

正常猿眼における視神経篩状板・細胞外マトリックスの 免疫組織化学的分析

福地 健郎

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

正常猿眼視神経篩状板の細胞外マトリックス, 特に collagen type I~VI, laminin, fibronectin, α -elastin の分布・局在について biotin-streptavidin system を用いて免疫組織化学的に観察した. collagen type I 及び type III は強膜に連続し, 篩状板の laminal beam がびまん性に染色された. 中心血管周囲の adventitia にも連続しておりこの部もやはりびまん性に染色された. collagen type IV 及び laminin は篩状板では laminal beam の縁に沿って線状に存在し, また beam 内の血管も ring 状に染色された. collagen type V, VI, fibronectin は type III などと同様, 篩状板の beam にびまん性に存在したが, beam の縁や血管に線状の強い染色を伴っていた. α -elastin は glial column, laminal beam 内に視神経線維を横切るように細かい band 状に豊富に認められた. これらの結果から細胞外マトリックスの collagen を始めとする蛋白成分の分布・局在に関して, 既報の人眼と猿眼で差は認められず質的に同一であると考えられた. (日眼会誌 94:1024-1030, 1990)

キーワード: 猿正常眼, 視神経篩状板, 細胞外マトリックス, 免疫組織化学, コラーゲン

Extracellular Matrix of the Optic Nerve Lamina Cribrosa in the Normal Monkey Eyes

Takeo Fukuchi

Department of Ophthalmology, Niigata University, School of Medicine

Abstract

The presence and distribution of collagen type I through VI, laminin, fibronectin and alpha-elastin were demonstrated in the normal monkey optic nerve lamina cribrosa, using a immunohistochemical method, the biotin-streptavidin (B-SA) system. Interstitial collagens, collagen type I and III, were detected diffusely within laminal beams continuously with surrounding sclera. The adventitia around the central artery and vein, and pial septa were also stained with collagen type I and III. Collagen type IV and laminin, which were basement membrane materials, were localized linearly along the margin of the laminal beams, pial septa and adventitia. They were also stained in all vascular walls. Collagen type V, VI and fibronectin were similar with collagen type I and III, but their linear staining was more intense onto the margin of the laminal beams and the pial septa. Rich immunoreactivity for alpha-elastin was found in the glial columns and the laminal beams. The

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2年1月24日受付, 平成2年3月6日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Fukuchi, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine.

Ichibancho, Asahimachidōri, Niigata 951, Japan

(Received January 24, 1990 and accepted in revised form March 6, 1990)

presence and distribution of the structural protein components of the ECM of the monkey optic nerve lamina cribrosa was the same as that previously reported in human. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 1024-1030, 1990)

Key words: Normal monkey eye, Optic nerve lamina cribrosa, Extracellular matrix, Immunohistochemistry, Collagen

I 緒言

近年、細胞外マトリックス^{1)~4)} (extracellular matrix: 以下 ECM と略す) が注目されている。既に眼組織に関しても角膜⁵⁾⁶⁾、網膜⁷⁾⁸⁾、前房隅角⁹⁾¹⁰⁾、視神経乳頭^{11)~21)}への各成分の分布、また各種疾患との関連などが報告されており、我々も人眼の球後視神経でその分布・局在について報告した²²⁾。このうち lamina cribrosa の ECM は組織学的な興味だけでなく、ECM の特に組織構造の維持という機能との関連から緑内障性視神経障害との関係が注目されている。

今回、私達は monkey eye の lamina cribrosa における ECM, 特に collagen type I~VI, laminin, fibronectin, α -elastin の分布、局在を酵素抗体法を用いて免疫組織化学的に観察した。これは視神経乳頭の構築に関する組織学研究のひとつであり、primate の実験緑内障、実験的視神経萎縮眼などにおける ECM の変化や意義を追求する際の正常コントロールとなる。

II 実験方法

実験にはカニクイサル (cynomorgous monkey) 3頭3眼、日本猿 (Japanese monkey) 2頭2眼を用いた。各 material の年齢などに関する情報は不明である。眼球摘出後、0.1M phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、球後1.0mm の部位で視神経を切断、さらに眼球から視神経乳頭部のみを切り出し今回の実験に用いた。組織は未固定のまま速やかにプラスチック製包埋皿に入れ O.C.T. compound (ともに TISSUE-TEK CO.) を加えた後、液体窒素に浸したイソペンタン中で急速凍結包埋した。Microtome-Criostat (INTERNATIONAL EQUIPMENT 社) の庫内を -20°C に設定しておき、ただちに厚さ6~8 μm 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, U.S.A.) を塗布したスライドガラスに張り付けた。スライドガラスはケースに入れ、密封し -70°C の超低温フリーザー中で保存した。

酵素抗体法染色は既報に準じ STRAVIGEN Immunohistology Kit (BioGenex Laboratories 社, U.S.A.) による Biotin-Streptavidin (B-SA) system で行った。 -20°C の冷アセトンで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い、また各処置後の洗浄は0.01M PBSで5分間、3回ずつ行った。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) collagen type I (1:200), rabbit anti (bovine) collagen type II (1:400), rabbit anti (bovine) collagen type III (1:800), rabbit anti (bovine) collagen type IV (1:1000), rabbit anti (human) collagen type V (1:600), rabbit anti (mouse) laminin (1:1500), rabbit anti (mouse) fibronectin (1:1200) (以上 ADVANCE 社, 東京), rabbit anti (human) collagen type VI (1:1000) (以上 Cemicon 社, U.S.A.), rabbit anti (human) α -elastin (1:500) (Elastin Product 社, U.S.A.) の polyclonal antibody を用いた。これらの抗体の特異性の検定はそれぞれ Ouchterlony 法で行った。

以上の一次抗体をいずれも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), 標識試薬 (streptavidin labeled peroxidase) 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-ethylcarbazole) で行い、一部の切片では対比染色をヘマトキシリンでおこなった。切片はクリスタルマウント (Biomedica 社, U.S.A.) で封入した後、光学顕微鏡で観察した。

III 結果

全体を通して collagen type I と III, 及び collagen type V, VI, fibronectin, さらに collagen type IV と laminin の間でそれぞれ互いに類似した染色像を示し

ていた。一方, collagen type II に対する染色はいずれの部位にも観察されなかった。また negative control として用いた非標識 nomal rabbit serum に対する染色も認められなかった (図 4c)。猿眼によって lamina

cribrosa の形態に個体差は認められたが、今回の研究の目的である ECM の分布という質的な点ではいずれも同一であり個体差は認められなかった。また日本猿とカンクイサルでは視神経乳頭の大きさという点で前

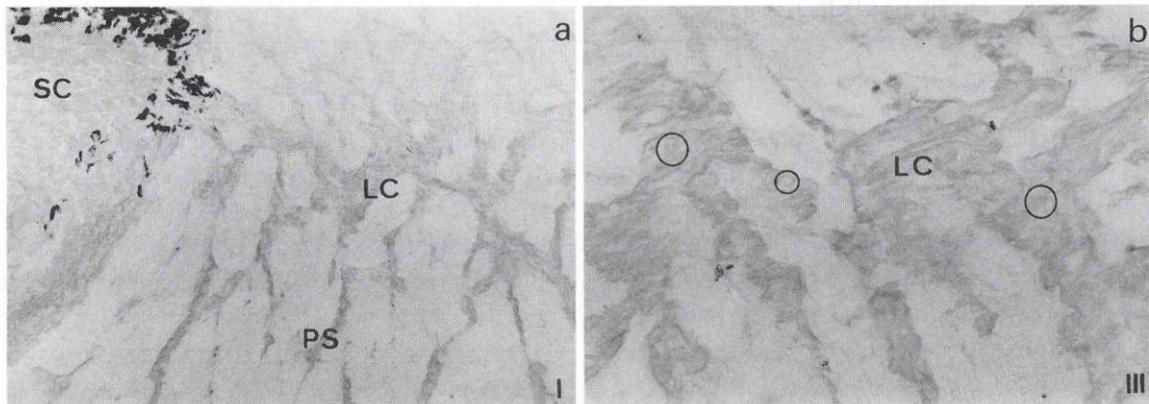


図1 a [collagen type I, DAB, ×50], b [collagen type III, DAB, ×100] . lamina cribrosa は周囲の sclera 及び後方の pial septa と連続しており、いずれもびまん性に染色されている(a)。lamina cribrosa は sclera を横切る方向にひだ状にびまん性に染色されている。血管は明瞭ではないがほぼ同様の濃度で染色され、いくつか確認できる (b)。 (○内)

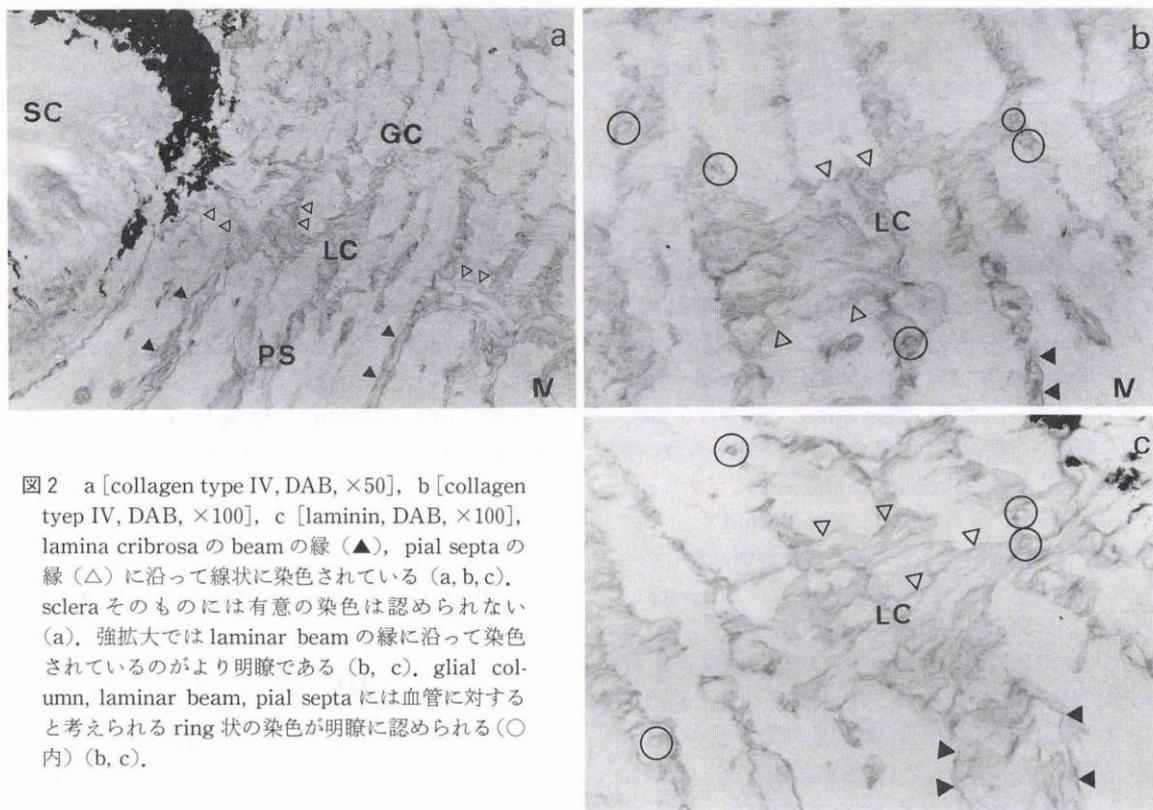


図2 a [collagen type IV, DAB, ×50], b [collagen type IV, DAB, ×100], c [laminin, DAB, ×100], lamina cribrosa の beam の縁 (▲), pial septa の縁 (△) に沿って線状に染色されている (a, b, c)。sclera そのものには有意の染色は認められない (a)。強拡大では laminar beam の縁に沿って染色されているのがより明瞭である (b, c)。glial column, laminar beam, pial septa には血管に対すると考えられる ring 状の染色が明瞭に認められる (○内) (b, c)。

者がより大きかったが、質的な差は認められなかった。

1. collagen type I (図1a), collagen type III (図1b)

両者は共に sclera でびまん性に染色され、それに連続して lamina cribrosa の beam が同様の濃度でびまん性に染色された。またこれらは pial septa や中心血管を取り巻く adventitia などと連続していた。強拡大ではいくつか血管と考えられる染色が確認できたが周囲の結合組織に比較し特に染色の濃度に差は認められなかった。

2. collagen type IV (図2a, b), laminin (図2c)

両者とも lamina cribrosa の beam そのものには染色は認められず、beam の縁に沿ってそれを取り巻くように線状に認められ、この染色は pial septa と nerve fiber bundle の境界に認められる線状の染色と

連続していた。また sclera との移行部では後方は pia mater と nerve fiber bundle の境界に認められる線状の染色、及び前方は Jacoby の境界組織縁の染色と連続していた。adventitia 表面の染色とも連続していた。また laminar beam, pial septa, adventitia, sclera などには ring 状の染色が認められ血管に対する染色と考えられた。また adventitia 内では細かい band 状の染色が認められた。

3. collagen type V (図3c), collagen type VI (図3a, b), fibronectin (図3d)

sclera, それに連続する lamina cribrosa, pial septa, adventitia, dura mater, arachnoid, pia mater などのいわゆる間質結合組織がびまん性に染色された。ただしこれらはいずれも lamina cribrosa の beam 縁や pial septa, adventitia と nerve fiber bundle との境界

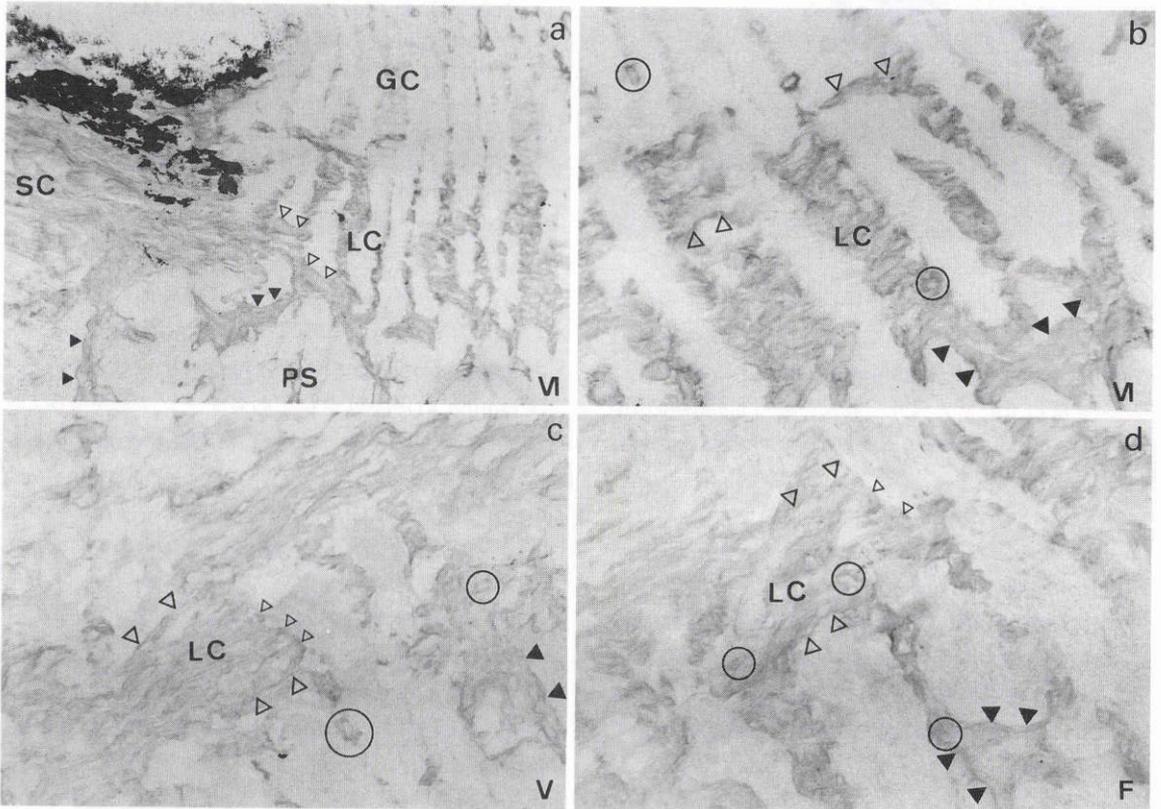


図3 a [collagen type VI, DAB, ×50], b [collagen type VI, DAB, ×100], c [collagen type V, DAB, ×100], d [fibronectin, DAB, ×100]. sclera はびまん性に染色されそれと連続して lamina cribrosa, pial septa もびまん性に染色されている (a)。しかし collagen type I, III と比べ laminar beam の縁 (▲), pial septa の縁 (△) に沿った染色はより強調されており optic nerve fiber bundle との境界が明瞭である (a, b, c, d)。血管と考えられる染色もより明瞭に認められる。b, c, d (○内)。fibronectin (F) ではよりびまん性の染色が強い傾向が認められた (d)。

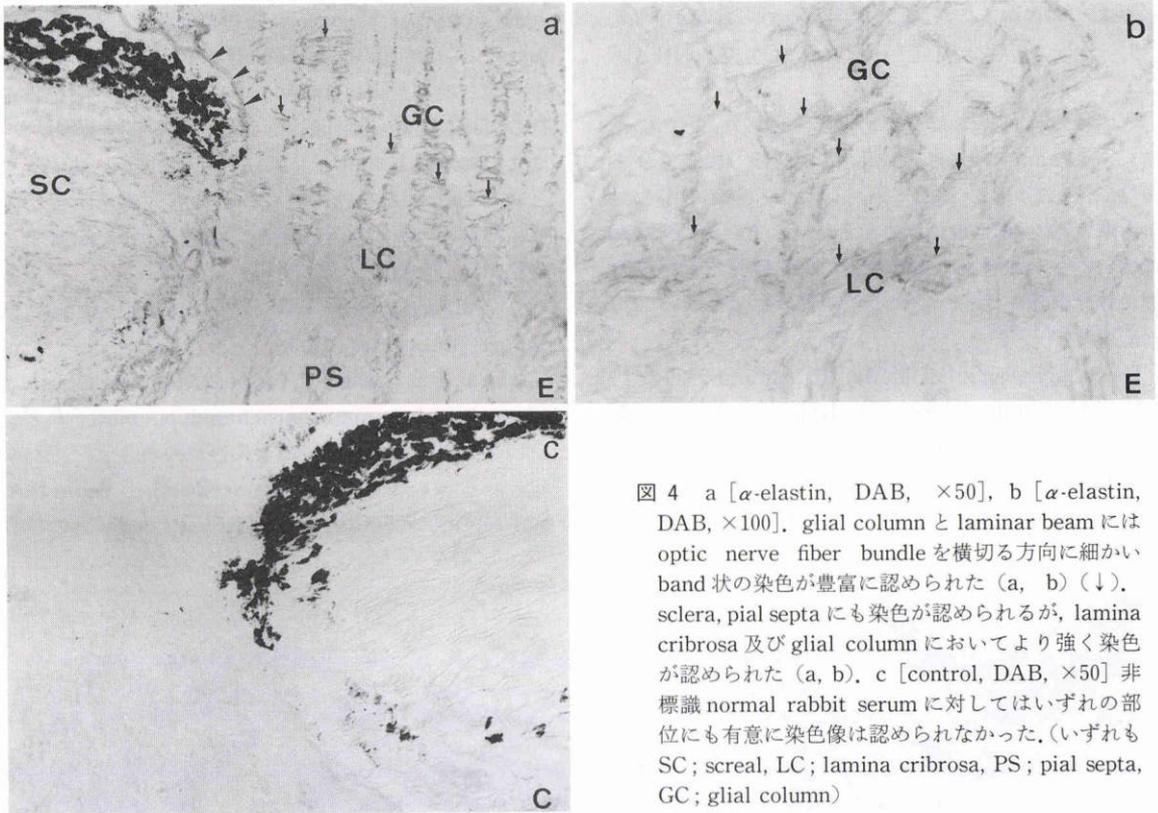


図4 a [α -elastin, DAB, $\times 50$], b [α -elastin, DAB, $\times 100$], glial column と laminar beam には optic nerve fiber bundle を横切る方向に細かい band 状の染色が豊富に認められた (a, b) (\downarrow). sclera, pial septa にも染色が認められるが, lamina cribrosa 及び glial column においてより強く染色が認められた (a, b). c [control, DAB, $\times 50$] 非標識 normal rabbit serum に対してはいずれの部位にも有意に染色像は認められなかった。(いずれも SC; sclera, LC; lamina cribrosa, PS; pial septa, GC; glial column)

などが明瞭に染色されまた血管に対すると考えられる ring 状の染色もより強く、従って collagen type, I, III と collagen type IV, laminin の両者が混合したパターンで染色されたと考えられた。ただし fibronectin に比較し、collagen type V, VI で線状の染色がより明瞭であった。

4. α -elastin (図 4a, b)

α -elastin に対する染色は glial column から lamina cribrosa に連続して optic nerve fiber bundle を横切る方向に細かい band 状に認められ、pial septa に移るとその染色は減少した。sclera や adventitia などにも同様に band 状の染色が認められた。sclera, pial septa に比較し laminal beam, glial column, adventitia での染色がより強かった。

IV 考 按

細胞外マトリックス (ECM) は生体の細胞間隙を満たす様々な巨大分子の集合体で、組織の硬度・弾性・柔軟性を規定し組織の構造を維持するとともに、細胞の生存環境を提供し細胞の分化・増殖に影響を与える

ものとされている¹⁾⁻⁴⁾。特に視神経乳頭の ECM に関しては緑内障性視神経障害との関連が重要で、なかでも lamina cribrosa が注目されている¹¹⁾⁻²¹⁾。その理由は lamina cribrosa 及びその各チャンネルを形成している ECM が眼球外へ向かう視神経線維束を機械的に、また機能的に支持していることから lamina cribrosa における ECM の成分・分布・密度などの個体差、病的変化などが、視神経そのものの眼圧に対する抵抗性の減弱とか、部位差、個体差を引き起こしている可能性が推定されるからである。

我々は既に人眼で ECM の lamina cribrosa における分布・局在について観察した²¹⁾が、今回は猿正常眼における ECM、特に collagen を始めとする structural protein 成分などの分布、局在について調べた。視神経乳頭の構造に関して猿眼は人眼とよく類似しており、緑内障による視神経障害に関する実験動物としてしばしば用いられている。今回の目的は ECM という観点から猿眼の lamina cribrosa の構造を免疫組織化学的に再検討することであり、また猿実験緑内障における ECM の変化を検討する際の正常コントロールとす

ることである。

これまでの研究^{11)~21)}によって adult human および mature primate の正常眼における細胞外マトリックス特に collagen type I~IV, laminin, α -elastin などの分布, 局在がほぼ明らかにされている。Hernandez による人眼¹¹⁾¹²⁾の, Morrison らの猿眼¹⁵⁾¹⁶⁾の報告, さらに今回の観察結果などの一致した所見として, 間質性コラーゲンである collagen type I, III は laminar beam と呼ばれる lamina cribrosa の個々の beam に存在し, 基底膜の構成成分である laminin, heparan sulfate proteoglycan, collagen type IV は laminar beam の縁, 及び血管に伴って存在すること, また lamina cribrosa には elastin が豊富に存在すること, collagen type II は視神経乳頭部には存在していないことなどが明かとなってきた。特に Hernandez らは collagen type IV, laminin などの基底膜成分が視神経線維を横切る方向に, 数層の連続した loose な膜状組織を形成し, これが elastin とともに組織に弾性を与えると考えている。従って, lamina cribrosa は基本的には硬度を与える collagen type I, III などの存在する間質性の層と弾性を与える collagen type IV, laminin などによって構成された基底膜性の層, さらに astrocyte などで構成された細胞成分の層が交互に重なり合って構成された複雑な組織であると考えられることができる。また laminar beam 及び glial column に α -elastin が豊富に確認されたのはこれまでの報告と同様で, 従って正常眼の lamina cribrosa を含む視神経乳頭部は眼圧の変化にある程度適応することが可能な組織構造であると考えられることができる。さらにこの研究では collagen type, V, type VI についても検討したが, lamina cribrosa では両者とも laminar beam そのものはびまん性に染色され, また beam の縁や血管と思われる部位に強い線状の染色が認められ, 従って collagen type I, type III と collagen type IV, laminin の二つのパターンが混合したパターンで染色された。これは Morrison ら, Goldbaum らの所見とほぼ同様である。一方, lamina cribrosa には fibronectin は存在しなかったという報告¹²⁾もあるが今回の結果では fibronectin に対する染色は collagen type V, type VI に類似しており, laminar beam や pial septa にはびまん性に認められ, また beam の縁や pial septa の境界部や血管周囲と考えられる部位により強調された染色を示していた。

lamina cribrosa の ECM に関して今回調べた成分

に関しては α -elastin の染色密度に差があった点を除けば, 他の間質結合組織, つまり sclera, dura mater, pia mater, pial septa, adventitia などとの間に構成成分上の差は認められなかった。Hernandez¹¹⁾は lamina cribrosa には collagen type IV が豊富に存在することから sclera などとは異なった中枢神経系の構造物であるだろうと述べているが, これは collagen type IV の存在部位に関する解釈の誤りと考えられる。lamina cribrosa の beam は血管を含む結合組織性の層板構造であって, glial cell がその周囲を取り巻き組織学的にその境界には必ず基底膜を伴っている^{23)~26)}。この astrocyte の基底膜はグリア境界膜と呼ばれ中枢神経系と中杯葉性間質組織の境界を形成している²⁷⁾と考えられており, この基底膜に collagen type IV および laminin が存在している。従って篩状板は軟膜中隔などの髄膜組織と同様に血管とともに後に侵入してきた中胚葉性組織の一つであると考えられる¹⁷⁾²⁷⁾²⁸⁾。

また以上の結果より, 猿正常眼の lamina cribrosa を ECM, 特に collagen を始めとする structural protein 成分という観点で, ヒト眼と比較した場合, 形態の差にとまなう量的な差はあるものの, 存在する成分やその分布・局在など質的な点では差は認められなかった。従って猿眼は ECM という点でも人眼とよく類似しており, 実験的緑内障の動物モデルとして適当と考えられた。

ただし今回の観察は厚さ 6~8 μ m の凍結切片を光顕レベルで観察したものである。従って本当にびまん性か, 本当に laminar beam の縁に線状に限局しているのか, また血管の染色に関してもこの部の血管が glial column, laminar beam, pial septa, adventitia に限局しており, 対比染色で確認した染色パターンが細かい ring 状の染色であるということから判定したが, 酵素抗体法染色のみの切片ではすべての血管を確認できるわけではなく, また血管のどの部分が染色されたのかなどの所見の確実性という点ではさらに検討が必要と考えている。lamina cribrosa は眼組織の中でもより微細で複雑な構造をしており, 猿眼は人眼と比べよりコンパクトで lamina cribrosa はよりファインである。従ってこれ以上の観察には免疫電顕法などの方法によって, より微細な構造と各成分の分布の関係を明らかにすることが必要と考えられ現在準備中である。さらに引き続いて type VII 以降の collagen や glycoprotein, proteoglycan などの ECM 成分の分布・局在,

それら ECM 成分の相互関係や相互作用という点に関して検討の予定である。

欄筆にあたり岩田教授の御指導、御校閲に深謝いたします。また写真等で御協力いただいた荒木幸夫技官、動物の飼育で御協力いただいた佐藤 弘技官にこの場を借り感謝いたします。

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—223, 279—382, 1984.
- 3) **梶川欽一郎**, 他: 特集, 細胞外マトリックス, 生体の化学 39: 258—314, 1988.
- 4) **Goldberg BD, Rabinovitch M**: Connective Tissue, In Weiss L (ed): *Cell and Tissue Biology*, 6th ed Urban & Schwarzenberg, Inc. Baltimore, 155—173, 1988.
- 5) **Zimmerman DR, Fischer RW, Winterhafter KH**, et al: Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. *Exp Eye Res* 46: 431—442, 1988.
- 6) **Murata Y, Yoshioka H, Iyama K**, et al: Distribution of type VI collagen in the bovine cornea. *Ophthalmic Res* 21: 67—72, 1989.
- 7) **Jerdan JA, Glaster BM**: Retinal microvessel extracellular matrix: An immunofluorescent study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 194—203, 1986.
- 8) **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.
- 9) **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.
- 10) **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.
- 11) **Hernandez MR, Igoe F**, et al: Extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am J Ophthalmol* 102: 139—148, 1986.
- 12) **Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, Neufeld AH**: Extracellular matrix of the human lamina cribrosa. *Am J Ophthalmol* 104: 567—576, 1987.
- 13) **Hernandez MR, Luo XX, Andrzejewska W**, et al: Age-related change in the extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am J Ophthalmol* 107: 476—484, 1989.
- 14) **Neufeld AH, Hernandez MR, Luo XX**, et al: Extracellular matrix of the normal and glaucomatous human optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (ARVO suppl): 201, 1989.
- 15) **Morrison JC, Jerden JA, L'Hernault NL**, et al: The extracellular matrix composition of the monkey optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1141—1150, 1988.
- 16) **Morrison JC, L'Hernault NL, Jerden JA**, et al: Ultrastructural localization of extracellular matrix components in the optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 107: 123—129, 1989.
- 17) **Morrison JC, Jerden JA, Dorman ME**, et al: Structural Proteins of the Neonatal and adult lamina cribrosa. *Arch Ophthalmol* 107: 1220—1224, 1989.
- 18) **Morrison JC, Dorman ME, Quigley HA**: Extracellular matrix changes in the glaucomatous optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (ARVO suppl): 201, 1989.
- 19) **Rehenberg M, Ammitzbohl T, Tengroth B**: Collagen distribution in the lamina cribrosa and the trabecular meshwork of the human eye. *Br J Ophthalmol* 71: 886—892, 1987.
- 20) **Goldbaum MH, Jeng S, Longemann R**, et al: The extracellular matrix of the human optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 107: 1225—1231, 1989.
- 21) **福地健郎, 岩田和雄**: 私信.
- 22) **福地健郎, 岩田和雄**: 人眼における球後視神経の細胞外マトリックス. *日眼会誌* 93: 962—968, 1989.
- 23) **Anderson DR, Hoyt WF, Francisco S**: Ultrastructure of intraorbital portion of human and monkey optic nerve. *Arch Ophthalmol* 82: 506—530, 1969.
- 24) **Anderson DR, Francisco S**: Ultrastructure of human and monkey lamina cribrosa and optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 82: 800—814, 1969.
- 25) **Anderson DR, Francisco S**: Ultrastructure of the optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 83: 62—73, 1970.
- 26) **Hogan MJ, Alvarade JA, Weddell JE**: Optic nerve, In *Histology of the Human Eye*. WB Saunders Com, Philadelphia, 523—606, 1971.
- 27) **Hirano A**: *A Guide to Neuropathology*. 2nd ed. Tokyo, Igaku-Syoin Ltd. 136—152, 1986.
- 28) **Jones EG**: The nervous tissue, In Weiss L (ed): *Cell and Tissue Biology*, 6th ed. Urban & Schwarzenberg, Inc., Baltimore, 306—324, 1988.