

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4報。偽水晶体嚢性緑内障での検討—

保 谷 卓 男

信州大学医学部眼科学教室

要 約

ロビクリル K4M に包埋した偽水晶体嚢性緑内障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、偽落屑物質 (PSX) 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 PSX にエラスチンの局在を示す金粒子の集積が多数認められた。② PPE を作用させると、PSX の金粒子の集

積が減少した。本研究結果から、偽水晶体嚢性緑内障の線維柱組織に見られる PSX にはエラスチンが存在し、PPE は、そのエラスチンを分解することが判明した。(日眼会誌 98:527—532, 1994)

キーワード：偽水晶体嚢性緑内障、偽落屑物質、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 4.
Pseudoexfoliation 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 pseudoexfoliative material (PSX) in trabecular tissue of pseudoexfoliation (PE) glaucoma and to estimate the influence of porcine pancreatic elastase-1 (PPE) on elastin in PSX. Trabecular tissue obtained from trabeculectomy specimens of PE glaucoma were used. 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 tis-

sue. The results were as follows. The gold particles indicating the presence of elastin were located in the PSX as well as in elastic fibers. The density of gold particles in PSX was reduced by PPE. These results show that elastin is located in PSX in trabecular tissue of PE glaucoma, and that PPE dissolves the elastin in PSX. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:527—532, 1994)

Key words: Pseudoexfoliation glaucoma, Pseudoexfoliative material, 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

水晶体前面、瞳孔縁部などに白色ふけ様の沈着物として認められる水晶体偽落屑を伴う開放隅角緑内障は、偽水晶体嚢性緑内障と呼ばれ、偽落屑物質 (PSX) による線維柱組織の閉塞が房水流出抵抗増大の原因と考える説^{1)~5)}が有力であるが、その本態については未だ不明である。以前から、電子顕微鏡学的研究が盛んに行われ、PSX の微細構造が明らかにされるとともに、免疫学的研究によって、PSX には多種の成分が存在する⁶⁾ことが明らかになりつつある。最近、弾性組織の構成成分である弾性線維やオキシタラン線維と PSX は、微細構造上常に密接に関連して存在している^{7)~9)}とともに、弾性線維の成分である微細線維蛋白¹⁰⁾、フィブリリン¹¹⁾、エラスチン¹²⁾、アミロイド P 蛋白¹³⁾、ビトロネクチン¹⁴⁾などの蛋白が PSX に存在することが確認され、PSX は弾性組織における細胞外物質、特に弾性線維の産生異常および変性の結果から引き起こされるもの、つまりは「弾性線維症」の一つのタイプであることが示唆されている¹⁵⁾。

そこで今回、弾性組織における重要な構成要素である弾性線維に存在することが知られているエラスチンが、偽水晶体嚢性緑内障の線維柱組織における PSX に存在するか否かを、プロテイン A-金法を用いた免疫染色を行い検討した上で、エラスチン分解作用をもつブタ膀胱エラスターゼ-1 (PPE) が PSX 内のエラスチンを分解するか否かを金粒子の免疫局在性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¹⁶⁾の如くであるが、67~87歳の偽水晶体嚢性緑内障患者 11 例 12 眼から線維柱帯切除術で得られた 3×4 mm の隅角組織を含む角強膜組織片を使用した。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/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) の混合液で 4℃で 24 時間固定した。

組織固定後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)/0.1 M リジン/0.15 M 塩化ナトリウムの混合液で洗浄後、エタノール系列で脱水し、ロビクリル K 4 M に冷包埋した。

包埋した試料から超ミクロトーム (Ultratome III, LKB, Sweden) を用いて、厚さ 0.1 μm の超薄切片を作製し、支持膜処理したニッケルグリッドに載せた。

2. エラスチン免疫染色

エラスチン免疫染色は既報¹⁶⁾とはほぼ同様の手法で行った。超薄切片を載せたグリッドを 0.05 M 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、0.05 M 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。0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)/0.05% トライトン X-100 で洗浄後、0.05 M 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 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、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)/0.05% トライトン X-100 で洗浄後、超薄切片を酢酸ウラン、クエン酸鉛染色し、電子顕微鏡で観察した。

3. エラスターゼ消化実験

ブタ膀胱エラスターゼ-1 (PPE) (ユーザイ、東京) を 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、1 mg/ml の希釈液を作製した。この希釈液に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、前述の如くエラスチン免疫染色し、透過電子顕微鏡で観察した。また、0.05 M 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

線維柱組織内のすべての弾性線維内にエラスチンの局在を示す金粒子の集積が認められ (図 1)，それは細線維で囲まれた低電子密度の無定型な部分に集積していた。

落屑物質 (PSX) にも金粒子の沈着が見られ (図 1, 2)，その集積は太い線維に接して認められた。金粒子の集積密度は、弾性線維のそれよりやや粗であった。また、その他の細胞外物質内には金粒子の沈着は認められなかった。

2. エラスターゼ消化所見

ブタ膀胱エラスターゼ-1 (PPE) を作用させた試料では、すべての弾性線維において、内部の金粒子の集積は明らかに減少した (図 3)。また、PSX は、その微細構造に変化は見られなかったが、金粒子の集積はほとんど認められなかった (図 3)。

IV 考 按

本研究結果から、偽水晶体嚢性緑内障の線維柱組織内に存在する落屑物質 (PSX) 内に、エラスチンの存在を示す金粒子の集積が認められ、エラスチンは PSX の構成成分の一つであることが判明した。

PSX の構成成分については、以前から多くの研究が行われてきた。Ringvold¹⁷⁾は、アミノ酸分析により、PSX にはコラーゲンとは明らかに異なる蛋白が存在することを報告した。Dvorak-Theobald¹⁾、Harnish³⁾、Horven¹⁸⁾、Davanger¹⁹⁾、Baba²⁰⁾は、組織化学的研究により、ムコ多糖あるいは糖蛋白の存在を報告し、それが PSX の重要

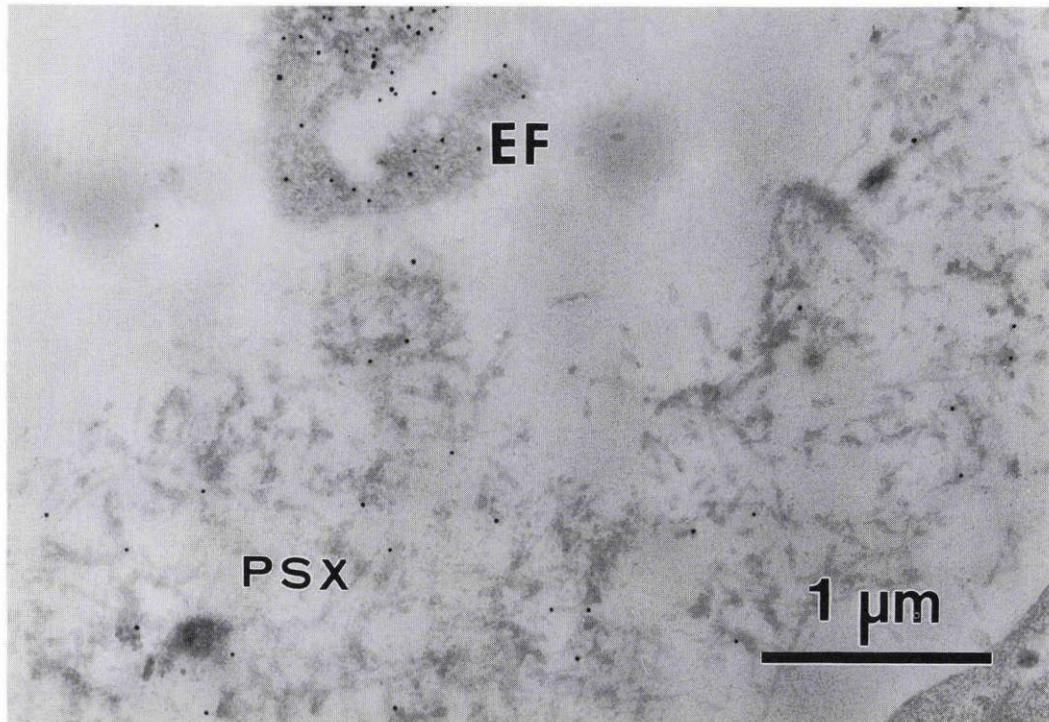


図1 弾性線維(EF)と偽落屑物質(PSX)のエラスチン免疫染色像。
EFのみでなく、PSXにもエラスチンの局在を示す金粒子の集積が認められる。

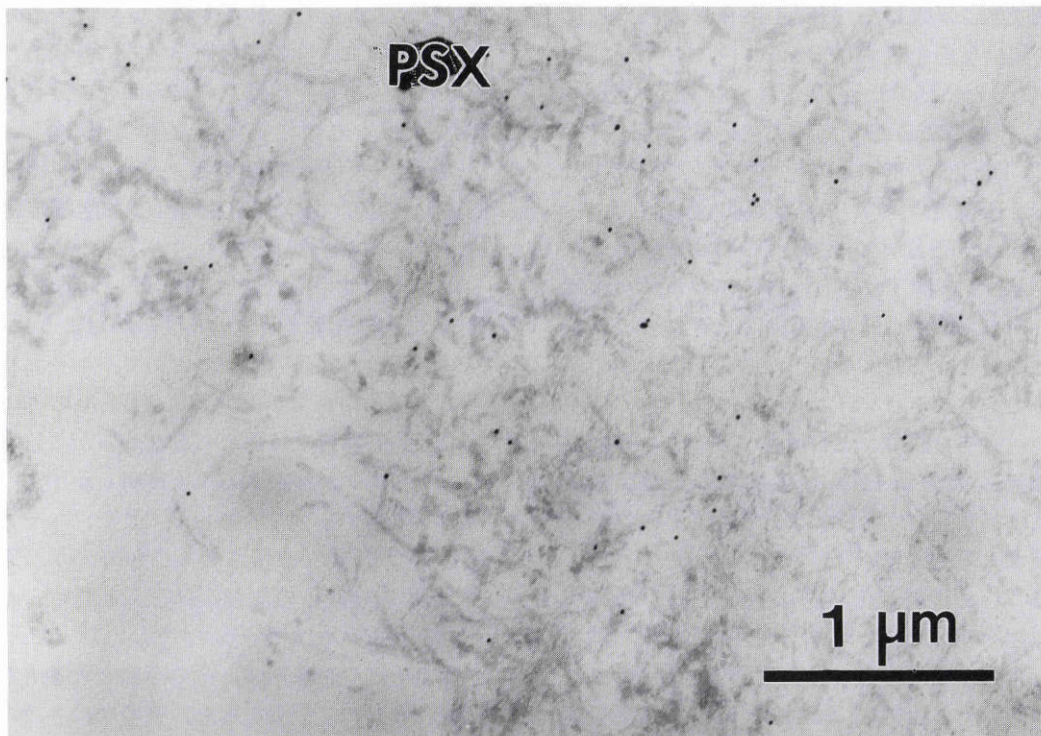


図2 PSXのエラスチン免疫染色像。
図1と同様、エラスチンの局在を示す金粒子の集積が認められる。

な構成要素であることを示した。また、アミロイドとの関連についての報告も多く、瀬川²¹⁾は、アミロイド線維とPSXは、ともに種々の蛋白分解酵素に抵抗性のある酸性ムコ多糖あるいは糖蛋白複合体が存在し、アミロイド線

維とPSXはほぼ同一の線維であることを報告した。Ringvoldら²²⁾は、PSXはコンゴー赤に陽性で、チオフラビンTとSに蛍光発色を示し、抗アミロイド血清で免疫反応陽性であることから、“amyloid-like substance”であ

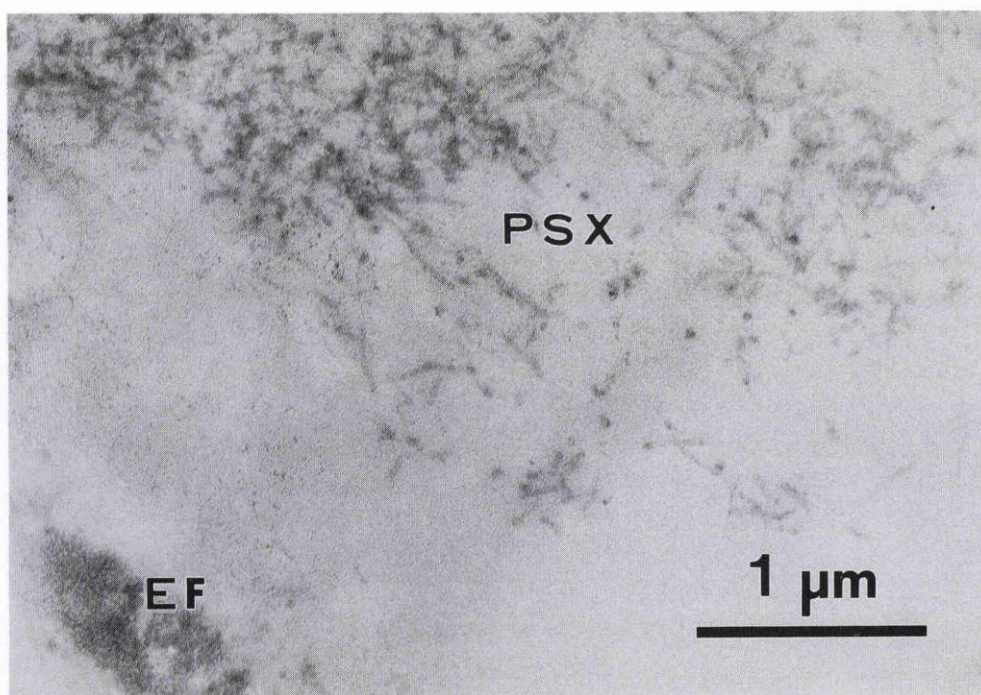


図3 ブタ膵エラスターゼ-1を作用させた弾性線維(EF)とPSX.
図1でみられた金粒子の集積はほとんど認められない。

ることを免疫学的に示唆した。Maretoja ら²³⁾は、PSX はコンゴ赤に陽性反応を示すことから、アミロイドであることを示唆した。Davanger ら²⁴⁾も、組織化学的にPSX とアミロイドの類似性を指摘しているが、一方、Streeten ら¹⁵⁾、Dark ら²⁵⁾は、組織化学的および微細構造上の特徴から、PSX とアミロイドの関連を否定した。

Harnish ら²⁶⁾は、PSX は抗 BM 1 PG 抗体に反応するが、抗 Type I および抗 Type II コラーゲン抗体には反応しないことから、PSX には基底膜プロテオグリカンが存在することを示し、また、最近、免疫電子顕微鏡で基底膜関連成分であるラミニン、フィブロネクチン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸化プロテオグリカンなどがPSX に存在することが知られ²⁷⁾²⁸⁾、PSX は基底膜の生合成における異常から作られることを示唆する報告も多い^{20)29)~31)}。

Streeten らは、免疫組織化学的にPSX とチン小帯の免疫学的類似性を示し、PSX はチン小帯の細線維に関連した糖蛋白を含む線維であること¹⁰⁾³²⁾、また、オキシタラン線維との類似性³³⁾を示唆し、Takei ら³⁴⁾は、電子顕微鏡学的に、PSX はチン小帯の細線維成分を含有することを示唆した。Garner ら³⁵⁾は、PSX とチン小帯がアルデヒドフクシンとクロムヘマトキシリンに同様の染色性を有することから、これらはオキシタラン線維と同様な線維であることを示し、PSX は、弾性線維の細線維に関連した物質であることを示唆した。また、Streeten ら¹⁰⁾は、PSX 内に弾性線維関連蛋白を有することを報告した。Li らは、弾性線維の成分であるフィブリリン¹¹⁾、エラス

チン¹²⁾、アミロイド P 蛋白¹³⁾、ビトロネクチン¹⁴⁾がPSX に存在することを免疫組織化学的に証明し、PSX は弾性線維における弾性線維系の異常および変性によって引き起こされるものである可能性を示唆し、Roh ら³⁶⁾、Streeten ら¹⁵⁾も、微細構造上PSX と弾性線維は密接に関連して存在することを報告し、‘弾性線維症’の一つのタイプであることを示唆した。

本研究で使用したウサギ抗ヒト大動脈 α エラスチン血清は、過去の報告¹²⁾¹⁶⁾でも明らかなように、免疫学的特異性が高く、本研究結果において、エラスチンの存在を示す金粒子の集積が弾性線維とPSX のみに認められ、他の細胞外物質には認められなかったことから、PSX 内にエラスチンが存在することは明らかであり、Li ら¹²⁾の報告を支持するものであった。また、エラスチン分解作用をもつPPEを作用させることにより、弾性線維およびPSX の金粒子の沈着がほとんど認められなかったこともそれを裏付けている。

弾性線維の細線維は、その形態と大きさを保つための骨組みとしての役割をもち、その中にエラスチンを包み込んでいる³⁷⁾。可溶性エラスチン(トロポエラスチン)は、細線維束間や周囲に集合して規則的に配列し合い、架橋を形成し、その結果として不溶性エラスチンとなり、弾性線維を形成することが知られている³⁸⁾。そして、そのエラスチンも細線維も種々のタイプの線維芽細胞、平滑筋細胞および血管内皮細胞などが合成していることが知られている^{39)~42)}。また、Yun ら⁴³⁾は、培養人線維柱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、人線維柱細胞がエラスチン合成能をもつことを示している。したがって、線維柱細胞がエラスチンの合成過程に何らかの異常を来し、その結果としてエラスチンを含む異常物質であるPSXを産生していることが予想される。

最近、培養人線維柱細胞にステロイドを投与するとエラスチンが産生される⁴³⁾とともに、原発開放隅角緑内障で線維柱組織内にエラスチンの増加が観察されており⁴⁴⁾、エラスチンが房水流出抵抗増大に関与している可能性が示唆されている。一方、偽水晶体嚢性緑内障に対するステロイドレスポンスは、原発開放隅角緑内障とは異なる⁴⁵⁾ため、本質的には原発開放隅角緑内障とは異なる続発性緑内障と考えられているとともに、前述の如く、PSX内にはエラスチン以外に種々の蛋白が存在することが報告されており、それらの成分の合成異常の関与も否定できない。しかし、本研究結果から、PSXにもエラスチンが存在することは明らかであり、それが房水流出抵抗増大に関与している可能性は十分考えられる。また、PPEを作用させることによって、そのエラスチンが分解されることも判明した。よって、偽水晶体嚢性緑内障において、もし、PSX内のエラスチンが房水流出抵抗増大に関与しているのであれば、PPEによりエラスチンを分解することによって、房水流出抵抗が減少することが予想される。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師、瀬川雄三教授、ならびに本学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) **Dvorak-Theovald G**: Pseudo-exfoliation of the lens capsule-Relation to "true" exfoliation of the lens capsule as reported in the literature and role in the production of glaucoma capsulocuticular. *Am J Ophthalmol* 37: 1—12, 1954.
- 2) **Ringvold A**: Electron microscopy of the trabecular meshwork in eyes with exfoliation syndrome (Pseudoexfoliation of the lens capsule). *Virchow Arch Abt A Path Anat* 353: 110—127, 1971.
- 3) **Harnish JP**: Exfoliation material in different sections of the eye. *Albrecht v Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 203: 181—190, 1977.
- 4) **Richardson TM, Epstein DL**: Exfoliation glaucoma-A quantitative perfusion and ultrastructural study. *Ophthalmol* 88: 968—980, 1981.
- 5) **Lutjen-Drecoll E, Tamm E**: Differences in the amount of 'plaque-material' in the outflow system of the eyes with chronic simple and exfoliation glaucoma. In: *Kriegstein GK (Ed): Glaucoma Update III*. Springer-Verlag, Berlin, 17—22, 1987.
- 6) **Ringvold A**: Exfoliation syndrome immunological aspects. *Acta Ophthalmol* 66(Suppl 184): 35—43, 1988.
- 7) **Streeten BW, Dark AJ, Wallace RN, Li ZY, Hoepner JA**: Pseudoexfoliative fibrilopathy in the skin of patients with ocular pseudoexfoliation. *Am J Ophthalmol* 110: 490—499, 1990.
- 8) **Schrehardt UM, Koca MR, Naumann GOH, Volkholz H**: Pseudoexfoliation syndrome—Ocular manifestation of a systemic disorder? *Arch Ophthalmol* 110: 1752—1756, 1992.
- 9) **Streeten BW, Li ZY, Wallace RN, Eagle RC, Keshgegian AA**: Pseudoexfoliative fibrilopathy in visceral organs of a patient with pseudoexfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 110: 1757—1762, 1992.
- 10) **Streeten BW, Gibson SA, Dark AJ**: Pseudoexfoliative material contains an elastic microfibrillar-associated glycoprotein. *Trans Am Ophthalmol Soc* 84: 304—320, 1986.
- 11) **Li ZY, Streeten BW, Wallace RN, Gibson SA**: Immunolocalization of fibrillin on pseudoexfoliative material and the ocular zonules. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 32: 1987.
- 12) **Li ZY, Streeten BW, Wallace RN**: Association of elastin with pseudoexfoliative material: An immunoelectron microscopic study. *Curr Eye Res* 7: 1163—1172, 1988.
- 13) **Li ZY, Streeten BW, Yohai N**: Amyloid P protein in pseudoexfoliative fibrilopathy. *Curr Eye Res* 8: 217—227, 1989.
- 14) **Li ZY, Streeten BW, Wallace RN**: Vitronectin localizes to pseudoexfoliative fibers in ocular and conjunctival sites by immunoelectron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 777: 1991.
- 15) **Streeten BW, Bockman L, Ritch R, Prince AM, Dark AJ**: Pseudoexfoliative fibrilopathy in the conjunctiva-A relation to elastic fibers and elastosis. *Ophthalmol* 94: 1439—1449, 1987.
- 16) 保谷卓男: ブタ腭 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1報一. *日眼会誌* 97: 1011—1027, 1993.
- 17) **Ringvold A**: A preliminary report on the amino acid composition of the pseudoexfoliation material (PE material). *Exp Eye Res* 15: 37—42, 1973.
- 18) **Horven I**: Exfoliation syndrome. A histological and histochemical study. *Acta Ophthalmol* 44: 790—800, 1966.
- 19) **Davanger M**: On the molecular composition and physico-chemical properties of the pseudoexfoliation material. *Acta Ophthalmol* 55: 621—633, 1977.
- 20) **Baba H**: Histochemical and polarization optical investigation for glycosaminoglycans in exfoliation syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221: 106—109, 1983.
- 21) 瀬川雄三: 流出抵抗物質としてのアミロイドならびに Pseudo-Exfoliation(PE) 細線維. *眼臨* 70: 951—954, 1976.
- 22) **Ringvold A, Husby G**: Pseudo-exfoliation material—An amyloid like substance. *Exp Eye Res* 17:

- 289—299, 1973.
- 23) **Meretoja J, Takkanen A**: Occurrence of amyloid in eyes with pseudo-exfoliation. *Ophthalmic Res* 9: 80—91, 1977.
 - 24) **Davanger M, Pedersen O**: Pseudo-exfoliation material on the anterior lens surface. Demonstration and examination of an interfibrillar ground substance. *Acta Ophthalmol* 53: 3—18, 1975.
 - 25) **Dark AJ, Streeten BW, Cornwall CC**: Pseudoexfoliative disease of the lens: A study in electron microscopy and histochemistry. *Br J Ophthalmol* 61: 462—472, 1977.
 - 26) **Harnish JP, Barrach HJ, Hassell JR, Sinha PK**: Identification of a basement membrane proteoglycan in exfoliation material. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol* 215: 273—278, 1981.
 - 27) **Konstas AG, Marshal GE, Lee WR**: Immunogold localisation of laminin in normal and exfoliative iris. *Br J Ophthalmol* 74: 450—457, 1990.
 - 28) **Schlotzer-Schrehardt U, Dorfler S, Naumann GOH**: Immunohistochemical localization of basement membrane components in pseudoexfoliation material of the lens capsule. *Curr Eye Res* 11: 343—355, 1992.
 - 29) **Eagle RC, Font RL, Fine BS**: The basement membrane exfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 97: 511—515, 1979.
 - 30) **Shakib M, Ashton N, Blach R**: Electron microscopic study of pseudo-exfoliation of the lens capsule. *Invest Ophthalmol* 4: 154—161, 1965.
 - 31) **Dark AJ, Streeten BW**: Pseudoexfoliation syndrome. In: Garner A, et al (Eds): *Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach*. Marcel Dekker, Inc, New York, 1303—1320, 1982.
 - 32) **Streeten BW, Gibson SA, Li ZY**: Lectin binding to pseudoexfoliative material and the ocular zonules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1516—1521, 1986.
 - 33) **Streeten BW, Dark AJ, Barnes CW**: Pseudoexfoliative material and oxytalan fibers. *Exp Eye Res* 38: 523—531, 1984.
 - 34) **Takei Y, Mizuno K**: Electron-microscopic study of pseudo-exfoliation of the lens capsule. *Albrecht v Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 205: 213—220, 1978.
 - 35) **Garner A, Alexander RA**: Pseudoexfoliative disease: Histochemical evidence of an affinity with zonular fibres. *Br J Ophthalmol* 68: 574—580, 1984.
 - 36) **Roh YB, Ishibashi T, Ito N, Inomata H**: Alteration of microfibrils in the conjunctiva of patients with exfoliation syndrome. *Arch Ophthalmol* 105: 978—982, 1987.
 - 37) **Franzblau C, Faris B**: Elastin. In: Hay ED (Ed): *Cell biology of the extracellular matrix*. Plenum Press, New York, 65—93, 1981.
 - 38) **Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG**: Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Eng J Med* 304: 566—579, 1981.
 - 39) **Fahrenbath WH, Sandberg LB, Cleary EG**: Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat Rec* 155: 563—576, 1966.
 - 40) **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.
 - 41) **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.
 - 42) **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.
 - 43) **Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsome DA, Alvarado JA**: Proteins secreted by human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2012—2022, 1989.
 - 44) 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.
 - 45) **Pohjola S, Horsmanheimo A**: Topically applied corticosteroids in glaucoma capsulare. *Arch Ophthalmol* 85: 150—153, 1971.