

人眼線維柱組織における細胞外マトリックスの局在

北 島 秀 一

信州大学医学部眼科学教室

要 約

正常人眼線維柱組織の細胞外マトリックスがいかなる物質から構成されているかを解明するために I, III, IV, V, VI 型コラーゲン, プロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチン, エラスチン, トロンボスポンディンに対する抗体を用いてその局在を検討した。正常屍体摘出眼 7 眼から得た線維柱組織から凍結切片を作製し, 光学顕微鏡酵素抗体法ならびに pre-embedding method による免疫電子顕微鏡法により線維柱組織における細胞外マ

トリックスの局在を観察した。本研究の結果, 正常人眼線維柱組織の細胞外マトリックスは前述の 10 種のタンパクを構成要素として含有していること, ならびにこれらのタンパクの線維柱組織における局在が確認された。(日眼会誌 98: 533-539, 1994)

キーワード: 人眼, 線維柱組織, 細胞外マトリックス, 酵素抗体法, Pre-embedding method

Localization of Extracellular Matrix in Human Trabecular Tissues

Shuichi Kitajima

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

Trabecular tissues taken from seven normal human eyes were subjected to this study. Localization of various types of collagen I, III, IV, V, VI, proteoglycan, laminin, fibronectin, elastin and thrombospondin in the human trabecular meshwork was investigated using immunohistochemical methods. The study revealed the presence and localization of the collagen types I, III, IV, V, VI,

proteoglycan, laminin, fibronectin, elastin, and thrombospondin in the trabecular meshwork. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 533-539, 1994)

Key words: Human trabecular tissue, Extracellular matrix, Immunohistochemical method

I 緒 言

房水の主要流出路である線維柱組織は, ぶどう膜網, 角強膜網, 内皮網から構成されており, 房水は索状組織なら成るぶどう膜網, 線維柱層板から成る角強膜網の網状組織間隙を通過して内皮網内に達し, Schlemm 管内壁を通過して Schlemm 管腔内に流出し, その外壁に開口している集合管を通過して上強膜静脈内に流れていくことが知られている¹⁾²⁾。また, 流出抵抗の主座は線維柱組織に, そのなかでも内皮網あたりに存在するものと信じられている^{3)~5)}。一方, 線維柱組織は基本的には線維柱細胞と細胞外マトリックスから構成されている。一般的に細胞外マトリックスの主要構成要素はコラーゲンとエラスチンという線維性タンパク, プロテオグリカンなどの複

合糖質, それにフィブロネクチン, ラミニンなどの接着性タンパクである。人眼の線維柱組織について数多くの研究がなされてきているが, その細胞外マトリックスに関する研究はまだ緒についたばかりで数も少ない⁶⁾⁷⁾。

本研究では, 正常人眼線維柱組織の細胞外マトリックスが如何なる物質から構成されているかを明らかにする目的で, I, III, IV, V, VI 型コラーゲン, プロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチン, エラスチン, トロンボスポンディンに対する抗体を用いて酵素抗体法による光学ならびに電子顕微鏡的研究を行い, 興味ある所見を得たので報告する。

II 実験対象ならびに結果

死後 12~36 時間を経過していた 48~88 歳までの正常

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 北島 秀一

(平成5年7月19日受付, 平成6年2月9日改訂受理)

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

(Received July 19, 1993 and accepted in revised form February 9, 1994)

遺体摘出眼7眼(48歳, 66歳, 74歳2眼, 77歳, 84歳, 88歳)(男性5眼, 女性2眼)を家族の同意を得て使用した。なお, この研究は中央検査部病理検査室内で, 臨床病理医の管理の下で行われた。線維柱帯を含む約4mm角の角強膜片を切り出し, 0.1M phosphate buffered saline(PBS)で作製した4%パラホルムアルデヒド(pH 7.4, 4°C)で固定した。24時間の固定後, 10%ショ糖加PBSに移し, さらに24時間後20%ショ糖加PBSに移した後, -80°Cドライエタノールで急速凍結した。この凍結組織からクリオスタット(Leitz 1780, Germany)で6 μ mの凍結切片を作製し, ポリ-L-リジンコート付スライドガラスに貼付し, 30分間乾燥させた。この切片を用いて後述の手順で光学顕微鏡(光顕)およびpre-embedding methodを用いた電子顕微鏡(電顕)酵素抗体法を施行した⁸⁾⁹⁾。

1. 光顕酵素抗体法

作製した切片をアセトンで前処置し(室温10分), 0.05M PBSで洗浄後(10秒1回, 3分2回), 100%メタノールおよび0.3%過酸化水素(H₂O₂)水溶液に浸漬し(室温30分), 内因性ペルオキシダーゼ阻害を行った。以後の手順はすべて湿室中で行ったが, 10%ウサギまたはマウス血清で非特異的反応の阻害を行い(室温15分), 次いで1%ウシ血清アルブミンPBS溶液(BSA/PBS)で希釈した一次抗体と反応させた(4°C, 一晚)。使用した一次抗体と希釈率は以下のとおりである。ウサギ抗I型コラーゲン抗体(1/100, CEMICON, Segundo), ウサギ抗III型コラーゲン抗体(1/100, CEMICON), マウス抗IV型コラーゲン抗体(1/100, CEMICON), ウサギ抗V型コラーゲン抗体(1/500, LSL, 東京), マウス抗VI型コラーゲン抗体(1/500, TELIOS, San Diego), ウサギ抗プロテオグリカン抗体(1/100, TELIOS), マウス抗フィブロネクチン抗体(1/100, IMMUNOTECH, Marseille), マウス抗ラミニン抗体(1/100, TELIOS), マウス抗トロンボスポンディン抗体(1/20, IMMUNOTECH), ウサギ抗 α -エラスチン抗体(1/100, ELASTIN PRODUCT, Owensville)。PBSで洗浄後(5分3回), BSA/PBSで100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識二次抗体(抗ウサギまたはマウスIg-G)と反応させた(室温60分)。二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識抗ウサギIg-G(γ 鎖L鎖), または抗マウスIg-G(γ 鎖L鎖)(医学生物学研究所, 名古屋)を使用した。以上の血清および抗体を各切片上に100 μ lずつ滴下して反応させた。PBSで洗浄(5分2回, 10分2回, 15分2回)した後, 3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)溶液で3~10分間発色させた。DAB溶液の組成は0.2M phosphate buffer(PB)250ml, 蒸留水250mlにDAB0.1g, 30% H₂O₂溶液100 μ lを加えたものを使用した。1分間流水水洗後, 1%メチルグリーン溶液で約10分間の核染色をし, エタノール系列による脱水, キシレンで透徹した後, 封

入し観察した。

2. 電顕酵素抗体法

作製した切片を10%ショ糖加0.05M PBSで洗浄(5分3回)後, 過ヨウ素酸(114mg/100ml生食)と10分間反応させ, 内因性ペルオキシダーゼ阻害を行い, 10%ショ糖加PBSで洗浄した(5分3回)。次いで, 前述の光顕酵素抗体法と同様に二次抗体との反応までを行った。正常ウサギまたはマウス血清との反応は室温30分, 一次抗体との反応は4°C, 16時間, 二次抗体との反応は室温2時間, 洗浄にはすべて10%ショ糖加PBSを用いた。10%ショ糖加PBSで5分間3回洗浄した後, 2.5%グルタルアルデヒド固定を室温30分, DAB単独液反応(DAB20mg/100ml Tris HCl, 室温30分), H₂O₂加DAB液反応(DAB20mg/100ml Tris HCl+0.005% H₂O₂室温5~10分)の手順で発色させた。0.1M PBSで5分間3回洗浄した後, 2%四酸化オスミウムで室温60分間の後固定を行いエタノール系列で脱水し, 酸化プロピレンに8分間3回浸漬した。切片を酸化プロピレンとQuetol 812樹脂(日新EM, 東京)の混合液に浸漬し順次混合比を高めた後, 樹脂を満たしたゼラチンカプセルをスライドガラス上の切片にかぶせ, 60°C48時間重合した。重合の終わった樹脂ブロックをスライドガラスの下面からガスバーナーで加熱し, 切片を樹脂ごとスライドガラスから剝離した。この手順で得られたブロックからUltratome III®(LKB, Sweden)で電顕用超薄切片(0.1 μ m)を作製し, 無染色で透過型電子顕微鏡(Model HS-9, 日立)で観察した。

対照実験としては, それぞれの一次抗体との反応または二次抗体との反応を省略し, 他の手順は前述の方法とすべて同一の方法を用いて免疫染色を行った試料を観察した。

III 結果

I型コラーゲン: 角膜, 強膜に比較すると, 線維柱組織は酵素抗体法ではより強く染まり, 個々の層板はほぼ均質に染色され(図1, 2, I), 電顕下では層板内の膠原細線維自身が染色されていた(図3, I)。

III型コラーゲン: III型はI型とほぼ同程度の染色性を呈し(図1, 2, III), 染色部位はI型と同様に電顕下では層板内の膠原細線維自身に陽性反応が認められた(図3, III)。

IV型コラーゲン: 角膜のデスメ膜, 線維柱組織, Schlemm管内外壁, 集合管ならびに血管壁, 毛様体筋の基底膜が染まり(図1, IV), 層板では基底膜が強く染色され(図2, IV), 電顕下では層板の基底膜ならびにSchlemm管壁直下に陽性反応が認められた(図3, IV)。

V型コラーゲン: 線維柱組織は角膜, 強膜に比し強く染色され(図1, V), 層板は均質に染色され(図2, V), 電顕下では層板の基底膜近傍の膠原細線維や中心部の膠

原細線維の一部が染色されていた(図3, V)。

VI型コラーゲン:角膜, 強膜に比し線維柱組織が強く染まり, 層板は均等に染まり(図1, 2, VI), 電顕下では長周期線維ならびに弾性線維鞘が陽性所見を呈した(図3, VI)。

プロテオグリカン:線維柱組織, Schlemm管内外壁, 集合管ならびに血管壁が染色され(図1, 2, PG), 電顕下では層板を構成する線維柱細胞の細胞質, 基底膜, さらに膠原細線維間の一部も染色され, Schlemm管壁直下にも陽性反応が認められた(図3, PG)。

ラミニン:線維柱組織, Schlemm管内外壁, 集合管ならびに血管壁が染色され(図1, 2, LN), 電顕下では層板の基底膜ならびにSchlemm管壁直下に局在が認められた(図3, LN)。

フィブロネクチン:線維柱組織は弱く染色されたが, Schlemm管壁, 集合管ならびに血管壁は前者より強く染色され(図1, 2, FN), 電顕下では層板の基底膜やSchlemm管内壁直下に陽性所見が認められた(図3, FN)。

エラスチン:角膜, 強膜はほとんど染まらず, 線維柱組織, 毛様体が強く染色された(図1, EL), 層板内では内部に点状の陽性所見が見られ(図2, EL), 電顕下では層板内部に点状に弾性線維の存在部位に一致して陽性所見が認められた(図3, EL)。

トロンボスポンディン:角膜, 強膜は染まらず, 線維柱組織のみがよく染まり, 層板は均等に染色され(図1, 2, TS), 電顕下では膠原細線維間が染色されていた(図3, TS)。

IV 考 按

本研究結果は正常人眼線維柱組織の細胞外マトリックスには, 角膜, 強膜のそれとは異なり, 少なくともI, III, IV, V, VI型コラーゲン, プロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチン, エラスチン, トロンボスポンディンが含まれていることを明らかにした。この結果は, Murphyら⁶⁾の行った蛍光抗体法を用いた光顕所見やTripathiら⁷⁾の光顕所見ともよく一致している。

本研究では酵素抗体法で染色した試料を光顕のみならず, 電顕でも同時に観察したので, 前二者の光顕像では局在が不鮮明であったものが, 本研究では細胞外マトリックスの個々の構成要素の局在がより鮮明に判明した。

線維柱組織のうち, ぶどう膜網と角強膜網は基本的に同じ構成要素から成り, 外表面に線維柱細胞, 細胞の内面に接して基底膜, 層板の中心部には膠原細線維束と弾性線維が存在し, 加齢とともに100nmの周期を有する長周期線維や弾性線維の周囲に弾性線維鞘と呼ばれる物質が増加してくることが知られている^{10)~12)}。本研究によると, この基底膜にはIV型コラーゲン, プロテオグリカ

ン, ラミニン, フィブロネクチンが含まれており, 加齢とともに基底膜が肥厚するという電顕所見¹²⁾やIV型コラーゲンが加齢とともに増加するという生化学的結果¹³⁾ともよく一致する所見である。IV型コラーゲン, プロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチンが血管壁にも認められたが, この所見は他組織ではよく知られた所見であり, ラミニンがIV型コラーゲンならびにプロテオグリカンと結合し, 細胞の基底膜への接着に関与しているものと思われる¹⁴⁾。膠原細線維は主としてI型コラーゲンで染色され, その他III型ならびにV型コラーゲンの局在も認められた。この所見は生化学的結果ともよく一致している。層板を構成する膠原細線維は径が10~100nmとさまざまで多くは40nmであるが, 径の細いものがIII, V型コラーゲンに相当するものと思われるが, 本研究ではその同定は困難であった。おそらくV型コラーゲンはIV型コラーゲンと結合し, I型コラーゲンはIII, V型コラーゲンと結合しているものと思われる¹⁵⁾。その他, 層板内の所々にエラスチンの陽性所見が認められた。その存在部位は弾性線維のそれとよく一致しており, 弾性線維を構成する15nmの細線維束に囲まれた内部に局在が認められた。加齢とともに増加する長周期線維ならびに弾性線維鞘は, Lütjen-Drecollら¹⁶⁾が報告したように本報告でも縞状にVI型コラーゲンで染色されるところから, これらの線維や物質に少なくともVI型コラーゲンが含まれていることは確かである。また, 層板内部の膠原細線維間には他組織とは異なり, トロンボスポンディンが局在するという所見は興味ある所見である。Tripathi⁷⁾がはじめてその存在を指摘したが, トロンボスポンディンは流出抵抗物質としても注目すべき物質であると思われる。

内皮網は他の網状組織とは異なり, 層板状構造は呈さず, 線維柱細胞, 膠原細線維, 弾性線維, 基底膜様無定形物質から成り, 加齢とともに基底膜様無定形物質が減少するとともに弾性線維鞘物質が増加してくることが知られている¹²⁾。本研究では内皮網においてもI, III, IV, V, VI型コラーゲン, プロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチン, エラスチン, トロンボスポンディンの存在は確認できたが, 今回用いたpre-embedding法では内皮網の微細構造の保存が不良のため, Schlemm管内壁直下に存在する基底膜様無定形物質や弾性線維鞘物質の同定が困難であったが, IV型コラーゲン, プロテオグリカン, ラミニン, フィブロネクチンの点状局在が内壁直下に観察された。今後は組織の微細構造の保存性に優れたロビクリルK4Mに包埋し, post-embedding法を用いて内皮網の微細構造を保持しつつ細胞外マトリックスの局在を明らかにしていく必要がある。本研究で明らかにされた細胞外マトリックスの各構成要素が何らかの形で流出抵抗増大に関与していると思われるので, 今後は組織の微細構造を保存しながら各構成要素の局在を詳細

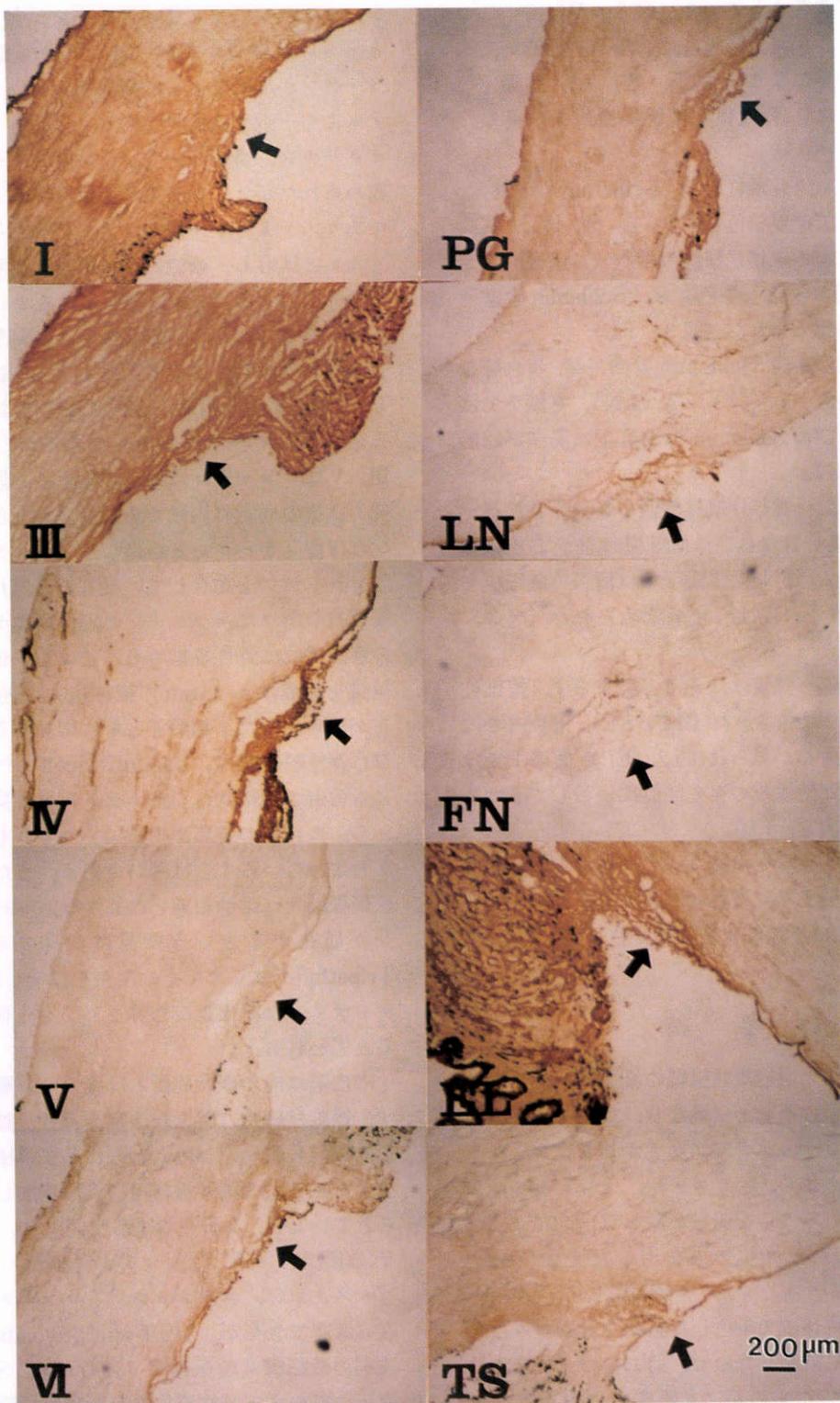


図1 酵素抗体法で染色した正常人眼線維柱組織の光学顕微鏡像。

- I (I型コラーゲン) 角膜, 強膜に比し線維柱組織 (矢印) がより強く染まっている. 77歳.
 III (III型コラーゲン) 線維柱組織 (矢印) が角膜, 強膜より強く染まっている. 74歳.
 IV (IV型コラーゲン) 線維柱組織 (矢印), デスメ膜, 毛様体, 血管壁が染まっている. 48歳.
 V (V型コラーゲン) 線維柱組織 (矢印) が他組織より強く染まっている. 48歳.
 VI (VI型コラーゲン) 線維柱組織 (矢印) が強く染まっている. 88歳.
 PG (プロテオグリカン) 線維柱組織 (矢印), 毛様体が染まっている. 65歳.
 LN (ラミニン) 線維柱組織 (矢印), Schlemm管内外壁, 集合管壁, デスメ膜が染まっている. 65歳.
 FN (フィブロネクチン) 線維柱組織 (矢印), Schlemm管内外壁, 集合管壁が染まっている. 84歳.
 EL (エラスチン) 線維柱組織 (矢印), 毛様体が染まっている. 74歳.
 TS (トロンボスポンディン) 線維柱組織 (矢印) が染まっている. 74歳.

(図2以下も括弧内は図1と同様)

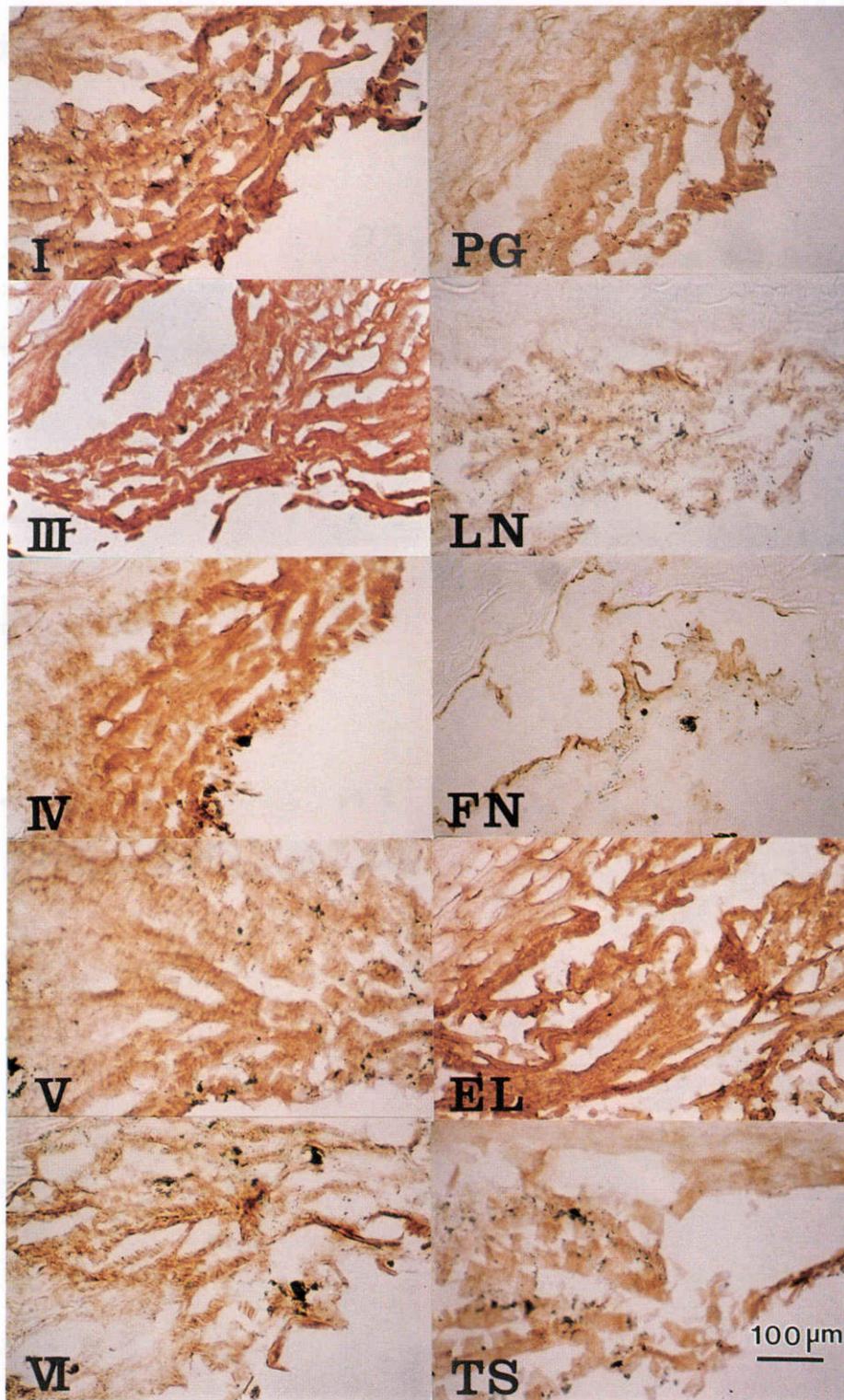


図2 酵素抗体法で染色した正常人眼線維柱組織の拡大光学顕微鏡像。

- I 線維柱層板がほぼ均質に染まっている。
- III 線維柱層板が染まっている。
- IV 層板，特に基底膜が染まっている。
- V 層板が均質に染まっている。
- VI 層板が均質に染まっている。
- PG 層板，特に基底膜が染まっている。
- LN 層板，特に基底膜が染まっている。
- FN Schlemm管内外壁ならびに層板が染まっている。
- EL 層板が染まり，層板内に点状，線状の陽性所見が認められる。
- TS 層板内が均質に染まっている。

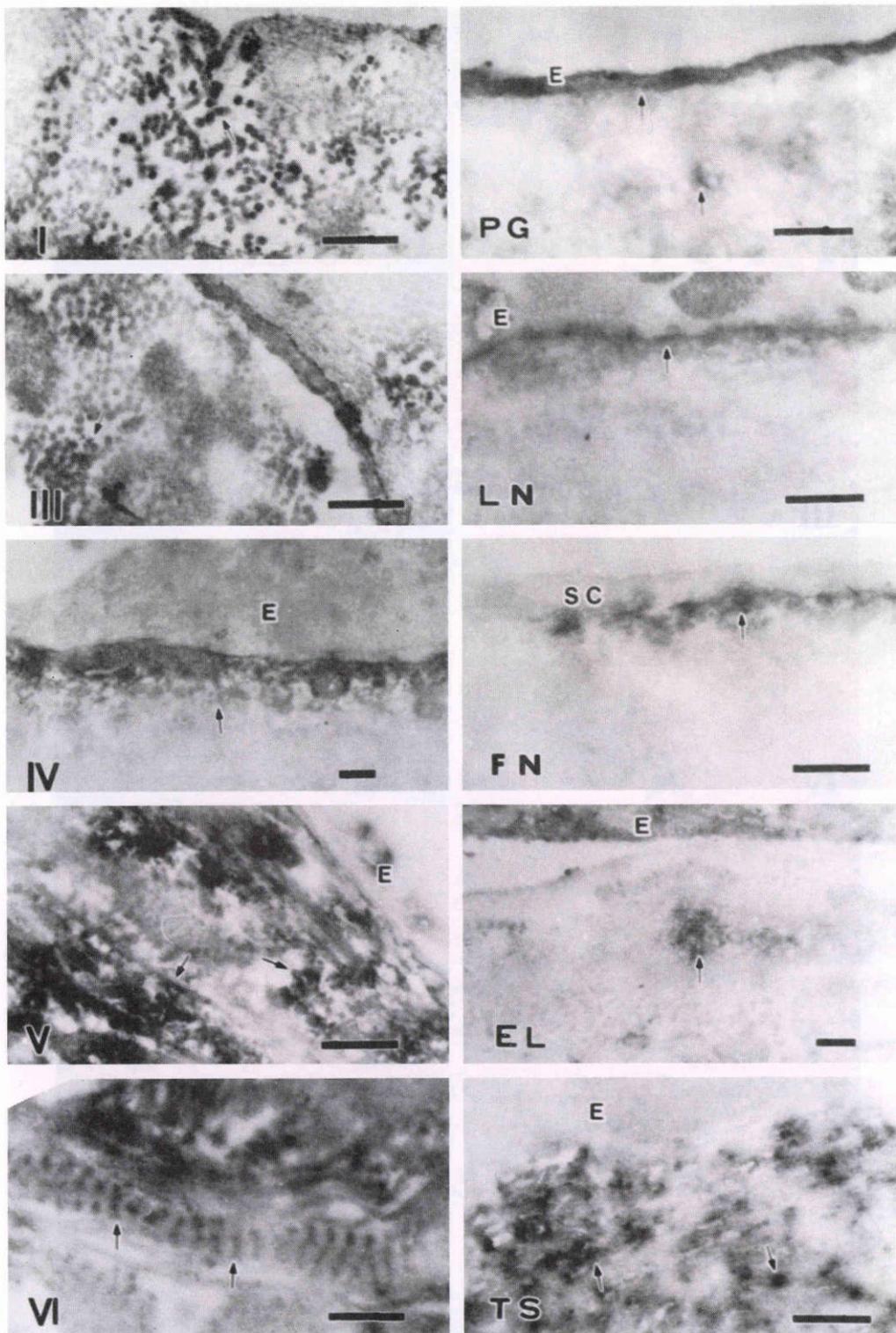


図3 正常人眼線維柱組織の酵素抗体法で染色した電子顕微鏡像。

- I 線維柱層板内の膠原細線維が染色されている(矢印)。
- III 層板内の膠原細線維(矢印)が染色されている。
- IV 線維柱細胞(E)直下の基底膜(矢印)が染色されている。
- V 線維柱細胞(E)直下の基底膜近く(矢印)と中心部近く(矢印)の膠原細線維が染色されている。
- VI 層板内の長周期線維(矢印)が縞状に染色されている。
- PG 線維柱細胞(E)の細胞膜, 基底膜(矢印), さらに層板内の膠原細線維間(矢印)に陽性所見が認められる。
- LN 線維柱細胞(E)の基底膜(矢印)が染色されている。
- FN Schlemm管(SC)内壁(矢印)直下に陽性所見が認められる。
- EL 層板内に点状の陽性所見(矢印)が認められる。線維柱細胞(E)。
- TS 層板内の膠原細線維間に陽性所見(矢印)が認められる。線維柱細胞(E)。

バーは0.5 μ m

に追求するとともに、それを緑内障に應用すれば緑内障の病因解明にも役立つものと思われる。

稿を終えるにあたり、本研究に際し御指導と論文の御校閲を賜りました瀬川雄三教授ならびに種々の御協力を頂いた保谷卓男助手に深謝いたします。

本論文要旨は、第96回日本眼科学会総会（横浜、1992）ならびに第58回日本中部眼科学会（大阪、1992）で発表した。

文 献

- 1) 瀬川雄三：Schlemm氏管内壁の細孔—フェリチン注入実験。日眼会誌 74：1240—1247, 1970.
- 2) Inomata H, Bill A, Smelser GK: Aqueous humor pathways through the trabecular meshwork and into Schlemm's canal in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*): An electron microscopic study. *Am J Ophthalmol* 73: 760—789, 1972.
- 3) Grant WM: Further studies on facility of flow through trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol* 60: 523—533, 1958.
- 4) Linnér E: The outflow pressure in normal and glaucomatous eyes. *Acta Ophthalmol* 33: 101—116, 1955.
- 5) Peterson WS, Jocson VL, Sears ML: Resistance to aqueous outflow in the rhesus monkey eye. *Am J Ophthalmol* 72: 445—451, 1971.
- 6) Murphy CG, Yun AJ, Newsome DA, Alvarado JA: Localization of extracellular protein of the human trabecular meshwork by indirect immunofluorescence. *Am J Ophthalmol* 104: 33—43, 1987.
- 7) 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.
- 8) Amenta PS, Martinez-Hernandez A: Specific methods for electron immunohistochemistry. In: Cunningham LW (Ed): *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando, Florida, vol 145: 133—148, 1987.
- 9) 長村義之, 渡辺慶一: 免疫電顕法—pre-embedding methodとpost-embedding method—. *病理と臨床* 2: 1427—1440, 1984.
- 10) 瀬川雄三: 正常人眼前房隅角の微細構造. *眼臨* 67: 1—24, 1973.
- 11) 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.
- 12) McMenamin PG, Lee WR, Aitken DAN: Age-related change in the human outflow apparatus. *Ophthalmology* 93: 194—209, 1986.
- 13) Horstmann HJ, Rohen JW, Sames K: Age-related changes in the compositions of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Aging Dev* 21: 121—136, 1983.
- 14) Terranova VP, Rohrbach DH, Martin GR: Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22: 719, 1980.
- 15) 林 利彦: 細胞外マトリックス成分の構造と機能, コラーゲン. 藤本大三郎(編): 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. アイビーシー, 東京, 5—33, 1990.
- 16) Lütjen-Drecoll E, Rittig M, Rauterberg J, Jander R: Immunomicroscopical study of type VI collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 48: 139—147, 1989.
- 17) Tripathi RC, Tripathi BJ: Localization of sialic acid moieties in the endothelial lining of Schlemm's canal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 44: 293—306, 1987.
- 18) Tripathi BJ, Millard CB, Tripathi RC: Qualitative and quantitative analyses of sialic acid in the human trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 51: 601—606, 1990.