眼内増殖組織のImmuno gold silver stainingによる光学顕微鏡的免疫組織化学（図4）

岡田　守生[1]・松村　美代[2]・白川　弘泰[1]
森　秀夫[1]・荻野　誠周[3]・本田　孔士[1]
1）京都大学医学部眼科学教室
2）兵庫県立尼崎病院眼科
3）愛知医科大学眼科学教室

Immunolightmicroscopic Study of Intraocular Proliferative Tissue Using Immuno-gold-silver Staining Method

Morio Okada[1], Miyo Matsumura[2], Hiroyasu Shirakawa[1], Hideo Mori[1], Nobuchika Ogino[3] and Yoshihito Honda[1]

1) *Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto Univeusity.*
2) *Department of Ophthalmology, Amagasaki Prefectural Hospital*
3) *Department of Ophthalmology, Aichi Medical University*

要　約

手術的に切除された網膜前後増殖膜で，免疫電子顕微鏡的にGFAP陽性であった10標本を対象に，IGSS法を用いて免疫光学顕微鏡的に観察し，GFAP陽性細胞の増殖膜内での分布を検討した．網膜前および網膜下増殖膜ともに，GFAP陽性細胞は，個個ばらばらに散在することはなく，また，全体に一定の密度で分布するのではなく，集団としてかたまって存在していた．IGSS法は，特定の種類の細胞の増殖膜全体での分布を調べるのに有力な方法であり，増殖膜の構造や成立基盤を検討する上で有用であると思われる．（日眼　92：330—335，1988）

キーワード：網膜前増殖組織，網膜下増殖組織，GFAP，IGSS，免疫組織化学

Abstracts

The distribution of GFAP positive cells in pre-and subretinal membrane of proliferative vitreoretinopathy was studied immunolightmicroscopically using the immuno-gold-silver staining (IGSS). GFAP positive cells were shown to exist in all 10 cases which had been shown to have GFAP-positive cells immunoelectronmicroscopically. These cells were never seen to be distributed sporadically through-out the membrane. The IGSS method is beneficial to investigate the distribution of specific types of cells in the proliferative membrane, and therefore is useful to study the fundamental construction of the membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 330—335, 1988)

Key words: preretinal proliferative tissue, subretinal proliferative tissue, GFAP, IGSS, immunohistochemistry

I　緒　言

網膜前後増殖膜の特徴を知ることは，増殖性硝子体網膜症の予防や治療の方法を探る第一歩であるが，ヒトの網膜前後増殖膜の研究材料は，治療のために手術的に切除されたものに限られ，当然ながら試料はきわめて微量である．そのため，これまで組織学的研究は主として電子顕微鏡的になされてきた[1)~8)]．これによ

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　（昭和62年9月25日受付）
Reprint requests to: Morio Okada, M.D.　Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.
53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan
（Accepted September 25, 1987）

り，増殖膜を構成する細胞の超微形態がわかり，さらに電顕的免疫組織学的手法を加えれば[9)10)]，個々の細胞の由来を推測できるが，観察視野が狭いため増殖膜の全体像や，細胞の分布状態がつかめないきらいがあった．少ない試料を電子顕微鏡用標本として包埋し，光学顕微鏡用切片と電子顕微鏡用切片を連続して作成し，両者に，同じ細胞を同定する免疫的手法を応用できれば，目的とする種類の細胞の超微構造とともに，その細胞の増殖膜内での分布を知ることができる．前回私達は，電子顕微鏡による免疫金コロイド法を用いて網膜前増殖膜に，神経膠細胞に特有の蛋白であるglial fibrillary acidic protein（GFAP）陽性細胞が関与していることを示した[10)]が，金コロイドの粒子が小さいために光学顕微鏡では観察できなかった．今回，同じ免疫電子顕微鏡用標本から免疫光学顕微鏡用切片を作成し，immuno gold silver staining（IGSS）法を用いることにより，光学顕微鏡的観察が可能となり，電子顕微鏡的観察と対比検討した．

II 対　象

手術的に切除した増殖性硝子体網膜症の網膜前後増殖膜で，電子顕微鏡的免疫金コロイド法でGFAP陽性であった10標本を対象とした．

III 方　法

1. IGSS法の原理

IGSS法は，免疫金コロイド法に銀増感を施行し，免疫電子顕微鏡用標本から光学顕微鏡的観察を可能にする方法である．組織抗原に対する一次抗体と，金コロイドに結合した二次抗体を目的とする組織抗原に対して順に反応させると，金コロイドは，二次抗体と一次抗体を仲介として組織抗原の部位に付着する．ついで銀増感処理を行うと金粒子の周囲に銀が析出し，抗原の存在部位が黒褐色に染色され，光学顕微鏡的観察が可能となる[11)]（図1）．今回は，GFAPに対する抗体を用いてIGSS法で染色した．

2. 試料の作成

切除された網膜前後増殖膜を，0.1%グルタールアルデヒドおよび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）を用いて室温で2時間固定した．PBSで洗浄し，0℃の50%エタノールで脱水した後，−35℃でエタノール系列の脱水を行い，Lowicryl K4M（Poralon Equipment Ltd. England）に包埋し，紫外線照射で重合した．対照としてヒト視神経を同様に処理して用いた．包埋した試料は，ウルトラミクロトーム（LKB-produckter AB Bromma Sweden）で薄切し染色した．

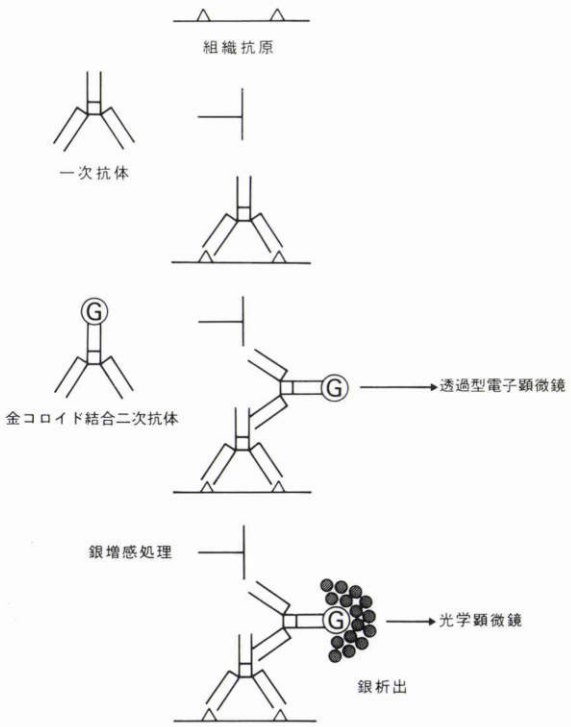
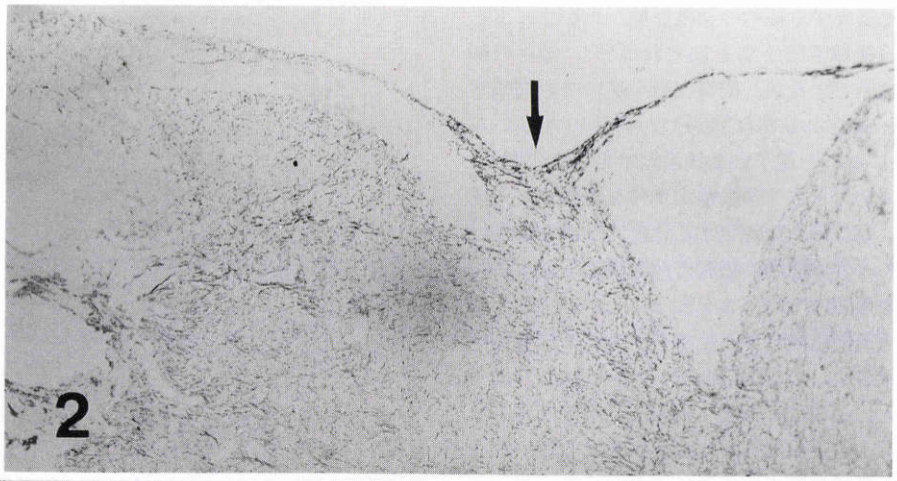


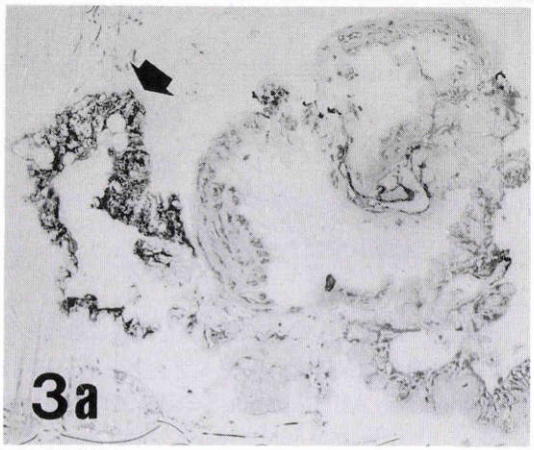
図1　IGSS法の原理

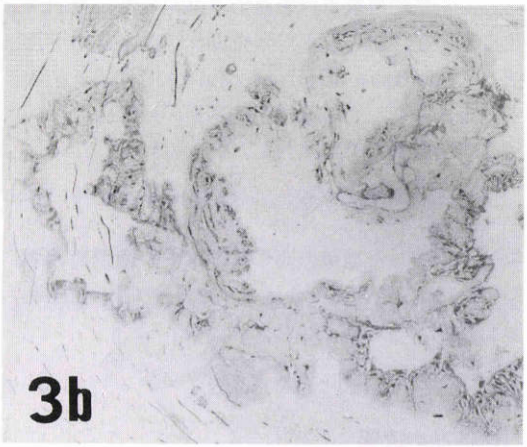
3. IGSS法

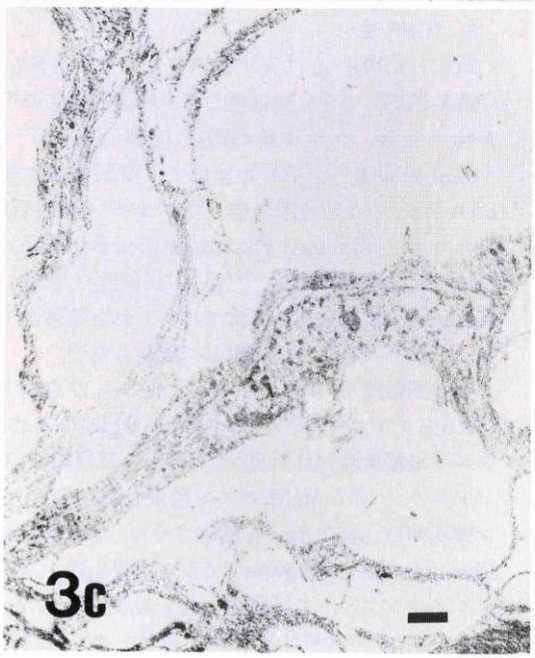
薄切した切片を，1%牛血清アルブミンを含むPBS（BSA-PBS）で5分間処理して非特異的反応の可能性を除いた後，ウサギ抗GFAP抗体（DAKO Corp. Santabarbara USA）を室温で1時間反応させた．BSA-PBSで3回洗浄の後，抗ウサギ—IgG抗体結合金コロイド（Janssen Pharmaceutica Belgium）と室温で1時間反応させた．PBSで3回洗浄した後，電子顕微鏡的免疫金コロイド法では，これを蒸留水で洗浄後，酢酸ウラニールで染色して鏡検した[10)]．

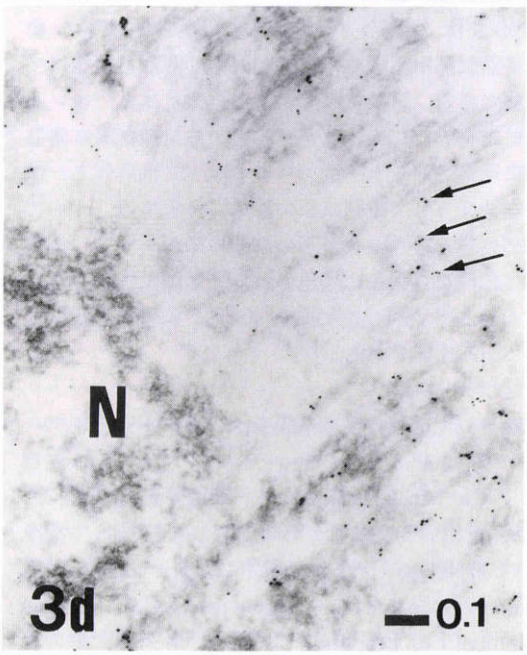
光学顕微鏡用，すなわちIGSS法には，ひき続き切片を2.5%グルタールアルデヒドで10分固定し，水洗後，クエン酸緩衝液（pH 3.85）で処理し，銀増感液（77mMヒドロキノン，5.5mMクエン酸銀を含む200mMクエン酸緩衝液（pH 3.85））を反応させた．定着液（Janssen Pharmaceutica Belgium）で反応を停止後，水洗し，トルイジンブルーで後染色を行い鏡検した．Negative controlは，一次抗体にかえて正常ウサギ血清を作用

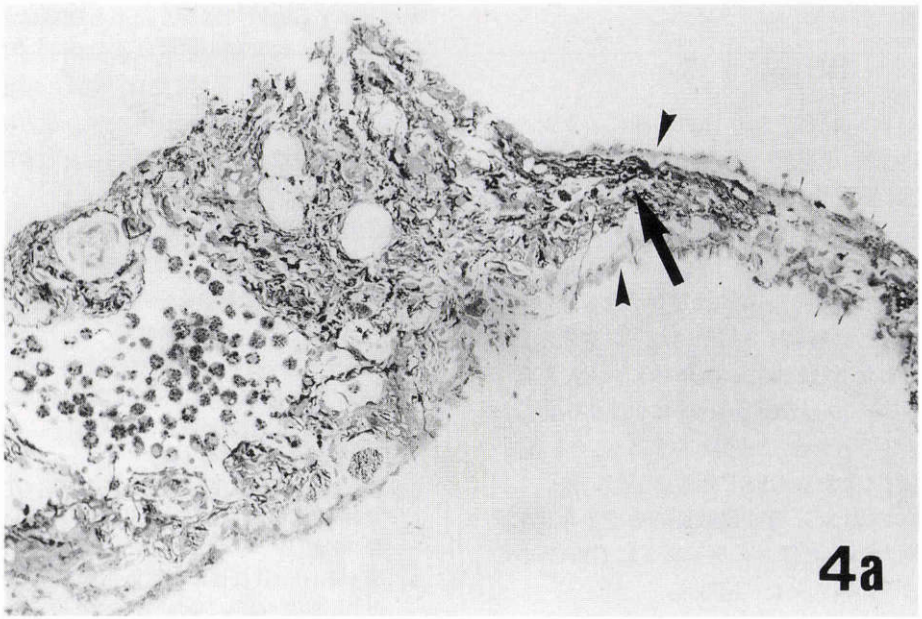

2

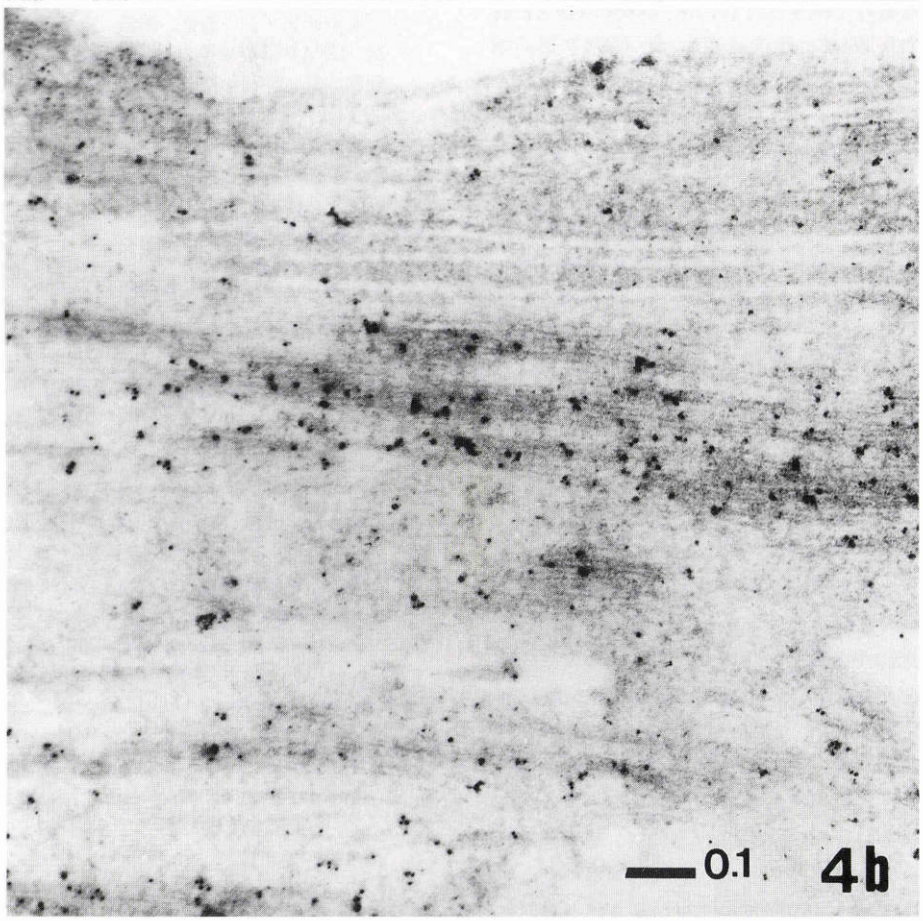

3a


3b


3c


N
3d
0.1


4a


0.1
4b

させ非特異的反応がないことを確認した．

IV 結　果

対照としたヒト視神経では，IGSS法により視神経のGFAP陽性細胞が褐色に染色された(図2)．一次抗体に代えて正常ウサギ血清を反応させたnegative controlでは，反応は全くみられなかった．

網膜前増殖膜のIGSS法の1例を図3に示した．GFAP陽性細胞は細胞質が褐色に染まって見え，増殖膜の中でばらばらに散在するのではなく，集団としてかたまって分布する(図3a)．一次抗体にかえて正常ウサギ血清を用いたnegative controlでは反応が見られず，褐色に染色された部分は認められない（図3b)．IGSS法で褐色に染まるGFAP陽性細胞は，長い突起を持った細胞で(図3c)，電子顕微鏡的免疫金コロイド法により細胞内の中間径フィラメントにGFAPの局在を示す金粒子がみられた（図3d)．

網膜下増殖膜の1例を図4に示す．外周にGFAP陰性の細胞があり，内部に褐色に染まったGFAP陽性細胞が集団を成していた(図4a)．褐色に染まった細胞を電子顕微鏡的金コロイド法で観察すると，細胞質内に中間径フィラメントの束をもち，これに沿ってGFAPの局在を示す金粒子が認められた（図4b)．

検索した10標本すべてにおいて，IGSS法で褐色に染まるGFAP陽性細胞は，増殖膜組織内で集団を成して存在し，個個ばらばらに存在することはなかった．

V 考　案

増殖性硝子体網膜症の増殖膜について，これまでの電子顕微鏡的観察[1)~8)]から膜を構成する細胞の候補があげられ，光顕的[12)13)]および電顕的[10)]免疫組織化学的方法により，神経膠細胞に特有の蛋白質であるGFAP陽性の細胞の関与が示された．しかし，得られる試料が微量であり，同じ試料から光顕および電顕両方の免疫組織学的検索を行うのはなかなか困難で，電顕的にGFAP陽性細胞が確認されても，その細胞の増殖膜内での配置配分がわかりにくく，全体像はつかみにくかった．IGSS法[11)]により免疫電顕用試料の光顕免疫組織学的観察が可能となり，電顕的にGFAP陽性が確認される細胞の，増殖膜内での分布が観察できるようになった．増殖膜内でGFAP陽性細胞は，個個ばらばらに散在することはなく，また，全体に一定の密度で分布するのではなく，集団としてかたまって存在していた．増殖膜では，それを構成する複数種の細胞が均等に分布するわけではなく，ある細胞はかたまって存在しており，増殖膜の組成は部位によって性質を異にすると考えられる．IGSS法は，特定の種類の細胞の増殖膜全体での分布を調べるのに有力な方法であり，増殖膜の構造や成立基盤を検討する上で有用であると思われる．

本研究は，文部省科学研究費一般A-61440075，およびC-62570798の援助を受けた．記して謝意を表する．なお，本論文の要旨は，第91回日本眼科学会総会において講演した．

図の説明

図2　ヒト視神経の抗GFAP抗体を用いたIGSS法(positive control)．GFAP陽性細胞が褐色に染色される．矢印は視神経乳頭部．90倍．

図3　網膜前増殖膜の1例．

3a　抗GFAP抗体を用いたIGSS法．GFAP陽性細胞が褐色に染色される(矢印)．トルイジンブルー染色，90倍．

3b　抗GFAP抗体にかえて正常ウサギ血清を用いたIGSS法．褐色に染色された部分は認められない．トルイジンブルー染色，90倍．

3c　GFAP陽性細胞の電子顕微鏡所見．GFAP陽性細胞は長い突起を持つ．4,500倍．

3d　GFAP陽性細胞の免疫電子顕微鏡所見．細胞内の中間径フィラメントに沿ってGFAPの局在を示す金粒子が認められる（矢印)．核（N）には金粒子の付着を認めない．60,000倍．

図4　網膜下増殖膜の1例．

4a　抗GFAP抗体を用いたIGSS法．増殖膜の内部の細胞が褐色に染色され（GFAP陽性）（矢印)，外周の細胞は染色されない(GFAP陰性）（矢頭)．180倍．

4b　GFAP陽性細胞の免疫電子顕微鏡所見．中間径フィラメントに沿ってGFAPの局在を示す金粒子が認められる．90,000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—7, 1977.

3) **Green WR, Kenyon KR, Michels RG,** et al: Ultrastructure of epiretinal membrane causing macular puckar after retinal reattachment surgery. Trans Ophthalmol Soc UK 99: 65—77, 1979.

4) **Kampik A, Kenyon KR, Michels RG:** Epiretinal and vitreous membrane. Comparative study of 56 cases. Arch Ophthalmol 99: 1445

—1454, 1981.

5) **Harada T, Chauvaud D, Pouliquen Y:** An electrone microscopic study of the epiretinal membrane of human eyes. Albrecht von Graefes. Arch Klin Exp Ophthalmol 215: 327—339, 1981.

6) **Trese M, Chandler DB, Machemer R:** Macular pucker II. Ultrastructure Graefes. Arch Klin Exp Ophthalmol 221: 16—26, 1986.

7) 松村美代, 山川良治, 吉村長久他：Subretinal strandの培養と組織学的検討. 日眼 90: 441—447, 1986.

8) **松村美代, 岡田守生, 山川良治他**：Epiretinal membraneの構成要素. 臨眼 40: 715—721, 1986.

9) **Yamashita H, Hori S, Masuda K:** Microfilament in preretinal membran cells of proliferative vitreoretinopathy. Jpn J Ophthalmol 29: 394—405, 1985.

10) **岡田守生, 松村美代, 山川良治, 白川弘泰, 吉村長久, 荻野誠周**：網膜増殖膜の免疫電子顕微鏡的検討. —Glial fibrillary acidic proteinについて—. 日眼 91: 657—664, 1987.

11) **Danscher G:** Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electron microscopy. Histochemistry 71: 81—88, 1981.

12) **大平明弘, 大島健司, 菊池昌弘**：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.

13) **Hiscott PS, Grieson I, Trombetta CJ,** et al: Retinal and epiretinal glia: An immunohistochemical study. Br J Ophthalmol 68: 698—707, 1984.

（第91回日眼総会原著）