

培養家鶏胚毛様体上皮細胞における Carbonic Anhydrase 活性の局在 (図8, 表1)

佐久間 修 (広島大学医学部眼科学教室)

Localization of Carbonic Anhydrase Activity in The Cultured Ciliary Epithelia from Chick Embryos

Osamu Sakuma

Department of Ophthalmology, Hiroshima University School of Medicine

要 約

毛様体突起部における房水産生機構に関与すると思われる carbonic anhydrase (CAase) 活性の局在を、培養1週および3週時の家鶏胚毛様体上皮細胞を用いて、電顕酵素組織化学的に検討した。CAase 活性の検出には、Hansson 法を電顕的検出法に改良した Yokota 法を利用した。その結果、培養3週時の色素上皮細胞 (PE) および無色素上皮細胞 (NPE) はともに CAase の酵素活性を保持していた。特に PE の自由表面側の微絨毛に強い CAase の反応沈着物を証明した。対照実験としておこなった CAase の活性阻害剤である sodium acetazolamide を含んだ反応液で処理した培養細胞では、これらの反応沈着物はほとんど消退した。この結果から、CAase 活性阻害剤の作用部位のひとつが毛様体色素上皮細胞にあることが推測された。また、培養毛様体上皮細胞における、apical 側と basal 側での CAase 活性の局在の差も、前回の ACLase 活性の局在の結果と対照的であり、培養細胞における膜特性に関して興味ある点を示した。(日眼 91: 865—871, 1987)

キーワード: carbonic anhydrase, 培養家鶏胚毛様体上皮細胞, 電顕酵素組織化学, 色素上皮細胞, Yokota 法

Abstract

The cytochemical localization of carbonic anhydrase (CAase) activity was demonstrated in cultured ciliary epithelia from chick embryos (Hamburger-Hamilton classification, stage 36, 37). Ciliary pigmented and non-pigmented epithelia (PE and NPE) at the 1st and 3rd week in primary culture were used. For the cytochemical demonstration of CAase, Yokota's method (a modified version of Hansson's method) was used for this study. Control experiments were carried out with sodium acetazolamide (an inhibitor of CAase activity). Under the electron microscope, reaction products of CAase activity were predominantly on the apical cytoplasmic membrane of cultured PE and NPE. These reaction products were particularly marked on the microvilli of PE. In controls, the reaction products were greatly diminished. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 865—871, 1987)

Key words: Carbonic anhydrase, Cultured ciliary epithelia, Electron microscopic histochemistry, Pigmented epithelium, Yokota's method

別刷請求先: 734 広島市南区霞1-2-3 広島大学医学部眼科学教室 佐久間 修

Reprint requests to: Osamu Sakuma, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hiroshima Univ. School of Med.

1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(昭和62年4月22日受付) (Accepted April 22, 1987)

I 緒 言

前回の報告¹⁾で、著者は家鶏胚の毛様体上皮細胞の培養系を用いて、無色素上皮細胞に adenylate cyclase (ACLase) の活性の局在を電顕組織化学的に証明し、かつ培養細胞そのものが、カテコールアミンに対する感受性を保持していることを認めた。しかし、ACLase-cAMP の系だけでなく、毛様体突起部における無色素上皮細胞層および色素上皮細胞層で発現される物質移動の方向性も、房水産生機構を解明する上で重要な問題であると考えられる。特に、エネルギーを用いた水やイオンの能動輸送はその重要な要素である。そこで、今回は、能動輸送に関係する酵素の一つであると考えられている carbonic anhydrase (CAase) 活性の局在について、培養家鶏胚毛様体上皮細胞を用いて電顕組織化学的に証明した。培養毛様体上皮細胞の CAase の活性局在に関する報告は過去に見られない。

II 実験材料および方法

1. 培養方法

既報²⁾のように、毛様体突起部から分離した色素上皮細胞 (PE) と無色素上皮細胞 (NPE) を牛胎児血清 (fetal bovine serum FBS; GIBCO) を10%含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で、1週および3週間培養した (図1に培養3週時の位相差顕微鏡所見を示す)。

2. CAase 活性検出法および透過型電子顕微鏡による観察

Hansson 法³⁾を電顕的方法に改良した Yokota 法⁴⁾によって、CAase 活性の組織化学的検出を行なった。

既報の方法で培養した NPE と PE の培養液を捨てて、0.1M カコジル酸塩緩衝液に溶解した1%グルタルアルデヒドを使用して、4℃で30分間浸漬固定し、その後0.1M カコジル酸塩緩衝液で30分間洗浄する。次に表1に示す A 液と B 液を混合した反応液で、

表 1

A液		
0.1M	CoSO ₄	1.0ml
0.5M	H ₂ SO ₄	6.0ml
0.067M	KH ₂ PO ₄	10.0ml
	ショ糖	1.16g
B液: NaHCO ₃ 0.75g + 蒸留水 40.0ml		
(B液は使用直前に調整する)		

20℃で10~20分間反応させた。対照としては、CAase の活性阻害剤である sodium acetazolamide (SA) を 10⁻⁴M 含む反応液で同様に処理した。反応後、0.1M カコジル酸塩緩衝液で20分間洗浄し、次に硝酸鉛を0.05%含むショ糖液で20℃、20分間浸漬した。その後、1%四酸化オスミウムで4℃、5分間の後固定を行なった後、エタノール系列で脱水し、エポンに包埋した。約2mmの大きさのエポンブロックを作成し、酢酸ウラニルの単染色を施し、日立 HU-12A 型電子顕微鏡で観察した。

III 結 果

培養1週時の PE, NPE では、ともに形質膜の基底側壁陥入および微絨毛の発達は不良であり、反応沈着物は殆ど認められなかった (図2, 3)。

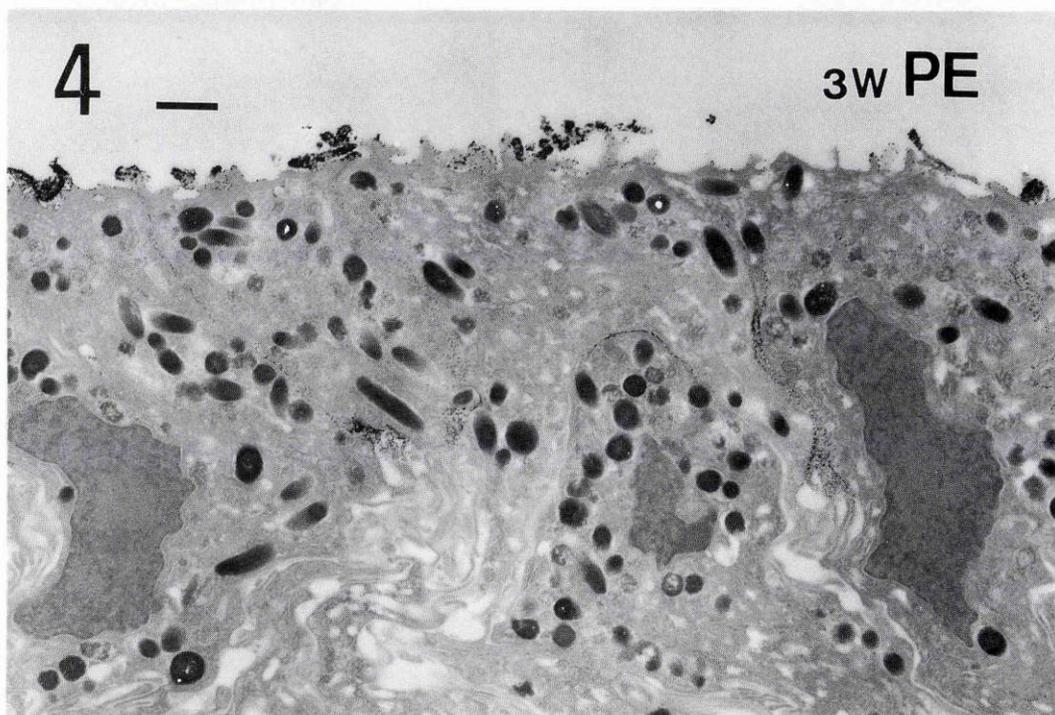
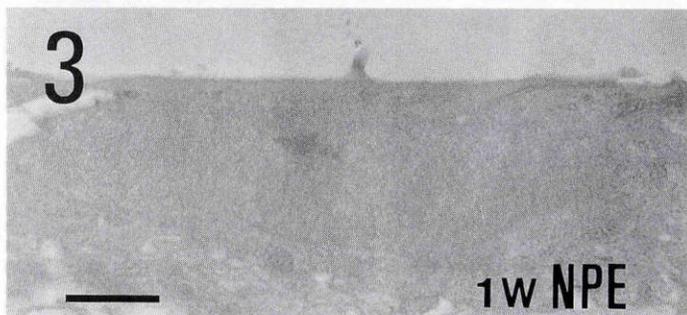
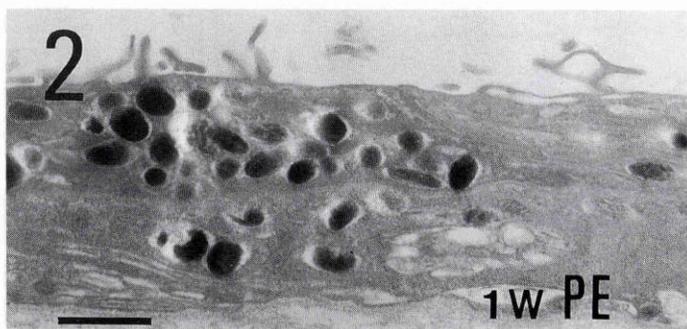
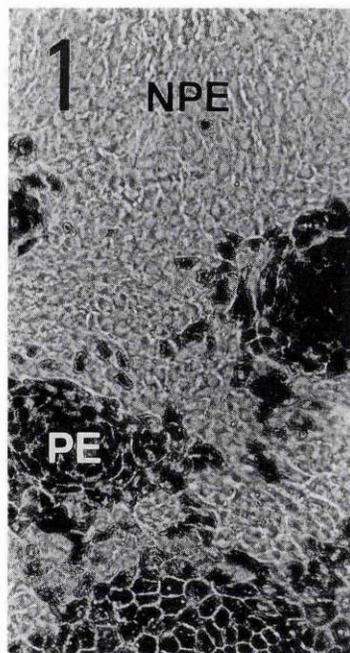
培養3週時の PE では、自由表面側の微絨毛と側壁細胞膜に、反応沈着物が認められたが、基底側壁陥入の部分には、沈着物は認められなかった (図4)。特に、微絨毛の部分に、強い反応沈着物を認めた (図5) が、SA 使用の対照では、これらの反応沈着物は、ほとんど消退した (図6)。

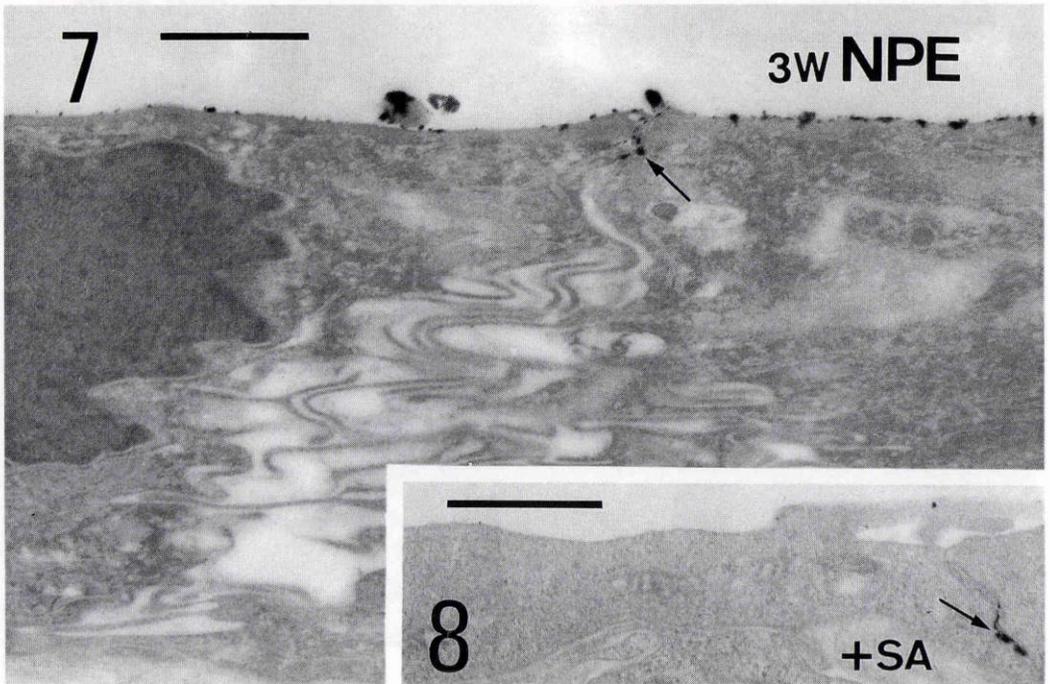
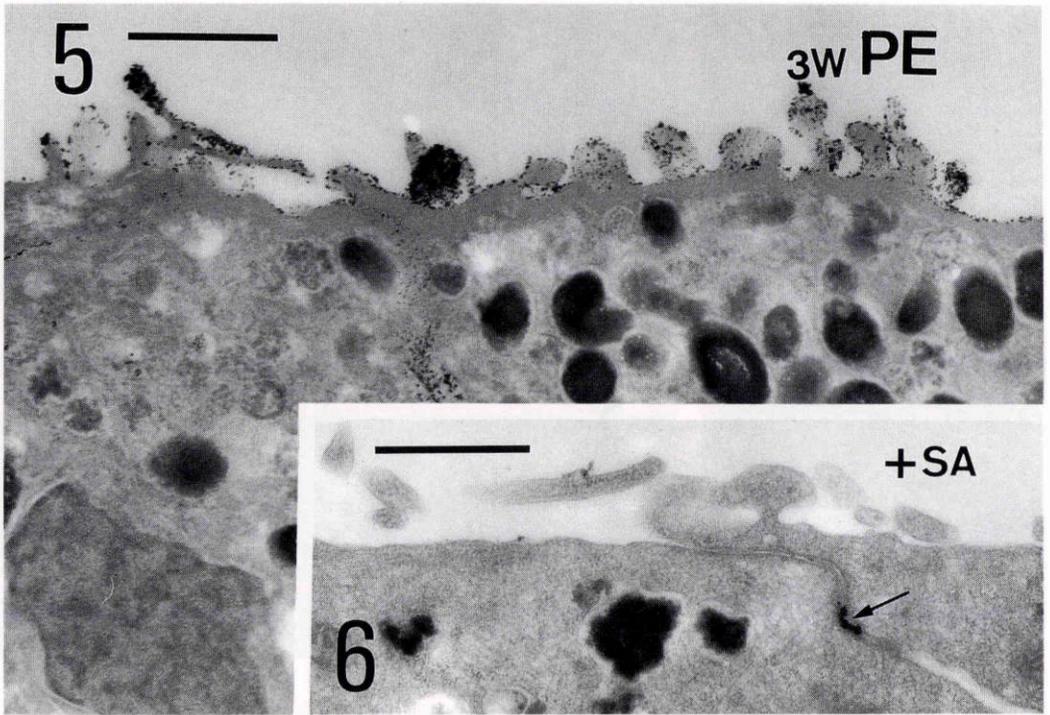
培養3週時の NPE では、自由表面側の形質膜上に反応沈着が認められた (図7)。反応沈着物は、一部、細胞間接合部にも認められたが、発達した基底側壁陥入には認められなかった。SA 使用の対照では、自由表面側の反応沈着物は、ほとんど消退した (図8)。

IV 考 按

CAase は、1932年 Meldrum⁵⁾らにより血液の炭酸脱水反応を促進する酵素として、最初に赤血球に見出された。その後、種々の動物を使って、赤血球以外の多くの組織において、この酵素の存在が証明されている。CAase は $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ という反応を触媒する。この反応の基質である炭酸ガスと水は生体内に豊富に存在しており、生体はこれらの基質を利用していろいろな生理的機能を発現していると考えられる。

CAase の組織化学的検出法は、最初に倉田⁶⁾により報告された。これは、 $\text{Me}(\text{HCO}_3)_2 \rightleftharpoons \text{MeCO}_3 + \text{H}_2\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{MeCO}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ (Me = 2 価金属) の反応を CAase が促進し、不溶性の炭酸塩が本酵素の局在部位に沈着するとの考えにもとづいたものであったが、再現性や特異性に問題があった。その後、倉田法よりも安定な基質液を用い、Häusler⁷⁾は、再現性も高く、SA





による阻害効果の認められる方法を報告した。しかし、この方法も長時間の組織化学反応を要するほか、生化学的知見に合致しない点いくつか指摘された。Häusler法で使用されている Na_2SO_4 の代わりに KH_2SO_4 を用いて、Hansson³⁾は、反応時間の短い特異性の高いCAase活性検出の方法を考案した。現時点では、CAase活性検出の組織化学的方法として、このHansson法が一番信頼がおけるものと考えられている⁸⁾。更にこの方法を応用してYokota⁴⁾は、反応生成物であるコバルト燐酸化合物を燐酸鉛に置換して電顕的観察を行なった。著者も、このYokota⁴⁾の方法に準じてCAaseの組織化学的検出を試みた。しかし、一般の生体組織と比較して培養系を材料として用いた場合、固定液による固定効果が強く出たため、著者はYokota法の固定時間を1/3程度に短縮して、固定をおこなった⁹⁾。特に、1%四酸化オスミウムの後固定を、15~20分以上でおこなうと、鉛化合物が流出し、CAaseの反応が消退することがあったので、この場合は5分間の短時間固定とした。

電顕組織化学的方法を用いて、CAase活性の局在の報告が過去にいくつかされている。Winbornら¹⁰⁾は、ヒトおよびハムスターの胃腺において、壁細胞のミトコンドリアの外表面や、主細胞の小胞体、ミトコンドリアの外表面や基質にCAase活性局在を認めている。同じくWinbornらは、ヒトおよびハムスターの腎近位尿管細胞の刷子縁を形成する微絨毛および先端部の形質膜、ミトコンドリアにもCAaseの活性を認めている。Yokotaら⁴⁾は、マウスの肝細胞において、Disse腔に面した形質膜と毛細胆管の微絨毛に活性を認めた。また、Hansson¹¹⁾はウサギ、ラットおよびヒトの種々の組織において、CAaseの組織化学的検出を試みて、ヒトのエックリン汗腺のstraight segment、ウサギの胆嚢上皮細胞の細胞間隙、そしてラットの近位および遠位尿管上皮細胞の基底陥入にCAaseの高い活性を証明している。

眼組織においてもCAase活性の組織化学的局在の証明が行なわれている。Bhattacharjee¹²⁾は、ウサギの眼の各部位においてCAase活性を検討し、その結果、網膜色素上皮細胞(RPE)と毛様体のNPEで活性が最も高く、その活性量は赤血球よりも高いことを推測した。Korhonenら¹³⁾は、ラットとマウスを用いて、網膜、毛様体突起部、虹彩の色素上皮細胞でもっとも強い反応を認めた。

電顕組織化学的には、Yokota⁴⁾がウサギ角膜内皮細胞

の側壁形質膜上に反応沈着物を認めている。また、松高¹⁵⁾も家兎眼において、CAaseの活性反応を内皮細胞の側壁形質膜上に認め、これが内皮細胞の房房側に存在するNa, K-ATPaseとともに、角膜実質の含水量を一定に保つための能動輸送を行なうionic pumpの中心的役割をなすと考えた。Lütjen-Drecoll¹⁶⁾は、ウサギ眼を用いて、CAase活性の局在を詳細に報告している。角膜では内皮細胞の細胞質、虹彩色素上皮細胞の基底側壁陥入および瞳孔散大筋に面した側の形質膜上に強い反応沈着物を認め、また、網膜色素上皮細胞の基底陥入、側壁形質膜、先端部の微絨毛、Müller細胞の細胞質、視細胞のミトコンドリアなどに反応沈着物を認めている。さらに毛様体上皮細胞のCAase活性局在についても詳細に報告し、毛様体突起部の前部では、NPEの側壁陥入とPEに面した形質膜に強い反応を認め、基底陥入の部分には反応を認めていない。PEでは細胞質に反応を認めたほか、強い反応を基底陥入に認めた。毛様体突起部の後部では、前部に比較して、PEのCAase活性は特に基底陥入の部分で減弱していた。毛様体扁平部でも突起部とはほぼ同様な活性局在を証明した。

このように、これまでの研究の結果からは、in vivoの毛様体上皮細胞のNPEとPEのCAaseの活性局在の所見は一致した結論が得られていない。その原因として、NPEは房水に面しており、一方PEは毛様体実質に接しているという組織学的な環境の相違がある。また、短時間で損傷せずに毛様体上皮を電顕組織化学材料として得ることは容易でない。加えて、組織固定の際に、微妙な固定状態の差が生じ、このために酵素の流出が起こったり、酵素活性に差が生じるという可能性も考えられる。これら困難な点を解決し、一定の結果を得る方法として、培養したNPEとPEを用いて、両細胞の酵素活性を比較することもきわめて意義あることと思われる。また、本実験で、著者が使用した三嶋らの開発した培養PEとNPEは、生体におけるそれぞれの形態と類似の構造を維持していることが認められており、生体におけるPEとNPEの機能も十分反映しているとも考えられる²⁾。そして、前回、著者は、この方法で培養した毛様体上皮細胞を用いて、ACLase活性の電顕組織化学的検索を行ない、ACLase活性が培養細胞で十分保持されており、NPEとPEでその活性に差があることを示した。また、これら培養細胞がカタコールアミンに対する感受性を保持していることも証明した¹⁾。今回は、CAase活性につい

て検討した。その結果、CAase 活性は培養 NPE, PE とともに認め、PE の方が酵素活性が強いように思われた。

CAase 阻害剤の眼圧低下効果に関して、Davson¹⁷⁾ や Green ら¹⁸⁾ は、これが毛様体突起部の CAase 活性を阻害したために生ずるという考えについて、疑問視する報告をしている。いっぽう、Kinsey¹⁹⁾ は、ウサギ眼の血清と後房水の HCO_3^- の濃度を検討し、後房水でその濃度が約30%高いことを証明した。Becker²⁰⁾²¹⁾ は、CAase 阻害剤の SA を投与したウサギの後房水の HCO_3^- の濃度が有意に低下することを認めた。また、ヒトで SA 投与前および後のトノグラフィーによる検討で、SA が房水分泌減少にのみ作用し、房水流出には影響しないことを証明した。このように、CAase 毛様体突起部における房水産生に密接に関与していると考えられる。しかし、現在もおお CAase が NPE および PE の2層の演じる房水分泌機構にどのように関与しているかは殆ど解明されていない。

今回の実験で著者は CAase の強い活性局在を毛様体上皮の PE と NPE の両細胞、特に PE の apical 側に証明した。米村²²⁾ はヒト、サル、ネコ、カエルで、RPE を脈絡膜と共に摘出し、RPE から導出される電位 transepithelial potential (TEP) を記録した。そして、CAase 阻害剤である Diamox[®] を apical 側 (視細胞側) の灌流液のみに与えると TEP は低下したが、basal 側 (脈絡膜側) のみに Diamox[®] を同濃度与えても TEP はほとんど変化がないことを認めた。RPE と発生を同じくする毛様体色素上皮細胞においても、Diamox[®] に対するこのような電気的応答が apical 側に端を発する可能性は高いと考えられる。もちろん、培養系が、生体と同様の電気生理学的性質を有するか否かは不明である。また、酵素活性の局在に関しても、生体と培養系で細胞極性が異なり、生体と異なる局在を示す可能性も否定できない。しかし ACLase が培養 NPE の基底側に、CAase が特に培養 PE の先端側にその活性を強くもつという所見は、培養細胞における膜特性に関して興味ある所見であると思われる。

稿を終るに臨み、ご校閲を賜った調枝寛治教授、ご指導、ご教示いただいた小野秀幸先生、三嶋 弘助教授に深謝致します。

本論文の一部は、第90回日本眼科学会総会 (四日市市、1986) において発表した。本研究は、文部省科学研究費 59570752 および 60771406 の援助を受けた。

写真説明

略語説明

PE: pigmented epithelium

NPE: non-pigmented epithelium

+SA: sodium acetazolamide で処理

図1 培養3週時の位相差顕微鏡写真 (×100)

PE は小型多角形の黒褐色の細胞集団を形成する。NPE は PE に比較して、やや小型で不整形を呈し、一部では隣接する NPE との間に間隙が観察される細胞集団を形成する。

図2~8 透過型電子顕微鏡写真 (bar は、1.0 μm を示す。)

図2, 3 培養1週時の PE (図2) と NPE (図3)。両細胞ともに微絨毛および基底側壁陥入の発達が不良で、CAase の反応沈着物とはほとんど見られない。(図2, 3 ×12,000)

図4 培養3週時の PE。微絨毛及び基底側壁陥入の発達が認められ、CAase の反応沈着物は、自由表面側の微絨毛に強く認められる。反応沈着物は、側壁細胞膜にも認められるが、基底側壁陥入の部分には認められない。(×8,500)

図5 培養3週時の PE の自由表面側の拡大像。(×20,000)

図6 sodium acetazolamide で処理した培養3週時の PE。反応沈着物は、ほとんど消退している。一部、細胞間接合部 (矢印) にわずかの沈着物が残る。(×20,000)

図7 培養3週時の NPE。基底側壁陥入の発達が認められる。CAase の反応沈着物は、自由表面側の形質膜と細胞間接合部 (矢印) に認められるが、その程度は PE のそれらに比して弱い。基底側壁陥入の部分には反応沈着物は認められない。(×20,000)

図8 sodium acetazolamide で処理した培養3週時の NPE。反応沈着物は、ほとんど消退している。一部、細胞間接合部 (矢印) にわずかの沈着物が残る。(×20,000)

文 献

- 1) 佐久間修, 小野秀幸, 三嶋 弘: 培養家鶏胚毛様体上皮細胞における Adenylate Cyclase 活性の局在。日眼 90: 1120-1126, 1986.
- 2) 三嶋 弘, 小野秀幸, 佐久間修他: 毛様体上皮細胞 (CE) の培養とその応用。The Latest Medical Book「眼科領域における最新の進歩」, 東京, 医学教育出版社, 346-357, 1985.
- 3) Hansson HPJ: Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. Histochemie 11: 112-128, 1967.
- 4) Yokota S: Electron microscopic demonstration of carbonic anhydrase activity in mouse liver cells. Histochemie 19: 255-261, 1969.
- 5) Meldrum NU, Roughton FJW: Some prop-

- erties of carbonic anhydrase, the CO₂ enzyme present in blood. *J Physiol (Lond)* 75: 15-16, 1932.
- 6) **Kurata Y**: Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. *Stain Technol* 28: 231-233, 1953.
- 7) **Häusler G**: Zur Technik und Spezifität des histochemischen Carboanhydrasen nachweises in Modellversuch und in Gewebesschnitten von Ratteniere. *Histochemie* 1: 29-47, 1958.
- 8) **菅井尚則**: Carbonic Anhydrase. 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学1986, 学際企画, 東京, 39-50, 1986.
- 9) **荒木正介**: 培養網膜細胞の組織化学. 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学1986, 学際企画, 東京, 95-107, 1986.
- 10) **Winborn WB, Seeling LL, Girard CM**: Variation in the pattern of carbonic anhydrase activity in the cells of the gastric glands. *Histochemistry* 39: 289-300, 1974.
- 11) **Hansson HPJ**: Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in some epithelia noted for active transport. *Acta Physiol Scand* 73: 427-434, 1968.
- 12) **Bhattacharjee P**: Distribution of carbonic anhydrase in the rabbit eye as demonstrated histochemically. *Exp Eye Res* 12: 356-359, 1971.
- 13) **Korhonen E, Korhonen LK**: Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in the eyes of rat and mouse. *Acta Ophthalmol* 43: 475-481, 1965.
- 14) **Yokota S, Waller WK**: Electron microscopic localization of carbonic anhydrase (CA) activity in rabbit cornea. *Albrecht v Graefes Arch Klin Ophthalmol* 145-152, 1975.
- 15) **松高 久**: Anoxia の家兎角膜に及ぼす影響について—Na, K-ATPase と Carbonic Anhydrase の電頭酵素組織化学による活性の局在と Anoxia での経時的变化について—. *眼紀* 36: 38-51, 1985.
- 16) **Lütjen-Drecoll E, Lonnerholm G**: Carbonic anhydrase distribution in the rabbit eye by light and electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 782-797, 1981.
- 17) **Davson H**: In *The Eye*, Vol 1, London, Academic Press, 167-170, 1959.
- 18) **Green A, Bocher CA, Calnan FA, et al**: Carbonic anhydrase and the maintenance of intraocular tension. *Arch Ophthalmol* 53: 463-471, 1955.
- 19) **Kinsey VE**: Comparative chemistry of aqueous humor in posterior and anterior chambers of rabbit eye. *Arch Ophthalmol* 50: 401-417, 1950.
- 20) **Becker B**: The effects of the carbonic anhydrase inhibitor, Acetazolamide, on the composition of the aqueous humor. *Am J Ophthalmol* 40: 129-136, 1955.
- 21) **Becker B**: The mechanism of the fall in intraocular pressure induced by the carbonic anhydrase inhibitor. *Diamox Am J Ophthalmol* 39: 177-183, 1955.
- 22) **米村大蔵**: 電気生理学的手法による網膜層別機能検査, とくに網膜色素上皮の薬物誘発応答. *眼紀* 36: 672-681, 1985.

(第90回日眼総会原著)