

## 網膜色素上皮細胞の反応様式

### 1. 貪食—表面性状の異なる異物に対する貪食作用 (図3)

緒方奈保子・金井 清和  
大熊 紘・宇山 昌延 (関西医科大学眼科学教室)

## Part 1. Phagocytosis in the Retinal Pigment Epithelium of Polystyrene Particles with Different Surface Characteristics

Nahoko Ogata, Kiyokazu Kanai, Hiroshi Ohkuma and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

### 要 約

白色ラットの網膜下腔に表面性状の異なる3種類のポリスチレン小球, すなわち負荷電, 正荷電, 親水性小球を経強膜的に注入し, 小球の表面性状の差が網膜色素上皮細胞の貪食に及ぼす影響を観察した。負荷電の小球は注入6時間後, 親水性の小球は24時間後, 正荷電の小球は48時間後に網膜色素上皮に貪食され, 小球の表面性状を変えると貪食開始時間に差がみられた。しかし, 48時間後には, どの種類の小球もすべて網膜色素上皮に貪食された。小球表面の物理化学的性状と網膜下腔の物質, 特に粘性多糖類との相互関係が, 貪食開始時間に大きな差をもたらしたと思われた。また, 貪食された小球は網膜色素上皮細胞の胞体内に留まり, Bruch膜側への exocytosis は認められなかった。(日眼 92:1406—1413, 1988)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 貪食, 微細構造, ラテックス小球, 網膜

### Abstract

We previously reported that retinal pigment epithelial cells (RPE) showed different phagocytic activity according to the physico-chemical characteristics of the surface of polystyrene particles. Particles (3 $\mu$ m in diameter) with three different surface characteristics were employed: negative charged particles, positive charged particles and hydrophilic particles. They were injected separately into the subretinal space in albino rats. Negative charged particle began to be phagocytized by RPE at 6 hours, hydrophilic particles by 24 hours, and positive charged particles by 48 hours. These findings suggested that the onset time of phagocytosis differed according to the physico-chemical properties of the surface of the particles. Phagocytized particles remained in RPE and exocytosis of particles in RPE towards Bruch's membrane was not observed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:1406—1413, 1988)

Key words: Retinal pigment epithelium, Phagocytosis, Fine structure, Particles, Retina

## I 緒 言

網膜色素上皮は, 光の吸収, ビタミンAの貯蔵と再生, 脈絡膜血管から網膜への栄養物質の輸送, 視細胞外節をとりまいてる粘性多糖類の生成など種々の機

能を営んでおり<sup>1)2)</sup>, また視細胞外節を貪食し消化する働きをもち<sup>3)~6)</sup>, 網膜内の代謝産物を吸収し, Bruch膜側へ排出することがわかっている<sup>3)~7)</sup>. さらに, 網膜色素上皮の貪食作用には選択性があることが知られている<sup>8)~12)</sup>. また視細胞外節の貪食不良が網膜変性症の発

別刷請求先: 570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 緒方奈保子 (昭和63年5月23日受付)

Reprint requests to: Nahoko Ogata, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.

1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Accepted for publication May 23, 1988)

病に関連している可能性がある<sup>13)</sup>。網膜色素上皮細胞は増殖して網膜下腔へ macrophage 様になって遊走し<sup>14)~16)</sup>、線維芽細胞様細胞となることが示され<sup>17)</sup>、網膜色素上皮の病的反応が網膜病変のあるものに大きく関与している<sup>11)13)</sup>。

食食に影響を及ぼす被貪食物の物理化学的性状には静電的荷電状態(負荷電と正荷電)<sup>18)19)</sup>、親水性、疎水性がある<sup>20)</sup>。我々は先に化学的性状の明らかなポリスチレン小球をラットの網膜下腔に注入し、小球表面の物理化学的性状を変えると色素上皮の食食に大きい差のあることを見出した<sup>21)~24)</sup>。今回は、網膜色素上皮の食食に著明な差がみられた3種類の異物、すなわち表面性状を負荷電、正荷電、または親水性にした小球を用い、網膜色素上皮に食食されやすい異物と、食食されにくい異物が網膜下腔にとどまっ場合のその後の食食状態について報告する。

## II 実験方法

### 1. 実験動物

実験動物として体重300~400gのWistar系の白色ラットを用いた。

### 2. ポリスチレン小球の表面処理

前報に記した方法<sup>22)23)25)</sup>によって小球の表面性状を負荷電、正荷電、及び親水性にした。

### 3. 網膜下腔注入法

前報<sup>20)</sup>に記した方法によってこれらの小球浮遊液0.05mlを網膜下腔に注入した。注入直後に眼底検査を行って、流入部から後極部にかけて胞状網膜剝離が形成されたのを確認し、注入液が正しく網膜下腔に注入されたものを実験に用いた。著しい網膜下出血や硝子体出血などが発生した眼球は除外した。

### 4. 試料作成方法

注入後6時間、24時間、48時間に眼球摘出を行い、直ちに2.5%グルタルアルデヒド(0.1M 磷酸緩衝液)にて3~24時間固定後、角膜、虹彩、水晶体を除去し、実体顕微鏡下に網膜剝離の範囲、ポリスチレン小球の分布状態、刺入部位、出血の有無、程度を観察し、注入による障害の少ない部位で、小球の分布状態が一定でよく注入されている部位を切り出した。細切した切片は1%四酸化オスミウムにて後固定後、漸増アルコール系列にて脱水、プロピレンオキシドに置換後、エボン包埋し光顕、電顕用観察に供した。

透過型電顕による観察には酢酸ウランと硝酸鉛による二重染色を行い日立HU-12型、H-500型電子顕微

鏡にて観察した。

## III 結果

網膜下腔へ注入された部位を見ると、注入後6時間では、負荷電の小球は網膜色素上皮によく食食されていたが、正荷電、親水性の小球はほとんど食食されていなかった(図1a, b, c)。注入後24時間になると、6時間で食食されなかった親水性小球は、色素上皮によく食食されていた。一方、正荷電小球は24時間後でも殆ど食食されないままであった(図2a, b, c)。しかし、注入48時間後には正荷電の小球も色素上皮に食食されていた(図3a, b, c)。

この様に負荷電の小球は6時間で、親水性の小球は24時間で、正荷電の小球は48時間で食食され、小球の表面性状を変えると食食開始時間には差が認められた。しかし、48時間後にはどの小球もすべて網膜色素上皮に食食された(図1~3)。

全経過を通じて、食食された小球は胞体内にとどまりBruch膜側への放出はみられなかった。

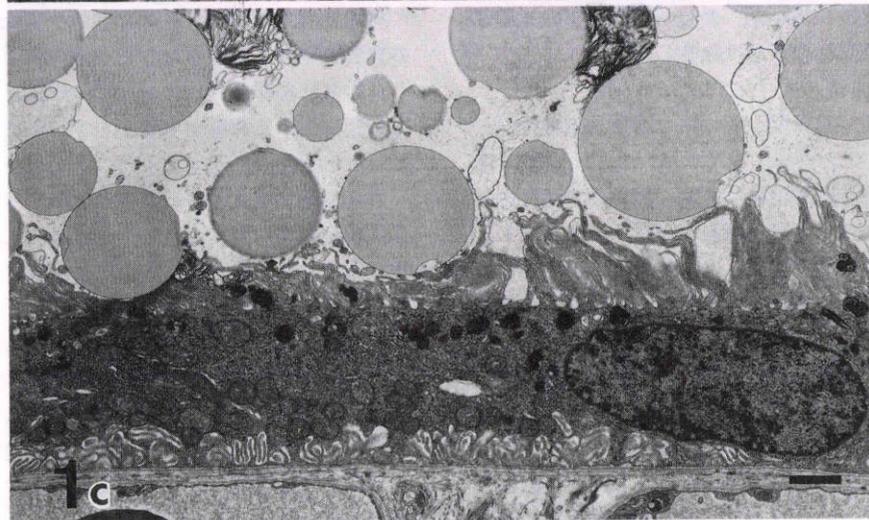
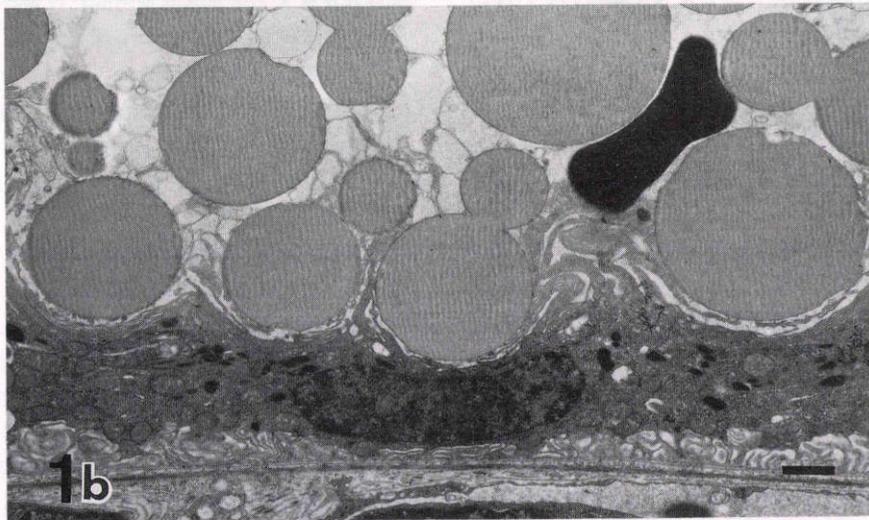
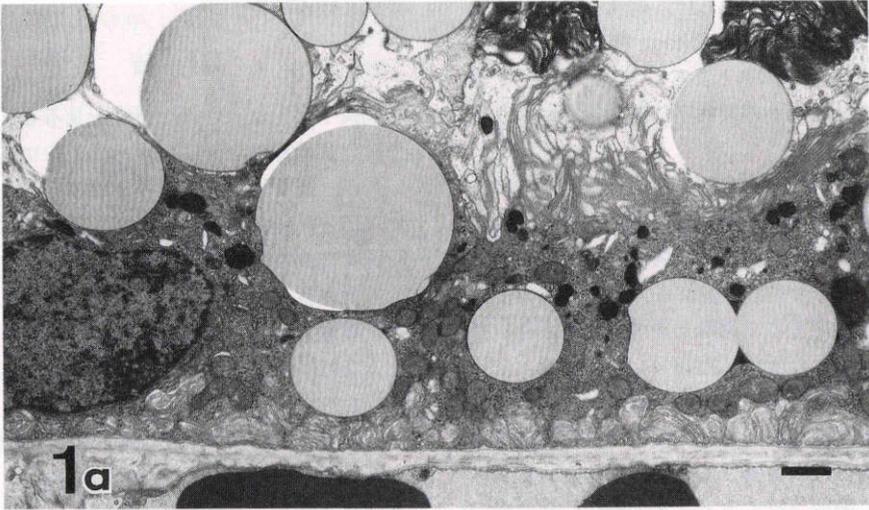
## IV 考 按

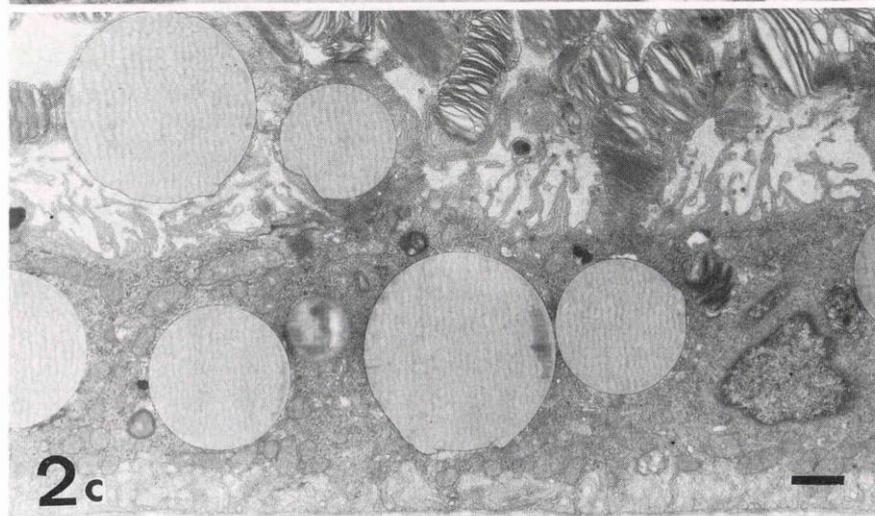
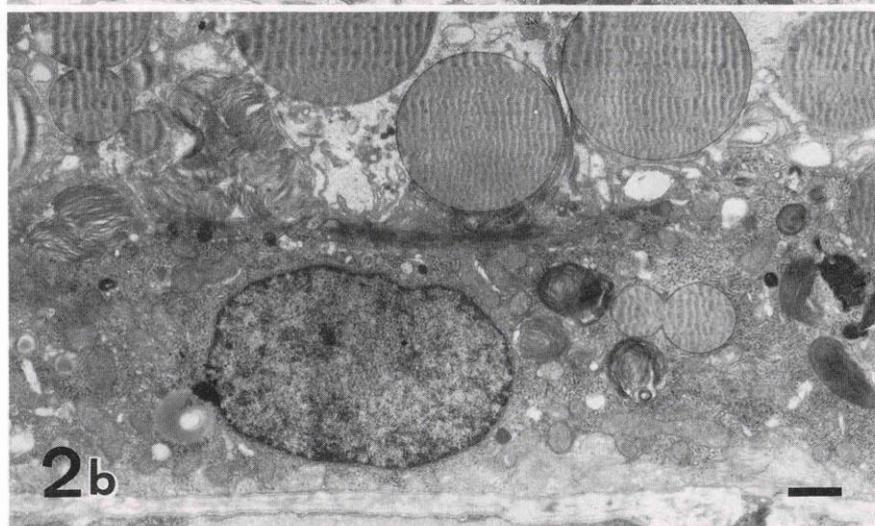
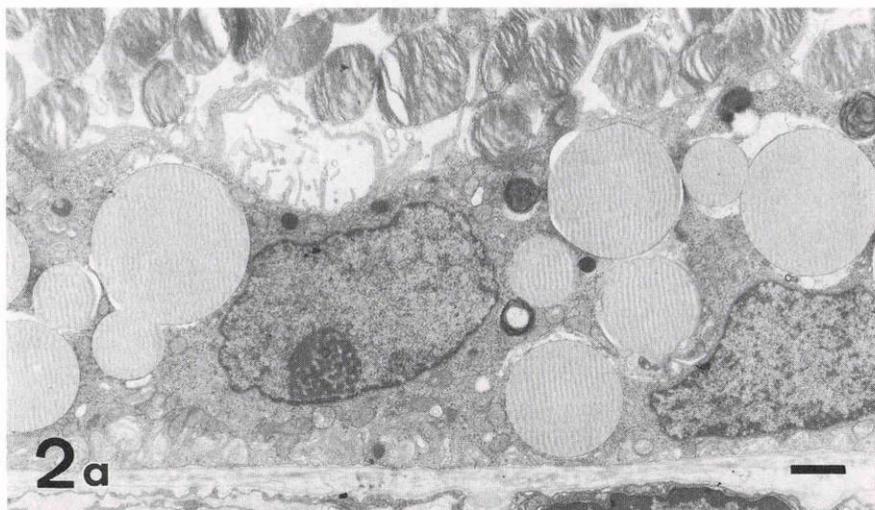
Hollyfield<sup>8)9)</sup>の報告以来、正常の網膜色素上皮の食食に選択性があることが確認されており<sup>12)</sup>、異なった糖をcoatingしたlatex粒子の実験では、網膜色素上皮が異物を認識し、選択的に食食する能力のあることが示されている<sup>11)</sup>。一般の食食細胞でも抗体・補体を介さない食食には被貪食物表面の糖と細胞表面のレクチン様レセプターの結合<sup>26)~29)</sup>や、異物の荷電状態<sup>18)19)</sup>、親水性・疎水性が関与する<sup>20)</sup>との報告がある。

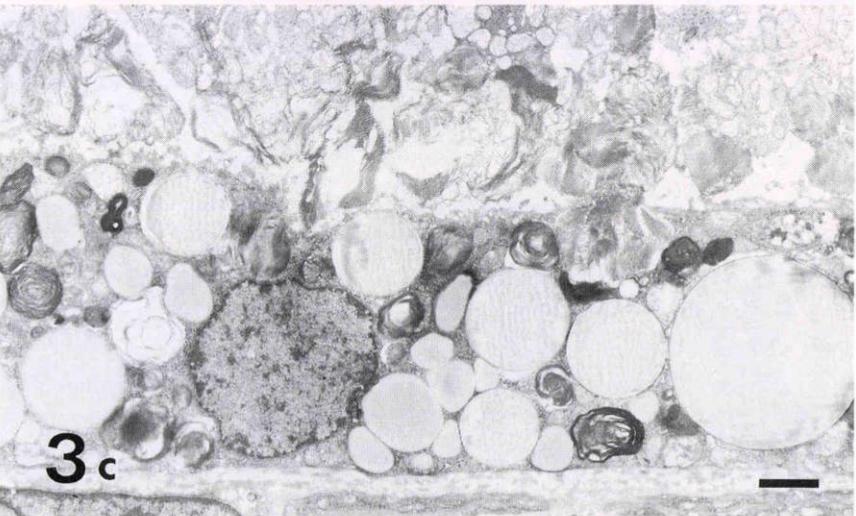
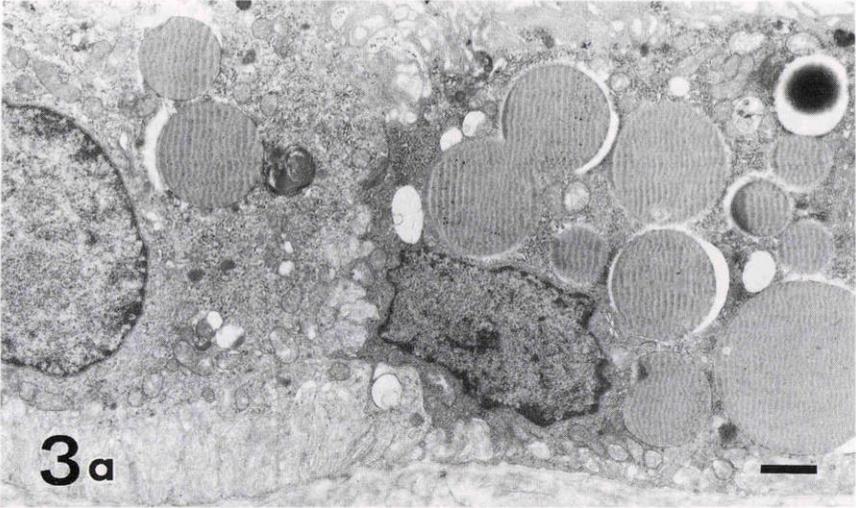
荷電状態では、マクロファージやKupffer細胞などの食食細胞が正荷電のものより負荷電の異物をよく取り込むことが報告されており<sup>18)</sup>、一方、マクロファージで細胞表面の負荷電を塩基性アミノ酸で中和して減少させると食食能が亢進する<sup>19)</sup>ことが観察されている。

食食現象を食食細胞と被貪食物の相対的な疎水性の違いから観察したvan Ossら<sup>20)</sup>によると、一般に食食細胞自身よりも疎水性の高いバクテリアは食食されやすかった。

我々は前報<sup>22)23)</sup>でポリスチレン小球に対する網膜色素上皮の食食の選択性は小球表面の親水性・疎水性、及び荷電状態が重要な要因になっていることを明らかにした。すなわち、疎水性の小球、負荷電の小球は色素上皮に食食されやすく、正荷電の小球、親水性の小球は食食されにくかった。







今回は貪食の差が著明であった負荷電小球, 正荷電小球, 親水性小球を用いその後の経過を観察した. その結果, 負荷電の小球は注入6時間後, 親水性の小球は24時間後, 正荷電の小球は48時間後に網膜色素上皮に貪食されはじめ, 表面性状の違いにより貪食開始時間に差がみられ, その後には表面性状が異なっても全ての小球は色素上皮に貪食された.

網膜下腔には interphotoreceptor matrix としてコンドロイチン硫酸などの粘性多糖類が存在しており, これらの酸性ムコ多糖類が貪食に関係していると推察されている<sup>30)</sup>. 透過型電顕でみえるポリスチレン小球の表面に付いた不定形物質を粘性多糖類とし, 貪食開始時間に影響を与える可能性が指摘されており<sup>31)</sup>, 加賀<sup>32)</sup>, 金井<sup>21)</sup>らも小球表面に不定形物質が附着しているのを観察している. さらに, 一部のムコ多糖類では, immunoreactive phagocytes の貪食作用に対して阻害<sup>33)~35)</sup>, または促進効果がある<sup>36)</sup>ことが報告され, ヒアルロン酸が細胞膜に及ぼす貪食阻害効果に付いても報告されている<sup>37)</sup>.

酸性ムコ多糖類は解離状態において $-COO^-$ ,  $-OSO_3^-$ などに解離し負荷電を帯びており<sup>38)</sup>, 網膜下腔に注入されたポリスチレン小球は, 網膜下腔のこれらの物質により表面性状に修飾を受けると思われる. 負荷電小球, 正荷電小球, 親水性小球のうち, 正荷電小球はヒアルロン酸などの負荷電巨大分子が多く表面に結合したと考えられ, 負荷電小球は小球表面にほとんど結合されず, 親水性小球は2者の中であったのではないかと思われる. 網膜色素上皮の apical 側には主に sialo-glycoconjugates が存在しており, 貪食物質の認識に関わっていると考えられ<sup>39)</sup>, しかもそれが細胞表面を負荷電に保っているおもな物質であると言われている<sup>40)</sup>.

今回, 網膜色素上皮の微絨毛とポリスチレン小球の接触は, 表面の粘性多糖類のために sialoglycoconjugates による認識が阻害され, 貪食されにくくなるのであろうと思われた. その結果, 表面に最も粘性多糖類が結合している正荷電小球は貪食されにくく, 負荷電小球ではそれが無いので貪食されやすく, 親水性はそれらの間であったと推察される.

48時間後には正荷電小球も色素上皮に貪食されるようになったのは, 網膜下腔にとどまる間に表面に附着した酸性ムコ多糖類の組成に何んらかの修飾を受け, 表面性状が貪食されやすい状態になったと考えられた. 親水性小球ではこのような網膜下腔の物質の修飾

を受け表面性状が貪食されやすい状態になるのに24時間かかったと推察された.

なお, 貪食された小球はすべて色素上皮の胞体内に留まり, Bruch 膜側への exocytosis は認められなかった.

また, 最近網膜色素上皮が extracellular matrix として collagen type I, III, IV, fibronectin を産生することも報告されており<sup>34)</sup>, これらの物質が貪食されるまでのポリスチレン小球を覆って, その表面性状になんらかの修飾を加えている可能性も考えられるが, 今後検討を加えたい.

本稿の要旨の一部は第91回日本眼科学会総会(1987. 5. 14, 京都)において緒方が口演した. なお, 本研究には文部省科学研究費(奨励研究 A62771402, 金井)の補助を受けた, 深謝いたします.

#### 図表説明

図1 注入6時間後, 網膜下腔に注入されたポリスチレン小球の貪食状態. 電顕所見. a: 負荷電の小球. 多数の小球はすでに胞体内に取り込まれている. b: 正荷電の小球. 微絨毛は小球を取り囲むようにのびているが小球は胞体内に取り込まれていない. c: 親水性の小球. 小球は RPE に接して存在しているが, 胞体内には取り込まれていない(一は $1\mu m$ ).

図2 注入24時間後, 網膜下腔に注入されたポリスチレン小球の貪食状態. 電顕所見. a: 負荷電の小球. 小球が胞体内によくとりこまれている. b: 正荷電の小球. 小球は RPE の胞体内にほとんどとりこまれていないが, ごく少数は胞体内にもみられる. c: 親水性の小球. 小球は胞体内によくとりこまれている(一は $1\mu m$ ).

図3 注入48時間後, 網膜下腔に注入されたポリスチレン小球の貪食状態. 電顕所見. a: 負荷電の小球. 小球は胞体内にとりこまれたままである. Bruch 膜側への exocytosis の所見はない. b: 正荷電の小球. 小球は RPE の胞体内によくとりこまれている. c: 親水性の小球. 小球は胞体内によくとりこまれている(一は $1\mu m$ ).

#### 文 献

- 1) Hogan MJ: Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 76: 64—80, 1972.
- 2) Spencer WE: Renaissance of the retinal pigment epithelium. Arch Ophthalmol 88: 1, 1972.
- 3) Young RW: The renewal of photoreceptor cell outer segments. J Cell Biol 33: 61—72, 1967.

- 4) **Young RW, Rok D**: Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42: 392—403, 1969.
- 5) **Young RW**: Shedding of disc from rod outer segments in the rhesus monkey. *J Ultrastruct Res* 34: 190—203, 1971.
- 6) **Young RW**: Renewal systems in rods and cones. *Ann Ophthalmol* 5: 843—854, 1973.
- 7) **Feeney L**: The phagolysosomal system of the pigment epithelium. A key to retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 635—638, 1973.
- 8) **Hollyfield JG, Ward A**: Phagocytic activity in the retinal pigment epithelium of the frog *Rana pipiens*. I. Uptake of polystyrene spheres. *J Ultrastruct Res* 46: 327—338, 1974.
- 9) **Hollyfield JG, Ward A**: Phagocytic activity in the retinal pigment epithelium of the *Rana pipiens*. II. Exclusion of *Sarcina subflava*. *J Ultrastruct Res* 46: 339—350, 1974.
- 10) **Philp NJ, Bernstein MH**: Phagocytosis by retinal pigment epithelium explants in culture. *Exp Eye Res* 33: 47—53, 1981.
- 11) **Seyfried-Williams R, McLaughlin BJ**: The use of sugar-coated beads to study phagocytosis in normal and dystrophic retina. *Vision Res* 23: 485—494, 1983.
- 12) **Hayashi M, Matsumoto A, Hayasaka Y, et al**: Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelium. Uptake of polystyrene spheres and *Staphylococcus aureus*. *Exp Eye Res* 28: 427—434, 1979.
- 13) **Herron WL Jr, Riegal BW, Myers OE, et al**: Retinal dystrophy in the rat, a pigment epithelial disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 8: 594—604, 1969.
- 14) **Gloor BP**: Zell Proliferation, Narbeldung und Pigmentation nach Lichtkoagulation. *Klin Mbl Augenheilk* 154: 633—648, 1969.
- 15) **Inomata H**: Wound healing after xenon arc photocoagulation in the rabbit retina. Identification of the proliferating cells in the lesion by light and electron microscopic autoradiography using  $^3\text{H}$ -thymidine. *Ophthalmologica* 170: 462—474, 1975.
- 16) **Inomata H**: Identification of proliferating cells in retinal wound healing after xenon arc photo-coagulations by electron microscopic auto-radiography. *J Clin Electron Microscopy* 7: 436—437, 1975.
- 17) **Machemer R, Laqua H**: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 1—23, 1975.
- 18) **Seno S, Tanaka A, Urata M, et al**: Phagocytic response of rat liver capillary endothelial cell and Kupffer cells to positive and negative charged iron colloid particles. *Cell Struct Func* 1: 119—127, 1975.
- 19) **Nagura H, Asai J, Kojima K**: Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Effect of electric surface charge on phagocytic activity of macrophages for fixed red cells. *Cell Struct Func* 2: 21—28, 1977.
- 20) **Van Oss CJ, Gillian CF**: Phagocytosis as a surface phenomenon. I. Contact angles and phagocytosis of non-opsonized bacteria. *J Reticulo-endothel Soc* 12: 283—292, 1972.
- 21) **金井清和, 大熊 紘, 宇山昌延**: 網膜色素上皮細胞の貪食作用の研究. 1. 走査型電顕による貪食様式の観察. *眼紀* 35: 612—618, 1983.
- 22) **金井清和, 大熊 紘, 宇山昌延**: 網膜色素上皮細胞の貪食作用の研究. 2. 被貪食物の荷電状態と貪食. *日眼* 88: 1293—1305, 1984.
- 23) **金井清和, 大熊 紘, 宇山昌延**: 網膜色素上皮細胞の貪食作用の研究. 3. 被貪食物の親水性, 含水率と貪食. *日眼* 88: 1428—1436, 1984.
- 24) **金井清和, 大熊 紘, 宇山昌延**: 網膜色素上皮細胞の貪食作用の研究. 4. 貪食の選択性と微絨毛の態度. *眼紀* 36: 1216—1221, 1984.
- 25) **緒方奈保子, 金井清和, 大熊 紘, 宇山昌延**: 網膜色素上皮細胞の貪食, 増殖反応. *眼紀* 39: 31—40, 1988.
- 26) **Bridges CDB**: Agglutination of isolated rod outer segments by lectins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 17—23, 1981.
- 27) **Bridges CDB**: Lectin receptors of rods and cones. Visualization by fluorescent label. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 8—16, 1981.
- 28) **Hall MO, Nir I**: The binding of concavalin A to the rod outer segments and pigment epithelium of normal and RCS rats. *Exp Eye Res* 22: 469—476, 1976.
- 29) **Nir I, Hall MO**: Ultrastructural localization of lectin binding sites on the surface of retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 29: 181—194, 1979.
- 30) **Bach G, Berman ER**: Aminosugarcontaining compounds of the retina. I. Isolation and identification. *Biochim Biophys Acta* 252: 453—461, 1971.
- 31) **Funahashi M, Okisaka S, Kuwabara T**: Phagocytosis by the monkey pigment epithelium. *Exp Eye Res* 23: 217—225, 1976.

- 32) 加賀典男, 越生 晶, 宇山昌延: 網膜色素上皮細胞の貪食と増殖に関する電子顕微鏡的研究. 日眼 81: 701—719, 1977
- 33) **Forrester JV, Balazs EA**: Effect of hyaluronic acid and vitreous. On macrophage phagocytosis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 97: 554—557, 1977.
- 34) **Hakansson L, Hallgren R, Venge P**: Effect of hyaluronic acid on phagocytosis of opsonized latex particles. *Scand J Immunol* 11: 649—653, 1980.
- 35) **Forrester JV, Balazs EA**: Inhibition of phagocytosis by highmolecular weight hyaluronate. *Immunol* 40: 435—446, 1980.
- 36) **Darzynkiewicz Z, Balazs EA**: Effect of connective tissue intercellular matrix on lymphocyte stimulation. I. Suppression of lymphocyte stimulation by hyaluronic acid. *Exp Cell Res* 66: 113—123, 1971.
- 37) 白川弘泰, 荻野誠周, 松村美代他: ニワトリ胚培養網膜色素上皮の貪食機能に関する研究—ラテックス粒子貪食能に対するムコ多糖類ニワトリ硝子体の阻害効果. 日眼 87: 86—91, 1983.
- 38) **White A, Handler P, Smith EL**: *Principles of Biochemistry*, 1045—1053, 廣川書店, 東京, 1975.
- 39) **Porrello K, LaVail MM**: Histochemical demonstration of spatial heterogeneity in the interphotoreceptor matrix of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1577—1586, 1986.
- 40) **Compochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM**: The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cell in vivo and its synthesis in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1615—1621, 1986.
-