

## 急性眼圧上昇猿眼における軸索輸送障害

白 柏 基 宏

新潟大学医学部眼科学教室

## 要 約

急性眼圧上昇猿眼の視神経乳頭部の順行性軸索輸送障害の部位による違いについて autoradiography を用いて検討した。硝子体内に<sup>3</sup>H-leucine 注入2時間後に眼圧上昇させ5時間の間灌流圧を30mmHgに保った。Lamina cribrosa レベルの視神経乳頭の横断連続切片に autoradiography を行い、grain の集積分布の程度をコンピューター画像解析により量的に解析した。局所的な grain の集積が視神経全体と視神経を8つに分割した sector において占める面積率を各々求めた。眼圧上昇眼では鼻側に比して耳側視神経において局所的な grain の集積が占める面積率の平均値が有為に高値であった。個々の bundle 内では結合組織ビームに隣接する bundle の周辺において grain の集積が強いものがしばしば観察された。以上より、眼圧上昇により耳側視神経乳頭において軸索輸送ブロックが強く生じたことが示唆され、その障害の過程に機械的なメカニズムが関与していることが推定された。(日眼会誌 94:250-257, 1990)

キーワード：軸索輸送，実験緑内障，視神経乳頭，眼圧上昇，猿

## Axonal Transport Blockage by Acute Intraocular Pressure Elevation in Monkeys

Motohiro Shirakashi

Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

## Abstract

The distribution of orthograde rapid axonal transport blockage in the optic nerve head by acute intraocular pressure (IOP) elevation in monkeys was studied by autoradiography. Tritiated leucine was injected intravitreally two hours before IOP elevation, and the IOP was elevated for five hours, maintaining a perfusion pressure of 30mmHg.

Serial step cross sections from the optic nerve head at the level of the lamina cribrosa were prepared for light microscopic autoradiography, and the accumulation and distribution of grains were quantitatively analyzed using computerized image analysis. The area of focal grain accumulation was expressed as a percent of the defined optic nerve area and each eight sectors, divided by axially intersecting vertical, horizontal, and diagonal lines, respectively. In eyes with IOP elevation, the mean area of focal accumulation of grains in the temporal half of the optic nerve was significantly larger, compared with the nasal half. Within axonal bundles, the focal high accumulation of grains was frequently indentified to be in association with trabecular beams of connective tissue in the peripheral portion of the axonal bundle. These results suggest temporal dominant blockage of axonal transport in the optic nerve head, which may be induced by mechanical compression of the axonal bundles during IOP elevation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 250-257, 1990)

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 白柏 基宏

(平成元年8月31日受付，平成元年10月16日改訂受理)

Reprint requests to: Motohiro Shirakashi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Niigata Univ. School of Med.

1 Asahimachi, Niigata 951, Japan

(Received August 31, 1989 and accepted in revised form October 16, 1989)

**Key words:** Axonal transport, Experimental glaucoma, Optic nerve head, Intraocular pressure elevation, Monkey

## I 緒 言

眼圧上昇の際に non-human primate では順行性及び逆行性軸索輸送の両者が障害され、またその高速相及び低速相の両者が障害され、これらの障害の初発部位は視神経乳頭(以下乳頭と略す)の lamina cribrosa とされている<sup>1)~8)</sup>。Autoradiography(以下 ARG と略す)を用いた primate の急性眼圧上昇実験で、順行性軸索輸送障害は乳頭内に均一に生じるのではなく、部位により差があり、上下あるいは耳側に障害が強いとされている<sup>4)5)7)</sup>。従来のこれらの実験<sup>4)5)7)</sup>では、autoradiograph における grain の集積分布の乳頭の部位による違いを数値化して表現する手段として半定量的手法が用いられている。今回、急性眼圧上昇猿眼の乳頭に ARG を行い、乳頭の部位による軸索輸送障害の違いを従来の報告に比べてより客観的に評価するためにコンピューター画像解析を応用し<sup>9)</sup>、autoradiograph の grain の集積分布の違いを検討したので以下に報告する。

## II 実験方法

実験動物として正常成熟日本猿(Macaca fuscata) 6頭12眼(体重7~10kg)を用い、そのうち7眼を実験眼、5眼をコントロール眼として使用した。全身麻酔として ketamine hydrochloride (15mg/kg) 筋注と pentobarbital sodium (40mg/kg) 静注を用い、局所麻酔として0.4%oxybuprocaine hydrochloride 点眼麻酔を用いた。全身麻酔後、22ゲージテフロンカテーテルを右大腿動脈に刺入後、ヘパリン加乳酸リンゲル充填ポリエチレンチューブに接続し、圧トランスデューサー(FUKUDA DENSHI, 電磁形脈波計 CMG-101)に連結して平均全身血圧を記録した。点眼麻酔後、両眼を開眼器にて開眼し、角膜輪部より27ゲージマイクロシリッジにて前房水0.1mlを吸引後、L-4, 5-<sup>3</sup>H] leucine (Amersham International plc, specific activity: 161Ci/mmol) 200 $\mu$ Ci/40 $\mu$ lの水溶液0.1mlを27ゲージマイクロシリッジで角膜輪部より5mm後方の部位から硝子体腔へ注入した。標識アミノ酸注入後2時間目に19ゲージエラスト針を角膜輪部より前房へ刺入し、外筒を前房へ留置し、ヘパリン加生食のボトルと接続してボトルの高さを変えることにより眼圧

レベルを設定した。実験眼7眼は5時間の間、灌流圧(平均全身血圧-眼圧)が30mmHgとなるように眼圧レベルを調整した。コントロール眼5眼は5時間の間、眼圧レベルを15mmHgに保持した。眼圧上昇を5時間持続させ、開胸後下行大動脈を結紮した。その後、右心耳に切開を加え、18ゲージ針を左心室に刺入後ポリエチレンチューブに接続し、灌流ポンプ(COLE PAR-MER INSTRUMENT Co.)を用いて生食(約200ml)で灌流後、3%paraformaldehyde, 1%glutaraldehyde in Millonig buffer (pH 7.3)にて灌流固定を行った。屠殺後直ちに開頭して眼球・視路を摘出し、同固定液にてさらに24時間固定後、カミソリ刃にて乳頭を含む小組織片を切り出した。組織片を1%osmium, 4%glutaraldehydeで固定、ethanol系列で脱水、propylene oxideで浸透後、epoxy resin内に包埋した。実験眼5眼とコントロール眼5眼において、ウルトラミクロトーム(SORVALL, MT2-B Ultra Microtome)にて乳頭を含む小組織片を網膜表面に平行に切りながら、厚さ1 $\mu$ mの乳頭の横断切片を作製し、実験眼2眼においては乳頭の縦断切片(厚さ1 $\mu$ m)を作製し、各々ARGに用いた。横断切片の作製に際しては、3%toluidine blue染色にて乳頭の前後方向のレベルの確認を行い、lamina cribrosa レベルの約90 $\mu$ m間隔の横断連続切片をARGに用いた。切片をゼラチン塗布スライドガラスにのせて乾燥後、ARG用薬剤(Sakura NR-M2, Konishiroku Co.)を塗布し、4週間の露出後、Konidol-X (Konishiroku Co.)にて現象し、Konifix (Konishiroku Co.)にて定着を行い、0.02% toluidine blueで染色した後、autoradiographの光学顕微鏡写真を撮影した。撮影フィルムにはFUJICHROME 100を使用し、撮影倍率、露光等の顕微鏡写真の撮影条件を統一した。コンピューター画像解析にはTopcon IMAGEnet<sup>9)10)</sup>を用いた。実験眼5眼の視神経横断切片の顕微鏡写真スライド画像は既報<sup>9)</sup>のごとくテレビカメラ(NC-110, NEC)を通して入力した後、デジタル化して保存後、256階調よりなる濃度分布ヒストグラムを算出した。肉眼によりgrainの集積の程度を集積なし(0)、軽度(1+)、中等度(2+)、高度(3+)に分類した後、肉眼判定で中等度(2+)以上のgrainの集積が認められる部位を抽出するように濃度分布ヒストグラムから特定の濃度 thresholdを



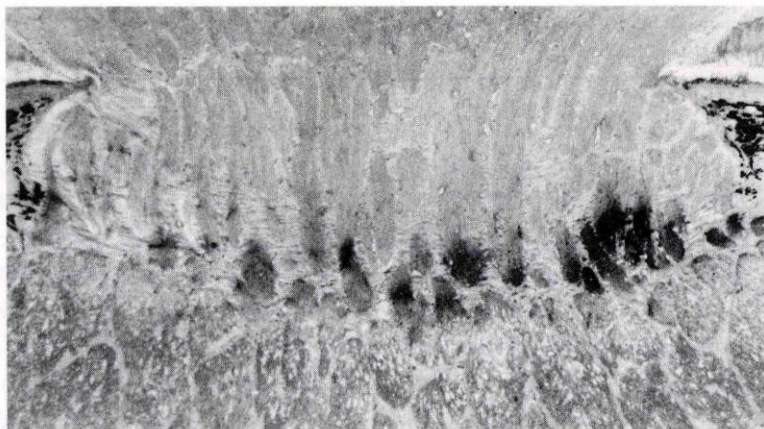


図1 実験眼(灌流圧=30mmHg, 5時間)の視神経乳頭縦断切片の autoradiograph. 視神経乳頭の lamina cribrosa のレベルに grain の強い集積を認める (×20, toluidine blue 染色).

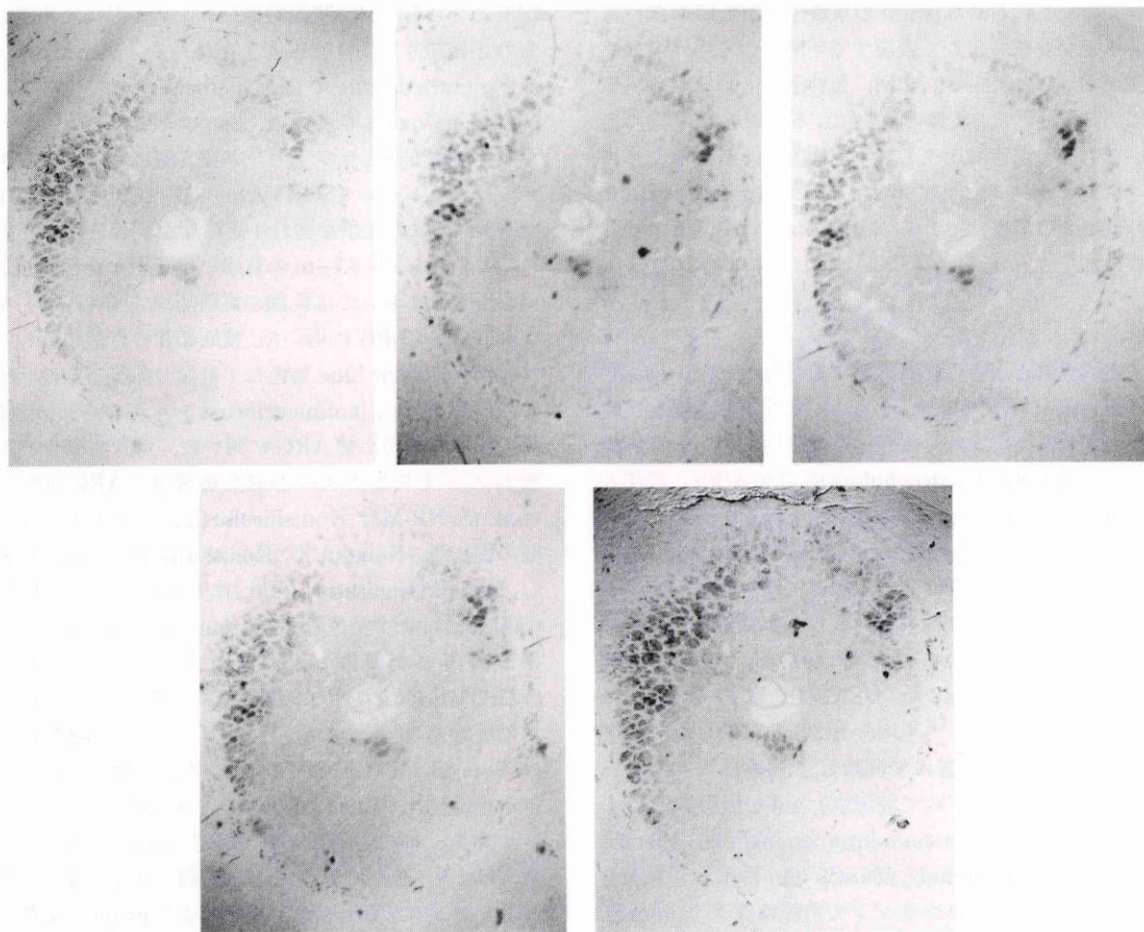


図2 実験眼(灌流圧=30mmHg, 5時間)の lamina cribrosa レベルの視神経乳頭横断切片の autoradiograph. 視神経横断面内の grain の分布は均一ではなく, 局所的に強い集積が認められる. 5枚の連続横断切片における grain の分布パターンには著しい違いは認められない(写真上: 上側, 下: 下側, 左: 耳側, 右: 鼻側, ×20, toluidine blue 染色).

選択し、その threshold 以下の濃度を有する grain の集積分布領域が視神経全体ならびに垂直水平方向と45度対角線方向により分割された8sector 内に占める面積率を各々算出した<sup>9)</sup>。尚、スライド画像を IMAGENet に入力する際の倍率、露光等の条件を全て統一して行い、全解析画像の設定濃度 threshold 値は同一のものを用いた。一眼当たり lamina cribrosa レベルの5枚の連続切片を解析し、その眼の視神経全体と各 sector において占める grain の画積率の平均値を算出した後、実験眼5眼の視神経全体と各 sector において占める grain の面積率の平均値を算出した。平均値の差の検定は Student's t-test により行った(有為水準: 5%)。

### III 実験結果

実験眼7眼の5時間の眼圧上昇の間の全身血圧は平均約105mmHgで、眼圧は平均約75mmHgであった。Lamina cribrosa のレベルの乳頭の横断切片では、視神経の周囲には色素を含んだ層を隔てて強膜組織が存在し、視神経内の視神経束(bundle)は glia cell を含む主に結合組織成分(glia-collagen beam)によって

取り囲まれている(図1~3)。

5時間の間灌流圧を30mmHgに保った実験眼では、7眼共に眼圧上昇による軸索輸送のブロックを示すと考えられる局所的に顕著な grain の集積を認めた(図1, 2)。乳頭の縦断切片において、grain の集積は lamina cribrosa のレベルに限局して認められた(図1)。Lamina cribrosa レベルの乳頭の5枚の連続横断切片において、grain の分布パターンは切片の間で多少の違いがみられたが、grain の分布パターンに著しい違いは認められなかった(図2)。眼圧を15mmHgに保ったコントロール眼では、5眼共に視神経全体に均一で極軽度な grain の分布を認めたが、局所的に著明な grain の集積は認められなかった(図3)。

図4に実験眼の画像解析による grain の集積分布面積率の測定結果の1例を示す。実験眼5眼の視神経全体において中等度(2+)以上の集積程度の grain が占める面積率の平均値は14.8±7.1% (平均±標準偏差)であった。視神経を8分割した sector, 水平垂直方向で4分割した sector, 対角線(45度)方向で4分割し

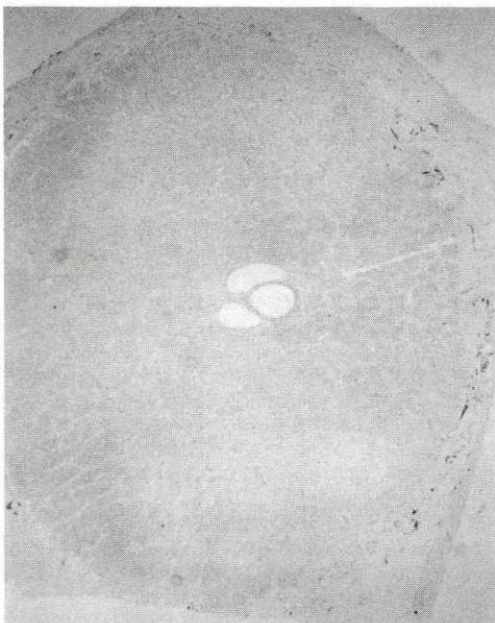


図3 コントロール眼(眼圧=15mmHg, 5時間)の視神経乳頭横断切片の autoradiograph(写真上:上側, 下:下側, 右:耳側, 左:鼻側, ×20, toluidine blue 染色)。

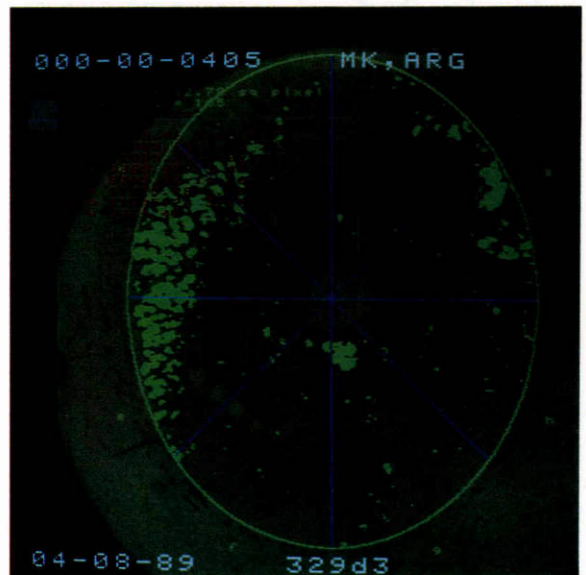
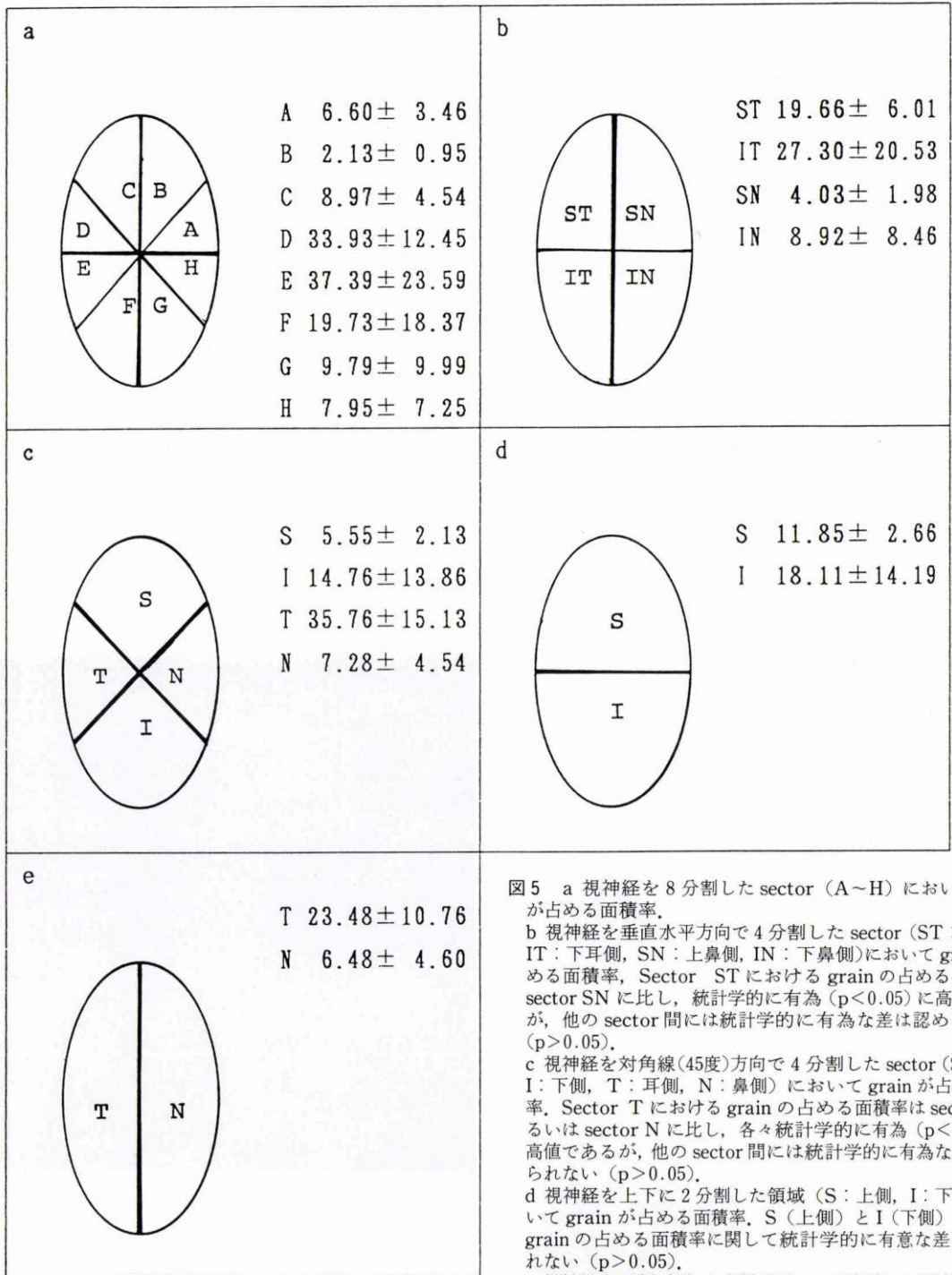


図4 実験眼(灌流圧=30mmHg, 5時間, 図2と同一眼)の画像解析による grain の集積分布面積率の測定結果。緑色の部分が中等度(2+)以上の grain の集積領域を示している。面積率は Sector A: 9.48%, sector B: 2.31%, sector C: 3.82%, sector D: 25.45%, sector E: 14.86%, sector F: 1.33%, sector G: 3.40%, sector H: 1.32%である(sector A~H の位置は図5aと同じ)。





た sector ならびに耳側と鼻側, 上側と下側に2分割した領域において grain の占める面積率の実験眼5眼の平均値を図5(a~e)に各々示す. 耳側視神経における grain の占める面積率の平均値は $23.5 \pm 10.8\%$ で, 鼻側の $6.5 \pm 4.6\%$ に比べて, 統計学的に有為 ( $p < 0.05$ )に高値であった(図5e). 視神経の上側と下側の間には grain の占める面積率の平均値に関して統計学的に有為な差は認められなかった ( $p > 0.05$ , 図5d). 個々の bundle 内の grain の分布をみると, 軽度(1+)の集積のみを有する bundle のほとんどは grain の分布が bundle 内で均一である傾向にあったが(図6), 中等度(2+)あるいは高度(3+)の grain の集積を有する bundle 内では, 中等度(2+)あるいは高度(3+)の grain の集積部分が bundle の周辺部に認められる傾向にあった(図7). 尚, collagen beam 及び glial beam 内には grain の集積はほとんど認められなかった.

#### IV 考 按

標識アミノ酸は硝子体内に注入された後, その大部分は硝子体内を拡散により網膜に到達し, 神経節細胞内に取り込まれて蛋白に合成される<sup>11)</sup>. その後標識蛋白が軸索内を axon terminal に向かって輸送され(順



図6 軽度(1+)の grain の集積のみが認められる bundle では grain の分布が bundle 全体に均一である ( $\times 134$ , toluidine blue 染色).

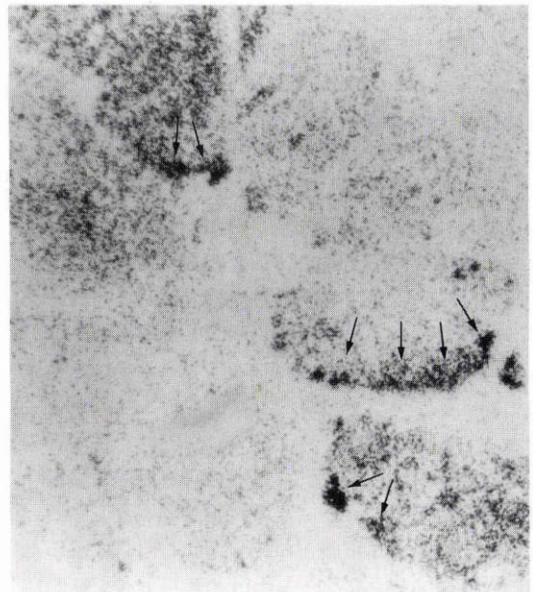
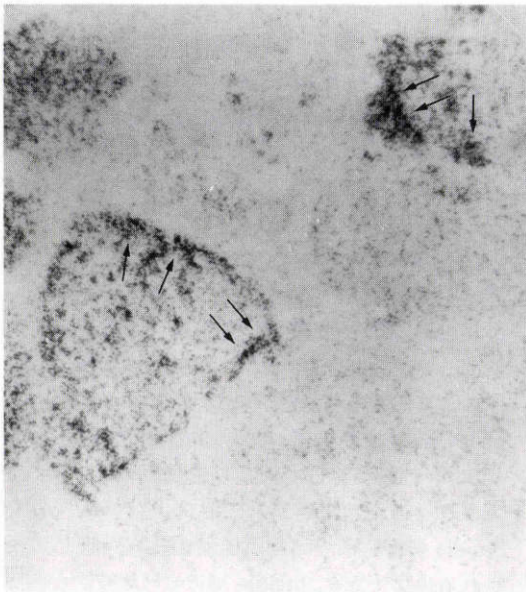


図7 中等度(2+)あるいは高度(3+)の grain の集積を有する bundle において, collagen beam に隣接する bundle の周辺部において grain の集積が強く認められる(矢印) ( $\times 134$ , toluidine blue 染色).



行性軸索輸送), その速度は高速相では200mm~400mm/dayとされている<sup>11)~14)</sup>. 眼圧上昇の軸索輸送に対する影響を調べる場合, 眼圧上昇が軸索輸送の最初の段階である神経節細胞におけるアミノ酸の摂取と蛋白合成過程に与える影響について考慮する必要がある. 標識アミノ酸は硝子体内に注入された後, 数時間以内に神経節細胞内に摂取されて蛋白合成される<sup>11)</sup>. また primate を用いた8時間の眼圧上昇実験から, 灌流圧が30~35mmHg以上に保たれれば, 眼圧上昇により神経節細胞の蛋白合成過程が著しく障害されないとされている<sup>1)</sup>. 従って, <sup>3</sup>H-leucine 注入2時間後に眼圧上昇を開始している今回の実験では, 眼圧上昇開始までの間に神経節細胞内における標識アミノ酸の摂取と蛋白合成は十分に行われており, 眼圧上昇後も眼圧上昇期間(5時間)の間に神経節細胞の機能は著しく障害されていないと考えられる.

今回の実験で, 実験眼において lamina cribrosa レベルの乳頭において局所的な著明な grain の集積が認められ, これは軸索輸送障害所見と考えられ, 従来の primate を用いた眼圧上昇実験結果<sup>1)~8)</sup>と一致するものである. 眼圧上昇による軸索輸送障害は, 眼圧上昇(灌流圧)レベルと眼圧上昇時間に影響され, 眼圧上昇(灌流圧)レベルが高い(低い)程, 眼圧上昇時間が長い程, その程度は高度とされており, 軸索輸送障害はまず lamina cribrosa 後方から始まり, 障害が進行すると前方に波及し lamina cribrosa 全体に及ぶとされている<sup>6)</sup>. Primate を用いた急性眼圧上昇実験で軸索輸送は灌流圧が25mmHg程度まで減少すると顕著に障害されるという報告があり<sup>1)</sup>, 一方, 灌流圧が30mmHgに維持されるように眼圧上昇させた実験で, light microscopic ARG で乳頭内に grain の集積を検出するためには眼圧上昇時間が最低2時間必要であるとされている<sup>2)</sup>. 従って, 今回の実験で5時間の間灌流圧が30mmHgという眼圧上昇下では, 神経節細胞の蛋白合成過程は著明に障害されることなく, かつ光学顕微鏡で grain の集積を乳頭内に検出することが十分可能であると考えられる.

Primate を用いた眼圧上昇実験で, 軸索輸送障害は乳頭に均一に生ずるのではなく, 視神経の上下あるいは耳側にその障害が強いとの報告がある<sup>4)5)7)8)</sup>. 眼圧上昇時の乳頭に ARG を行い, grain の集積分布を横断切片で評価する場合, grain の集積分布状態は切片のレベルにより異なる可能性があり, 眼圧上昇時に lamina cribrosa は後方に弯曲するために(図1)<sup>15)</sup>, 一つの横

断切片の中央部は網膜面に近く, 周辺部は post-laminar portion に近い可能性があり, 中央部と周辺部の grain の集積程度の違いを比較することはできないが, 一定間隔の連続切片を調べることにより各 sector 間の grain の集積程度の違いを相対的に比較することは可能と考えられる. 今回の実験眼では, 中等度(2+)以上の grain の集積は視神経全体で平均約15%を占めており, 耳側では平均約23%と鼻側の平均約6%に比して有為に高値であり, 眼圧上昇により上下側を含んだ耳側視神経がより障害され易いことが示唆された. 一方, 今回の眼圧上昇実験で使用したサル眼の球後視神経の軸索輸送標識蛋白量を定量的に分析したところ, 鼻側に比して耳側視神経の軸索輸送蛋白量が減少しているという結果が得られており<sup>16)</sup>. 従って, 眼圧上昇により乳頭の耳側において軸索輸送が強く障害され, その結果耳側視神経における軸索輸送標識蛋白量が減少した可能性が考えられる. 今回の実験では, 軸索輸送障害を評価する方法として grain の sector 当たりを占める面積率を用いたが, axon 数(密度)が視神経の部位により異なるとされ<sup>17)</sup>, 耳側が鼻側より障害され易いことを証明するには, 厳密には, 各 sector で axon の占める面積当たりの grain の集積率を算出すべきと考えられる. サル視神経では上鼻側に比し下耳側の axon 密度は高く, axon 径は小さいとされ<sup>17)</sup>. bundle 間の結合組織は耳鼻側間で差があるとされるので<sup>18)</sup>, axon のトータル面積が部位により異なる可能性がある. これらの構造的違いが今回の実験結果にある程度影響している可能性があり, 今度更に検討が必要である.

緑内障性視神経障害のメカニズムとして, 血管障害説と機械的障害説という大きく二つの仮説があるが, 未だそのメカニズムは明らかではない<sup>19)</sup>. 急性眼圧上昇サル眼の乳頭を電顕的<sup>20)</sup>あるいは horseradish peroxidase を用いて<sup>6)</sup>調べた報告で, 同一 bundle 内の軸索であっても眼圧上昇によって受ける障害の程度が部位により異なる可能性が示唆されている. Lamina cribrosa では血管組織は bundle 周囲の glial-collagen column 内に存在して軸索を栄養しているので, 眼圧上昇により血流障害が起これば, 血管から最も遠い bundle の中心部の軸索が低酸素状態を来してまず侵されるはずであり, bundle 周辺では比較的血流障害が起りにくいと考えられる. 今回の実験結果においても, bundle 内の grain の集積が周辺性とびまん性のものが認められたが, 周辺部に強い grain の集積は血流



障害では説明しがたいと考えられる。平均眼圧が約70 mmHg に及ぶ急性眼圧上昇であるので軸索輸送障害の原因として乳頭の循環障害は当然考慮されるべきであるが、軸索輸送障害のメカニズムとして周辺部に強い集積があったものは、眼圧上昇による乳頭の後方彎曲に伴い<sup>15)</sup>、glial-collagen beam の屈曲等の力が特に局所的に軸索に作用した結果で、びまん性の集積は均等な bundle の圧迫による結果と推定している。今回は個々の bundle 内の grain の集積分布を定性的に評価するとどまったが、現在、bundle 内の grain の分布の量的な評価を行っており、これにより数多くの bundle 内の局所的な grain の分布ならびに軸索輸送障害の状態が客観的に把握され、眼圧上昇による軸索輸送障害のメカニズムの解明に手懸かりを与えるものと考えている。

岩田和雄教授の御校閲に深謝致します。又、御指導、御協力いただいた難波克彦講師、里沢明充先生、沢口昭一先生に感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) **Anderson DR, Hendrickson A**: Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 771-783, 1974.
- 2) **Quigley HA, Anderson DR**: The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol* 15: 606-612, 1976.
- 3) **Minckler DS, Tso MOM, Zimmerman LE**: A light microscopic, autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic nerve head during ocular hypotony, increased intraocular pressure, and papilledema. *Am J Ophthalmol* 82: 741-757, 1976.
- 4) **Minckler DS, Bunt AN, Johanson GW**: Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 426-441, 1977.
- 5) **Quigley HA, Anderson DR**: Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 640-644, 1977.
- 6) **Minckler DS, Bunt AH, Klock IB**: Radioautographic and cytochemical ultrastructural studies of axoplasmic transport in the monkey optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 33-50, 1978.
- 7) **Radius RL**: Distribution of pressure-induced fast axonal transport abnormalities in primate optic nerve. An autoradiographic study. *Arch Ophthalmol* 99: 1253-1257, 1981.
- 8) **Sakugawa M, Chihara E**: Blockage at two points of axonal transport in glaucomatous eyes. *Graefes Arch Clin Ophthalmol* 223: 214-218, 1985.
- 9) **白柏基宏, 難波克彦, 岩田和雄, 他**: 眼圧上昇サル眼における autoradiography 法による軸索輸送障害の検討一. 第27回北日本眼科学会講演抄録, 86, 札幌, 1989.
- 10) **難波克彦, 白柏基宏, 福地健郎, 他**: コンピューター画像解析 (IMAGEnet) による視神経乳頭陥凹の立体計測. *臨眼* 43: 535-538, 1989.
- 11) **Karlsson JO, Sjöstrand J**: Synthesis, migration and turnover of protein in retinal ganglion cells. *J Neurochem* 18: 749-767, 1971.
- 12) **千原悦夫**: 正常白色家兎の視路における Orthograde fast axoplasmic transport の動態. *日眼会誌* 81: 274-279, 1977.
- 13) **沢口昭一**: 順行性高速軸索輸送の分析. 第1報. 正常白色家兎視路における生化学的分析. *日眼会誌* 89: 285-293, 1986.
- 14) **千原悦夫, 本田孔士**: 眼科学における軸索輸送. *日眼会誌* 84: 331-349, 1980.
- 15) **Levy NS, Crapps EE, Bonney RC**: Displacement of the optic nerve head: Response to acute intraocular pressure elevation in primate eyes. *Arch Ophthalmol* 99: 2166-2174, 1981.
- 16) **白柏基宏, 沢口昭一, 岩田和雄**: サル眼における実験急性眼圧上昇の順行性高速軸索輸送への影響—軸索輸送標識蛋白の分析—(講演要旨). *眼紀* 40: 569-570, 1989.
- 17) **Sanchez RM, Dunkelberger GR, Quigley HA**: The number and diameter distribution of axons in the monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1342-1350, 1986.
- 18) **Radius RL**: Regional specificity in anatomy at the lamina cribrosa. *Arch Ophthalmol* 99: 478-480, 1981.
- 19) **Minckler DS, Spaeth GL**: Optic nerve damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 26: 128-148, 1981.
- 20) **Quigley HA, Flower RW, Addicks EM, et al**: The mechanism of optic nerve damage in experimental acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 505-517, 1980.