

ヒト眼における球後視神経の細胞外マトリックス (図3)

福地 健 郎・岩 田 和 雄 (新潟大学医学部眼科学教室)

要 約

ヒト眼, 正常球後視神経における type I~V collagen, laminin, fibronectin の存在, 分布について biotin-streptavidin system を用いて免疫組織化学的に観察した. 間質コラゲンである type I 及び type III collagen は軟膜中隔, 軟膜, くも膜, 硬膜, 中心動静脈周囲の adventitia などの間質結合組織にびまん性に認められた. 一方, 基底膜の成分である type IV collagen 及び laminin は視神経線維束と軟膜, 軟膜中隔, adventitia との境界に線状に限局していた. また血管壁, くも膜も同様に染色された. type V collagen 及び fibronectin は間質結合組織と基底膜の両方に確認され, 従って前者と後者が複合したパターンで染色された. ただし fibronectin では基底膜組織での染色がより顕著であった. これらは視神経萎縮, 緑内障, その他視神経疾患における細胞外マトリックスの変化, 役割を理解する際の正常コントロールとなると考えられる. (日眼会誌 93: 962-968, 1989)

キーワード: ヒト眼, 球後視神経, 細胞外マトリックス, 免疫組織化学

Extracellular Matrix of the Human Retrobulbar Optic Nerve

Takeo Fukuchi and Kazuo Iwata

Department of Ophthalmology, Niigata University, School of Medicine

Abstract

The presence and distribution of laminin, fibronectin and type I through V collagens were determined in the human retrobulbar optic nerve using an immunohistochemical method, the biotin-streptavidin (B-SA) system. Type I and type III collagens, which were interstitial collagens, were detected diffusely within pial septa, pia mater, arachnoid membrane, dura mater and adventitia around the central retinal artery and vein. Type IV collagen and laminin, which were basement membrane materials, were localized linearly along the borders between optic nerve fascicles and pial septa, adventitia, pia mater. Also they were also stained in all vascular walls and the arachnoid membrane. Type V collagen and fibronectin were detected both in the interstitial connective tissues, diffusely, and in the basement membranes, linearly. Fibronectin was stained more intensively in the basement membranes than type V collagen. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 962-968, 1989)

Key words: Human eye, Retrobulbar optic nerve, Extracellular matrix, Immunohistochemistry

I 緒 言

近年, 眼科領域でも細胞外マトリックス^{1)~7)}が注目

されており^{8)~22)}, 既に視神経乳頭^{8)~12)}, 角膜¹⁴⁾¹⁵⁾, 網膜^{16)~20)}, 前房隅角⁸⁾²¹⁾²²⁾などについて各成分の分布, 局在, さらに眼疾患との関連について研究, 報告されて

別刷請求先: 951 新潟市旭町通一番町 新潟大学医学部眼科学教室 福地 健郎 (平成元年 6 月 8 日受付, 平成元年 7 月 14 日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Fukuchi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Niigata Univ., School of Med. Ichibancho, Asahimachidori, Niigata 951, Japan

(Received June 8, 1989 and accepted in revised form July 14, 1989)

いる。一方、球後視神経に関して存在成分についての報告⁸⁾¹³⁾はあるが、詳細な局在についての報告¹⁸⁾や視神経疾患における変化、役割についての研究はわずかである。

今回、私達は手術的眼球摘出を行った61歳人眼球後視神経の細胞外マトリックス、特に type I~V collagen, laminin, fibronectin の分布について酵素抗体法染色を用いて光学顕微鏡的に観察した。これは球後視神経に関する組織学的研究のひとつであり、各種視神経疾患における細胞外マトリックスの変化について研究する際の正常コントロールとして意義あるものと考えここに報告する。

II 実験方法

実験には右眼脈絡膜悪性黒色腫の疑いで眼球摘出術を行われた61歳女性の眼球を用いた。

眼球は手術的摘出後、0.1M phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、球後1.0mmの部位で視神経を切断、それより後方を球後視神経部として今回の観察に用いた。組織は未固定のまますみやかにプラスチック製包埋皿に入れO.C.T. compaund (ともにTISSUE-TEK社)を加えた後、 -70°C チオペンタン中で急速凍結包埋した。包埋後 -70°C フリーザー中で保存した。酵素抗体法染色はSTRAVIGEN Immunohistology Kit (BioGenex Laboratories社)によるbiotin-streptavidin (B-SA) Systemで行った。Microtome-Cryostat (INTERNATIONAL EQUIPMENT社)を -20°C に設定し、厚さ $6\sim 8\mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。切片はあらかじめ0.01%poly-L-lysine (Sigma社)を塗布したスライドガラスに張り付けた。 -20°C の冷アセトンにて5分間固定、風乾した後に0.01M PBSにて洗浄した。以下の処理はすべて室温下の湿室内で行った。まず内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのために3% H_2O_2 で5分間、非特異的結合のブロッキングのために5%normal goat serumで30分間処理した。

一次抗体としてはrabbit anti (bovine) type I collagen (1 : 600), rabbit anti(bovine)type II collagen (1 : 400), rabbit anti(bovine)type III collagen (1 : 800), rabbit anti (bovine) type IV collagen (1 : 1000), rabbit anti (human) type V collagen (1 : 600), rabbit anti(mouse) laminin (1 : 1500), rabbit anti (mouse) fibronectin (1 : 1200) (以上すべてAD-VANCE社)のpolyclonal antibodyを用いた、以

上の一次抗体を90分間反応させた。negative controlとして非標識 normal rabbit serumを用いた。つづいて二次抗体 (biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin), さらにに標識試薬 (horseradish peroxidase labelled streptavidin) をそれぞれ40分間反応させた。発色はDAB (diaminobentidin) もしくはAEC (3-amino-9-ethylcarbazol)で行った。一部の切片はヘマトキシリンで対比染色を行った。クリスタルマウント (Biomeda社)で封入した後、光学顕微鏡で観察した。

III 結果

今回の標本で酵素抗体法による細胞外マトリックスの染色は視神経横断面の各部で認められた。DABで発色した切片は褐色に、AECで発色した切片は赤色に染色された。球後視神経に関して、新鮮凍結包埋、切片作製後に冷アセトン固定を行った標本では、各種一次抗体、BSA systemでの反応は良好であったが、切片の形態保持の点で多少問題があった。全体を通じ type I collagen と type III collagen (図1), type IV collagen と laminin (図2), type V collagen と fibronectin (図3)はそれぞれ類似した染色パターンを示していた。type II collagen はいずれの部位にも有意の染色像は認められなかった。コントロールとして用いた非標識 normal rabbit serum に対する有意の染色像も認められなかった (図3)。

(1) type I collagen (図1A), type III collagen (図1B, C)

視神経線維束の間隙である pial septum にびまん性の染色が認められた (図1A, C)。さらに pia mater, arachnoid, dura mater (図1B)、網膜中心動静脈周囲の adventitia などほぼ同様の濃度でびまん性に染色された。網膜中心動静脈、視神経周囲結合組織内の血管などもそれをとるまくようにびまん性に染色された。

(2) type IV collagen (図2A, B, C), laminin (図2D)

視神経線維束と pial septum との境界部に線状の染色が認められた (図2A, B)。この染色は視神経線維束を完全に取り囲んでおりどの部位にも例外なく認められた。視神経の周辺部の pia mater との境界に同様の染色が認められ、これらの成分が pia mater 中に突出している像が認められた (図2B)。pial septum の結合組織そのものには染色が認められず、pial septum 内では血管の周囲にのみ染色が認められた。視神経線維

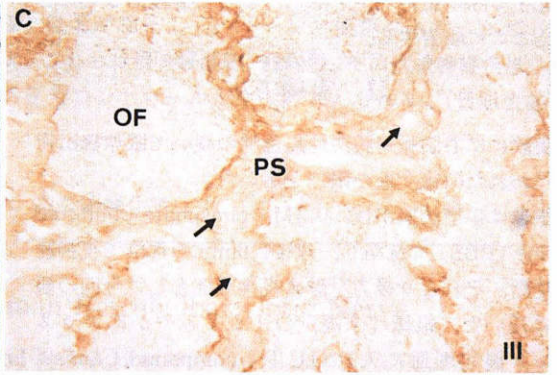
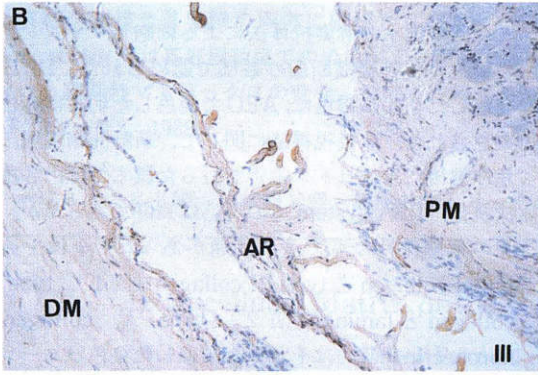
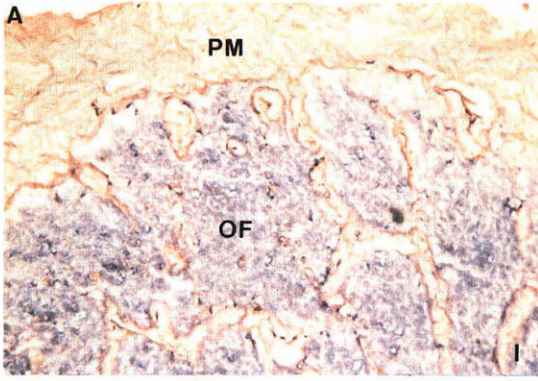


図 1

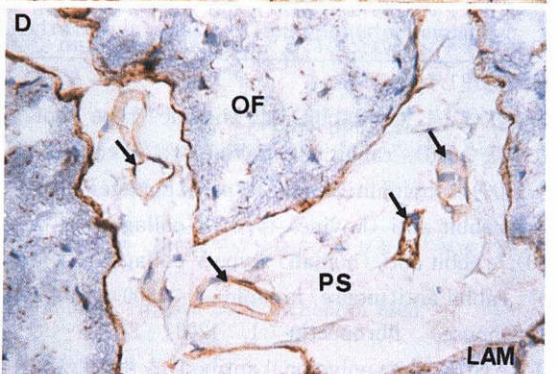
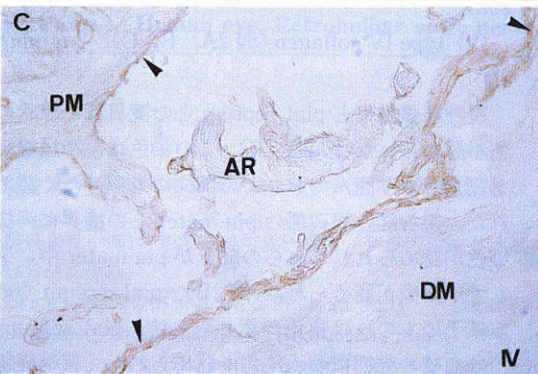
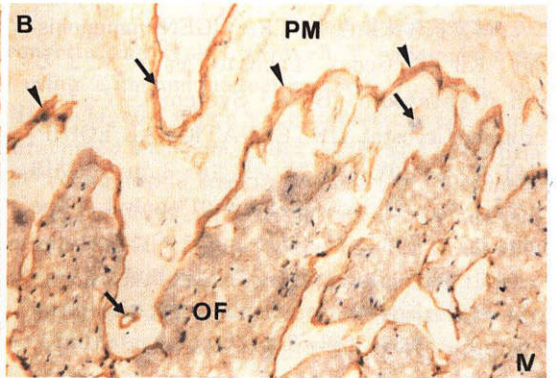
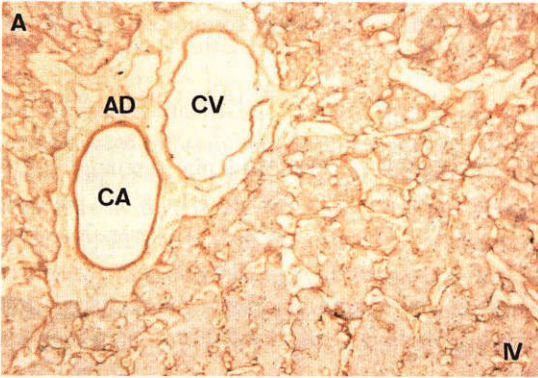


図 2

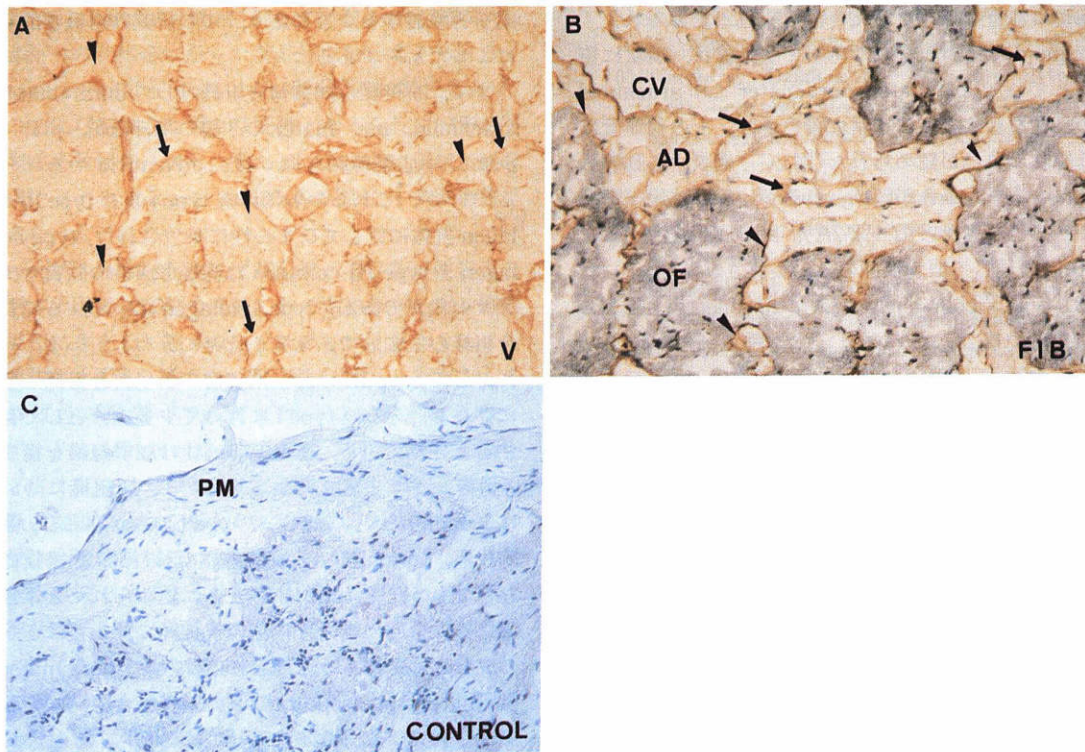


図 3

図 1A 〔視神経周辺部, type I collagen, AEC, 対比染色 (+), $\times 20$] pia septum, pia mater がびまん性に赤く染色されている。B 〔視神経周辺部, type III collagen, DAB, 対比染色 (+), $\times 33$] pia mater, arachnoid, dura mater の 3 層の視神経鞘はいれずもびまん性に染色されている。C 〔視神経内, type III collagen, DAB, 対比染色 (-), $\times 100$] pia septum 全体がびまん性に染色されている。血管周囲 (\rightarrow) もほぼ同様の濃度で染色されている。

図 2A 〔視神経中央部, type IV collagen, DAB, 対比染色 (+), $\times 20$] 視神経線維束と pia septum 及び中心動脈周囲の adventitia (AD) との境界が線状に染色されている。中心動脈 (CA), 中心静脈 (CV) の周囲も染色されているが中心動脈により強い。B 〔視神経周辺部, type IV collagen, DAB, 対比染色 (+), $\times 100$] 同様に視神経線維束 (OF) と pia septum, pia mater (PM) との境界が線状に染色されている。この染色が pia mater 内に突出した部分 (\blacktriangle) が見られるが Cohen の “pale subsurface fillet” に一致した染色と考えられる。pia mater, pia septum 内の血管 (\rightarrow) も染色されている。C 〔視神経周辺部, type IV collagen, DAB, 対比染色 (+), $\times 33$] pia mater (PM) と dura mater (DM) は arachnoid (AR) 側の表面がともに線状に染色されている (\blacktriangle)。arachnoid はその表面を被われるように染色が認められる。D 〔視神経内, laminin, DAB, 対比染色 (+), $\times 100$] type IV collagen と同様に視神経線維束 (OF) と pial septum (PS) と境界が線状に染色されている。pia septum 内の血管 (\rightarrow) も染色されている。

図 3A 〔視神経内, type V collagen, DBA, 対比染色 (-), $\times 20$] pia septum がびまん性に染色されている (\blacktriangle)。type I, III collagen に比べ視神経線維束との境界により染色が強い傾向が見られる (\rightarrow)。B 〔視神経内, fibronectin, DAB, 対比染色 (+), $\times 50$] type V collagen と類似し pia septum や adventitia (AD) はびまん性に染色され、さらに視神経線維束との境界 (\blacktriangle) 及び中心静脈 (CV) を始め血管周囲 (\rightarrow) がより強く染色されている。C 〔視神経周辺部, control, DAB, 対比染色 (+), $\times 33$] 非標識 normal rabbit serum に対してはいずれの部位にも染色像は認められなかった。(OF; optic nerve fascicules, PS; pia septum, PM; pia mater, AR; arachnoid, DM; dura mater, AD; adventitia, CA; central artery, CV; central vein)

束内には血管に伴うと考えられる染色が認められた。arachnoidでは周囲を取り巻くように線状、輪状に染色されていた。pia mater, dura materではarachnoid側の表面を被うように線状に染色され、その他血管に伴う線状の染色が認められた(図2C)。網膜中心動静脈周囲にも濃厚な染色が認められるが、静脈に比べ動脈により染色が強かった(図2A)。adventitia内もpial septumと同じく血管周囲のみが染色された。

(3) type V collagen (図3A), fibronectin (図3B) 前二者の複合したパターンで染色された。つまりpial septum, pia mater, arachnoid, dura mater, adventitiaなどの間質組織はびまん性に染色され、それに加えて視神経線維束とpial septum, pia materの境界部、各部における血管周囲がより強く線状に染色されていた。網膜中心動静脈の周囲もtype IV collagenなどと同様に染色されたがやはり動脈が静脈にくらべより濃厚であった。ただし、type V collagenではびまん性染色の傾向が強くなり、一方fibronectinについては線状の染色が顕著であるという点で多少違いが認められた。

IV 考 案

細胞外マトリックスは生体の細胞集団または遊離細胞の間隙を満たす様々な巨大分子の集合体であり、組織の硬度や弾性を規定し、組織の構造の維持のみならず細胞の生存環境を提供し、細胞の分化や増殖に影響を与えるものとされている¹¹⁻⁵⁾。現時点で細胞外マトリックスの成分としてはtype I~XII collagen, laminin, fibronectin, elastin, vitronectin, tenascin, glucosaminoglycanなどが知られているが、これらは大きく線維成分を構成するcollagenとelastin、いわゆる無構造物質として認められるproteoglycan、及びfibronectin, lamininなどの糖蛋白質に分けられる⁴⁾⁵⁾。近年、細胞外マトリックスに関する研究の進歩に伴い臨床の分野でも各種疾患における変化、役割などについて盛んに研究されている。眼科領域でも既に角膜^{14)15)17)~19)}、網膜^{16)~20)}、視神経乳頭^{8)~12)}、前房隅角⁸⁾²¹⁾²²⁾などで、その局在、分布さらに各種眼疾患との関係について研究が行われている。私達は今回ヒト眼球後視神経の細胞外マトリックスの分布、局在について光顕的に観察した。視神経の構造に関しては既にCohen²³⁾、Andersonら²⁴⁾²⁵⁾らによって電顕レベルの微細構造まで詳細に観察されている。今回の目的は細胞外マトリックスの分布という観点から球後視神経の構

造を再検討することであり、この研究は組織学的見地によったものである。

まず、視神経の間質結合組織としてdura mater, arachnoid, pia materの3層の視神経鞘, pial septum, 中心動静脈を取り巻くadventitiaがあげられる^{23)~26)}が、これらの各層は抗type I及びtype III collagen抗体に対してびまん性に染色された。type I collagenとtype III collagenは線維形成性間質コラーゲンの代表である。type I collagenはいわゆる間質結合組織の主成分であり広く全身に分布している。それに対してtype IIIは胎生期皮膚や新生結合組織に豊富に存在し、その他type Iに伴って少量成分として存在するとされている。またtype IIIは細網線維を構成するコラーゲンと考えられている¹⁾²⁾³⁾。眼組織についてはKonomiら¹³⁾は強膜にはtype Iのみが存在し、強膜篩状板, dura materと眼球外壁の移行部、脈絡膜血管などでtype Iとtype IIIがともに認められたと報告している。今回の結果では球後視神経に関してはどちらの成分についてもその局在に差はなく、dura mater, pia mater, pial septumなどの間質結合組織は等しく染色されていた。間質コラーゲンの一つであるtype II collagenは全身的には主に軟骨に存在²⁾³⁾し、眼組織に関してSwanら²⁷⁾はbovineの硝子体中に存在することを報告している。今回の結果では視神経内のいずれの部位にもtype II collagenに対する染色は確認されなかった。

一方、type IV collagenは基底膜コラーゲンとして、またlamininは基底膜を構成する糖蛋白質の一つとして知られている²⁾⁴⁾⁶⁾。電顕的には前者が基底膜全体に存在のに対して、後者はlamina lucidaに局在する点で多少異なるとされている²⁾が、光顕的観察ではその判別は不可能で今回の観察ではほぼ同様の染色像が得られた。まず特徴的なのは視神経線維束とpia mater, pial septum, adventitiaなどの間質結合組織との境界に沿って線状の染色が認められた。nerve tissue及びoligodendrogliaは結合組織や血管との間にastrocyteの突起が存在している。このastrocyteはnerve tissue, oligodendroglia側にはbasement membraneを持たず、それに対して結合組織、血管との境界にはbasement membraneを持っている。この境界部はneuroectoderm-mesoderm junctionと呼ばれている²⁰⁾²²⁾がこの基底膜成分が線状に染色されたものと考えられる。特に視神経周辺部のpia materとの境界部にはこれらの成分の突出した像が認められ、Cohen¹⁹⁾

の“pale subsurface fillet”と呼ばれる astroglia の pia mater への突出部に沿った基底膜成分と考えられる, pia mater, pial septa, adventitia 自身は染色されず, その中に存在する血管の基底膜と考えられる円形の染色像が多数観察された. また arachnoid は線状, 輪状に染色され meningeal cell の基底膜に対する染色と考えられた.

type V collagen はまず基底膜への存在が報告されたが, 実際には細胞の表面, 他の型のコラーゲン線維の周囲に存在し, 様々な結合組織に広く分布することが報告され²⁾現在では type I, III collagen などとともに線維性の間質コラーゲンの一つと考えられている¹⁵⁾. 一方, fibronectin は基底膜, 細胞表面, 血漿中など広く存在しており, 主に細胞相互, 細胞と基質の組織の接着の役割を果たしていることが推定されている²⁴⁾. 今回の観察ではこれら二つの成分に関しては共に結合組織ではびまん性に染色され, さらに基底膜では線状に染色が強調された像が得られた. 間質結合組織に広く分布するのに加え基底膜にも存在するという点で類似しているためと考えられた. ただし, type V collagen では間質結合組織に対するびまん性の染色が強いものに対して, fibronectin は基底膜組織に対する線状の染色がより強い点で多少異なっていた. fibronectin に関して, 中枢神経系では major component ではない⁷⁾とされているが, 視神経乳頭部で sclera などの間質結合組織でも認められたとの報告⁹⁾があり, また視神経について蛍光抗体法で検出した報告¹⁸⁾とほぼ同様であることから今回の結果は妥当なものと考えている.

ただし, 今回の実験に用いた一次抗体に関して, 特に type VI~XII collagen との cross-reaction については検討されていない. 今後この点についても確認し, さらに type VI~XII collagen についてもその分布, 局在を検討の予定である.

擲筆にあたり写真作製等で御協力いただきました荒本幸雄技官に深謝いたします.

文 献

- 1) Hay ED: Extracellular Matrix. J Cell Biol 91: 205-223, 1981.
- 2) 梶川欽一郎: 結合組織. 東京, 金原出版, 1-8, 131-236, 279-382, 1984.
- 3) 畑隆一郎: コラーゲン—その機能と代謝—. 蛋白質・核酸・酵素 31: 29-52, 1986.
- 4) 梶川欽一郎他: 特集 細胞外マトリックス. 生体の科学 39: 258-314, 1988.

- 5) 板倉照好他: 特集 細胞外マトリックスの動的機能. 細胞工学 8: 13-68, 1989.
- 6) Timple R, Dziadek M: Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. Int Rev Exp Pathol 29: 1-112, 1986.
- 7) Liesi P: Laminin and fibronectin in normal and malignant neuroectodermal cells. Med Biol 62: 163-180, 1984.
- 8) Rehnberg M, Ammitzböll T, Tengroth B: Collagen distribution in the lamina cribrosa and the trabecular meshwork of the human eye. Br J Ophthalmol 71: 886-892, 1987.
- 9) Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, et al: Extracellular matrix of the human optic nerve head. Am J Ophthalmol 102: 139-148, 1987.
- 10) Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, et al: Extracellular matrix of the human lamina cribrosa. Am J Ophthalmol 104: 567-576, 1987.
- 11) Morrison JC, Jerdan JA, L'Hernault NL, et al: The extracellular matrix composition of the monkey optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1141-1150, 1988.
- 12) Morrison JC, L'Hernault NL, Jerdan JA, et al: Ultrastructural location of extracellular matrix components in the optic nerve head. Arch Ophthalmol 107: 123-129, 1989.
- 13) Konomi H, Hayashi T, Sato H, et al: Immunohistochemical localization of type I, III, and IV collagens in the sclera and choroid of bovine, rat, and normal and pathological human eyes. Biomed Res 4: 451-458, 1983.
- 14) Zimmerman DR, Fischer RW, Winterhalter KH, et al: Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. Exp Eye Res 46: 431-442, 1988.
- 15) Limsenmayer TF, Fitch JM, Mayne R: Extracellular matrices in the developing avian eye: Type V collagen in corneal and noncorneal tissues. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 41-47, 1984.
- 16) Jerdan JA, Glaser BM: Retinal microvessel extracellular matrix: An immunofluorescent study. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 194-203, 1986.
- 17) Sramek SJ, Wallow IHL, Bindley C, et al: Fibronectin distribution in the rat eye. An immunohistochemical study. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 500-505, 1987.
- 18) Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, et al: Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. Invest Ophthalmol

- Vis Sci 28 : 506—514, 1987.
- 19) **Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, et al** : Alterations in the distribution of fibronectin and laminin in the diabetic human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 28 : 515—521, 1987.
 - 20) **Canpochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM** : The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 27 : 1615—1621, 1986.
 - 21) **Rodrigues MM, Katz SI, Foidart JM, et al** : Collagen, factor VIII antigen, and immunoglobulins in the human aqueous drainage channels. Ophthalmology 87 : 337—345, 1980.
 - 22) **Murphy CG, Yun AJ, Newsome DA, et al** : Localization of extracellular proteins of the human trabecular meshwork by indirect immunofluorescence. Am J Ophthalmol 104 : 33—43, 1987.
 - 23) **Cohen AI** : Ultrastructural aspects of the human optic nerve. Invest Ophthalmol Vis Sci 6 : 294—308, 1967.
 - 24) **Anderson DR, Hoyt WF, Francisco S** : Ultrastructure of intraorbital portion of human and monkey optic nerve. Arch Ophthalmol 82 : 506—530, 1969.
 - 25) **Anderson DR, Francisco S** : Ultrastructure of meningeal sheaths. Arch Ophthalmol 82 : 659—674, 1969.
 - 26) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE** : The Optic Nerve, in Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE (eds) : Histology of the Human Eye. Philadelphia, WB Saunders Co, 571—605, 1971.
 - 27) **Swan DA, Constable IJ, Harper E** : Vitreous structure. III. Composition of bovine vitreous collagen. Invest Ophthalmol Vis Sci 11 : 735—738, 1972.
-