

眼内レンズ表面に見られる膜様物の免疫組織化学的研究

坂本 泰二***, 石橋 達朗**, 菅井 滋**, 大西 克尚**, 福嶋 正博**, 居石 克夫*

*九州大学医学部病理学教室 **九州大学医学部眼科学教室

要 約

家兎眼(3羽, 3眼)に眼内レンズを移植して, 7日目に摘出し, 眼内レンズ表面の膜様物を免疫組織化学的に検討した。膜様物は抗フィブロネクチン血清に陽性反応を示し, 膜様物の構成成分はフィブロネクチンが含まれることが確認された。またフィブロネクチン以外の血漿成分に対する抗血清にも陽性反応を示し, 膜様物の構成成分はフィブロネクチンを含む血漿の混合物であることが示唆された。(日眼会誌 94: 1074-1078, 1990)

キーワード: 眼内レンズ, 膜様物, 免疫組織化学, フィブロネクチン, 血液房水樹

Immunohistochemical Study of the Surface Membrane on a Intra-ocular Lens

Taiji Sakamoto***, Tatsuro Ishibashi**, Shigeru Sugai**

Yoshitaka Ohnishi**, Masahiro Fukushima** and Katshuo Sueishi*

*Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University

**Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

Surface membranes of intraocular lenses implanted in three rabbit, were studied immunohistochemically with anti-rabbit fibronectin serum and anti-rabbit whole serum antiserum. The specimens were embedded in an epoxy resin and cut at 1 μ m. Before the immunostaining procedure, the sections were placed in a solution of saturated NaOH in absolute ethanol to remove the epoxy resin. Immunostaining procedure was performed by routine avidin-biotin-peroxidase technique. The surface membranes showed positive reactions against both anti-sera. These results indicated that the surface membrane of implanted intraocular lenses was composed of fibronectin with some other serum proteins. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 1074-1078, 1990)

Key words: Intraocular lens, Membran, Immunohistochemistry, Fibronectin, Blood-aqueous barrier

I 緒 言

近年, 広く眼内レンズ移植術に用いられている眼内レンズは, 光学部が poly-methyl methacrylate

(PMMA)で作られている。この物質は生体にとって異物であるが, 強い細胞反応は見られないことが報告されている¹⁾⁻³⁾。その理由について様々な方面からの研究がなされてきたが, 近年, 眼内レンズ表面の膜様物

別刷請求先: 〒812 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学部病理学教室 坂本 泰二

(平成元年12月29日受付, 平成2年2月24日改訂受理)

Reprint requests to: Taiji Sakamoto, M.D. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University.

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812 Japan

(Received December 29, 1989 and accepted in revised form February 24, 1990)

が強い細胞反応を抑制し眼内レンズ透明性維持に重要な役割を果たしているのではないかと流目されている。

膜様物の本態については Wolter⁴⁾が最初に報告して以来、いくつかの報告がある。主なものではフィブロネクチンであるという説⁵⁾⁶⁾、ムコ多糖類であるという説⁷⁾、コラーゲンである⁸⁾という説が報告されてきたが、確定はなされていない。

膜様物の性質を明らかにするためには生化学的あるいは免疫組織化学的同定が必要であるがまだその報告はない。特に、眼内レンズの材質が硬質であるので、組織切片作製が困難であること、またその際、抗原性の低下が著しい場合には、免疫反応に利用し得ない等の問題があるため検討を困難にしていた。今回我々は、試料製作過程および免疫反応過程に改良をくわえることで、摘出した眼内レンズ表面の膜様物について、初めて免疫組織化学的検討を可能にした。家兎眼に移植した眼内レンズ表面の膜様物についてその結果を報告する。

II 実験方法

1. 実験動物および手術方法

実験動物として体重約3.3kgの白色家兎(3羽, 3眼)を用いた。ケタラルール10mg~15mg/kgの筋注による麻酔下にてシムコ針による計画的囊外法(P-ECCE)を施行した。P-ECCE後、通常的眼内レンズ手術に準じて囊内に眼内レンズを挿入した。その際、フィブリンの析出を予防するためにヘパリンの点眼を手術中に行なった。眼内レンズはBausch & Lomb社製6.5mm径のものを使用した。眼内レンズ挿入後、8-0シルク糸にて強角膜縫合を行い、抗生物質、ステロイド点眼を行った。眼内レンズ挿入術後7日目にケタラルール麻酔下にて眼球を摘出して、以下の実験に用いた。

2. 試料の作製

摘出眼球より直ちに眼内レンズのみを取り出し、約0.7cm×0.7cmの大きさに細切した。PLP(periodate-lysine-paraformaldehyde)固定液に4℃で20分浸し、PBS(phosphate-buffered-saline, pH7.4)で5分間3回洗浄した。アルコール系列で脱水後、プロピレンオキサイドは使用せず、エポキシ樹脂に包埋した。包埋した試料より約1ミクロンの切片をPorter-Blum MT2B型ミクロトームで作製し、免疫染色用に使用した。

3. 抗体の特異性の検定

1%アガロース平板に2mm直径の小穴を図1のように作り、抗家兎フィブロネクチン山羊血清(Cappel社)、抗家兎全血清山羊血清(生化学工業社)、ウサギ血清よりゼラチンアフィニティーカラムを用いて精製した⁹⁾フィブロネクチン0.5mg/mlで満たした。2日間、4℃湿室中に放置後、オクタロニ法にて判定した。

4. 免疫組織化学染色

切片をアルブミンスライドガラスに貼付し、冷風乾燥後、脱エボンをを行った。NaOH15gを無水エタノール100mlに溶かし、5日間放置後その上清を組織切片にのせ、15分間静置した。その後、無水アルコールにて5分間、3回洗浄を行い、アルコール系列を通し、PBSにて5分間3回洗浄を行った。1%牛アルブミン溶液で組織切片を30分間処理してbackground stainingを抑制した後、1次抗体として抗家兎フィブロネクチン山羊血清、または抗家兎全血清山羊血清をPBSで400倍に希釈して、4℃湿室中で一昼夜反応させた。反応後、洗浄液(0.2%Tween20-PBS)で5分間3回洗浄して、2次抗体として、ビオチン化家兎抗山羊イムノグロブリン抗体(Vector社)を250倍にPBSにて希釈したものと30分間反応させた。上記洗浄液で5分間3回洗浄後、ABC complex(Vector社)を、30分間反応させた。PBSで5分間5回洗浄後、DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydro-chloride, 和光純薬)反応を約3分間行った。蒸留水で洗浄してDAB反応を停止して、透徹、封入を行い光学顕微鏡で観察した。なお、以上の反応は1次抗体反応の他はすべて室温で行った。

陰性対照として、1次抗体の代わりに、正常山羊血清を、400倍にPBSで希釈したものをを用い、陽性対照として、正常家兎の腎臓を、眼内レンズと同様の過程で固定、包埋したものをを用い、ヘマトキシリン核染色を行なった。

5. 吸収試験

上記実験で用いた抗家兎フィブロネクチン山羊血清、および抗家兎全血清山羊血清をそれぞれPBSにて200倍に希釈した溶液1mlを0.5mg/mlフィブロネクチン溶液200 μ lと混合して37℃で1時間反応させ、それぞれの抗フィブロネクチン抗体を吸収させた。その溶液を1次抗体として上記と同様な方法で免疫組織反応に用いた。

III 結果

1. オクタロニ法

図1に示すように抗家兔フィブロネクチン山羊血清とフィブロネクチンの間には一本の沈降線を形成し、特異的反応が認められた。抗家兔全血清山羊血清とフィブロネクチンの間には強い特異的反応はみられなかった。

2. 免疫組織化学的検索

陽性対照について観察すると、腎の糸球体に強い陽性反応が見られ、ボーマン嚢にも陽性反応を認めた(図2)。これらの反応は、陰性対照として一次抗体に正常山羊血清を用いたものには認めなかった(図3)。

眼内レンズについて観察すると、抗フィブロネクチン山羊血清を一次抗体として用いた切片では光学部表

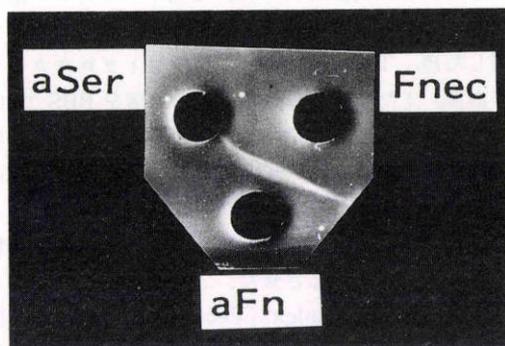


図1 オクタロニ法。Fnec：フィブロネクチン，aFn：抗フィブロネクチン抗血清，aSer：抗家兔全血清山羊血清がそれぞれの穴に入れてある。フィブロネクチンと抗フィブロネクチンの間に一本の沈降線がみられる。

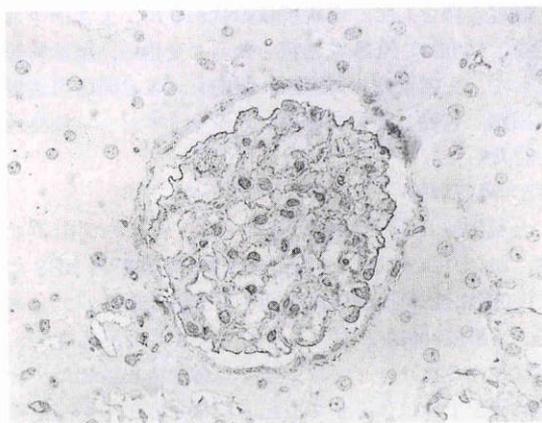


図2 抗家兔フィブロネクチン山羊血清を用いた家兔腎の免疫組織像(陽性対照)，糸球体内に陽性像を認める。核染色はヘマトキシリンにて行なった。(100倍)

面に強い陽性反応を示す膜様物が認められた(図4, 5)。また抗家兔全血清山羊血清を一次抗体として用いた切片の膜様物にも陽性反応が認められた(図6)。眼内レンズの光学部表面だけではなく、ループ表面ならびに光学部とループの間にも陽性反応を示す無構造物が存在していた(図4)。それらは抗家兔フィブロネクチン山羊抗血清をフィブロネクチンで吸収した血清を一次抗体として用いたものには見られなかったが、抗家兔全血清山羊血清をフィブロネクチンで吸収したものには陽性反応がみられた。眼内レンズ表面の膜様物は、レンズ前表面のほうに強く見られた。眼内レンズ

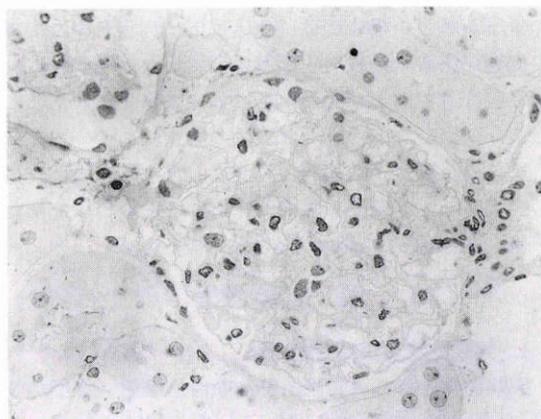


図3 正常山羊血清を用いた家兔腎の免疫組織像(陰性対照)。図2で見られた糸球体内の陽性像は見られない。(100倍)

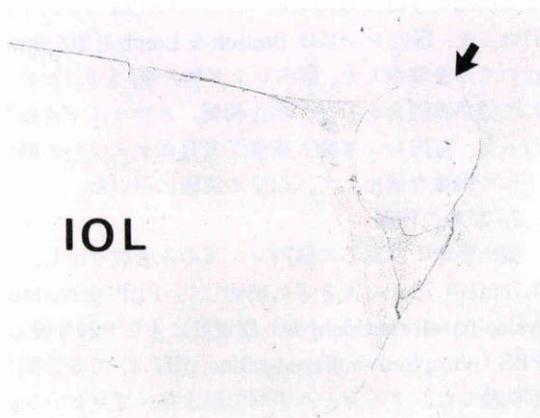


図4 抗家兔フィブロネクチン山羊血清を用いた眼内レンズの免疫組織像。光学部表面ならびにループに陽性像が認められる。ループと光学部のあいだにも陽性像を示す無構造物質を認める。IOL：光学部，矢印：ループ(130倍)

IOL

図5 抗家兎フィブロネクチン山羊血清を用いた眼内レンズの免疫組織像。眼内レンズ光学部表面に膜様物を認める。IOL：光学部（560倍）

IOL

図6 抗家兎全血清山羊血清を用いた眼内レンズの免疫組織像。眼内レンズ表面の膜様物に陽性像をみとめる。IOL：光学部（560倍）

後面にはほとんど見られなかった。

IV 考 案

眼内レンズ表面に出現する膜様物については近年様々な報告がある^{4)~8)10)~14)}。その中では、膜様物の本体はコラーゲンとするもの⁸⁾、フィブロネクチンとするもの⁵⁾⁶⁾、ムコ多糖類⁷⁾、それらの総合体とするもの¹¹⁾、があるがいまだ証明はされていない。

今回、我々は、免疫組織化学的方法を用いて膜様物の性状を明らかにした。その際の問題として2つがあげられた。一つは、本来の組織構築を留めた適切なレンズの切片をいかに作製するかである。このことは

Ishibashi ら¹⁵⁾の報告したように、プロピレンオキシドを用いずにエポキシ包埋した切片を使用することで解決した。しかし、もう一つの問題としてエポキシ包埋後に切片を製作して免疫反応を行なうことは、抗体の浸透性が著しく低下するため不可能であった。そこで Mar ら¹⁶⁾の方法を改変することで免疫反応を行なうことが可能となった。抗フィブロネクチン血清を用いて免疫反応を行なうと眼内レンズ表面の膜様物に陽性反応が見られた。無構造かつ線条の物質は非特異的陽性反応が現れやすいがフィブロネクチンによる抗体吸収試験を行なうと反応が見られなくなることより、表面の膜様物の陽性反応はフィブロネクチンに対する特異的反応であると考えられた。

一方、家兎全血清に対する抗体である山羊血清から抗フィブロネクチン抗体を吸収試験で除いた血清も、眼内レンズ表面の膜様物と反応した。このことより眼内レンズ表面の膜様物形成には、フィブロネクチン以外の血清中の物質の関与も示唆された。

フィブロネクチンは、分子量約23万のペプチド鎖が重合した糖蛋白質で、血漿中に存在する血漿フィブロネクチンと、細胞が分泌する細胞性フィブロネクチンに大別できる。血漿フィブロネクチンは分子量235,000のA鎖と230,000のB鎖からなるヘテロダイマーで生理的条件下で可溶性である。細胞性フィブロネクチンは血漿フィブロネクチンより分子量がやや大きい2量体が重合して多量体となったもので不溶性である¹⁷⁾。その主な機能は細胞間および細胞と間質との接着作用であるが、細胞形態の調節、細胞の運動、食作用の増強作用もあることが報告されている¹⁸⁾。

手術時、眼内レンズ表面に付着したフィブリンや組織破砕物を除去するのは主にマクロファージである。眼内レンズ表面にフィブロネクチンがあると、レンズ表面にマクロファージが付着し易くなり、さらに食作用、運動が活性化される。要するに眼内レンズ表面のフィブロネクチンはレンズの透明性維持のためには好都合のように思われる。反面、眼内レンズ手術後の重大な合併症である虹彩と眼内レンズの癒着はフィブロネクチンの存在により強くなることが推測される。つまり眼内レンズ表面のフィブロネクチンが、眼内レンズ手術後の経過に正負いずれの影響を及ぼすかは不明である。フィブロネクチンの由来については、手術中の血液房水棚の破綻により前房内に流入する血漿由来のものおよび手術後、眼内レンズ表面に出現する多数のマクロファージ由来のものが考えられるがいずれで

あるかは現在は決められない。

膜様物には、スリットランプで確認できる比較的厚いものと、電子顕微鏡で初めて観察できる薄いものが報告されている⁶⁾。今回免疫組織化学的に確認された膜様物は、電子顕微鏡的に確認される膜様物よりは明らかに厚いが、スリットランプで認められる膜様物よりは薄かった。スリットランプで確認される膜様物と電子顕微鏡的膜様物の本態および相互関係は不明であり、今回の実験で示された膜様物がいずれの性状を現わすのかは確認できなかった。今後は膜様物の性状と由来をより明らかにしてその存在意義をさらに検討する必要がある。

稿を終えるにあたり御校閲いただきました猪俣 孟教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Ridley H**: The history of lens implantations. In Ed Rosen ES, Haining WA, Arnott EJ, Ed, Intraocular Lens Implantation, 37-42, CV Mosby, St Louis, 1984.
- 2) **Jaffe NS**: Intraocular lens implants, In Jaffe NS (ed): Cataract Surgery and Its Complications. St. Louis, CV Mosby, 99-133, 1976.
- 3) **Howard GM, Praeger DL**: Histopathologic examination of a globe containing an intraocular implant. *Ann Ophthalmol* 14: 197-199, 1982.
- 4) **Wolter JR**: Foreign body giant cells on intraocular lens implants. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 219: 103-111, 1982.
- 5) **Kappelhof JP, Pameyer JH, De Jong PTVM, et al**: The proteinous coating and cytology of implant lenses in the rabbits. *Am J Ophthalmol* 102: 750-758, 1986.
- 6) **Ishibashi T, Sugai S, Kubota T, et al**: Cytopathology of early cellular reaction implant lenses in monkeys. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 227: 470-475, 1989.
- 7) 河合憲二, 後藤靖彦, 井上隆夫, 他: PMMA 眼内レンズ表面の沈着物について (in vivo, in vitro で比較検討). 第52回日本中部眼科学会報告, 京都, 1986.
- 8) 大平明弘, 大島健司, 山中昭夫, 他: 人工水晶体の生体親和性に関する研究. *日眼会誌* 90: 169-175, 1986.
- 9) **Engvall E, Ruoslahti E**: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer* 20: 1-5, 1977.
- 10) **Wolter JR**: Cytopathology of intraocular lens implantation. *Ophthalmology* 92: 135-142, 1985.
- 11) 上野山謙四郎, 金川龍一, 田村 学, 他: 眼内レンズと細胞反応. (5) 眼内レンズ表面の薄膜形成. *IOL* 2: 205-211, 1988.
- 12) **Humalda D, Blanksma LJ, Jongebloed WL, et al**: Membrane formation and endothelial cell growth on an intra-ocular lens in the human eye, a SEM study. *Doc Ophthalmol* 61: 241-246, 1986.
- 13) **Ohara K**: Biomicroscopy of surface deposits resembling foreign body giant cells on implanted intraocular lenses. *Am J Ophthalmol* 99: 304-311, 1985.
- 14) **Hermine S, Dietrich VD**: Foreign body against intraocular lenses. *Am J Ophthalmol* 97: 743-751, 1984.
- 15) **Ishibashi T, Sugai S, Kubota T, et al**: Cytology of intraocular lens surface, A transmission electron-microscopic study. *Ophthalmologica* 198: 30-34, 1989.
- 16) **Mar H, Tsukada T, Gown A, et al**: Correlative light and electron microscopic immunohistochemistry on the same section with colloidal gold. *J Histochem Cytochem* 35: 419-425, 1987.
- 17) 米増國雄: フィブロネクチンと炎症. *代謝* 23: 985-994, 1986.
- 18) 下岡正志, 伊井一夫: フィブロネクチン, ラミニン. *代謝* 26: 209-219, 1989.