

健常ウマ眼球の組織学的・免疫組織化学的研究
(健常眼球組織と抗原提示細胞の免疫組織化学的検
索) ならびにイヌの眼球および口腔内黒色細胞性
腫瘍の悪性度とマクロファージ浸潤に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

佐野悠人

獣医病理・免疫学

指導教員 教授 谷山弘行

2015年度

汎例

ABC	avidin-biotinylated peroxidase complex
α SMA	α -smooth muscle actin
Ch A	chromogranin A
CK	cytokeratin
CK 8	cytokeratin 8
CK 18	cytokeratin 18
DAB	0.05%3,3-diaminobenzidine in PBS、0.01%H ₂ O ₂
Des	desmin
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HE	ヘマトキシリン・エオシン
IHC	免疫組織化学
MC	melanocytoma
MHC II	major histocompatibility complex class II
MM	malignant melanoma
MT	melanocytic tumor
M2TAM	M2 型腫瘍随伴マクロファージ
NF	nerofilament protein
NSE	neuron specific enolase
Pan-CK	pan-cytokeratin
PBS	カルシウム・マグネシウム不飽和 0.01M リン酸緩衝食塩水
Syna	synaptophysin
S100	S100 protein
TAM	tumor-associated macrophages (腫瘍随伴マクロファージ)
Vime	vimentin

目次

凡例

緒論	1
----	---

第 I 章 ウマ眼球の組織学的（角膜、虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜ならび水晶体）における組織学的および免疫組織化学的検索

1-1. 序文	5
1-2. 材料と方法	
1-2-1. 供試動物ならび組織学的検索	6
1-2-2. 免疫組織化学的検索	
1-2-2-1. 蛍光抗体法	7
1-2-2-2. 酵素抗体法	7
1-3. 結果	
1-3-1. 組織学的検索	10
1-3-2. 免疫組織化学的検索	12
1-4. 考察	34
1-5. 小括	40

第 II 章 ウマ眼球ぶどう膜における CD163 陽性細胞ならび MHC II 陽性細胞の分布

2-1. 序文	42
2-2. 材料と方法	
2-2-1. 供試動物	43

2-2-2. 免疫組織化学的検索	43
2-2-3. 統計学的検索	44
2-3. 結果	
2-3-1. 免疫組織化学的検索	
2-3-1-1. CD163+細胞	46
2-3-1-2. MHC II+細胞	46
2-3-2. 統計学的検索	47
2-4. 考察	52
2-5. 小括	56
第 III 章 ウマ眼球における硝子体細胞の組織学的ならび免疫組織化学的検索とその分布	
3-1. 序文	58
3-2. 材料と方法	
3-2-1. 供試動物ならび組織学的検索	59
3-2-2. 免疫組織化学的検索	60
3-2-3. 統計学的検索	61
3-3. 結果	
3-3-1. 組織学的検索	63
3-3-2. 免疫組織化学的検索	64
3-3-3. 統計学的検索	64
3-4. 考察	70
3-5. 小括	74
第 IV 章 イヌの口腔および眼球黒色細胞性腫瘍における CD163 陽性腫瘍随伴 M2 マ	

クロファージの免疫組織化学的および定量的検索

4-1. 序文	76
4-2. 材料と方法	
4-2-1. 供試動物ならび組織学的検索	78
4-2-2. 免疫組織化学的検索	78
4-2-3. 統計学的検索	79
4-3. 結果	
4-3-1. 組織学的検索	80
4-3-2. 免疫組織化学的検索	81
4-3-3. 統計学的検索	82
4-4. 考察	91
4-5. 小括	94
総括	95
謝辞	98
引用文献	99

緒論

眼球は、発生学的に三胚葉を起源とする細胞が複雑に分化し構築される感覚器である [79, 91, 97]。複雑に分化し構築された各眼球組織における発生を理解するために、胎児（仔）眼球と分化した健常眼球との組織学的特徴ならび免疫組織学的特徴における比較研究がなされ [62, 63, 66]、健常眼球組織の組織学的特徴や免疫組織化学的特徴を把握することは眼球の発生の理解に際し基盤となり重要である。また、眼球においても他の組織同様に、多種の動物に渡り多くの疾患が生じることが知られている [25, 26, 30–34, 90, 93]。そして、様々な眼球疾患の病態の解明や理解において、疾患と健常の眼球組織における比較研究は眼球疾患の病態理解の向上に大きく貢献している [19, 21, 41, 57, 66, 126]。これらのことより、眼球における組織学的特徴と免疫組織学的特徴を組み合わせた基礎知識は眼球発生や眼球疾患を理解するために重要である。ウマの眼球においても、発生異常や全身性・局所性による感染性・炎症性・免疫介在性・腫瘍性などに分類される多岐に渡る原因に分類される疾患が報告されている [2, 5–10, 23, 26, 54, 59, 60, 76, 92]。しかしながら、健常ウマ眼球における研究は少なく、ウマの眼球疾患を理解するための基礎知識は乏しい。多岐に渡る眼球疾患における病態の理解の向上において、健常ウマ眼球組織についてのさらなる基礎知識の向上が必要不可欠である。

眼球は解剖学的に他の組織と隔離されているため、独自の免疫機能を備えた組織であり、免疫特権部位（組織）として知られている [80, 95]。眼球の免疫特権の形成において眼球組織に在住する抗原提示細胞は、局所的な免疫恒常性維持や全身性免疫寛容機構に貢献し、重要な役割を担っていると考えられている [80, 95]。さらに、分布する抗原提示細胞は局所性の炎症性、免疫介在性疾患の起爆や波及を担う細胞として機能していることが考えられている [67]。眼球組織の中でも眼球血管膜（ぶどう膜）

は、マクロファージと樹状細胞に分類される組織在住抗原提示細胞の分布が豊富な眼球組織であることがヒト、マウス、ラットで明らかとなっており [81–83]、それらはぶどう膜や眼球全体の免疫恒常性機構に関与しているとともに、ぶどう膜炎の起爆や波及に関与すると考えられている。ぶどう膜炎はウマの眼球疾患の中で最も認められる疾患であり [8, 26]、ウマ眼球組織に分布する抗原提示細胞についての詳細を明らかにすることは、ウマの眼球免疫恒常性機構の理解や眼球炎症性・免疫介在性疾患の病態を理解するために必要不可欠であると考ええる。

眼球の組織在住細胞の分布は、眼球組織の間質のみならず硝子体内腔にも認められている。硝子体と眼球組織との境界層に分布する細胞は硝子体細胞と呼ばれ、ヒトや実験動物の硝子体細胞はその免疫組織化学的表現型より、マクロファージであることが示唆されている [4, 14, 15, 47, 96, 100, 106, 121, 123, 127]。そして、同細胞の硝子体内増殖性疾患への関与、眼球内免疫への抗原提示細胞としての関与、さらには眼球内組織傷害や修復過程における反応性の活性化が報告されている [40, 44, 58, 64, 68, 106, 123, 127]。しかしながら、ウマの硝子体細胞における研究報告はない。そこで、ウマの後房内における疾患の病態の理解向上には、ウマ眼球における硝子体細胞の特徴を明らかにする必要があると考ええる。

慢性炎症反応に伴う腫瘍微小環境は、固形腫瘍の形成や進行において重要な役割を果たしている [75, 116]。特に腫瘍に浸潤するマクロファージ (TAM) は、腫瘍微小環境の形成に参画する重要な細胞である。近年、ヒトの数多くの固形腫瘍において、その悪性度や予後不良と TAM の浸潤増加が相関していることが示されており [52, 70]、TAM は腫瘍に有利な微小細胞環境を形成し腫瘍促進に関与していると考えられている。TAM の多くは M2 への活性化を受け M2 マーカーの発現が増強しており [77, 112]、M2 型腫瘍随伴マクロファージ (M2TAM) の浸潤程度を知ることは腫瘍の悪性度を理解する上で重要な要素である。ヒトの眼球腫瘍における悪性度と M2TAM 浸潤との関連性が検索されており、黒色細胞性腫瘍の悪性度や予後不良とその浸潤増加と

の相関性が明らかになっている [17]。イヌにおいても眼球に黒色細胞性腫瘍が発生し、それは組織学的に悪性であっても転移は稀で、臨床的な観点から良性であると理解されている [101, 118]。一方で、口腔の黒色細胞性腫瘍は早期に遠隔転移することから悪性であると認識されており [50, 114, 134]、イヌの黒色細胞性腫瘍では異なる発生部位が一つの予後指標になることが知られている。これらの異なる腫瘍発生部位における異なる腫瘍悪性度については広く認知されているが、それについて腫瘍微小環境、すなわち M2TAM の浸潤程度の観点からの研究報告は過去になされていない。

本研究では、ウマ眼球疾患における病態の理解向上を目的として、ウマ眼球組織について以下の 3 章に分けられる検索を行った。まず第 1 章では、ウマ眼球組織（角膜、虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜ならび水晶体）の組織学的構造を把握し、細胞骨格・上皮系・筋系・神経系/神経内分泌系マーカーに分類される各種の一次抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い、各組織の免疫組織化学的特徴を検索した。続く第 2 章では、眼球免疫恒常性機構に重要な役割を担っている眼球組織の抗原提示細胞について、ウマぶどう膜に分布する組織在住マクロファージ、B 細胞と MHC II 陽性細胞の分布と、それらの分布の特徴を検索した。そして第 3 章では、硝子体の免疫機構あるいは後眼房の疾病に関与していると考えられている硝子体細胞について、ウマ眼球における硝子体細胞の組織形態学的特徴、免疫組織学的特徴、さらにそれらの各眼球組織（毛様体、網膜、視神経乳頭部）の硝子体皮質における分布の特徴を検索した。

さらに、ウマ眼球の基礎研究に加え本研究の第 4 章では、眼球疾患における病態理解を一つの目的として、イヌの眼球と口腔内の黒色細胞性腫瘍を用いて、それらの悪性度と CD163 陽性 M2 マクロファージ浸潤との関連性の有無について検索を行った。

第 I 章

ウマ眼球構成組織（角膜、虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜ならび
水晶体）における組織学および免疫組織化学的検索

1-1. 序文

多種の動物の眼球において、他の臓器同様に先天性や後天性の多岐に分類される疾患が生じることが広く知られている [25, 26, 30-35, 90, 93]。それらの病態を理解するために、免疫組織化学染色は検索手法の一つとして汎用されおり [30-34]、眼球組織における免疫組織学的特徴を把握する基礎知見は、健常と多様な眼球疾患との比較研究は眼球疾患の理解向上に貢献している [30-34]。そのため、免疫組織化学的手法により眼球疾患の病態を理解するためには、眼球組織の免疫組織化学的特徴を理解することは重要である。過去には、ヒト [37-39, 42, 48, 62, 63, 65, 85, 86, 98, 102, 108]、サル [46]、マウス [98]、ラット [63, 98]、ウサギ [42, 63, 87]、ニワトリ [98, 140]、モルモット [98] やウシ [42, 98] において眼球各組織に区分された中で、それらの免疫組織化学的特徴の検索がなされ明らかになっている。これらに加え、イヌ [71] やプレーリードック [84] の眼球組織全体における免疫組織化学的特徴が明らかになっている。

ウマ眼球においても発生異常、炎症性・免疫介在性疾患・腫瘍性疾患などに分類される多岐にわたる疾患が知られており [2, 5-10, 23, 26, 54, 59, 60, 76, 92]、それらの原因、病態あるいはその由来を把握するために免疫組織化学的手法は汎用されている。しかしながら、ウマ眼球組織における免疫組織化学的特徴を検索した報告は見当たらない。ウマ眼球組織における免疫組織化学的特徴を明らかにすることは、ウマ眼球疾患のさらなる理解や病態解明の向上に必要な不可欠であると考えられる。

本研究では、ウマにおける眼球疾患の免疫組織化学的手法を用いた病理組織学的理解の向上を目的として、健常ウマ眼球組織（角膜、虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜ならびに水晶体）における組織学的特徴を把握することに加え、健常ウマ眼球各組織における免疫組織化学的特徴を明らかにすることを目的とした。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 供試動物ならび組織学的検索

臨床的に眼疾患を伴わないサラブレッド種4頭(雄3、雌1)の5眼球を使用した。使用したウマの詳細は表1に示した。眼球の固定には、ダッビットソンの固定液を用いた。固定に際し眼球背側中央部に前後約1 cmの切込みを入れ、注射針付きシリンジを用いて約0.5-1.0 mlの固定液を注入し、約36時間の固定液浸漬を行った。固定眼球より、角膜、毛様体、網膜、脈絡膜を含有する厚さ0.5-1.0 cmの組織片、ならび視神経乳頭部を含有する厚さ0.5-1.0 cmの組織片に切り出し、アルコール脱水とキシレン浸漬後、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋組織より、厚さ5 μm のパラフィン組織切片を作製し、HE染色を施し組織学的検索を行った。

表1. 試供動物の特徴

No.	眼球	性別	年齢	診断
1	右	雄	1歳	ウォブラー症候群
2	右	雄	4歳	蹄骨炎
3	左	雄	13歳	ウォブラー症候群
4	右			
5	左	雌	14歳	水腎症

1-2-2. 免疫組織化学的検索

パラフィン包埋組織より、厚さ5 μm のパラフィン組織切片を作製し、免疫組織化学的検索を行った。尚、免疫組織学的検索は蛍光抗体法と酵素抗体法を併用し行った。

1-2-2-1. 蛍光抗体法

蛍光抗体法は間接蛍光抗体法により行った。細胞骨格を標的とした一次抗体として、Vime、Pan-CK、Des、GFAP、NF を使用した。これらに加え、上皮系マーカーとして CK 8 ならび CK 18、筋系マーカーとして α SMA、神経系・神経内分泌系マーカーとして NSE、Syna、Ch A、カルシウム結合型タンパクのマーカーとして S100 を一次抗体として使用した。それぞれの一次抗体の詳細情報および抗原賦活化方法は表 2 に示した。作製パラフィン切片は、キシレンにて脱パラフィンし、エチルアルコールを通し水洗した。前処置後、十分な流水洗を行い、非特異的反応除去の目的で、10% ヤギ正常血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を切片上にマウントし、37°C 30 分間のブロッキング処置を行った。PBS でそれぞれの至適濃度に一次抗体を希釈し(表 2)、希釈一次抗体を切片上にのせ保湿箱内で 4°C overnight 反応させた。一次抗体反応終了後、PBS 洗浄と 0.05% トライトンへの浸漬を行い、二次抗体として PBS で 200 倍希釈した二次抗体の Alexa Fluor[®] 488 蛍光標識ヤギ抗マウス IgG 抗体、または Alexa Fluor[®] 546 蛍光標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, OR, U.S.A.) を用い、遮光下室温 30 分間反応させた。二次抗体反応後、十分な PBS 洗浄を遮光下で行い、水溶性封入材または ProLong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, U.S.A.) で封入し、蛍光顕微鏡 (C2; Nikon Instech Co, Ltd., Tokyo, Japan) にて観察した。各一次抗体の陽性対象として、Vime、Pan-CK および CD31 には皮膚組織、CK 8 ならび CK 18 には肝臓組織、Des ならび α SMA には平滑筋ならび横紋筋組織、NSE、Syna および Ch A には副腎組織、S100、GFAP ならび NF には脊髄組織を用いた。これらの陽性対象はダッビットソンの固定液により固定された組織を用いた。陰性対象には、一次抗体または二次抗体のそれぞれ混和の無い溶液を使用した。

1-2-2-2. 酵素抗体法

酵素抗体法は、ABC (ABC; Vectarstain Elite ABC Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) 法により行った。蛍光抗体法と同様のウマ眼球組織における免疫組織化学的特徴の検索を目的とし行った。それぞれの一次抗体の詳細、ならび抗原賦活化方法は表 2 に示した。作製パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィンし、エチルアルコールを通し、水洗した。前処置後、十分な流水洗を行い、内因性ペルオキシダーゼの不活化の目的として、0.05% HIO₄水溶液に室温 15 分間の浸漬を行った。非特異的反応除去の目的で、ブロックエース (Block Ace[®]; DS Farma Biomedical, Osaka, Japan) 37°C 30 分間の浸漬を行った。PBS でそれぞれの至適濃度に一次抗体を希釈し (表 2)、希釈一次抗体を切片上にて保湿箱内で 4°C overnight 反応させた。一次抗体反応終了後、PBS 洗浄と 0.05% トライトンへの浸漬を行い、二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG 抗体、またはビオチン標識ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を用い室温 30 分間反応させた。二次抗体反応後、十分な PBS 洗浄を行い、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories) に室温 30 分間反応させ、0.05% DAB 水溶液を用いて発色反応を行った。すべての組織の対比染色には Mayer のヘマトキシリン染色を行った。各一次抗体の陽性対象には、蛍光抗体法と同様の組織を用いた。

表 2. 免疫組織化学的検索に使用した一次抗体

一次抗体	タイプ	前処置	希釈	クローン	製造元
Vime	MM	Autoclave	—	V9	Dako
Pan-CK	MM	Autoclave	—	AE1/AE3	Nichirei
CK 8	MM	Microwave	1: 20	Ks8.7	Progen
CK 18	MM	Microwave	1: 10	Ks18.04	Progen
Des	MM	Autoclave	1: 80	D9	Progen
αSMA	MM	Microwave	1: 300	1A4	Dako
GFAP	MM	N.D.	1: 200	Nr.Z0334	Dako
NF	MM	Microwave	1: 200	2F11	Dako
NSE	MM	N.D.	1: 200	BBS/NC/VI-H14	Dako
Syna	MM	Microwave	1: 400	SY38	Millipore
S100	RP	N.D.	1: 300	—	Dako
Ch A	RP	Microwave	1: 1000	—	Abcam

MM : マウスモノクローナル. RP : ウサギポリクローナル.

1-3. 結果

1-3-1. 組織学検索

ウマ眼球組織を構成する角膜、虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜ならび水晶体は図 1 に示す位置に認められた。また、各眼球組織における組織学的特徴は以下に記載する。

角膜：明瞭な 4 層の組織による構築が認められた (図 2)。最外層は、十数層の非角化上皮細胞により構成される角膜上皮細胞により覆われていた (図 3)。角膜上皮細胞層における最表層は扁平で、中間層では各細胞の丈は高くなり、最下層では最大の細胞丈を有する基底細胞層が認められた。また、前境界板は不明瞭であった。角膜構造の中間層に相当し角膜全体の厚さの大部分を構成する角膜固有層は、規則的な間隔で細胞が配列する線維性組織により構成されていた (図 4)。角膜中間層の最内層直下には、厚い好酸性の膜 (= 後境界板 / デスメ膜) を認めた。角膜最内層は、一層の角膜内皮細胞 (= 角膜後上皮) により内張りされていた (図 5)。

虹彩：前側の虹彩支質と後側を覆う色素上皮細胞により構成されていた (図 6, 図 7)。虹彩支質は色素細胞や線維細胞、血管により構成される血管線維性組織により形成されており、色素上皮領域には瞳孔散大筋が認められた (図 8)。また、虹彩先端領域には瞳孔括約筋が認められた (図 9)。背側上部の虹彩縁にのみ、虹彩色素上皮細胞層と連続性を有し、豊富な色素含有細胞と血管に豊富な支質より形成される虹彩顆粒を認めた。

毛様体：前部の毛様体冠部と後部の扁平な毛様体輪部により構成されていることが特

徴付けられた。冠部には多数の毛様体突起が形成され、硝子体内に突出し認められた（図 10）。冠部ならび輪部共に虹彩色素上皮細胞層と網膜と直接的に連続性を有する二層の毛様体上皮細胞層と、脈絡膜と連続性に構成される外側の血管膜毛様体部（支質）により構成されていた。二層の毛様体上皮細胞は、内層は無色素細胞、外層は豊富なメラニンを含有する色素細胞の層により構成されていた（図 11）。毛様体支質（間質）は、虹彩支質（間質）と脈絡膜（脈絡膜血管板）と連続する豊富な血管形成を伴う線維性間質により構成されていた（図 12）。

脈絡膜：豊富な血管と無色素ならび色素含有細胞の間質への分布を認める線維性組織により構成されていた（図 13, 14）。タペタム領域には線維性輝板（図 13）が認められた。

網膜・視神経乳頭：網膜は毛様体輪部と連続性に、後房最内層を覆う 10 層から構成される膜構造として認められた。網膜の 10 層構造は、内側より内境界板、視神経線維層、内網状層、視神経（節）細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界層、視細胞層に相当する層構造により形成されており、視細胞直下と脈絡上板間には網膜色素上皮細胞層が認められた（図 15）。網膜色素細胞層において、タペタム領域の網膜色素細胞はメラニン含有に乏しいか無色素性であり、ノンタペタム領域では同細胞に豊富なメラニン色素の含有が認められた。視神経乳頭は網膜神経線維層から連続する軸索束として認められ、それらは線維性結合組織により構成される強膜篩板により、視神経線維束としての細分化が認められた（図 16）。視神経乳頭部では網膜中心動脈を認め、網膜中心動脈からの分枝は視神経乳頭部にのみ局限して認められた（図 17）。

視神経・髄膜：視神経乳頭部より連続性に視神経の形成が認められた。視神経の神経

線維は、線維性結合組織により神経線維束に区画され軸索を形成し、視神経の最外側は髄膜に相当する線維性結合組織により覆われていた。

水晶体：両凸レンズ状の形態より、前極、後極、赤道、前面、後面に区別された。

水晶体の最表層は、好酸性の均質無構造膜である水晶体包（囊）で全周性に覆われていた。水晶体包直下の赤道部を含む前面には、一層の立方上皮により構成される水晶体上皮細胞層を認めた（図 18）。赤道部において水晶体上皮細胞は、水晶体深部に向かい紡錘状となり、水晶体線維への移行が認められた。水晶体皮質における赤道部の浅層から中層にかけては、水晶体細胞の水晶体線維への移行細胞核が認められた（図 19）。水晶体核ならび水晶体皮質は、密な規則性を有する線維組織の配列により構成されていた。

1-3-2. 免疫組織化学的検索

本研究に用いたすべてのウマ眼球組織において、免疫組織化学的手法による個体差や左右差は認められず、検索したウマ眼球組織の各染色性は各検体で類似していた。また、ウマ眼球組織における各一次抗体に対する免疫組織化学的検索の結果は表 3 に示した。

角膜：角膜上皮全層は Pan-CK に陽性であった（図 20）。固有層を構成する細胞は Vime に陽性であり、散在性に S100 陽性であった。角膜内皮細胞は、Pan-CK に陽性（図 21）であり、Vime には陰性（図 22）であった。また、角膜内皮細胞は CK 8（図 23）、CK 18（図 24）ならび S100 に陽性であった。

虹彩：虹彩間質細胞、虹彩後上皮細胞ならび虹彩筋（虹彩括約筋ならび虹彩散大筋）

は Vime に陽性であった。括約筋は α SMA (図 25) と Des (図 26) に陽性であり、散大筋は α SMA (図 27, 28) にのみ陽性であった。

毛様体：毛様体無色素上皮細胞は、Vime (図 29) および NSE (図 30) に陽性であり、Des (図 31) 陽性を呈する細胞も時折認められた。毛様体色素上皮細胞は Vime (図 29)・Pan-CK (図 32)・CK 8 (図 33)・CK 18 (図 34) に陽性であった。毛様体筋、篩状靭帯表層や小柱網表層細胞を含む間質構成細胞は Vime に陽性であり、毛様体筋は α SMA・Des に陽性であった。

脈絡膜：広範囲にわたる間質細胞は Vime に陽性であったが、タペタムは陰性でありその他の抗体にもタペタムは陰性であった。また間質には S100 陽性細胞を散在性に認めた。

網膜：神経線維層は、Vime・GFAP (図 35)・NF (図 36)・NSE (図 37)・S100 (図 38) に陽性であった。神経節細胞は Ch A・NSE (図 37) に陽性であり、また神経節細胞の中には GFAP・NF・Syna・S100 (図 38) に陽性であるものも認められた。内網状層は GFAP (図 35)・NF (図 36)・NSE (図 37)・Syna・S100 (図 38) に陽性であり、内顆粒層は Vime・NSE (図 37)・Syna・S100 に一部の細胞が散在性に陽性であった。外網状層は GFAP (図 35)・NF (図 36)・NSE (図 37) に陽性であり、外顆粒層は Vime・NSE・Syna・S100 に一部の細胞が陽性であった。視細胞層は Syna に陽性であり、一部 NSE 陽性細胞も認められた。網膜色素上皮細胞は、タペタムとノンタペタム領域の両領域において Vime (図 39)・Pan-CK (図 40)・CK8・CK18 陽性であった。

視神経乳頭・視神経・髄膜：軸索は Vime・GFAP・NF・NSE・S100 に陽性であり、

グリア細胞は Vime・GFAP・S100 に陽性であった。髄膜は Vime に陽性であった。

水晶体：水晶体上皮細胞は、Vim（図 41）・GFAP（図 42）・NSE（図 43）・S100（図 44）に陽性であり、細胞核の移行部や水晶体皮質では Vime・GFAP・S100 の陽性像を認めた。

その他の眼球組織：虹彩支質、毛様体支質、視神経乳頭部、脈絡膜血管層に分布する血管の血管壁は Vime・ α SMA・Des に陽性であった。また、ぶどう膜末梢神経は、Vime・GFAP・NF・S100 に陽性であった。

表 3. 各健常眼球組織における免疫組織化学的検索結果 (1)

	Vime	Pan-CK	CK 8	CK 18	αSMA	Des
角膜						
表皮層	—	+	+	+	—	—
基底細胞層	—	+	+	+	—	—
固有層 (間質細胞)	+	—	—	—	—	—
デスメ膜	—	—	—	—	—	—
内皮細胞 (層)	—	+	+	+	—	—
虹彩						
間質 (支質) 細胞	+	—	—	—	—	—
括約筋	+	—	—	—	+	+
散大筋	+	—	—	—	—	+
後上皮	+	—	—	—	—	—
毛様体						
篩状靭帯 (細胞)	+	—	—	—	+	+
小柱網 (細胞)	+	—	—	—	+	—
無色素上皮細胞	+	—	—	—	—	+
色素上皮細胞	+	+	+	+	—	—
間質 (支質) 細胞	+	—	—	—	—	—
毛様体筋	+	—	—	—	+	+
脈絡膜						
タペタム	—	—	—	—	—	—
間質細胞	+	—	—	—	—	—

+ : 陽性. — : 陰性.

表 3. 各健常眼球組織における免疫組織化学的検索結果 (2)

	GFAP	NF	NSE	Syna	S100	Ch A
角膜						
表皮層	—	—	—	—	—	—
基底細胞層	—	—	—	—	—	—
固有層 (間質細胞)	—	—	—	—	±	—
デスメ膜	—	—	—	—	—	—
内皮細胞 (層)	—	—	—	—	+	—
虹彩						
間質 (支質) 細胞	—	—	—	—	—	—
括約筋	—	—	—	—	—	—
散大筋	—	—	—	—	—	—
後上皮	—	—	—	—	—	—
毛様体						
篩状靭帯 (細胞)	—	—	—	—	—	—
小柱網 (細胞)	—	—	—	—	±	—
無色素上皮細胞	—	—	+	—	—	—
色素上皮細胞	—	—	—	—	—	—
間質 (支質) 細胞	—	—	—	—	—	—
毛様体筋	—	—	—	—	—	—
脈絡膜						
タペタム	—	—	—	—	—	—
間質細胞	—	—	—	—	±	—

+ : 陽性. — : 陰性. ± : 一部陽性.

表 3. 各健常眼球組織における免疫組織化学的検索結果 (3)

	Vime	Pan-CK	CK 8	CK 18	αSMA	Des
網膜						
内境界板	—	—	—	—	—	—
神経線維層	±	—	—	—	—	—
神経節細胞 (層)	—	—	—	—	—	—
内網状層	—	—	—	—	—	—
内顆粒層	±	—	—	—	—	—
外網状層	—	—	—	—	—	—
外顆粒層	±	—	—	—	—	—
外境界板	—	—	—	—	—	—
視細胞層	—	—	—	—	—	—
網膜色素上皮細胞 (層)	+	+	+	+	—	—
視神経・視神経乳頭						
軸索	+	—	—	—	—	—
グリア細胞	+	—	—	—	—	—
髄膜 (視神経鞘膜)	+	—	—	—	—	—
水晶体						
包膜	—	—	—	—	—	—
水晶体上皮	+	—	—	—	—	—
皮質	+	—	—	—	—	—
核	—	—	—	—	—	—

＋：陽性. —：陰性. ±：一部陽性.

表 3. 各健常眼球組織における免疫組織化学的検索結果 (4)

	GFAP	NF	NSE	Syna	S100	Ch A
網膜						
内境界板	—	—	—	—	—	—
神経線維層	+	+	+	—	+	—
神経節細胞 (層)	±	±	+	±	±	+
内網状層	+	+	+	+	+	—
内顆粒層	—	—	±	±	±	—
外網状層	+	+	+	—	+	—
外顆粒層	—	—	+	+	+	—
外境界板	—	—	—	—	—	—
視細胞層	—	—	+	+	—	—
網膜色素上皮細胞 (層)	—	—	—	—	—	—
視神経・視神経乳頭						
軸索	+	+	+	—	+	—
グリア細胞	+	—	—	—	+	—
髄膜 (視神経鞘膜)	—	—	—	—	—	—
水晶体						
包膜	—	—	—	—	—	—
水晶体上皮	+	—	+	—	+	—
皮質	+	—	—	—	+	—
核	—	—	—	—	—	—

+: 陽性. —: 陰性. ±: 一部陽性.

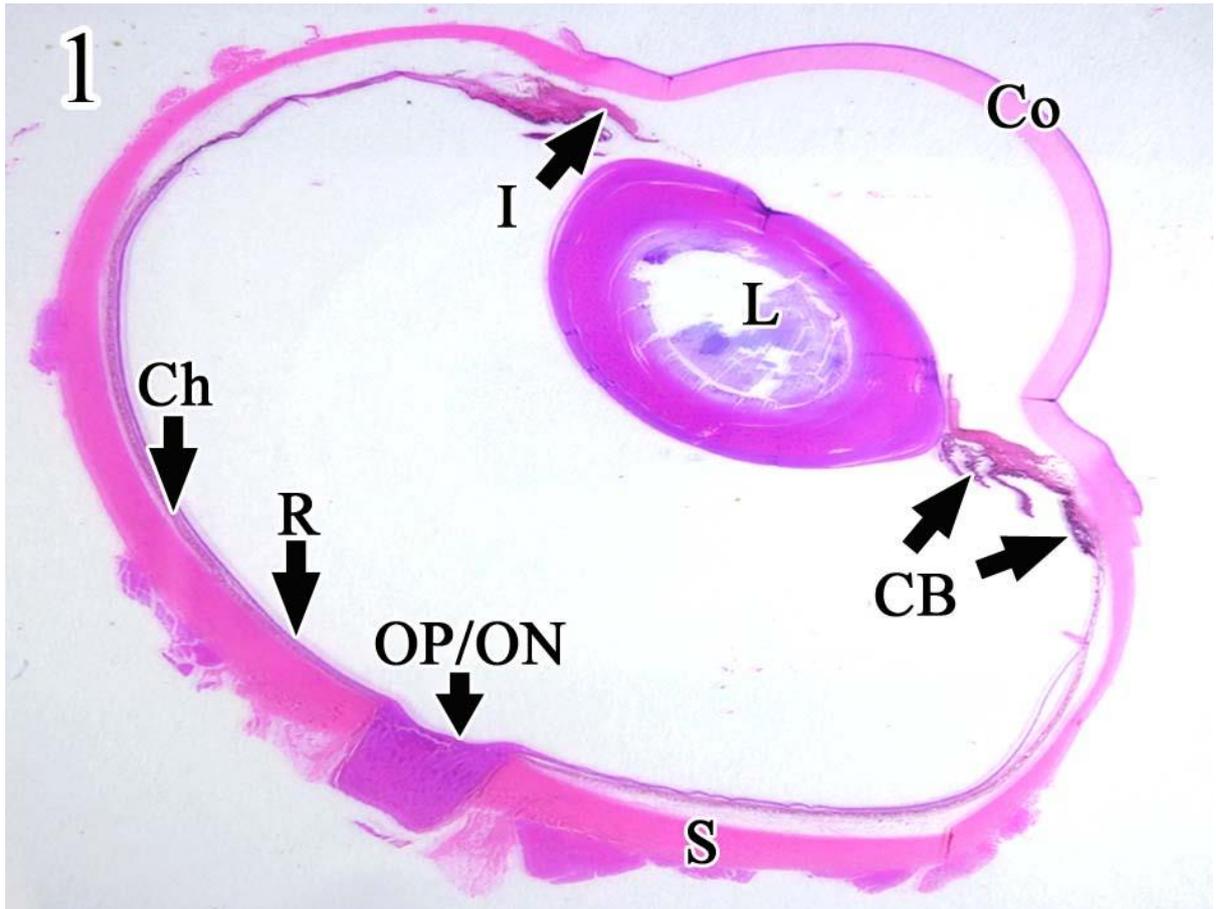


図 1. 成馬, 眼球. ウマ眼球は写真に示した各組織に大別され構成されている (虹彩顆粒は除く). Co: 角膜. I: 虹彩. CB: 毛様体. R: 網膜. Ch: 脈絡膜. S: 強膜. OP/ON: 視神経乳頭・視神経. L: 水晶体. HE. 拡大図.

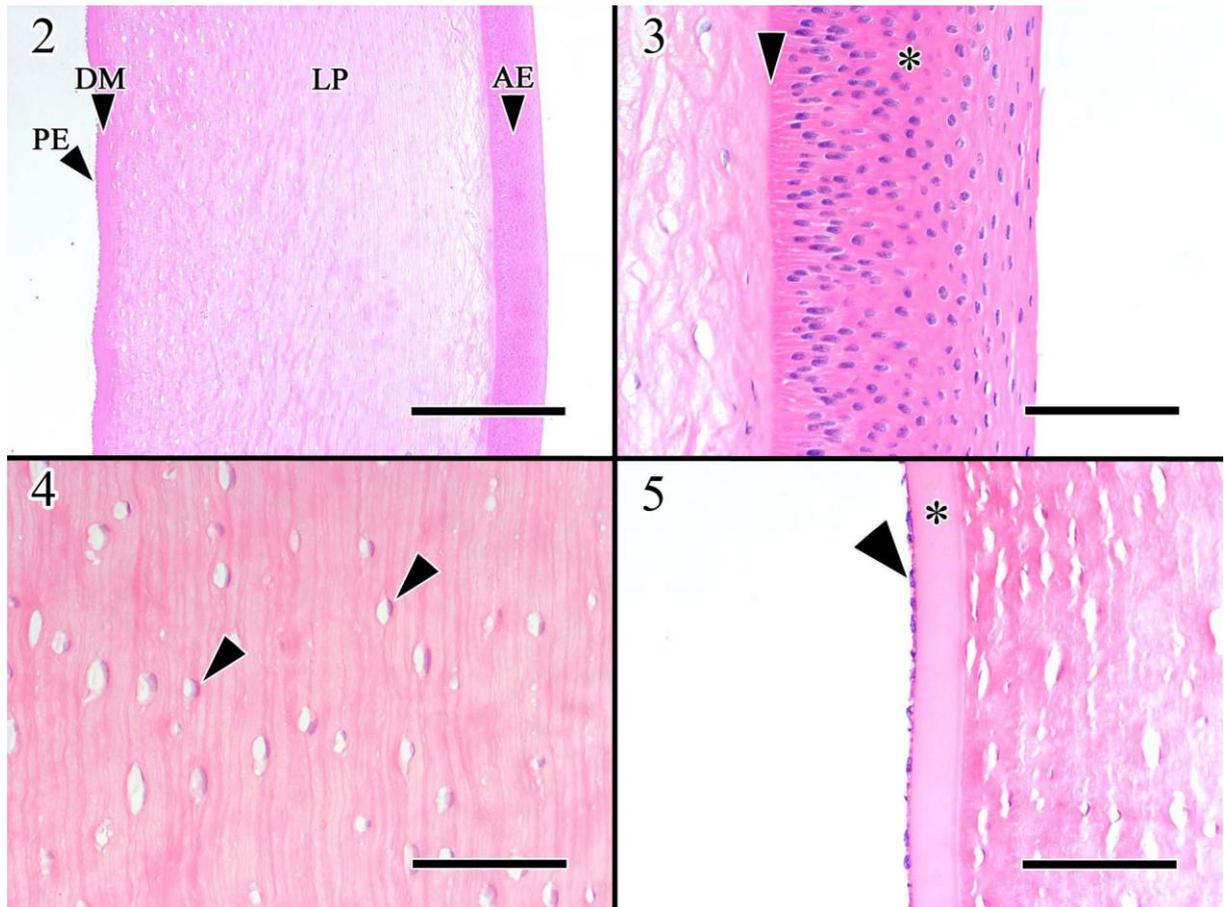


図 2. No. 3, 角膜. 明瞭な 4 層に分類される組織により角膜は構成されている. AE : 前上皮. LP : 固有層 (支質). DE : デスメ膜 (後境界板). PE : 後上皮 (角膜内皮). HE. Bar=500 μ m.

図 3. No. 3, 角膜. 角膜上皮 (*) は十数層により構成される. 前境界板は不明瞭である (矢頭). HE. Bar=100 μ m.

図 4. No. 3, 角膜. 固有層は線維性組織, 線維細胞 (矢頭) の規則的な配列により構成される. HE. Bar=100 μ m.

図 5. No. 3, 角膜. 角膜最内層は一層の角膜後上皮 (内皮) 細胞により内張りされ, 直下内層にはデスメ膜 (*) を認める. HE. Bar=100 μ m.

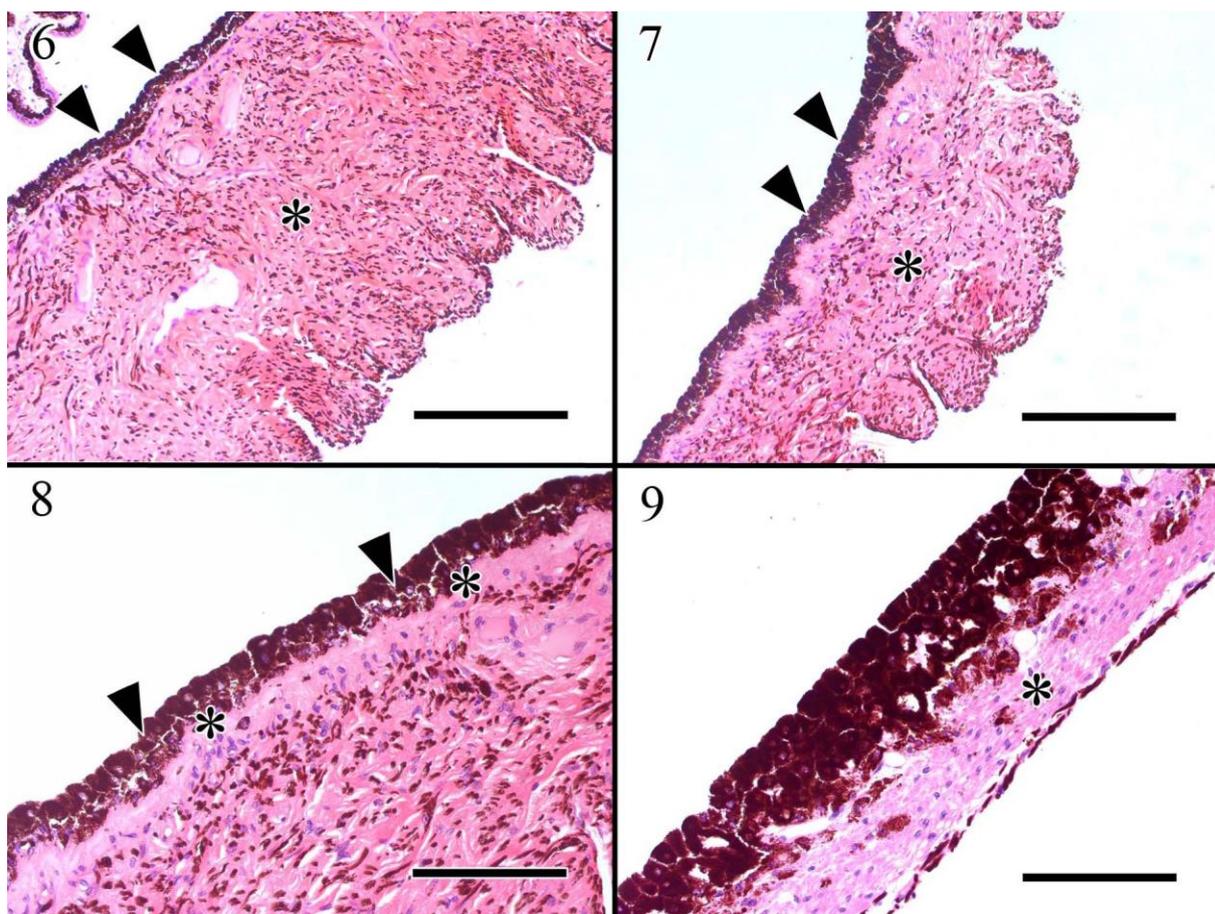


図 6, 図 7. No. 2, 虹彩. 後面が色素細胞層 (矢頭) に覆われた色素沈着を伴った線維性間質 (*) により構成されている. 図 6: 基部, 図 7: 中間部. HE. Bar=100 μ m.

図 8. No. 2, 虹彩. 色素上皮領域 (矢頭) において虹彩散大筋 (*) を認める. HE. Bar=100 μ m.

図 9. No. 2, 虹彩. 先端部領域において虹彩括約筋 (*) を認める. HE. Bar=100 μ m.



図 10. No. 2, 前部ぶどう膜. 虹彩 (I) と毛様体 (CB) は線維性間質によって連続性に構築されている. 毛様体 (毛様体冠) は眼球内腔へ枝状, 乳頭状に突出し形成されている. HE. Bar=500 μ m.

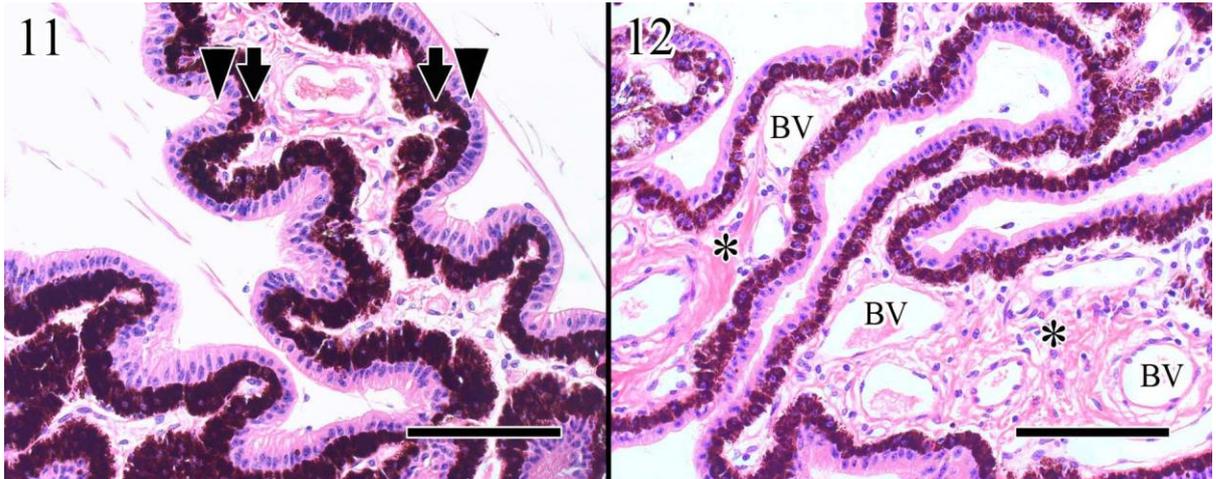


図 11. No. 2, 毛様体 (毛様体冠部). 毛様体上皮は内層の色素上皮 (矢印), 外層の無色素上皮 (矢頭) の二層により構成されている. HE. Bar=100 μ m.

図 12. No. 2, 毛様体 (毛様体冠部). 毛様体間質は血管 (BV) に豊富な線維性組織 (*) により構築されている. HE. Bar=100 μ m.

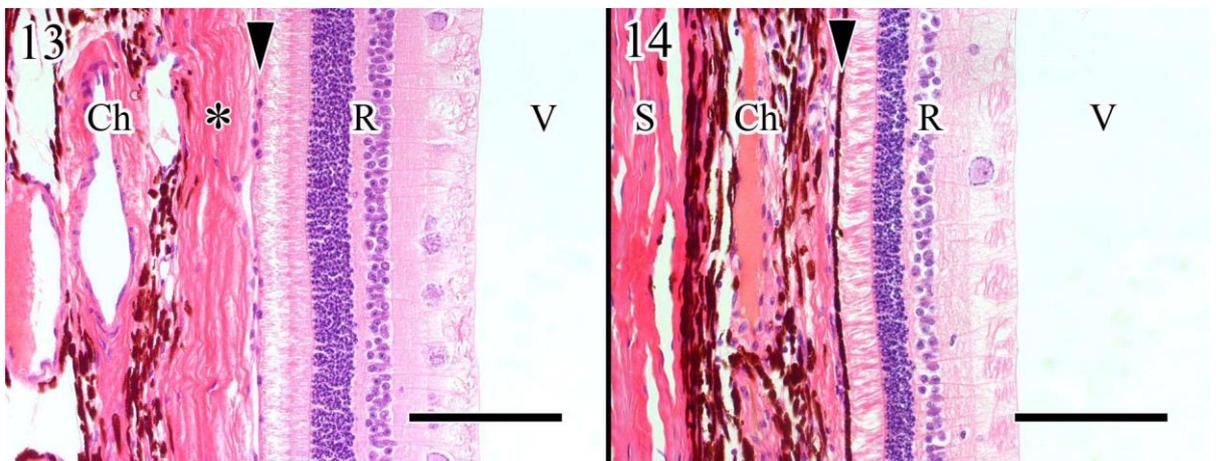


図 13, 14. No. 3, 後部ぶどう膜ならび網膜. 硝子体腔側 (V) より網膜 (R), 脈絡膜 (Ch), 強膜 (S) により構成されている. 網膜は明瞭な細胞層と無細胞層, 脈絡膜は血管と色素に富んだ線維性組織により構成される. タペタム領域 (図 13) では線維性タペタム (*) を認め, 網膜色素上皮層 (矢頭) に色素沈着は認めない. ノンタペタム領域 (図 14) では網膜色素上皮層 (矢頭) に色素沈着を認める. HE. Bar=100 μ m.

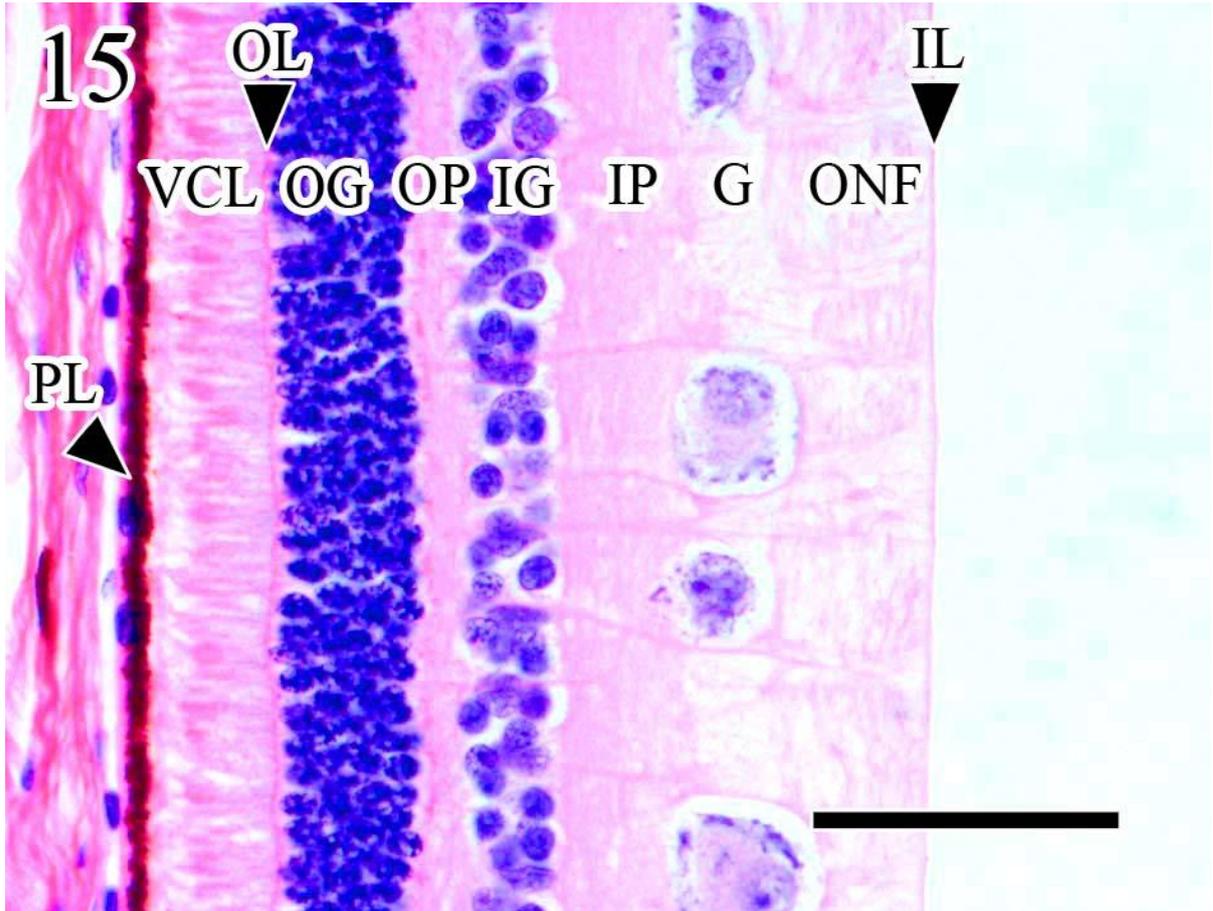


図 15. No. 3, 網膜. 明瞭に区分される 10 層により構成される. IL : 内境界板. ONF : 視神経線維層. G : 神経節細胞層. IP : 内網状層. IG : 内顆粒層. OP : 外網状層. OG : 外網状層. OL : 外境界板. VCL : 視細胞体層. PL : 色素上皮層. HE. Bar=50 μ m.

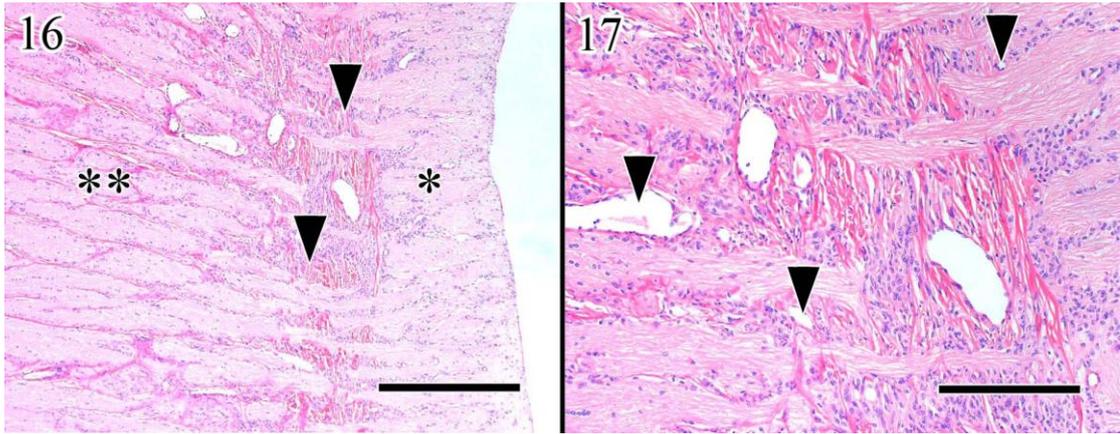


図 16. No. 3, 視神経乳頭・視神経. 網膜神経線維層から連続する軸索束として視神経乳頭部を認める (*). 線維性結合組織で構成される強膜篩板 (矢頭) により, 視神経線維束として細分化される (**). HE. Bar=500 μ m.

図 17. No. 3, 視神経乳頭・視神経. 多くの血管分枝 (矢頭) を認める. HE. Bar=100 μ m.

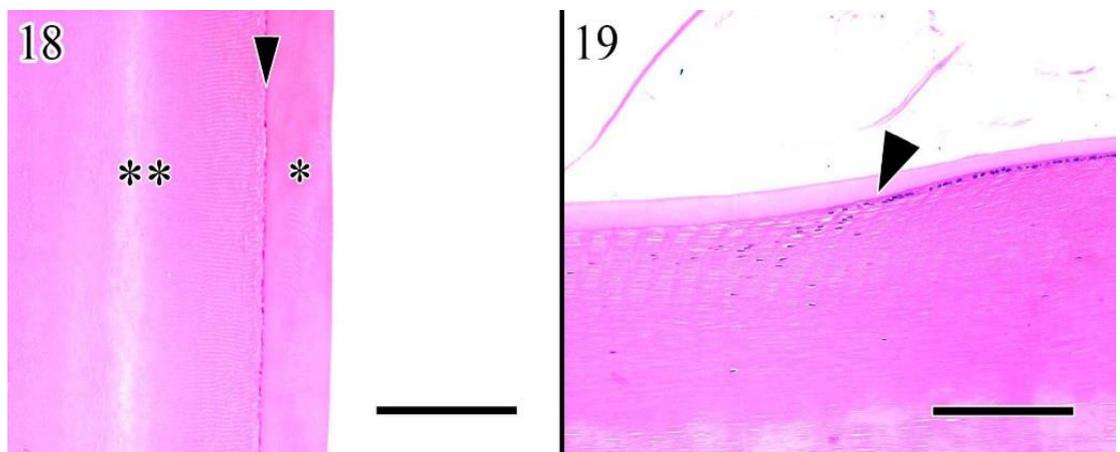


図 18. No. 3, 水晶体前極. 水晶体の最表層は水晶体包 (*) に覆われ, 水晶体皮質 (**) の間には一層の水晶体上皮細胞層 (矢頭) を認める. HE. Bar=100 μ m.

図 19. No. 3, 水晶体赤道部. 水晶体赤道部において水晶体上皮細胞の水晶体線維への移行 (矢頭) ならび移行細胞核を認め, 後極への水晶体上皮細胞の分布は認めない. HE. Bar=100 μ m.

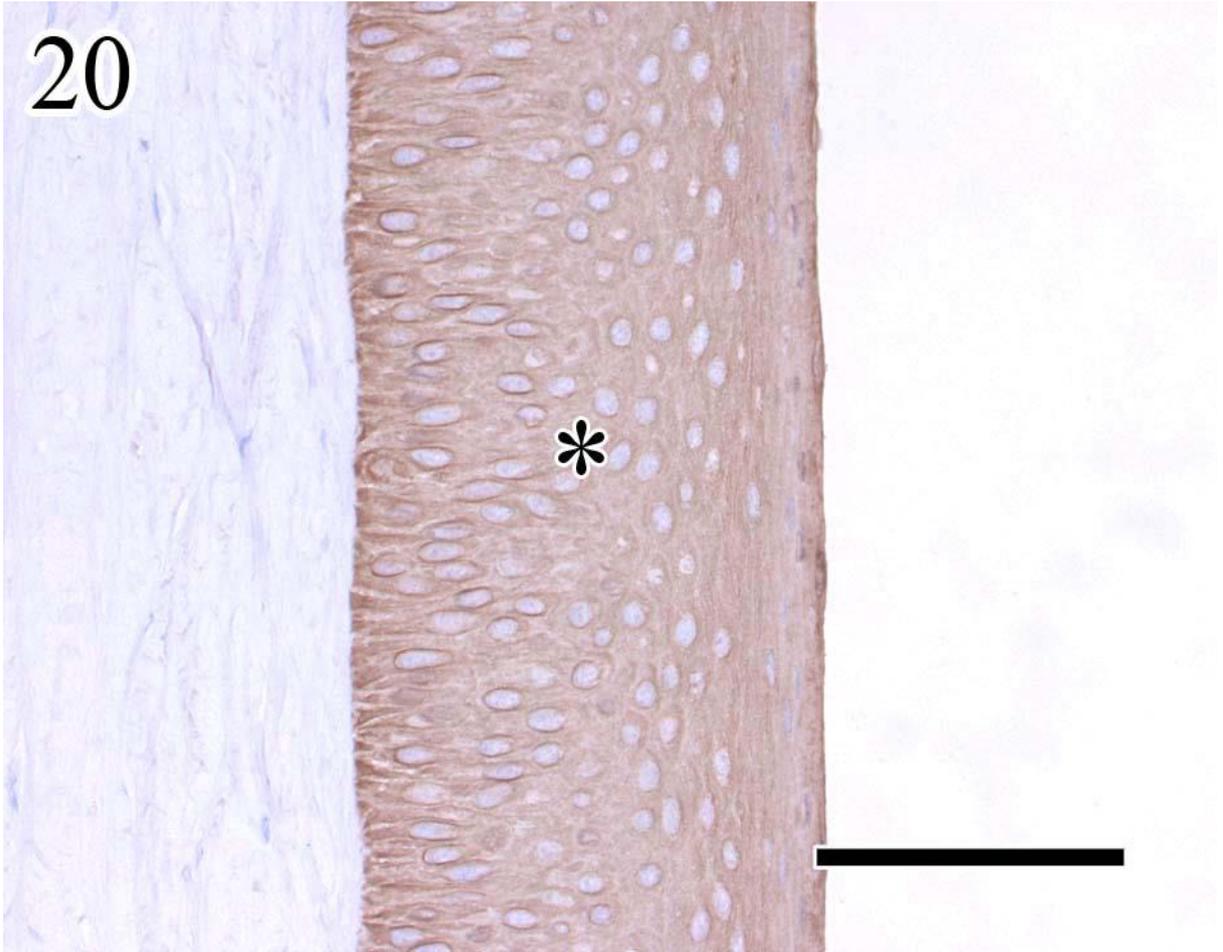


図 20. No. 3, 角膜. Pan-CK. 角膜上皮層 (*) の全層に発現を認める. IHC. Bar=100 μm .

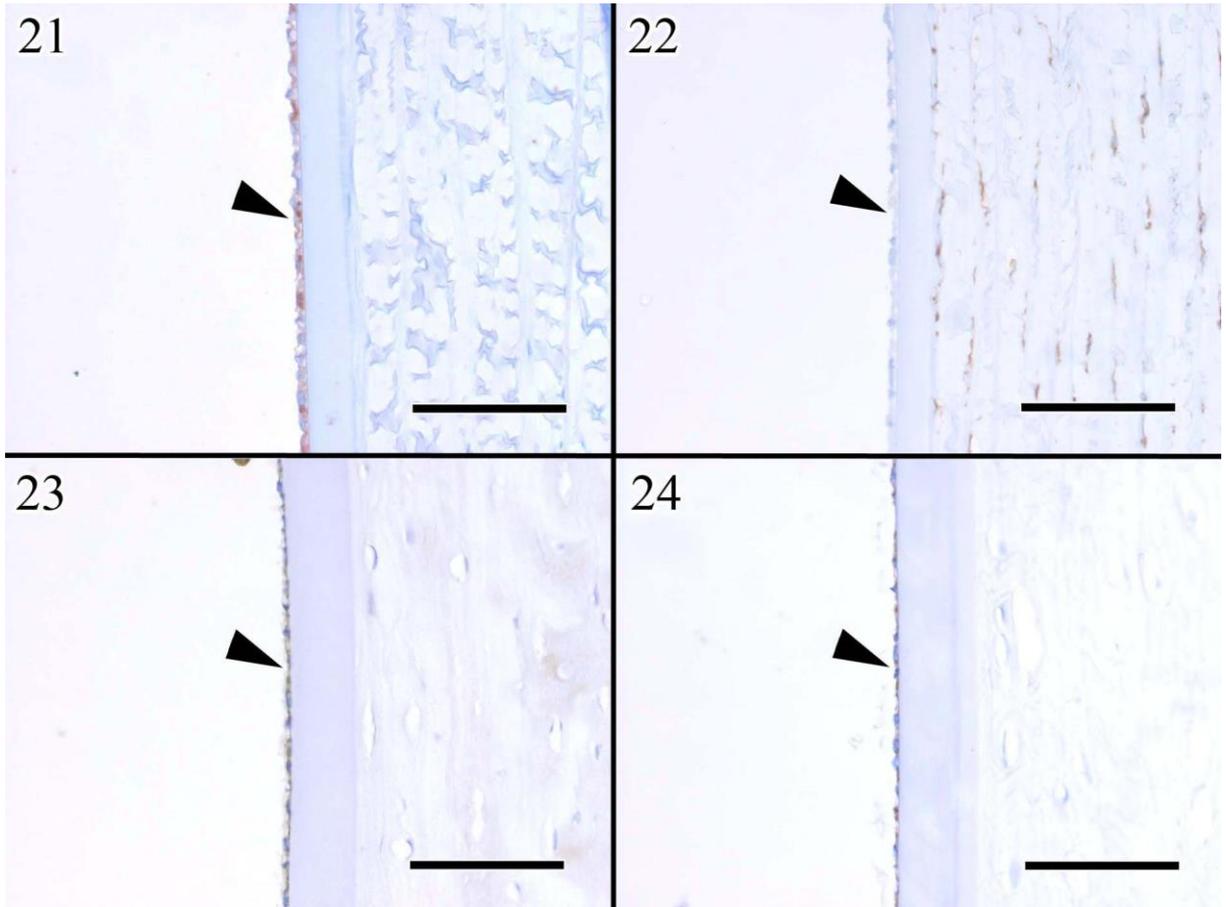


図 21. No. 3, 角膜. Pan-CK. 後上皮 (角膜内皮細胞) 層 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 22. No. 3, 角膜. Vime. 後上皮 (角膜内皮細胞) 層 (矢頭) に発現は認めない. IHC. Bar=100 μ m.

図 23. No. 3, 角膜. CK8. 後上皮 (角膜内皮細胞) 層 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 23. No. 3, 角膜. CK18. 後上皮 (角膜内皮細胞) 層 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

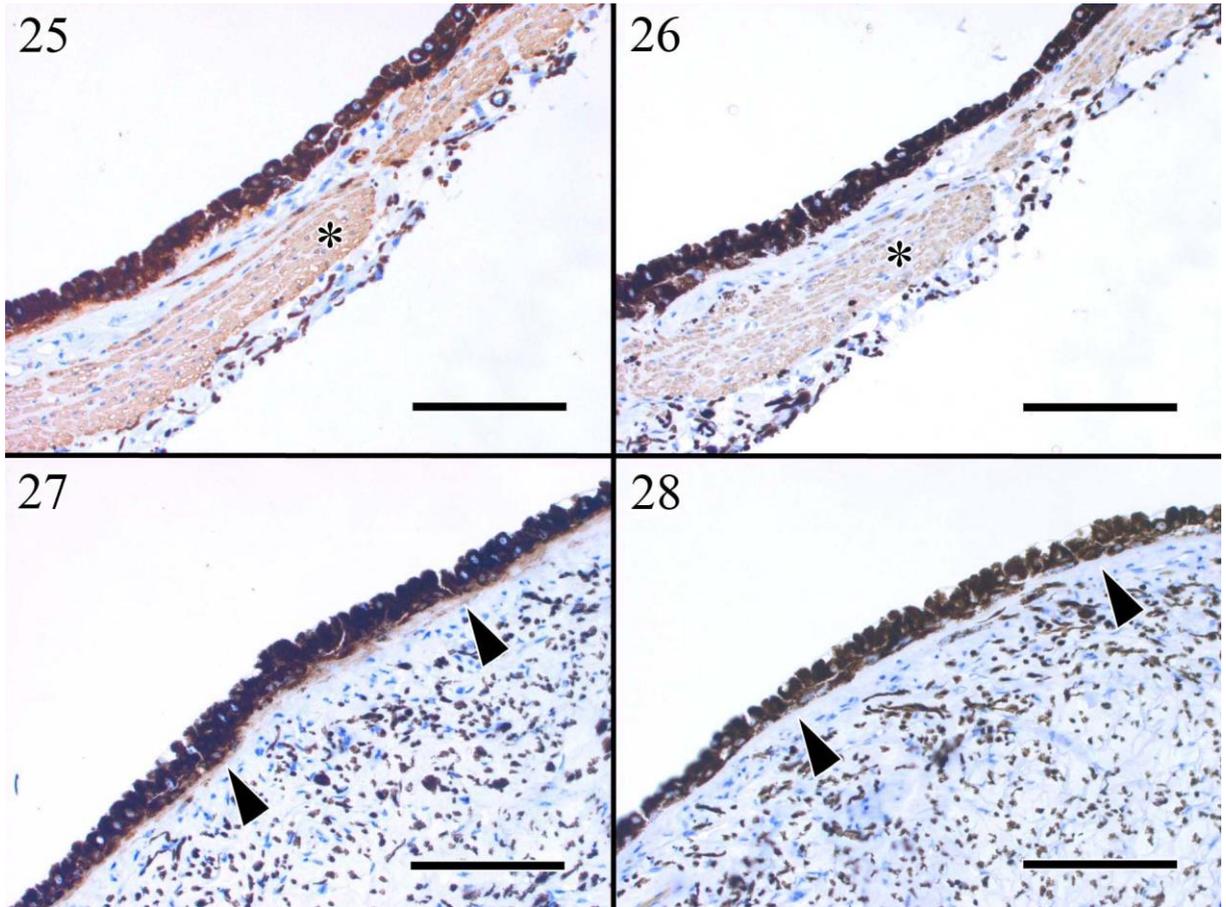


図 25. No. 2, 虹彩. α SMA. 括約筋 (*) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 26. No. 2, 虹彩. Des. 括約筋 (*) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 27. No. 2, 虹彩. α SMA. 散大筋 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 28. No. 2, 虹彩. Des. 散大筋は陰性 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

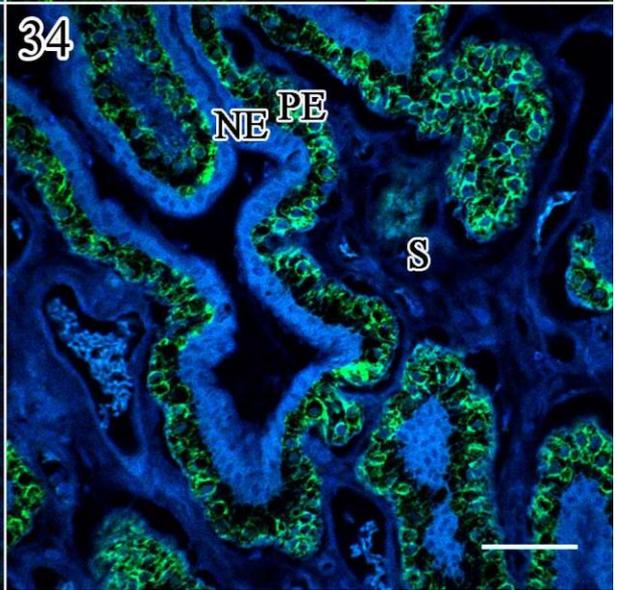
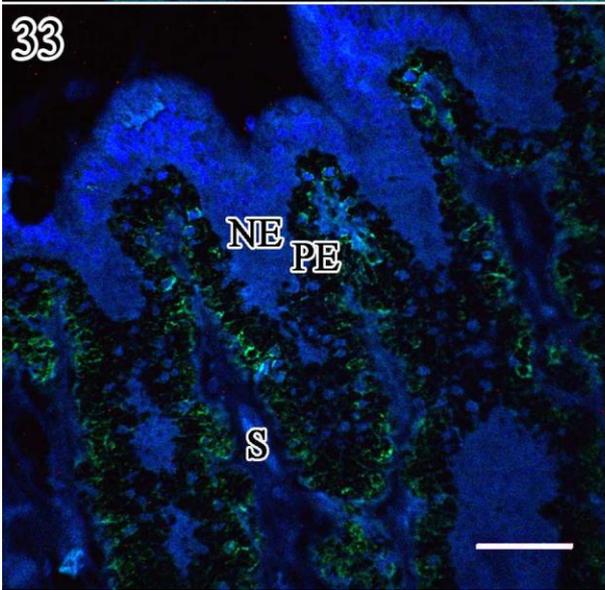
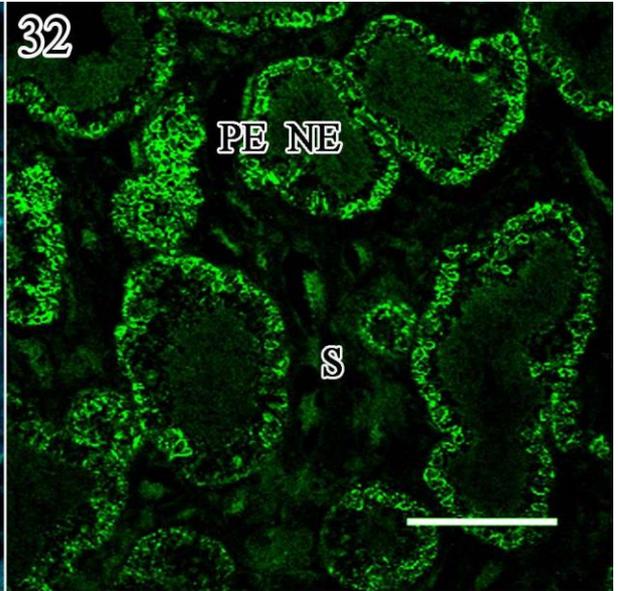
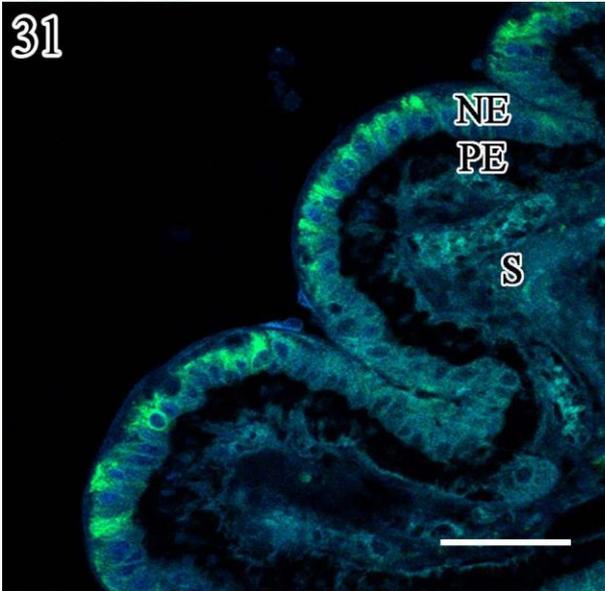
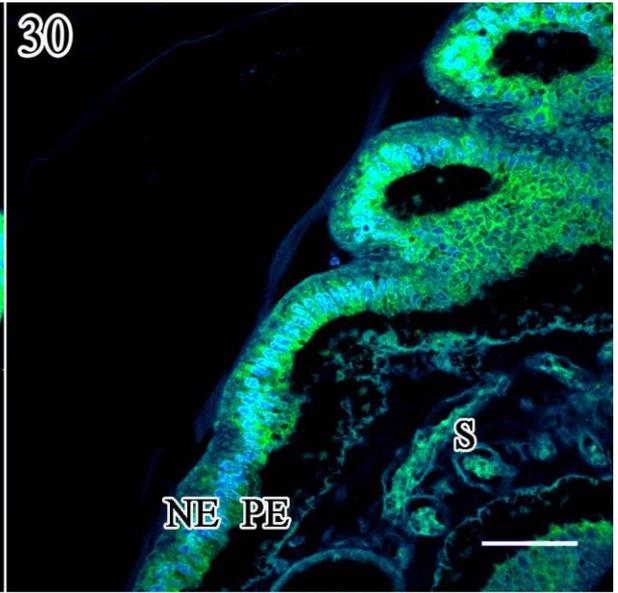
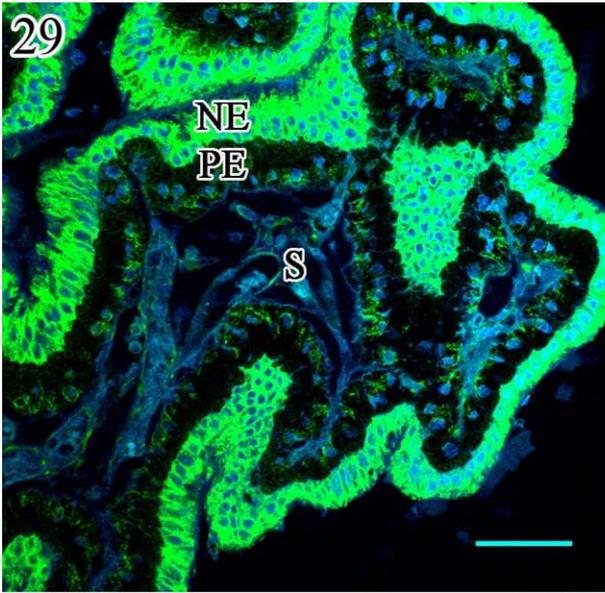


図 29. No. 3, 毛様体. Vime. 無色素上皮ならび色素上皮に発現を認める. NE : 無色素上皮. PE : 色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

図 30. No. 3, 毛様体. NSE. 無色素上皮に発現を認める. E : 無色素上皮. PE : 色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

図 31. No. 3, 毛様体. Des. 無色素上皮に発現を認める. E : 無色素上皮. PE : 色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

図 32. No. 3, 毛様体. Pan-CK. 色素上皮に発現を認める. E : 無色素上皮. PE : 色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

図 33. No. 3, 毛様体. CK 8. 色素上皮に発現を認める. E : 無色素上皮. PE : 色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

図 34. No. 3, 毛様体. CK 18. 色素上皮に発現を認める. E : 無色素上皮. PE : 色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

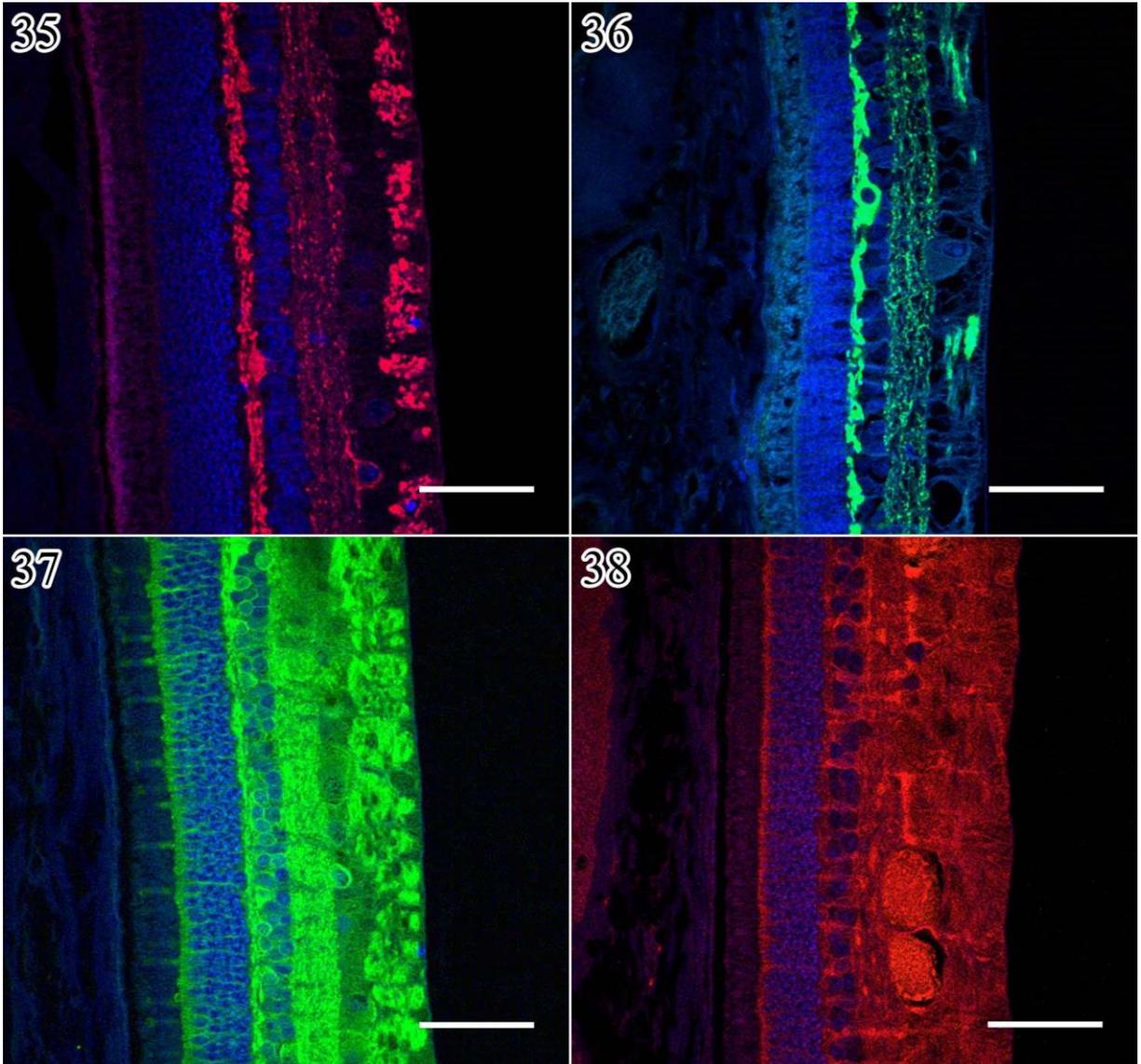


図 35. No. 5, 網膜. GFAP. 神経線維層, 内網状層, 外網状層に発現を認める. IHC.

Bar=50 μ m.

図 36. No. 5, 網膜. NF. 神経線維層, 内網状層, 外網状層に発現を認める. IHC.

Bar=50 μ m.

図 37. No. 5, 網膜. NSE. 神経線維層, 内網状層, 一部の内顆粒層の細胞, 外網状層, 一部の外顆粒層の細胞に発現を認める. IHC. Bar=50 μ m.

図 38. No. 5, 網膜. S100. 神経線維層, 神経節細胞層, 内網状層, 一部の内顆粒層の細胞, 外網状層, 一部の外顆粒層の細胞に発現を認める. IHC. Bar=50 μ m.

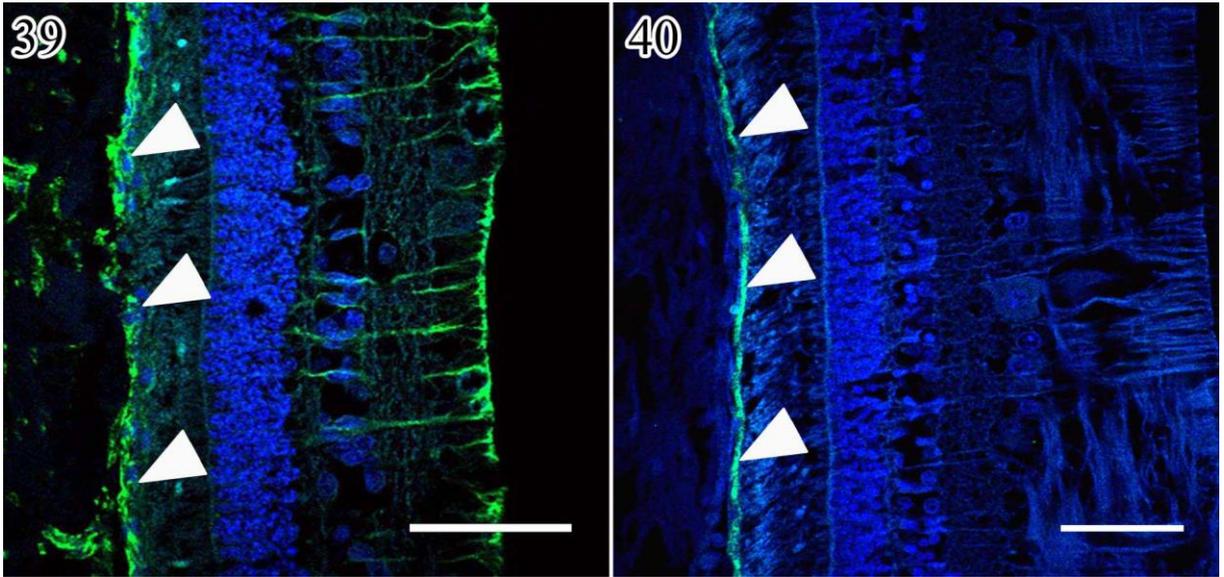


図 39. No. 4, 網膜. Vime. 網膜色素上皮 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=50 μ m.

図 40. No. 4, 網膜. Pan-CK. 網膜色素上皮 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=50 μ m.

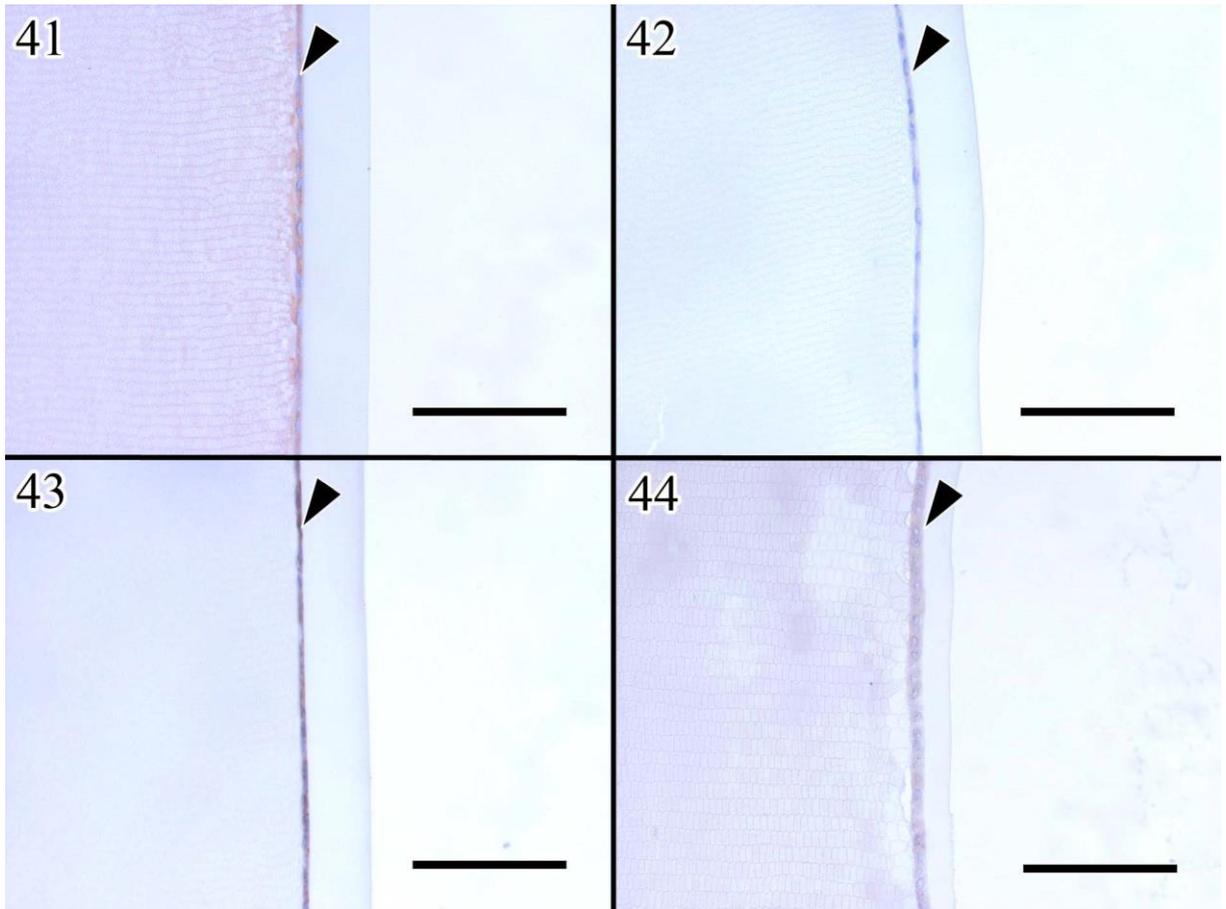


図 41. No. 1, 水晶体. Vime. 水晶体上皮 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 42. No. 1, 水晶体. GFAP. 水晶体上皮 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 43. No. 1, 水晶体. NSE. 水晶体上皮 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

図 44. No. 1, 水晶体. S100. 水晶体上皮 (矢頭) に発現を認める. IHC. Bar=100 μ m.

1-4. 考察

本研究は、ウマ眼球組織、すなわち角膜、虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜ならび水晶体、における組織学的特徴を明らかにした。そして、その結果は過去に報告されているそれぞれのウマ眼球組織が有する特徴と概ね一致した [5-10, 30-34]。また、本研究によりウマ眼球を構成する各組織の免疫組織化学的特徴が明らかとなり、ウマの眼球組織が有する免疫組織化学的特徴とヒトを含めた他の動物種が有する免疫組織化学的特徴との相違性が明らかとなった。

角膜は発生学的に表層外胚葉に由来し、角膜を構成する各層へとそれぞれ分化すると考えられている [79, 91, 97]。本研究における角膜の免疫組織化学的検索結果より、ウマの角膜を構成する各層は、角膜上皮層は上皮系、固有層は間葉系、デスメ膜は無細胞性に分類される層に分化し構成されていることが明らかになった。これらのウマの角膜上皮からデスメ膜における分化の特徴は、ヒト、イヌやプレーリードックにおいても同様に認められている [61, 71, 84]。また、角膜最内層を形成する角膜内皮細胞は、ウマでは Pan-CK、CK 8、CK 18 に陽性を示し上皮系への分化を示す細胞であると考えられた。健常眼球における角膜内皮細胞の免疫組織化学的表現型の検索はヒトで数多くなされており [37-39, 48, 62, 85, 86, 102, 108]、様々な抗体の発現の組み合わせで認められている。ヒトの角膜内皮細胞においては NF、神経性マーカー (neural cell adhesion molecule・NSE・S100)、間葉系マーカー (Vime)、上皮系マーカー (CK 8、CK 18) の発現が報告されている。そのため、ヒトの角膜内皮細胞における免疫組織学的特徴の確定は未だになされていない。イヌとプレーリードックの角膜内皮細胞は、Vime に陽性を示し間葉系の性質を有していることが報告されており [71, 84]、ウマとそれらの角膜内皮細胞では異なる分化を成していることが示唆された。また、ウマの角膜内皮細胞では CK の発現に加え S100 の発現が認められた。S100 のタンパク質

群は多様機能（カルシウム恒常性維持・タンパク質のリン酸化調節・細胞成長・細胞運動性・細胞周期調節など）を有していることが証明、提唱されている [29, 107]。角膜内皮細胞は眼球内腔（前房）と直接に面しており、角膜組織上層との介在細胞としての機能が S100 の発現から推察された。ウマの角膜内皮細胞における S100 の発現は、角膜内皮細胞が角膜最内層を覆う上皮細胞としての機能のみならず、S100 を介した多様な機能により角膜の恒常性維持に貢献していることを示唆しているのかもしれない。

本研究において、虹彩括約筋は α SMA と Des、散大筋は α SMA にそれぞれ陽性であった。これらから、筋系の特徴とその分化を示す組織であること考えられたが、両筋にマーカーの発現性の違いが認められた。ウマと同様の散大筋と括約筋における筋系マーカーの発現性の違いは、イヌの両虹彩筋においても認められているが [71]、ヒトにおいては両筋に α SMA と Des の発現が認められている [65, 125]。 α SMA と Des は筋系組織マーカーとして汎用され、平滑筋には通常両者の発現が認められる [18, 24]。このことからウマの虹彩括約筋は平滑筋であるといえる。一方、本研究の散大筋の結果からは同筋は、筋上皮細胞に近い免疫組織化学的発現性であると考えられた [13]。 α SMA は、機能学的に細胞収縮性に関与していると考えられており、ウマの虹彩両筋における機能学的な特徴を反映するものであると考えられた。また、平滑筋における Des の局在は暗斑に一致し認められており [73]、本研究の 2 つの虹彩筋における異なる免疫組織化学的検索結果は、両筋の構造的違いを反映しているのかもしれない。虹彩後上皮は、毛様体上皮細胞と共に神経上皮に分類されるが [31]、ウマの虹彩後上皮は Vime に陽性であったが神経系マーカーをはじめとする他のマーカーに陰性であり、神経系の性質を有している特徴を示唆する所見は得られなかった。過去のプレーリードックにおいてもウマと同様の免疫組織化学的特徴が虹彩後上皮に認められているが、イヌにおいては NSE に陽性であり神経系の性質を有していることが示唆されている [71]。

ウマ毛様体上皮細胞において、無色素上皮細胞は Vime に陽性で間葉系、色素上皮細胞は Vime、Pan-CK、CK 8、CK 18 に陽性で上皮系と間葉系の両者の性質をそれぞれ有しており、異なる免疫組織化学的表現型を有した細胞により二層構造が形成されていることが明らかとなった。ヒト、イヌやプレーリードックにおける毛様体上皮細胞の両層では Vime の発現のみが認められており [65, 71, 84, 125]、ウマの毛様体上皮はそれらの動物とは異なる免疫組織化学的特徴を有した細胞により構築されていると考えられた。また、ヒトやイヌの毛様体無色素上皮では Des、NSE、GFAP、Syna の発現、色素上皮では GFAP の発現も認められており、毛様体上皮におけるそれらの発現は、毛様体上皮が神経提由来の神経上皮である性質を反映しているものであると考えられている [65, 71, 125]。ウマの無色素上皮では Des、NSE の発現が Vime に加えて認められ、神経提由来の神経上皮の性質を有していることが推察される免疫表現型であると考えられた。しかしながら、ウマの色素上皮では CK 以外の発現は認められず無色素上皮細胞とは異なる分化を成した細胞であることが推察された。

ウマの網膜は、内・外境界板を除く網膜層は神経系・神経内分泌系マーカーに陽性を示し、“神経膜”であることが特徴付けられた。組織学的に証明された各網膜層における免疫組織化学的特徴が明らかとなり、各網膜層では各抗体に対して陽性細胞と陰性細胞が混在しそれらを形成していることが明らかとなった。通常、網膜層構造は、単一細胞により各層構造が形成されているのではなく、多くの細胞分布、すなわちミューラー細胞、神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞、双極細胞、錐状体細胞、桿状体細胞、により構成されていることが知られている [33, 124, 137]。ウマ網膜においてもそれらに相当する細胞分布により網膜層が形成されており、他の動物とその構造は類似していると考えられている [10]。網膜層の中でも、神経節細胞層、内顆粒層と外顆粒層は網膜構成細胞の細胞体により構成されており、神経節細胞層では神経節細胞、内顆粒層はアマクリン細胞、水平細胞と双極細胞、外顆粒層は錐状体細胞と桿状体細胞により構成されている [33, 124, 137]。ウマ網膜の各層構造における神経

系・神経内分泌系マーカーの各抗体における陽性細胞と陰性細胞の分布は、多数の異なる細胞により網膜構造が形成されており、その免疫表現型が単一ではないことを反映している結果なのかもしれない。また、ヒトの網膜神経節細胞では、機能的特性により少なくとも5種類のサブタイプに分類され、多様性を有していることが明らかとなっている [12]。ウマの網膜神経節細胞における免疫組織化学的な多様性は、機能的な多様性を反映している結果なのかもしれない。

ウマの視神経における免疫組織化学的特徴は、視神経乳頭部と連続性に同様でありその特徴は一般的に知られている中枢神経の特徴に類似するものであると考えられた。また視神経を覆う髄膜において、ウシやニワトリでは Vime と CK の両者の発現が認められており、上皮と間葉の特徴を有していると考えられているが [1]、ウマでは Vime にのみ陽性であり間葉系の免疫組織化学的特徴を有する線維性膜組織であることが特徴付けられた。

網膜色素上皮細胞においても、異種動物間で異なる免疫組織化学的特徴が報告されている。本研究において、ウマの健常眼球における網膜色素上皮細胞は Vime、Pan-CK、CK 8、CK 18 に陽性であり、上皮と間葉の両者の性質を有した健常眼球構成組織であることが特徴付けられた。ウマと同様に網膜色素上皮細胞が間葉と上皮の性質を示す免疫組織化学的特徴は、サル、イヌ、ウシ、ラット、モルモット、マウス、ウサギの網膜色素上皮細胞においても認められている [41, 46, 71, 98]。しかしながら、ヒトの健常眼球における網膜色素上皮細胞では CK のみの発現が認められており [65, 66]、ニワトリの網膜色素上皮細胞における CK の発現は認められていない [98]。ウマの網膜色素上皮細胞は、その免疫組織化学的表現型より多くの哺乳動物で報告されている網膜色素上皮細胞の特徴と類似性を有した分化を示すことが明らかになった。

ウマの水晶体上皮細胞は、Vime、GFAP、NSE、S100 に陽性であることが本研究により特徴付けられた。水晶体上皮細胞は発生学的に表層外胚葉由来であると考えられているが [7, 80, 93, 99]、CK ではなく Vime 陽性であることは一つの特徴であると考え

えられた。また、ウマの水晶体上皮細胞が GFAP、NSE、S100 に陽性であることから、免疫組織化学的に神経系の性質を有する間葉系細胞への分化を有していると考えられた。ヒト、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリにおける水晶体上皮細胞の免疫組織化学的特徴もウマ同様であることが報告されており [16, 42, 71, 87, 88, 105, 117, 140]、CK の発現は水晶体の発生早期に消失することが知られている [63, 66]。ウマの水晶体上皮細胞における Vime の発現は、胎仔期に CK から Vime への発現性の変化が生じている結果なのかもしれない。これらの発現性に加え、他の動物の水晶体上皮細胞においては、 α SMA の発現が報告されている [42, 105]。 α SMA の発現は、上皮細胞における上皮から間葉への移行を指し示す特徴の一つであると考えられており、水晶体上皮細胞における α SMA の発現は、発生学的に上皮に由来する水晶体上皮細胞の間葉への移行過程を示唆し反映するものであると推察されている [42, 71]。本研究において、ウマ水晶体上皮細胞における α SMA の発現は認められなかった。ウマの水晶体上皮細胞における Vime 陽性、CK や α SMA に陰性である免疫組織化学的検索結果は、ウマの水晶体上皮細胞がより間葉系に分化した性質を有していることを示し、異なる動物種間における水晶体上皮細胞の分化程度に伴う発現性の違いを反映している可能性が考えられた。

眼球構成組織の免疫組織化学的特徴を知ることは、眼球疾患の病態理解の向上に貢献している。眼球疾患に伴い眼球組織の免疫組織化学的特徴が変化することが報告されており [19, 21, 41, 57, 66, 126]、眼球疾患の病態を理解する上で健常眼球組織の免疫組織化学的特徴は重要な基礎知識である。また、健常眼球組織における免疫組織化学的特徴を理解することは、眼球における腫瘍性疾患の由来の検索に際し必要不可欠であり、様々な動物種に生じた眼球腫瘍の理解に際し貢献している [30–34]。ウマにおいても、眼球腫瘍が報告されており、免疫組織化学的検索は腫瘍細胞の由来を特定するための手法として用いられている [2, 60, 76, 92]。本研究のウマ眼球組織における免疫組織化学的特徴を明らかにした検索結果は、ウマの眼球疾患における病態理

解の基礎データとして、さらには眼球腫瘍性疾患の由来の特定に際しても有用である
と考える。また眼球疾患のみならず、発生過程における眼球組織の免疫組織化学的表
現型の変化が認められており [62, 63, 66]、眼球発生を理解する上でも健常眼球組織
の免疫組織化学的特徴を知ることは重要である。ウマにおける眼球発生の過程は、ヒ
トを含めた他の動物からの引用により、それらと類似あるいは同様であると理解され
ているが [5-10]、ウマ固有の眼球発生の詳細は未だに明らかになっていない。その
ため、ウマの眼球発生を理解するためにも、本研究で明らかになった健常ウマ眼球組
織の免疫組織化学的特徴を把握することは必要不可欠であると考ええる。

本研究では、成馬の眼球組織における組織学的特徴を把握し、さらに細胞骨格・上
皮系・筋系・神経系/神経内分泌系マーカーを用いて、それらの免疫組織化学的特徴を
明らかにした。本研究により明らかとなったウマ健常眼球組織の基礎知識を理解する
ことは、多岐に渡るウマ眼球疾患との比較研究やそれらの病態の理解向上に際し一助
となると考える。さらに本研究の結果は、今後のウマ眼球の発生における細胞分化過
程の理解に際し一助になると考える。

1-5. 小括

ウマ眼球の構成組織である、角膜・虹彩・毛様体・脈絡膜・網膜・脈絡膜ならび水晶体における組織学的ならび免疫組織化学的検索を行った。組織学的検索では、網膜血管が視神経乳頭部にのみに分布していることを含め、過去に報告されているウマの眼球組織における特徴とほぼ一致した。免疫組織化学的検索では、角膜内皮細胞と毛様体色素上皮細胞における CK の発現が特徴的に明らかになった。また、その他にもウマの各眼球組織とヒトを含めた他の動物の各眼球組織での各抗体の発現性についての相違性が明らかとなり、それらからは他の動物との細胞分化の程度の違いが推察された。

第 II 章

ウマ眼球ぶどう膜における CD163 陽性細胞
ならび MHC II 陽性細胞の分布

2-1. 序文

ぶどう膜に在住する抗原提示細胞は、局所的な免疫恒常性維持や全身性免疫寛容機構に貢献し、眼球免疫特権形成に重要な役割を担っていると考えられている。ぶどう膜は豊富な在住抗原提示細胞の分布組織であることが、健常ヒト[82]、マウス[81, 82]、ラット [82, 83] において、免疫組織化学的手法を用いた検索により明らかとなっている。そして、ぶどう膜在住の抗原提示細胞はマクロファージと樹状細胞への分類がなされている。これらの分類された健常ぶどう膜に分布する組織在住抗原提示細胞は、健常組織における免疫恒常性維持に貢献しているのみならず、ぶどう膜の炎症性・免疫介在性疾患の起爆や波及を担う細胞として機能していると考えられている [80]。

MHC II の発現は、抗原提示を行う能力を有する細胞に認められる特徴であり、通常抗原提示細胞に分類されるマクロファージ、樹状細胞と B 細胞に認められる [115]。眼球組織に分布する MHC II 陽性細胞は免疫特権の形成に携わり、眼球免疫に重要な役割を担っていると考えられている [95, 120]。さらに、眼球組織に分布する MHC II 陽性細胞は、炎症や免疫応答に中心的役割を担っていると考えられている。

ウマにおいても多様な原因によるぶどう膜炎の報告がなされている [8, 26, 53]。しかしながら、ぶどう膜組織に分布する抗原提示細胞の詳細は十分に明らかとなっていない。ウマぶどう膜炎の発病機序や病態をさらに理解する上で、ぶどう膜における抗原提示細胞の分布を理解することは必要不可欠であると考ええる。

本研究は、ウマぶどう膜の免疫恒常性機構とウマぶどう膜炎の発病機序や病態の理解向上を目的とし、それらの基礎知見となるぶどう膜組織在住細胞を CD163 と MHC II を用いて分類、さらにはそれらの分布と局在を明らかにした。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 供試動物

臨床的に眼疾患を伴わないサラブレッド種 10 頭（雄 1、雌 9）のウマより採材された 11 眼球（1 歳～24 歳齢）を用いた。使用したウマの詳細は表 4 に示した。眼球固定は、10% 中性緩衝ホルマリン水溶液による約 48 時間の浸漬により行った。固定に際し、各々の眼球背側中央部に前後約 1 cm の切込みを入れ、注射針付きシリンジを用いて約 0.5-1.0 ml の固定液の注入を行った。固定眼球は、前ならび後ぶどう膜組織を含有する厚さ 0.5-1.0 cm の組織片に切り出し、アルコール脱水とキシレン浸漬後、パラフィンに包埋した。5 μm の厚さのパラフィン組織切片を作製し、免疫組織化学的検索を行った。

表 4. 試供動物の特徴

No.	眼球	性別	年齢	診断
1	左	雌	1 歳	骨盤骨折
2	右	雌	1 歳	離断性骨軟骨症
3	左	雄	1 歳	ウォブラー症候群
4	右	雌	2 歳	左第三中手骨骨折
5	左	雌	8 歳	転筋破裂
6	右	雌	8 歳	結腸捻転
7	右	雌	8 歳	脊髄損傷
8	左	雌	9 歳	子宮動脈破裂
9	右	雌	15 歳	結腸捻転
10	右	雌	17 歳	結腸捻転
11	左	雌	24 歳	乳腺癌

2-2-2. 免疫組織化学的検索

本研究では、間接蛍光抗体法による免疫組織化学的検索を行った。一次抗体には、単球・マクロファージ系マーカーとしてマウスモノクローナル抗ヒト CD163 (AM-3K; Trans Genic Inc., Kobe, Japan)、抗原提示細胞マーカーとして MHC II (HLA-DR; TAL.1B; Dako, Glostrup, Denmark)、B リンパ球マーカーとしてウサギポリクローナル抗ヒト CD20 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.) を用いた。一次抗体に対する抗原賦活化の目的として、CD163 には Proteinase K (Dako) によるタンパク分解酵素処理、MHC II にはオートクレーブによる加熱処理を行った。CD20 には前処置は行わなかった。作製パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィンし、エチルアルコールを通し、水洗した。前処置後、十分な流水洗を行い、非特異的反応除去の目的で、10% ヤギ正常血清 (Sigma-Aldrich) を切片上へのせ、37°C 30 分間のブロッキング処置を行った。一次抗体は PBS を用いて、CD163 と MHC II は 50 倍、CD20 は 200 倍にそれぞれ希釈し、希釈一次抗体を切片上へのせ保湿箱内で 4°C overnight 反応させた。反応終了後、PBS 洗浄と 0.05% トライトンへの浸漬を行い、二次抗体として PBS により 200 倍希釈した Alexa Fluor 488 蛍光標識ヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes)、または Alexa Fluor 546 蛍光標識ヤギ抗ウサギ IgG (Molecular Probes) を用い、切片上へのせ遮光下で室温 30 分間反応させた。二次抗体反応終了後、十分な PBS 洗浄を行い、水溶性封入剤で封入し蛍光顕微鏡 (C2; Nikon Instech Co., Ltd.) を使用し観察を行った。各一次抗体の陽性対象としてウマリンパ節組織を用いた。陰性対象には、一次抗体の混和の無いそれぞれの溶液を用いて、上述した工程を同様に行った。

2-2-3. 統計学的検索

ぶどう膜各部位 (毛様体、虹彩、脈絡膜) における CD163+細胞と MHC II+細胞の各々の出現頻度を明らかにするために、間接蛍光抗体法の結果を用いて統計学的検

索を行った。両抗体陽性細胞数の計測は、無作為に選択された 400 倍視野で行い、画像上の面積測定において 1mm^2 を超える視野数の計測を行った。ぶどう膜各部位で計測されたそれぞれの陽性細胞数は、 1mm^2 あたりの平均陽性細胞数として算出した。算出された平均陽性細胞数を用いて、ぶどう膜各部位間の比較検定を行った。比較検定はエクセル統計 2012 (Excel and Ekuseru-Toukei 2012; Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行い、事前比較としてクラスカル・ウォリス検定、事後検定としてシェッフエの検定を行った。統計学的検索結果において、 $p<0.01$ で有意差ありとした。

2-3. 結果

2-3-1. 免疫組織化学的検索

2-3-1-1. CD163+細胞

毛様体:CD163+細胞の大多数は色素上皮細胞直下の基底側に沿い認められた(図45)。それらは、主に長短の紡錘形あるいは伸展した形態であり、円形や類円形の陽性細胞も認められた(図46)。同様の形態を示すCD163+細胞の毛様体間質における分布も散在性に認められた。

虹彩:前面表層や色素上皮細胞直下、間質全域に散在性に分布するCD163+細胞を認めた(図47)。前面表層に認められたCD163+細胞は類円形から半円形で虹彩前面と前房の境界部に位置し認められた。間質に散在性に分布するCD163+細胞は、主に円形から類円形であり、時に紡錘形の形態で認められた。また、色素上皮間直下において伸展するCD163+細胞を認めた。虹彩根部では瞳孔縁領域から虹彩中間部と比較し、より多くのCD163+細胞の分布が認められた。

脈絡膜:脈絡膜間質線維間に散在性に分布するCD163+細胞を認め、それらは大多数は円形から類円形の形態であり、時に長短の紡錘形の形態であった(図48)。

2-3-1-2. MHC II+細胞

毛様体:上皮細胞に隣接し多くのMHC II+細胞を認めた。それらは毛様体冠から毛

様体輪におよぶ色素上皮細胞間や無色素上皮細胞間に介在し散在性に認められ（図 49-51）、短紡錘形で樹状状の形態であった。さらに、多くの MHC II+細胞は色素上皮・間質境界部に位置し色素上皮下部に沿って位置して認められ、多形性に富み、伸展した紡錘形、短紡錘形、類円形で、時に樹状状であった。毛様体冠間質の MHC II 陽性細胞は僅かで散在性に認める程度であった。

虹彩：前面表層や色素上皮細胞直下、色素上皮細胞間に介在し分布する MHC II+細胞を認めた。また、間質全域に散在性に分布する MHC II+細胞を認めた。前面表層に認められた MHC II+細胞は類円形から半円形で前面と前房の境界部に位置し認められた。間質の MHC II+細胞は、主に円形から類円形であり、時に紡錘形の形態で認められた。色素上皮間に介在する MHC II+細胞は長短の突起を有し樹状状の形態であった。

脈絡膜：間質線維間に散在性に分布する円形から類円形で時に紡錘形の MHC II+細胞を認めた（図 52）。また、樹状状の形態を呈する MHC II+細胞も認められた。

2-3-2. 統計学的検索

各検体におけるぶどう膜各部位での 1 mm² 辺りの平均 CD163+ならび MHC II+細胞数の計測結果は表 5-1 と表 5-2 にそれぞれに示した。ぶどう膜各部位間における 1 mm² 辺りの CD163+細胞数の平均値の統計学的検索の結果、毛様体は虹彩と比較し有意 ($p<0.0001$) であり、脈絡膜との比較においても有意 ($p=0.0021$) であった（有意差** $p<0.01$ ）。虹彩と脈絡膜との比較において有意差は認められなかった（図 53）。また、ぶどう膜各部位間における 1 mm² 辺りの MHC II+細胞数の平均値の統計学的検索の結果、毛様体は虹彩と比較し有意 ($P<0.0001$) であり、脈絡膜との比較において

も有意 ($P=0.0029$) であった (有意差** $p<0.01$)。虹彩と脈絡膜との比較において有意差は認められなかった (図 54)。

表 5-1. ぶどう膜各組織における 1 mm^2 あたりの CD163 陽性細胞数とその平均値

No.	毛様体	虹彩	脈絡膜
1	375	84	101
2	375	110	110
3	419	72	80
4	429	66	117
5	468	94	73
6	381	72	112
7	454	87	102
8	356	85	100
9	494	107	158
10	433	65	83
11	362	95	34
平均値 ± 標準偏差	413 ± 47	85 ± 15	97 ± 31

表 5-2. ぶどう膜各組織における 1 mm^2 あたりの MHCII 陽性細胞数とその平均値

No.	毛様体	虹彩	脈絡膜
1	656	114	73
2	566	77	97
3	556	51	74
4	450	63	127
5	445	63	127
6	441	112	95
7	602	65	104
8	413	85	98
9	710	100	144
10	550	86	107
11	436	44	53
平均値 ± 標準偏差	550 ± 125	78 ± 23	100 ± 27

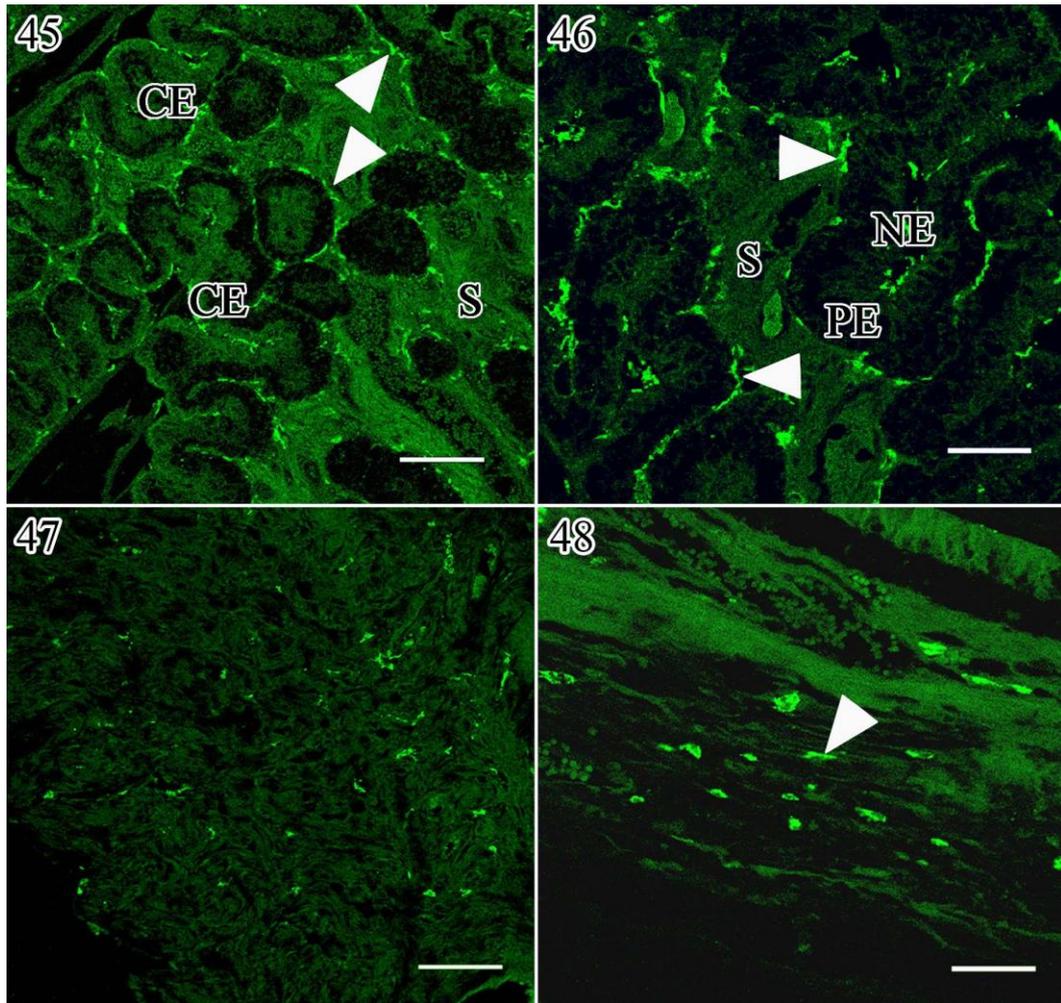


図 45. No. 3, 毛様体. CD163. 毛様体上皮に隣接して CD163 陽性細胞 (矢頭) を認める. CE : 毛様体上皮. S : 間質. IHC. Bar=100 μ m.

図 46. No. 3, 毛様体. CD163. 毛様体色素上皮の基底側直下に近接して分布する紡錘状で伸長した CD163 陽性細胞 (矢頭) を認める. NE : 毛様体無色素上皮. PE : 毛様体色素上皮. S : 間質. IHC. Bar=50 μ m.

図 47. No. 1, 虹彩. CD163. 虹彩間質に散在性に分布する CD163 陽性細胞を認める. IHC. Bar=50 μ m.

図 48. No. 1, 脈絡膜. CD163. 卵円形の CD163 陽性細胞, 時に伸長した CD163 陽性細胞 (矢頭) を認める. IHC. Bar=50 μ m.

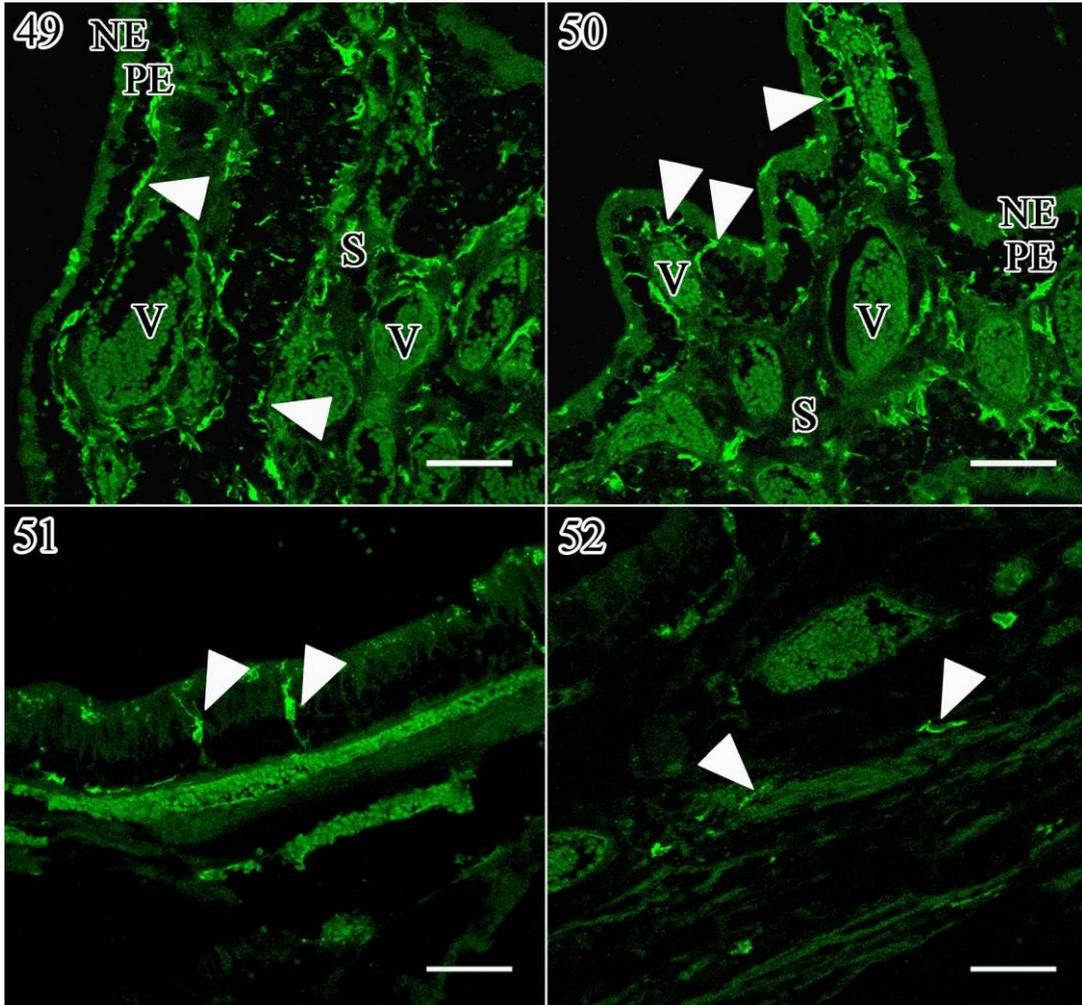


図 49. No. 9, 毛様体. MHC II. 毛様体色素上皮の基底側直下に近接して分布する MHC II 陽性細胞 (矢頭) を認める. 毛様体間質においても散在性に MHC II 陽性細胞を認める. NE: 毛様体無色素上皮. PE: 毛様体色素上皮. S: 間質. V: 血管. IHC. Bar=50 μ m.

図 50. No. 11, 毛様体. MHC II. 毛様体上皮間に分布する MHC II 陽性細胞や, 時に毛様体上皮間に伸長し介入する MHC II 陽性突起を認める (矢頭). NE: 毛様体無色素上皮. PE: 毛様体色素上皮. S: 間質. V: 血管. IHC. Bar=50 μ m.

図 51. No. 11, 毛様体. MHC II. 毛様体上皮間に介在する樹状状 MCH II 陽性細胞を認め, 細胞質から MHC II 陽性突起の伸長を認める (矢頭). IHC. Bar=50 μ m.

図 52. No. 1, 脈絡膜. MHC II. 卵円形の MHC II 陽性細胞, 時に伸長した MHC II 陽性細胞を認める. IHC. Bar=50 μ m.

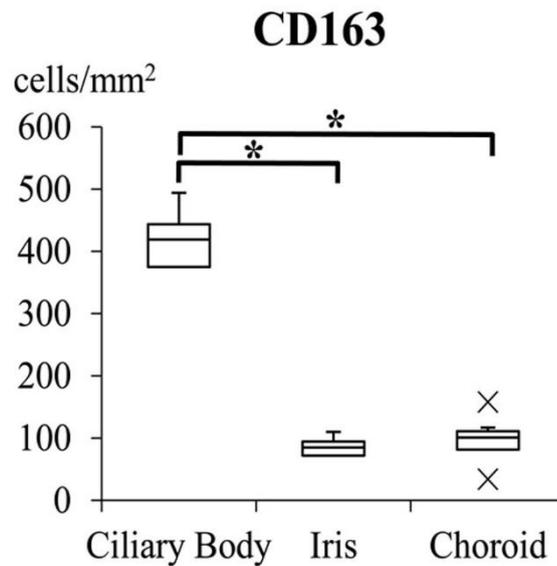


図 53. 毛様体，虹彩および脈絡膜に分布する CD163 陽性細胞の各組織間における定量的分析．毛様体と虹彩 ($p<0.001$) ならび毛様体と脈絡膜 ($p=0.0021$) 間にそれぞれ有意差を認めた．*標準誤差．*統計学的有意差 ($p<0.01$)．

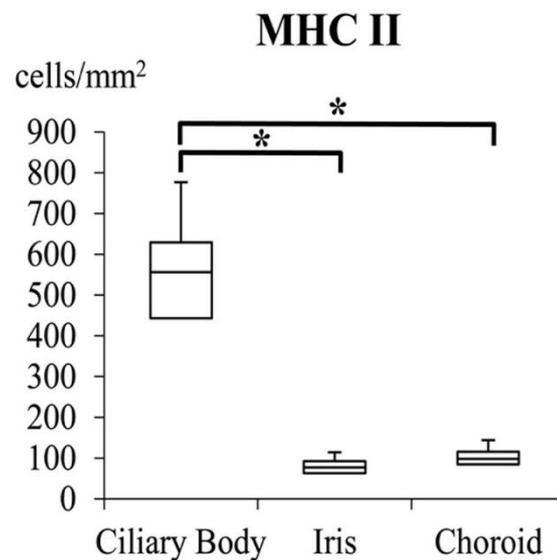


図 54. 毛様体，虹彩および脈絡膜に分布する MHC II 陽性細胞の各組織間における定量的分析．毛様体と虹彩 ($p<0.001$) ならび毛様体と脈絡膜 ($p=0.0029$) 間にそれぞれ有意差を認めた．*統計学的有意差 ($p<0.01$)．

2-4. 考察

本研究により、はじめてウマぶどう膜組織に分布する CD163 陽性細胞が明らかになった。CD163 はウマを含めた様々な組織マクロファージにその発現が認められており [136]、本研究で明らかとなった CD163 陽性細胞は、ウマぶどう膜組織在住組織マクロファージであると考えられた。正常組織に分布する組織マクロファージは、侵入抗原に対する最前線の細胞学的防御機構で有ると同時に、多様な生理活性物質を産生することにより正常組織の免疫恒常性維持、組織リモデリングや血管新生に関与している [27]。本研究でウマぶどう膜組織に検出された CD163 陽性マクロファージは、選択的活性化マクロファージに分類され、炎症や免疫反応に対し抑制性の免疫調節機能を有していることが知られている [35]。CD163 は type B crystalline-rich scavenger receptor であり、の代表的な機能として haemoglobin-haptoglobin complexes を貪食することにより、正常組織の遊離 haemoglobin による酸化を防ぐことが考えられている。さらに、このレセプターは細菌感染に対する免疫センサーとしての機能が報告されており、CD163 陽性マクロファージは抑制性の免疫調節機能のみならず、局所炎症を誘起する細胞としての機能することが明らかとなっている [36]。本研究では、健常ウマぶどう膜における侵入抗原に対する最前線の防御機構として参画し、抑制性の免疫恒常性維持、さらにはぶどう膜炎を誘起する細胞として重要な役割を担う可能性を有した組織マクロファージの分布が明らかとなった。

眼球組織に分布する MHC II 陽性細胞は、免疫特権の形成に寄与していると考えられており [95, 120]、ウマぶどう膜組織におけるその分布、局在、陽性細胞数を認知することは眼球免疫恒常性機構の理解に重要である。本研究では、ウマぶどう膜組織に分布する MHC II 陽性細胞を蛍光抗体法によりそれらを評価した。過去の酵素抗体法を用いたウマぶどう膜組織の MHC II 陽性細胞の検索では、間質に分布する MHC II

陽性細胞が疎らで僅かに認められているのみであるとされており、その正確な MHC II 陽性細胞数は明らかとなっていない [104]。また、毛様体上皮細胞直下と上皮細胞間の MHC II 陽性細胞は検出されておらず、ウマぶどう膜の MHC II 陽性細胞はごく少数であると理解されていた。今後のウマぶどう膜組織ひいてはウマ眼球における免疫恒常性維持機構、すなわちウマ眼球の免疫特権の理解に際し、本研究で証明された一定数の MHC II 陽性細胞が毛様体を主体に分布しているということを考慮すべきであると考える。過去の免疫特権の概念として、ぶどう膜を含めた眼球組織に分布する MHC II 陽性細胞はごく少数であると報告されていた [120]。そして、ごく少数である MHC II 陽性細胞の分布が眼球の炎症や免疫応答を最小限に抑制し、眼球の組織を保護していると考えられており、ぶどう膜に分布する MHC II 陽性細胞も僅かであるとされていた [3, 67, 129]。しかしながら、ぶどう膜組織に分布する MHC II 陽性細胞の再評価がヒト、マウス、ラットでなされ、多くの MHC II 陽性細胞の分布が証明されている [81-83]。現在では、それらのぶどう膜に分布する多くの MHC II 陽性細胞による眼球免疫特権への関与が考えられている。

抗原提示細胞はマクロファージに加え、樹状細胞と B 細胞の 3 種類に分類される [115]。本研究においては、ウマぶどう膜に分布する CD20 陽性細胞は認められず、B 細胞の分布は示唆されなかった。しかしながら、CD163 ならび MHC II 陽性細胞の局在と形態学的比較により、毛様体上皮細胞間に分布する樹状細胞の分布が示唆された。本研究で示唆された樹状細胞は、樹状状 MHC II 陽性細胞であり、その形態と免疫表現型より樹状細胞であると考えられた。さらに、毛様体根部においても散在性に樹状状 MHC II 陽性細胞が認められ、それらにおいても樹状細胞であることが推察された。樹状細胞における貪食作用は乏しいが、抗原提示能に極めて特化した抗原提示細胞である [119]。また末梢組織在住の樹状細胞は内因性抗原の処理に関与し、内因性抗原に対するセンサー機能や免疫機構変動の監視を担っていると考えられている [119]。ウマぶどう膜組織に認められた樹状状 MHC II 陽性細胞は、ウマぶどう膜組

織において免疫機構調節の重要な役割を担っていると考えられた。しかしながら、ウマぶどう膜に分布する樹状状 MHC II 陽性細胞の詳細な機能を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

統計学的検索により、ウマぶどう膜における CD163 陽性細胞と MHC II 陽性細胞の毛様体を中心として広がる両陽性細胞の分布が特徴付けられた。この結果から毛様体が両陽性細胞の最大分布組織であることが明らかになった。毛様体における両陽性細胞の局在からは、両陽性細胞は血液硝子体関門の形成に関連した細胞学的防御機構の役割を担っていることが推察された。さらに、毛様体が MHC II 陽性細胞の最大分布組織であったことより、毛様体はぶどう膜に侵入した抗原認識の最大組織であることが示唆された。ウマぶどう膜において毛様体は、ぶどう膜炎の起爆と波及に際して中心的な役割を果たしていることや、それに引き続く抗原提示細胞による循環 T 細胞への局所的な抗原提示による免疫応答が行われる場として虹彩や脈絡膜よりも重要なぶどう膜組織であることを暗示しているのかもしれない。また、マウス、ラットやヒトにおける MHC II 陽性ならび陰性マクロファージや樹状細胞に分類される組織在住抗原提示細胞の分布はぶどう膜間質を主体とした網目状分布として検出されている [80-83]。ウマとそれらの異なる組織在住細胞の分布は、ウマと他の動物では異なるぶどう膜組織が眼球免疫の主体をなす組織であることを示しているのかもしれない。

本研究では、健常ウマぶどう膜組織における免疫恒常性機構に参画する可能性のあるウマぶどう膜組織在住細胞として、組織マクロファージと MHC II 陽性細胞の分布と局在を明らかにした。そして、ウマぶどう膜におけるそれらの毛様体を主体とした分布を特徴付けた。本研究によるウマぶどう膜組織における抗原提示細胞のデータは、健常ぶどう膜の免疫恒常性機構の理解向上や解明の一助になると考えられる。またウマぶどう膜炎は最も認められる眼球疾患であり、局所性や全身性の感染性や免疫介在性に分類される多様な原因により引き起こされる [8, 26]。そして、それらの病態に

において、免疫反応が重要な因子であると考えられている [53, 78]。本研究で明らかとなった健常ウマぶどう膜における組織在住細胞の特徴を知ることは、ウマぶどう膜炎の発生機序や病態を理解するための一助になると考える。

2-5. 小括

本研究では、ウマぶどう膜における組織在住 CD163 陽性細胞ならび MHC II 陽性細胞の分布の検索を免疫組織化学的手法を用いて行った。ぶどう膜全体に両陽性細胞の分布が認められ、統計学的検索結果より毛様体を主体とした両細胞の分布が特徴付けられた。さらに両陽性細胞の免疫組織化学的形態と分布領域について比較した結果、樹状状 MHC II 陽性細胞の分布が毛様体に認められた。これらのことより、本研究により健常ウマぶどう膜組織における毛様体を主体とした組織マクロファージの分布が明らかになり、樹状細胞の分布が示唆された。本研究により得られた健常ウマ眼球組織における組織在住細胞の検索結果は、ウマの眼球疾患、特にぶどう膜炎のさらなる病態理解の一助になると考えられた。

第 III 章

ウマ眼球における硝子体細胞の 組織学的および免疫組織化学的検索とその分布

3-1. 序文

硝子体細胞は、単一の硝子体・後房眼球組織との境界部（硝子体皮質または網膜内境界板上）に存在する細胞と定義され、ヒトや実験動物（マウス、ラット、モルモット）、ウマを除く様々な家畜や伴侶動物（ウシ、ヒツジ、シカ、イヌ、ネコなど）および鳥類で報告されている [4, 14, 15, 47, 96, 100, 106, 121, 123, 127]。また、その形態学的研究 [4, 14, 15, 96, 106, 121, 123] と機能学的研究 [4, 15, 100, 106, 121, 123]、および免疫組織化学的研究 [47, 100, 106, 127] から、硝子体細胞は骨髄由来で、硝子体内で分化した組織マクロファージであることが示唆されている。

ヒトやマウス、ウサギ、ニワトリの硝子体細胞では、自然発生眼球疾病ならび実験的にその動態の研究がなされ、同細胞の硝子体内増殖性疾患への関与、眼球内免疫への抗原提示細胞としての関与、さらには眼球内組織傷害や修復過程における反応性の活性化が報告されている [40, 44, 58, 64, 68, 106, 123, 127]。一方、ウマやウシなどの家畜動物ならびイヌやネコなどの伴侶動物には様々な眼球疾患が知られ、研究がなされているが [26, 31, 33, 90]、それらの病態に関与する眼球組織マクロファージの動態についての報告は見当たらない。

本研究では、ウマにおける眼球内疾患に関わる硝子体細胞の動態を明らかにする為に、その基礎知見となる硝子体細胞の形態学的特徴を組織学的手法を用いて、免疫組織化学的特徴を間接蛍光抗体法を用いて検索した。加えて硝子体細胞の分布と年齢別の出現頻度の検索を行った。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 供試動物

臨床的に眼疾患を伴わないサラブレッド種 18 頭（雄 8、雌 10）のウマより採材された 31 眼球（胎齡約 90 日～24 歳齡）を用いた。18 頭は年齢によって 4 グループ（G1：胎齡約 90 日 6 眼球、G2：胎齡 300 日以上 6 眼球、G3：1～3 歳 8 眼球、G4：8～24 歳 11 眼球）に分類した（表 6）。眼球固定は、10%中性緩衝ホルマリン水溶液による約 48 時間の浸漬により行った。固定に際し、各々の眼球背側中央部に前後約 1 cm の切込みを入れ、注射針付きシリンジを用いて約 0.5-1.0 ml の固定液の注入を行った。固定眼球から、前部ぶどう膜組織（虹彩・毛様体・前部脈絡膜）、網膜組織と後部脈絡膜、視神経乳頭組織のそれぞれを含有する厚さ 0.5-1.0 cm の組織片に切り出し、アルコール脱水とキシレン浸漬後、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋後、厚さ 5 μ m のパラフィン組織切片を作製し、HE 染色を施し組織学的検索を行った。また、同様に作製されたパラフィン組織切片を用いて免疫組織化学的検索を行った。

表 6. 試供動物の特徴

グループ	眼球	性別	年齢	診断
1	左右	雄	胎齡 90 日	————
	左右	雌	胎齡 90 日	————
	左右	雄	胎齡 90 日	————
2	左右	雄	胎齡 310 日	難産・早産
	左右	雄	胎齡 318 日	難産・早産
	左右	雄	胎齡 320 日	難産・早産

3	右	雌	1 歳	離断性骨軟骨症
	左右	雄	1 歳	ウォブラー症候群
	左	雄	1 歳	ウォブラー症候群
	左右	雌	2 歳	ウォブラー症候群
	左右	雄	2 歳	ウォブラー症候群
	4	左	雌	8 歳
左右		雌	8 歳	内転筋損傷
右		雌	9 歳	慢性蹄葉炎
左		雌	9 歳	脊髄損傷
左右		雌	15 歳	慢性蹄葉炎
左右		雌	24 歳	扁平上皮癌
左右		雌	24 歳	乳腺癌

3-2-2. 免疫組織化学的検索

本研究では、間接蛍光抗体法による免疫組織化学的検索を行った。一次抗体には、抗原提示細胞マーカーとして MHC II、単球・マクロファージ系マーカーとして CD163、リンパ球マーカーとして CD3 (T リンパ球) と CD20 (B リンパ球)、グリア細胞の鑑別として GFAP、Ca²⁺結合機能マーカーとして S100、上皮系細胞の鑑別として Pan-CK を用いた。一次抗体の詳細情報ならびそれぞれの前処置は表 5 に示した。作製パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィンし、エチルアルコールを通し、水洗した。前処置後、十分な流水洗を行い、非特異的反応除去の目的で 10% ヤギ正常血清

(Sigma-Aldrich) を切片上へのせ、37°C 30 分間のブロッキング処置を行った。一次抗体は PBS を用いて、それぞれの適切濃度に希釈し (表 7)、希釈一次抗体を切片上へのせ保湿箱内で 4°C overnight 反応させた。反応終了後、PBS 洗浄と 0.05% トライトンへの浸漬を行い、二次抗体として PBS により 200 倍希釈した Alexa Fluor[®] 488 蛍光標識ヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes)、または Alexa Fluor[®] 546 蛍光標識ヤギ抗ウサギ IgG (Molecular Probes) を用い、切片上へのせ遮光下で室温 30 分間反応させた。

二次抗体反応終了後、十分な PBS 洗浄を行い、水溶性封入剤で封入し蛍光顕微鏡 (C2; Nikon, Instech Co., Ltd.) を使用し観察を行った。各一次抗体の陽性対象として、MHC II、CD3 ならび CD20 にはウマリンパ節組織、CD163 にはウマ肺組織、GFAP ならび S100 にはウマ網膜組織ならび眼球内神経線維と血管組織、Pan-CK にはウマ皮膚組織をそれぞれ用いた。陰性対象には、一次抗体の混和の無いそれぞれの溶液を用いて、上述した工程を同様に行った。

表 7. 免疫組織化学的検索に使用した一次抗体

一次抗体	タイプ	前処置	希釈	クローン	製造元
MHC II	MM	Autoclave	1:50	TAL.1B5	Dako
CD163	MM	Proteinase K	1:50	AM-3K	Trans Genic Inc.
CD3	RP	Microwave	1:5	—	Nichirei
CD20	RP	Not done	1:200	—	Thermo Scientific
GFAP	RP	Microwave	1:100	—	Dako
Pan-CK	MM	Autoclave	—	AE1/AE3	Nichirei
S100	RP	Microwave	1:300	—	Dako

MM：マウスモノクローナル、RP：ウサギポリクローナル。

3-2-3. 統計学的検索

硝子体細胞の分布と出現頻度を明らかにするために、以下の検索を行った。HE 染色切片を使用し、硝子体細胞を 4 つの異なる部位（毛様体冠、毛様体輪、網膜、視神経乳頭）においてそれぞれ 400 倍 5 視野で計測し、硝子体網膜境界部の 500 μm 長の境界線上に分布する細胞数の平均値を算出した。算出された細胞数の平均値を用いて、各部位におけるグループ間での検定比較、さらに各グループにおける各部位間の検定比較を行った。前者の比較では、クラスカル・ウォリス検定を事前比較として、またシェフェの検定を事後比較として行った。後者の比較では、マンホイットニーの U 検

定を行った。比較検定はエクセル統計 2012 (Excel and Ekuseru-Toukei 2012; Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いて行った。統計学的検索結果において、 $p<0.01$ または $p<0.05$ で有意差ありとした。

3-3. 結果

3-3-1. 組織学的検索

G3 および G4 において、毛様体冠および毛様体輪の無色素上皮細胞上に多くの硝子体細胞を認め (図 55)、その形態は多型性に富んでおり 4 つの形態 (type-1 : 円形から類円形の核ならび細胞質を有し突起を有さない細胞、type-2 : 円形から類円形の核ならび細胞質を有し複数の突起を有している細胞、type-3: 扁平から紡錘形の核ならび細胞質を有し突起を有していない細胞、type-4: 扁平から紡錘形の核ならび細胞質を有し複数の突起を有している細胞) に大きく大別された (図 56a-d)。中でも、G3 ならび G4 では type-2 および type-4 が多く認められる傾向にあった。また、毛様体輪部における細胞は type-3 の形態を呈する傾向があった。網膜硝子体境界部 (網膜内境界板上) ならび視神経乳頭硝子体境界部では同細胞は認められなかった。毛様体冠周辺部では type-1 および type-2 の形態を呈する遊離細胞を認めた。

G2 では毛様体冠および毛様体輪の無色素上皮細胞直上に硝子体細胞を認め、G3 ならび G4 同様に硝子体細胞は 4 つの形態に大きく分類された。中でも、G2 では type-1 および type-3 が多く認められる傾向にあった。網膜硝子体境界部ならび視神経乳頭硝子体境界部では同細胞は認められなかった。毛様体冠周辺部では type-1 および type-2 の形態を呈する遊離細胞を認めた。

G1 では、毛様体冠および毛様体輪の無色素上皮細胞直上において硝子体辺縁部に位置する細胞は認められなかった (図 57)。

また、すべてのグループにおいて、網膜ならび視神経乳頭部の硝子体辺縁部に位置する硝子体細胞は認められなかった (図 58)。

3-3-2. 免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索では、G2、G3 ならび G4 における組織学的に 4 つの形態に大別された硝子体細胞は、CD163 (図 59a, 59b) と MHC II (図 60c, 60d) に陽性を示した。また、毛様体冠周辺部で認められた遊離細胞も同様に CD163 と MHC II に陽性を示した。G1 においては硝子体辺縁部において、CD163 ならび MHC II に陽性を示す細胞は認められなかった。G2、G3 ならび G4 において、CD3、CD20、GFAP、S100 ならび Pan-CK に陽性を示す硝子体細胞は認められなかった。

3-3-3. 統計学的検索

各グループごとにおける各部位間 (毛様体冠、毛様体輪) の比較において、G2 と G3 間ならび G2 と G4 間で有意差を認め、G3 と G4 間では有意差は認められなかった (図 61)。また、各グループ内における各部位間 (毛様体冠、毛様体輪) の比較において、すべてのグループで両者間に有意差を認め、毛様体冠は毛様体輪に対し統計学的に有意であった (図 62)。

55

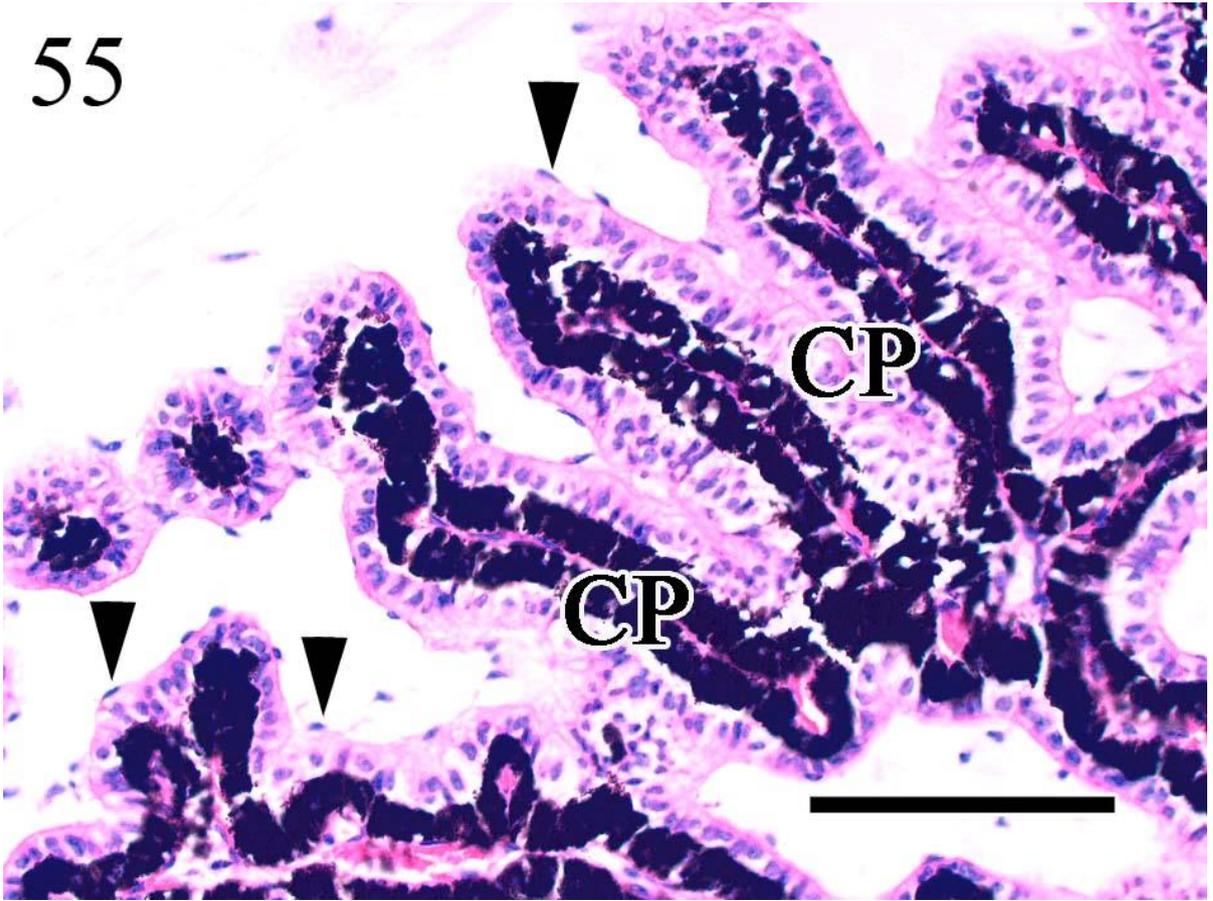


図 55. 成馬, 毛様体. 毛様体突起周囲に隣接した硝子体細胞の分布 (矢頭) を認める.

CP : 毛様体突起. HE. Bar=100 μ m.

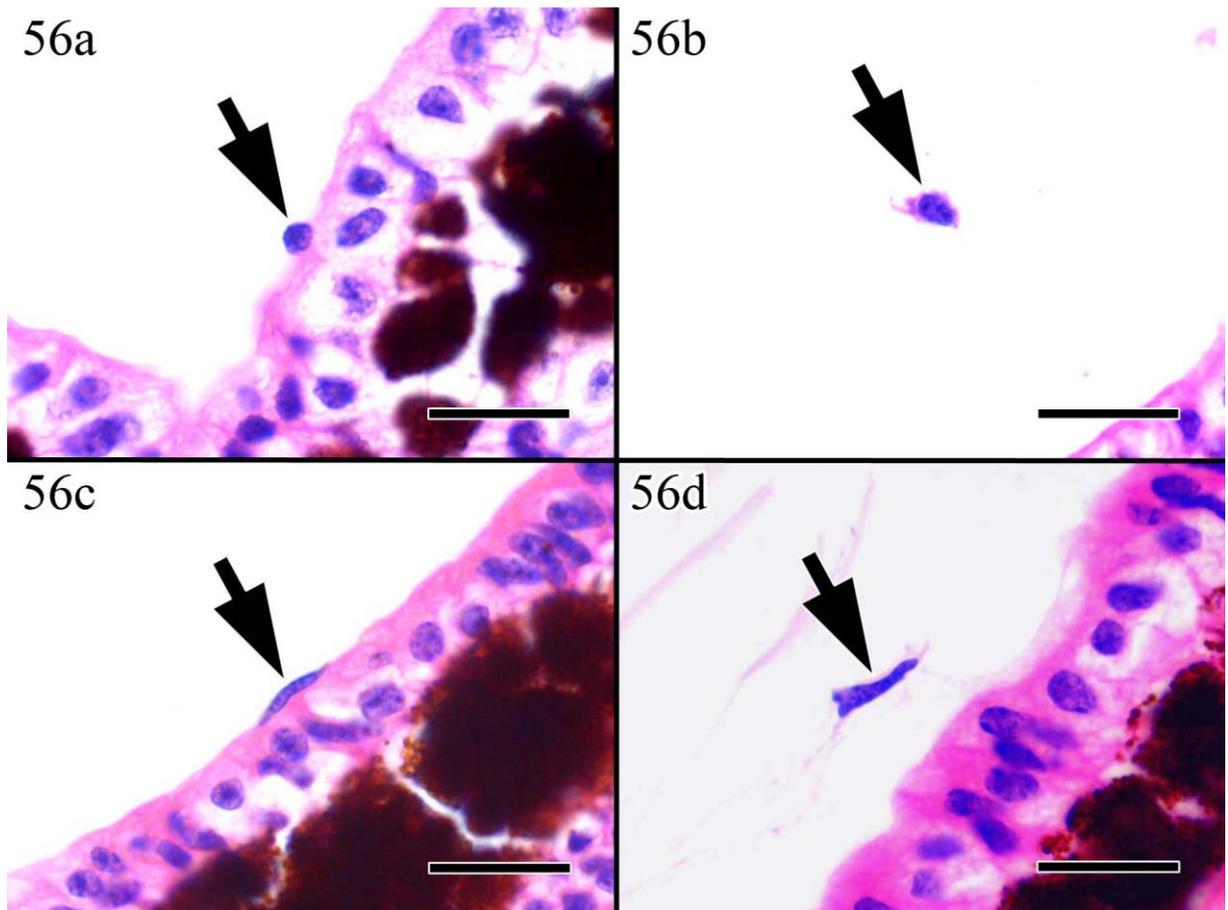


図 56. 成馬，毛様体．毛様体無色素上皮頭頂側表層上やその表層に隣接して，Type-1（図 56a，矢印），Type-2（図 56b，矢印），Type-3（図 56c，矢印），Type-4（図 56d，矢印）の硝子体細胞を認める．HE．Bar=10 μ m.

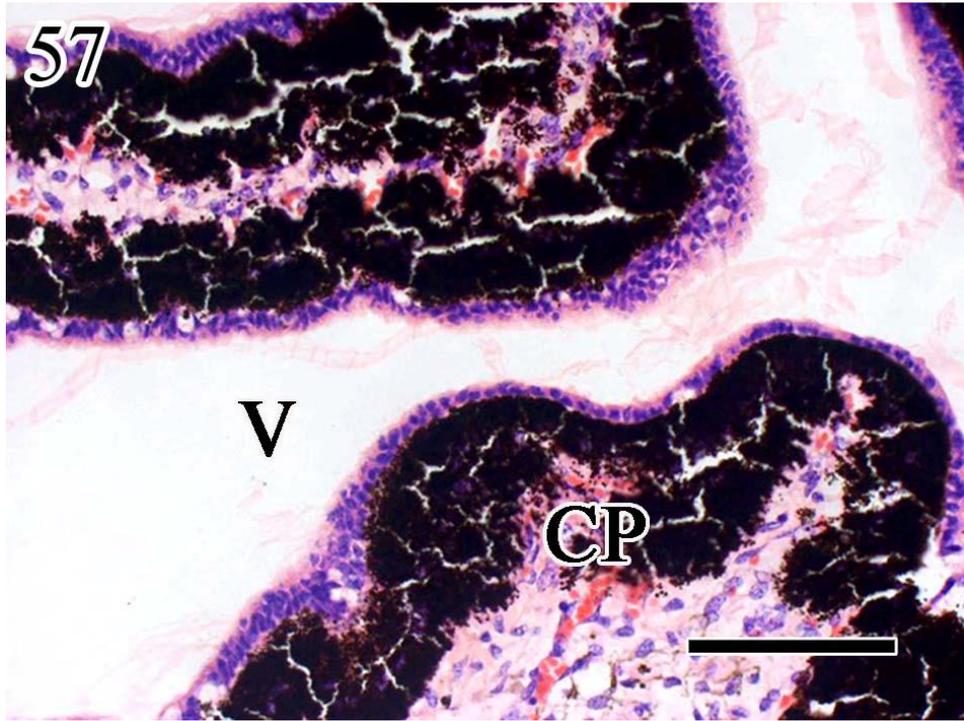


図 57. G1 胎仔，毛様体．毛様体突起周囲に硝子体細胞の分布は認めない．CP：毛様体突起．V：硝子体腔．HE．Bar=50 μ m.

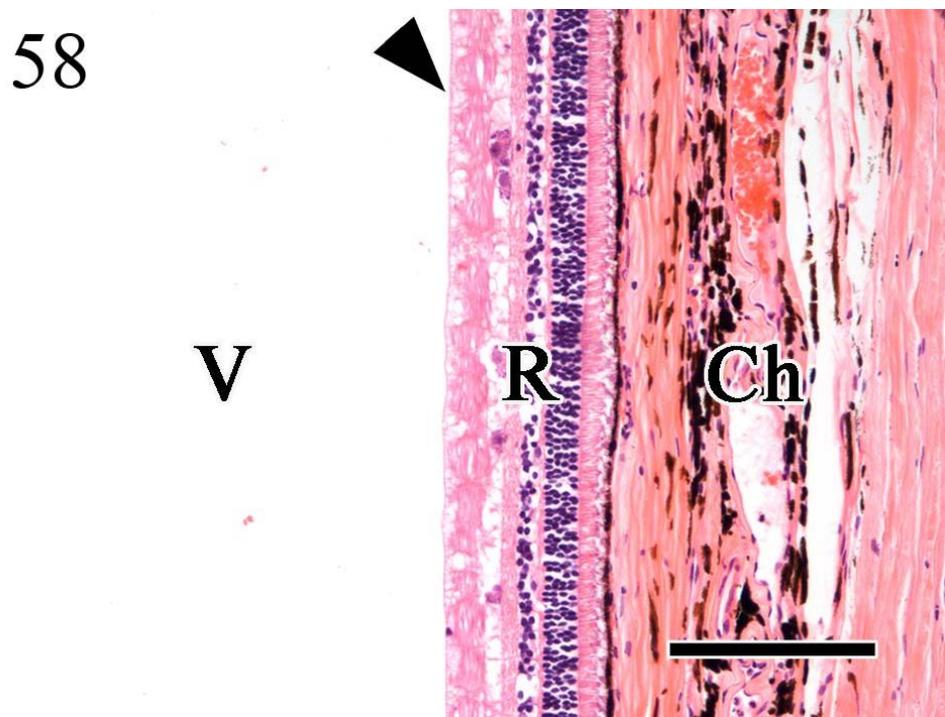


図 58. 成馬，網膜．網膜上や網膜硝子体皮質領域（矢頭）に硝子体細胞の分布は認めない．V：硝子体腔．R：網膜．Ch：脈絡膜．HE．Bar=50 μ m.

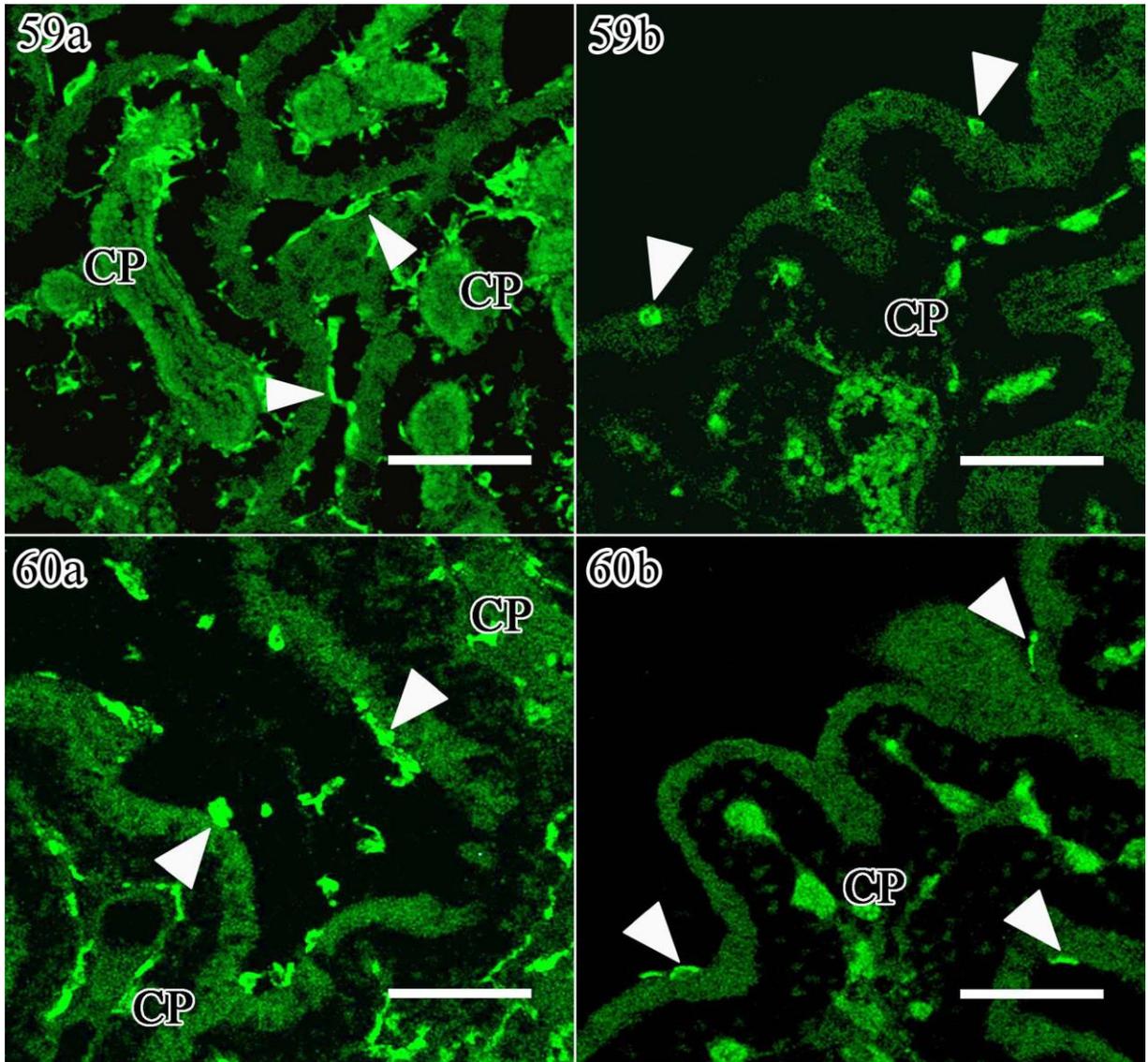


図 59. 図 59a : 成馬, 図 59b : G2 胎仔. 毛様体. MHC II. 毛様体突起に隣接して分布する硝子体細胞において MHC II の発現を認める (矢頭). CP : 毛様体突起. IHC. Bar=50 μ m.

図 60. 図 60a : 成馬. 図 60b : G2 胎仔. 毛様体. CD163. 毛様体突起に隣接して分布する硝子体細胞において CD163 の発現を認める (矢頭). CP : 毛様体突起. IHC. Bar=50 μ m.

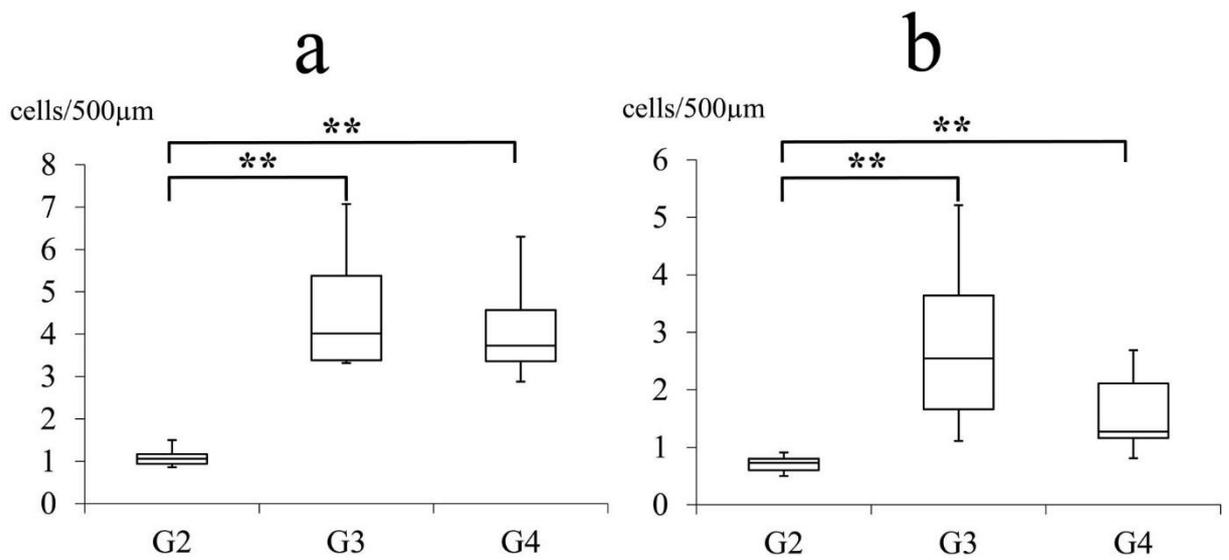


図 61. 各グループ間における毛様体突起 (a) と毛様体輪 (b) に分布する硝子体細胞の定量的分析. 毛様体突起において G2 と G3 ($p=0.0039$) ならび G2 と G4 ($p=0.0060$) 間, 毛様体輪において G2 と G3 ($p=0.0006$) ならび G2 と G4 ($p=0.0257$) 間でそれぞれ有意差を認めた. $**p<0.01$ または $*p<0.05$ で統計学的有意差ありとした.

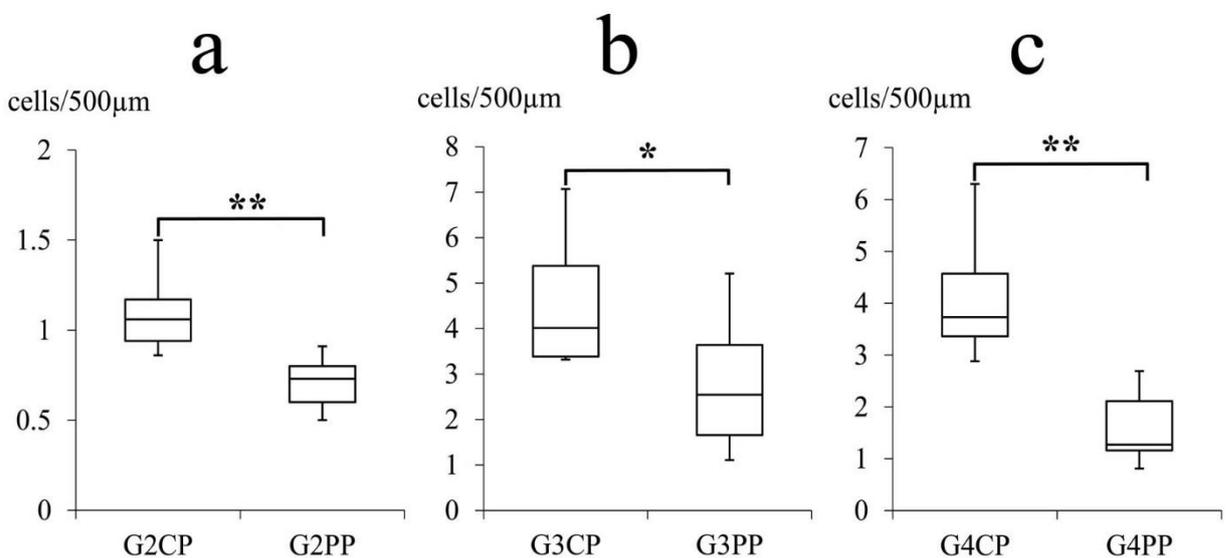


図 62. 各グループにおける毛様体突起 (CP) と毛様体輪 (PP) に分布する硝子体細胞の定量的分析. すべてのグループにおいて毛様体突起と毛様体輪の間でそれぞれ有意差を認めた. G2: $p=0.0065$ (a), G3: $p=0.0356$ (b), G3: $p=0.0001$ (c). $**p<0.01$ または $*p<0.05$ で統計学的有意差ありとした.

3-4. 考察

ウマの毛様体冠および毛様体輪部で認められたウマ硝子体細胞における CD163 の発現性より、同細胞は眼球組織マクロファージであると考えられた。マウスならびラットの硝子体細胞においてもウマ硝子体細胞と同様に CD163 の発現が証明されており、同細胞は眼球における組織マクロファージであることが証明されている [100, 106]。CD163 は、骨髄由来で単球-マクロファージ系の末梢組織マクロファージに特異的に発現しているマクロファージ表面抗原であり [35]、ウマを含めた多くの動物で肺泡マクロファージや肝クッパー細胞などの組織マクロファージに特異的な発現が証明されている [69, 72, 136]。さらに、ウマ硝子体細胞における MHC II の発現は、同細胞が抗原提示細胞であることを証明した [115]。ウマ硝子体細胞において、リンパ球マーカー、グリア細胞マーカー、上皮系細胞マーカーにそれぞれ陰性を示したことは、同細胞がリンパ球由来、グリア細胞由来、さらには上皮系細胞由来の細胞であることを支持しないものである。S100 は、Ca²⁺結合性タンパク質で樹状細胞やランゲルハンス細胞などの他の抗原提示細胞での発現が認められるが [28, 110]、本研究ではすべてのグループのウマ硝子体細胞において S100 の発現は認められなかった。しかしながら、健常ヒト眼球における硝子体細胞では、他の組織マクロファージで発現が認められる CD68 陰性であることに加え S100 の発現が認められており、その免疫組織学的性状から他の組織マクロファージとは異なる単球-マクロファージ系の細胞であることが示唆されている [74]。ヒト硝子体細胞におけるその免疫組織学的性状が他の組織マクロファージとは異なる理由として、ヒト硝子体細胞は他の組織マクロファージとは異なる前駆細胞を起源としていること、その分化ステージによる発現性への影響、さらには眼球内微小環境からの細胞分化への影響などが推察されている。ウマとヒトでの S100 の発現性の違いは、硝子体細胞の機能の違いやその分化、さら

には正常な眼球内環境の違いを反映しているのかもしれない。S100における発現性の違いの詳細な意義を明らかにする為には、今後の更なる研究が必要である。本研究における免疫組織化学的検索の結果、ウマ眼球の硝子体辺縁部にはCD163の発現性が証明された眼球組織マクロファージが分布していることが明らかになった。

G2、G3ならびG4の毛様体冠および毛様体輪部におけるウマ硝子体細胞は、組織形態学的に単一ではなく多型性に富んでおり、これらを4つの型に分類した。他の動物における健常眼球の硝子体細胞もその形態は単一ではなく、様々な形態が存在することが過去に報告されているが、その組織学的形態のタイプ別への分類はなされていない [4, 15, 47, 96, 121, 123]。過去の報告においてマクロファージ型とされた硝子体細胞はtype-1に類似し、その垂型とされている突起を有するマクロファージ型の硝子体細胞はtype-2に類似していた [121]。また、線維細胞型とされている細胞はtype-3に相当するものと考えられ、その垂型とされている突起を有する線維細胞型の硝子体細胞は、type-4に相当する細胞と考えられた [121]。これらの硝子体細胞の特徴的な形態は、前者では硝子体の産生 [55]、後者では硝子体線維の産生 [94] による硝子体細胞の機能の違いを反映しているものと考えられていたが、それらが真実であるか十分な裏付けはなされていない。本研究において、ウマ硝子体細胞が眼球組織マクロファージであることから、突起形成という形態変化は細胞成熟に伴う形態変化であることや細胞活性化によるものであると考えられた。その意義としては、捕食作用をより効率よく行うための形態的变化なのかもしれない。ヒトやマウスの硝子体細胞では、網膜前膜形成における形質転換を伴う線維芽ならび筋上皮細胞様の細胞への形態変化により癒痕性収縮の病態へ関与することが知られている [58, 64, 68]。健常ウマ眼球においては、4つの異なる形態の硝子体細胞が存在することが明らかになり、組織形態学的にtype別分類することにより、ウマの眼球疾患における硝子体細胞の組織形態の変化という観点から病態への関わりが明らかになると考えられる。

ウマ硝子体細胞の分布の特徴として、毛様体（毛様体冠>毛様体輪）が主の分布領

域として認められたことであり、視神経乳頭部を含めた網膜組織への分布が認められないことである。毛様体冠部で認められた遊離細胞も、その形態と免疫組織化学的発現性からウマ硝子体細胞であると考えられた。硝子体細胞の分布における検索は過去に様々な動物で行われており、毛様体ではすべての動物でその分布が認められているが [4, 47, 96, 121, 123]、異なる動物種やその異なる眼球構造においては分布領域の違いが認められている。ニワトリでは、網膜血管を有さず視神経乳頭部より硝子体内へ突出するペクチンがその役割を果たしているが、ウマ同様に網膜組織に硝子体細胞の分布は認められていない [123]。しかしながら、モルモットもウマ同様に無血管の網膜構造を有しているが、網膜への散在性の硝子体細胞の分布が認められている [96]。網膜血管を有するヒトや実験動物さらには大型家畜では網膜組織上の分布が認められており、ヒトやウシでは網膜血管に沿った多くの硝子体細胞の分布が特徴的に認められている [4, 121]。ウサギでは網膜での少数の硝子体細胞の分布に加え、硝子体内においてより多くの硝子体細胞が認められている [47]。ウマでも認められた毛様体冠部の遊離硝子体細胞はモルモットおよびウサギで認められている [47, 96]。本研究ではウマ硝子体細胞の分布領域が明らかになったことに加え、ウマでは毛様体における硝子体細胞の最大分布数は毛様体冠部で認められた。硝子体細胞の最大分布は、多くの動物では毛様体輪部であり [121]、ウサギでは硝子体内で認められている [47]。ウマ硝子体細胞における分布領域および最大分布数の結果から、毛様体冠が硝子体細胞の分布という観点から重要な部位であることが示唆された。ウマの毛様体冠は、硝子体細胞の間質から硝子体内への移行や、あるいは硝子体細胞からの間質細胞への抗原提示を行う部位として重要な役割を果たしているのかもしれない。

ウマ硝子体細胞は G2 にも認められ、硝子体細胞が出生前から硝子体辺縁部に分布を開始していることを証明した。また、G2 では硝子体細胞が認められ、G1 では硝子体細胞が認められなかったことは、胎仔期における眼球成長に伴う硝子体細胞の分布増加を示していると考えられた。G2 における硝子体細胞の分布部位は G3 および G4

と同等であった。加えて G2 に分布する硝子体細胞も G3 および G4 と同等の免疫組織化学的発現性が認められ、その G2 における硝子体細胞の免疫組織化学的性状から同細胞はすでに出生前から分化していると考えられた。本研究では、硝子体細胞の分布の差は G2 と G3・G4 間に認められ、G3 と G4 との間には認められなかった。これらの結果は、硝子体細胞が妊娠末期から出生後 1～3 歳齢の間に最も増加することを示していることが考えられた。マウスでは加齢性の硝子体細胞の分布増加が証明されているが [20, 127, 135]、今回の結果では出生後のウマ硝子体細胞の増加を支持する結果は得られなかった。硝子体細胞の増殖をもたらす要因には、動物種差、眼球構造の違い、その動物の寿命の長さ、さらには飼育環境など様々な因子が考えられる。

ウマ硝子体細胞における馬眼球内での生物学的役割やその確定的な機能の詳細は今までに報告されていない。今回の研究において、ウマの硝子体辺縁部位置する硝子体細胞の存在を明らかにし、研究結果からはウマ硝子体細胞の免疫組織化学的発現性や、同細胞は健常な胎仔および成馬の眼球組織内において多形性に富んだ形態を呈する細胞であることを証明した。ヒトを含めた他の動物では硝子体細胞の眼球疾病下の動態が自然発生症例や実験的病態下において研究されている。ヒトやマウスにおける網膜前膜形成 [58, 64, 68]、マウスにおける実験的に誘起された眼球免疫疾患への抗原提示細胞としての役割や、実験的眼球 LPS 暴露、実験的糖尿病網膜変性症などに応答することが証明されており、それらとの関わりが示唆されている [58, 106, 127]。さらにウサギにおける実験的レーザー網膜光凝固に対する分裂活性化や実験的硝子体出血への反応性増殖 [40, 44]、ニワトリにおける実験的眼球内細菌感染や異物注入における貪食活性化なども知られている [123]。ウマ硝子体細胞も眼球疾患における抗原提示細胞としての役割や眼球疾患におけるその病態への関わりを有することが考えられ、さらなるウマ硝子体細胞の研究が必要である。本研究におけるウマ眼球での硝子体細胞の存在や分布、さらにはその形態や免疫組織化学的特徴などの基礎知見の集積は、今後のウマ眼球疾患の解明における一端を担うと考えられる。

3-5. 小括

本研究では、ウマ（胎仔～成馬）の硝子体細胞について組織形態学的、免疫組織化学的に検索し、異なる4箇所（毛様体突起、毛根、毛鞘、毛根鞘）の硝子体皮質に区分しウマ硝子体細胞の分布についての検索を行った。ウマの硝子体細胞は組織形態学的に4型に大別され、それらは免疫組織化学的にCD163とMHC IIに陽性を示した。また、ウマの硝子体細胞の最大分布組織は毛様体突起の硝子体皮質であった。これらの結果から、ウマの硝子体細胞は毛様体突起部の硝子体皮質に最大分布する、多形性に富んだ組織マクロファージであり、さらには抗原提示能を有した細胞であることが明らかとなった。

第 IV 章

イヌの口腔および眼球黒色細胞性腫瘍における
CD163 陽性腫瘍随伴 M2 マクロファージの
免疫組織化学的および定量的検索

4-1. 序文

イヌの MT は腫瘍性疾患全体の 7%を占め、比較的一般的に発生する腫瘍である [114]。イヌの MT において、腫瘍発生部位は悪性度を反映する基準となっており、口腔 MT は悪性そして眼球 MT は良性であると一般的に理解されている [101, 119]。口腔 MT はイヌの口腔腫瘍の中で最も多く発生し、その 70~80%は局所リンパ節や他臓器への転移を引き起こし、術後の平均生存率は 3 ヶ月、1 年またはそれ以上の生存率は約 25%と低値である [50, 114, 134]。組織学的特徴、例えば色素沈着程度、有糸分裂数、腫瘍増殖形態、は腫瘍の悪性度や予後に関連しない [101, 113, 118]。一方、眼球 MT、特に前部ぶどう膜黒色細胞腫は眼球腫瘍において最も多く発生し、組織学的に悪性であっても術後の他臓器転移は稀で予後は良好である [43, 132, 133]。これらに加え、免疫組織化学的手法を用いた腫瘍増殖活性、すなわち Ki-67 陽性細胞数の検出はイヌの MT における悪性度を反映していることが明らかとなっている [11, 89, 103, 113]。

慢性炎症反応に伴う腫瘍微小環境は、固形腫瘍の形成や進行において重要な役割を果たしている [75, 116]。特に、腫瘍に浸潤するマクロファージ (=TAM) は腫瘍微小環境の形成に参画する重要な細胞である。TAM の多くは M2 型への活性化を受け M2 型マーカーの発現が増強している [77, 112]。M2TAM の腫瘍浸潤増加は、ヒトの固形悪性腫瘍において腫瘍悪性度や予後不良と相関性が明らかとなっており、腫瘍に有利な微小細胞環境の形成に中心的役割を果たし腫瘍促進に関与していると考えられている [52, 70]。

イヌの悪性と良性 MT において、M2TAM 浸潤と腫瘍悪性度との関連性についての報告は見当たらない。本研究では、悪性と良性 MT における CD163 陽性 M2TAM 浸潤の関連性と、CD163 陽性 M2TAM 浸潤と腫瘍増殖活性との関連性を検討することを

目的とした。さらに、イヌの口腔 MT の異なる 3 組織型と CD163 陽性 M2TAM 浸潤との関連性を検討することを目的とした。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 供試動物ならび組織学的検索

口腔 MT 29 症例ならび眼球 MT 19 症例を使用した。試料は 4%パラホルムアルデヒドにより 24 時間浸漬、または 10%中性緩衝ホルマリンによる 24~48 時間浸漬によって固定した。固定された試料はアルコール、キシレンに浸漬され、パラフィン包埋後 4 μm の厚さのパラフィン切片を作成し、HE 染色を施し組織学的検索に用いた。口腔ならび眼球 MT は、World Health Organization classification of the alimentary system、ocular and optic tumors of domestic animals に従い悪性ならび良性に分類した [49, 131]。さらに、口腔 MT は優位な増殖組織型により、上皮様型 (epithelioid type)、紡錘形型 (spindle-cell type)、上皮様型と紡錘形型が混在する混合型 (mixed type) の 3 つの組織型に分類した。眼球 MT は悪性と良性に分類した。尚、豊富な黒色色素を有する組織切片は、過マンガン酸カリウム・シュウ酸法による前処理した切片に HE 染色を行い検索した。

4-2-2. 免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索は間接蛍光抗体法で行った。一次抗体として、CD163 (AM-3K; Trans Genic Inc.) と Ki-67 (MIB-1; DAKO) を使用した。一次抗体に対する抗原賦活化の目的として、CD163 には Proteinase K (DAKO) によるタンパク分解酵素処理、Ki-67 にはオートクレーブによる加熱処理を行った。非特異的反応除去の目的で、10% ヤギ正常血清 (Sigma-Aldrich) を切片上へのせ、37°C 30 分間のブロッキング処置を行った。一次抗体は PBS を用いて、CD163 は 50 倍、Ki-67 は 30 倍に希釈し切片上に

のせ、CD163 は 4°C overnight、Ki-67 は室温 1 時間保湿箱内で反応させた。一次抗体反応終了後、PBS 洗浄と 0.05% トライトンへの浸漬を行い、二次抗体として PBS により 200 倍希釈した Alexa Fluor® 488 蛍光標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) と Alexa Fluor® 546 蛍光標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) を CD163 と Ki-67 にそれぞれに用いた。二次抗体は切片上にのせ遮光下で室温 30 分間反応させた。反応終了後、切片は ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Cell Signaling Technology) で封入し、蛍光顕微鏡 (C2; Nikon Instech Co, Ltd.) を使用し観察を行った。各一次抗体の陽性対象として、CD163 にはイヌのリンパ節、Ki-67 にはイヌ皮膚組織をそれぞれ用いた。陰性対象には、一次抗体または二次抗体のそれぞれを省いた各溶液を用いた。口腔と眼球 MT における CD163 と Ki-67 の各々の陽性細胞数は、壊死領域を省いた箇所による 400 倍視野で hot spot の 10 視野で計測し、それらを平均値として算出し統計学的検索を行った。

4-2-3. 統計学的検索

口腔 MT と眼球 MT、眼球 MM と眼球 MC の CD163 と Ki-67 のそれぞれの平均陽性細胞数における有意差を検定するために Student-*t* 検定を行った。また、口腔 MT の 3 型間における CD163 と Ki-67 の平均陽性細胞数の有意差を検定するために、Kruskal-Wallis 検定を事前比較として、また Scheffe の検定を事後比較として行った。すべての統計学的検索は、エクセル統計 2012 (Excel and Ekuseru-Toukei 2012; Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いて行い、 $p < 0.01$ で有意差ありとした。口腔と眼球 MT における CD163 と Ki-67 の平均陽性細胞数の相関性を明らかにするために、Pearson's product-moment correlation coefficient を算出し評価した。

4-3. 結果

4-3-1. 組織学的検索

口腔 MT の 29 症例は、すべて MM と診断され、それらは epithelioid: 14 症例、spindle-cell: 3 症例、Mixed: 12 症例の 3 つの組織型に分類された。Epithelioid type は、線維性間質により区画された大小の腫瘍細胞巣を形成し、大型の細胞質を有する上皮様腫瘍細胞により構成されていた。腫瘍細胞の核は大型の円形から類円形で、1 個～複数個の明瞭な核小体を有しており、有糸分裂像が認められた (図 63)。Spindle-cell type は、帯状や束状に配列する紡錘形腫瘍細胞により構成され、腫瘍細胞の核は大型の楕円形で、明瞭な核小体を有しており、有糸分裂像が認められた (図 64)。Mixed type は、epithelioid ならび spindle-cell type で認められた腫瘍細胞形態と腫瘍増殖パターンにより構成されていた。また、多くの有糸分裂像を認め、色素沈着は無いものから中程度のものまで様々であった。

眼球 MT の 19 症例は、MM 5 症例と MC 14 症例の前部ぶどう膜黒色細胞性腫瘍に診断された。眼球 MM は、卵円形、紡錘形または両者の形態が混在する腫瘍細胞により構成され、腫瘍細胞は大小不同の異型核を有していた (図 65a, 65b)。腫瘍細胞における色素沈着の程度は、ないものから高度に沈着する症例まで様々であった。有糸分裂像は、3-4 / 10 high power fields で認められ、局所的な壊死領域が認められた。眼球 MC は 2 種類に分類される腫瘍細胞の形態から構成されていた。1 種類は、高度な色素沈着により腫大した円形細胞質で、小型から中型の核を有し異型性に乏しい形態であった (図 66a, 66b)。もう 1 種類は、様々な色素沈着程度を伴う slender な紡錘形細胞質で、小型から中型の核を有した形態であった。有糸分裂像は、非常に稀で有るか認めることは出来なかった。

4-3-2. 免疫組織化学的検索

口腔 MT の epithelioid type において、腫瘍増殖巣周囲間質を主体に浸潤する多数の CD163+マクロファージを認めた (図 67)。それらの多くは、間質・腫瘍増殖巣境界部に位置し腫瘍増殖巣に沿って認められた。また、腫瘍増殖巣内では腫瘍細胞間に介在し認められた (図 68)。腫瘍浸潤 CD163+マクロファージの形態は多形性に富み、類円形、長短紡錘形であった。その形態の多様性の程度は、症例により様々であった。Spindle-cell type において CD163+マクロファージは、紡錘形腫瘍細胞間あるいは腫瘍細胞束間に混在し認められた (図 69)。形態は主には長短の紡錘形、時に類円形の形態であった。Mixed type では、epithelioid と spindle-cell type で認められた CD163+マクロファージの形態と浸潤パターンが、各々の腫瘍増殖型の領域で認められた。

眼球 MM では、腫瘍間質ならび腫瘍細胞間に浸潤する陽性細胞を散在性に認めた (図 70)。それらの形態は円形から類円形、伸展状であった。眼球 MC では、腫瘍間質ならび腫瘍細胞間に浸潤する少数の陽性細胞を散在性に認めた (図 71)。それらの形態は円形から類円形であった。

Ki-67 の陽性像は口腔 MT ならび眼球 MT のそれぞれの腫瘍内細胞の核に認められた (図 72-75)。

口腔 MT 全体と各組織型および眼球 MT 全体と MM ならび MC における CD163 ならび Ki-67 の平均陽性細胞数は、表 8-1 と表 8-2 にそれぞれ示した。

表 8-1. 口腔 MT における CD163 ならび Ki-67 平均陽性細胞数 (平均値±標準偏差)

	All	Epithelioid	Spindle-cell	Mixed
CD163	52.84 ± 15.94	52.57 ± 13.01	52.37 ± 15.05	53.28 ± 20.13
Ki-67	55.46 ± 23.9	52.56 ± 20.36	47.4 ± 8.32	60.85 ± 29.86

表 8-2. 眼球 MT における CD163 ならび Ki-67 平均陽性細胞数 (平均値±標準偏差)

	All	MM	MC
CD163	13.77 ± 4.58	19.32 ± 2.81	11.63 ± 3.04
Ki-67	7.95 ± 5.52	15.82 ± 2.5	5.38 ± 2.89

4-3-3. 統計学的検索

口腔 MT と眼球 MT 間 (図 76)、眼球 MM と眼球 MC 間 (図 77) に CD163 マクロファージと Ki-67 の各々の平均陽性細胞数の有意差を認めた。また、口腔 MT の 3 型間における CD163 マクロファージ平均陽性細胞数に有意差は認められなかった。同様に、Ki-67 陽性細胞数においても有意差は認められなかった。口腔 MT と眼球 MT における CD163 と Ki-67 平均陽性細胞数に正の相関性を認めた (図 78)。

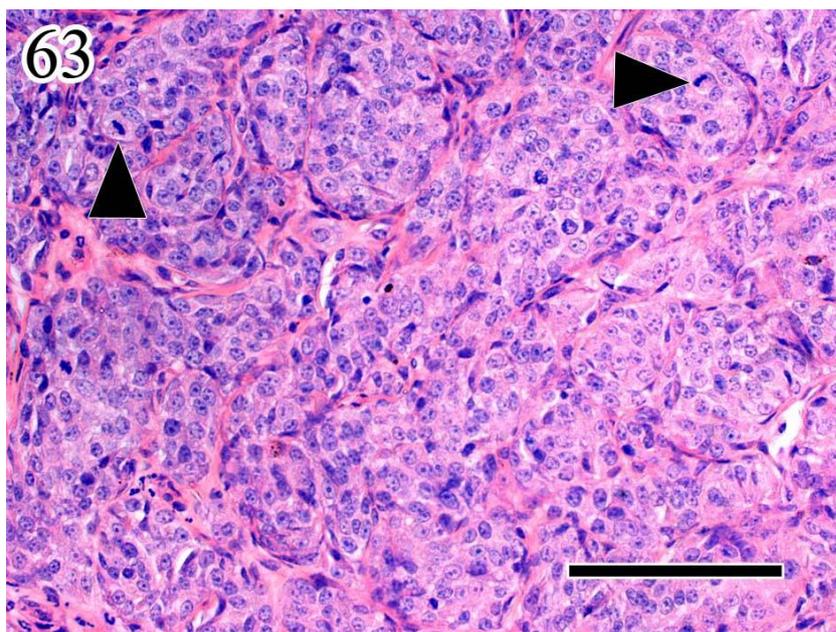


図 63. 口腔 MT, Epithelioid type. 線維性間質により区画された上皮様腫瘍細胞の増殖により構成されている. 有糸分裂像 (矢頭) が認められる. HE. Bar=100 μ m.

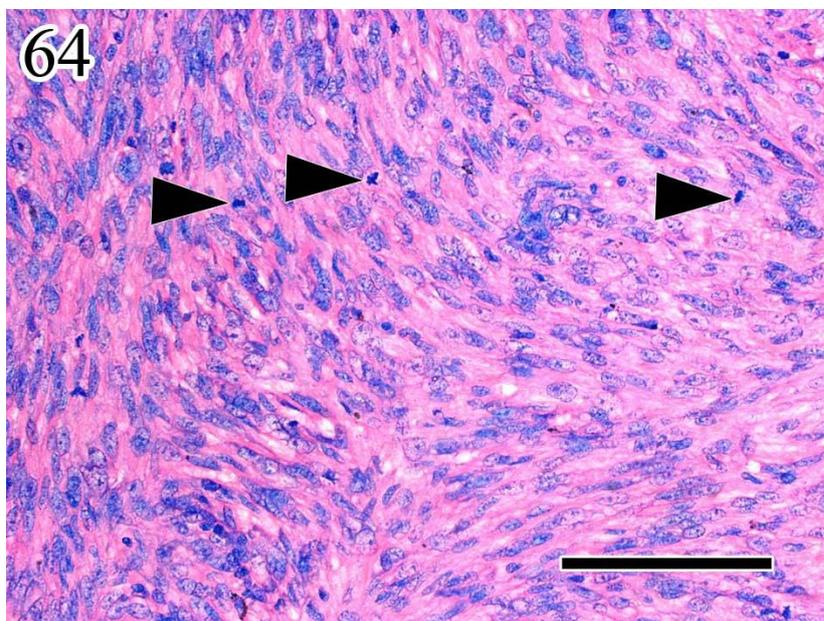


図 64. 口腔 MT, Spindle-cell type. 帯状や束状に配列する紡錘形腫瘍細胞の増殖により構成されている. 有糸分裂像 (矢頭) が認められる. HE. Bar=100 μ m.

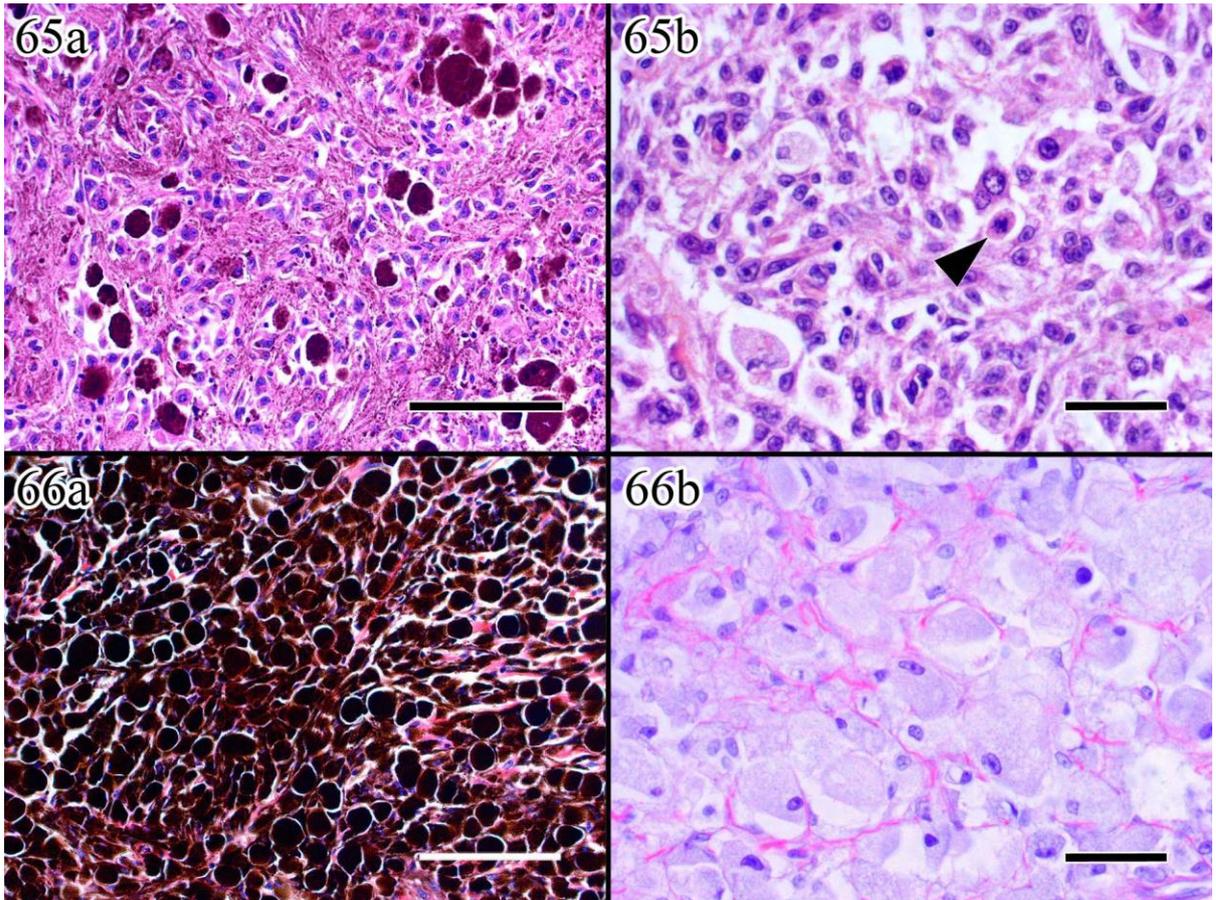


図 65. 眼球 MM. 色素沈着の程度が様々な卵円形と紡錘形腫瘍細胞のシート状増殖により構成されている (図 65a). HE. Bar=100 μm . 腫瘍細胞は大小不同の円形から類円形の異型核を有し, 有糸分裂像 (矢頭) が認められる (図 65b). 脱色素 HE. Bar=20 μm .

図 66. 眼球 MC. 僅かな線維性間質を伴う高度な色素沈着により腫大した円形細胞質を有する腫瘍細胞のシート状増殖により構成されている (図 66a). HE. Bar=100 μm . 腫瘍細胞は小型から中型の円形から卵円形の異型性に乏しい核を有している (図 66b). 脱色素 HE. Bar=20 μm .

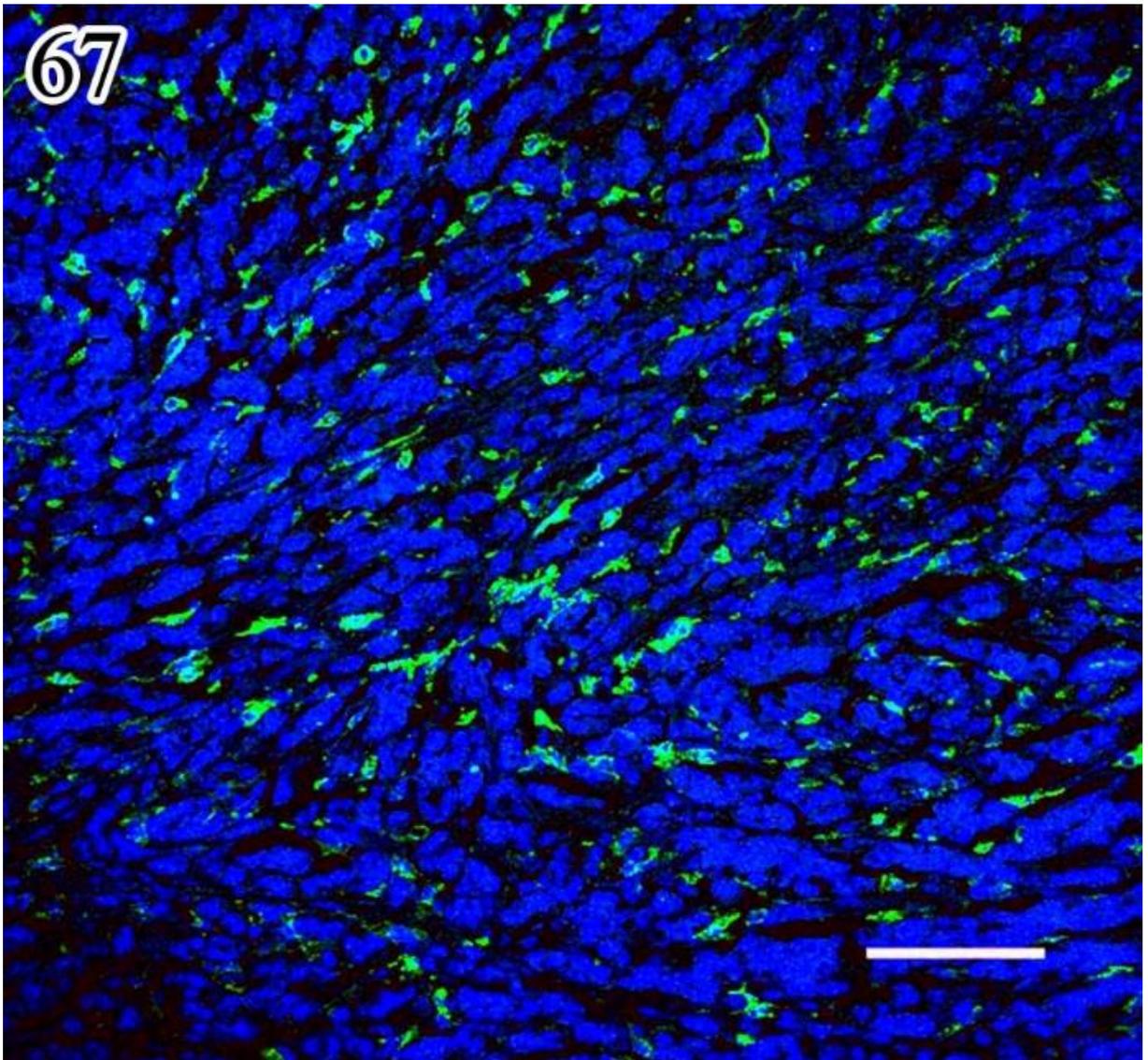


図 67. 口腔 MT, Epithelioid type. CD163. 腫瘍増殖巣周囲間質を主体とした CD163
+マクロファージ浸潤を認める. IHC. Bar=100 μ m.

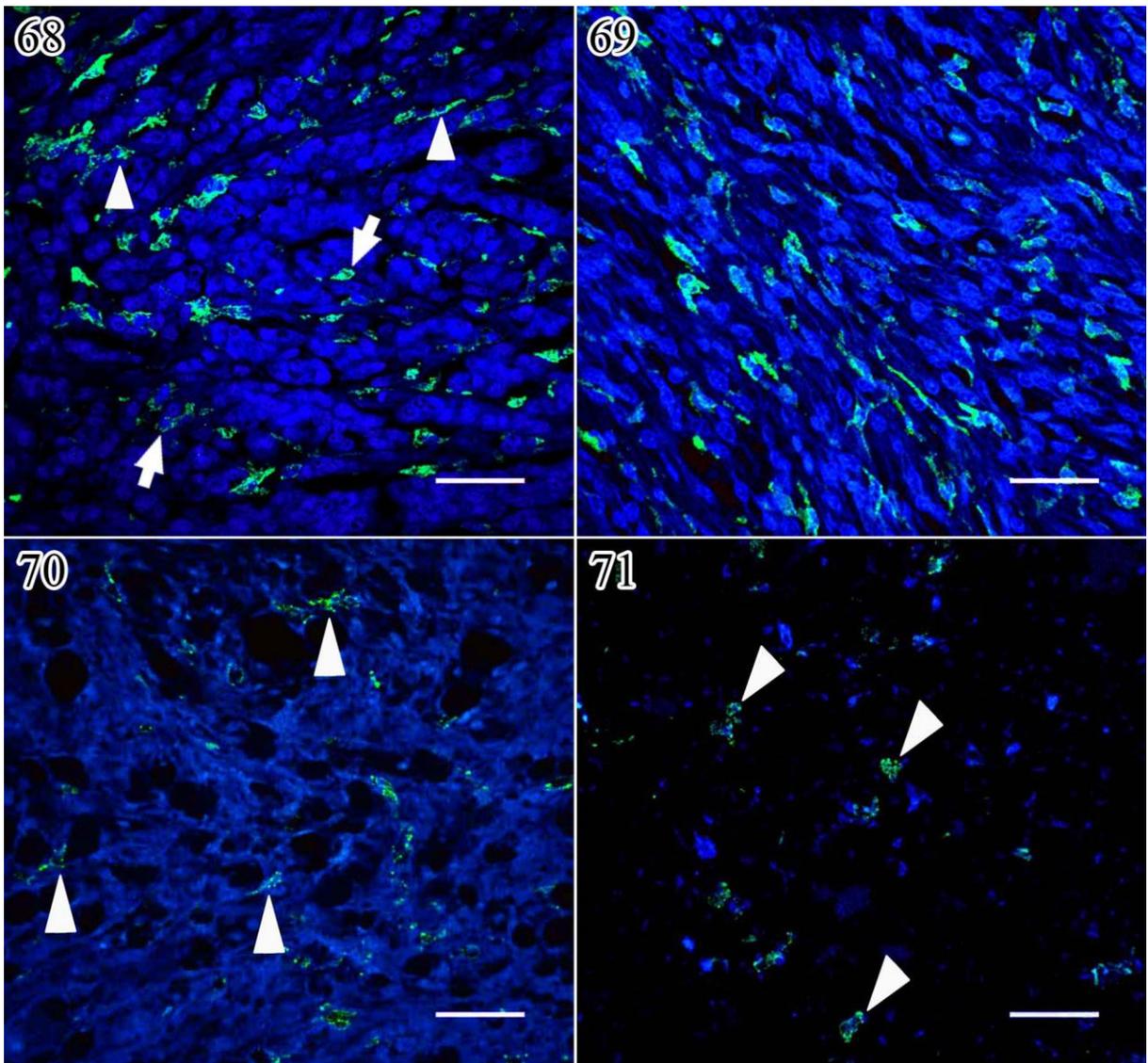


図 68. 口腔 MT, Epithelioid type. CD163. 包巣状の腫瘍細胞増殖巣に近接した CD163 +マクロファージ浸潤 (矢頭) を主体として認め、時に腫瘍細胞間に介在し浸潤する陽性細胞 (矢印) を認める. CD163+マクロファージの形態は多型性に富み、円形から類円形、長短紡錘形あるいはそれらの形態で突起を有している. IHC. Bar=50 μ m.

図 69. 口腔 MT, Spindle-cell type. CD163. 紡錘形腫瘍細胞間あるいは腫瘍細胞束間に混在した CD163+マクロファージ浸潤を認める. CD163+マクロファージは主に長短の紡錘形であり、時に円形から類円形の形態で認められる. IHC. Bar=50 μ m.

図 70. 眼球 MM. CD163. 腫瘍細胞間において散在性に CD163+マクロファージ浸潤 (矢頭) を認める. CD163+マクロファージは、円形から類円形、長短紡錘形ある

いはそれらの形態で突起を有する形態で認められる。IHC。Bar=50 μ m。

図 71. 眼球 MC. CD163. 腫瘍細胞間においてごく僅かで散在性に CD163+マクロファージ浸潤（矢頭）を認める。CD163+マクロファージは主に円形から類円形の形態で認められる。IHC。Bar=50 μ m。

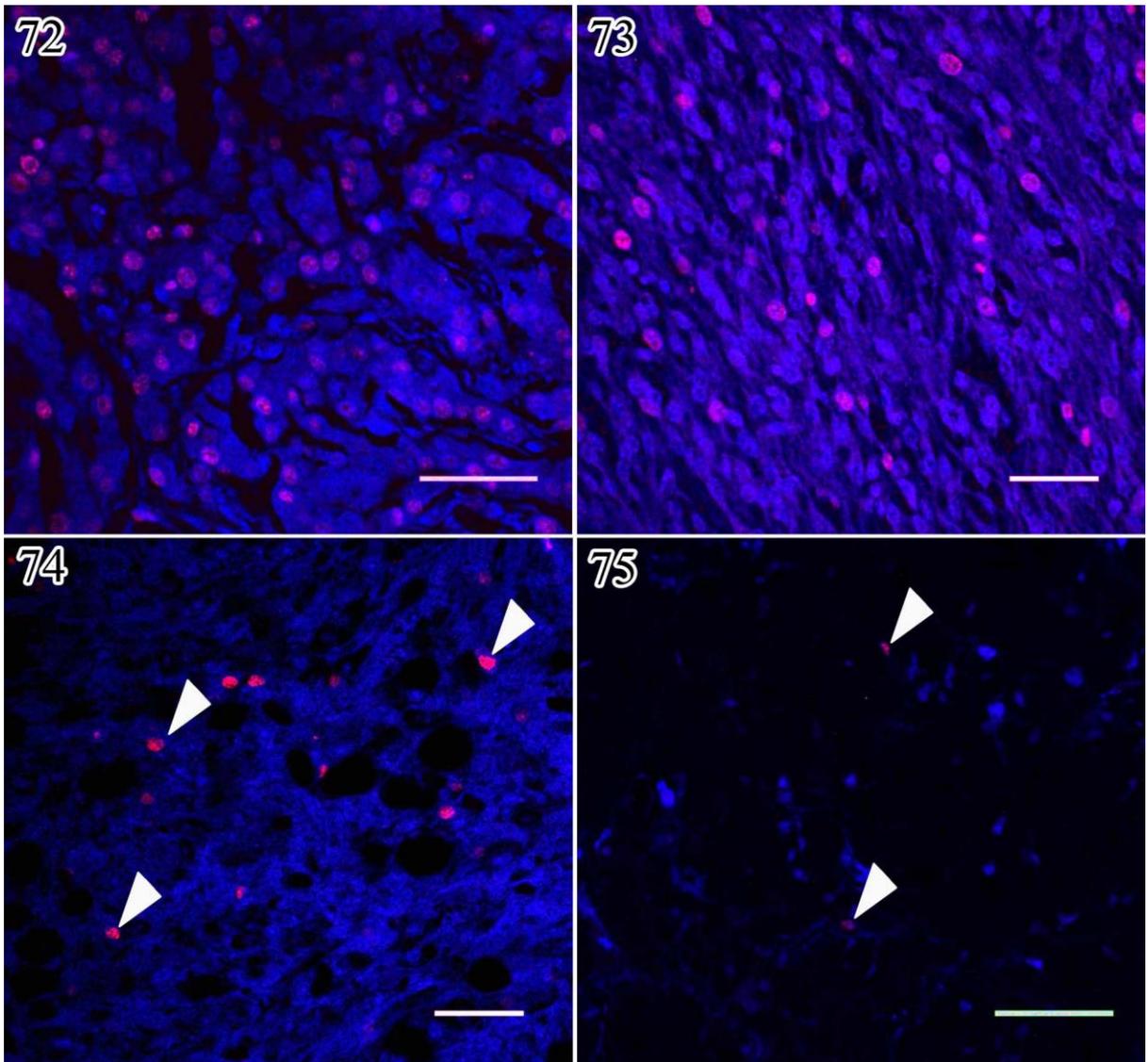


図 72. 口腔 MT, Epithelioid type. Ki-67. 多数の腫瘍内細胞の核において Ki-67 陽性像を認める. IHC. Bar=50 μ m.

図 73. 口腔 MT, Spindle-cell type. Ki-67. 多数の腫瘍内細胞の核において Ki-67 陽性像を認める. IHC. Bar=50 μ m.

図 74. 眼球 MM, Epithelioid type. Ki-67. 散在性の腫瘍内細胞の核において Ki-67 陽性像 (矢頭) を認める. IHC. Bar=50 μ m.

図 75. 眼球 MC, Epithelioid type. Ki-67. 2つの腫瘍内細胞の核において Ki-67 陽性像 (矢頭) を認める. IHC. Bar=50 μ m.

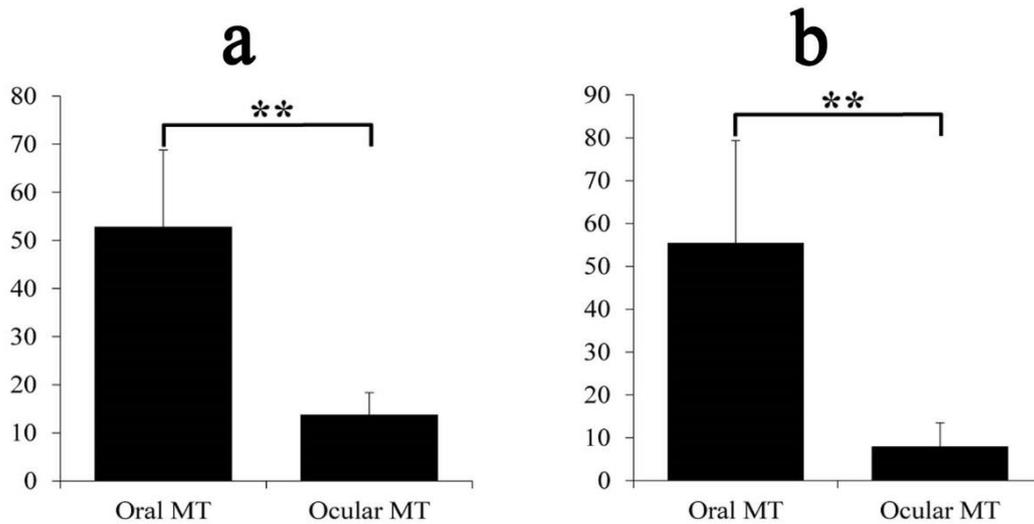


図 76. 口腔 MT と眼球 MT 間における CD163 (a) と Ki-67 (b) の各々の平均陽性細胞数による定量的分析. CD163 と Ki-67 の両者において口腔 MT と眼球 MT 間に有意差を認めた ($p < 0.0001$). $**p < 0.01$ で統計学的有意差ありとした.

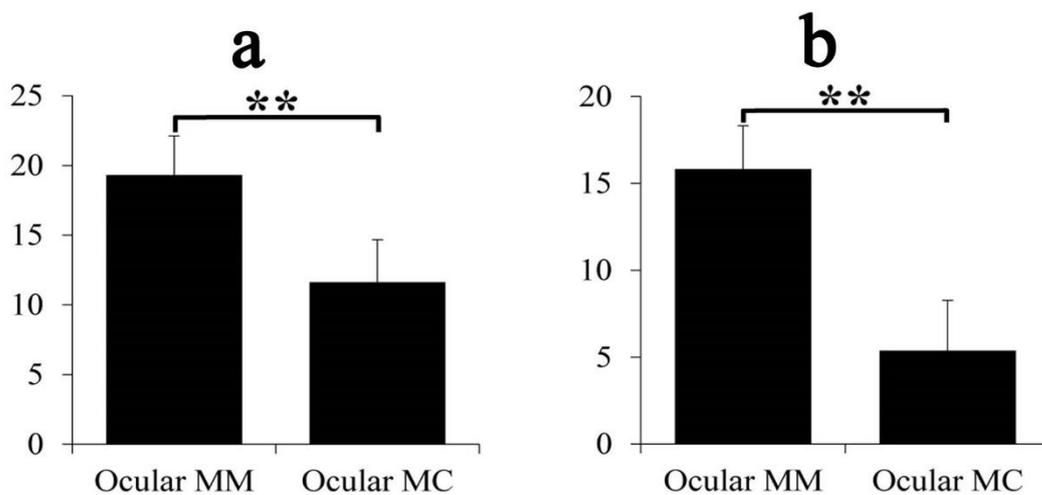


図 77. 眼球 MM と眼球 MC 間における CD163 (a) と Ki-67 (b) の各々の平均陽性細胞数による定量的分析. CD163 ($p = 0.0002$) と Ki-67 ($p < 0.0001$) の両者において口腔 MT と眼球 MT 間に有意差を認めた. $**p < 0.01$ で統計学的有意差ありとした.

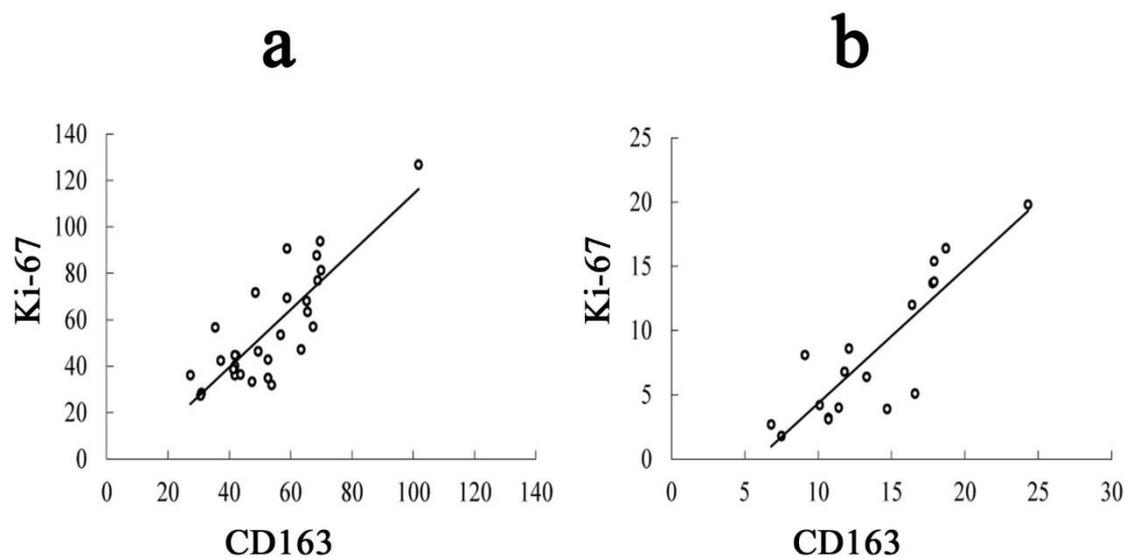


図 78. 口腔 MT (a) と眼球 MT (b) における CD163 と Ki-67 の平均陽性細胞数による相関図. 口腔 MT と眼球 MT の両者において CD163 と Ki-67 の間に正の相関性を認めた (口腔 MT; $r=0.829119$, 眼球 MT; $r=0.866462$).

4-4. 考察

腫瘍間質の炎症は、腫瘍拒絶に関与していると同時に腫瘍の形成や進行に関与しており、腫瘍間質におけるマクロファージはそれらに参画する重要な細胞である [75, 111, 116, 130]。マクロファージは、その異なる活性様式により M1 型 (=classically activated) と M2 型 (=alternatively activated) マクロファージの二種類に大別される [77]。M1 は、炎症誘起ならび反応促進・貪食を介した病原体除去・免疫活性化に機能する。一方で、M2 は、抗炎症反応、組織修復、免疫抑制に機能する [77, 111, 130]。TAM も同様に 2 型に大別され、その多くは M2 への活性化を受け M2 マーカーの発現が増強している [77, 112]。M2TAM は、炎症性の腫瘍促進性微小環境の形成に多様な機能により中心的役割を果たしており、抗炎症・血管新生・抗腫瘍免疫抑制により、腫瘍増殖・脈管新生・転移などの腫瘍進行に貢献している [22, 75, 98, 116]。さらに臨床病理学的に、ヒトの固形悪性腫瘍における M2 浸潤増加は腫瘍悪性度や予後不良と相関することから、M2 は腫瘍悪性度と腫瘍促進に関与していると考えられている [52, 70]。本研究において、イヌの悪性と良性 MT に浸潤する TAM を CD163 陽性 M2 として検出し、悪性 MT には良性 MT と優位な差のある CD163 陽性 M2 の浸潤が証明された。CD163 は type B crystalline-rich scavenger receptor であり、M2 に極性を示すマクロファージに発現が認められている [35, 45, 69]。本研究で優位差のある多数の CD163 陽性 M2TAM が悪性 MT に認められたことは、悪性 MT において炎症性の腫瘍促進微小環境が形成されていると考えられた。CD163 陽性 M2 の浸潤に伴うイヌ MT における腫瘍微小環境形成が、イヌ MT の悪性度に影響を及ぼす重要な因子の一つであると考えられた。

イヌ MT に認められた浸潤 CD163 陽性 M2TAM は、細胞間相互作用により腫瘍増殖に加担し腫瘍進行に貢献することが可能である。M2TAM は、炎症回路により様々なサ

イトカインや成長因子 (Ex. TNF α , IL-1, IL-6, EGF, TGF β etc.) を産生・分泌する [75, 116]。そして、M2TAM により産生・分泌されるサイトカインや成長因子は、腫瘍細胞との細胞間相互作用により Sat-3、HIF、NF- κ B 経路を介した腫瘍細胞増殖に関与する [52, 61, 138]。さらに、M2TAM は細胞周期を調節する G0/G1 switch gene 2 を開放することにより、細胞増殖周期を早めることによっても腫瘍細胞増殖を促進する [139]。本研究において、イヌ MT を悪性 MT と良性 MT に分類、すなわち口腔 MM、眼球 MM と MC に分類した中で CD163 陽性 M2TAM 浸潤程度と Ki-67 を指標とした腫瘍増殖との相関性が示された。イヌ MT の浸潤 CD163 陽性 M2TAM は腫瘍増殖に貢献することにより、腫瘍進行に関与し腫瘍の悪性度に関与していることが考えられた。さらには、浸潤 CD163 陽性 M2TAM は、MT 腫瘍細胞の増殖促進に加担することにより腫瘍進行に貢献している可能性が考えられた。

イヌ MT ではその発生部位に加え、腫瘍内の Ki-67 陽性細胞数を検出することは、腫瘍悪性度を反映するパラメーターである [11, 89, 103, 113]。しかしながら、過去のイヌ MT の腫瘍内 Ki-67 陽性細胞数と組織学的悪性度との関連性を検索した報告において、口腔 MT と眼球 MM ならびに眼球 MC を区分した正確な結果は示されていない。本研究により、イヌ MT を発生部位と組織学的悪性度に分類した中で、Ki-67 陽性細胞数とそれらの悪性度との関連性が明確となった。本研究は、イヌ MT の Ki-67 陽性細胞数は、異なる腫瘍発生部位による悪性度の違いと組織学的悪性度に関連していることを新たな検索結果として提示した。

イヌの口腔 MT は組織細胞型に関係無く悪性であり [101, 113, 114, 118]、Ki-67 陽性細胞数の増加は臨床的予後不良に相関する [11, 89, 103, 113]。本研究において、3 組織型に関係性の無い Ki-67 陽性細胞数と相関性のある多くの CD163 陽性 M2TAM の浸潤が口腔 MT に認められたことは、CD163 陽性 M2TAM 浸潤は口腔 MT が潜在的に悪性であることに関連する知見の一つであると考えられた。ヒト MT においては、M2TAM 浸潤と腫瘍細胞の悪性度との関連性が報告されており、さらに M2TAM 浸潤

増加は臨床的予後に関連していることが明らかとなっている [17, 51, 56, 122, 128]。Ki-67 陽性細胞数と相関する CD163 陽性 M2TAM の浸潤は、口腔 MT における浸潤 CD163 陽性 M2TAM が新たな予後検索の指標となる可能性を暗示しているのかも知れない。さらに本研究の結果は、眼球 MT においても予後指標となる可能性を暗示しているのかもしれない。しかしながら、イヌ MT における CD163 陽性 M2TAM 浸潤と予後との相関性を明らかにし、予後指標としての有用性を評価するためには、今後の更なる研究が必要である。

本研究において、初めてイヌの悪性と良性 MT における CD163 陽性 M2TAM 浸潤の比較がなされた。そして、組織学的悪性度ならび腫瘍発生部位の違いにおける腫瘍悪性度と CD163 陽性 M2TAM 浸潤との関連性が明らかとなり、CD163 陽性 M2TAM 浸潤はイヌ MT における悪性度を反映する一つの因子であることが示唆された。さらには、Ki-67 を指標とした免疫組織化学的腫瘍悪性度との CD163 陽性 M2TAM の浸潤増加の相関性が明らかとなり、浸潤 CD163 陽性 M2TAM は腫瘍増殖を活性化し、イヌ MT の悪性度に関与していることが示唆された。これらのことから、イヌ MT 浸潤する CD163 陽性 M2TAM は、腫瘍増殖に有利な腫瘍微小環境を提供することにより、腫瘍進行に重要な役割を果たしていることが考えられた。

4-5. 小括

本研究では、イヌの眼球と口腔 MT におけるそれらの悪性度と M2TAM 浸潤との関連性を検索した。眼球 MT では、組織学的に良性と悪性に分類された中で、組織学的悪性度に相関する M2TAM の浸潤増加が認められ、良性と悪性で優位差のある M2TAM 浸潤が認められた。口腔 MT では、組織学的に全て悪性である 3 組織型に分類された中で、眼球 MT と優位差のある M2TAM 浸潤が認められた。さらに、眼球と口腔 MT における腫瘍増殖活性指数と M2TAM 浸潤に正の相関性が認められた。これらのことより、イヌの眼球と口腔 MT における悪性度に M2TAM 浸潤が関連し、それらの腫瘍進行に重要な役割を果たしていることが示唆された。

総括

ウマの眼球において、発生異常や全身性や局所性による感染性、炎症性、免疫介在性、腫瘍性などに分類される多岐に渡る原因による疾患が報告されている[2, 5-10, 23, 26, 54, 59, 60, 76, 92]。それらの疾患の病態を理解するために、ウマ眼球組織における組織学的ならび免疫組織化学的特徴や眼球組織在住細胞の特徴を明らかにすることは必要不可欠な基礎知識であると考え。しかしながら、ウマ眼球疾患の病態を理解するために基盤となるウマ眼球組織における基礎研究は乏しく、その基礎知識の蓄積は過去になされていない。そのため、本研究の第1章ではウマ眼球疾患の病態理解の基礎知見となる、ウマ眼球構成組織における組織学的ならび免疫組織化学的特徴を明らかにし、第2章ならび第3章では組織在住細胞（組織マクロファージ、MHC II 陽性細胞、硝子体細胞）について明らかにした。

本研究の第4章では、イヌの眼球および口腔 MT における悪性度と CD163 陽性マクロファージ（=CD163 陽性 M2TAM）浸潤との関連性について明らかにした。

1. ウマ眼球組織における組織学的および免疫組織化学的検索について

第1章により、ウマ眼球の構成組織が有する組織学的特徴と免疫組織化学的特徴が明らかになった。組織学的検索では、過去に明らかになっているウマ眼球の組織学的特徴と概ね一致する結果が示された。しかしながら、免疫組織化学的検索ではウマ眼球の構成組織における各々の免疫組織化学的特徴が明らかとなり、過去に報告されているヒトを含めた他の動物における眼球組織との相違性が明らかになった。本章によりウマ眼球を構成する各組織の免疫組織化学的特徴が示され、ウマ眼球組織における新たな基礎データの蓄積の一端がなされた。眼球組織の健常と疾患の免疫組織化学的

特徴における比較研究は、多岐に渡るヒトを含めた他の動物における眼球疾患の病態理解に貢献している。本章により明らかとなったウマ眼球組織における基礎データは、ウマ眼球の多岐に渡る眼球疾患の病態理解に際し、眼球疾患の比較対照として有用であると考えられた。

2. ウマ眼球組織における組織在住細胞の検索について

第2章により、ウマぶどう膜における組織マクロファージと MHC II 陽性細胞 (MHC II 陽性樹状細胞) に分類される一定数の組織在住細胞が分布していることが明らかとなった。さらに、両陽性細胞の最大分布組織は毛様体であることが明らかとなり、毛様体を中心とした両陽性細胞の分布が特徴付けられた。そして本章において明らかになったウマぶどう膜組織における両陽性細胞の分布の特徴より、ぶどう膜の中でも毛様体がぶどう膜の免疫恒常性維持や、ぶどう膜炎の起爆や波及を中心的に担う組織であることが考えられた。

第3章では、ウマ眼球組織在住細胞として毛様体の硝子体皮質領域に分布する硝子体細胞の存在が示された。そして、ウマの硝子体細胞は多型性に富んだ組織マクロファージであることが明らかとなり、さらに MHC II 抗原保有細胞であることが明らかになった。ヒトを含めた他の動物の硝子体細胞では、眼球疾患の病態への関与が明らかにされているが、本章ではウマ硝子体細胞の詳細な機能については明らかではない。しかしながら、ウマ硝子体細胞の免疫組織化学的特徴より、ウマ硝子体細胞はウマの眼球疾患、特に後房内における眼球疾患の病態に関与する可能性を有する細胞であると考えられた。

両章を通じて、ウマ眼球の組織在住細胞についての基礎データの蓄積の一端がなされた。そして、明らかとなったウマ眼球組織における組織在住細胞の基礎データは、今後のウマの眼球における免疫恒常性機構の理解や眼球疾患における病態の理解向

上の一助になると考えられた。

3. イヌの眼球および口腔 MT における悪性度と M2TAM 浸潤の関連性について

イヌの眼球および口腔 MT において、腫瘍細胞の悪性度による比較研究はなされているが [109]、腫瘍進行に重要な役割を果たしていると考えられる慢性炎症に伴う腫瘍微小環境による比較検索は過去になされていない。第 4 章では、イヌの眼球 MT と口腔 MT の悪性度と CD163 陽性 M2TAM 浸潤との関連性についてはじめて明らかになった。両 MT における組織学的ならび免疫組織化学的悪性度と CD163 陽性 M2TAM 浸潤との相関性が明らかになり、同細胞は腫瘍に有利な腫瘍微小環境の形成に加担し、腫瘍進行に重要な役割を果たしている細胞であると考えられた。さらに、イヌの眼球と口腔 MT における CD163 陽性 M2TAM は、眼球と口腔において異なる腫瘍微小環境の形成に加担し、イヌの MT における発生部位による異なる腫瘍悪性度を反映していることが考えられた。また本章では、イヌの眼球疾患について眼球 MT の悪性度とマクロファージ浸潤に着目した腫瘍微小環境との関連性が明らかになった。本章によりイヌの眼球疾患における病態理解の一端がなされ、今後のさらなるイヌの眼球疾患における病態理解、特に眼球の腫瘍微小環境を理解するための一助になると考えられた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導賜りました酪農学園大学獣医病理・免疫学教室 谷山弘行教授、松田一哉准教授、岡本実准教授、平山和子博士に心より感謝申し上げます。また、数多くのウマの検体を提供して下さったウマ産業に従事する獣医師の先生方、腫瘍の検体を提供して下さった酪農学園大学伴侶動物医療学分野 廉澤剛教授、遠藤能史講師、前原誠也准教授、PATHO LABO 大町哲夫博士、学位論文作成にあたり貴重なアドバイスを頂きました獣医解剖・組織学教室 竹花一成教授、獣医生化学教室 横田博教授に深謝致します。最後に、大学院生活で多くのご協力を頂いた酪農学園大学獣医病理・免疫学教室の先輩であります坂口佳菜子博士、溝奥尋子博士、河村芳朗獣医師、同期であります長峰栄路博士、近藤佑美獣医師、同教室の卒業・在学学部生の方々、獣医病理・免疫学教室内外の諸氏に心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Achtstätter, T., Fouquet, B., Rungger-Brändle, E. and Franke, W. W. 1989. Cytokeratin filaments and desmosomes in the epithelioid cells of the perineurial and arachnoid sheaths of some vertebrate species. Differentiation **40**: 129–149.
2. Arenas-Gamboa, A. M. and Mansell, J. 2011. Epithelioid haemangiosarcoma in the ocular tissue of horses. J. Comp. Pathol. **144**: 328–333.
3. Bakker, M. and Kijlstra, A. 1985. The expression of HLA-antigens in the human anterior uvea. Curr. Eye Res. **4**: 599–604.
4. Balazs, E. A., Toth, L. Z., Eckl, E. A. and Mitchell, A. P. 1964. Studies on the structure of the vitreous body. XII. Cytological and histochemical studies on the cortical tissue layer. Exp. Eye Res. **3**: 57–71.
5. Barnett, K., Crispin, S. and Lavach, J. D. 2004. Cornea. pp. 107–147. *In: Equine ophthalmology: an atlas and text, 2nd ed.* (Barnett, K., Crispin, S., Lavach, J. D. and Matthews, A. G. eds.), W. B. Saunders, Edinburgh.
6. Barnett, K., Crispin, S. and Lavach, J. D. 2004. Anterior chamber, aqueous and glaucoma. pp. 149–163. *In: Equine ophthalmology: an atlas and text, 2nd ed.* (Barnett, K., Crispin, S., Lavach, J. D. and Matthews, A. G. eds.), W. B. Saunders, Edinburgh.
7. Barnett, K., Crispin, S. and Lavach, J. D. 2004. Lens. pp. 165–181. *In: Equine ophthalmology: an atlas and text, 2nd ed.* (Barnett, K., Crispin, S., Lavach, J. D. and Matthews, A. G. eds.), W. B. Saunders, Edinburgh.
8. Barnett, K., Crispin, S. and Lavach, J. D. 2004. Iris and ciliary body. pp. 183–199. *In: Equine ophthalmology: an atlas and text, 2nd ed.* (Barnett, K., Crispin, S., Lavach, J. D. and Matthews, A. G. eds.), W. B. Saunders, Edinburgh.
9. Barnett, K., Crispin, S. and Lavach, J. D. 2004. Vitreous. pp. 201–209. *In: Equine ophthalmology: an atlas and text, 2nd ed.* (Barnett, K., Crispin, S., Lavach, J. D. and Matthews, A. G. eds.), W. B. Saunders, Edinburgh.

10. Barnett, K., Crispin, S. and Lavach, J. D. 2004. Fundus. pp. 211–246. *In: Equine ophthalmology: an atlas and text*, 2nd ed. (Barnett, K., Crispin, S., Lavach, J. D. and Matthews, A. G. eds.), W. B. Saunders, Edinburgh.
11. Bergin, I. L., Smedley, R. C., Esplin, D. G., Spangler, W. L. and Kiupel, M. 2011. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet. Pathol.* **48**: 41–53.
12. Berson, D. M. 2007. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Arch.* **454**: 849–855.
13. Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z. M., Messi, M. L., Enikolopov, G. N., Mintz, A. and Delbono, O. 2013. Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. *Stem Cell Res.* **10**: 67–84.
14. Bloom, G. D. and Balazs, E. A. 1965. An electron microscopic study of hyalocytes. *Exp. Eye Res.* **4**: 249–255.
15. Boltz-Nitulescu, G., Grabner, G. and Förster, O. 1979. Macrophage-like properties of human hyalocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **121B**: 223–228.
16. Bozanic, D., Bocina, I. and Saraga-Babic, M. 2006. Involvement of cytoskeletal proteins and growth factor receptors during development of the human eye. *Anat. Embryol. (Berl.)* **211**: 367–377.
17. Bronkhorst, I. H., Ly, L. V., Jordanova, E. S., Vrolijk, J., Versluis, M., Luyten, G. P. and Jager, M. J. 2011. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**: 643–650.
18. Brooks, J. J. 1994. Disorders of soft tissue. pp. 147–229. *In: Diagnostic Surgical Pathology*, 4th ed. (Sternberg, S. S. ed.), Raven Press, New York.
19. Casaroli-Marano, R. P., Pagan, R. and Vilaró, S. 1999. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**: 2062–2072.
20. Chinnery, H. R., McLenachan, S., Humphries, T., Kezic, J. M., Chen, X., Ruitenberg, M.

- J. and McMenamin, P. G. 2012. Accumulation of murine subretinal macrophages: effects of age, pigmentation and CX3CR1. Neurobiol. Aging **33**: 1769–1776.
21. Colitz, C. M., Malarkey, D., Dykstra, M. J., McGahan, M. C. and Davidson, M. G. 2000. Histologic and immunohistochemical characterization of lens capsular plaques in dogs with cataract. Am. J. Vet. Res. **61**: 139–143.
22. Condeelis, J. and Pollard, J. W. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Cell **124**: 263–266.
23. Cooley, P. L., Wyman, M. and Kindig, O. 1990. Pars plicata in equine recurrent uveitis. Vet. Pathol. **27**: 138–140.
24. Cooper, B. J. and Valentine, B. A. 2002. Tumors of muscle. pp. 319–363. *In: Tumors in Domestic Animals*, 4th ed. (Meuten, D. J. ed.), Iowa State Press, Ames.
25. Curtis, R., Barnett, K. C. and Leon, A. 1991. Diseases of the canine posterior segment. pp. 461–525. *In: Veterinary Ophthalmology*, 2nd ed. (Gelatt, K. N. ed.), Lea and Febiger, Philadelphia.
26. Davidson, M. G. 1991. Equine ophthalmology. pp. 576–610. *In: Veterinary Ophthalmology*, 2nd ed. (Gelatt, K. N. ed.), Lea and Febiger, Philadelphia.
27. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. and Taylor, P. R. 2013. Tissue-resident macrophages. Nat. Immunol. **14**: 986–995.
28. Donato, R. 1991. Perspectives in S-100 protein biology. Review article. Cell Calcium **12**: 713–726.
29. Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D. J. and Geczy, C. L. 2013. Functions of S100 proteins. Curr. Mol. Med. **13**: 24–57.
30. Dubielzig, R. R., Ketring, K. L., Mclellan, G. J. and Albert, D. M. 2010. Diseases of the corneal and sclera. pp. 201–243. *In: Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*, Elsevier, Philadelphia.
31. Dubielzig, R. R., Ketring, K. L., Mclellan, G. J. and Albert, D. M. 2010. The uvea. pp.

- 245–322. *In: Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*, Elsevier, Philadelphia.
32. Dubielzig, R. R., Ketring, K. L., Mcllellan, G. J. and Albert, D. M. 2010. Diseases of the lens. pp. 323–347. *In: Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*, Elsevier, Philadelphia.
33. Dubielzig, R. R., Ketring, K. L., Mcllellan, G. J. and Albert, D. M. 2010. The retina. pp. 349–397. *In: Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*, Elsevier, Philadelphia.
34. Dubielzig, R. R., Ketring, K. L., Mcllellan, G. J. and Albert, D. M. 2010. The optic nerve. pp. 399–417. *In: Veterinary Ocular Pathology: A Comparative Review*, Elsevier, Philadelphia.
35. Fabriek, B. O., Dijkstra, C. D. and van den Berg, T. K. 2005. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* **210**: 153–160.
36. Fabriek, B. O., van Bruggen, R., Deng, D. M., Ligtenberg, A. J., Nazmi, K., Schomagel, K., Vloet, R. P., Dijkstra, C. D. and van den Berg, T. K. 2009. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* **113**: 887–892.
37. Foets, B. J., van den Oord, J. J., Desmet, J. J. and Missotten, L. 1990. Cytoskeletal filament typing of human corneal endothelial cells. *Cornea* **9**: 312–317.
38. Foets, B. J., van den Oord, J. J., Engelmann, K. and Missotten, L. 1992. A comparative immunohistochemical study of human corneotrabeular tissue. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **230**: 269–274.
39. Foets, B. J., van den Oord, J. J., Volpes, R. and Missotten, L. 1992. In situ immunohistochemical analysis of cell adhesion molecules on human corneal endothelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* **76**: 205–209.
40. Forrester, J. V., Grierson, I. and Lee, W. R. 1980. Vitreous membrane formation after experimental vitreous haemorrhage. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **212**: 227–242.

41. Fuchs, U., Kivelä, T. and Tarkkanen, A. 1991. Cytoskeleton in normal and reactive human retinal pigment epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **32**: 3178–3186.
42. Garcia, C. M., Kwon, G. P. and Beebe, D. C. 2006. α -Smooth muscle actin is constitutively expressed in the lens epithelial cells of several species. Exp. Eye Res. **83**: 999–1001.
43. Giuliano, E. A., Chappell, R., Fischer, B. and Dubielzig, R. R. 1999. A matched observational study of canine survival with primary intraocular melanocytic neoplasia. Vet. Ophthalmol. **2**: 185–190.
44. Gloor, B. P. 1969. Mitotic activity in the cortical vitreous cells (hyalocytes) after photocoagulation. Invest. Ophthalmol. **8**: 633–646.
45. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. Nat. Rev. Immunol. **3**: 23–35.
46. Guerin, C. J., Anderson, D. H. and Fisher, S. K. 1990. Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **31**: 1474–1482.
47. Haddad, A. and André, J. C. 1998. Hyalocyte-like cells are more numerous in the posterior chamber than they are in the vitreous of the rabbit eye. Exp. Eye Res. **66**: 709–718.
48. Hayashi, K., Sueishi, K., Tanaka, K. and Inomata, H. 1986. Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. **224**: 452–456.
49. Head, K. W., Cullen, J. M., Dubielzig, R. R., Else, R. W. Misdorp, W., Patnaik, A. K., Tateyama, S. and van der Gaag, I. 2002. World Health Organization. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. Washington, DC.
50. Head, K. W., Elase, R. W. and Dubielzig, R. R. 2000. Tumors of the alimentary tract. pp. 401–481. *In*: Tumors of Domestic Animals. 4th ed. (Meuten, D. J. ed.), Iowa State Press, Ames.

51. Herwig, W. C. and Grossniklaus, H. E. 2011. Role of macrophages in uveal melanoma. Expert Rev. Ophthalmol. **6**: 405–407.
52. Heusinkveld, M. and van der Burg, S. H. 2011. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. J. Trans. Med. **9**: 216–228.
53. Hines, M. T. 1984. Immunologically mediated ocular disease in the horse. Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract. **6**: 501–512.
54. Hughes, K. J. 2010. Ocular manifestations of systemic disease in horses. Equine Vet. J. **37**: 89–96.
55. Jacobson, B. 1978. Biosynthesis of hyaluronic acid in the vitreous. V. Studies on a particulate hyalocyte glycosyltransferase. Exp. Eye Res. **27**: 247–258.
56. Jensen, T. O., Schmidt, H., Møller, H. J., Høyer, M., Maniecki, M. B., Sjoegren, P., Christensen, I. J. and Steiniche, T. 2009. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on cancer stage I/II melanoma. J. Clin. Oncol. **27**: 3330–3337.
57. Jirsova, K., Merjava, S., Martincova, R., Gwilliam R., Ebenezer, N. D., Liskova, P. and Filipec, M. 2007. Immunohistochemical characterization of cytokeratin in the abnormal corneal endothelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients. Exp. Eye Res. **84**: 680–686.
58. Joshi, M., Agrawal, S. and Christoforidis, J. B. 2013. Inflammatory mechanisms of idiopathic epiretinal membrane formation. Mediators Inflamm. Article ID: 192582.
59. Kalsow, C. M. and Dwyer, A. E. 1998. Retinal immunopathology in horses with uveitis. Ocular Immunol. Inflamm. **6**: 239–251.
60. Kappe, E. C., Köhler, K., Felbert, I. V., Teifke, J. P., Tóth, J. and Reinacher, M. 2009. Pleomorphic corneal sarcoma resembling malignant peripheral nerve sheath tumor in a horse. Vet. Pathol. **46**: 444–448.
61. Karin, M. 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature

- 441: 431–436.
62. Kasper, M., Stosiek, P. and Lane, B. 1992. Cytokeratin and vimentin heterogeneity in human cornea. Acta Histochem. **93**: 371–381.
63. Kasper, M. and Viebahn, C. 1992. Cytokeratin expression and early lens development. Anat. Embryol. (Berl.) **186**: 285–290.
64. Kawahara, S., Hata, Y., Kita, T., Arita, R., Miura, M., Nakao, S., Mochizuki, Y., Enaida, H., Kagimoto, T., Goto, Y., Hafezi-Moghadam, A. and Ishibashi, T. 2008. Potent inhibition of cicatricial contraction in proliferative vitreoretinal diseases by statins. Diabetes **57**: 2784–2793.
65. Kivelä, T., Fuchs U. and Tarkkanen, A. 1992. Cytoskeleton in neuroectodermally derived epithelial and muscle cells of the human iris and ciliary body. J. Histochem. Cytochem. **40**: 1517–1526.
66. Kivelä, T. and Uusitalo, M. 1998. Structure, development and function of cytoskeleton elements in non-neuronal cells of the human eye. Prog. Retin. Eye Res. **17**: 385–428.
67. Knisely, T. L., Anderson, T. M., Sherwood, M. E., Flotte, T. J., Albert, D. M. and Granstein, R. D. 1991. Morphological and ultrastructural examination of I-A⁺ cells in the murine iris. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **32**: 2423–2431.
68. Kohno, R. I., Hata, Y., Kawahara, S., Kita, T., Arita, R., Mochizuki, Y., Aiello, L. P. and Ishibashi, T. 2009. Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. Br. J. Ophthalmol. **93**: 1020–1026.
69. Komohara, Y., Hirahara J, Horikawa, T., Kawamura, K., Kiyota, E., Sakashita, N., Araki, N. and Takeya, M. 2006. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. J. Histochem. Cytochem. **54**: 763–771.
70. Komohara, Y., Jinushi, M. and Takeya, M. 2014. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. Cancer Sci. **105**: 1–8.
71. Labella, P., Reilly, C. M., Naydan, D. K. and Labella, A. L. 2012. Immunohistochemical

- characteristics of normal canine eyes. Vet. Pathol. **49**: 860–869.
72. Lau, S. K., Chu, P. G. and Weiss, L. M. 2004. CD163: a specific marker of macrophage in paraffin-embedded tissue samples. Am. J. Clin. Pathol. **122**: 794–801.
73. Lazarides, E. and Hubbard, B. D. 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100Å filaments from muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**: 4344–4348.
74. Lazarus, H. S. and Hageman, G. S. 1994. In situ characterization of the human hyalocyte. Arch. Ophthalmol. **112**: 1356–1362.
75. Le Bitous, M. A. and Stamenkovic, I. 2008. Tumor-host interactions: the role of inflammation. Histochem. Cell Biol. **130**: 1079–1090.
76. Leiva, M., Felici, F., Carvalho, A., Ramis, A. and Peña, T. 2013. Benign intraocular teratoid medulloepithelioma causing glaucoma in an 11-year-old Arabian mare. Vet. Ophthalmol. **16**: 297–302.
77. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. **23**: 549–555.
78. Matthews, A. G. 1983. Uveitis in the horse: a review of the aetiological and immunopathological aspects of the disease. Equine Vet. J. **15**(S2): 61–64.
79. McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S. and Ryan, M. T. 2006. 眼と耳 pp. 307–324. 獣医発生学 (谷口和之, 木曾康郎, 佐藤英明 監修), 学窓社, 東京.
80. McMenamin, P. G. 1997. The distribution of immune cells in the uveal tract of the normal eye. Eye **11**: 183–193.
81. McMenamin, P. G. 1999. Dendritic cells and macrophages in the uveal tract of the normal mouse eye. Br. J. Ophthalmol. **83**: 598–604.
82. McMenamin, P. G., Grewe, J. and Holt, P. G. 1994. Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **35**: 3234–3250.

83. McMenamin, P. G., Holthouse, I. and Holt, P. G. 1992. Class II major histocompatibility complex (Ia) antigen-bearing dendritic cells within the iris and ciliary body of the rat eye: distribution, phenotype and relation to retinal microglia. Immunology **77**: 385–393.
84. Meekins, J. M., Eshar, D., Rankin, A. J. and Henningson, J. N. 2015. Clinical and histologic description of ocular anatomy in captive black-tailed prairie dogs (Cynomys ludovicianus). Vet. Ophthalmol. 1–7.
85. Merjava, S., Brejchova, K., Vernon, A., Daniels, J. T. and Jirsove, K. 2011. Cytokeratin 8 is expressed in human corneconjunctival epithelium, particularly in limbal epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **52**: 787–794.
86. Merjava, S., Neuwirth, A., Mandys, V. and Jirsova, K. 2009. Cytokeratins 8 and 18 in adult human corneal endothelium. Exp. Eye Res. **89**: 426–431.
87. Michetti, F., Rende, M., Calogero, G., Dell’Anna, E. and Cocchia, D. 1985. Immunohistochemical detection of S-100 protein in non-nervous structures of the rabbit eye. Brain Res. **332**: 358–360.
88. Michetti, F., Rende, M., Lauriola, L., Stolfi, V., Calogero, G. and Cocchia, D. 1986. Immunohistochemical localization of S-100-containing cells in non-nervous structures of the human eye. Cell Biol. Int. Rep. **10**: 765–773.
89. Millanta, F., Frantini, F., Corazza, M., Castagnaro, M., Zappulli, V. and Poli, A. 2002. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. Res. Vet. Sci. **73**: 45–51.
90. Miller, T. R. and Gelatt, K. N. 1991. Food animal ophthalmology. pp. 611–655. *In*: Veterinary Ophthalmology, 2nd ed. (Gelatt, K. N. ed.), Lea and Febiger, Philadelphia.
91. 溝口史郎. 1984. 感覚器の発生 pp. 65–81. 人体発生学 (山田英智, 橋本一成 編集), 朝倉書店, 東京.
92. Moore, P. F., Hacker, D. V. and Buyukmihci, N. C. 1986. Ocular angiosarcoma in the horse: morphological and immunohistochemical studies. Vet. Pathol. **23**: 240–244.

93. Nasisse, M. P. 1991. Feline ophthalmology. pp. 529–575. *In: Veterinary Ophthalmology*, 2nd ed. (Gelatt, K. N. ed.), Lea and Febiger, Philadelphia.
94. Newsome, D. A., Linsenmayer, T. F. and Trelstad, R. L. 1976. Vitreous body collagen. Evidence for a dual origin from the neural retina and hyalocytes. *J. Cell Biol.* **71**: 59–67.
95. Niederkorn, J. Y. 2002. Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Crit. Rev. Immunol.* **22**: 13–46.
96. Ogawa, K. 2002. Scanning electron microscopic study of hyalocytes in the guinea pig eye. *Arch. Histol. Cytol.* **65**: 263–268.
97. O’Rahilly, R. 1975. The prenatal development of the human eye. *Exp. Eye Res.* **21**: 93–112.
98. Owaribe, K., Kartenbeck, J., Rungger-Brändle, E. and Franke, W. W. 1988. Cytoskeletons of retinal pigment epithelial cells: interspecies differences of expression patterns indicate independence of cell function from the specific complement of cytoskeletal proteins. *Cell Tissue Res.* **254**: 301–315.
99. Qian, B. Z. and Pollard, J. W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**: 39–51.
100. Qiao, H., Hisatomi, T., Sonoda, K. H., Kura, S., Sassa, Y., Kinoshita, S., Nakamura, T., Sakamoto, T. and Ishibashi, T. 2005. The characterization of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *Br. J. Ophthalmol.* **89**: 513–517.
101. Ramos-Vara, J. A., Beissenherz, M. E., Miller, M. A., Johnson, G. C., Pace, L. W., Fard, A. and Kottler, S. J. 2000. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet. Pathol.* **37**: 597–608.
102. Risen, L. A., Binder, P. S. and Nayak, S. K. 1987. Intermediate filaments and their organization in human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**: 1933–1938.
103. Roels, S., Tilmant, K. and Ducatelle, R. 1999. PCNA and Ki67 proliferation markers as

- criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. J. Comp. Pathol. **121**: 13–24.
104. Romeike, A., Brüggmann, M. and Drommer, W. 1998. Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). Vet. Pathol. **35**: 515–526.
105. Rungger-Brandle, E., Conti, A., Leuenberger, P. M. and Rungger, D. 2005. Expression of alpha-smooth muscle actin in lens epithelia from human donors and cataract patients. Exp. Eye Res. **81**: 539–550.
106. Sakamoto, T. 2003. Cell biology of hyalocytes. Nihon Ganka Gakkai Zasshi **107**: 886–882.
107. Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A. C. and Shaw, G. S. 2006. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. Biochem. J. **396**: 201–214.
108. Shamsuddin, A. K., Nirankari, V. S., Purnell, D. M. and Chang, S. H. 1986. Is the corneal posterior cell layer truly endothelial? Ophthalmology **93**: 1298–1303.
109. Shimoyama, Y., Akihara, Y., Kirat, D., Iwano, H., Hirayama, K., Kagawa, Y., Ohmachi, T., Matsuda, K., Okamoto, M., Kadosawa, T., Yokota, H. and Taniyama, H. 2007. Expression of monocarboxylate transporter 1 in oral and ocular canine melanocytic tumors. Vet. Pathol. **44**: 449–457.
110. Shrestha, P., Muramatsu, Y., Kudeken, W., Mori, M., Takai, Y., Ilg, E. C., Schafer, B. W. and Heizmann, C. W. 1998. Localization of Ca(2+)-binding proteins in epithelial tumours of the skin. Virchows Arch. **432**: 53–59.
111. Sica, A. and Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization in vivo veritas. J. Clin. Invest. **122**: 787–795.
112. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. and Allavena, P. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. Eur. J. Cancer. **42**: 717–727.
113. Smedley, R. C., Spangler, W. L., Esplin, D. G., Kitchell, B. E., Bergmen, P. J., Ho, H. Y.,

- Bergin, I. L. and Kiupel, M. 2011. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. Vet. Pathol. **48**: 54–72.
114. Smith, S. H., Goldschmidt, M. H. and McManus, P. M. 2002. A comparative review of melanocytic neoplasms. Vet. Pathol. **39**: 651–678.
115. Snyder, P. W. 2012. Disease of immunology. pp. 242–288. *In*: Pathologic Basis of Veterinary Disease, 5th ed. (Zachary, J. F. and McGavin, M. D. eds.), Elsevier, St. Louis.
116. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. and Allavena, P. 2014. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J. Leukoc. Biol. **7**: 5429–5435.
117. Song, S., Landsbury, A., Dahm, R., Liu, Y., Zhang, Q. and Quinlan, R. A. 2009. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. J. Clin. Invest. **119**: 1837–1848.
118. Spangler, W. L. and Kass, P. H. 2006. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. Vet. Pathol. **43**: 136–149.
119. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu. Rev. Immunol. **9**: 271–296.
120. Streilein, S. J. 2008. Immune regulation and the eye. Trends in Immunol. **29**: 548–554.
121. Szirmai, J. A. and Balazs, E. A. 1958. Studies on the structure of the vitreous body. III. Cells in the cortical layer. AMA Arch. Ophthalmol. **59**: 34–48.
122. Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nishioka, Y., Sone, S. and Kuwano, M. 2000. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . Int. J. Cancer **85**: 182–188.
123. Uehara, M., Imagawa, T. and Kitagawa, H. 1996. Morphological studies of the hyalocytes in the chicken eye: scanning electron microscopy and inflammatory

- response after the intravitreal injection of carbon particles. J. Anat. **188**: 661–669.
124. 上原正人, 石川勉, 谷口和之, 岡野眞臣. 2005. 感觉器 pp. 221–245. 獣医組織学 (日本獣医解剖学会編), 学窓社, 東京.
125. Uusitalo, M. and Kivelä, T. 1995. Development of cytoskeleton in neuroectodermally derived epithelial and muscle cells of the human eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **36**: 2584–2591.
126. Uusitalo, M. and Kivelä, T. 1997. Cell types of secondary cataract: an immunohistochemical analysis with antibodies to cytoskeletal elements and macrophages. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. **235**: 506–511.
127. Vagaja, N. N., Chinnery, H. R., Binz, N., Kezic, J. M., Rakoczy, E. P. and McMennamin, P. G. 2012. Changes in murine hyalocytes are valuable early indicators of ocular disease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **53**: 1445–1451.
128. Varney, M. L., Johansson, S. L. and Singh, R. K. 2005. Tumor-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemoattractant protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. Melanoma Res. **15**: 417–425.
129. Wang, H. M., Kaplan, H. J, Chan, W. C. and Johnson, M. 1987. The distribution and ontogeny of MHC antigens in murine ocular tissue. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **28**: 1383–1389.
130. Wang, Y. C., He, F., Feng, F., Liu, X. W., Dong, G. Y., Qin, H. Y., Hu, X. B., Zheng, M. H., Liang, L., Feng, L., Liang, Y. M. and Han, H. 2010. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. Cancer Res. **70**: 4840–4849.
131. Wilcock, B., Dubielzig, R. R. and Render, J. A. 2002. World Health Organization. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Histological Classification of Ocular and Otic Tumors of Domestic Animals. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. Washington, DC.
132. Wilcock, B. P. 2007. Eye and ear. pp. 459–552. *In*: Jubb, Kennedy, and Palmer's

- Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol I. (Maxie, M. G. ed.), Elsevier Saunders, Philadelphia.
133. Wilcock, B. P. and Peiffer, R. L. Jr. 1986. Morphology and behavior of primary ocular melanocytomas in 91 dogs. Vet. Pathol. **23**: 418–424.
 134. Withrow, S. J. 2001. Cancer of the oral cavity. pp. 305–318. *In*: Small Animal Clinic Oncology. 3rd ed. (Kersey, R. ed.), WB Saunders, Philadelphia.
 135. Xu, H., Chen, M., Manivannan, A., Lois, N. and Forrester, J. V. 2008. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. Aging Cell **7**: 58–68.
 136. Yamate, J., Yoshida, H., Tsukamoto, Y., Ide, M., Kuwamura, M., Ohashi, F., Miyamoto, T., Kotani, T., Sakuma, S. and Takeya, M. 2000. Distribution of cells immunopositive for AM-3K, a novel monoclonal antibody recognizing human macrophages, in normal and diseased tissues of dogs, cats, horses, cattle, pigs, and rabbits. Vet. Pathol. **37**: 168–176.
 137. Young, B., Lowe, J. S., Stevens, A. and Heath, J. W. 2009. 感覚器 pp. 400–425. 機能を中心とした図説組織学 (澤田元, 佐藤宏, 大野伸一, 佐々木克典 訳), 医学書院, 東京.
 138. Yu, H., Kortylewski, M. and Pardoll, D. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. Nat. Rev. Immunol. **7**: 41–51.
 139. Yuan, A., Chen, J. J. and Yang, P. C. 2008. Pathophysiology of tumor-associated macrophages. Adv. Clin. Chem. **45**: 199–223.
 140. Zwaan, J., Wang, L., Garza, A. and Lam, K. W. 1994. Neuron-specific enolase expression during eye development in the chicken embryo. Exp. Eye Res. **58**: 91–97.