性が認められている¹⁵⁾。このような前囊下の上皮細胞増殖は、前囊下白内障の初期の形態学的所見と考えられる。一方、ウシ水晶体上皮細胞を confluent な状態で培養すると、直ちに細胞の内外に細線維が形成され¹⁶⁾、さらにこれを長期に培養すると、IV型の他にI



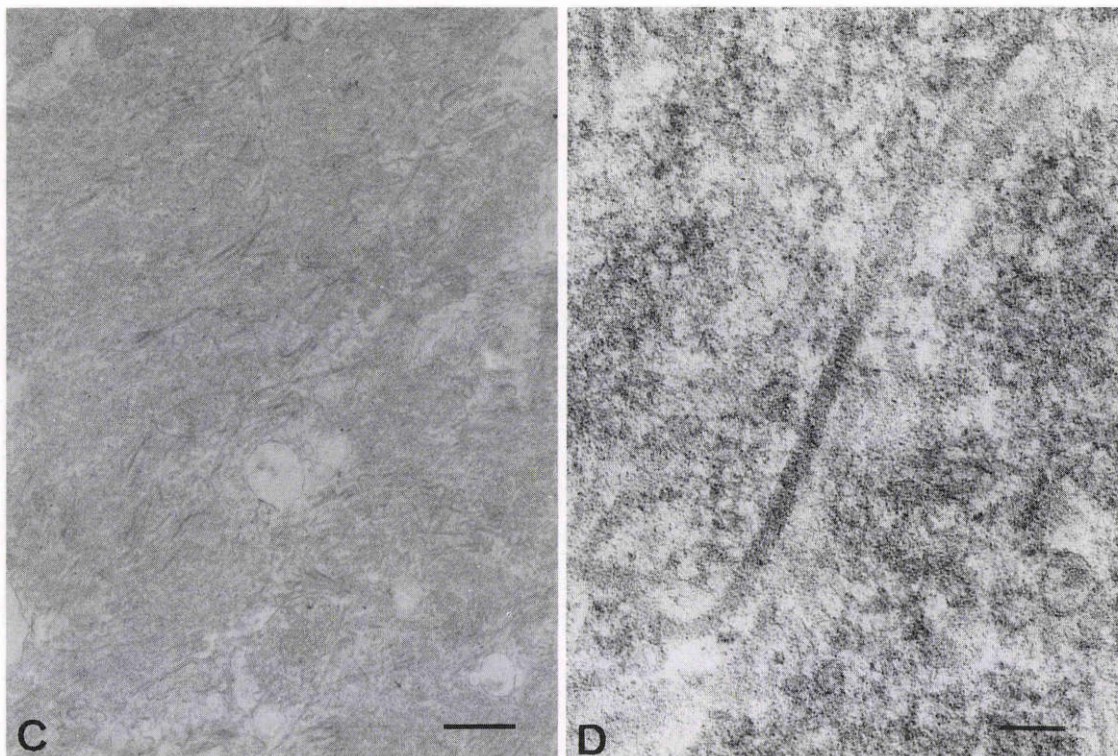
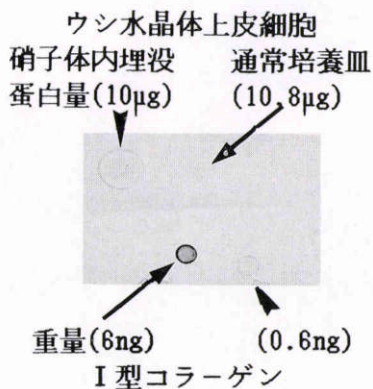


図5 図2Cの光学顕微鏡標本(A), 硝子体上面の細胞(*)は形態変化は少ないが, 内層の細胞(星印)は変性, 崩壊していた. この星印の部分電子顕微鏡で観察すると(タンニン酸を用いた固定), 硝子体のコラーゲン線維は細胞周囲に集合し(B), 変性した部分をリンタングステン酸染色で観察しても(C), 硝子体コラーゲン線維より多い多数のコラーゲン線維(D)がみられた. このコラーゲン線維には周期性横紋が認められた. Aは $\times 150$, Bのbarは $2\mu\text{m}$, Cは $0.5\mu\text{m}$, Dは $0.1\mu\text{m}$.

イムノブロット法



型, III型コラーゲンが産生されたと報告されている¹⁷⁾. つまり増殖した上皮細胞は, 細胞外に種々のコラーゲン線維を産生する. そして我々の行った実験では, ウシ水晶体上皮細胞をコラーゲンゲル内に埋没して培養すると, 急速に形を線状に変化させた. しかもウシ硝子体コラーゲンを細胞の extracellular matrix として用いた培養では, わずか2週間で, 変性, 壊死に陥った細胞の部分に, 硝子体コラーゲンとは異なるコラーゲン線維の出現があり, さらにイムノブロット法でI型コラーゲンに対する反応を検出した.

前囊下白内障の前極部の混濁部分に出現してくる紡

図6 イムノブロット法: ウシ硝子体内 (II型コラーゲン) でウシ水晶体上皮細胞を2週間培養すると, その組織からI型コラーゲンに対する反応が検出された.

錘形の細胞とコラーゲン線維は前嚢下白内障の極めて特徴的な所見であり、その由来と白内障の進行に関係するその役割については以下のように推論した。すなわち先ずなんらかの原因で前嚢下の水晶体上皮細胞が増殖して重層するような状態が起こると、上皮細胞間にコラーゲン線維が産生されるようになる。このコラーゲン線維が上皮細胞の extracellular matrix として存在すると、細胞は形を線状に変え、さらに加速的に種々のコラーゲン線維を形成するようになり、生じた細胞の変性、壊死と種々のコラーゲン線維の存在は、臨床で経験する前嚢下白内障の固い板状の混濁として前極部前嚢直下に出現するものと考えられた。

文 献

- 1) Henkind P, Philip R: Anterior polar cataract. *Am J Ophthalmol* 63: 768—771, 1967.
- 2) 尾形徹也, 松井正明: 人眼前極白内障の水晶体嚢及び上皮細胞に関する電子顕微鏡的研究. *日眼* 76: 1286—1297, 1972.
- 3) Fent RL, Brownstein S: A light and electron microscopic study of anterior subcapsular cataracts. *Am J Ophthalmol* 75: 972—984, 1974.
- 4) Dehm P, Kefalides NA: The collagenous component of lens basement membrane. *J Biol Chem* 253: 6680—6686, 1978.
- 5) 中沢 清: カプセルの化学組成. 岩田修造 編, 水晶体, その生化学的機構. 東京, メディカル葦出版, 35—40, 1986.
- 6) Greenberg G, Hay ED: Cytodifferentiation and tissue phenotype change during transformation of embryonic lens epithelium to mesenchyme-like cells in vitro. *Dev Biol* 115: 363—379, 1986.
- 7) Elsdale T, Bard J: Collagen substrate for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54: 626—637, 1972.
- 8) 日本電子顕微鏡学会関東支部編: 医学生物学電子顕微鏡観察法. 東京, 丸善, 233—235, 1982.
- 9) 鈴木克哉: 一般電子染色法. 日本医科大学 WHO 電顕診断学センター編: 電子顕微鏡診断学, 埼玉, 藤田企画出版, 64, 1986.
- 10) Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577—580, 1981.
- 11) 矢島保道, 水川 淳, 沖坂重邦: 水晶体の構造. あたらしい眼科 1: 3—17, 1984.
- 12) 梶川欽一郎: 線維芽細胞. 小川和朗 他編: 人体組織学, 東京, 朝倉書店, 6—15, 1984.
- 13) 朝倉章子: 硝子体におけるヒアルロン酸存在様式: 組織化学的研究. *日眼* 89: 179—191, 1985.
- 14) 梶川欽一郎: 膠原線維. 小川和朗 他編: 人体組織学, 東京, 朝倉書店, 31—39, 1984.
- 15) Gorthy WC, Morrill DJ, Anderson JW: Anterior polar cataract development in mutant Wister rats. A ultrastructural study, in Regnault M (ed): *Aging of the Lens*. Amsterdam, Elsevier/Morth-Holland Biomedical Press, 207—222, 1980.
- 16) Hughes RC, Laurent M, Lonchampt M, et al: Lens glycoproteins. Biosynthesis in cultured epithelial cells of bovine lens. *Eur J Biochem* 52: 143—155, 1975.
- 17) Laurent M, Kern P, Courtois Y, et al: Synthesis of type I, III and IV collagen by bovine lens epithelial cells in long-term culture. *Exp Cell Res* 134: 23—31, 1981.