# マウス前眼部における100nm 周期細線維の

# 実験的形成について (図6,表1)

## **平野 耕治\* ・粟屋** 忍\* ・小林 身哉\*\* (\*名古屋大学医学部眼科学教室) 小林 邦彦\*\*・星野 洗\*\* (\*\*名古屋大学医学部第2解剖学教室)

# Experimental Formation of 100nm Periodic Fibrils in the Anterior Segment of the Mouse Eye

# Koji Hirano\*, Shinobu Awaya\* Miya Kobayashi\*\* Kunihiko Kobayashi\*\* and Takeshi Hoshino\*\*

\*Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine \*\*Department of Anatomy, Nagoya University School of Medicine

#### 要 約

約100nm の周期構造を持つ長周期コラーゲンは、ヒト線維柱帯においては加齢とともにその出現頻度を増 すことが知られている.今回,我々はマウスの眼球を摘出後,20mM ATP 添加 F12培養液または同リン酸緩 衝液にて酸性条件下,37°Cで2時間の incubation を行なった後,電子顕微鏡による観察をしたところ,この長 周期コラーゲンによく似た,約100nm の周期を有する線維構造をみとめた.この線維構造すなわち100nm 周期 細線維は低温(4°C)あるいは中性条件での incubation では形成がみられず,ATP 無添加では medium を酸 性に調整したものでわずかに形成がみられた.したがって,ATP,酸,37°Cの条件によりヒトの細胞外マトリッ クスの加齢変化と類似した形態的変化がマウスにおいて実験的に観察された.(日眼 92:2156-2163,1988)

キーワード:100nm 周期細線維,長周期コラーゲン,角膜実質,隅角線維柱帯,加齢モデル

#### Abstract

Long-spacing collagen which exhibits 100nm periodicity has been observed in the interstitial connective tissue of various organs under normal and pathological conditions. We previously reported a quantitative analysis of the long-spacing collagen fibrils in the human trabecular meshwork, and their increasing occurrence with age. Bruns et al. reported the experimental formation of 100nm-periodic fibrils, resembling long-spacing collagen, with an incubation of rat tail tendon in the culture medium containing 20mM ATP. According to the method of Bruns et al., we incubated tissue blocks of mouse eye ball, which show no structures of 100nm-periodic fibrils under the normal condition. Abundant 100nm-periodic fibrils were observed by incubation with ATP at  $37^{\circ}$ C in the corneal stroma and in the region of the anterior chamber angle (trabecular meshwork). Acidic pH of the incubation medium without ATP also caused the formation of these fibrils but the amount was small. These results indicate that ATP under acidic conditions at  $37^{\circ}$ C is necessary for the experimental formation of 100nm-periodic fibrils in the connective tissue of the mouse eye. These experimental studies offer a useful model for the explanation of the age-related increase of 100nm-periodic fibrils in the trabecular meshwork of the human eye. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 2156-2163, 1988)

別刷請求先:466 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部眼科学教室 平野 耕治 (昭和63年9月14日受付,昭和63年9月29日改訂受理)

Reprint requests to: Koji Hirano, M.D. Dept. of Ophthalmol., Nagoya Univ. School of Med.

65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466, Japan

(Received September 14, 1988 and accepted in revised form September 29, 1988)

Key words : 100nm-periodic fibrils, Long-spacing collagen, Corneal stroma, Trabecular meshwork, Age-related change

### I 緒 言

約100nmの周期構造を持つ長周期コラーゲンは眼 科領域においてはFuchs' dystrophy<sup>112)</sup>や Chandler 症 候群のDescemet 膜<sup>3)</sup>,原発性開放隅角緑内障の線維 柱帯<sup>4)~6)</sup>,ある種の涙腺腫瘍の細胞間質<sup>7)</sup>などに認めら れるとの報告がある.この構造はこうした病的状態に かぎらず,正常でも加齢により増加し,とくに高齢者 の線維柱帯の細胞間質に多くみられる<sup>8)~10)</sup>.しかし, その病的意義およびその形成過程については現在のと ころよくわかっていない.先に我々はヒト線維柱帯に おいて加齢に伴いこの長周期コラーゲンが増加するこ とを電顕的観察により定量的にあきらかにし,この構 造が線維柱帯の細胞間質における加齢変化の指標とな り得ることを示した<sup>111</sup>.従って,この約100nmの周期 をもつ線維構造の形成過程を探ることは前眼部の加齢 変化を考察する上で有用なことと考えられる.

ところで, Bruns ら<sup>12</sup>はヒト皮膚の線維芽細胞の長 期培養,あるいはラットの尾腱を ATP とともに incubate することにより,この長周期コラーゲンによく似 た約100nm の周期構造をもった線維すなわち100nm 周期細線維が形成されることを報告し,さらに,モノ クローナル抗体をもちいた実験から,この100nm 周期 細線維の主要成分はVI型コラーゲンであることを示し た.

今回,我々はマウス前眼部において,長周期コラー

ゲンによく似た100nm 周期細線維を in vitro で実験 的に形成させ、その形成条件につき若干の知見を得た. ここに、前眼部における間質結合組織の加齢変化につ いての考察を含めて報告する.

### II 実験方法

#### 1. 材料

adult の dd および beige (C57BL/6-bg<sup>J</sup>/bg<sup>J</sup>) mouse からエーテル麻酔下に眼球を摘出し,摘出眼球は径線 方向に 2 分割した.一部は摘出後ただちに 4 %バラ フォルムアルデヒドにて固定し,残りは表に示した各 条件で細線維形成のための incubation をおこなった. ヒトの材料として autopsy により得られた,白内障の ほかにはとくに眼疾患の既往のない女性(79歳)の眼 球をもちいた.

#### 2. ATP incubation

表に示すごとく実験  $1 \sim 6$  では F12培養液 (F12) あ るいはリン酸緩衝液 (PBS) に20mM の ATP 濃度と なるよう ATP・2Na を加え, incubation medium とし た.実験 1 は Bruns らの原法にもとづき, ATP を添加 した F12で37℃, 2 時間の incubation をおこなったも の,実験 2 は温度 4 ℃で72時間の incubation を, 3, 4 は F12の代わりに PBS をもちいそれぞれ 2 時間お よび24時間の incubation をおこなったものである.

20mMのATP濃度ではF12でpH4.7, PBSでpH 3.0と medium が酸性に傾くため, NaOHで中和し

Exp. No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	plus ATP experiments						minus ATP controls						no incubation
Medium	F12	F12	PBS	PBS	PBS	PBS	F12	F12	F12	F12	PBS	PBS	
20mM ATP	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
pH	4.7	4.7	3.0	3.0	6.6	6.6	7.4	7.4	7.4	4.7	3.1	3.1	***
Temperature (°C)	37	4	37	37	37	37	37	37	4	37	37	37	
Incubation time (hr)	2	72	2	24	2	24	2	24	72	2	2	24	0
100nm-periodic fi	ibril for	matior	obser	ved in	;								
cornea	+	-	#	#	a = b	-	-	-		+	-	+	-
trabecular meshwork	+	-	+	+	-	-	-	_	NE	-	-	+	-

表 ATP incubation の条件と結果

-: absent, +: normally present, #: moderately present, #: abundant, NE: not examined

(pH 6.6), 同様の incubation を実験 5, 6 でおこなった.

ATP incubation に対する control 群を実験 7~12 に示す.実験7,8,9はATP 無添加すなわち,F12 のみで incubation をおこなったものである.また, HCl により, medium の pH を ATP 添加時と同じ pH に調整して incubation をおこなったものが実験 10,11,12である.

#### 3. 電子顕微鏡観察

Incubation の後、各試料を4%パラフォルムアルデ ヒド (pH 7.4) にて、4℃、1週間固定し、さらに、 2%グルタールアルデヒド (pH 7.4) で4℃、2時間 固定した後、1%の四酸化オスミウムにより室温で90 分の後固定をおこなった。これをエタノール系列によ り脱水し、Quetol 812に包埋した。包埋した試料から 超薄切片を作製、切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛 で電子染色した後、日立 H-800電子顕微鏡にて観察を おこなった。

### III 結 果

1. 正常状態でのマウス角膜実質および隅角部の細 胞間質の微細構造

眼球摘出後ただちに固定した群の角膜実質では、い

わゆる D 周期を示す径 $30 \sim 50$ nm のコラーゲン細線維 の間に,または近接して,径 $6 \sim 7$ nm の filament が認め られた(図1). この filament は短いものから長いもの まであり,しばしば約100nm の等間隔にマメ状の塊を 持った構造をとり,あたかも有刺鉄線を思わせる形態 をしていた.

隅角部では、シュレム管は明確には認められなかっ たものの、強角膜移行部の前房側には断面状ふるい様 にみられる構造があり、線維柱帯に相当する部位と考 えられた. この部の細胞間質にも角膜実質と同様、径 30~50nmのコラーゲン細線維および径6~7nmの有 刺鉄線様 filament が認められたが、それらの他にはと くに目立った線維構造はみられなかった.

2. 100nm 周期細線維の実験的形成

20mM ATP のもと37℃, 2 時間の incubation を行 なった群(実験1,3)では,角膜実質に約100nm の 周期を持つ線維状構造が多くみられた(図2,3).こ の構造は横幅25~150nm でコラーゲン細線維に伴走 する形で認められており,電子密度の高い,幅約35nm の帯あるいは結節の間を径6~7nm の filament が結ん でいる形態をとっていた.ここで私達はこの約100nm 周期の線維構造を Bruns らの記載に準じ,100nm 周期 細線維と呼ぶことにする.同じ条件下, incubation を



図1 眼球摘出後ただちに固定したマウス角膜実質の電顕像. コラーゲン細線維の間 に径6~7nmの filament がみられる (矢印) (×60,000, bar は1µm).



図2 ATP を添加したリン酸緩衝液中 (pH 3.0), 37℃, 2時間の incubation を行 なったマウス角膜実質. コラーゲン細線維に伴走する形で約100nm 周期の細線維が 多く認められる (矢印) (×60,000, bar は1µm).



図3 図2で認められた100nm 周期細線維の拡大像. 100nm 周期の電子密度の高い band の間を径6~7nm の細い filament が結んでいる形態をとっている(×90,000, bar は0.5µm).



図4 塩酸により pH を3.0に調整したリン酸溶液中で, 37°C, 24時間の incubation を おこなったマウス角膜実質. 100nm 周期細線維の形成がみられる(矢印)が,これ らの細線維は ATP とともに incubate したものに較べて幅が狭く,縦に連なった形 態をとっている (×60,000, bar は1 $\mu$ m).



図5 ATP を加えた F12培養液で incubation をおこなったマウスの隅角部. 角膜実 質と同様, 100nm の周期をもった細線維が認められる (矢印) (×60,000, bar は1 μm).

昭和63年12月10日

24時間に延長して行なった場合,実験1,3と同様100 nm 周期細線維の形成がみられたが,その量,形態とも 2時間の incubation のものと変わりはなかった.ま た,20mM ATP 添加 medium を NaOH により中和し たもの (pH 6.6) では2時間および24時間の incubation を行なっても100nm 周期細線維の形成はみられ なかった (実験5, 6).

control として, ATP 無添加の F12 (pH 7.4) では, 2 時間および24時間 incubate しても100nm 周期細線 維の形成はみられなかった(実験 7, 8). 一方, F12 および PBS に HCl を加えて, それぞれ ATP 添加時 と同じ pH にそろえて incubate すると, F12で 2 時間 後に, PBS では24時間後にそれぞれ100nm 周期細線維 がみられるようになった(実験10, 12). PBS に HCl を 加えた medium では 2 時間の incubation では100nm 周期細線維の形成はみられなかった(実験11). 酸性 medium 中での incubation の後,認められた100nm 周 期細線維は,前述の, ATP による incubation により形 成されたものに較べ横幅が狭く, むしろ縦長に連なっ た形態をとっており, しばしば有刺鉄線様の構造を とっていた(図 4).

4℃では ATP 添加, 無添加いずれの状態でも, ま た, その incubation の時間を72時間に延長しても100 nm 周期細線維の形成はみられなかった(実験 2, 9).

ATP を加えた medium, あるいは酸性の medium

で37℃で2時間ないし24時間 incubation を行なった 試料中, ヒトの線維柱帯に相当する部分では角膜実質 と同様,100nm 周期細線維がみられるようになってき たが,ここで認められた100nm 周期細線維は角膜実質 で認められたものに較べ横幅が狭く,長さも短かかっ た(図5).

3. 100nm 周期細線維と長周期コラーゲンの周期構造の比較

図6はヒト線維柱帯の細胞間質に認められた長周期 コラーゲンである。100~120nm 周期で電子密度の高 い帯が認められ、その間を filament が結んだ形態を とっており、全体として線維状あるいは塊状の様相を 呈していた。今回の研究で形成されたマウスの100nm 周期細線維の周期は実際のところ、85~110nmの周期 性を有しており、上述したヒト線維柱帯にみられた長 周期コラーゲンとはその周期性において若干の差異を 認めたものの、周期的に現われる電子密度の濃い帯の 間を細い線維が結んでいるといった微細構造において 両者は極めて類似していた。

### IV 考 按

ATP を含有する酸性の medium により37℃の条件 下で incubation を行なうと, マウスの角膜実質および 隅角部の細胞間質に, 通常の状態では認められること のない100nm 周期細線維が形成されてくることがわ



図6 ヒト線維柱帯にみられた long-spacing collagen. 100~120nm 周期で電子密度 の高い帯が認められ、その間を filament が結んだ形態をとっている(×30,000, bar は1µm).

かった. この100nm 周期細線維の形成は, ATP があっ ても medium が中性の場合は認められず(実験 5, 6), その形成に酸性条件が必要であることがわかっ た. 一方, ATP 無添加でも medium が酸性の条件下で incubation を行なった群では, わずかながら100nm 周 期細線維の形成が認められている(実験10, 12). これ は, incubate した組織中に含まれる ATP あるいはそ れに準じた物質が関与してその形成を促したものと考 えられる. また, 4 ℃の低温条件のもとで incubation を行なった群では ATP 添加, 無添加をとわず, incubation の時間を72時間に延長しても100nm 周期細線 維の形成はみられなかった. これより, この100nm 周 期細線維の形成にはなんらかの酵素反応が関与してい ることが示唆される.

100nm 周期細線維の形成は、もともと存在した線維 の前駆物質がATPの存在下、酸性および37℃の条件 で aggregation をおこしたものであろう。その前駆物 質としては、incubate していない組織のコラーゲン線 維周囲にみられた径6~7nm の有刺鉄線様 filament や diffuse に認められた短い filament などが考えられる が、今回の電子顕微鏡観察では認められなかったその 他の物質の可能性もある。

Bruns ら<sup>12</sup>はこの100nm 周期細線維の形成にVI型 コラーゲンがかかわっていることをモノクローナル抗 体をもちいた実験よりあきらかにしており,また,Linsenmayer ら<sup>13</sup>は径約10nm の細線維,すなわち'beaded filament'の構成成分に同じくVI型コラーゲンがあ ることを示している.一方,Zimmermannら<sup>14</sup>はヒト 角膜に関する生化学的検討からVI型コラーゲンが乾燥 重量において角膜の約1/4を占めていることを示し,さ らに,それが角膜実質に多く含まれていると述べてい る.これらの所見を総括すると,今回の実験でマウス 角膜実質にみられた100nm 周期細線維の形成におい てもVI型コラーゲンを含む前駆体がかかわっていると みなされる.

ヒトの線維柱帯で加齢とともに多く認められてくる 長周期コラーゲンと今回の実験で形成されてきた100 nm 周期細線維は微細構造において極めて類似した形 態をとっているものの,その周期において若干の差異 がみられた.この差に意味があるとすれば,それはヒ トおよびマウスの種差に由来するものとも考えられる が,固定による組織の収縮度の差かもしれない.現在, この差異の質的検討を行なっている.

ここで、両者を同一のものと考えれば、今回の実験

結果は,前眼部における細胞間質の加齢変化を検討す る上で興味深いてがかりを与えるものと思われる.

#### 献

文

- Iwamoto T, DeVoe AG: Electron microscopic studies on Fuchs' combined dystrophy. I. Posterior portion of the cornea. Invest Ophthalmol 10: 9-28, 1971.
- 2) 秋谷 忍,大島 崇,和田真知子: Fuchs' dystrophy に関する形態学的研究.日眼 82:887-899, 1978.
- Richardson TM: Corneal decompensation in Chandler's syndrome. A scanning and transmission electron microscopic study. Arch Ophthalmol 97: 2112–2119, 1979.
- Rohen JW, Witmer R: Electron microscopic studies on the trabecular meshwork in glaucoma simplex. Graefe's Arch Klin Exp Ophthalmol 183: 251-266, 1972.
- Rohen JW: Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. Ophthalmology 90: 758-765, 1983.
- 6) Lütjen-Drecoll E, Shimizu T, Rohrbach M, et al: Quantitative analysis of 'plaque material' in the inner- and outer wall of Schlemm's canal in normal- and glaucomatous eyes. Exp Eye Res 42: 443-455, 1986.
- 7) McDonald P, Jakobiec FA, Hornblass A, et al: Benign peripheral nerve sheath tumors (neurofibromas) of the lacrimal gland. Ophthalmology 90: 1403-1413, 1983.
- Barron LK, Feeney ML, Hogan MJ, et al: Electron microscopic studies of the human eye.
  I. Preliminary investigations of the trabeculas. Am J Ophthalmol 46: 27-35, 1958.
- Leeson TS, Speakmann JS: The fine structure of extracellular material in the pectinate ligament (trabecular meshwork) of the human iris. Acta Anat 46: 363-379, 1961.
- 10) Horstmann HJ, Rohen JW, Sanes K: Agerelated changes in the comparison of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. Mechanisms of Aging and Development 21, Elsevier, 121-136, 1983.
- 11) 平野耕治,栗屋 忍,小林身哉他:ヒト線維柱帯細 胞外マトリックスの年齢差についての定量的検 討. 眼紀 39:1680-1688, 1988.
- 12) Bruns RR, Press W, Engvall E, et al: Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: Identification by immunoelectron microscopy. J Cell Biol 103: 393

昭和63年12月10日

-404, 1986.

- 13) Linsenmayer TF, Bruns RR, Menzer A, et al: Type VI collagen: Immunohistochemical identification as a filamentous component of the extracellular matrix of the developing avian stroma. Developmental Biol 118: 425-431, 1986.
- 14) Zimmermann DR, Trueb B, Winterhalter KH, et al: Type VI collagen is a major component of the human cornea. FEBS Letters 197: 55-58, 1986.