

人眼線維柱組織におけるエラスチンの電子顕微鏡 免疫組織化学的検索

海 平 淳 一

信州大学医学部眼科学教室

要 約

正常および原発開放隅角緑内障 (POAG) 眼の線維柱組織におけるエラスチンの局在を, α エラスチンとトロポエラスチンに対する抗血清を用いて, プロテイン A 金法により電子顕微鏡免疫組織化学的に検索した. 線維柱組織内ではエラスチンの局在が, sheath を伴わない弾性様線維, 周期性のある sheath を伴う弾性様線維, 細顆粒様物質に囲まれた弾性様線維, さらに connecting fibrils の 4 種類の線維に認められた. これらの線維ではエラスチンは低電子密度の無定型な部分に観察され, 個体差は認められなかった. また, POAG 眼では正常眼にはみられないエラスチンの著しい増加が Schlemm 管内壁直下の細線維様物質内に観察されたことから, 同疾患の発症にエラスチンが関与している可能性が示唆された. (日眼会誌 97: 1143—1150, 1993)

キーワード: 人眼線維柱組織, エラスチン, 電子顕微鏡免疫組織化学, 原発開放隅角緑内障

Ultrastructural Immunohistochemical Localization of Elastin in the Human Trabecular Meshwork

Junichi Umihira

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

An electron microscopic study on the distribution of elastin in the trabecular meshwork of normal human eyes and in that of eyes with primary open angle glaucoma (POAG) was done using a protein-A gold immunohistochemical method with antiserum to either α -elastin or tropoelastin. Four types of elastic fibers were found to have elastin: (1) elastic-like fibers without the sheath, (2) fibers surrounded with a sheath of periodic structure, (3) fibers surrounded with fine granular-like material, and (4) connecting fibrils. No individual differences were observed in the labeling for these four types of elastic fibers. Antigenic sites against elastin of the elastic fibers were observed mainly in the low electron density amorphous elements. In the subendothelial layer of Schlemm's canal of the eyes with POAG, a marked increase of elastin was noted within the area containing fine fibrillar-like material. This phenomenon did not occur in age-matched normal eyes. The results suggest that elastin plays an important role in the development of POAG. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1143—1150, 1993)

Key words: Human trabecular meshwork, Elastin, Ultrastructural immunohistochemistry, Primary open angle glaucoma

別刷請求先: 〒390 松本市旭 3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 海平 淳一

(平成 5 年 3 月 31 日受付, 平成 5 年 5 月 15 日改訂受理)

Reprint requests to: Junichi Umihira, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University, School of Medicine, 3-1-1, Asahi, Matsumoto 390, Japan.

(Received March 31, 1993 and accepted in revised form May 15, 1993)

I 緒 言

線維柱組織（以下 TM）における房水流出抵抗の異常な増大が各種緑内障の病因であり、特に原発開放隅角緑内障（以下 POAG）においては、TM 内に種々の細胞外基質の増加が電子顕微鏡（以下電顕）レベルで観察されている。このことから、TM に存在する各種細胞外基質が房水流出調節機構に関与しているものと推測されている^{1)~5)}。近年、これらの細胞外基質に対する組織化学的あるいは生化学的な検索がすすめられているが、TM が非常に微細な組織であることから、いかなる細胞外基質が房水流出抵抗の直接的な原因であるのかは未だに明確でない。そこで、TM に存在する主要な細胞外基質の局在をより詳細に検索する目的で、電顕免疫組織化学的研究が試みられている^{6)~9)}。

生体内の多くの組織には、主要な細胞外基質の一つであるエラスチンを主成分とする弾性線維（elastic fiber）が存在する。眼内においても弾性線維は Bruch 膜、視神経、結膜下組織、血管壁などに多くみられる¹⁰⁾¹¹⁾。これらの組織における弾性線維は電顕レベルにおいて周囲の少量の高電子密度の細線維と中心部の多量の低電子密度の無定型物質から構成されており、エラスチンは一般に無定型物質に存在している^{11)~13)}。しかしながら、TM 内の弾性線維は細線維が著しく多く、無定型物質が著しく少ないことから通常の弾性線維とは異なるものと考えられており^{2)6)14)~16)}、弾性様線維（elastic-like fiber）と特別な名前で呼ばれている²⁾。TM 内の弾性様線維は、組織化学的にエラスチンに対する染色性が陽性で⁶⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、角膜と強膜岬の機械的な連結を担っていると考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾。また、弾性様線維中に少量存在する無定型物質が臍臓由来のエラスターゼで消化されることから²⁾⁶⁾¹⁵⁾、この弾性様線維内の無定型物質にエラスチンが存在するものと考えられていたが、その詳細は従来の透過型電顕では観察困難であった。近年、Gong ら⁶⁾が電顕免疫組織化学的手法を用いて正常ヒト TM 内のエラスチンの電顕レベルでの局在を報告し、TM 内のエラスチンの性格づけがなされつつある。本研究では、TM 内のエラスチンの電顕レベルでの局在をより高感度に検索し、加えて POAG 眼におけるエラスチンの局在ならびに正常眼のそれとの比較を検討する目的で、組織内の抗原性をより保持できる親水性の包埋材である Lowicryl K 4 M に冷包埋した正常および POAG 眼の TM に対して電顕免疫組織化学的観察を

表 原発性開放隅角緑内障症例の概要

症例	眼	年齢	C/D 比	視野 (湖崎分類)	術前眼圧* (mmHg)
1	左	42	0.8	II	38
2	右	52	0.9	IV	32
3	右	52	0.9	III	26
	左	52	0.9	III	23
4	右	60	0.9	IV	42
	左	60	0.6	III	36
5	左	67	0.8	II	18
6	右	72	1.0	V	15
7	右	81	0.9	IV	18

*術前眼圧は手術直前に Goldmann 圧平式眼圧計で測定したものを記載した。

行ったところ、POAG 眼では TM 内のエラスチンの局在に正常眼とは明らかな異差が確認されたのでここに報告する。

II 実験方法

1. 組織：研究に使用した正常眼の TM は、眼球銀行から提供された眼疾患の報告されていない 8 例 8 眼（年齢 51~88 歳）の摘出人眼から、角膜移植後に切り出した 4×4 mm 角の TM 組織片である。同組織の使用に関しては摘出時に遺族の同意を得た。POAG の TM は 7 例 9 眼の線維柱帯切除術後に得た TM 組織片である。術前の細隙灯検査では、すべての症例において偽落屑物質は認められなかった。緑内障症例の詳細は表に示した。同組織の使用に関しては術前に、患者に十分な説明を行い同意を得た。

2. 抗血清：本研究では、すでにいくつかの文献⁶⁾¹¹⁾¹³⁾でエラスチンに対する特異性が確認されている Elastin Products 社 (St. Louis, MO, USA) 製の、ウサギ抗ヒト大動脈 α エラスチン血清およびウサギ抗牛胎児頸韌帯トロポエラスチン血清を一次抗体として用いた。

3. 組織の固定および包埋：TM 組織片は角膜移植後あるいは緑内障手術後、ただちに 4% パラホルムアルデヒドおよび 0.1% グルタルアルデヒドを含んだ、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 4℃ で 24 時間固定した。固定した組織は 4℃ で、0.1 M リジンおよび 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 20 分毎に 3 回洗浄し、エタノール系列で脱水後、-20℃ で Lowicryl K 4 M に包埋し、50 時間紫外線重合した。包埋した組織から厚さ 50 nm の超薄切片を作成し、膜処理したニッケルグリッドに乗せた。

4. 電顕標本の染色と観察：免疫染色は Roth¹⁸⁾ のプロテイン A 金法に若干の変更を加えた以下の手順で行った。すなわち、ニッケルグリッド上の切片を室温で 0.05% Triton X-100 および 5 mg/ml 牛血清アルブミンを含んだ 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で 1 時間、100 倍に希釈した一次抗体希釈液で 4 時間、30 倍に希釈したプロテイン A 金溶液 (標識金粒子径 15 nm) で 2 時間の順に作用させた。一次抗体およびプロテイン A 金溶液の希釈は 0.05% Triton X-100 および 5 mg/ml 牛血清アルブミンを含んだ 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で行った。免疫染色後、2% 酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色を行い、観察は日立 HS-9 電子顕微鏡 (加速電圧 75 kV) で行った。

5. 対照：対照染色としては、一次抗体のかわりに 100 倍に希釈したウサギ正常血清を使用した染色と、

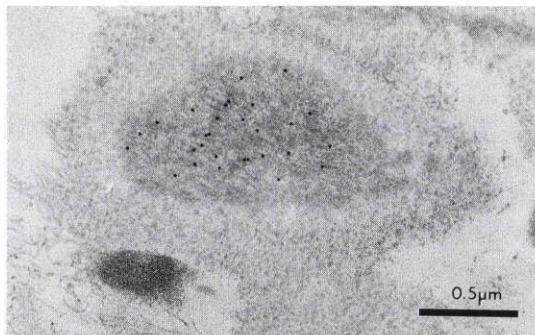


図 3 図 1 と同様の染色を行った 67 歳原発性開放隅角緑内障 (症例 5) の線維柱組織。

中等度電子密度の細顆粒様物質に囲まれる弾性様線維が観察される。

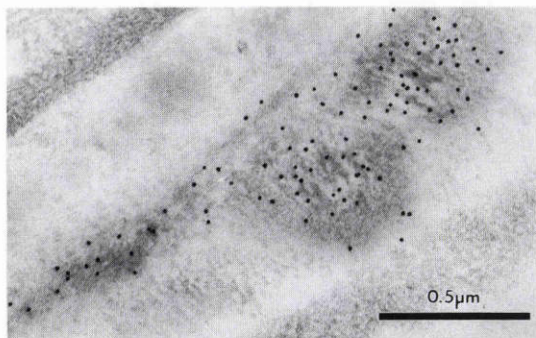


図 1 ウサギ抗ヒト大動脈 α エラスチン血清を用いて、プロテイン A 金法で染色した 51 歳正常眼の線維柱組織。

Sheath を伴わない弾性様線維が観察される。標識金粒子は主に弾性様線維内の低電子密度の無定型な部分に認められる。

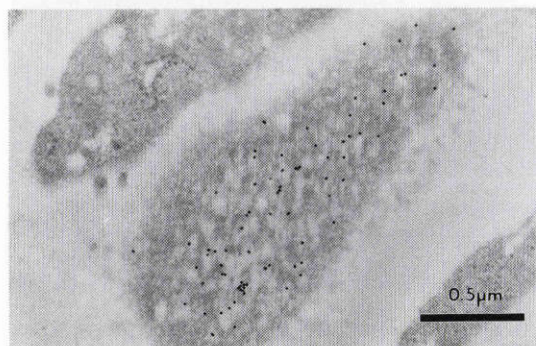


図 2 図 1 と同様の染色を行った 68 歳正常眼の線維柱組織。

中等度電子密度で 45 nm 程度の周期性のある sheath を伴う弾性様線維が観察される。

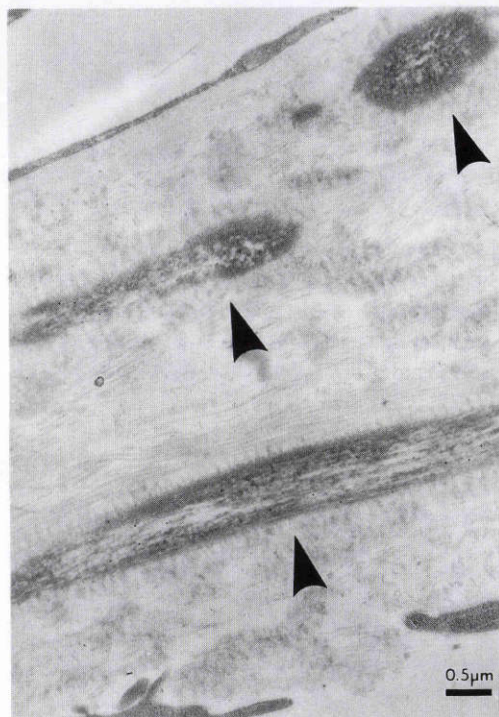


図 4 ウサギ抗牛胎児頭頸靱帯トロポエラスチン血清を用いて、プロテイン A 金法で染色した 74 歳正常眼の線維柱層板。

標識金粒子は主に弾性様線維内の低電子密度の無定型な部分に認められるが、トロポエラスチンに対する標識金粒子の数はエラスチンに対するそれよりも少ない。(矢尻：弾性様線維)

免疫染色を行う前にニッケルグリッド上の切片を室温下で0.1 mg/mlに希釈したブタ膀胱由来エラスターゼに2時間作用させた後に免疫染色を行う方法で行った。

III 結 果

1. 弾性様線維：正常眼とPOAG眼のTMにおけるエラスチンの局在を示す金粒子は、同様に、主に弾性様線維内の高電子密度の細線維間の低電子密度の無定型な部分に認められた。この弾性様線維に対する標識は、ぶどう膜網、角強膜網、内皮網のどの部分においても同程度に観察され、個体差は認められなかった。弾性様線維は特に内皮網においては、それを囲む周囲

の細胞外基質 (sheath) の形態学的特徴から、sheathを伴わないもの (図1)、中等度電子密度で45 nm程度の周期性のあるsheathを伴うもの (図2)、中等度電子密度の細顆粒様物質に囲まれるもの (図3) の3種類に分類でき、それぞれの弾性様線維に α エラスチンおよびトロポエラスチンの局在を示す金粒子が観察された。ただし、トロポエラスチンに対する標識金粒子の数は α エラスチンに対するそれよりも少なかった (図4)。

2. Connecting fibrils: Rohen ら¹⁹⁾が内皮網において、弾性様線維とSchlemm管内壁内皮細胞とを連結するように観察されると記載した、45~50 nmの周期性をもつこの線維性の構造物にも弾性様線維と同様の

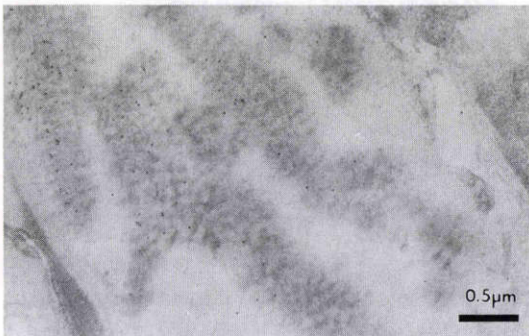


図5 ウサギ抗ヒト大動脈 α エラスチン血清を用いて、プロテインA金法で染色した60歳原発性開放隅角緑内障 (症例4左眼) の線維柱組織。Connecting fibrilsが観察される。標識金粒子は45~50 nmの周期性を持つこの線維性の構造物の主に低電子密度の部分に認められる。

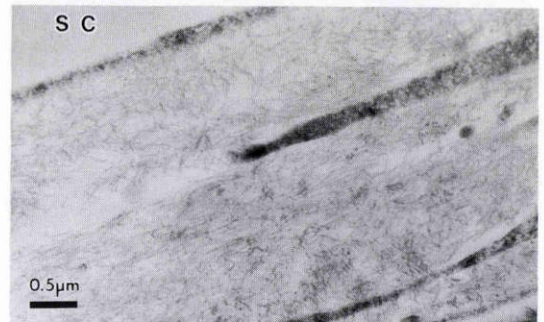


図7 ウサギ抗ヒト大動脈 α エラスチン血清を用いて、プロテインA金法で染色した63歳正常眼のSchlemm管内壁内皮細胞直下。標識金粒子はほとんど認められない。(SC: Schlemm管)

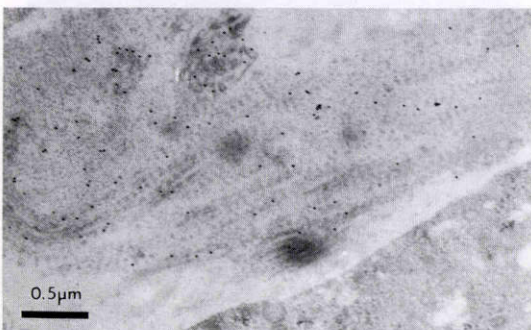


図6 ウサギ抗ヒト大動脈 α エラスチン血清を用いて、プロテインA金法で染色した81歳原発性開放隅角緑内障 (症例7) の内皮網。弾性様線維、connecting fibrilsとその周囲の細顆粒様物質に標識金粒子が認められる。

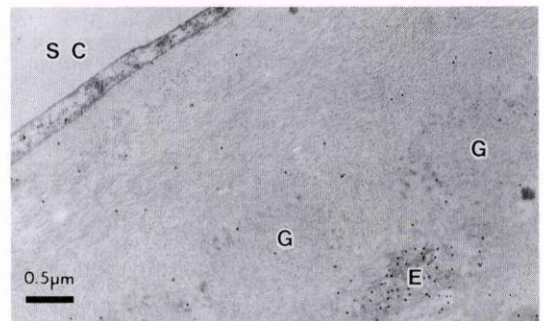


図8 図7と同様の染色を行った72歳原発性開放隅角緑内障 (症例6) のSchlemm管内壁内皮細胞直下。弾性様線維 (E) と細顆粒様物質 (G) に標識金粒子が観察される他に、細線維様物質を含む領域に多数の金粒子が観察される。(SC: Schlemm管)

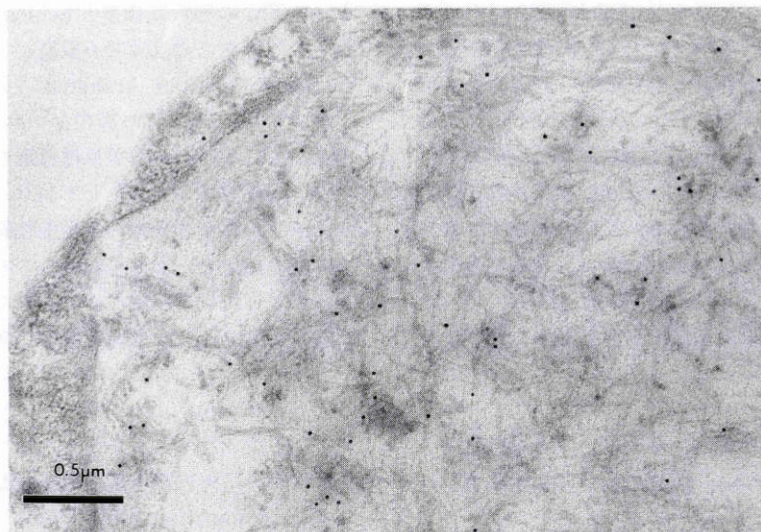


図9 図8と同一眼の Schlemm 管内壁内皮細胞直下。
標識金粒子は細線維様物質間の隙間の部分に存在する。

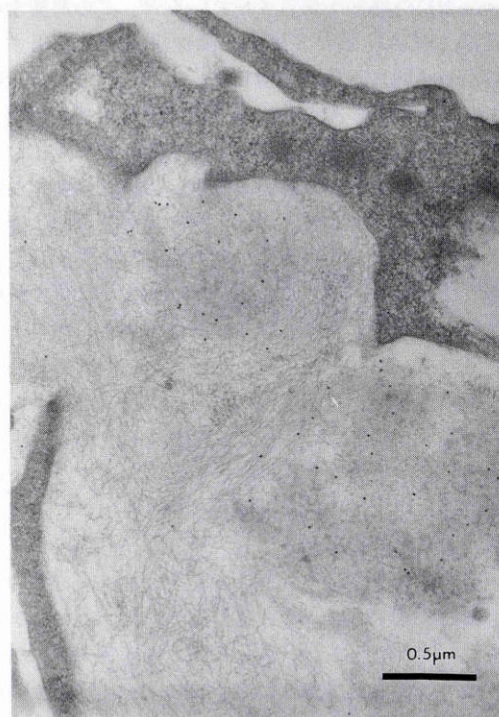


図10 図7と同様の染色を行った60歳原発性開放隅角緑内障(症例4左眼)の Schlemm 管内壁内皮細胞直下。
細線維様物質内に線維状の構造をとらない標識金粒子の集合が観察される。

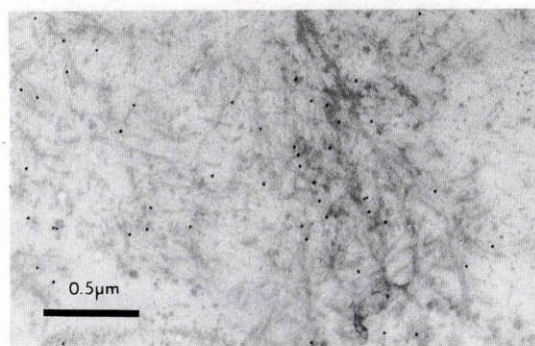


図11 図8と同一眼の細線維様物質。
細線維様物質内の一部では標識金粒子の周囲に高電子密度の細線維が観察される。

α エラスチン(図5, 6)とトロポエラスチンに対する標識金粒子が観察された。

3. 細顆粒様物質: 弾性様線維の周囲や Schlemm 管内皮細胞直下に見られる中等度の電子密度を持つ細顆粒様物質には標識金粒子は通常観察されなかったが, 上述の弾性様線維や connecting fibrils の付近に, わずかではあるが細顆粒様物質の中に α エラスチンに対する標識金粒子のみが認められた(図6)。

4. 細線維様物質: 正常眼の TM では, 主に Schlemm 管内壁内皮細胞直下に存在する細線維様物質には α エラスチンに対する標識金粒子は殆ど認め

られなかった(図7),ところが,POAG眼においては正常眼と異なり, α エラスチンに対する標識金粒子が細線維様物質内に多数存在した(図8,9),この増加した金粒子は弾性様線維やconnecting fibrilsに認められたような線維状の構造を示さず,ほとんどの場合,高電子密度の細線維を伴っていなかった.金粒子の増加は細線維様物質全体に観察されたが,Schlemm管内壁内皮細胞直下のいくつかの部分では,その部分に金粒子が集合しているように観察された(図10),また,一部では金粒子の周囲に通常の弾性様線維に比べると少ないが,高電子密度の細線維が金粒子に添って観察された(図11).

5. 膠原線維,長周期線維,基底膜,基底膜様物質:これらの細胞外成分には,標識金粒子は全く認められなかった.

6. 対照:一次抗体のかわりにウサギ正常血清を使用して染色した場合も,切片にエラスターゼを作用させた後に染色を行った場合も,エラスチンおよびトロポエラスチンに対する染色性は認められなかった.

IV 考 按

種々の正常組織や器官において,エラスチンはほとんど共通のアミノ酸構造を持っているとされている²⁰⁾.それ故,本研究ではエラスチンの構成成分である α エラスチンとトロポエラスチンに対する抗血清をTMにおいてもエラスチンの局在を検索する標識物質の一つとなり得るものと考えて使用した.大動脈をはじめとする,血管系の弾性線維は多量のエラスチンを含んでいるが²¹⁾,腱組織やTMといった未熟な組織の弾性線維のエラスチンの含有量は前者に比べて著しく少量であり^{21,22)},これらの未熟な組織においてエラスチンを検索することは容易ではない. Murphy ら¹⁷⁾は1 μ mの切片を用いた間接免疫蛍光抗体法を用いて,TMにおけるエラスチンの局在を光学顕微鏡(以下光顕)レベルで観察している.彼らは,エラスチンはぶどう膜網と角強膜網に証明されるが,内皮網には証明されなかったと報告している.著者も予備実験としてABC法を用いた光顕レベルでの検索を行ったが,TM内のエラスチンの詳細な観察は困難であった.そこで,種々の固定液および固定条件,染色条件での免疫染色を試みた上で,本研究で用いた電顕免疫組織化学的手法をLowicryl K 4 Mに冷包埋した切片に用いたところ,高感度で特異性の高い観察結果が得られた.また,組織をLowicryl K 4 Mに冷包埋した

ため,TMの層板状構造とSchlemm管の管状構造を保った状態をどの切片でも観察ができた.

Gong ら⁹⁾はEpon-Aralditeに包埋した正常人眼のTM内のエラスチンの局在をプロテインA金法にて検索している.彼らは弾性様線維の中心の部分にエラスチンが局在すると報告しており,この染色結果はエラスチンが弾性様線維の無定型物質に局在するという本研究の結果と一致している.このことは従来「弾性様線維」と特別な名称をつけられていたこの線維性構造物がエラスチンを含んだ真の「弾性線維」であることを示している.また,本研究ではRohen ら¹⁹⁾が観察したconnecting fibrilsもエラスチンを含んだ弾性線維の一形態であることが確認された.

本研究では弾性様線維の周囲に細胞外物質を伴わないもの,connecting fibrilsと類似した周期性のある細胞外物質を伴うもの,周囲に細顆粒様物質を伴うものの3種類の弾性様線維を正常眼とPOAGにおいて観察したが,POAG眼では従来の電顕レベルでの形態学的研究で,弾性様線維を囲む細胞外物質(Rohen's plaque III)の増加が報告されている²³⁾.この形態学的変化は,POAG眼のTM内に弾性様線維と関係する何らかの細胞外基質が増加しているということを示唆している.一方,Alvarado ら⁴⁾は,従来の透過型電子顕微鏡で観察される正常眼とPOAG眼のTMにおける細胞外物質の量的な違いは房水流出抵抗の変化を説明するには少なすぎると考え,従来の観察法では観察できない細胞外物質の変化が重要な役割を果たしているのではないかと述べている.エラスチンは免疫組織化学的手法を用いなければ,直接その局在を観察することはできない.もし,TMにおける細胞外物質の局在や量的な変化が房水流出抵抗の増大をもたらすならば,本研究で観察されたPOAG眼のSchlemm管内壁内皮細胞直下に存在する細線維様物質のエラスチンの増加沈着も房水流出抵抗の増大に関与している可能性があるものと考えられた.

エラスチンを産生する細胞は種々のホルモンやビタミン類に暴露すると,その産生量が変化することが知られている^{23,24)}.また,Yun ら²⁵⁾は免疫蛍光抗体法を用いて,培養線維柱細胞がデキサメサゾンの暴露によって種々の細胞外基質のなかでエラスチンのみの産生量を増加することを報告している.これらのことは,エラスチンがステロイド緑内障とおそらくPOAGにおける房水流出抵抗の成因と関係するだろうことを示唆している.

最近, Hernandez¹¹⁾が, 電顕免疫組織化学的手法を用いて POAG 眼の視神経乳頭におけるエラスチンの質的变化を報告している。彼女は重症例ほど線維状の構造をとらないエラスチンが増加すると記載しているが, この結果は本研究で観察された TM におけるエラスチンの細線維様物質への局在所見と類似している。これらの所見が眼圧の上昇による二次的变化なのか, POAG の病因に深く関与しているのかは, 未だに不明であるが, 本研究で用いた電顕免疫組織化学的手法は POAG の病因を解明する有用な手段となり得るものであると考えられた。

稿を終えるにあたり御指導, 御校閲頂きました信州大学医学部眼科学教室瀬川雄三教授ならびに信州大学医学部第一解剖学教室臼田信光助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Segawa K: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 19: 317—338, 1975.
- 2) Lütjen-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—573, 1981.
- 3) Rohen JW: Why is intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. *Ophthalmology* 90: 758—765, 1983.
- 4) Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG: Juxtacanalicular tissue in primary open angle glaucoma and in nonglaucomatous normals. *Arch Ophthalmol* 104: 1517—1528, 1986.
- 5) Lütjen-Drecoll E, Shimizu T, Rohrbach M, Rohen JW: Quantitative analysis of plaque material in the inner- and outer wall of Schlemm's canal in normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 42: 443—455, 1986.
- 6) Gong H, Trinkaus-Randall V, Freddo TF: Ultrastructural immunocytochemical localization of elastin in normal human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 8: 1071—1082, 1989.
- 7) Lütjen-Drecoll E, Rittig M, Rauterberg J, Jander R, Mollenhauer J: Immunomicroscopical study of the type VI collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 48: 139—147, 1989.
- 8) Marshall GE, Konstas AG, Lee WR: Immunogold localization of type IV collagen and laminin in the aging human outflow system. *Exp Eye Res* 51: 691—699, 1990.
- 9) Marshall GE, Konstas AG, Lee WR: Immunogold Ultrastructural localization of collagens in aged human outflow system. *Ophthalmology* 98: 692—700, 1991.
- 10) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: Histology of the Human Eye. An Atlas and Textbook. Philadelphia, WB Saunders Co, 112—182, 328—363, 538—606, 1971.
- 11) Hernandez MR: Ultrastructural immunocytochemical analysis of elastin in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2891—2903, 1992.
- 12) Schwartz E, Fleischmaler R: Association of elastin with oxytalan fibers of the dermis and with extracellular microfibrils of cultured skin fibroblasts. *J Histochem Cytochem* 34: 1063—1068, 1986.
- 13) White JF, Hughes JL, Kumaratilake JS, Fanning JC, Gibson MA, Krishnan R, et al: Post-embedding methods for immunolocalization of elastin and related components in tissues. *J Histochem Cytochem* 36: 1543—1551, 1988.
- 14) Yamashita T, Rosen DA: The elastic tissue of primate trabecular meshwork. A histologic and electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 3: 85—95, 1964.
- 15) Iwamoto T: Light and electron microscopy of the presumed elastic components of the trabeculae and scleral spur of the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 3: 144—156, 1964.
- 16) Tripathi RC: Comparative physiology and anatomy of the aqueous outflow pathway. In: Davson H, et al (Eds): *The Eye Vol 5*. New York, Academic Press, 163—358, 1974.
- 17) Murphy CG, Yun AJ, Newsome DA, Alvarado JA: Localization of extracellular proteins of human trabecular meshwork by indirect immunofluorescence. *Am J Ophthalmol* 104: 33—43, 1987.
- 18) Roth J: The protein A-gold technique—a qualitative and qualitative approach for antigen localization on thin sections. In: Bullock GR, et al (Eds): *Techniques in immunocytochemistry*, New York, Academic Press 108—133, 1982.
- 19) Rohen JW, Futa R, Lütjen-Drecoll E: The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 574—585, 1981.

- 20) **Sandberg LB**: Elastin structure in health and disease. *Int Rev Connect Tissue Res* 7: 159—210, 1979.
- 21) **Ross R**: The elastic fiber, A review. *J Histochem Cytochem* 21: 199—208, 1973.
- 22) **Greenlee TK, Ross R, Hartman J**: The fine structure of elastic fibers. *J Cell Biol* 30: 59—71, 1966.
- 23) **Mecham RP, Lang G, Madras J, Starcher B**: Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: Effect of culture conditions and extracellular matrix on elastin production. *J Cell Biol* 90: 332—338, 1981.
- 24) **Davidson JM, Giro MG**: Control of elastin synthesis: Molecular and cellular aspect. In: Mecham RP (Ed): *Regulation of matrix accumulation*, New York, Academic Press, 177—216, 1986.
- 25) **Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsome DA, Alvarado JA**: Proteins secreted by human trabecular cells. Glycocorticoid and other effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2012—2022, 1989.