網膜色素上皮細胞の反応様式

2. 遊走と有糸分裂像（図4）

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 2. Pathologic Response of the Retinal Pigment Epithelium. Migration and Mitosis

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ポリスチレン小球を経強膜的に注入し，貪食開始後，すなわち注入48時間後の網膜色素上皮細胞の反応を観察した．注入した小球の表面性状の差異は，網膜色素上皮の増殖に対して影響を及ぼさなかった．網膜下腔の小球が少数であったところでは，網膜色素上皮細胞はすべての小球を貪食し，網膜下腔は清掃されて，色素上皮細胞の増殖は起こらなかった．網膜下腔に小球が多数存在したところでは，色素上皮は増殖し，さらに遊走して小球を旺盛に貪食した．なお，網膜色素上皮細胞の増殖は小球を注入後，48時間で初めて観察された．また，光顕および電顕で網膜下腔の網膜色素上皮細胞の有糸分裂像を直接観察し，有糸分裂中の細胞が，細胞間結合装置を有していることから，網膜色素上皮細胞が有糸分裂により増殖することを証明できた．（日眼　92：1650—1656，1988）

キーワード：網膜色素上皮細胞，増殖，有糸分裂，遊走，微細構造

Abstract

We previously reported that the retinal pigment epithelial cells (RPE) showed different phagocytotic activity according to the physico-chemical surface characteristics of polystyrene particles. This study describe the proliferative activity of the RPE. We injected polystyrene particles into the subretinal space of albino rats. Forty eight hours after injection, where amounts of particles were enough to be phagocytosed by the original single RPE layer, RPE scavenged subretinal particles, and showed neitner proliferation nor migration. Where a large amount of particles remained in the subretinal space, RPE showed proliferation and migration to particles. RPE cells in the subretinal space showed mitotic figures. We identified these cells as RPE cells, which were shown to have inter-cellular junctional complexes under transmission electron microscopy. These proliferative and migratory responses by RPE were observed within 48 hours after the procedure. There was no difference in response of RPE in relation to the surface nature of the particles. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 1650—1656, 1988)

Key words: Retinal pigment epithelium, Proliferation, Mitosis, Migration Fine structure

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6月7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 June 7, 1988)

I 緒　言

実験的網膜剝離において，網膜色素上皮細胞が，網膜下腔にmacrophage様になって遊走し[1)~8)]，また増殖性硝子体網膜症では，眼内の網膜表面や，網膜硝子体境界部に線維芽細胞様細胞となって，増殖することが実験的にも臨床的にも示されている[9)~13)]．このように病的条件下での網膜色素上皮細胞の増殖[14)15)]はいろいろな網膜病変に関わっている．また網膜色素上皮細胞が増殖することはすでに^{3}H-Thymidineによるラジオオートグラフィーで確認されている[16)17)]が，その*in vivo*の分裂像は未だとらえられていない．

前回我々は，ラットの網膜下腔にポリスチレン小球を注入したところ，小球の表面性状[18)19)]により，網膜色素上皮細胞の小球貪食開始時間に差があることを見いだした[20)21)]．今回は，貪食反応開始後の色素上皮の観察を続けると，網膜色素上皮細胞がポリスチレン小球に対し，貪食反応だけでなく増殖ならびに遊走反応を示すことを認め，さらに明らかな細胞分裂像を確認したので報告する．

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種類

負荷電小球，正荷電小球，親水性小球．表面処理の方法は前報[20)]に記したとおりである．

3. 網膜下腔注入法

既報[20)]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，注入部から後極部にかけて胞状網膜剝離が形成されたことを確認し，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などが発生した眼球は除外した．

4. 試料作成方法

注入後，48時間に眼球摘出を行い，直ちに2.5%グルタールアルデヒド(0.1M燐酸緩衝液)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，プロピレンオキサイドに置換後，エポン包埋し光顕，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ニル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．

また，観察に際しては，従来の方法に加え，眼球の接線方向に切った切片で網膜色素上皮細胞層を広く観察した．

III 結　果

前報[20)21)]に記したように，貪食開始には小球の性状によって差がみられたが，今回は正荷電，負荷電，親水性処理のどの小球も貪食されていた注入48時間後の試料について検討した．

注入48時間後，どの種類の小球も網膜色素上皮細胞に貪食開始されていたが，小球の比較的少ないところでは前回[20)21)]観察したように，色素上皮細胞は網膜下腔に注入された小球を完全に貪食し，網膜下腔は完全に清掃された．この際には網膜色素上皮細胞は一層のままでとどまり，網膜色素上皮の増殖はほとんどみられなかった．

しかし，網膜下腔に小球が多数残存したところでは，網膜色素上皮細胞の反応態度は著しく異なった．多数の小球を貪食し，胞体内に含んだ網膜色素上皮細胞は，増殖して2層から数層に重層し，さらに，ポリスチレン小球を貪食した網膜色素上皮細胞はBruch膜から離れ網膜下腔を内方へ遊走した(図1)．網膜色素上皮細胞のこの反応態度は小球の表面性状の差によって違いはみられなかった．

この様な旺盛な増殖，遊走がみられた部位の網膜色素上皮細胞層を眼球の接線方向に切った切片で，網膜色素上皮を広範囲に観察すると，胞体内にポリスチレン小球を貪食した細胞が有糸分裂している像が多数認められた(図2)．これを電顕で観察すると，染色糸がはっきり認められ，分裂中の細胞は胞体内にポリスチレン小球を有したままであり(図3)，さらに拡大でみると染色糸，微細小管が明らかで，その隣接する細胞間には細胞間結合装置が多数認められた(図4)．このように，有糸分裂している細胞が，上皮系細胞の特徴を持つことから，これが網膜色素上皮細胞であることが確認できた．

IV 考　按

網膜色素上皮細胞は種々の処置を加えられたり，病

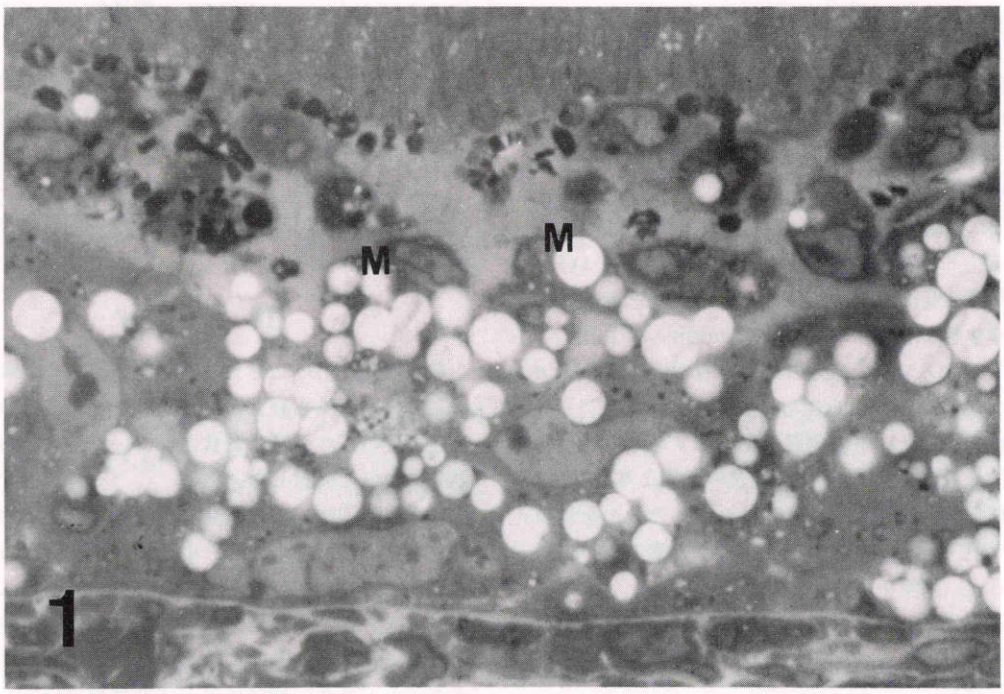

図1　注入48時間後，光顕所見．網膜色素上皮細胞は増殖して2から3層に重層し，さらに，網膜下腔へ向かって遊走した(M)．これらの増殖，遊走した色素上皮細胞は小球をさかんに貪食していた（×1000油浸）．

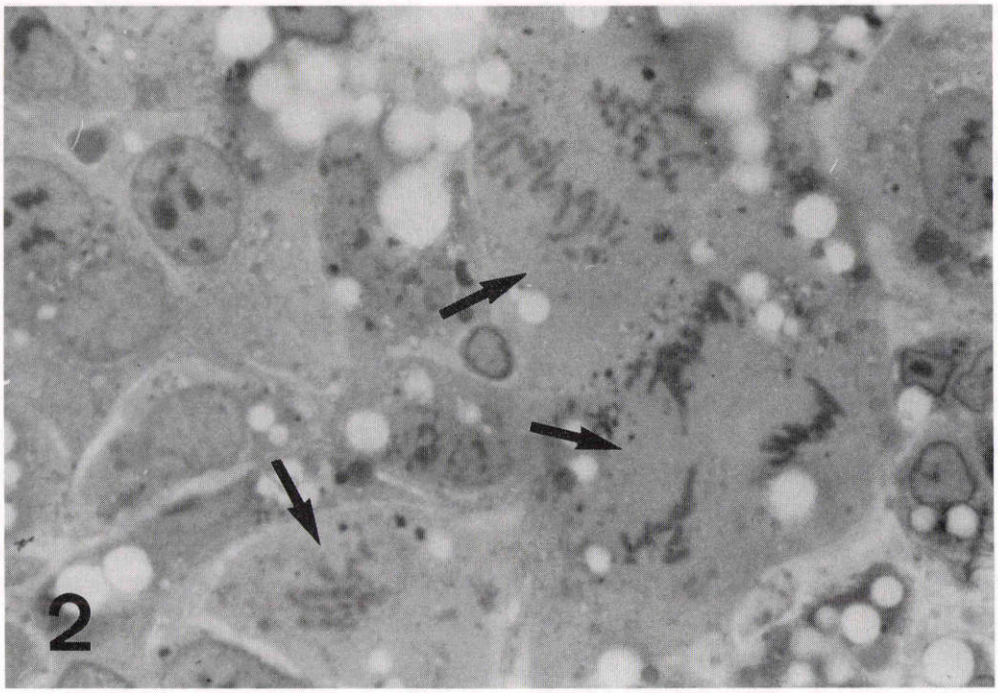

図2　注入48時間後，色素上皮層接線方向の切片の光顕所見．小球を貪食した細胞に多数の有糸分裂（矢印）を認めた（×1000油浸）．

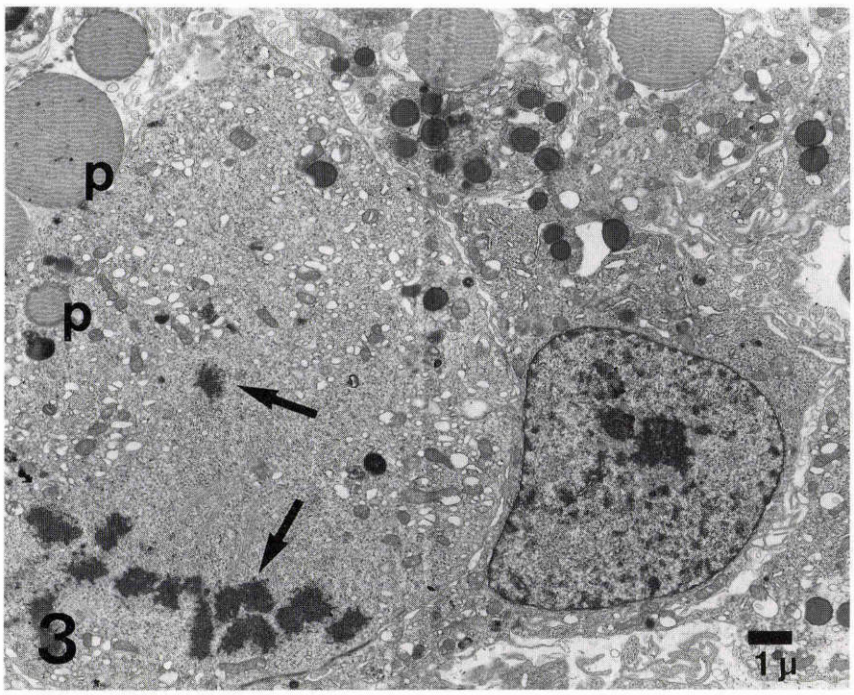

図3　注入48時間後，色素上皮層の電顕所見(弱拡大)．小球を貪食したまま色素上皮細胞に有糸分裂がみられた．染色糸が明らかである(矢印)．p：ポリスチレン小球．

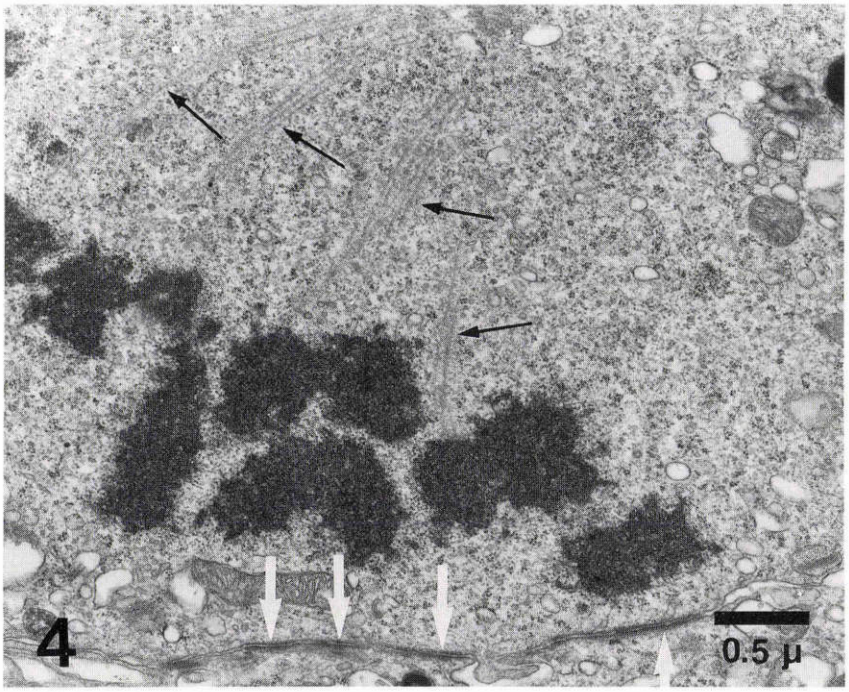

図4　注入48時間後，色素上皮の電顕所見(強拡大)．隣接する細胞間に結合装置(白矢印)がみられ，有糸分裂を示す細胞が色素上皮細胞であることを確認した．染色糸，微細小管(黒矢印)が明かである．

的状態（光凝固[16)17)22)23)]，冷凍凝固[24)]，網膜剝離[1)~9)]）で増殖することは既によく知られている．中でも難治性網膜剝離にみられる増殖性硝子体網膜症では網膜色素上皮細胞の増殖反応が重要な役割を果していると考えられている．網膜下腔にポリスチレン小球を注入することによる網膜色素上皮の増殖も報告されている[25)]が，今回我々は，表面性状の異なるポリスチレン小球を網膜下腔に注入し，貪食反応が開始された後の網膜色素上皮細胞の反応を観察し，色素上皮の増殖，遊走を検討した．

注入6時間から，24時間には，網膜色素上皮細胞はどの表面性状のポリスチレン小球に対しても1層のままで貪食を行っていた[20)21)]．注入48時間後に初めて網膜色素上皮細胞は増殖，遊走を開始した．注入された小球が比較的小数であったところでは，色素上皮は小球を胞体内に貪食したが，増殖はほとんど起こらず1層のままであった[20)21)]．これは網膜下腔の小球の数がちょうど適当数であり，すべての小球が既存の1層の色素上皮によって貪食され，清掃し尽くされたためと考えられた．

一方，網膜下腔に小球が多数存在し，小球を既存の1層の網膜色素上皮で清掃しきれなかったところでは，網膜色素上皮細胞は増殖し，さらに遊走してその小球の処理にあたったと考えられた．

この様な，48時間後の網膜色素上皮細胞の増殖反応には，ポリスチレン小球の性状による差はみられなかった．ポリスチレン小球の表面性状は化学反応により与えられたものであるから，生体内でも時間的経過のみで変化することはない．したがって，それぞれ，その小球表面に網膜下腔に存在する物質の修飾を受け[20)21)]，差がなくなり，色素上皮に対する反応にも違いがみられなくなったのであろう．

Hiscott[26)]らは，網膜色素上皮の欠損部を作成し，その修復の過程を^{3}H-Thymidineを用いて観察したところ網膜色素上皮細胞の増殖は処置後3日から7日に起こったと報告している．我々の観察では既報[20)]で述べたと同じく処置後48時間ですでに増殖がみられ，後報[27)]で述べるように，3日目には増殖した細胞は紡錘形に形態を変え，7日目には線維芽細胞様に化生していた．Campochiaroらは網膜色素上皮細胞の膜レセプターに働く増殖因子[28)]として，a retina derived stimulaterを報告[29)]しており，Bryanらは網膜色素上皮細胞自体も網膜色素上皮の細胞成長因子を持つと述べている[30)]．網膜下腔の異物の刺激が，このような因子の放出をもたらした可能性があると考えられる．48時間後に初めて旺盛な増殖反応がみられたことは，色素上皮がこの様な因子により，増殖を起こすにはラットでは48時間かかると思われた．

網膜色素上皮細胞が増殖することは，実験的網膜剝離[1)~9)]や，硝子体内に注入した網膜色素上皮細胞[14)31)32)]，さらに網膜色素上皮細胞の培養実験で認められている[32)]．しかし，*in vivo* で網膜色素上皮細胞の有糸分裂像を直接見ることは難しいとされてきた[16)]．なぜなら，切片標本上で観察できる分裂中の細胞は僅かであり，その様な分裂中の細胞は本来の位置より移動していることが多く，また分裂中の細胞は，細胞内構造が本来のものより変化しているためである[16)]．そのため，Inomataらが^{3}H-Thymidineをもちいた，電顕オートラジオグラフィーで網膜色素上皮細胞の有糸分裂を指摘[16)17)]して以来，^{3}H-Thymidineを用い網膜色素上皮の増殖を確認する方法[26)32)]が取られてきた．Bruke[33)]らはポリスチレン小球を貪食した網膜色素上皮細胞の増殖を^{3}H-Thymindineで観察している．

しかし，今回処置後48時間で網膜色素上皮細胞の旺盛な増殖を観察し，網膜色素上皮層に平行方向に切片を作成することによって一度に多数の網膜色素上皮細胞を観察すると，小球を貪食した細胞の有糸分裂像をとらえることが出来た．この細胞は，細胞間結合装置を有しており，明らかに上皮系の細胞の特徴を持っていることから，網膜色素上皮細胞の有糸分裂像であることが確認できた．

網膜色素上皮細胞の増殖のしかたについては，buddingによるのであろうとする考え[6)]と，有糸分裂であろうとする考えがある[16)17)26)32)33)]が，いまだその生体内での有糸分裂は観察されていなかった．今回，網膜下腔で直接に有糸分裂像を確認したことからmitosisによって増殖が起こることが明かとなった．

本稿の要旨の一部は第90回日本眼科学会総会（1987．5．14．京都）において緒方が口演報告した．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，ここに深謝いたします．

文　献

1) **大熊正人**：実験的網膜剝離における脈絡膜及び色素上皮の微細構造に関する研究．第1報．色素上皮，Bruch膜毛細血管板の変化．日眼　75：1771—1778, 1971.
2) **大熊正人**：実験的家兎剝離網膜の透過型並びに走査型電子顕微鏡的観察：I．剝離網膜初期の変化．日眼　76：303—311, 1972.

3) **大熊正人**：実験的網膜剝離における脈絡膜及び色素上皮の微細構造．第3報．網膜色素上皮の走査型電子顕微鏡的観察．日眼　76：377—384，1972．
4) **稲原　明**：実験的網膜剝離の剝離面の微細構造に関する研究．第1報．色素上皮の変化．日眼　77：1002—1019，1973．
5) **柳田　泰**：網膜下液に関する研究．第3報．実験的網膜剝離における網膜色素上皮とmacrophageとの関連について．日眼　84：912—922，1980．
6) **Johnson NF, Foulds WS:** Observations on the retinal pigment epithelium and retinal macrophages in experimental retinal detachment. Br J Ophthalmol 61：564—572，1977．
7) **Stern W, Anderson D, Fisher S,** et al: Anatomical recovery following retinal detachment: Clinicopathological correlations. Aus J Ophthalmol 9：143—154，1981．
8) **Anderson DH, Guerin CJ, Erickson** et al: Morphorogical recovery in the reattached retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 27：168—183，1986．
9) **Machemer R, Laqua h:** Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). Am J Ophthalmol 80：1—23，1975．
10) **Mueller-Jensen K, Machemer R, Azarnia R:** Autotransplantation of retinal pigment epithelium in intravitreal diffusion chambers. Am J Ophthalmol 80：530—537，1975．
11) **Machemer R, Van Horn D, Aaberg TM:** Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 85：181—191，1978．
12) **Kampik A, Kenyon KR, Michels RG,** et al: Epiretinal and vitreous membrane. Comparative study of 56 cases. Arch Ophthalmol 99：1445—1454，1981．
13) **Hiscott PH, Grierson I, Mcleod D:** Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: An immunohistochemical study. Br J Ophthalmol 68：708—715，1984．
14) **Mandelcorn M, Machemer R, Fineberg E,** et al: Proliferation and metaplasia of intravitreal retinal pigment epithelium cell autotransplants. Am J Ophthalmol 80：227—237，1975．
15) **Radtke ND, Tano Y, Chanddler D,** et al: Stimulation of massive periretinal proliferation by autotransplantation of retinal pigment epithelial cells in rabbits. Am J Ophthalmol 91：76—87，1981．
16) **Inomata H:** Wound healing after xenon arc photocoagulation in the rabbit retina. Identificatin of the proliferating cells in the region by light and electron microscopic autoradiography using ^{3}H-thymidine. Ophthalmologica, 170：462—474，1975．
17) **Inomata H:** Identification of proliferating cells in retinal wound healing after xenon arc photocoagulations by electron microscopic auto-radiography. J Clin Electron Microscopy 7：436—437，1975．
18) **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．被貪食物質の荷電状態と貪食．日眼　88：1293—1305，1984．
19) **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．
20) **緒方奈保子，金井清和，大熊　紘，宇山昌延**：網膜色素上皮の貪食，増殖反応．眼紀　39：31—40，1988．
21) **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反応様式．1．貪食．日眼　92：1406—1413，1988．
22) **Wallow IHL, Tso MOM:** Repair after xenon arc photocoagulation. 2. A clinical and light microscopic study of the evolution of retinal lesion in the rhesus monkey. Am J Electron Microscopy 22：273—275，1973．
23) **Ishikawa Y, Uga S, Ikui H:** The cell division of the pigment epithelium in the repairing retina after photocoagulation. J Electron Microscopy 22：273—275，1973．
24) **Lincoff H:** The mechanisum of the cryosurgical adhesion. IV. Electron microscopy. Am J Ophthalmol 71：674—689，1971．
25) **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．
26) **Hiscott WH, Machemer R:** Retinal pigment epithelial repair. ARVO abstract, 289，1987．
27) **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反応様式．3．線維芽細胞様化生．日眼　92，第12号，1988．
28) **清水信義**：細胞の増殖機構と増殖因子．最新医学　40：466—474，1985．
29) **Campochiaro PA, Glaser BM:** A retina-derived stimulator of retinal pigment epithelial cell and astrocyte proliferation. Exp Eye Res 43：449—457，1986．
30) **Bryan III JA, Campochiaro PA:** A retinal pigment epithelial cell derived growth factor. Arch Ophthalmol 104：422—425，1986．

31) **Griersos I, Boulton M, Hitchins C,** et al: Human retinal pigment epithelial cells in the vitreous of the owl monkey. Exp Eye Res 43: 491—502, 1986.

32) **Burke JM, Foster SJ:** Injured vitreous stimulates DNA synsthesis in retinal pigment epithelial cells in culture and within the vitreous. Graefe's. Arch Clin Exp Ophthalmol 218: 153—155, 1982.

33) **Burke JM, Foster SJ:** Induction of DNA synthesis by co-cultures of retinal glia and retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sic 26: 636—642, 1985.