

# ブタ膵エラスターゼ-1の人線維柱組織内エラスチンに及ぼす影響

—免疫組織化学的研究：第3報。原発開放隅角緑内障眼での検討—

保谷卓男

信州大学医学部眼科学教室

## 要約

ロビクリル K4M に包埋した正常および原発開放隅角緑内障眼の線維柱組織を用いて、プロテイン A-金法によりエラスチン免疫染色を行い、弾性線維以外の細胞外物質におけるエラスチンの局在を電子顕微鏡免疫組織化学的に検討した。また、同組織にブタ膵エラスターゼ-1 (PPE) を作用させた後、前述の如くエラスチン免疫染色を行い、エラスチンの免疫局在性の変化を検討した。結果は、① 原発開放隅角緑内障眼では、Schlemm 管内壁直下の細線維様物質内に正常眼にはみられない、エラスチンの局在を示す金粒子が多数みられた。② PPE を作

用させると、金粒子の集積が減少した。本研究結果から、原発開放隅角緑内障眼の線維柱組織では、Schlemm 管内壁直下の細線維様物質内に多量のエラスチンが存在し、それが PPE により分解されることが判明した。(日眼会誌 98:520-526, 1994)

キーワード：人線維柱組織，原発開放隅角緑内障，プロテイン A-金法，エラスチン，ブタ膵エラスターゼ-1

## Effects of Porcine Pancreatic Elastase-1 on Elastin in Human Trabecular Meshwork

—Immunohistochemical Studies: Report 3.  
Primary Open Angle Glaucoma—

Takuo Hoya

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

### Abstract

The aim of this study was to determine the location of elastin in the extracellular material and to estimate the influence of porcine pancreatic elastase-1 (PPE) on the elastin in human trabecular tissue. Trabecular tissues obtained from normal post-mortem eyes and trabeculectomy specimens of primary open angle glaucoma (POAG) were used in this study. The tissues were embedded in Lowicryl K4M and sectioned for electron microscopy. First, the sections were subjected to protein A-gold immunohistochemical staining to determine the location of elastin in the tissues. Second, the sections were exposed to PPE, before immunostaining, to evaluate the change of immunolocalization of the gold particles in the tissue. The results were as follows. In POAG specimens, gold particles indicat-

ing the presence of elastin were located in the area of fine fibrillar-like material in the subendothelial layers of Schlemm's canal in POAG specimens. In normal eyes, few gold particles were localized in the area. The density of gold particles in the area was reduced by PPE in POAG specimens. These results show that elastin is localized in the area of fine fibrillar-like material in the subendothelial layers of Schlemm's canal of POAG, and that PPE dissolves the elastin in the area. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 520-526, 1994)

Key words: Human trabecular tissue, Primary open angle glaucoma, Protein A-gold, Elastin, Porcine pancreatic elastase-1

別刷請求先：390 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 保谷 卓男  
(平成5年11月9日受付，平成6年2月9日改訂受理)

Reprint requests to: Takuo Hoya, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine,  
3-1-1 Asahi Matsumoto-shi, Nagano-ken 390, Japan

(Received November 9, 1993 and accepted in revised form February 9, 1994)

## I 緒 言

原発開放隅角緑内障では、房水流出抵抗の場である線維柱組織の電子顕微鏡学的研究が盛んに行われており、内皮網内に無定形物質、細線維様物質などの細胞外物質の増加沈着が確認され、それが房水流出抵抗増大メカニズムに重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>1)2)</sup>。最近では、線維柱組織における細胞外物質の中でも、通常の電子顕微鏡(電顕)では観察できないムコ多糖や蛋白質が房水流出調節機構に関与している可能性が示唆されており<sup>3)~5)</sup>、線維柱組織の細胞外物質には多種の蛋白質の存在が報告されている<sup>6)~11)</sup>。しかし、如何なる細胞外物質が房水流出抵抗増大の直接的原因であるか、また、如何にして原因となる細胞外物質を減少させられるのかは未だ不明である。

弾性組織における重要な構成成分であるエラスチンは、線維柱組織においては、全蛋白質量の7%ほどの微量な蛋白である<sup>12)</sup>が、ステロイドを投与することにより線維柱組織細胞が産生することがわかり<sup>13)</sup>、エラスチンがステロイド緑内障および原発開放隅角緑内障の房水流出抵抗増大メカニズムに関与している可能性が示唆されている。著者は、ロビクリルK4Mに冷包埋した正常および原発開放隅角緑内障の線維柱組織を、プロテインA-金法により電顕免疫組織化学的に検索し、弾性線維内にエラスチンの局在を確認し、また、そのエラスチンがブタ脛エラスターゼ-1(PPE)によって分解されることを報告した<sup>14)</sup>。

そこで今回、原発開放隅角緑内障の線維柱組織において、弾性線維以外の細胞外物質内にエラスチンが存在するか、また、正常眼に比し増加しているかどうかを、プロテインA-金法によって電顕免疫組織化学的に検索するとともに、そのエラスチンがPPEによって分解されるかどうかを、金粒子の集積の変化により検討したのでここに報告する。

## II 実験方法

### 1. 電子顕微鏡試料作製

電子顕微鏡試料作製方法の詳細は、既報<sup>14)</sup>の如くであるが、緑内障の既往のない51~88歳の正常屍体摘出眼6例6眼を遺族の同意を得た上で使用し、線維柱組織を含む4mm角の隅角組織片を作製した。また42~67歳の原発開放隅角緑内障患者6例6眼から、線維柱帯切除術で得られた3×4mmの隅角組織片を使用した。組織片は、切除後ただちに4%パラホルムアルデヒド/0.1%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)の混合液で4℃で24時間固定し、ロビクリルK4Mに冷包埋した。包埋した試料から、厚さ0.1μmの超薄切片を作製し、ニッケルグリッドに載せた。

### 2. エラスチン免疫染色法

エラスチン免疫染色は、既報<sup>14)</sup>とほぼ同様の手法で行った。超薄切片を載せた grids を0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)/0.05% トライトン X-100/牛血清アルブミン(5 mg/ml)混合液に室温で1時間浸漬し、非特異的反応を除去した。この後、0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)/0.05% トライトン X-100/牛血清アルブミン(5 mg/ml)混合液で100倍に希釈した、ウサギ抗ヒト大動脈αエラスチン血清(Elastin products Co., St. Louis, MO, USA)に室温で4時間浸漬した。0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)/0.05% トライトン X-100小滴で洗浄後、0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)/0.05% トライトン X-100/牛血清アルブミン(5 mg/ml)で30倍に希釈したプロテインA-金(Amersham Int. plc. Amersham, UK)溶液に室温で2時間浸漬した。再度0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)/0.05% トライトン X-100小滴で洗浄後、超薄切片をウラン、鉛染色し、日立HS-9型透過電子顕微鏡で観察した。

### 3. エラスターゼ消化実験

ブタ脛エラスターゼ-1(PPE)(エーザイ、東京)を0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に溶解し、1 mg/ml のPPE希釈溶液を作製した。この溶液に、上記の超薄切片を載せたグリッドを37℃で2時間浸漬した。その後、上述の如くエラスチン免疫染色を行い、ウラン、鉛染色の後、透過電子顕微鏡で観察した。また、0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に、37℃で2時間浸漬した試料を対照とした。

## III 結 果

### 1. エラスチン免疫染色所見

原発開放隅角緑内障でも、正常眼に見られると同様に、弾性線維内の低電子密度の無定型な部分にエラスチンの局在を示す金粒子が多数存在した(図1)。正常眼の線維柱組織では、Schlemm管内壁直下に見られる細線維様物質には、エラスチンの存在を示す金粒子の集積はほとんど認められなかった(図2)が、一方、原発開放隅角緑内障では、Schlemm管内壁直下に見られる細線維様物質のその線維に沿って、多数の金粒子の集積が認められた(図3)。正常眼、原発開放隅角緑内障とも、その他の細胞外物質であるコラーゲン線維、基底膜様物質、長周期線維などには金粒子の集積は全く認められなかった。

### 2. エラスターゼ消化所見

PPEを作用させた試料では、原発開放隅角緑内障でも、正常眼と同様にほとんどの弾性線維において、内部に金粒子の集積はほとんど認められなかった(図4)。また、原発開放隅角緑内障のSchlemm管内壁直下に見られる細線維様物質に多数沈着していた金粒子は、PPEを作用させた後はほとんど認められなかった(図5)。

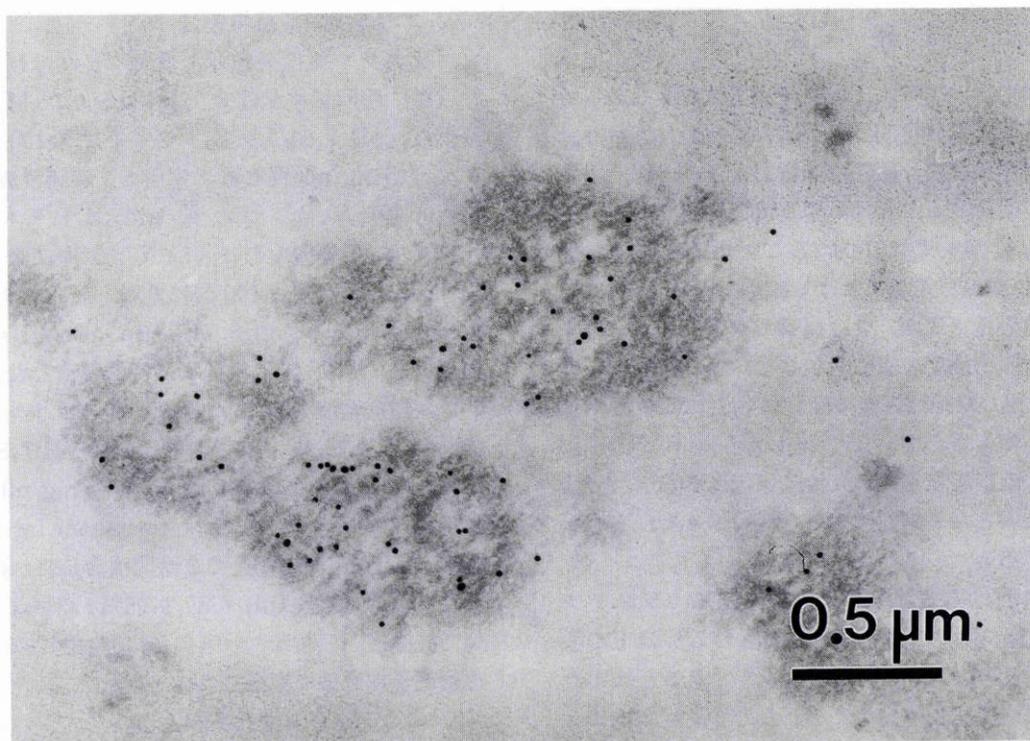


図1 弾性線維のエラスチン免疫染色像.

原発開放隅角緑内障でも、正常眼と同様にすべての弾性線維にエラスチンの局在を示す金粒子が多数認められる。

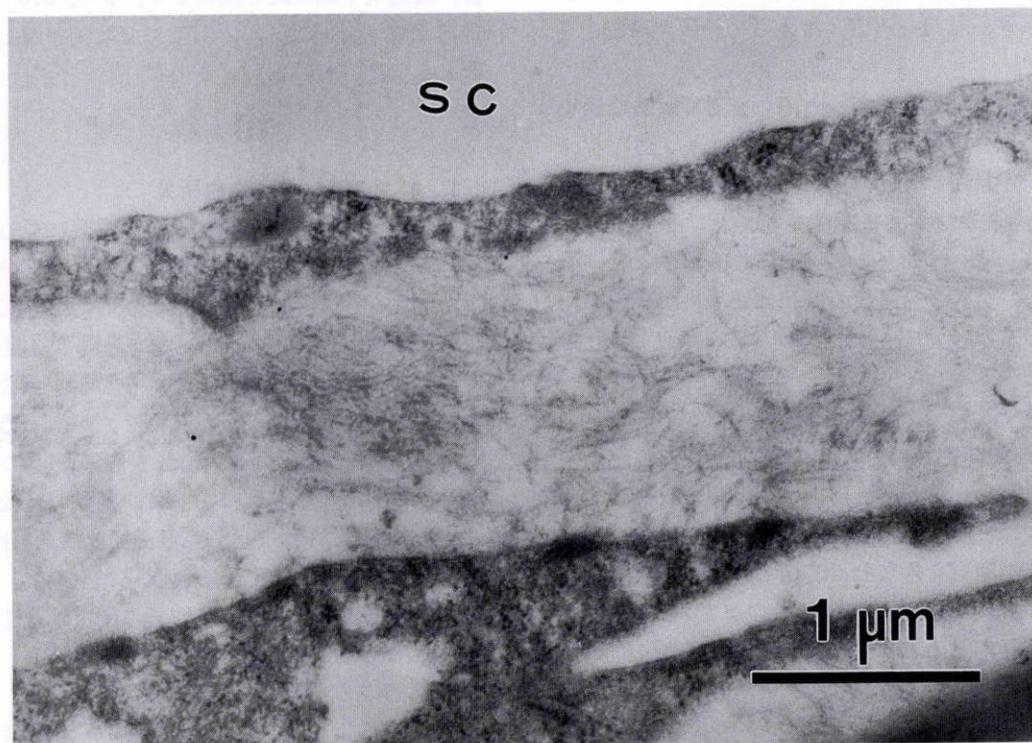


図2 正常眼の内皮網.

正常眼では、Schlemm 管内壁直下に見られる細線維様物質にエラスチンの存在を示す金粒子の集積はほとんど認められない。

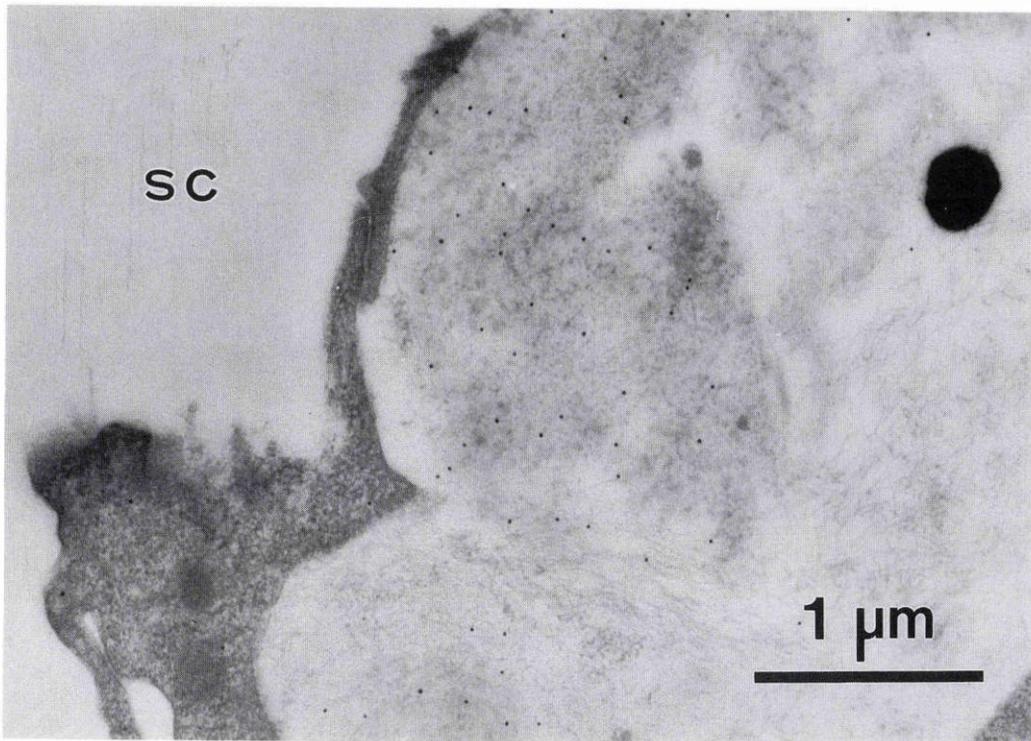


図3 原発開放隅角緑内障の内皮網.

原発開放隅角緑内障では、Schlemm管内壁直下に見られる細線維様物質にエラスチンの存在を示す金粒子が多数認められる。

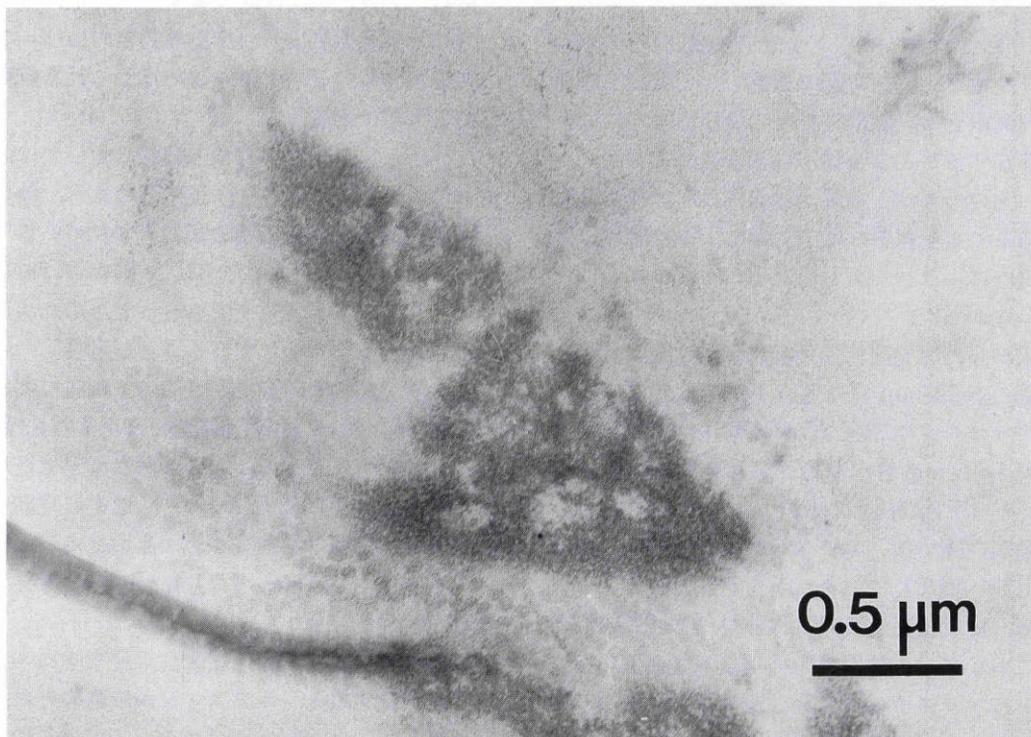


図4 ブタ膵エラスターゼ-1 (PPE) を作用させた弾性線維.

PPE を作用させた試料では、原発開放隅角緑内障でも正常眼と同様にすべての弾性線維に、図1で見られた金粒子の集積はほとんど認められない。

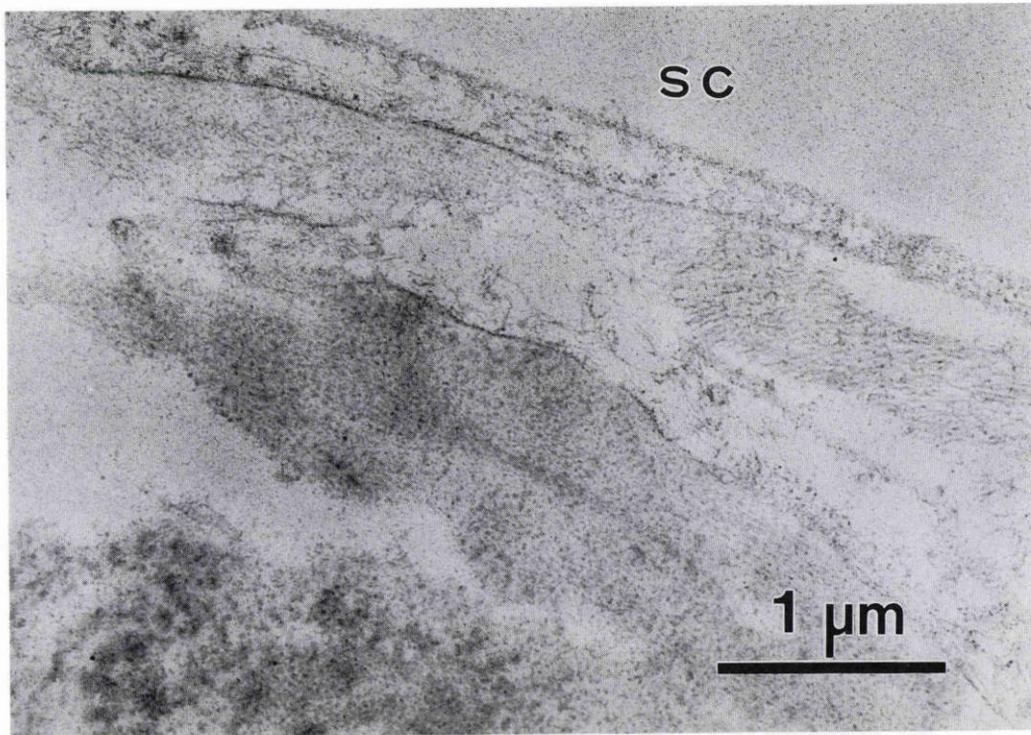


図5 PPEを作用させた原発開放隅角緑内障の内皮網。

PPEを作用させた後は、原発開放隅角緑内障のSchlemm管内壁直下の細線維様物質には、金粒子の集積はほとんど認められない。

#### IV 考 按

著者<sup>14)</sup>は、今回と同様にプロテインA-金法を用いたエラスチン免疫染色を行い、電顕で観察し、正常眼、原発開放隅角緑内障とも、線維柱組織の弾性線維内にはエラスチンが存在することを金粒子の集積像により明らかにし、また、その所見は正常眼、原発開放隅角緑内障とも同様であることを報告した。しかし、弾性線維以外の細胞外物質内にエラスチンが存在するか否かについては検討していなかった。

本研究結果から、原発開放隅角緑内障の線維柱組織では、内皮網のSchlemm管内壁直下に見られる細線維様物質内にエラスチンの局在を示す金粒子が多数認められ、正常眼のSchlemm管内壁直下に存在する細線維様物質内には、その所見は認められなかった。このことは、原発開放隅角緑内障では、エラスチンを含む細線維様物質が正常眼に比べ増加していることを示している。

Murphyら<sup>7)</sup>は、間接免疫蛍光抗体法で、光学顕微鏡(光顕)レベルにおいて、正常人線維柱組織の線維柱層板のcentral coreにエラスチンの局在を証明しているが、内皮網には証明されなかったと報告している。また、Gongら<sup>11)</sup>は、Epon-Aralditeに包埋した正常人線維柱組織において、プロテインA-金法を用いて、弾性線維内の低電子密度な部分に特異的に金粒子の集積を認め、この部分にエラスチンが局在することを報告しているが、弾性線維以外の細胞外物質内にはエラスチンの局在は確認され

ていない。これらの報告はともに正常人線維柱組織を観察しており、手法は異なるものの、正常眼の線維柱組織では、弾性線維以外の細胞外物質内にはエラスチンの局在を示す金粒子の集積を認めなかった本研究結果を支持するものである。

一方、原発開放隅角緑内障においては、以前から通常の電顕的研究により、正常眼に比べ、特に内皮網内に多量の細胞外物質の蓄積が報告されている<sup>12)</sup>。しかし、Johnsonら<sup>3)</sup>、Ethierら<sup>4)</sup>は、電顕における細胞外物質の量よりも、ムコ多糖や蛋白質の方が房水流出抵抗増大に重要な役割を果たしていることを示唆し、Alvaradoら<sup>5)</sup>は、原発開放隅角緑内障の内皮網内の高電子密度の物質(RohenのいうIII型 plaque)は正常の23%増加しているにすぎず、よって、それが房水流出抵抗増大の原因になるとは考えられず、やはり、通常の電顕では観察できないムコ多糖や蛋白質が房水流出抵抗調節に最も重要であると述べ、Ethierら、Johnsonらの考えを支持している。

Yunら<sup>13)</sup>は、培養人線維柱組織細胞にステロイドを加えて培養すると、エラスチンが細胞内外に増加することを報告し、エラスチンがステロイド緑内障および原発開放隅角緑内障の眼圧上昇メカニズムに関与している可能性を示唆した。また、瀬川<sup>15)</sup>は、原発開放隅角緑内障の線維柱組織では、内皮網のSchlemm管内壁直下の細線維様物質内に大量のエラスチンが存在することを確認し、原発開放隅角緑内障では、エラスチンを含む細線維

様無定形物質が房水流出抵抗増大の原因である可能性を示唆した。

本研究において、正常眼の線維柱組織では、弾性線維以外の細胞外物質には明らかなエラスチンの局在は認められなかったが、原発開放隅角緑内障の線維柱組織では、内皮網の Schlemm 管内壁直下の細線維様物質にエラスチンの局在を示す金粒子が多数認められている。海平<sup>16)</sup>も著者と同様の手法を用いて、原発開放隅角緑内障の Schlemm 管内壁直下の細線維様物質にエラスチンの局在を示す金粒子の集積を認めており、本研究結果は、それを支持するものである。

可溶性エラスチン（トロポエラスチン）は種々の細胞によって合成分泌され<sup>17)~20)</sup>、細線維束内で架橋を形成し、不溶性のエラスチンとなり、弾性線維を形成する<sup>21)</sup>といわれている。このことは、原発開放隅角緑内障では、線維柱組織細胞によって過剰に合成分泌された可溶性エラスチンが内皮網の Schlemm 管内壁直下の細線維様物質の細線維束内で架橋を形成し、不溶性のエラスチンとなって存在していることを示唆している。そして、このエラスチンを多量に含む細線維様無定形物質が房水流出抵抗増大の原因となり得ると考えられる。

著者<sup>14)</sup>は、かなり低濃度の PPE でも線維柱組織の弾性線維内のエラスチンを分解することを報告した。本研究では高濃度の PPE を使用したが、弾性線維のみならず、原発開放隅角緑内障の内皮網 Schlemm 管内壁直下の細線維様物質に多数認められたエラスチンの局在を示す金粒子の集積が、PPE を作用させることによって明らかに減少した。このことは、PPE が Schlemm 管内壁直下の細線維様物質に含まれるエラスチンも分解することを示している。

また、著者<sup>22)</sup>は、経口投与された PPE は血中から房水を介して線維柱組織へ移行し、同組織内の弾性線維のエラスチンを分解することを報告した。よって、本研究結果から、原発開放隅角緑内障では、内皮網 Schlemm 管内壁直下の細線維様物質内にエラスチンが増加しており、それが房水流出抵抗増大の原因となっている可能性があり、また、そのエラスチンが PPE によって分解されることが判明したことから、原発開放隅角緑内障患者に経口投与された PPE が線維柱組織へ移行し、同組織内の Schlemm 管内壁直下の細線維様物質内に増加しているエラスチンが分解されれば、増大している房水流出抵抗が減少する可能性があることが示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究および論文に対して、御指導、御校閲を賜りました恩師、瀬川雄三教授、ならびに本学第一解剖学教室白田信光助教授に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Rohen JW, Witmer R: Electron microscopic studies on the trabecular meshwork in glaucoma simplex. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 183: 251—266, 1972.
- 2) Segawa K: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 19: 317—338, 1975.
- 3) Johnson M, Ethier CR, Kamm RD, Grant WM, Epstein DL, Gaasterland D: The flow of aqueous humor through micro-porous filters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 92—97, 1986.
- 4) Ethier CR, Kamm RD, Palaszewski BA, Johnson MC, Richardson TM: Calculations of flow resistance in the juxtacanalicular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1741—1750, 1986.
- 5) Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG: Juxtacanalicular tissue in primary open angle glaucoma and in nonglaucomatous normals. *Arch Ophthalmol* 104: 1517—1528, 1986.
- 6) Floyd BB, Cleveland PH, Worthen DM: Fibronectin in human trabecular drainage channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 797—804, 1985.
- 7) 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.
- 8) Lütjen-Drecoll E, Rittig M, Rauterberg J, Jander R, Mollenhauer J: Immunomicroscopical study of type VI collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 48: 139—147, 1989.
- 9) Marshal GE, Konstas AG, Lee WK: Immunolocalization of type IV collagen and laminin in the aging human outflow system. *Exp Eye Res* 51: 691—699, 1990.
- 10) Marshal GE, Konstas AG, Lee WK: Immunogold ultrastructural localization of collagens in the aged human outflow system. *Ophthalmology* 98: 692—700, 1991.
- 11) Gong H, Trinkaus-Randall V, Freddo TF: Ultrastructural immunocytochemical localization of elastin in normal human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 8: 1071—1082, 1989.
- 12) Horstman HJ, Rohen JW, Sames K: Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Aging Dev* 21: 121—136, 1983.
- 13) Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsome DA, Alvarado JA: Protein secreted by human trabecular cells-Glucocorticoid and other effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2012—2022, 1989.
- 14) 保谷卓男: ブタ睪 elastase-1 の人線維柱組織内エラスチンに及ぼす影響—免疫組織化学的研究: 第1報. *日眼会誌* 97: 1011—1027, 1993.
- 15) 瀬川雄三: 原発開放隅角緑内障と前房隅角. *あたらしい眼科* 9: 1513—1522, 1992.
- 16) 海平淳一: 正常および原発開放隅角緑内障の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. *日眼会誌* 97: 1143—1150, 1993.
- 17) Fahrenbath WH, Sandberg LB, Cleary EG: Ultrastructural studies on early elastogenesis.

- 1) Rohen JW, Witmer R: Electron microscopic studies on the trabecular meshwork in glaucoma simplex. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp*

- Anat Res 155 : 563—576, 1966.
- 18) **Ross R** : The smooth muscle cell II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. J Cell Biol 50 : 172—186, 1971.
  - 19) **Thyberg J, Hinek A, Nilsson J, Friberg U** : Electron microscopic and cytochemical studies of rat aorta. Intracellular vesicles containing elastin and collagen-like material. Histochem J 11 : 1—17, 1979.
  - 20) **Schwartz E, Goldfischer S, Coltoff-Schiller B, Blumenfeld OO** : Extracellular matrix microfibrils are composed of core proteins coated with fibronectin. J Histochem Cytochem 33 : 268—274, 1985.
  - 21) **Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG** : Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. N Eng J Med 304 : 566—579, 1981.
  - 22) **保谷卓男** : プタ豚 elastase-1 の人線維柱組織内 elastin に及ぼす影響—免疫組織化学的研究 : 第2報. 日眼会誌 98 : 13—22, 1994.
-