

家兎濾過手術後における proliferating cell nuclear antigen の発現

渡辺 穰爾, 沢口 昭一, 阿部 春樹, 岩田 和雄

新潟大学医学部眼科学教室

要 約

実験的濾過手術後の創傷治癒過程における細胞の増殖活性を, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)を指標として免疫組織化学的に観察した。白色家兎眼に線維柱帯切除術を行い, 術後1, 4, 7, 14日の濾過部を10%緩衝ホルマリンで固定した後パラフィン切片を作成し, 濾過部組織におけるPCNAを標識ストレプトアビジン・ビオチン法を用いて検出した。

濾過部には術後4日からPCNA陽性細胞が増加し, 濾過部の閉塞が始まった。術後7日にはPCNA陽性細胞はさらに増加し, 濾過部はほぼ閉塞した。術後14日には濾過部は瘢痕化組織で完全に閉塞し, PCNA陽性細胞は著明に減少していた。この実験結果は濾過手術に併用する増殖抑制薬物の投与方法に示唆を与えるものであり, またPCNAを指標とすることにより濾過手術後の増殖活性をオートラジオグラフィーよりも簡便に検討できることが実証された。(日眼会誌 97:1274-1278, 1993)

キーワード: 濾過手術, 創傷治癒, Proliferating cell nuclear antigen

Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen Following Filtration Surgery in Rabbits

Joji Watanabe, Shoichi Sawaguchi, Haruki Abe and Kazuo Iwata

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Niigata University

Abstract

We evaluated cell replication in wound healing following experimental filtration surgery. Cell replication was measured via immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen, which is a marker of cell proliferation. Trabeculectomy was performed on albino rabbit eyes, with the filtering site harvested on postoperative days 1, 4, 7, and 14. Samples were fixed with 10% buffered formalin and prepared for paraffin section, and proliferating cell nuclear antigen was detected in filtering site tissue using the labeled streptavidin-biotin method. The number of immunoreactive cells increased at days 4 to 7 and was markedly decreased at day 14; the filtering site was obstructed at days 7 to 14. These findings may have clinical implications for the administration of antiproliferative agents after filtration surgery. Evaluation of cell replication following filtration surgery by detecting proliferating cell nuclear antigen is a simpler technique than autoradiography. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1274-1278, 1993)

Key words: Filtration surgery, Wound healing, Proliferating cell nuclear antigen

別刷請求先: 951 新潟市旭町通1-757 新潟大学医学部眼科学教室 渡辺 穰爾

(平成5年3月31日受付, 平成5年5月25日改訂受理)

Reprint requests to: Joji Watanabe, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Niigata University, 1-757 Asahimachidori, Niigata 951, Japan

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

I 緒 言

緑内障濾過手術の不成功は創傷治癒過程による濾過部の瘢痕化が原因であり¹⁾、この瘢痕化を抑制することが濾過手術を成功に導くために重要となる。既報²⁾では濾過手術後の創傷治癒過程における組織変化を観察し、術後2～3日で線維芽細胞が増殖してくるのを確認したが、濾過手術後の細胞増殖生活について検討した報告は少ない。

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は、細胞周期のデオキシリボ核酸 (DNA) 合成期の核で増加する分子量 36 kDa のポリペプチドである^{3)~6)}。PCNA はデオキシリボ核酸ポリメラーゼ δ の補助蛋白であり、細胞の DNA 合成に重要な蛋白であることが最近の研究で解明されている⁷⁾⁸⁾。PCNA はいろいろな組織の増殖細胞に存在しており、細胞増殖の1つの指標として考えられている⁴⁾⁹⁾。今回の実験では、家兎濾過手術後における細胞の増殖活性を PCNA を指標として観察し、若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

実験対象として体重 3~4 kg の白色家兎 8 匹 8 眼を用いた。動物に対する取り扱い「動物の保護及び管理に関する法律」ならびに「実験動物の使用及び保管等に関する基準」に従った。7 匹の家兎に対し、ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) (20 mg/kg) の耳静脈内投与による全身麻酔と塩酸オキシブプロカイン (ベノキシール®) の点眼麻酔の後、既報²⁾に従い濾過手術を行った。すなわち、耳側上方の結膜を円蓋部付近で切開し、結膜と結膜下組織を角膜輪部まで剥離した後、上直筋耳側の強膜上の血管が分布していない部分に、約 6×3 mm 大の輪部基底半層強膜弁を作成した。その後、強膜角膜移行部で前房側の強角膜を約 3×1 mm 大に切除した。強膜弁の頂点を 10-0 ブロリンで強膜に 2 か所縫合し、結膜を 9-0 ナイロンで連続縫合した。術後抗生物質の筋注および眼軟膏投与を行った。残りの 1 匹については手術を行わず、非手術家兎とした。

非手術家兎および術後 1, 4, 7, 14 日の家兎をペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) の大量静脈内注射により屠殺した。抜眼後、強膜および濾過部強膜弁部分を採取し、矢状断で半切した。0.1 M リン酸緩衝 10% ホルマリン (pH 7.2) で 12 時間固定した後、型通りパラフィン包埋し 5 μ m 切片を作成した。

PCNA の検索はヒストファイン SAB-PO キット® (ニチレイ社) を用いて酵素抗体法染色により以下のように行った。

脱パラフィン後、0.01 M phosphate buffer saline (PBS) で洗浄し、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのために 0.3% 過酸化水素加メタノールで 30 分処理した。PBS 洗浄後、非特異的反応をブロックするために 10% 正常ウサギ血清を 10 分間反応させた。次に一次抗体として、2% ウシ血清アルブミン加 PBS で 100 倍に希釈したマウス抗ラット PCNA モノクローナル抗体 (Dako 社) を 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体としてビオチン化ウサギ抗マウス IgG+IgA+IgM を 10 分間、PBS 洗浄後、酵素試薬としてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 5 分間それぞれ反応させた。これらの反応はすべて室温湿室内で行った。ジアミノベンチジンで発色させた後、マイヤーヘマトキシリンで対比染色した。水洗、エタノール系列による脱水、キシレンによる透徹後、エンテランニュー® (Merck 社) で封入し、ツァイス光学顕微鏡で観察、Fujichrome® ISO 100 にて写真撮影を行った。なお、陰性対照として一次抗体に 100 倍希釈マウス腹水を用いた。

III 結 果

PCNA 陽性細胞は核が褐色に、それ以外の細胞はマイヤーヘマトキシリン染色により青紫色に染色され、明瞭に識別された。

非手術眼の強膜には PCNA 陽性細胞は認められなかった。術後 1 日では、濾過部に炎症細胞の浸潤を認めるのみで濾過部は開存していた。強膜弁下の強膜に PCNA 陽性細胞が少数認められるが、濾過部への浸潤はほとんどみられなかった。術後 4 日では、強膜弁下濾過部および結膜下組織に PCNA 陽性細胞が多数出現しており、濾過部の閉塞が始まっていた。術後 7 日になると PCNA 陽性細胞がさらに増加し、濾過部はほぼ閉塞していた。結膜下組織および上強膜組織にも PCNA 陽性細胞が多数認められた。術後 14 日では、濾過部は完全に瘢痕化組織によって閉塞した。PCNA 陽性細胞の数は術後 7 日より顕著に減少していた (図 1)。

IV 考 按

濾過手術後の濾過部創傷治癒過程については、家兎眼やサル眼を用いた報告がいくつかある^{10)~13)}。それら

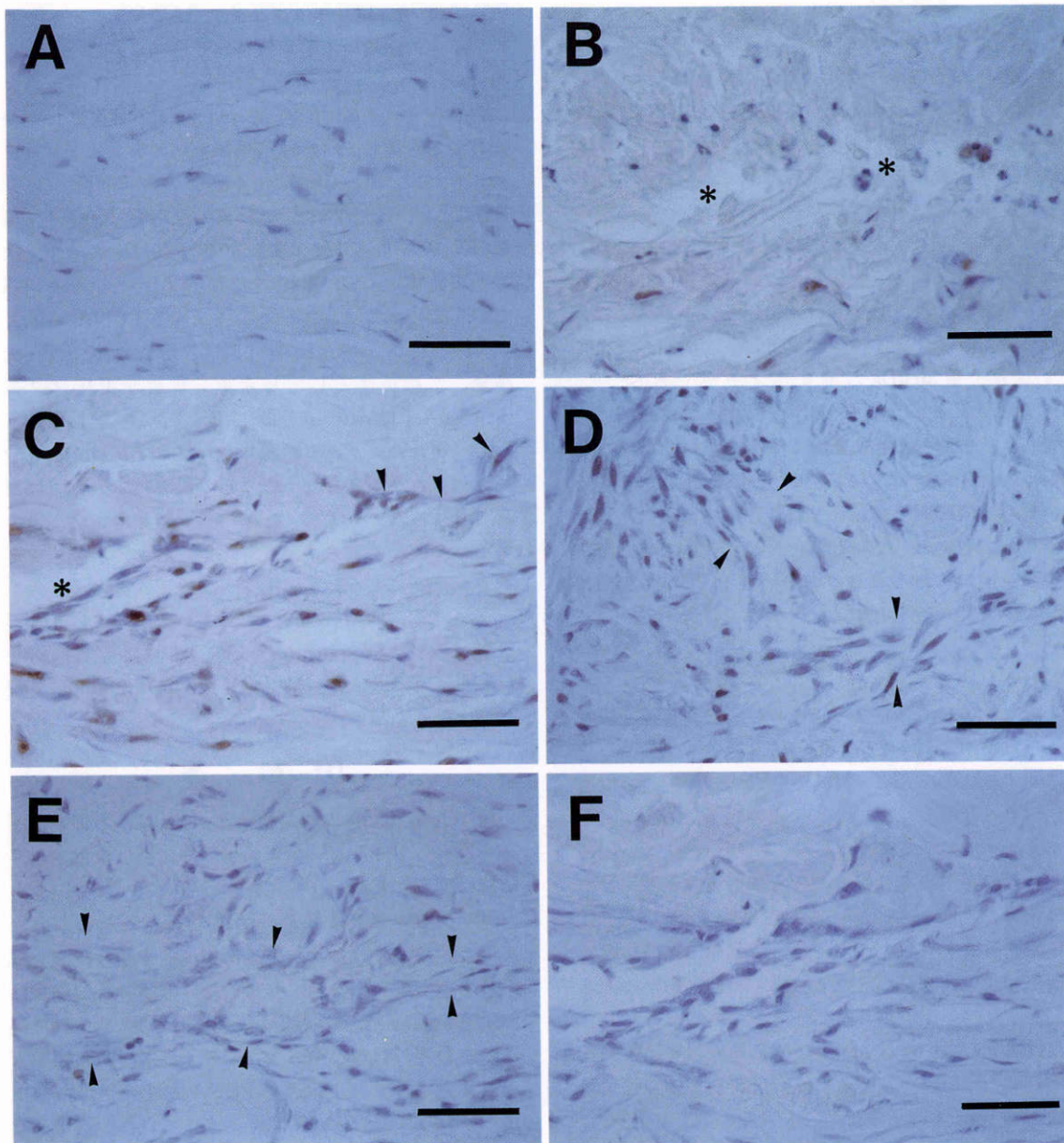


図1 非手術眼の強膜および濾過手術後の強膜濾過部における proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞。

PCNA 陽性細胞は核が褐色に、それ以外の細胞は青紫色に染まっている。A：非手術眼強膜、PCNA 陽性細胞は認められない。B：術後1日。濾過部に炎症細胞の浸潤を認める。強膜弁下の強膜にPCNA 陽性細胞が少数認められるが、濾過部への浸潤はない。濾過部は開存している(星印)。C：術後4日。PCNA 陽性細胞が濾過部周辺の強膜から濾過部にかけて増加している。濾過部(星印)の部分的な閉塞が始まっている(矢尻)。PCNA 陽性細胞のほとんどは紡錘形をしており、線維芽細胞と思われる。D：術後7日。濾過部および濾過部周辺強膜のPCNA 陽性細胞の数はさらに増加し、濾過部(矢尻で囲まれた部位)はほぼ閉塞している。E：術後14日。濾過部(矢尻で囲まれた部位)は完全に閉塞している。PCNA 陽性細胞の数は術後7日と比較して顕著に減少している。F：術後4日組織の陰性対照。細胞の核はすべて青紫色に染色されており、特異的な反応は認められない。写真左が角膜側。(バーは50 μ m)

によれば、術後 2～3 日目頃から線維芽細胞の増殖が始まり、肉芽組織を形成し、最終的に瘢痕化により濾過部は閉塞する。白色家兎に濾過手術を行った既報²⁾では、強膜弁下濾過部には術後 6 時間で炎症細胞が浸潤し、術後 2 日目で線維芽細胞が強膜弁下の周辺部から出現し、術後 5 日で結合組織形成が始まり、術後 7 日で濾過部はほぼ閉塞した。しかし、濾過手術後の細胞増殖活性について検討した報告は少ない。Jampel ら¹²⁾はカンクイザルに濾過手術を行い、オートラジオグラフィーにより術後における細胞の³H-thymidine のとりこみ量を検討した。それによれば、³H-thymidine のとりこみは術後 24 時間でみられ、術後 5 日で最大となり術後 11 日で基準レベルに戻った。しかし、オートラジオグラフィーは放射性物質を使用するなど、複雑な操作を必要とするのが問題点であった。

増殖する細胞は細胞周期に入ると S 期に DNA を複製し、M 期に細胞分裂をする。M 期と S 期の間には G₁ および G₂ 期があるが、PCNA は G₁ 期から S 期にかけて増加する核内抗原であり³⁾、PCNA 陽性細胞の増加は DNA を複製する状態にある細胞の増加、すなわち細胞増殖能の亢進を意味する。PCNA はホルマリン固定でも固定時間が短時間であれば失活せず、パラフィン切片でも検出できるため⁹⁾、PCNA を指標とすることにより、より簡便に細胞増殖能を判定できるという。

眼科領域において PCNA についての報告はきわめて少なく、著者らが調べた範囲ではラット水晶体上皮細胞の増殖能を検討した山口ら¹⁴⁾の報告があるのみである。それによれば、胎生期から生後 4 日までの水晶体ではすべて水晶体上皮細胞でほぼ均一に PCNA が認められ、生後 4 週以降は週齢とともに水晶体上皮細胞が減少し、PCNA 陽性細胞は減少した。今回の実験では、PCNA を指標として濾過手術後濾過部における細胞増殖能を検討した。術後 1 日の時点で PCNA 陽性細胞は濾過部周辺強膜に出現するが、濾過部には存在しなかった。術後 4 日になると濾過部辺縁および濾過部周辺強膜に PCNA 陽性細胞が多数出現し、濾過部の閉塞が始まった。術後 7 日には PCNA 陽性細胞はさらに増加し、濾過部はほぼ閉塞した。術後 14 日には濾過部は瘢痕化組織で完全に閉塞し、PCNA 陽性細胞は減少していた。この結果は、オートラジオグラフィーを用いた Jampel ら¹²⁾の報告とほぼ一致しており、濾過部周辺強膜からの濾過部への細胞浸潤および細胞増殖は術後 4 日後から始まり、7 日前後に最高と

なり以後低下することが示された。

濾過手術に 5-fluorouracil (5-FU) や mitomycin C (MMC) などの抗腫瘍剤を併用して濾過部の術後瘢痕化を抑制し、術後眼圧コントロール成功率を向上させた報告が多くなされている^{15)~19)}。特に 5-FU は DNA 合成時にとりこまれて DNA 合成を阻害する代謝拮抗剤であり、この実験結果から、5-FU の術後投与は DNA 合成のピークである術後 4～7 日前後に特に集中的に行うのが効果的であると予想される。今後は眼科領域でも腫瘍などさまざまな分野において、PCNA が細胞増殖能の 1 つの指標として検討され得ると予想される。

文 献

- 1) Skuta GL, Parrish RK II: Wound healing in glaucoma filtering surgery. *Surv Ophthalmol* 32: 149—170, 1987.
- 2) 渡辺穰爾: 家兎濾過手術における濾過部のフィブリンおよびフィブロネクチンの動態. *眼紀* 43: 1441—1447, 1992.
- 3) Takasaki Y, Deng J-S, Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154: 1899—1909, 1981.
- 4) Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ: Cyclin: A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leuk Res* 8: 143—157, 1984.
- 5) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374—376, 1984.
- 6) Waseem NH, Lane DP: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96: 121—129, 1990.
- 7) Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326: 515—517, 1987.
- 8) Prelich G, Tan C-K, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* 326: 517—520, 1987.
- 9) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, et al: Proliferating

- cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162: 285—294, 1990.
- 10) **Seetner A, Morin JD**: Healing of trabeculectomies in rabbits. *Canad J Ophthalmol* 14: 121—125, 1979.
 - 11) **Desjardins DC, Parrish RK II, Folberg R, Nevarez J, Heuer DK, Gressel MG**: Wound healing after filtering surgery in owl monkeys. *Arch Ophthalmol* 104: 1835—1839, 1986.
 - 12) **Jampel HD, McGuigan LJB, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Quigley HA**: Cellular proliferation after experimental glaucoma filtration surgery. *Arch Ophthalmol* 106: 89—94, 1988.
 - 13) **Miller MH, Grierson I, Unger WI, Hitchings RA**: Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalm Surg* 20: 350—357, 1989.
 - 14) **山口慶子, 庄司昭世, 加藤圭一, 玉井 信**: Proliferating cell nuclear antigen によるラット水晶体上皮細胞増殖能の検討. あたらしい眼科 8: 1935—1938, 1991.
 - 15) **Heuer DK, Parrish RK II, Gressel MG, Hodapp E, Palmberg PF, Anderson DR**: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. II. A pilot study. *Ophthalmology* 91: 384—394, 1984.
 - 16) **Nakano Y, Araie M, Shirato S**: Effect of postoperative subconjunctival 5-fluorouracil injections on the surgical outcome of trabeculectomy in the Japanese. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 27: 569—574, 1989.
 - 17) **Watanabe J, Iwata K, Sawaguchi S, Nanba K**: Trabeculectomy with 5-fluorouracil. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 72: 455—461, 1991.
 - 18) **Chen C-W, Huang H-T, Sheu M-M**: Enhancement of IOP control effect of trabeculectomy by local application of anticancer drug. *Acta XXV Concilium Ophthalmologicum, Rome*. 1487—1491, 1986.
 - 19) **Kitazawa Y, Kawase K, Matsushita H, Minobe M**: Trabeculectomy with mitomycin. A comparative study with fluorouracil. *Arch Ophthalmol* 109: 1693—1698, 1991.