

豚眼線維柱組織の器官培養

宮 永 和 人

信州大学医学部眼科学教室

要 約

豚眼を用いて線維柱組織の器官培養を行い、形態学的変化およびグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, 以下 GAG と略す) 合成能を調べた。また、免疫組織化学的手法を用いてトロンボスポンジンの局在について検討した。線維柱組織を含む強角膜組織片を7日から21日まで培養し、これらのうち一部は³H-glucosamine および³⁵S-sulfate を加えた培地で48時間培養した。この培養期間において組織片の形態学的変化はわずかであり、グリコサミノグリカン合成もほぼ一定の割合であった。トロンボスポンジンは線維柱層板内にその局在を認めた。この器官培養法を用いて、薬剤やホルモンの線維柱組織に与える影響を知ることが可能であることが示唆された。(日眼会誌 97: 1151-1156, 1993)

キーワード: 線維柱組織, 器官培養, 豚眼, グリコサミノグリカン, トロンボスポンジン

Porcine Trabecular Meshwork Organ Culture

Kazuto Miyanaga

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

In order to investigate whether porcine eyes could be useful for trabecular meshwork (TM) organ culture, changes in ultrastructure and synthesis of glycosaminoglycans (GAGs) of organ-cultured porcine TM were studied. The presence of thrombospondin was also detected in porcine TM, using an immunohistochemical method. Explants were cultured for periods of 7 to 21 days and subsequently some of them were labeled with ³H-glucosamine and ³⁵S-sulfate for 48 hours. There was very little change in the ultrastructure of the explants during our culture periods. The total incorporation of ³H-glucosamine and ³⁵S-sulfate into trabecular GAGs for up to 21 days showed similar patterns. Immunoreactivity for thrombospondin was found in the trabecular sheets. This organ culture system suggests a model for studying the various drug and hormone induced alterations in this tissue. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1151-1156, 1993)

Key words: Trabecular meshwork, Organ culture, Porcine eyes, Glycosaminoglycans, Thrombospondin

I 緒 言

緑内障の病理を解明する上で線維柱組織を培養により維持させ、そこでみられる経時の変化を観察するこ

とは重要な一手法である。1982年 Rohen ら¹⁾によるサルおよびヒトの線維柱組織の器官培養が報告されて以来、房水流出機構の研究において線維柱組織の器官培養法は種々の薬剤やホルモンに対する形態的变化ある

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 宮永 和人

(平成5年5月25日受付, 平成5年5月31日改訂受理)

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

(Received May 25, 1993 and accepted in revised form May 31, 1993)

いは蛋白質、糖蛋白などの生化学的变化を知る上で有用な方法として今日これらに関する報告も増えてきている^{2)~5)}。ところが、ヒト眼ではその入手が限られており、研究に必要な一定の数の眼球を同時に培養することは困難である。そこで、我々はこれに代わるものとして豚眼を利用できないかと考え、豚眼の線維柱組織を器官培養した。3週間の培養ののち、その形態とグリコサミノグリカン(以下GAGと略す)合成能について分析し、加えて光学顕微鏡(以下光顕と略す)・電子顕微鏡(以下電顕と略す)酵素抗体法によりトロンボスポンジンの局在を検討した。

II 実験方法

1. 豚眼線維柱組織片の作製および培養

屠殺後、氷冷保存した豚眼(ランドレース, 1歳)を摘出後12時間以内に使用した。脂肪組織、外眼筋、テノン嚢を取り除き0.2%ポビドンヨードに10分、次いで70%アルコールに30秒浸し、Dulbeccoのリン酸緩衝液(以下PBSと略す)で洗浄した。これらののち、結膜および角膜上皮を取り除き赤道部で半切した。水晶体、網膜、毛様体、脈絡膜を除去し虹彩を根部で切除し、組織片を眼球の大きさに応じて4~6mmの長さで円周・子午線方向に切開を加え、8個の線維柱組織を含む強角膜組織片を作製した。これらの組織片は、既報²⁾に従いイーグルMEMに10%ウシ胎児血清ならびに200 U/mlのペニシリンGを加えたものを液体培地とし、37°C、5%CO₂の条件下で3週間まで培養した。培養液は3日毎に交換した。また、これらのうち一部は2および3週間前培養後48時間ラジオアイソトープ(以下RIと略す)³H-glucosamine 0.55 MBq/mlおよび³⁵S-sulfate 1.11 MBq/ml(New England Nuclear社)を加えた培地で培養した。

2. 固定

各培養期間を経た強角膜組織片を2.5%グルタルアルデヒドにて前固定し0.1MPBSで洗浄後、1%オスミウム酸にて後固定を行いエタノール系列にて脱水しエポキシ樹脂で包埋した。続いて包埋されたエポキシブロックをLKBミクロトームにて薄切片トルイジンブルーで染色したのち、光顕にて観察した。さらに超薄切片を作製したのち透過型電子顕微鏡(HS-9, 日立)で観察を行った。

3. GAGの分離および分析

RIを加えた培地で培養した組織片から線維柱帯のみを取り出し既報³⁾にない脱脂・蛋白消化・ゲル濾過

を行った。まず、脱脂は各組織に対して10倍量のクロロホルム:メタノール(2:1)溶液にて1回の交換を含め24時間行った。これをアセトンですすぎ乾燥させた。蛋白消化はパバインで行い、緩衝液は5mM EDTA, 2mM塩酸システイン, 200mM酢酸ナトリウム(pH 5.5)で、緩衝液100μl当たりパバインを3mg添加し48時間、65°Cで消化した。消化した蛋白は最終濃度が10%になるようにTCAを加えた後、2時間、4°Cで沈降させ15分、4°C、12,000gで遠沈して除き、上清はBio-Gel P-6 DGカラム(Bio-Rad Laboratories社)でクロマトグラフィーを行い、さらに小さな蛋白を除いた。これに100%エタノールおよび5%酢酸カリウムを3倍量加えて12時間、-20°Cで沈降させ、さらに90分、4°C、12,000gで遠沈して沈澱、乾燥させた。GAGの酵素消化には放線菌ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼAC、コンドロイチナーゼABC、ケラタナーゼ(以上、生化学工業)、1N塩酸および20%n-ブチル硝酸塩を使いそれぞれヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸に分離し、それぞれの試料を液体シンチレーションカウンター(パッカー社)にてカウントした。

4. 光顕・電顕酵素抗体法によるトロンボスポンジンの検索

トロンボスポンジンの検索にあたっては酵素標識抗体法(間接法)で免疫染色を行った。培養していない組織片に対してクライオスタットにて6μmの凍結切片を作製、アセトン固定した後0.3%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、抗ヒトトロンボスポンジン抗体(モノクローナル抗体コスモ・バイオ0367)を一次抗体(4°C、一晚)、抗マウス免疫グロブリンをペルオキシダーゼ標識二次抗体(室温、60分)として反応させた。ジアミノベンジジン(以下DABと略す)にて発色、メチルグリーンにて核染色を行い、脱水、封入後鏡検した。電顕用試料は二次抗体との反応後、2.5%グルタルアルデヒドで再固定しDABによる発色、2%オスミウム酸による後固定の後、脱水、エポキシ樹脂による包埋を行い、超薄切片作製後透過型電子顕微鏡(前述)にて観察した。

III 結果

1. 培養線維柱組織の形態

培養0, 1, 2, 3週間後の線維柱組織を光顕、電顕にて観察した(図1~9)。光顕においては培養によ

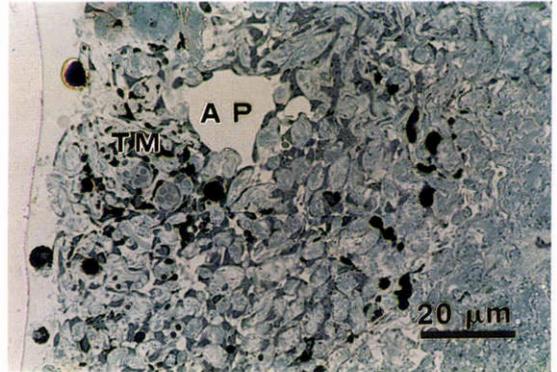
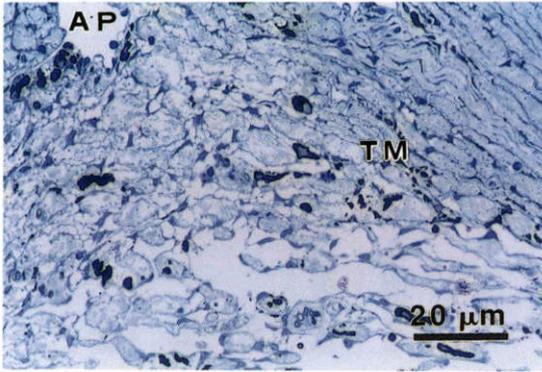


図1 培養前線維柱組織の光学顕微鏡像。
線維柱組織 (TM) と隅角房水叢 (AP) がみられる。

図2 培養7日の線維柱組織の光学顕微鏡像。
TM：線維柱組織，AP：隅角房水叢。

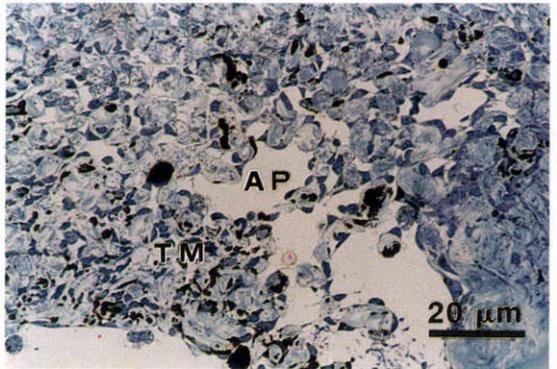
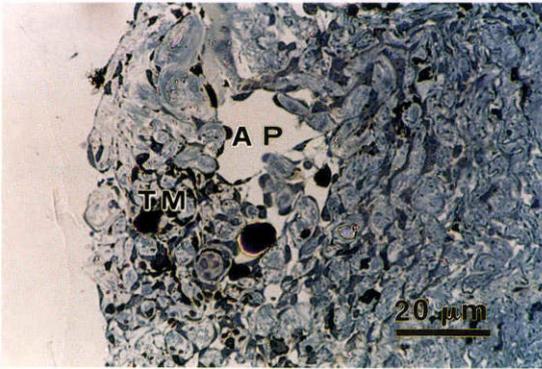


図3 培養14日の線維柱組織の光学顕微鏡像。
TM：線維柱組織，AP：隅角房水叢。

図4 培養21日の線維柱組織の光学顕微鏡像。
TM：線維柱組織，AP：隅角房水叢。

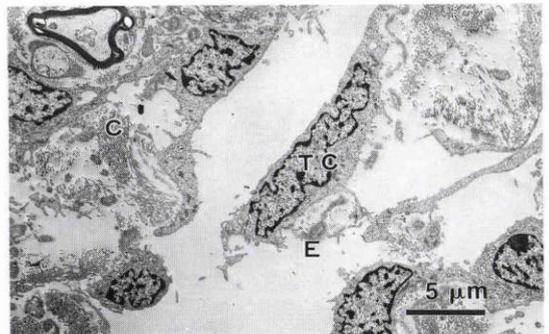
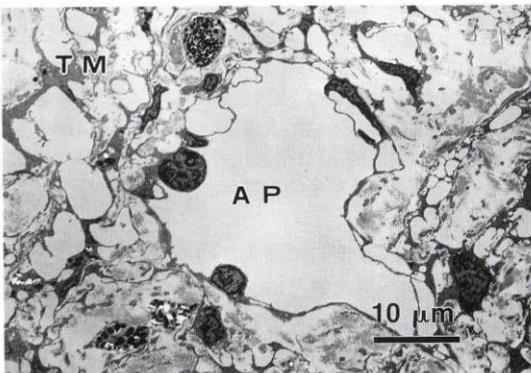


図5 培養前線維柱組織の電子顕微鏡像。
巨大空腔を有する隅角房水叢 (AP) と線維柱組織 (TM)。

図6 培養前線維柱組織の電子顕微鏡像。
TC：線維柱細胞，C：コラーゲン細線維，E：弾力線維。

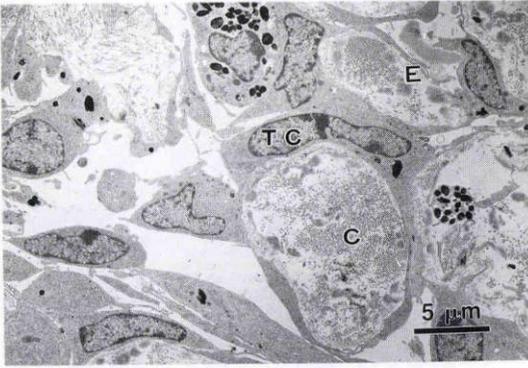


図7 培養7日の線維柱組織の電子顕微鏡像。
TC：線維柱細胞，C：コラーゲン細線維，E：弾力線維。構成要素の微細構造は培養前と同様である。

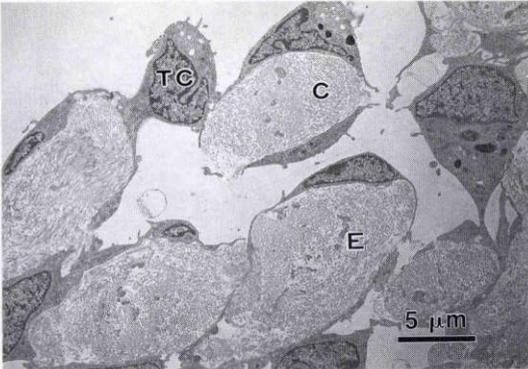


図8 培養14日の線維柱組織の電子顕微鏡像。
TC：線維柱細胞，C：コラーゲン細線維，E：弾力線維。構成要素の微細構造は培養前と同様である。

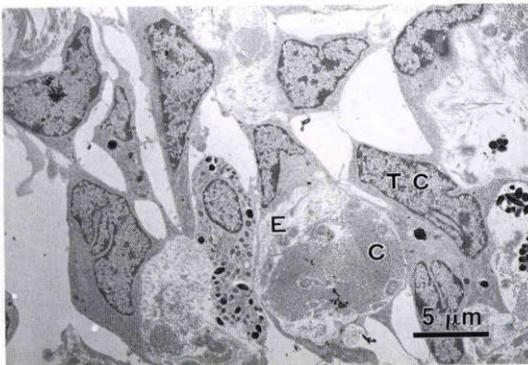


図9 培養21日の線維柱組織の電子顕微鏡像。
TC：線維柱細胞，C：コラーゲン細線維，E：弾力線維。構成要素の微細構造は培養前と同様である。

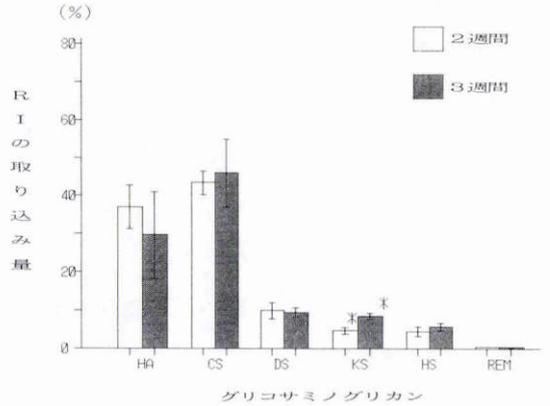


図10 培養豚眼線維柱組織のGAG生合成 (³H-glucosamine)

HA：ヒアルロン酸，CS：コンドロイチン硫酸，DS：デルマトン硫酸，KS：ケラタン硫酸，HS：ヘパラン硫酸，REM：未消化のGAG。バーは標準誤差を示す。値は平均値±標準誤差(n=5)を示す。*：p<0.02

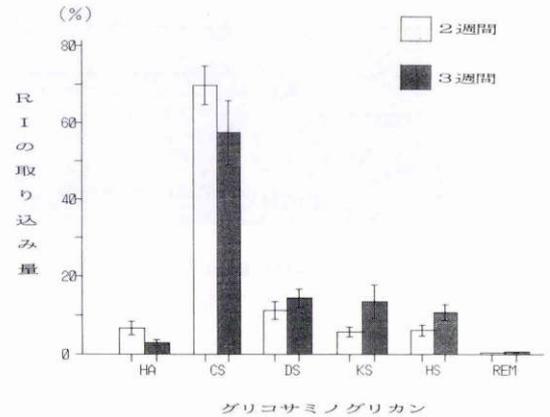


図11 培養豚眼線維柱組織のGAG生合成 (³⁵S-sulfate)

HA：ヒアルロン酸，CS：コンドロイチン硫酸，DS：デルマトン硫酸，KS：ケラタン硫酸，HS：ヘパラン硫酸，REM：未消化のGAG。バーは標準誤差を示す。値は平均値±標準誤差(n=5)を示す。

り前房側の数層の細胞に消失が認められたが，残る組織の構築は隅角房水叢 (angular aqueous plexus, ヒトの Schlemm 管に相当する) に至るまで保存されており，細胞および核の形態，細胞間接着，隅角房水叢の内皮細胞の配列には変化を認めなかった。電顕による検討では内皮細胞における細胞膜および核膜の保存，細胞内小器官，核の染色性は，ほぼ培養前の組織



図12 線維柱組織の免疫組織化学的光学顕微鏡像。
線維柱層板がトロンボスポンジン陽性像を呈する(矢印)。

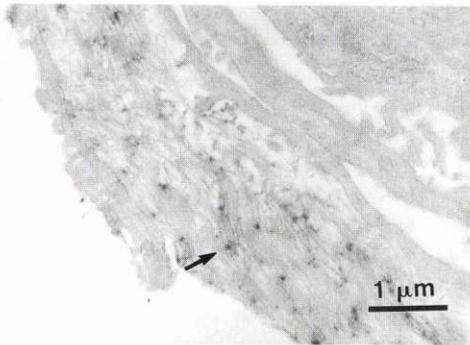


図13 線維柱組織の免疫組織化学的電子顕微鏡像。
層板内コラーゲン細線維間にトロンボスポンジン陽性顆粒が存在する(矢印)。

と同様の所見を示したが、一部の培養細胞において核における仁の出現があり、エラスチン、コラーゲンはやや増加する傾向があった。

2. GAGの生合成

2および3週間器官培養した線維柱帯における ^3H -glucosamineと ^{35}S -sulfateのGAGへの取り込み量を表したのが図10と11である。有意差検定をStudent's t-testにより行った結果、ケラタン硫酸の ^3H -glucosamineの取り込み量において2、3週間の相対的增加による有意差($p < 0.02$)が認められたが、その他のGAGでは有意差を認めなかった。

3. トロンボスポンジンの局在

トロンボスポンジンの検索を培養していない線維柱組織で光顕・電顕酵素抗体法を用いて行ったところ、コラーゲン細線維間にトロンボスポンジンの局在を示

す粒子が認められた(図12, 13)。

IV 考 按

今回、線維柱帯の器官培養の材料として豚眼を使用したことについては、その入手が量的に容易であることとtripathiら⁶⁾、Bahlerら⁷⁾も述べているように眼球の容積、房水流出能、線維柱帯の構築が比較的ヒトに近いことで、ヒトに代わるモデルとして好ましい条件を持っていることなどによる。器官培養は以前から我々の教室で行っている方法²⁾に準じて行ったが、ヒト眼より汚染の危険性が高いと考えられたため、眼球の洗浄に関して汚染に対する予防効果をあげるため⁸⁾、従来の抗生剤に代わりポビドンヨードおよび70%アルコールを使用した。

豚などの下等哺乳類では強膜岬が発達しておらず、ぶどう膜網と角強膜網の区分が不明瞭であり、Tripathi⁹⁾はヒトの線維柱組織に相当する部位に対して隅角網状組織(angular meshwork)と区別している。今回培養した線維柱組織においては1~3週間にわたり、この隅角網状組織の主要な部分はほぼ培養前の状態に保たれていたが、このうち前房側の数層の細胞に消失がみられた。この消失した細胞はヒトのぶどう膜網の一部に相当すると思われるが、ヒトおよびサル¹⁰⁾の器官培養においてもぶどう膜網に他の部位より早期に細胞消失がみられることはこれまでも報告されており、Johnsonら⁴⁾はぶどう膜網が角強膜網や内皮網とは細胞系統が異なることを示唆するものではないかと考察している。

また、糖質として房水流出抵抗の要因にあげられているGAGについて、その合成能を培養線維柱組織の生化学的反応をみる指標として検討したが、今回の培養法にてGAGの生合成が行われていたことを示す結果が得られた。2~3週間の生合成のパターンは ^3H -glucosamineにおいて、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸が優位を占める点についてはAcottら⁵⁾(ヒト)、Yueら¹⁰⁾(サル)、Nishiyama³⁾(ウサギ)、Creanら¹¹⁾(ウシ)の報告した結果と同様であった。

トロンボスポンジンは分子量450 kDの糖蛋白でTripathiら¹²⁾により正常のヒトおよび豚の線維柱組織における存在が確認されており、この細胞接着分子と老化や原発開放隅角緑内障にみられる細胞充実性の減少との関連が注目されている。この報告の中でヒトの抗体に対して豚眼も同様の反応がみられたと述べているが、我々が今回用いた豚眼に対してこのことを確

かめるため、酵素抗体法にて免疫染色を行った結果、ヒトと同様にコラーゲン細線維間にその局在を認められた。

房水流出抵抗の原因となる物質がいくつか想定されてきている今日、我々の行った3週間にわたる豚眼の線維柱組織における器官培養法が確立された。これにより薬剤やホルモンのこの組織に与える生化学的、形態学的変化を知ることが可能となった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた瀬川雄三教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Rohen JW, Schachtschabel DO, Wehrmann R**: Structural changes of human and monkey trabecular meshwork following *in vitro* cultivation. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 225—232, 1982.
- 2) **Urakawa Y, Miyazaki M, Ishihara A, Segawa K, Watanabe S, Shimizu Y**: Human trabecular meshwork organ culture. *Jpn J Ophthalmol* 32: 401—411, 1988.
- 3) **Nishiyama K**: Glycosaminoglycans of organ-cultured rabbit trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 204: 35—43, 1992.
- 4) **Johnson DH, Tschumper RC**: The effect of organ culture on human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 49: 113—127, 1989.
- 5) **Acott TS, Kingsley PD, Samples JR, Buskirk MV**: Human trabecular meshwork organ culture: Morphology and glycosaminoglycan synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 90—100, 1988.
- 6) **Tripathi BJ, Millard CB, Tripathi RC**: Corticosteroids induce a sialated glycoprotein (Cort-GP) in trabecular cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 51: 735—737, 1990.
- 7) **Bahler CK, Johnson DH**: The porcine eye as a model for aqueous outflow perfusion studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(Suppl): 1161, 1992.
- 8) **Nash RW, Lindquist TD, Kalina RE**: An evaluation of saline irrigation and comparison of povidone-iodine and antibiotic in the surface decontamination of donor eyes. *Arch Ophthalmol* 109: 869—872, 1991.
- 9) **Tripathi RC**: Comparative physiology and anatomy of the aqueous outflow pathway. In: Davson H, Graham LT (Eds): *The eye*. Vol 5. Academic Press, London, UK, 163—356, 1974.
- 10) **Yue BYJT, Elvart JL**: Biosynthesis of glycosaminoglycans by trabecular meshwork cells *in vitro*. *Curr Eye Res* 6: 959—967, 1987.
- 11) **Crean EV, Tyson SL, Richardson TM**: Factors influencing glycosaminoglycan synthesis by calf trabecular meshwork cell cultures. *Exp Eye Res* 43: 365—374, 1986.
- 12) **Tripathi BJ, Tripathi RC, Yang C, Millard CB, Dixit VM**: Synthesis of a thrombospondin-like cytoadhesion molecule by cells of the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 181—188, 1991.