

正常胎生裂閉鎖および胎生裂閉鎖不全の組織学的・組織化学的研究

池田 晃三¹⁾, 白井正一郎¹⁾, 馬嶋 昭生¹⁾, 平林 義章²⁾, 山田 和順²⁾

¹⁾名古屋市立大学医学部眼科学教室, ²⁾名古屋市立大学医学部第二解剖学教室

要 約

胎生裂の正常閉鎖過程におけるグリコサミノグリカン分子種の動態を組織化学的に観察した。また、実験奇形学的に成立した胎生裂閉鎖不全についても組織化学的に観察し、グリコサミノグリカン分子種の変化を比較検討した。実験動物はJcl:ICRマウスを用い、胎生裂閉鎖不全は妊娠母獣に ochratoxin A を投与して成立させた。得られた正常胎生裂閉鎖および閉鎖不全を有する発達期マウスの胎生裂に対して垂直断面で連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色および増感高鉄ジアミン染色を行った。組織に局在するグリコサミノグリカン分

子種を同定するために、亜硝酸処理法またはコンドロイチナーゼ ABC 消化法を増感高鉄ジアミン染色に先立って併用した。その結果、胎生裂の正常閉鎖過程および閉鎖不全成立過程で、胎生裂縁基底膜中のヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸異性体の量的変化が組織病理学的に重要な役割を果たしていることが実証された。(日眼会誌 99:427-434, 1995)

キーワード：胎生裂閉鎖, 胎生裂閉鎖不全, 組織化学, グリコサミノグリカン, ICR マウス

Histological and Histochemical Studies on the Normal and Faulty Closure of the Embryonic Fissure in the Eye of ICR mice

Kozo Ikeda¹⁾, Shoichiro Shirai¹⁾, Akio Majima¹⁾,
Yoshifumi Hirabayashi²⁾ and Kazuyori Yamada²⁾

Department of Ophthalmology¹⁾ and Anatomy²⁾, Nagoya City University Medical School.

Abstract

Histological and histochemical studies were made on the changes in microscopic structures and glycosaminoglycan molecular species in tissues undergoing normal and faulty closure of the embryonic fissure from eyes of prenatal mice of Jcl:ICR strain. The purpose of this study was to elucidate the mechanism underlying the faulty closure of the embryonic fissure and to find the key substances involved in normal and faulty closure. To obtain mice with an appropriate faulty closure of the embryonic fissure, ochratoxin A was employed as a teratogenic agent. Serial sections from tissues undergoing normal and faulty closure of embryonic fissure were cut at right angle to the fissure. As the staining procedures, a hematoxylin-eosin procedure and a sensitized high iron diamine method were used. A chemical modification (nitrous acid treat-

ment) or an enzyme digestion procedure (chondroitinase ABC digestion procedure) was employed in combination with the sensitized high iron diamine method to identify glycosaminoglycan molecular species in the tissues. The results obtained in the present study substantiated the histopathological importance of heparan sulfate and isomeric chondroitin sulfate in the basement membrane of the embryonic fissure during the course of histogenesis in normal and faulty closure of the embryonic fissure of developing murine eyes. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:427-434, 1995)

Key words: Closure of the embryonic fissure, Faulty closure of the embryonic fissure, Histochemistry, Glycosaminoglycan, ICR mouse

別刷請求先：467 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 池田 晃三
(平成6年8月22日受付, 平成6年12月1日改訂受理)

Reprint requests to: Kozo Ikeda M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School. 1
Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan

(Received August 22, 1994 and accepted in revised form December 1, 1994)

I 緒 言

眼球は、発生過程で陥入・癒合・分離が連続的に起こることにより形成され、発生学上非常に興味深い器官である。胎生裂の閉鎖は組織の癒合により生じ、その機序に関する古典的概念が Barber¹⁾、Mann²⁾および Duke-Elder^ら³⁾により示されて久しい。彼らは眼杯内板と外板の発育速度に差があり、内板の発育の方が速いため、胎生裂縁では内板は軽度外反しており、そのままの状態では閉鎖が進行すると考えた。近年、鈴木^ら⁴⁾⁵⁾や Hero⁶⁾はその古典的概念を再検討し、胎生裂縁で外板が内反した状態で閉鎖が進行するという新しい概念を提唱している。しかし、胎生裂縁で眼杯内板と外板の基底膜が消失し、それぞれ相互に癒合する機序は不明であり、胎生裂閉鎖不全の成立機序も十分解明されていない。

グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) は、胎生期の間葉細胞間に広く存在する分子種で、細胞や組織の分化・増殖・移動に重要な役割を果たしてい

る⁷⁾⁸⁾。現在まで、実験動物を用いた胎生裂閉鎖過程および胎生裂閉鎖不全の成立機序に関する研究^{2)~6)9)10)}は行われているが、組織化学的に検索した報告はない。

今回我々は、正常胎生裂閉鎖および閉鎖不全の成立機序を解明し、その鍵となる物質を検索する目的で、胎生期の Jcl:ICR マウスを用い、正常胎生裂の閉鎖過程と実験奇形学的に成立させた胎生裂閉鎖不全の組織構造および GAG 分子種の変化を組織学的および組織化学的に比較検討した。その結果、ヒトにおける胎生裂閉鎖不全の成立機序を解明するために有用な結果を得たので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

Jcl:ICR マウスを用い、発情期の健康な雄と未経産で発情期の雌各 1 匹を一晚同一飼育箱に入れ、翌朝腔栓を認めたものを妊娠 0 日とした。正常な胎生裂閉鎖過程を観察するために、母獣 10 匹を妊娠 12 日に屠殺・開腹し

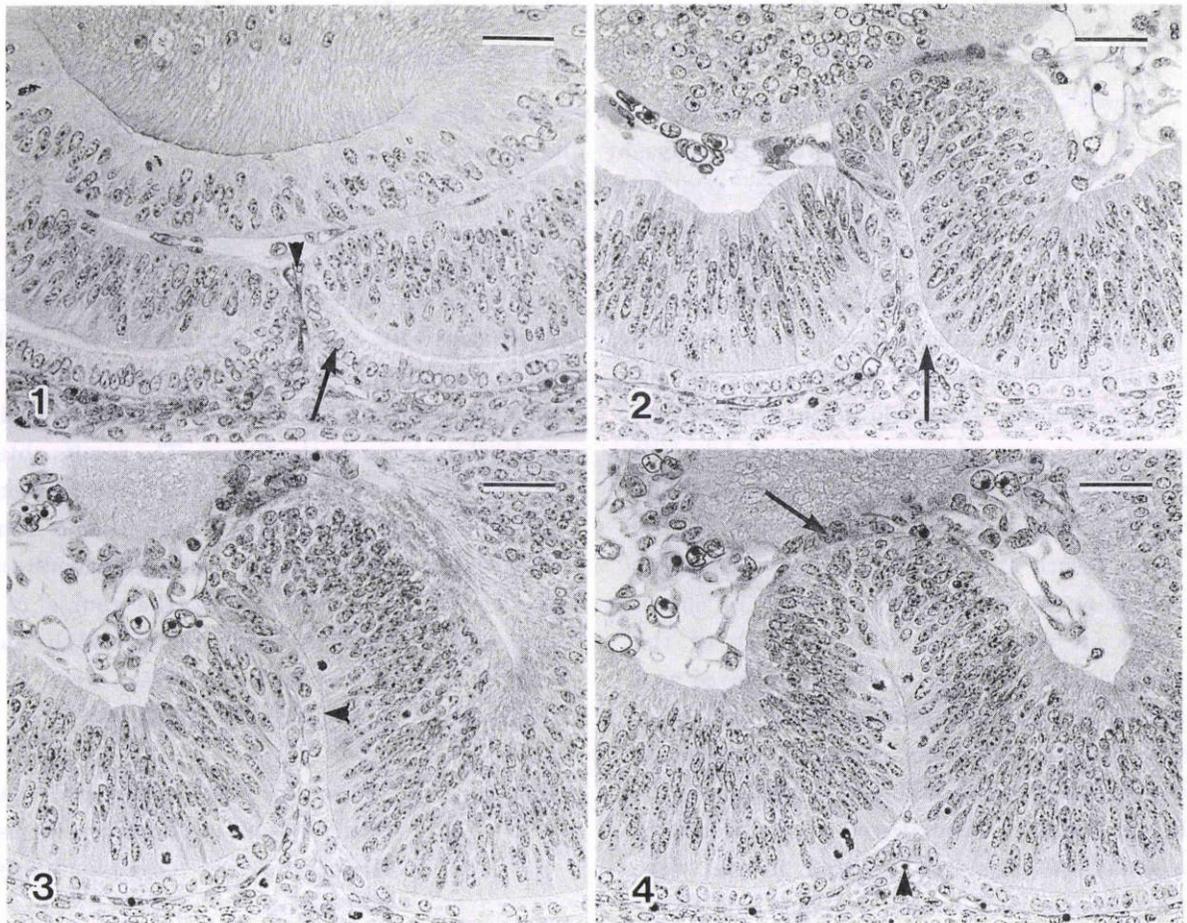


図 1～4 は胎生 12 日の Jcl:ICR マウス胎芽の正常胎生裂閉鎖過程。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, バーは 30 μ m

図 1 矢印:内反した外板, 矢じり:扁平化した間葉細胞

図 2 矢印:顕著に内反した外板.

図 3 矢じり:核の変性像.

図 4 矢印:襞を作成した内板, 矢じり: notch を示す外板.

て胎芽を取り出し、直ちに Bouin 液に浸漬して室温 (18~20°C) で1週間固定した。また、胎生裂閉鎖不全を観察するために、催奇形物質である ochratoxin A (Makor Chemicals Ltd, Israel) を propylene glycol と蒸留水の等量混合液で溶解して用いた¹¹⁾。妊娠7日の母獣10匹に ochratoxin A を 2 mg/kg 腹腔内に投与し、正常では胎生裂閉鎖の完了している妊娠14日⁴⁾に母獣を屠殺・開腹して胎仔を取り出した。直ちに実体顕微鏡下で観察し、その中で外脳症を有し他に重度の形成異常を合併しない胎仔を正常胎芽と同様の手法で固定した。固定した眼部組織塊は、アルコール系列で脱水後キシレンで透徹して、パラフィンに包埋した。胎生裂に対して垂直断で厚さ 2.0 μm の連続切片を作製し、ゼラチン処理したスライドガラスに貼付した。切片を脱パラフィンおよび水和後、以下の染色を施した。正常胎生裂閉鎖20胎芽と胎生裂閉鎖不全20胎仔を組織学的に観察した。

2. 染色法

1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色：水和切片

をヘマトキシリン液に室温で5~10分浸漬して染色し、30分水洗後、0.5% エオジン水溶液に室温で5~10分浸漬して染色した。アルコール系列で脱水し、キシレンで透徹後、HSR液 (国際試薬, 神戸) を用いて封入した。

2) 増感高鉄ジアミン (sensitized high iron diamine, S-HID) 法¹²⁾¹³⁾：水和切片を高鉄ジアミン液で60~120分染色した後、0.5 mM トリクロロ (エチレン) 白金酸カリウム溶液に60分浸漬し、0.1~0.5% 水素化ホウ素ナトリウム溶液で10~30秒還元した後、物理現象を20°Cで5~10分施した。染色後水洗して、アルコール系列で脱水し、キシレンで透徹して、HSR液で封入した。

3. 選択的方法

1) 化学修飾法：亜硝酸 (HNO_2) 処理法¹⁴⁾；S-HID法に先立って HNO_2 処理法を併用した。水和切片を 0.24 M 亜硝酸ナトリウム・1.8 M 酢酸溶液に室温で80~120分浸漬した。また、対照として隣接する切片を 1.8 M 酢酸溶液に同温度、同時間浸漬した。

2) 酵素消化法：コンドロイチナーゼ (Chase) ABC 消

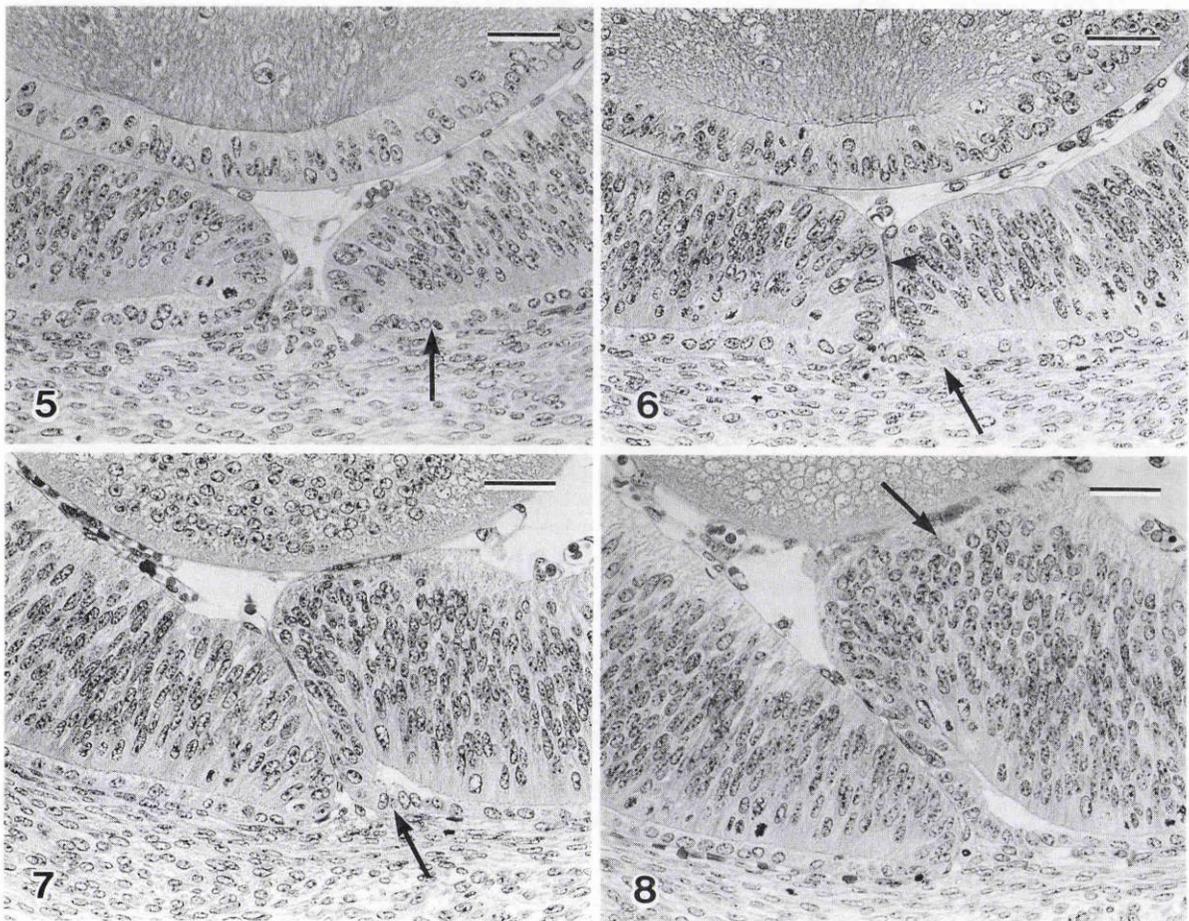


図5~8は ochratoxin A を投与した胎生14日の Jcl:ICR マウス胎仔の胎生裂閉鎖不全成立過程。

HE 染色、バーは 30 μm

図5 矢印：内反しない外板。

図6 矢印：軽度外反した外板、矢じり：扁平化した間葉細胞。

図7 矢印：軽度外反した外板。

図8 矢印：過増殖した内板。

化法¹⁵⁾；S-HID法に先立ってChase ABC消化法を行った。連続する2枚の切片を準備し、1枚の切片は1.0 U/mlのChase ABC (*Proteus vulgaris*) (生化学工業, 東京)を含む0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に37°Cで18~20時間浸漬し、他の1枚には酵素を含まない緩衝液に酵素消化群と同温度・同時間浸漬した。

III 結 果

1. ヘマトキシリン・エオジン染色結果

1) 正常胎生裂閉鎖像 (胎生12日)

近接した両側の胎生裂縁の間に、少数の扁平化した間葉細胞が介在した。この時期には、両側の胎生裂縁は軽

度に内反していた(図1)。連続切片上、眼杯外板の胎生裂への陥入は顕著となり、両側の胎生裂縁は接着した(図2)。さらに、閉鎖開始部の外板細胞の識別は不明瞭となり、少数の核の変性像が観察された(図3)。閉鎖の進行した部では、内板の細胞同士が癒合して襞を形成し、外板の細胞同士は癒合してnotchを形成した(図4)。その後、notchと襞は消失して平坦化し、胎生裂は閉鎖していた。

2) 胎生裂閉鎖不全像 (胎生14日)

胎生裂縁は相対し全く内反しておらず、胎生裂縁の間に少数の間葉細胞が介在していた(図5)。連続切片上、両側の胎生裂縁が接近した部位では、その間には少数の

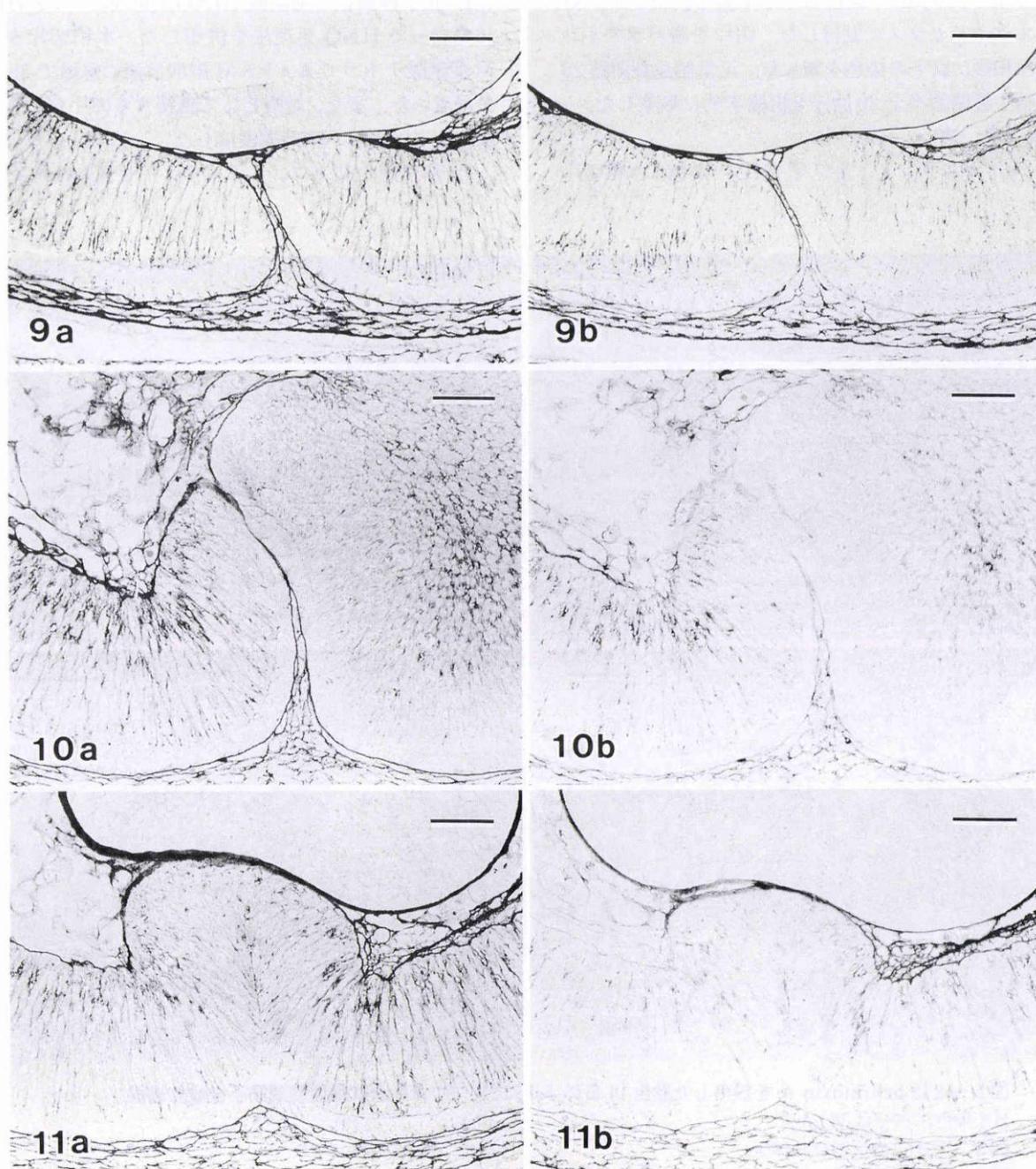


図9~11は正常胎生裂閉鎖過程。

a: sensitized high iron diamine (S-HID) 染色, b: 亜硝酸 (HNO_2) 処理/S-HID 染色, バーは30 μm

扁平化した間葉細胞が介在し、胎生裂縁は内反せず軽度外反していた(図6)。さらに別の部位では、外板は胎生裂に全く陥入せず(図7)、内板の細胞は過増殖して襞を形成し、胎生裂閉鎖不全を示した(図8)。以上の経過中、胎生裂縁の細胞に核の変性像は認められなかった。

2. 増感高鉄ジアミン染色結果

1) 正常胎生裂閉鎖像(胎生12日)

接着する直前の胎生裂縁の眼杯基底膜は顕著なS-HID陽性反応を呈し、眼杯の細胞間に中等度のS-HID陽性顆粒が分布した(図9a)。HNO₂処理を施すと、胎生裂縁の基底膜の同染色性は著しく減弱し、眼杯細胞間のS-HID陽性顆粒の染色性も明らかに減弱した(図9b)。胎生裂の閉鎖開始とともに、S-HID反応強陽性を示す胎生裂縁の眼杯基底膜は薄層化し(図10a)、HNO₂処理を施すと同基底膜のS-HID染色性は顕著に減弱するか陰性化した(図10b)。胎生裂閉鎖後は、胎生裂の癒合部にS-HID反応陽性の基底膜は認められなかったが、中等度のS-HID陽性顆粒が分布した(図11a)。HNO₂処理により、これらのS-HID陽性顆粒は顕著に減弱した(図11b)。

接着する直前の胎生裂縁の眼杯基底膜は顕著なS-

HID反応陽性を呈し、眼杯の細胞間に中等度のS-HID陽性顆粒が認められた(図12a)。Chase ABC消化法により、同基底膜のS-HID染色性は変化しなかったが、S-HID陽性顆粒の染色性は減弱傾向を示した(図12b)。閉鎖が進行すると、S-HID反応陽性を呈する両側の胎生裂縁の基底膜は、互いに癒合しはじめた(図13a)。Chase ABC消化法では同基底膜の染色性は変化しなかった(図13b)。

2) 胎生裂閉鎖不全像(胎生14日)

接着する直前の胎生裂縁の眼杯基底膜は、S-HID染色で顕著に染色され、内板の細胞間には中等度のS-HID陽性顆粒を認めた(図14a)。HNO₂処理により胎生裂縁の眼杯基底膜のS-HID染色性は明らかな減弱を示さなかったが、S-HID陽性顆粒の染色性は減弱した(図14b)。胎生裂縁が接着した部でも、基底膜は顕著なS-HID陽性反応を示し、内板の細胞間に中等度のS-HID陽性顆粒を認めた(図15a, 16a)。HNO₂処理で同基底膜の染色性は明らかな変化を示さなかったが、陽性顆粒の染色性は減弱した(図15b, 16b)。

両側の胎生裂縁が接着する直前は、同部の基底膜はS-HID反応強陽性を示し、眼杯細胞間に中等度の陽性顆

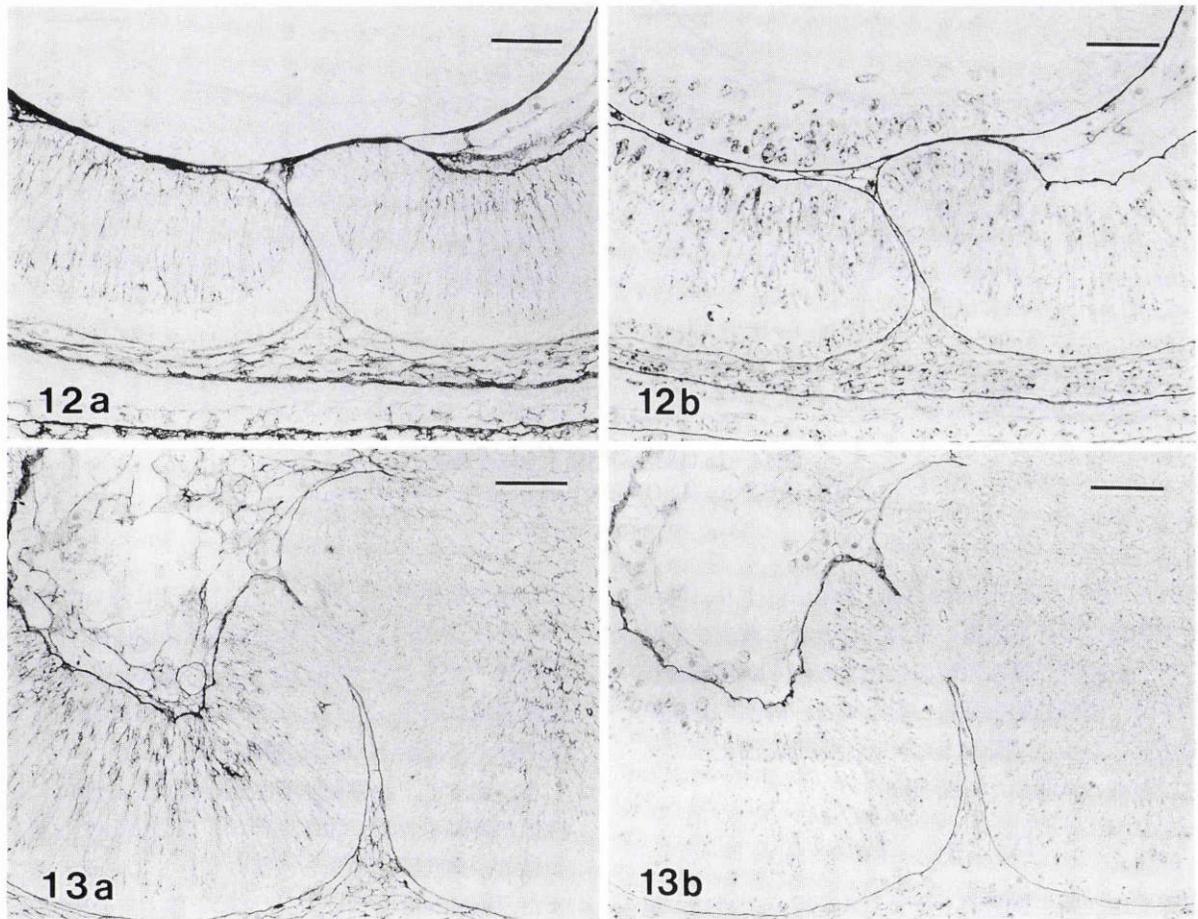


図12, 13は正常胎生裂閉鎖過程。

a: S-HID染色, b: Chase ABC消化/S-HID染色, バーは30 μm

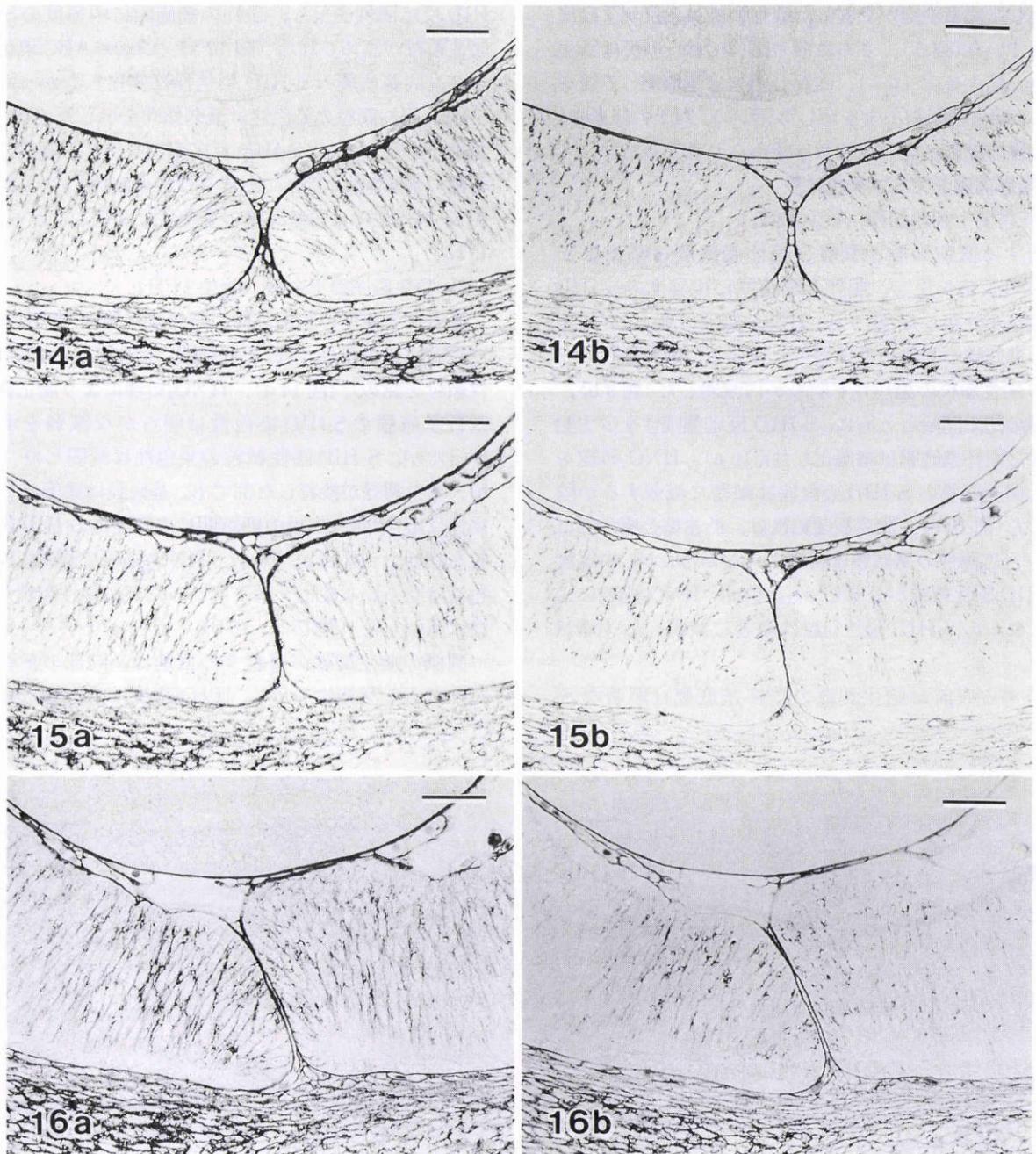


図 14~16 は胎生裂閉鎖不全成立過程.
a: S-HID 染色, b: HNO₂処理/S-HID 染色, バーは 30 μm

粒を認めた (図 17 a). Chase ABC 消化法により, 開存する胎生裂縁の眼杯基底膜の染色性は著しく減少するか消失した. 細胞間の陽性顆粒の染色性も明らかに減弱した (図 17 b). 両側の胎生裂縁が接しても, 同部の基底膜は強陽性反応を示し (図 18 a), Chase ABC 消化法で同染色性は顕著に減弱した (図 18 b).

IV 考 按

本研究では, 胎生裂閉鎖不全マウスを得るために, 現在まで当教室で行われてきた実験奇形学的研究¹¹⁾の結果に基づき, 催奇形物質である ochratoxin A の投与日お

よび投与量を決定した. また, 本研究に用いた Jcl:ICR マウスは, 胎生 11 日から胎生裂閉鎖が開始し, 胎生 13 日には終了することが知られている⁴⁾ため, 正常胎生裂の閉鎖過程は胎生 12 日に, ochratoxin A で成立した胎生裂閉鎖不全は胎生 14 日に観察した.

本研究では, 正常胎生裂閉鎖が進行する部位に核の変性像が観察された. 鈴木ら⁴⁾⁵⁾は, この核の変性像が胎生裂縁での基底膜の消失と密接に関与していると考えた. また, Bernfield ら¹⁶⁾は, マウス顎下腺上皮の組織発生で, 器官の形態形成期に間葉細胞がある種の基底膜分解酵素を産生し, 基底膜を改造することが上皮組織の分化に必

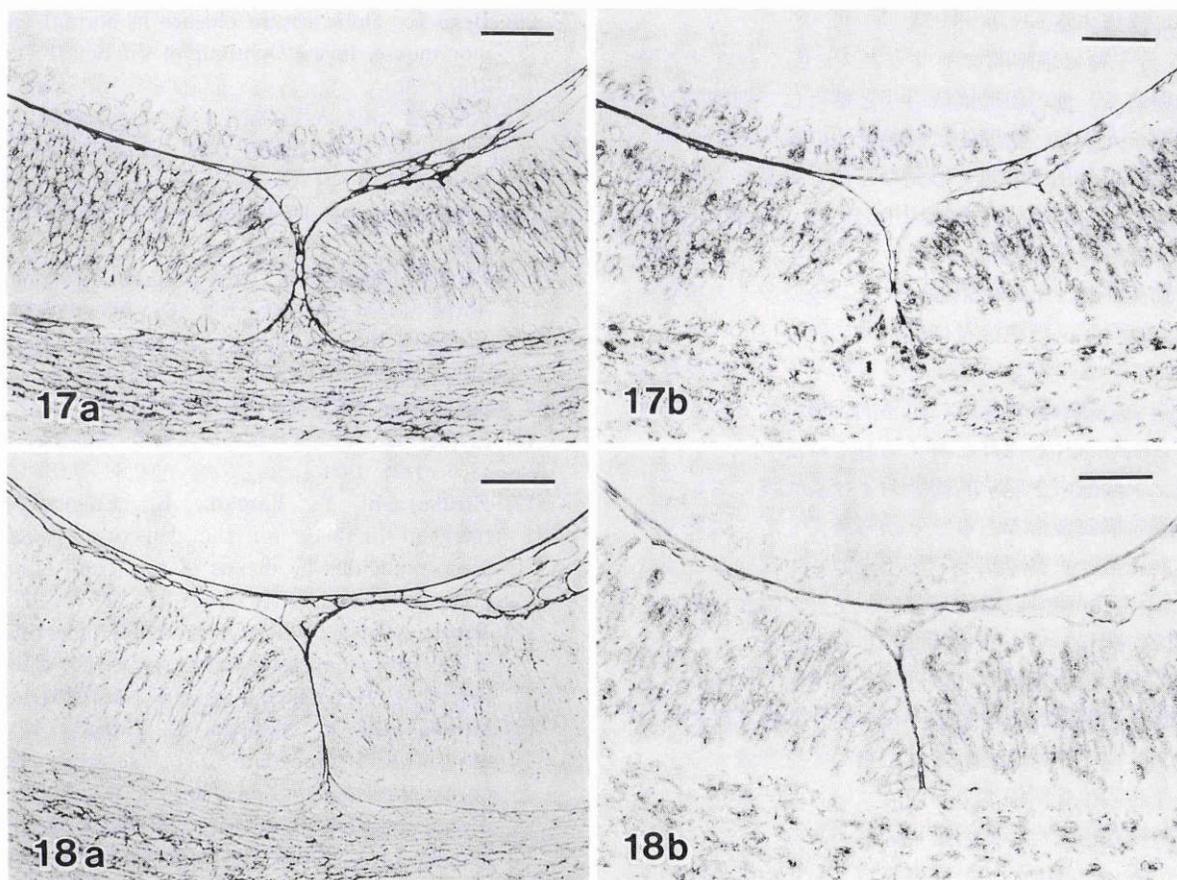


図 17, 18 は胎生裂閉鎖不全成立過程。
a: S-HID 染色法, b: Chase ABC 消化/S-HID 染色, バーは 30 μm

須であることを明らかにし, この基底膜の消失が上皮細胞の形態変化を刺激すると述べている。このことは, 上皮の発生分化に基底膜が重要な役割を果たしていることを示している。

正常胎生裂閉鎖では, 胎生裂縁への外板の陥入, 同部での基底膜の消失ならびに内反した外板細胞の核の変性などの過程が重要な役割を果たしていると考えられる。Ochratoxin A で神経堤由来の間葉細胞に障害を与えることにより生じる胎生裂閉鎖不全マウスでは, 上述した組織変化の過程は観察されない。すなわち, 胎生裂閉鎖不全の成立は胎生裂縁に介在する異常な間葉細胞が胎生裂縁の基底膜に何らかの変化を生じさせたことに起因すると推定できる。眼原基の形成にあずかる間葉組織は神経堤細胞由来であること^{17)~19)}や, 本研究で用いた催奇形物質の ochratoxin A は神経上皮細胞と神経堤細胞を障害して外脳症マウスを生じさせること²⁰⁾はよく知られている。また, ochratoxin A で成立したマウスの眼形成異常の組織学的研究¹¹⁾でも, 神経堤細胞の異常が多様な眼形成異常の成立に関与していることが示されている。このことから, ochratoxin A により成立した外脳症マウスでは, 胎生裂縁に介在する間葉細胞が障害されることにより胎生裂閉鎖不全が成立すると考えられる。

本研究で用いた組織化学的方法およびその結果を表 1

に示す。S-HID 法は, 酸性複合糖質検出法であるジアミン法に物理現象法を導入することにより検出感度を鋭敏にした方法である¹²⁾¹³⁾。S-HID 染色法を用いることにより, 従来の手法では検出不可能であった組織に含まれる少量の酸性複合糖質の検出を効率よく, かつ容易に行うことができる。HNO₂処理法は, ヘパラン硫酸のような N-硫酸基含有 GAG を特異的に分解する化学修飾法であることが知られている¹⁴⁾。さらに, Chase ABC 消化法は組織からコンドロイチン硫酸異性体(A, B, C, D and/or E)のような酵素基質を糖質組織化学的に除去する酵素消化法である¹⁵⁾。以上から, HNO₂処理/S-HID 法および Chase ABC 消化/S-HID 法は, 組織に含まれるヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸異性体の局在を各々

表 1 胎生裂縁基底膜の組織化学的検索結果

	S-HID	HNO ₂ /S-HID	ChaseABC/S-HID
反応特異性	酸性複合糖質は陽性	ヘパラン硫酸を除去	コンドロイチン硫酸異性体を除去
正常閉鎖	強陽性	減弱	変化(-)
閉鎖不全	強陽性	変化(-)	減弱

S-HID: sensitized high iron diamine, HNO₂: 亜硝酸

特異的に検出する。

GAG分子種は細胞間マトリックスに広く存在する酸性複合糖質で、他の組織構成分子と結合して細胞間および組織間を充填し、物理的に組織構造の維持を担う他、細胞や組織の分化・増殖・移動などにも重要な役割を果たしている⁷⁸⁾。GAG分子種の中でヘパラン硫酸は、細胞が隣接する細胞や細胞間マトリックスと接着する際に接着部に動員され、その糖鎖部分により他の多くの接着分子と強く結合し、細胞接着に促進的に作用していることが知られている⁹⁾¹⁰⁾²¹⁾。一方、コンドロイチン硫酸異性体は、細胞や組織の接着反応に阻害的に作用する特異な生物活性を賦与された物質と考えられている²²⁾。

ヘパラン硫酸の生理学的機能および基底膜においてそれが主要な構成要素であることから考えて、この研究で得られた正常胎生裂閉鎖と閉鎖不全の胎生裂縁基底膜におけるヘパラン硫酸の量的差は、胎生裂が閉鎖するか否かと密接に関連している可能性が示唆された。また、コンドロイチン硫酸異性体の生理学的作用と今回観察された正常胎生裂閉鎖および閉鎖不全の胎生裂縁基底膜におけるコンドロイチン硫酸異性体の量的差を考慮すると、同分子種が胎生裂閉鎖不全の成立に際して胎生裂縁で接着阻害の役割を果たしている可能性がある。

以上から、ochratoxin Aにより成立した胎生裂閉鎖不全は、胎生裂縁基底膜の何らかの変化が一因を成し、胎生裂が閉鎖するか否かには基底膜に含まれているHSとCHS異性体が主要物質として深く関与しているものと考えられる。また、上述した胎生裂閉鎖不全の胎生裂縁基底膜に存在するGAG分子種の量的および質的变化は、眼原基を形成する間葉細胞と眼杯の神経上皮細胞間の異常な上皮-間葉相互作用の結果と考えられる。

本研究は、平成6年度文部省科学研究費奨励研究A-06771525の援助を受けたことを付記し、感謝の意を表します。また、本研究の英語論文はJpn J Ophthalmol, 39: 20-29, 1995に掲載されている。

文 献

- 1) Barber AN: Embryology of the Human Eye. CV Mosby, St. Louis, 50-63, 1955.
- 2) Mann I: Developmental Abnormalities of the Eye. British Medical Association, London, 74-93, 1957.
- 3) Duke-Elder S, Cook C: Embryology. In: Duke-Elder S (Ed): System of Ophthalmology, Vol III, Part I. Henry Kimpton, London, 19-48, 1963.
- 4) 鈴木 敬, 白井正一郎, 馬嶋昭生: 胎生裂の閉鎖機序に関する形態学的研究 (I). 日眼会誌 92: 238-242, 1988.
- 5) 鈴木 敬, 白井正一郎, 馬嶋昭生: 胎生裂の閉鎖機序に関する形態学的研究 (II). 日眼会誌 93: 247-253, 1989.

- 6) Hero I: Optic fissure closure in normal cinnamon mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 197-216, 1990.
- 7) 大平敦彦: 細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能. 代謝 21: 305-313, 1984.
- 8) Ruoslahti E: Proteoglycans in cell regulation (minireview). J Biol Chem 264: 13369-13372, 1989.
- 9) Pei YF, Robin JAG: The prenatal development of the mouse eye. Anat Rec 168: 105-126, 1970.
- 10) Geeraets R: An electron microscopic study of the closure of the optic fissure in golden hamster. Am J Anat 145: 411-431, 1976.
- 11) 白井正一郎: 眼先天異常の成立機序. 日眼会誌 95: 1206-1237, 1991.
- 12) Hirabayashi Y, Yamada K: Efficient histological methods for the detection of acidic glycoconjugates by means of sensitized diamine procedure. Connective Tissue 22: 39-40, 1991.
- 13) Hirabayashi Y: Light-microscopic detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedure. Histochem J 24: 409-418, 1992.
- 14) Hirabayashi Y, Shimizu S, Yamada K: A nitrous acid procedure as a selective histochemical means of eliminating the N-sulphates of glycoconjugates. Histochem J 21: 687-692, 1989.
- 15) Yamagata Y, Saito H, Habuchi O, Suzuki S: Purification and properties of bacterial chondroitinase and chondrosulfatases. J Biol Chem 243: 1523-1535, 1968.
- 16) Bernfield M, Banerjee SD, Koda JE, Rapraeger AC: Remodelling of the basement membrane: Morphogenesis and maturation. Ciba Found Symp 108: 179-196, 1984.
- 17) Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ: Origins of avian ocular and periocular tissues. Exp Eye Res 29: 27-43, 1979.
- 18) Morriss-Kay GM, Tan S-S: Mapping cranial neural crest cell migration pathways in mammalian embryos. Trends Genet 3: 257-261, 1987.
- 19) Osumi-Yamashita N, Eto K: Mammalian cranial neural crest cells and facial development. Develop Growth & Differ 32: 451-459, 1990.
- 20) Hayasaka I, Hoshino K, Kameyama Y: Pathogenesis of ochratoxin A- and concanavalin A-induced exencephalies in mice. Cong Anom 26: 11-24, 1986.
- 21) Lark, MW, Colp LA: Turnover of heparan sulfate proteoglycans from substratum adhesion sites of murine fibroblasts. J Biol Chem 259: 212-217, 1984.
- 22) Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K: Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. J Biol Chem 264: 8012-8018, 1989.