

正常人眼視神経乳頭篩板における Sulfated-proteoglycan の分布と形態

沢口 昭一*, 岩田 和雄*, 海谷 忠良**

新潟大学医学部眼科学教室, **聖隷浜松病院眼科

要 約

正常人眼の視神経乳頭篩状板（特に強膜篩板）に於ける細胞外マトリックスの一つである Sulfated-proteoglycans を, Cationic-Dye (Cuprolinic-Blue) で染色した後電子顕微鏡にて観察した。Laminar beam はコラーゲン, エラスチン様物質とそれを取りまく基底膜様物質, および血管から構成されていた。コラーゲン上には, 3種類の Cuprolinic-Blue 陽性の filament が観察され, 大きさ及び電子密度から CB-1, CB-2及び CB-3 filament と名付けた。CB-1 filament は, 細く短く, コラーゲン線維の長軸にほぼ直行し, 比較的規則正しい間隔で配列していた。CB-2 filament は, CB-1 filaments より僅かに強い電子密度を示し, やや太く長く, コラーゲン線維上に不規則に分布していた。CB-3 filaments は強い電子密度を有し, 所々に散在性に特にコラーゲン線維の疎に分布している部位に多く認められた。更に基底膜様の構造並びに血管壁の基底膜には大きさが不揃いのフィラメント状及び多数の dot 状の Cuprolinic Blue 陽性の物質を認めた。(日眼会誌 95: 311-317, 1991)

キーワード: 正常人眼視神経乳頭篩状板, 細胞外マトリックス, キュプロロニックブルー, プロテオグリカン

The Distribution and Characterization of Sulfated-proteoglycans in the Normal Human Lamina Cribrosa

Shoichi Sawaguchi*, Kazuo Iwata* and Tadayoshi Kaiya**

*Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

**Eye Clinic, Seirei Hamamatsu General Hospital

Abstract

The distribution and morphological characterization of the sulfated-proteoglycans in the normal human lamina cribrosa under the electron microscope after staining with cationic-dye (Cuprolinic-Blue) in critical electrolyte condition were studied. Three types of Cuprolinic-Blue positive filaments were identified associated with collagen in the lamina cribrosa according to their size, electron-density and their relation to the collagen fibrils. The thin and short Cuprolinic-Blue positive filaments (referred to as CB-1 filament in this communication) distributed over the collagen fibers in relatively regular fashion.

The intermediate-sized Cuprolinic-Blue positive filaments (CB-2) were seen randomly associated with collagen fibers. The clusters of large CB-3 filaments were seen unevenly associated with loosely

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 沢口 昭一

(平成2年6月15日受付, 平成2年8月23日改訂受理)

Reprint requests to: Shoichi Sawaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine.

Ichibancho, Asahimachidōri, Niigata 951, Japan

(Received June 15, 1990 and accepted in revised form August 23, 1990)

packed collagen fibers. The higher electron density of CB-2 and CB-3 filaments than those of CB-1 filaments were also demonstrated. Cuproinic-Blue positive dots and blots as well as various sizes of filaments could be identified in the basal lamina surrounding the collagen beams and in the basement membrane of the blood vessels. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 311-317, 1991)

Key words: Normal human lamina cribrosa, Extracellular matrix, Cuproinic-Blue, Sulfated-proteoglycan

I 緒 言

緑内障に於ける視神経乳頭陥凹の発生, 進展に関しては眼圧の程度, 眼圧上昇の期間, 並びに乳頭篩板自体の強度及び弾性等が重要な要素と考えられる。また, 臨床的には陥凹の発生, 進展に関しては著しい個体差が存在し, 更に低眼圧緑内障の様に正常眼圧にも拘らず著しい乳頭陥凹を示す例, 或は, 高眼圧症の様に眼圧上昇が長期間持続するにも拘らず, 殆ど陥凹の進展を認めない症例が存在する。

近年視神経乳頭篩板を構成する細胞外マトリックスとしてコラーゲン, ラミニン, フィブロネクチン等が報告され^{1)~7)}, さらに人眼緑内障及び猿眼実験緑内障に於て, この部位に於けるこれらの細胞外マトリックスの構成に変化のあることが報告されている^{8)~10)}。細胞外マトリックスの一つであるプロテオグリカンは, コラーゲン或は基底膜様物質など他の細胞外マトリックスと密接な関係を有しその組織の強度, 弾性等に重要な働きを示すことが知られており, 眼科領域においても角膜, 隅角線維柱帯に組織化学的にまた生化学的にその存在が証明され, 更に種々の眼科疾患に於てその異常が報告されている^{11)~14)}。Morrison等は sulfated-proteoglycans の一つである Heparan-sulfate を免疫組織化学的に猿視神経乳頭に証明した⁶⁾。しかしながら視神経乳頭部の Proteoglycans の形態, 分布等についての報告は限られており, 更に緑内障眼に於ける乳頭陥凹の発生, 進展に関しては, 他の細胞外マトリックスと共に重要な役割を果たしているものと推定される。今回我々は, 正常人眼の乳頭篩板を cationic-dye (Cuproinic-Blue) で染色後, 電子顕微鏡でプロテオグリカン(特に Sulfated-portion)を観察し興味ある知見を得たのでここに報告する。

II 対象および実験方法

1. 対象

緑内障並びに他の眼疾患の既往のない正常人眼 2 例

2 眼 (67歳, 75歳)の視神経乳頭部位を実験に用いた。眼球は摘出後 (67歳: 交通事故で死亡, 75歳: 肺炎で死亡) 12時間以内に赤道部で半切し固定液 (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, Sorensen's phosphate buffer, pH7.4) に浸漬し, 次いで拡大鏡下に後極部並びに視神経乳頭部に異常のないことを確認した。その後, 視神経乳頭部位をカミソリで眼球から切り放し更に固定液に浸漬したその後, 視神経乳頭部位は更にカミソリで篩板の方向に直角に薄切し更に同固定液中に一晩浸漬固定した。

2. 実験方法

Cuproinic-Blue (Gallard, Co, LTD, NY) の染色方法は, Scott 並びに Tawara の方法に準じた¹⁵⁾¹⁶⁾。以下, 簡便に方法について述べる。

1) 平衡化: 上記のごとく固定した乳頭部組織片を更に固定液 (2.5% glutaraldehyde, 25mM Sodium-Acetate, 0.1M Magnesium Chloride, pH5.7) に浸漬する (15分, 4回)。

2) Cuproinic-Blue 染色: 平衡化に用いた固定液に 0.05% の濃度となるように Cuproinic-Blue を加え平衡化した組織片を染色液中に室温で一晩浸す。

3) 洗浄: Cuproinic-Blue 染色液で染色した組織を平衡化に用いた固定液にて洗浄する (5分, 3回)。

4) 洗浄: 0.5% の濃度の Sodium-Tungstate (蒸留水) で更に組織片を洗浄 (5分, 3回)。

5) 洗浄: 0.5% の濃度の Sodium-Tungstate (50% Ethanol) で更に組織片を洗浄 (5分, 3回)。

6) 脱水: 50%, 70%, 80% Ethanol: 15分, 1回
95%, 100% Ethanol: 15分, 2回

7) Propylene Oxide に浸漬: 10分, 2回

8) Epon: Propylene Oxide = 1:1, 一晩, Epon: Propylene Oxide = 2:1, 一晩。

9) Epon 包埋。できあがった epon ブロックは LKB ミクロトームで薄切しトルイジンブルーで染色した後光学顕微鏡にて観察した。更にダイヤモンドナイフで超薄切片を作成した後ウラン染色を施し電子顕微鏡

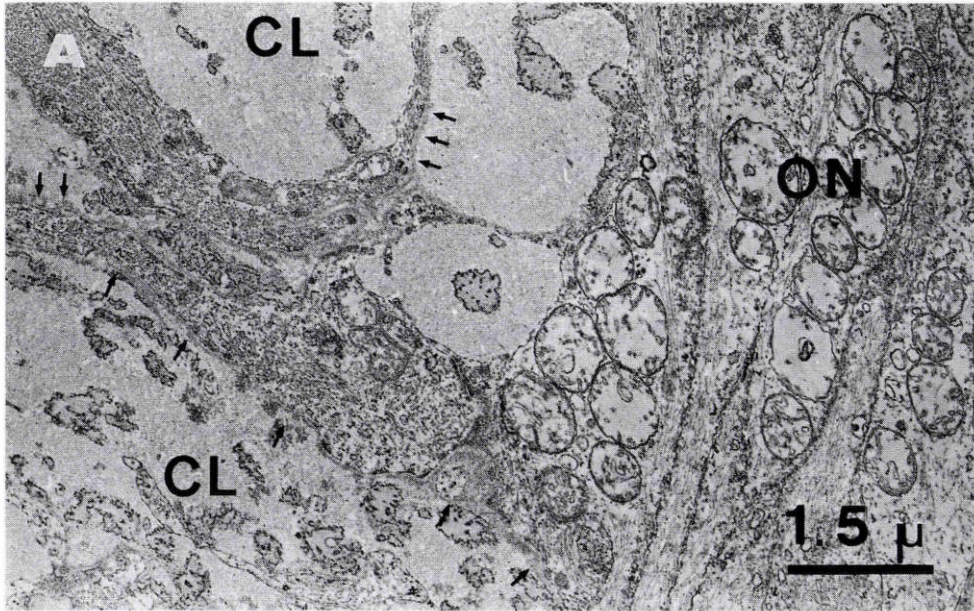


Fig. 1A Normal architecture of lamina cribrosa. Optic nerve fiber bundles (ON) are surrounded by collagenous laminar beams (CL). The arrows indicate the basal lamina surrounding the collagenous beams. ($\times 15,000$)

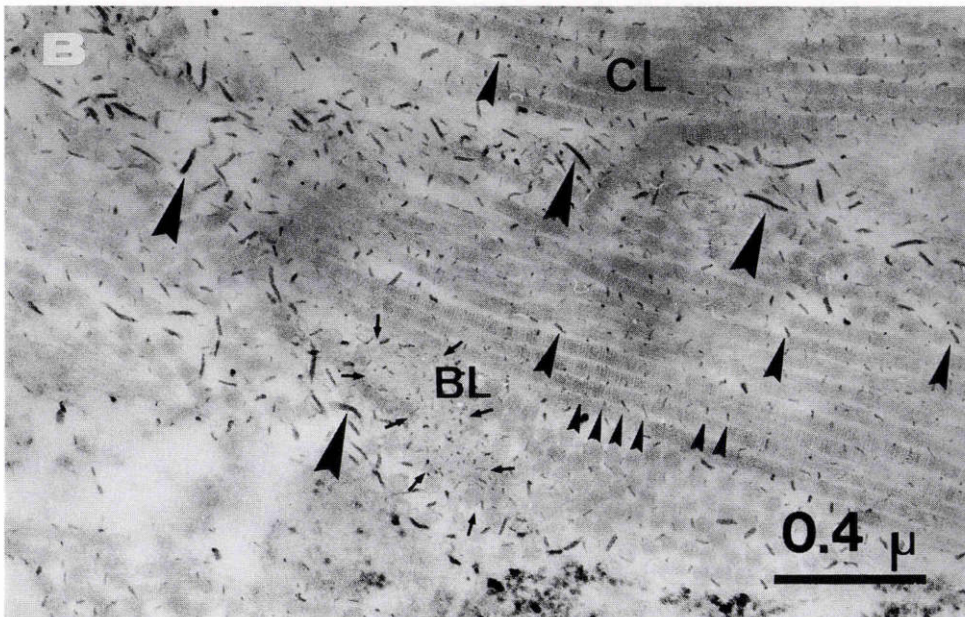


Fig. 1B The collagenous laminar beams (CL) stained with Cuproline Clue under the critical electrolyte condition. Various sizes of Cuproline Blue positive filaments can be identified associated with collagens (CL) as well as basal lamina (BL) surrounded by small arrows. Dots and small filamentous proteoglycans are also seen associated with basal lamina (BL). Small arrowheads : CB-1 filament, Intermediate sized arrowheads : CB-2 filaments, Large arrowheads : CB-3 filaments. ($\times 60,000$)

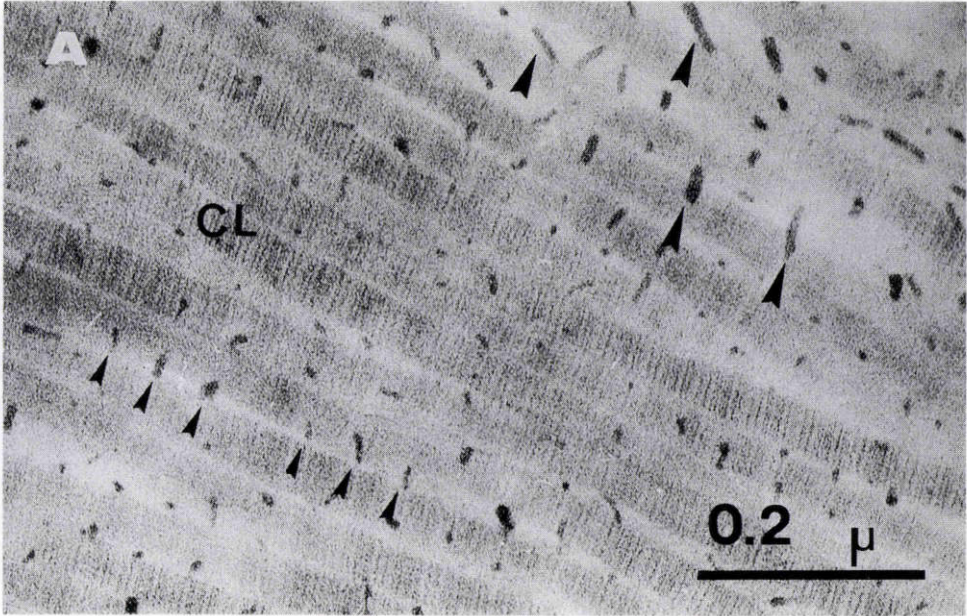


Fig. 2A Small arrowheads indicate CB-1 filaments, which are distributed at right angle to the long axis of the collagen fibers with relatively regular intervals. Intermediate sized arrowheads are associated with collagen fibers in random fashion named CB-2 filaments. ($\times 180,000$)

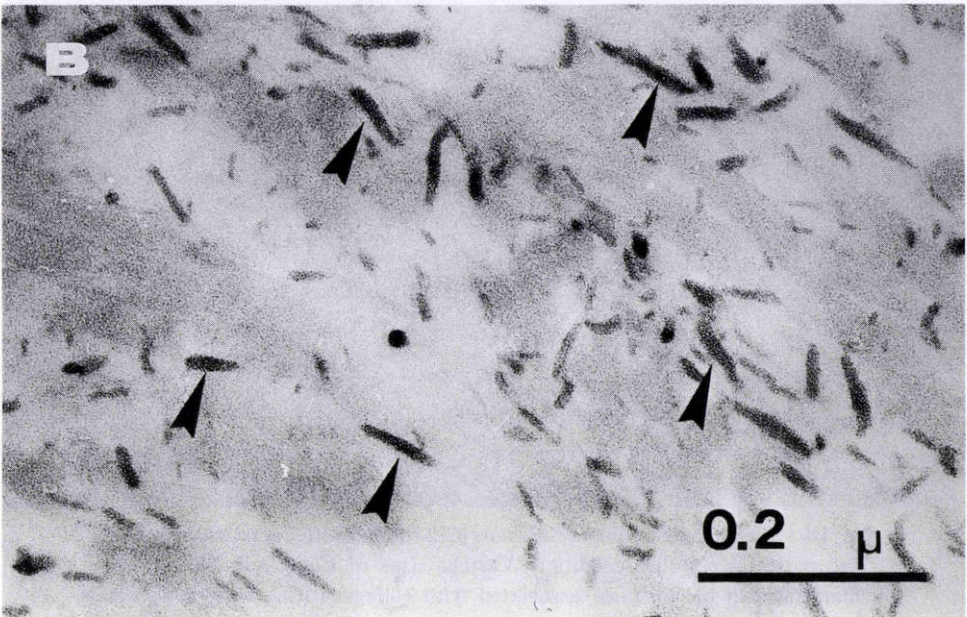


Fig. 2B Large and electron dense filaments (CB-3 filaments) are occasionally seen associated with loosely packed collagen fibers. ($\times 180,000$)



Fig. 3A Arrows indicate the basal lamina (BL) surrounding the collagen beams. The smallest arrowheads show dot and short filamentous sulfated proteoglycans associated with basal lamina (BL). Small, intermediate, and large sized filaments are also seen associated with collagen beams. ($\times 120,000$)

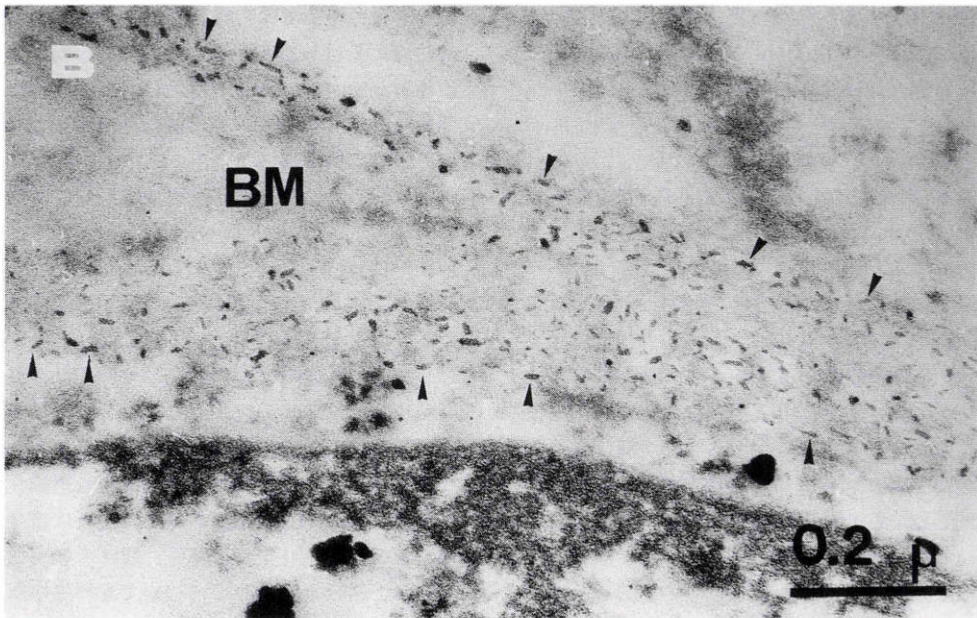


Fig. 3B The smallest arrowheads indicate the dot and small filamentous sulfated proteoglycans associated with basement membrane (BM) of the blood vessels in the lamellar beams. ($\times 120,000$)

(日立 H-7000) 下に観察した。

III 結 果

視神経乳頭篩板(特に強膜篩板)はコラーゲン, コラーゲンを取りまく基底膜様物質, 及び血管壁から構造されている (Fig. 1A), それぞれの細胞外マトリックス上にさまざまな Cuproinic Blue 陽性の物質が観察された。コラーゲン上には3種類の Cuproinic-Blue 陽性の filaments が大きさ, コラーゲン線維との関係, 及び電子密度の差から分類された (Fig. 1B), 細く, 短い filament (CB-1と呼ぶ)はコラーゲン線維の長軸に対して直交し, 比較的規則正しい間隔で配列していた (Fig. 1B, 2A), CB-1 filament よりやや長く, 太い filament (CB-2と呼ぶ)は, コラーゲン線維上を不規則にまた散在性に分布していた (Fig. 1B, 2A), CB-3 filaments はCB-2 filament より更に大きく, コラーゲン線維上に極めて疎らに見られ, さらに散在性に集束している所見も見られた (Fig. 1B, 2B), Filament の電子密度はCB-3で強く次いでCB-2, 更にCB-1の順番であった。

コラーゲンを取りまく基底膜様物質及び血管壁の基底膜には種々の大きさのフィラメント状及び点状一棍棒状の Cuproinic-Blue 陽性の物質が観察された (Fig. 1B, 3A, 3B), また今回の実験に用いた2例の眼球の間では, これらの filament の大きさ, 並びに分布に関しては特別な差は認められなかった。

IV 考 按

視神経乳頭篩板における Sulfated-Proteoglycans を cationic-dye である Cuproinic-Blue で染色し, この部位を構成する細胞外マトリックスであるコラーゲン, コラーゲンを取りまく基底膜様物質, および血管壁の基底膜と密接に関係している染色陽性の filaments と dots を観察することができた。今回, 我々の証明した proteoglycan の内, CB-1, CB-2 filaments は, そのおおよその大きさ, 配列より, 角膜, 隅角線維柱帯に証明されたコラーゲン線維と密接に関係した proteoglycan と同様な働き, 即ち, 組織の強度, 弾性に役だっているものと推定される¹⁴⁾¹⁷⁾。一方, 隣合うコラーゲン線維束の隙間を埋める様に分布する極めて大きくまたパラエターに富むCB-3 filaments は, 正常の角膜, 隅角線維柱帯には報告されていず, 正常の乳頭篩板に特徴的である可能性があり, 興味ある知見と考えられる。

プロテオグリカンは細胞外マトリックスの主要な構成様素の一つであり, 他の細胞外マトリックスと密接な関係を有しその組織の形態, 強度, 弾性等の維持に重要な働きを果たしている事が知られている。眼科領域に於いては角膜, 隅角線維柱帯等に分布し, 角膜に於いては強度, 弾性の維持に働く他, 透光性の維持にも重要な役割を担っている¹⁷⁾¹⁸⁾。また隅角線維柱帯に於いては他の細胞外マトリックスとともに trabecular beams の構造の維持並びに房水流路における一定の抵抗性の維持に役だっているものと推定される¹⁴⁾。角膜のアルカリ損傷では, proteoglycans の構成要素である glycosaminoglycans が減少し, 角膜は混濁しまた著しく脆弱となる¹⁹⁾。また円錐角膜に於いては proteoglycans の中でも特に Keratan-sulfate の減少が報告され, 円錐角膜の発生, 進行に関与する因子として, 或はその病因論として最近注目されている²⁰⁾²¹⁾。更に緑内障に於いては, 組織化学と電子顕微鏡の併用で, proteoglycans の主要な構成要素の一つである glycosaminoglycans の異常な集積が隅角線維柱帯に証明されている^{22)~24)}。更に, 最近, 本法と同様な方法で加齢, 及び緑内障の隅角線維柱帯においては, コラーゲンと関連した proteoglycan が減少するということが明かにされ²⁵⁾, trabecular beams の collapse との関係について報告されており, 種々の疾患, 及び緑内障に於ける線維柱帯の proteoglycan の変化は, 本物質が緑内障に於ける篩板の陥凹形成についても何等かの形で関与している可能性があることを示唆するものとして興味深い。

緑内障における乳頭陥凹形成についても何等かの形で関与している可能性があることを示唆するものとして興味深い。

緑内障における乳頭陥凹の発生, 進展に関しては眼圧が重要な働きを担っている事は疑いの余地も無い。しかしながら低眼圧緑内障に於て陥凹は進展し, 一方, 高眼圧症では陥凹が起りにくいという事実, さらには先天緑内障では乳頭篩板に可逆性が著しく, それぞれの眼圧レベルに耐え得る乳頭篩板の組織化学的, 生化学的な特性が乳頭陥凹の発生, 進行に重要な意義を持つものと推定できる。現在, 我々の教室では人眼緑内障及び猿眼実験緑内障についても同様の研究を進めており引き続き報告の予定である。

研究に協力頂いた新潟大学眼科, 荒木幸雄教授及び聖隷浜松病院病理部山田哲司技師にこの場を借りて深謝する。

文 献

- 1) **Hernandez MR, Igoe F, Neufeld AH**: Extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am J Ophthalmol* 102: 139—148, 1986.
- 2) **Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, et al**: Extracellular matrix of the human lamina cribrosa. *Am J Ophthalmol* 104: 567—576, 1987.
- 3) **Morrison JC, L'Hernault NL, Jerdan JA, et al**: Ultrastructural localization of extracellular matrix components in the optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 107: 123—129, 1989.
- 4) **福地健郎, 岩田和雄**: 正常人眼視神経乳頭における細胞外マトリクスの免疫組織化学による検討. 27回北日本眼科学会抄録集, 66.
- 5) **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.
- 6) **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.
- 7) **Morrison JC, Jerdan JA, Dorman ME, et al**: Structural proteins of the neonatal and adult lamina cribrosa. *Arch Ophthalmol* 107: 1220—1224, 1989.
- 8) **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.
- 9) **Morrison JC, Dorman ME, Quigley HA, et al**: Extracellular matrix changes in the glaucomatous optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(ARVO Suppl): 201, 1989.
- 10) **Fukuchi T, Hara H, Shirakashi M, et al**: The changes of the extracellular matrices in the optic nerve head of experimentally induced monkey glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(ARVO Suppl): 99, 1990.
- 11) **Anthes A**: Studies on corneal polysaccharide. VIII. Changes in the glycosaminoglycans in some human corneal disorders. *Exp Eye Res* 8: 438, 1969.
- 12) **Covington HI, Cintron C**: Mild extraction of proteoglycans from fetal rabbit corneas: Reassociation of purified keratan sulfate with collagen fibrils of extracted tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(ARVO Suppl): 204, 1989.
- 13) **Richardson TM**: Distribution of glycosaminoglycans in the aqueous outflow system of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 319, 1982.
- 14) **Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG**: Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the human trabecular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2215—2231, 1989.
- 15) **Scott JE**: Collagen-proteoglycan interactions: Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochem J* 187: 887, 1980.
- 16) **Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG**: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. I. Histochemical studies using cuproinic blue. *Exp Eye Res* 46: 689, 1988.
- 17) **Scott JE, Haigh M**: "Small"-proteoglycan: Collagen interactions: Keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the "a" and "c" bands. *Biosci Rep* 5: 765, 1985.
- 18) **Funderburgh JL, Cintron CC, Covington HI, et al**: Immuno-analysis of keratan sulfate proteoglycans from corneal scars. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1116, 1988.
- 19) **Brown SI, Wassermann HE, Dunn MW**: Alkali burns of the cornea. *Arch Ophthalmol* 82: 91—94, 1969.
- 20) **Funderburgh JL, Pnjwani N, Conrad GW, et al**: Altered keratan sulfate epitopes in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2278—2281, 1989.
- 21) **Sawaguchi S, Beatrice Y, Sugar J, et al**: Proteoglycans in Keratoconus cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (in press, 1991).
- 22) **Segawa K**: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 19: 317, 1975.
- 23) **Segawa K**: Electron microscopic changes of the trabecular tissue in primary open-angle glaucoma. *Ann Ophthalmol* 11: 50, 1979.
- 24) **Lutjen-Drecoll E, Futa R, Rohen JW**: Ultra-histochemical studies on tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 563, 1981.
- 25) **Gong H, Freddo TF**: Ultrastructural localization of sulfated proteoglycan in normal and glaucomatous human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(ARVO Suppl): 491, 1990.