

成体豚培養毛様体無色素上皮細胞の細胞特性

唐沢 容子, 沖坂 重邦, 水川 淳, 西川 真平

防衛医科大学校眼科学教室

要 約

目 的：成体豚培養毛様体無色素上皮細胞の細胞特性を調べ、毛様体無色素上皮の反応性増殖である毛様体炎膜と比較検討した。

対象と方法：豚毛様体上皮を培養し、無色素上皮細胞を選択的に単離した。DNA 合成、位相差顕微鏡、透過電子顕微鏡による形態観察、老化随伴 β ガラクトシダーゼ発現について検討した。

結 果：細胞は増殖の接触阻止や上皮の形態的特徴を示さずに増殖した。増殖能の低下とともに老化随伴 β ガラクトシダーゼが発現した。DNA 合成は長期間続いたが、培養後期では細胞分裂の不全が生じ、核の形態異

常や多核細胞、アポトーシスも観察された。

結 論：培養下の無色素上皮細胞における無秩序な増殖と上皮細胞の性質の欠如は、生体内での毛様体炎膜の形成過程や、光凝固・冷凍凝固後の毛様体上皮細胞の増殖と類似していた。培養毛様体上皮細胞の挙動は、毛様体炎膜の形成や治療後の経過を理解する一助となると考えられる。(日眼会誌 109 : 346—354, 2005)

キーワード：培養毛様体無色素上皮細胞, 細胞増殖, 上皮形態学, 老化, 毛様体炎膜

Cellular Characteristics of Cultured Non-pigmented Ciliary Epithelium from Adult Pigs

Yoko Karasawa, Shigekuni Okisaka, Atsushi Mizukawa and Shimpei Nishikawa

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

Abstract

Purpose : To compare the reactive proliferation of non-pigmented ciliary epithelial cells in patients with cyclitis, or after cyclophotocoagulation and cyclocryocoagulation, and the cultured non-pigmented ciliary epithelial cells from adult pigs.

Methods : Porcine ciliary epithelial cells were cultured and non-pigmented ciliary epithelial cells were isolated. Detection of DNA synthesis, morphological observation by a phase contrast microscope and a transmission electron microscope, and staining of senescence-associated β -galactosidase were carried out.

Results : The cells proliferated without showing contact inhibition of growth or reconstitution of epithelial morphology. With a decrease of proliferative activity, the cultured cells expressed senescence-associated β -galactosidase. Although DNA synthesis persisted for a long time, some cells in later culture periods showed morphologically abnormal

nuclei or plural nuclei indicating dysfunction of cell division, or apoptotic features.

Conclusion : The uncontrolled growth and loss of the epithelial nature of non-pigmented ciliary epithelial cells *in vitro* resembles the process of formation of cyclitic membrane and proliferation of ciliary epithelium after cyclophotocoagulation and cyclocryocoagulation in patients. Observatin of the behavior of cultured non-pigment epithelial cells could aid in understanding the mechanism of cyclitic membrane formation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 346—354, 2005)

Key words : Cultured ciliary non-pigmented epithelial cells, Cell proliferation, Epithelial morphology, Senescence, Cyclitic membrane.

別刷請求先 : 359-8513 所沢市並木 3-2 防衛医科大学校眼科学教室 唐沢 容子
(平成 16 年 7 月 12 日受付, 平成 16 年 10 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to : Yoko Karasawa. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College. 3-2 Namiki, Tokorozawa 359-8513, Japan

(Received July 12, 2004 and accepted in revised form October 28, 2004)

I 緒 言

炎症により組織が損傷されると、欠損部を補修するために癒痕組織が形成される。眼内炎による組織損傷後に種々の細胞が関与する反応性増殖が起き、毛様体扁平部、鋸状縁部では、毛様体炎膜が形成される。毛様体炎膜は増殖性の毛様体上皮、グリア細胞、線維芽細胞、新生血管などから構成され、多くは毛様体扁平部の炎症後に形成される^{1)~3)}。毛様体扁平部炎では、色素上皮は増殖する場合と増殖も萎縮も起きない場合があるのに対し、無色素上皮は全例において増殖していた³⁾⁴⁾。

毛様体上皮細胞の増殖は炎症時だけではなく、毛様体光凝固後⁵⁾⁶⁾や毛様体冷凍凝固後⁷⁾にも惹起される。毛様体扁平部の光凝固、冷凍凝固では、毛様体扁平部の色素上皮と無色素上皮がともに傷害される。しかし修復過程において、色素上皮細胞が壊死または萎縮するのに対し、無色素上皮細胞の増殖は著しく、周囲の組織を巻き込んで毛様体炎膜を形成することが報告^{5)~7)}されている。

成体豚の毛様体の、主として扁平部から無色素上皮細胞を単離、培養したところ、形態と増殖に毛様体炎膜中の無色素上皮細胞と類似する点があった。毛様体無色素上皮細胞の培養は毛様体炎膜形成のモデルになり得ると考え、その細胞特性をさらに詳細に観察し、毛様体炎や毛様体光凝固、冷凍凝固後に生ずる毛様体炎膜の組織病理像との類似性を検討した。

II 実験方法

豚毛様体の主として扁平部から毛様体上皮を採取し、培養して無色素上皮細胞以外の細胞を除いた。得られた細胞が無色素上皮であることを免疫細胞化学染色で確認後、形態、増殖能について検討した。

1. 毛様体上皮細胞の採取と培養

食肉用に屠殺された成体豚の眼球を可及的速やかに半

割した。実体顕微鏡下で水晶体を摘出し、鋸状縁で網膜を分離した。毛様体を含む部分から硝子体の大部分を除き、0.04% エチレンジアミン四酢酸(EDTA)液に浸した後、主に毛様体扁平部から残りの硝子体ごと毛様体上皮層を剝離した⁸⁾。扁平部からは色素上皮層と無色素上皮層が結合したまま硝子体とともに剝がれ(図1A)、扁平部からひだ部の移行部分からは色素上皮細胞が一部付着した毛様体無色素上皮層が硝子体に付着して得られた(図1B)。細切後37°Cで1時間0.2% コラゲナーゼ消化した。位相差顕微鏡観察では無色素上皮細胞は数個から数十個の細胞塊を形成したが、色素上皮細胞の多くが破裂し、色素顆粒がコラゲナーゼ液中に放出された。遠心後、細胞をペニシリンストレプトマイシン添加ダルベッコ改変イーグル MEM/ハム F 12(DF 培地, シグマ社)に懸濁した。15% 牛胎児血清(FBS)添加 DF 培地(DF-15%FBS)に細胞懸濁液を重層し、30分静置した。この間に細胞塊は下層に沈み、色素上皮細胞から放出された色素顆粒は大部分が上層にとどまった。下層を遠心して無色素上皮細胞を主とする細胞集団を得、0.05% トリプシン・0.02% EDTA 液で37°C 5分処理した。細胞をDF-15% FBS に懸濁し、プライマリア培養皿(ペクtonディキンソン社)に植えた。色素顆粒を貪食した無色素上皮細胞は色素上皮細胞との判別が困難であるが、細胞を単離する過程で細胞懸濁液を重層後静置し、色素顆粒を含む層を排除することで判別が容易になった。

位相差顕微鏡下で色素を持つ細胞集団や形態的に無色素上皮と異なる細胞を繰り返し剝離し、11日後に0.05% トリプシン・0.02% EDTA 処理して植え継ぎ、DF-15% FBS で培養した。基底膜成分の効果を調べるため、通常の組織培養皿とIV型コラーゲンコート培養皿でラミニン(10 µg/ml)添加の有無を比較した。

2. 免疫細胞化学染色

得られた細胞集団が無色素上皮細胞を主とするものであることを確認するために、免疫細胞化学染色を行っ

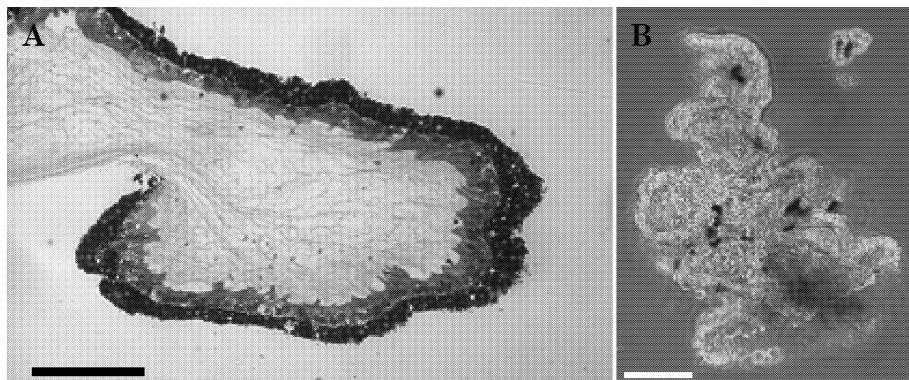


図 1 採取時の毛様体上皮細胞。

A: 色素上皮層(外側の細胞層)と無色素上皮層が結合したまま硝子体に付着して採取された毛様体上皮層の切片の光学顕微鏡像。ヘマトキシリン・エオシン染色。バーは100 µm B: 無色素上皮層に少数の色素上皮細胞が付着した毛様体上皮層。位相差顕微鏡像。バーは100 µm

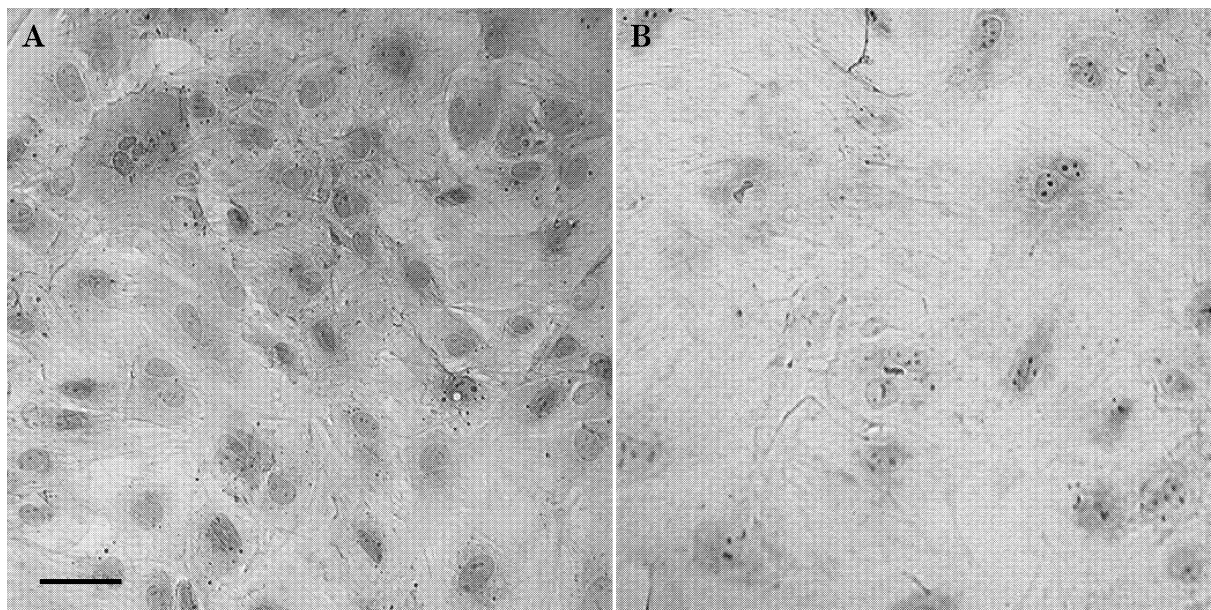


図 2 H^+ , K^+ -ATPase の免疫細胞化学染色.

A: 培養毛様体上皮細胞の染色. B: 一次抗体を不使用の陰性対照. 継代後 6 日目の培養. A ではすべての細胞が染色されている. バーは $50 \mu m$

た. 培養細胞を 10% 中性ホルマリンで固定後, 抗 H^+ , K^+ -ATPase 抗体 HK 12.18⁹⁾(Calbiochem 社), 抗ビメンチン抗体(ケミコン社), 抗グリア線維酸性蛋白(GFAP)抗体(ケミコン社)を一次抗体とし, ベクタステイン ABC パーオキシダーゼキット(ベクター社)を用いた免疫細胞化学染色を行った. ビメンチン, グリア線維酸性蛋白の染色には, それぞれ培養ヒト線維芽細胞, 培養豚網膜を陽性対照とし, 一次抗体を加えないものを陰性対照とした.

3. 透過電子顕微鏡観察

培養細胞は 4% グルタルアルデヒド液(pH 7.2, 0.15 M リン酸緩衝液)で 20 分固定後, 1% グルタルアルデヒド, 2.5% ホルマリン混合液(pH 7.2, 0.15 M リン酸緩衝液)で再固定され, エタノール系列で脱水し, エポン包埋された. 薄切標本を 1% アズール II 染色し, 光学顕微鏡で観察後, 超薄切片をウラン鉛二重染色し透過電子顕微鏡で観察した.

4. DNA 合成細胞の検出

培養液中に $10 \mu M$ のプロモデオキシウリジン(BrdU)を加え所定時間培養した. 中性ホルマリンで固定後, 1 規定塩酸 20 分処理で DNA を変性させた後 0.1 M 硼酸緩衝液で中和し, 抗 BrdU 抗体(Caltag 社)とベクタステイン ABC パーオキシダーゼキットを用いて免疫細胞化学染色した.

5. 老化随伴 β ガラクトシダーゼ染色

培養細胞を 10% 中性ホルマリンで 10 分間固定後, 老化随伴 β ガラクトシダーゼ染色を行った¹⁰⁾. 反応条件はすべて $37^\circ C$ 18 時間とした. BrdU の免疫細胞化学染色との二重染色をする場合は, 老化随伴 β ガラクトシダ

ーゼ染色の反応後免疫細胞化学染色を行った.

6. アポトーシス検出・BrdU 免疫二重染色

BrdU ラベルした細胞をホルマリン固定した. フルオレセイン標識 dUTP と反応させた transferase-mediated deoxyUTP nick-end labeling(TUNEL)を *in situ* 細胞死検出キット(ロシュ社)を用いて行った後, BrdU の免疫染色を行った.

III 結 果

1. 培養細胞の形状と純度

Sakamoto ら⁸⁾は屠殺豚眼から EDTA 処理により毛様体の無色素上皮細胞を単離する方法を報告している. この方法に従って無色素上皮細胞の単離を試みた. 色素上皮細胞層と無色素上皮細胞層が結合したまま採取されたもの(図 1 A)と, 少数の色素上皮細胞が付着した無色素上皮細胞層が採取されたもの(図 1 B)を分けて集め, その後の処理を行ったところ, 色素上皮細胞はほとんどが破裂し, 両者とも最終的には無色素上皮細胞を主とする細胞集団が得られた. 無色素上皮細胞は基質に接着した後, 4~5 日後から活発に増殖を始めた. 色素上皮細胞の増殖をみるため, 色素顆粒を多く含む細胞集団に印を付け, 頻回に顕微鏡観察したが, 色素を多く持つ細胞の増殖はほとんど起きなかった. したがって, 色素上皮細胞は操作中に多くが死滅し, 生き残った細胞もほとんど増殖しないと考え, その後の実験では, 両者を合わせて培養し, 色素顆粒を多く持つ細胞集団, および形態的に無色素上皮細胞と異なる細胞集団を剥離した後に継代培養した.

色素上皮細胞は色素顆粒を放出したり, 細胞分裂によ

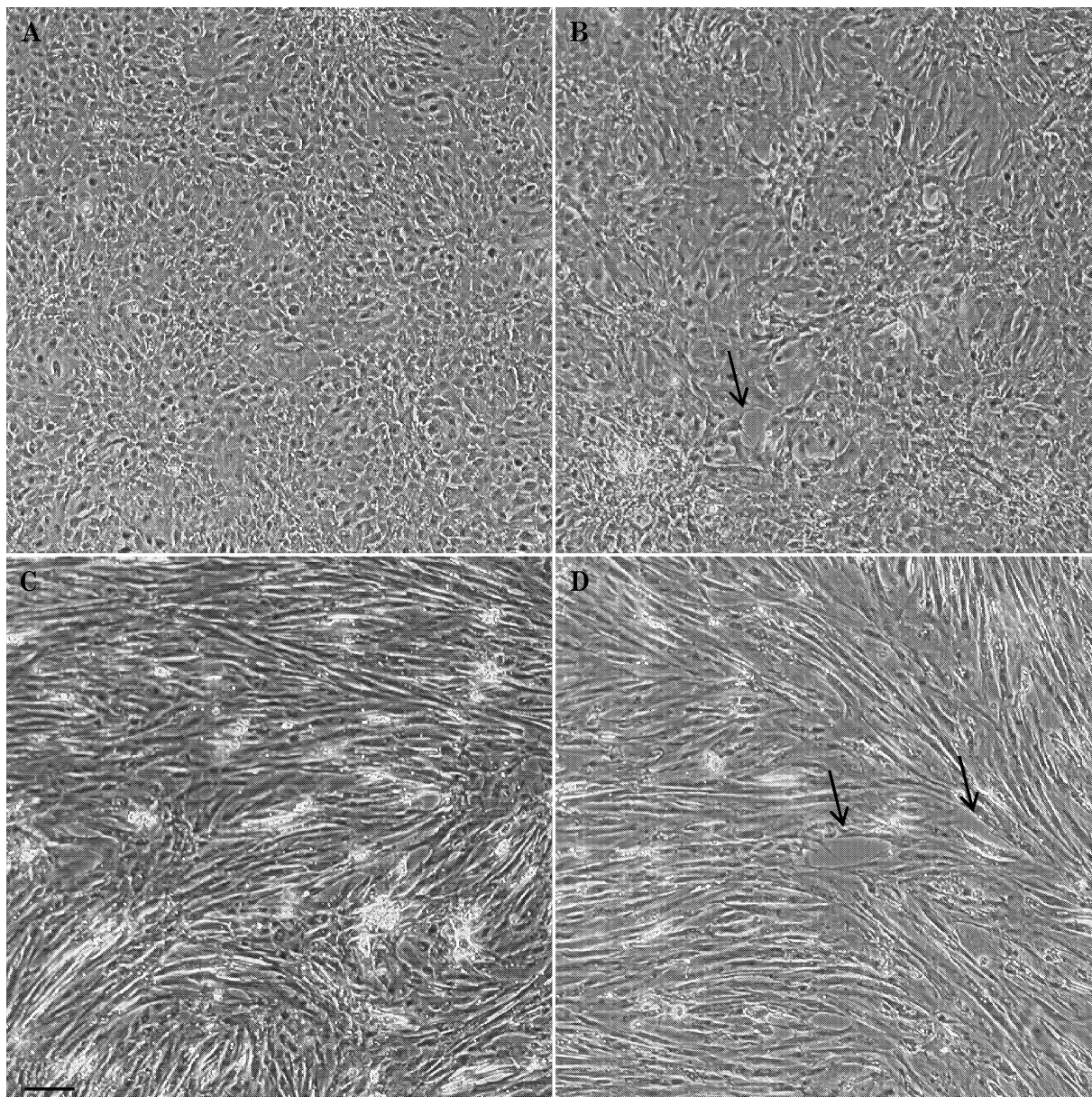


図 3 培養毛様体無色素上皮細胞の位相差顕微鏡像。

培養後 A : 15 日, B : 21 日, C : 48 日, D : 126 日. 個々の細胞は次第に大型化し, 細長くなる. 矢印は培養皿表面が露出している部分. バーは 200 μm

り色素顆粒が希釈されたりすると無色素上皮細胞と区別がつかなくなるため, 無色素上皮細胞に発現し, 色素上皮細胞には発現しない H^+ , K^+ -ATPase の免疫細胞化学染色を行った. 初代培養時にはほとんどの細胞が陽性となり, 混入した少数の色素顆粒を多く含む細胞は陰性であった. 継代培養 6 日後に再度免疫細胞化学染色を行ったが, ほぼすべての細胞が陽性であった(図 2). H^+ , K^+ -ATPase の免疫細胞化学染色は他の培養でも植え継ぎ後行ったが, いずれの場合も, ほぼすべての細胞が染色された.

操作時に混入の可能性があり, 増殖能を持つグリア細胞と線維芽細胞の混入を調べるため, 植え継ぎ後, GFAP とビメンチンに対する免疫細胞化学染色を行った.

GFAP 陽性細胞は皆無であった. ビメンチンの免疫細胞化学染色では, まれに陽性細胞が混入することがあり, その場合は培養日数が経過した細胞に再度免疫細胞化学染色を行い, 陽性細胞が増えていないことを確認した.

2. 植え継ぎ後の細胞の形態

通常培養皿に植えた場合と, IV型コラーゲンコート皿上にラミニンとともに植えたものでは, 後者の方が細胞の増殖が促進され培養基質表面に細胞がよく広がった. ラミニンはコラーゲンコート皿に加えた場合は細胞の広がりを促進したが, 通常の培養皿に添加した場合は無添加の対照より細胞の広がりが抑制された. いずれの培養条件でも個々の細胞の形態には大きな差異はなかった.

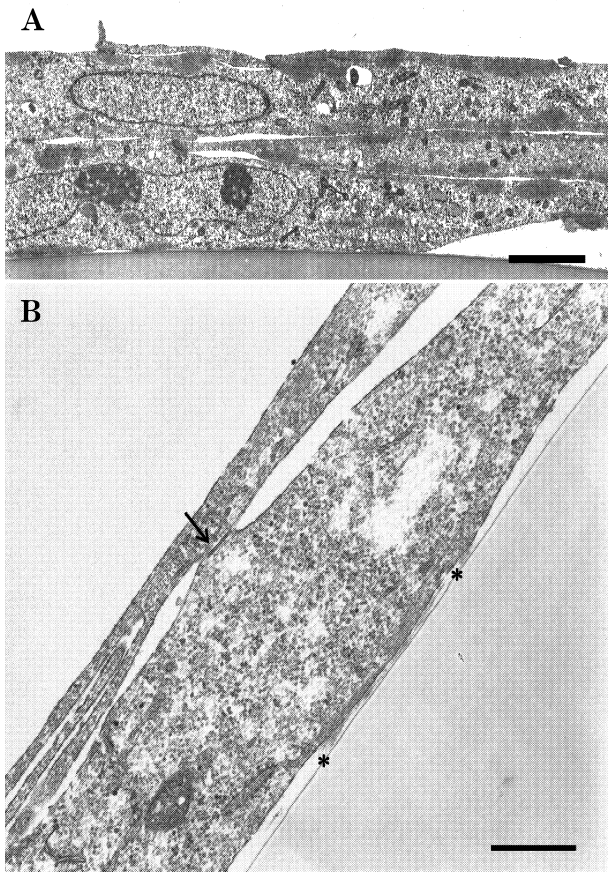


図 4 透過電子顕微鏡写真.

A: 培養毛様体無色素上皮細胞の縦断切片像。極性を持たない細胞が薄く広がって重層化している。基底膜の分泌、細胞間の接着装置の形成は観察されない。バーは3 μm B: まれに基底膜成分の分泌(*), 接着装置(矢印)が観察される。バーは0.5 μm

また、継代培養せずに初代培養時のまま維持した細胞も同様の形態を示した。

細胞層は単層上皮特有の多角形あるいは敷石状の構造をとらず、基質表面を不規則な形をした細胞が覆っていた(図3 A)。基質が露出している付近にも細胞が重層化する部分が見られた(図3 B)。細胞は初めは小型で盛んに増殖したが、次第に紡錘型になり大型化していき、細胞層から脱落する細胞も現れた(図3 C)。培養日数の経過とともに脱落する細胞が増え、基質面の露出も増加したが、培養は4か月以上維持できた(図3 D)。

細胞の垂直切片の透過電子顕微鏡観察では、薄く伸びた細胞が重層していた。基底膜成分の添加の影響はなく、どの条件の培養でも豊富な細胞内小器官を含んでいた。通常の上皮細胞にみられる細胞膜の先端側(apical)、基底側(basal)の分化はみられず、細胞内に微細線維構造が豊富に存在していた(図4 A)。まれに細胞間の結合装置がみられ、基底膜成分は、細胞と培養皿の間、あるいは重層した細胞間に分泌された例がわずかにあるのみであった(図4 B)。

3. 細胞増殖の検討

BrdUを取り込ませることにより、DNA合成細胞を標識した。植え継ぎ翌日から24時間BrdUラベルした培養13日目の培養では、重層化している細胞に陽性核を持つものがあり、細胞は重層化しても増殖が停止しないことが明らかになった(図5)。この時点では、約90%の細胞がBrdUラベルされ、細胞は活発に増殖していることが示された。その後ラベルされる細胞は減少したが、培養開始後75日経過した細胞でもBrdU陽性細胞があり(図6)、細胞増殖は長期間にわたって継続してい

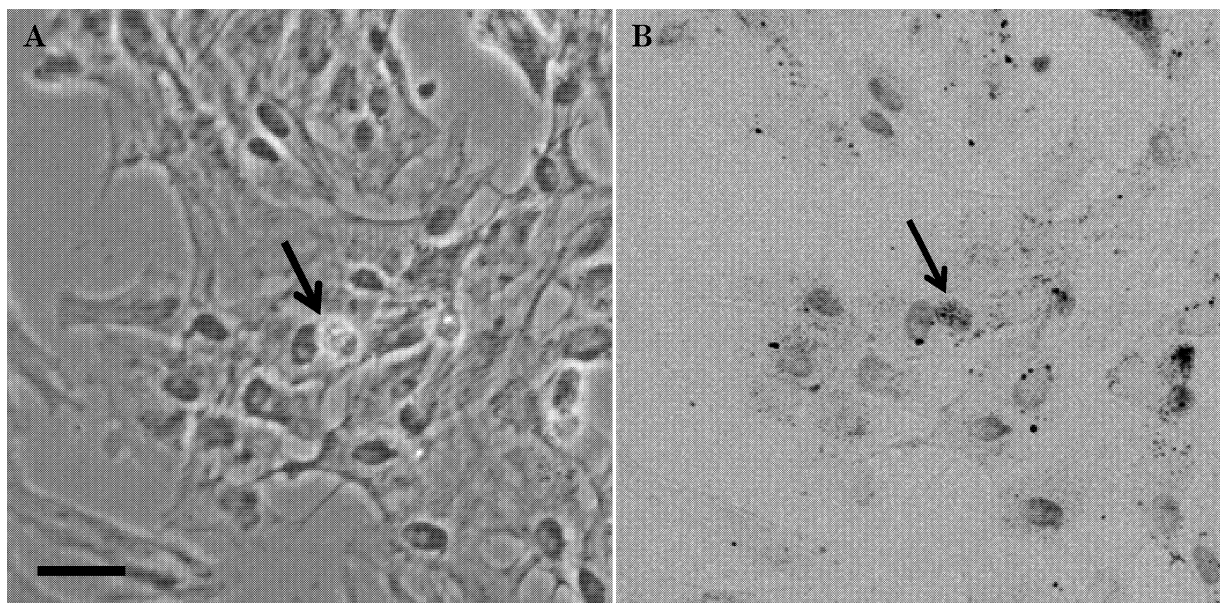


図 5 ブロモデオキシウリジン(BrdU)を取り込ませた細胞の A: 位相差顕微鏡像と B: BrdU の免疫細胞化学染色像.

矢印の重層した細胞が BrdU 陽性核を持つ。バーは50 μm

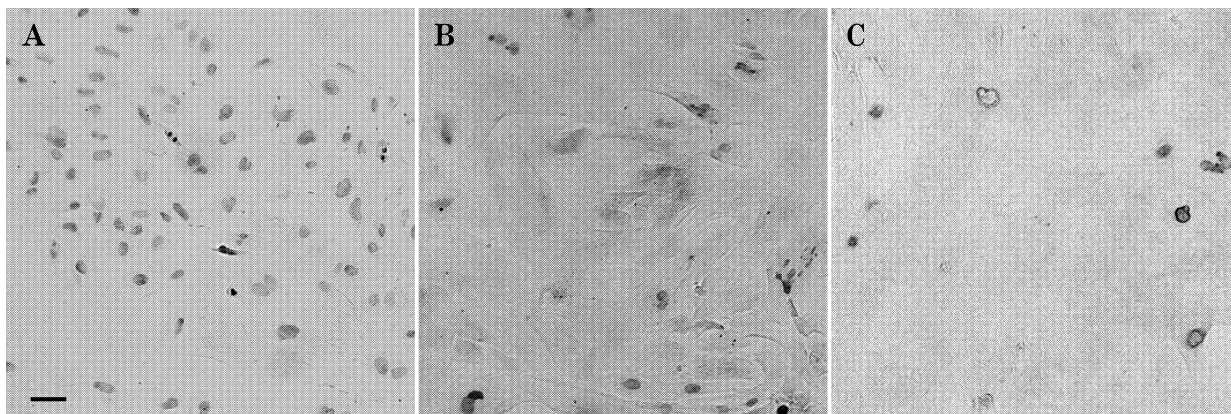


図 6 BrdU の免疫細胞化学染色.

老化随伴 β -ガラクトシダーゼ染色後に BrdU の免疫細胞化学染色を実施. A : 14 日目, 24 時間ラベル後染色. B : 24 日目, C : 75 日目, 72 時間ラベル後染色. A の 24 時間ラベルでは, ほとんどすべての細胞が BrdU 陽性核を持つ. 72 時間ラベル後染色した (B) (C) では, 染色された核を持つ細胞が減少している. バーは 50 μ m

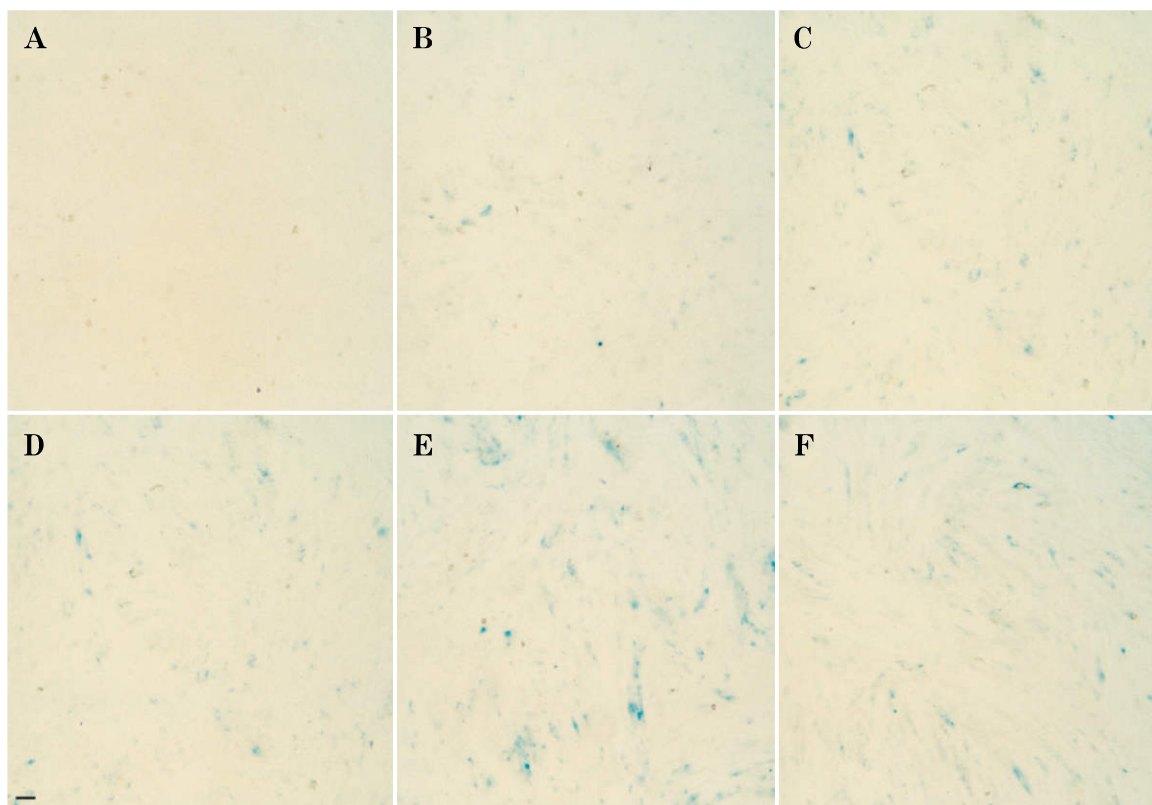


図 7 老化随伴 β ガラクトシダーゼ染色.

培養後 A : 13 日目, B : 20 日目, C : 29 日目, D : 39 日目, E : 50 日目, F : 61 日目. 培養日数の経過とともに次第に青く染色された陽性細胞が増加していくが, E と F では大きな差はない. バーは 100 μ m

ることが明らかになった.

4. 老化の進行

日を追って老化随伴 β -ガラクトシダーゼ染色を行い, 細胞の分裂寿命の変化を調べた(図 7). 増殖が盛んな培養開始後 13 日目では染色される細胞はなく, 18 日目以降から次第に染色細胞が増えていったが, すべての細胞が陽性となることはなく, 培養後 50 日頃以降からは陽

性細胞の割合はほぼ一定となった. 老化随伴 β -ガラクトシダーゼ染色と BrdU の免疫組織化学染色では, 両方に染まる細胞はなかった.

5. 異常核を持つ細胞の出現

培養 13 日目に BrdU 陽性となった細胞核は, 分裂中のものを除いては正常な楕円形をしていた. 老化随伴 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞が出現した培養開始 18 日目

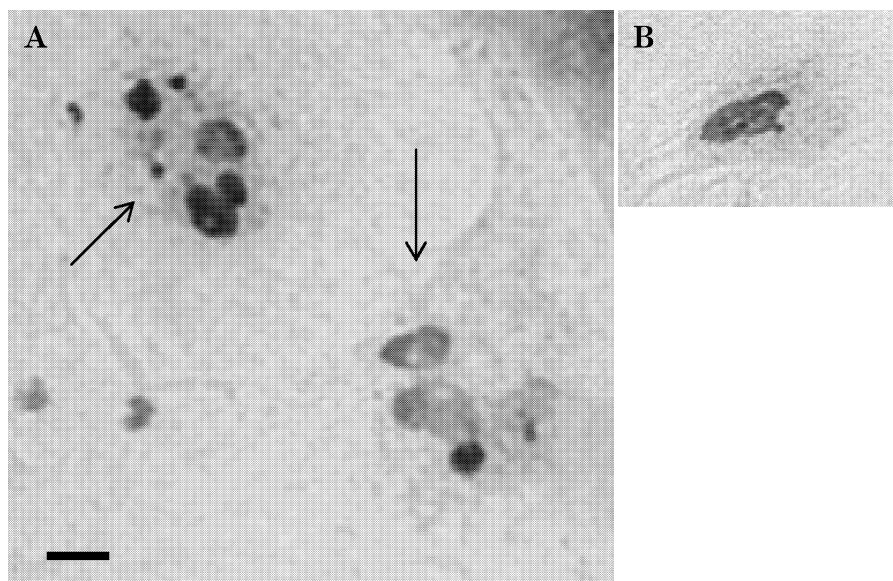


図 8 BrdU 陽性の異常な形態を持つ核.

3 日間 BrdU ラベルした培養 60 日目の培養の BrdU 免疫染色. A: 隣り合っている分断化した核(矢印)を持つ細胞. 右上は老化随伴 β -ガラクトシダーゼ陽性の細胞. B: 通常の大きさの核に加えて微小な核(矢印)が存在している. バーは 10 μ m

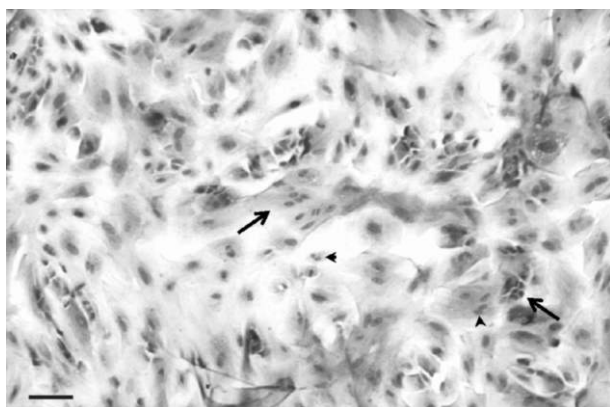


図 9 培養 60 日目のヘマトキシリン染色.

2 核を持つ細胞(矢じり)と 4 個以上の核を持つ細胞(矢印)が存在している. バーは 100 μ m

以降に BrdU ラベルした細胞に異常な形態の BrdU 染色核を持つものが観察された. 図 8 は, 3 日間ラベルした培養 60 日後の培養細胞の BrdU 免疫染色を示す. ほぼ通常の大きさの核に加えて微小な核を持つ細胞と, 断片化した複数の小核を持つ細胞があった. これらの細胞は, 隣り合っていることがあり, DNA 複製後の細胞分裂時に異常な核分裂が起きたことを示唆していた. 同時期の培養細胞のヘマトキシリン染色では, 多核細胞は容易に観察されたが, 分断化した核や微小核を持つ細胞はほとんど観察されなかった(図 9). 多核細胞の核は, 形態的には楕円形をしていた.

BrdU ラベル後に TUNEL と BrdU 免疫染色の二重染色を行った. 微小核を持つ核と断片化した核はすべて TUNEL 陰性であった. TUNEL 陽性細胞には BrdU 陽

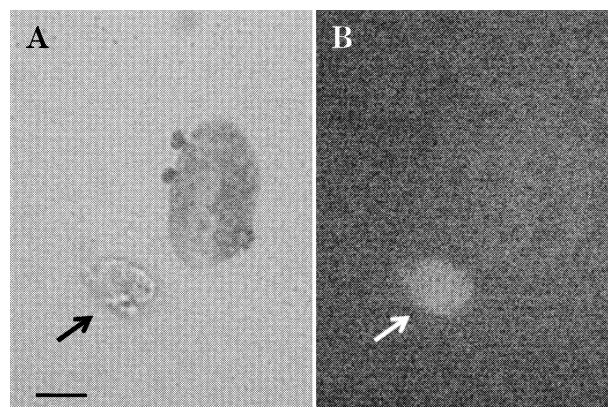


図 10 BrdU ラベル細胞の TUNEL・BrdU 免疫細胞化学二重染色.

A: 明視野, B: 蛍光顕微鏡像. 矢印は transferase-mediated deoxyUTP nick-end labeling (TUNEL) 陽性細胞. 微小核を持つ BrdU 陽性細胞は TUNEL 陰性. バーは 10 μ m

性のものと陰性のものがあつた. 位相差顕微鏡観察では TUNEL 陽性細胞にアポトーシス特有の細胞の萎縮もみられた(図 10).

IV 考 按

毛様体炎膜は, 眼内炎後や冷凍凝固, 光凝固後に形成される. 眼内炎の場合では, 反応はゆっくり進行し, 毛様体実質部の血管が基底膜断裂部を通して色素上皮と無色素上皮の間に侵入し, 毛様体無色素上皮の増殖とともにグリア細胞, 色素上皮の増殖もみられる場合がある¹²⁾⁴⁾. これに反し, 光凝固や冷凍凝固の場合は数秒から数十秒間に強い傷害が起き, 血管も傷害されるために血

管の侵入は起きず、色素上皮は萎縮あるいは消失する。強膜も損傷されるために強膜の線維芽細胞が増殖して無色素上皮細胞とともに毛様体炎膜形成に参加する^{5)~7)}。このように、毛様体炎膜形成の契機となる傷害の違いによって、毛様体炎膜組織を形成する細胞の種類は異なるが、いずれの場合も無色素上皮の増殖が毛様体炎膜形成の基本となっている。正常な無色素上皮は細胞が一層に配列しているのに対し、毛様体炎膜を形成している無色素上皮には重層化や層構造の乱れがみられる。毛様体無色素上皮の細胞特性を詳細に検討することは毛様体炎膜形成の機序を理解するための手がかりになると考えた。

今回の成体豚毛様体上皮細胞の採取条件では、毛様体色素上皮細胞の多くが操作中に破壊され、生き残ったものほとんど増殖しなかった。免疫細胞化学染色で H⁺, K⁺-ATPase 陽性で、GFAP 陽性の細胞はなく、ビメンチンは陰性の細胞が大多数を占めたので、ほぼ純粋な毛様体無色素上皮細胞が得られた。ヒト、サルでの毛様体光凝固、冷凍凝固後の組織像では、一般的に色素上皮の萎縮や消失に対して無色素上皮の増殖が観察されていることから^{5)~7)}、成体の毛様体無色素上皮は色素上皮より機械的傷害に強く、増殖能も高いと考えられた。

培養中の無色素上皮細胞は、培養皿底に接着し広がった後活発に増殖したが、その後増殖は急速に低下した。一般に上皮細胞は細胞間に接着装置を有し、増殖に対して接触阻止を示すが、今回の培養毛様体無色素上皮細胞にはこれらの性質はみられず、細胞は重層しながら増殖していった。上皮細胞の増殖は密着結合の形成により制御されるとする報告¹¹⁾があり、細胞間結合が再構築できないことが無秩序な増殖の一因であると考えられた。

通常、上皮細胞は細胞間の結合装置とともに細胞の先端 (apical) 側と基底 (basal) 側の分化が起きるが、透過電子顕微鏡観察ではこれは全くみられず、細胞の重層化とともに線維芽細胞に類似した形態を示していた。網膜色素上皮細胞、水晶体上皮細胞などの上皮細胞で、培養条件により上皮細胞から他の種類の細胞への化生が起きることが報告¹²⁾¹³⁾されている。その際にも細胞の重層化や細胞極性の喪失などの現象がみられる。今回の無色素上皮細胞では、基底膜成分の分泌と細胞間接着装置の形成がわずかにみられたこと、線維芽細胞のマーカーであるビメンチンは陰性であったことから、この状態は化生には至らないものの、細胞が上皮の性質をほぼ失ったものと考えられた。Quigley¹⁴⁾は毛様体冷凍凝固後の組織病理学検索を行い、毛様体ひだ部で線維芽細胞様の細胞への置き替わりを報告している。培養下での無色素上皮細胞の変化が生体内でも起きるとしたら、この線維芽細胞様細胞は無色素上皮細胞由来である可能性がある。幼弱な動物から採取した毛様体上皮細胞では合成培地の使用や基底膜成分の添加により上皮形態を再構築した報告¹⁵⁾¹⁶⁾があるが、同様の培養条件で培養しても今回の毛

様体上皮は上皮構造を再構築することはなかった。毛様体無色素上皮細胞の培養下で上皮構造を再構成する能力は個体の発生段階によって変化していく可能性がある。成体の毛様体無色素上皮細胞で上皮構造を再構築する性質が欠如していることの結果として、再増殖した毛様体無色素上皮細胞の線維芽細胞様の形態変化と無秩序な増殖が起きると仮定すれば、このことが眼内炎や光凝固、冷凍凝固後に増殖刺激を受けた無色素上皮細胞の増殖、重層化を惹き起こし、毛様体炎膜形成に至る契機となることが考えられる。

細胞増殖の低下の時期に一致して分裂寿命の老化の指標である老化随伴 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞が出現し、分裂寿命の尽きた細胞が出現したことが示された。しかし、長期間の培養でも、すべての細胞が老化随伴 β -ガラクトシダーゼ陽性となることはなく、細胞増殖も低頻度ながら長期間起きていた。一方で細胞層から剝がれて脱落する細胞も観察され、見かけの細胞数は徐々に減少していった。腫瘍細胞では分裂寿命が尽きた細胞は、長期間生き残ると考えられているが¹⁷⁾、今回の場合、老化随伴 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞がそのまま生き残っているのか、あるいは細胞の死滅と新たな陽性細胞の出現が並行して起きているのかは不明である。

DNA 合成が低下した後に BrdU 陽性となった細胞には異常な核を持つものが出現した。これらの細胞のあるものは、隣り合っていることから、有糸分裂の際の染色体分離の異常が考えられる。これらの異常のうち、分断化した核は分裂極が複数形成され、それぞれの極に移動した染色体の周りに核膜が形成されたものであり¹⁸⁾、微小な核を持つものは一部の染色体、あるいは染色体の断片が有糸分裂の際に他の染色体に取り残され、その周りに核膜が形成されたものとされる¹⁹⁾。これらの異常な核を持つ細胞の運命は細胞死に終わることから、この現象は有糸分裂細胞死、あるいは有糸分裂カタストロフと呼ばれる¹⁵⁾。アポトーシスの際にも核の断片化が起きるが、異常核を持つ細胞には細胞の萎縮やアポトーシス小体の形成はなく、顕微鏡観察では核の形態以外は生きている細胞と類似していた。微小核は TUNEL 法で染色されないとする報告¹⁸⁾と染色されるとする報告¹⁹⁾があるが、BrdU 陽性の異常核を持つ細胞はすべて TUNEL 陰性であった。同時期に固定した細胞のヘマトキシリン染色では、異常核を持つ細胞はほとんどなく、有糸分裂細胞死は細胞分裂後早い時期に起きると考えられ、培養後期に脱落していく細胞の少なくとも一部は有糸分裂細胞死によるものと考えられた。一方、細胞が萎縮した TUNEL 陽性の細胞も存在し、アポトーシスによる細胞死も起きていることが示された。

ヘマトキシリン染色では多数の多核細胞がみられた。多核細胞は、核分裂と細胞分裂が同調せず、核分裂のみ起きて細胞分裂が起きないことが原因であり、3 個以上

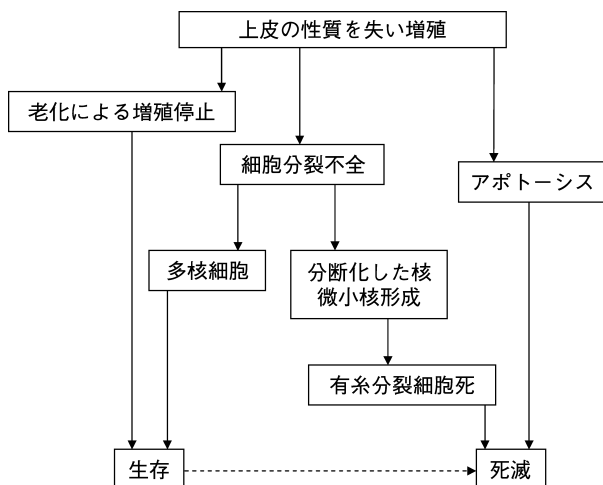


図 11 培養毛様体無色素上皮細胞がたどる経過。

培養下で細胞は上皮の性質を失い増殖する。細胞の一部は老化するまで増殖した後増殖を停止し生き残る。一部の細胞は不完全な細胞分裂を起こす。この時多核細胞となったものは生き残るが、核が分断化したり微小核を生じた細胞は有糸分裂細胞死により死滅する。一方ではアポトーシスにより死滅する細胞もある。

の核を持つ細胞では細胞分裂が起きずに核分裂のみが2回以上起きていと推測される。多核細胞は容易に観察できたことから、異常核を持つ細胞とは異なり長期間生存できると考えられた。

培養下の成体豚毛様体無色素上皮細胞のたどる経過を図 11 に示す。無色素上皮細胞は上皮の性質を失って増殖し、あるものは老化して分裂寿命が尽きた状態で生き残る一方、長期間にわたり増殖し続ける細胞もあった。増殖を続ける細胞では、異常な細胞分裂が起こりやすく、多核細胞は生き残るが、分断した核や微小核を持つ細胞はやがて有糸分裂細胞死により死滅すると考えられた。また、アポトーシスを起こして死ぬ細胞もあった。

眼内では無色素上皮細胞は増殖が制限された状態であり、また他の組織からの直接的、間接的な影響を受けるため培養下と同じ挙動をとることはないが、培養初期に起きる上皮細胞としての性質の喪失と無秩序な増殖は毛様体炎膜形成時の毛様体無色素上皮の挙動を反映していると考えられる。毛様体炎や光凝固・冷凍凝固後に生じる毛様体無色素上皮細胞の増殖の経過を観察することは困難であるが、培養時の細胞と比較することで、病態の理解が進むと考えられる。

文 献

- 1) Chan CC, Fujikawa LS, Rodrigues MM, Stevens G Jr, Nussenblatt RB: Immunohistochemistry and electron microscopy of cyclitic membrane. Report of a case. Arch Ophthalmol: 1040—1045, 1986.
- 2) Folberg R: The eye. In: Spencer WH (Ed): Ophthalmic Pathology, An Atlas and Textbook.

- WB Saunders Co, Philadelphia, 24—25, 1996.
- 3) 沖坂重邦: 房水流出路. 日眼会誌 104: 517—530, 2000.
- 4) Pederson JE, Kenyon KR, Green WR, Maumenee AE: Pathology of pars planitis. Am J Ophthalmol 86: 762—774, 1978.
- 5) 水川 淳, Liu Guo Jing, 沖坂重邦: 連続波 Nd: YAG レーザー毛様体ひだ部光凝固の組織病理学的観察. 日眼会誌 96: 132—145, 1992.
- 6) 沖坂重邦, Liu Guo Jing, 水川 淳: 毛様体ひだ部・扁平部に対する光凝固の比較検討. あたらしい眼科 9: 661—665, 1992.
- 7) 河瀬泰子, 沖坂重邦, 水川 淳, 村上 晶: 人眼および猿眼に対する毛様体冷凍凝固の組織病理学的検討. 日眼会誌 108: 339—346, 2004.
- 8) Sakamoto S, Shichi H: Distribution and induction of alkoxyresorufin O-dealkylases and gamma-glutamyl transpeptidase in porcine ciliary epithelium. J Ocul Pharmacol 6: 211—217, 1990.
- 9) Fain GL, Smolka A, Cilluffo MC, Fain MJ, Lee DA, Brecha NC, et al: Monoclonal antibodies to the H⁺-K⁺ ATPase of gastric mucosa selectively stain the non-pigmented cells of the rabbit ciliary body epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 785—794, 1988.
- 10) Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 92: 9363—9367, 1995.
- 11) Balda MS, Garrett MD, Matter K: The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. J Cell Biol 160: 423—432, 2003.
- 12) Itoh Y, Eguchi G: *In vitro* analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: A unique model system for studying cellular and molecular mechanisms of “transdifferentiation”. Dev Biol 115: 353—362, 1986.
- 13) 矢島保道, 唐沢容子, 沖坂重邦: ウシ水晶体上皮細胞化生とコラーゲンの役割について. 日眼会誌 92: 2110—2119, 1988.
- 14) Quigley HA: Histological and physiological studies of cyclocryotherapy in primate and human eyes. Am J Ophthalmol 82: 722—732, 1976.
- 15) Coca-Prados M, Chatt G: Growth of non-pigmented ciliary epithelial cells in serum-free hormone-supplemented media. Exp Eye Res 43: 617—629, 1986.
- 16) Cilluffo MC, Fain MJ, Fain GL: Tissue culture of rabbit ciliary body epithelial cells on permeable supports. Exp Eye Res 57: 513—526, 1993.
- 17) Roninson IB: Tumor cell senescence in cancer treatment. Cancer Res 63: 2705—2715, 2003.
- 18) Roninson IB, Broude EV, Chang BD: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. Drug Resist Updat 4: 303—313, 2001.
- 19) Paglin S, Delohery T, Erlandson R, Yahalom J: Radiation-induced micronuclei formation in human breast cancer cells: Dependence on serum and cell cycle distribution. Biochem Biophys Res Commun 237: 678—684, 1997.