(昭和62年度 第91回総会)

宿題報告

血液眼関門についての研究

ー機能と形態の接点,その研究法の開発一 第1部 血液-網膜関門構成細胞における機能関連酵素の局在および

細胞膜表面荷電の barrier 機構関与について (図54,表23)

上 野 聪 樹 (京都大学医学部眼科学教室)

共同研究者

 石郷岡
 均・平田
 昭・安渕
 奉男・西川
 雅子

 仁平
 美果・本田
 治・高橋
 政代・晴山
 正志

 北岡
 隆・田中
 利男・中野
 徹(京都大学医学部眼科学教室・第2解剖学教室)

 那須
 史男・篠上
 治彦(東邦大学医学部第2解剖学教室)

 H.J. BAMBAUER・H. UMAR
 (Giessen 大学医学部解剖・細胞生物学教室)

研究協力者

藤本	和	(京都大学医学部第2解剖学教室・米 NIH)
藤本	豊士	(京都大学医学部第2解剖学教室)
猪俣腎	一郎	(東邦大学医学部第2解剖学教室)
瀬口	春道	(高知医科大学第2解剖学教室)
馬屋	原宏	(武田薬品中央研究)
安藤	孝雄	(武田薬品中央研究所)
M. U	ECK	(Giessen 大学医学部解剖・細胞生物学教室)
伊東	雅	(京都大学医学部第1外科学教室)
大平	明弘	(福岡大学医学部眼科学教室)

New Aspects of Ultracytochemical Studies on Blood-Retinal Barriers

I. Role of heterogenous transport enzyme localization and cell surface charge in blood-retinal barrier

Satoki Ueno

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

別刷請求先:〒520 大津市長等1-1-35 大津赤十字病院眼科 上野 聡樹 (昭和63年10月11日受付)

Reprint requests to: Satoki Ueno MD. Department Ophthalmology, Ohtsu Red Cross Hospital, 1-1-35, Nagara, Ohtsu-shi 520, Japan (Received October 11, 1988)

Abstract

Numerous morphological studies on blood-retinal barriers have been so far performed mainly to observe the localization of penetrating tracers such as lanthanum nitrate or peroxidase. From these examinations revealing blockage of such tracers, it is well accepted that retinal pigment epithelium or retinal capillary endothelium can block the penetration of such tracers into the sensory retina. In contrast, it has been claimed that blockage of tracers dose not always reveal precise overview of blood-retinal barriers but that cellular functions such as heterogenous transport systems and/or selective uptake systems may play much more important roles as blood-retinal barriers to maintain constant physiological environment surrounding the sensory retina. Therefore, recently much effort has been paid to clarify such physiological or biochemical aspects of barrier function. However, morphology and function has always inseparable relationships. Especially, ultrafine morphological studies are indispensable to observe heterogenous function of the cell membranes or microorganella. From these points of view, it is inevitablly essential to improve conventional penetration tracer procedures or to develope completely new cytological approach for interpretation of functional roles of blood-retinal barriers. In this report, our newly developed cytological procedures as below mentioned are introduced and some interesting results obtained are discussed, with special referrence to the functional aspects of the blood-retinal barrier. Newly developed cytochemical methods were applied to reveal heterogenesity of the localization of cyclic nucleotide-producing, degrading exzymes or transport ATPases in retinal pigment epithelium and retinal capillary endothelium. These enzyme localizations were also examined in ependymal cells and cerebral capillary endothelium which played the major roles in blood-brain barrier (BRB). Although the enzyme localization or enzyme characteristics were comparatively examined in between retinal pigment epithelium and ependymal cells, and in retinal and cerebral capillary endothelium, they showed quite different localizations. These results indicate that participation of these cells in the blood-retinal or blood-brain barriers may be different in spite of same origin in the developmental process. Various peroxidatic molecules were utilized as cytochemical tracers to observe infusion through retinal capillary endothlium and choriocapillaris. Interesting result was obtained that smaller tracers did not penetrate much faster than lager molecules. The characterisity of invasion of such tracer proteins were modified according to their electrical charges. Therefore, the surface charge of choroidal and retinal capillary endothlial cell membranes were examined with charged-ferritin labeling using freeze-fracture labeling and frozen ultrathin section labeling techniques. Differnt from choriocapillary endothelium revealing marked surface negative charge, there existed relatively high anionic charge in anti-luminal surface of retinal capillary endothelium. From these observations, the role of cell surface charge in blood-retinal barrier were discussed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1913-1960, 1988)

Key wards : Blood-retinal barrier, K⁺-NPPase, Ca⁺⁺-ATPase, Cyclase, PDEase, HRP, MP, tracer, cell surface charge, charged ferritin

I 緒 言

われわれ医学に携わるものにとって, barrier という 言葉自体は決して耳慣れないものではない.しかしだ からといって,「実際に barrier とはどの様な物あるい はどの様な事を意味しているのであろうか?」という ような疑問を持ったことがないのも本当のところでは ないだろうか.それどころか, barrier を専門に研究さ れてきた方々のこれまでの著述を見ても,その意味の 受けとめ方が一人一人微妙に異なる場合すらある. barrier という言葉を辞書で調べてみると,次ぎのよう な意味が記されている.まず,「関所」「関門」「柵」な どである.これだけではわからないのと同じであり, さらに詳しく調べていくと,「(全ての通行・出入りを 禁止する)障壁」「難関」などとも書いてあり,さらに は「障害」あるいは「邪魔者」という言葉まで記載さ れている.全ての通行を完全に遮断するものと,柵や 関所のようにあるものは通しある物は通さないという

昭和63年12月10日

ものではその意味合いが全く異なってくる. このよう な言葉の意味の解釈上の違いも,結局は生体における barrier という事象の概念を微妙に異ならす一因と なっているのかもしれない.

一方、これまでの barrier 研究の歴史を調べてみる と、もちいられた研究方法の違いが、そのまま barrier に対する概念の違いとなっているのではないかという 印象を受けざるをえない。 そもそも barrier という考 え方自体は形態学的な研究によってもたらされた物で あるといえる. 形態学研究者が最初に用いた approach は、色素 (トリパンブルー)を注入して、各 組織におけるその色素の染色性を肉眼であるいは光顕 切片上において観察する事であった. これらの実験に おいて,血管内に注入された色素は,ほとんどの組織 を染色するが、 中枢神経組織や脳質には出現しないと いう興味ある結果がもたらされた1).ところが、脳室内 へ色素を注入すると,実験動物は急激に死亡してしま う、この様な現象から、脳脊髄液から脳組織に向かっ てほとんど物質の移動の障害となるものはないが、血 液から脳組織へは、ある種の物質の移動を完全に遮断 する機構が存在するものと考えられ、これが1885年 Ehrlichの提唱した血液・脳関門 blood brain barrier (BBB)という概念²⁾³⁾の実験的証明となった.(実際の 用語として Blood-brain barrier という言葉がもちい られたのは、1921年 Stern と Gautier⁴⁾からである) 以 後,形態学的研究はさらに電顕レベルでの解析へとす すみ、電顕的に識別可能なトレーサーを注入して、そ れがどの組織は通過するか、あるいはどこで塞き止め られるかという方向へと発展した5)~9). これらの中枢 における研究に誘発され、眼組織においても同様の研 究が活発に行われだした、しかも、ほぼ時期を同じく して、Novotony ら10)によって眼科臨床上に蛍光眼底 造影法の登場を見たことがこれらの研究に尚一層拍車 をかけたことは否定出来ない. 蛍光眼底造影像から蛍 光色素である fluorescein sodium は正常な網膜血管や RPE を diffusion によっては通過しないのではないか といわれ、実験的にも Tsukahara ら¹¹⁾, Grayson ら¹²⁾ によって血液中に注入された fluorescein が組織切片 の上で網膜血管あるいは RPE をこえて網膜側へは侵 入していない組織化学像が示された. 眼組織において も脳脊髄液産生機構と同様に以前から毛様体の房水産 牛機構における血管一前房間の barrier 機構が興味を 持たれていたが, 螢光眼底造影の発達と共に脈絡膜血 管一網膜間の barrier 機構も注目を集めるようになっ た. 電顕を用いた tracer 研究では, 血管に注入された 電子密度の高い tracer が網膜血管, 網膜色素上皮細胞



図 1

図 2

(図1,2)や毛様体上皮細胞層を越えて網膜あるいは 前房内に侵入することなく,これら上皮細胞あるいは 物質を完全に塞き止める事が可能である absolute barrier 現象を有する事は明らかになった.つまり先程 の barrier という意味の解釈から言えば,これまでは 通過を障害するあるいは完全に塞き止めてしまうもの という意味合いでの研究が進んできたように思われ る.

一方話を BRB の研究にもどすと、生理学的研究に おいては、脳室の成分と血清成分のあきらかな違いか ら,血管と脳室間に存在する細胞がある種の選択的透 過性を有していることが注目された^{13)~23)}. つまり, 生 理的な特質をも決して自由拡散的に透過させることな く,かなりの規則性を持って選択透過し、しかもこれ らをある方向性をもって輸送することにより、組織を 常に一定の生理学的環境下に置いて正常に機能さすこ とが本来の barrier の役割であるという解釈を下した ことが、 生理学的研究が単に塞き止め現象に止どすら ず net flux barrier 現象を追及する姿勢を決定づけた と言えるだろう、例えばこれは、生理的物質注入後の 脳脊髄液あるいは房水中における量的変化の解析など の実験²⁴⁾²⁵⁾によく現されているといえるし、いってみ れば, これらの研究は現在生理学の分野において一大 問題である細胞膜の透過性や輸送機構の解析そのもの である。

この様に barrier とは(表1)に示すように,形態学 的には物質の移動を塞き止める現象であり,生理学的 には関所の役割であるというやや異なった解釈のもと



で互いに研究が進んできたのであるが,例えば光のエ ネルギーを電気的信号に変換するような網膜の役割 や,あるいは血管のない透光体組織を栄養する房水産 生機構においては,その生理的環境形成のほうがより 重要な意味をもつと考えられても不思議ではない.し かも,生理学的研究方法の開発に比べ,形態学的な barrier 研究においてはその後の新しい研究法の開発 が遅れたことも相俟って,このところ研究の主体が生 理学や生化学的な研究分野に移行する傾向にある印象 を受ける事はある程度仕方がないのかもしれない.

そうは言っても、生理学や生化学的研究からもたら されるのは、あくまで全体像としての barrier 機能で しかない.細胞のどの様な器官や機構がその機能を果 たすために関与しているかというような微細なレベル での機能的研究, さらには個々の細胞レベルでの機能 の相違性等というような, 眼 barrier を考える上で非 常に重要な意味を持つ問題を解決していくためには. net での動きをみる approach のみでは充分納得出来 る答えを引出す事が困難であることも確かである.こ のような問題にこそ,形態学,特に微細形態学や微細 細胞学が持つ有利性が発揮出来るものと確信する。本 来,構造と機能はつねに一体・裏表の関係であり、あ る事象の解明には両者とも不可欠の物である. 形態学 を専門にする私が眼 barrier の研究を指名された時. これまで以上に眼 barrier 機構を明らかにするために は、構造の機能的意義を構造に即して追及しなければ ならないし, またそのためにはこれまで形態的に行わ れてきた absolute barrier の研究の範囲からさらに一 歩進んで,結局は新しい観点での方法論の開発から研 究を始めることが必要であると考えるに至ったのはこ のような理由による.

勿論,一口に「新しい研究方法の開発」と言ってし まえば非常に簡単明瞭に聞こえるが,これまで誰も試 み得なかったゆえに,一つ一つのプロセス毎に方法の 正当性や再現性の確認が必要とされたし,時には新し い実験機械まで開発せねばならないといったような大 問題があったことまで含めれば,研究開始当初から既 に多くの失敗や困難に直面したことは正直確かであ る.そのためにというのは些かいい訳めくが,この様 に限られた時間内にわれわれが行い得たことはほんの 僅かである.僅かではあるが,何故その様な方法を開 発せねばならなかったという理由とこれまで試み得た こと,あるいはそれによって現在まで明らかになった 点を順次項目別に紹介していきたいと思う.その上で, 諸兄の批判を仰ぎ,われわれの研究の今後のさらなる 発展の糧としたいと考えている.もっと欲を言えば, ここに示すものなど遙かに凌駕するような研究方法を これから開発出来得る可能性を持った方々に,例え示 唆の一つでも与えられることにでもなればこれ以上の 幸せはない.

先程から述べているように、眼球組織における barrier 機構 は大きくいって、血液一房水関門 bloodaqueous barrier (BAB)と血液一網膜関門 bloodretinal barrier (BRB)に分けられる. 房水産生機構 や前眼部透光体の環境形成から、血液一房水関門は非 常に興味を持たれる問題であり、むしろこちらのほう が古くから盛んに研究が行われてきた分野ではある が、研究時間が制約された点からここでは血液一網膜 関門に絞って話を進めることをお許しいただきたい.

II 網膜毛細血管内皮と網膜色素上皮 細胞における機能関連酵素局在の barrier 機構の関与について

網膜はよく知られているように、光という物理的な エネルギーを一連の変換機構によってイオンの流れと して電気的刺激に変える機能と、その刺激をさらに ニューロンを介してより高次へと伝達する機能を持 つ、いわば非常に高度な professional な組織であり、 この様に非常に微妙な生理学的機能を活発に行う組織 においては、その細胞を効率よく機能させるためにか なり恒常的な生理的環境が形成されていると考えられ る. しかしこの事を逆に言えば、例えイオンや生理的 な物質であるといえども,ある基準を越えて変化する ようなことがあると、その環境はたちまち破壊され、 細胞機能が悪くなるどころか、時としては簡単に細胞 障害を引き起こすことにもなるという危険性も同時に 持ち合わせていると言えるだろう.この事は、例えば 同様の機能を持つ脳組織や脊髄組織を見ると決して無 理な推測でないことがわかる、以上の二点から言えば, 網膜はその活発な代謝のために外方から必要充分なレ ベルでの物質を摂取することが必要であるとしても, これ以外ではなるべく外的な変化を直接的に受けない よう,出来得るかぎり barrier というクッションをは さんで隔離された環境にあることが望ましいわけであ る.

この様に,網膜を生理学的に閉鎖された環境にある 機能細胞の集団と考えれば,それに対して影響を与え うる因子は,硝子体,網膜血管および脈絡膜血管であ 表 2



るということは解剖学的に間違いない. 眼球自身が一 つの閉鎖された組織であると考えれば、硝子体はすで に毛様体等の BRB によって一定の環境を形成されて いる組織であるから、網膜に対して無視できない外的 影響は結局のところ血液成分と言うことになるであろ う、網膜血管においては、血液成分に対して内皮細胞、 基底膜, グリア細胞の順番に接している. 一方, 脈絡 膜血管では、内皮細胞、Bruch 膜、網膜色素上皮細胞 の順にであり、両者ともほぼ同じような形を取ってい るのかの印象をうける.共に一番最初に血液成分と接 するのが内皮細胞であることは間違いない(表2).こ の様に書けば、内皮細胞が barrier として最も重要で あるかのように聞こえるが、緒言で述べたように、形 態学的に脈絡網膜細血管内皮細胞には fenestration が多く存在し、血管に注入された HRP や硝酸ランタ ン等の tracer は比較的自由にこの fenestration を通 過するが、網膜色素上皮細胞細胞膜基底側面レベルで
 塞き止められる. これから, 脈絡膜血管一網膜では barrier として重要な働きを持つのは、むしろ細胞間に tight jnction を有する網膜色素上皮細胞(図3)であ ろうと考えられてきた.一方,網膜血管内皮細胞間(図 4)にも形態学的に強固な tight junction が存在し、注 入された tracer は管腔側細胞膜とこの tight junction をこえることなく²⁶⁾²⁷⁾, barrier として最も重要である と考えられている、実際に、これまで barrier について 述べられた総説²⁸⁾²⁹⁾では, barrier のタイプ分けとして は(表3)に示すように、血管型と上皮型にわけられ る。BRBにおいては、血管内皮型として網膜毛細血管 内皮細胞があげられ、上皮型 barrier として網膜色素 上皮細胞があげられている. これらは、血液一房水関

5-(1917)



図 3





門 blood-aqueous barrier における虹彩血管と毛様体 上皮細胞, BRB における脳毛細血管と脳室上衣細胞と にそれぞれ対比されている.この様な分類自体が果た して正当なものであるかどうかは後に討論するとし て、網膜毛細血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞には少 なくともある種の barrier 機構が存在していることは 間違いがない、しかるにその実態は、あくまである種 の物質が塞き止めるという点のみであったことも確か である。

ところが, 先程から述べているように網膜はある意 味で閉鎖された環境が望ましいとしても、単に何でも かんでもを塞き止めるだけの barrier に守られていて はその機能などが果たせるわけがない、そこでこれら の両細胞には, 必要なものは網膜側へ輸送出来る機能 も同時に有していることも間違いないであろう、そも そも細胞間を tight junction でブロックされ、しかも 細胞膜は細胞自身が生存するために必要以上の物質を 自由に通す訳などないのであるから,形態学的に内皮 や上皮細胞が連続して存在すること自体が barrier 以 外の何者でもないわけである. そう言ってしまえば, わざわざ血管内皮細胞などは必要ないわけであるの で、単に形態学的な塞き止め barrier としてだけでな く,細胞膜自身が何か特有な輸送機能を持つことで機 能的な意味での barrier として働いているのではない かという観点から、これらの細胞における膜機能が興 味を持たれてきた。

この様な考えは、脳脊髄組織における血管組織にお いて早くから想定されてきた問題である. これまでの 眼 barrier の総説では、脳脊髄および網膜毛細血管は 他の組織における毛細血管とは形態的構造やヒスタミ ンに対する態度を異にし30)31),これら血管は共に同様 な性格を有するもので、barrier としても働くと明記さ れている.しかし、この様な実験結果だけからそのよ うに断定的なことをいって果たしてよいものかという 疑問が大きく残る、脳脊髄血管では、細胞膜における 輸送酵素特に active tansport 関連酵素活性の局在が 興味を持たれ幾つかの試みがなされてきた32).また、網 膜色素上皮細胞と同様に脳室に対する上皮系 barrier である脳室上衣 ependymal 細胞におけるこれらの関 連酵素活性も興味を持たれている33).では、果たして網 膜血管内皮細胞と脳脊髄血管内皮細胞さらに、上衣細 胞と網膜色素上皮細胞とで全く同様な輸送酵素活性が 存在し、しかも同様の局在性がみられるのであろうか. この様な点も含めて、機能的な共通性を見出ださねば、 単に構造が似ていることなど barrier の共通性を論じ ることの必要かつ充分な証拠にはならないのではない だろうか. その意味で、以下にこの二組の細胞間にお ける輸送関連酵素活性局在性について比較検討を試み

昭和63年12月10日

たものである.

1. 網膜色素上皮細胞と脳質上衣細胞

一般に上皮細胞は、分泌上皮と吸収上皮とに大別さ れているが, これは単に輸送される物質サイドからみ た輸送の方向性の点からの分類であり、いずれにせよ ある方向をもって水, イオン, 種々の物質を移送する ものと考えられている.上皮細胞における物質輸送と いう重要な働きをコントロールするものとして、最近 ではCaイオンあるいは cyclic nucleotide (cAMP ま たは cGMP) などの second messenger が注目を集め ている³⁴⁾. さらには Na-K-ATPase や Ca-ATPase な どのエネルギーをもちいた水、イオンの能働輸送も見 逃せない要素であり,ある種の上皮細胞ではその輸送 機能の主役を演じることもあるのである35). この様な cyclic nucleotide を外的刺激によって,産生・分解し 細胞内レベルをコントロールする一連の酵素活性群 や、能働輸送に関与する ATPase 活性群は上皮細胞原 形質膜においては通常 apical 側と basolateral 側とで その活性に違いがあり、この様な局在性の偏位こそが それぞれの上皮細胞における物質移動の方向性決定の 大きな要因と考えられている。網膜色素上皮細胞にお いても以上述べた酵素活性の apical 側と basolateral 側での局在性の相違を in situ で捕らえられれば、網膜 色素上皮細胞がもつ水、イオン、物質などの輸送機構 の解明に大いに助けになることは間違いない. 残念な がら,現在までこれら酵素活性の微細局在を明らかに することは、多くの方法論的問題のために極めて困難 であると考えられてきた.われわれは現在までに提唱 された検出法の問題点を再検討し,新しい酵素組織細 胞化学法の開発をすすめてきた. ここでどの様な方法 をもちいて、上述の酵素活性の網膜色素上皮細胞及び 脳室上衣細胞における局在について検討したかを報告 したいと思う.

(Na-K-ATPase)

Na-K-ATPase は,1950年 Skou³⁶)によって神経細胞 に発見された酵素活性であり、エネルギーをもちいて 浸透圧に関係なく Na イオンと水を細胞外に放出し、 K イオンを細胞内に取込む能動輸送に関与するとさ れている³⁷⁾³⁸⁾.現在まで試みられた組織化学検出方法 としては、

[1] Na-K-ATPase に特異的な阻害剤であるウアバ イン ouabain をもちいたオートラジオグラフィー³⁹⁾

- [2] 酵素免疫組織細胞化学法40)41)
- [3] 酵素組織細胞化学法

表 4



があげられるが、このうち前二者は電顕のレベルで観 察するにはまだ解像力の点で問題がありその微細局在 は明らかにされなかった。一方,酵素組織化学として 初期におこなわれた, ATPを直接基質として用いる 方法では、ウワバイン感受性やイオン一依存性等の点 で信頼性に乏しく,実際には使用する事は困難であっ た. そこで1970年 Ernst¹⁷⁾は Na-K-ATPase の部分反 応である K-依存性 paranitrophenylphosphatase (K-NPPase)活性を検出する事で, Na-K-ATPase 活性を 検出する試みを発表した^{42)~44)}. 1961年 Tostensen ら45)により報告された K-NPPase は、K イオンに依存 してパラナイトロフェニールリン酸 paranitrophenylphosphate を加水分解するが、ウアバイン感受性を始 めとして種々の点で Na-K-ATPase との共通性をも つ. このため、本酵素は(表4)の模式図において記 号②に示すように, Na-K-ATPase 複合体の K イオン 依存性の脱リン酸反応部分を示すものと考えられてい る. この後 Ernst 法の欠点を改良した Mayahara らの 方法46)47)が発表され現在に至っている.その後腎臓の duct cell など多くの吸収上皮細胞でこの方法をもち いて検出が試みられ basolateral に非常にきれいな限 局した微細局在が得られており,これまでの生理学的 な推測を裏付る結果となっている.

一方,これら吸収上皮とは逆の方向性を持った物質 輸送をおこなうと考えられている分泌上皮細胞でも検 出が試みられたが,理論上では本酵素が apical 側へ局 在するものと思われたにもかかわらず、多くの分泌上 皮細胞でも basolateral 側の細胞膜に局在してい た⁴⁸⁾⁴⁹⁾. この現象は、水やイオンの動きには Na-K-ATPase のみならず H-K-ATPase^{50)~52)}, HCO₃-ATPase⁵³⁾, Na-H-HCO₃ ion counter transport system⁵⁴⁾, さらには H-Cl-ATPase⁵²⁾等他の輸送機構 も併せて関与する結果と解釈されている.

それでは、網膜色素上皮細胞ではこのNa-K-ATPase 活性の局在はどうであろうか. (図5~6)に 示す様に, 光顕レベルでは余り網膜色素上皮細胞にお いては強い活性は認められない(図5). ところが、電 子顕微鏡レベルで観察すると(図6,7), K-NPPase 活性による反応が認められ、やはり basolateral 細胞 膜に限局しているのがわかる. Steinberg ら55)~60)は電 気生理学的研究から、網膜色素上皮細胞においては K イオンは basolateral へ, Na イオンは apical 側へ移 送されるという結果より, Na-K-ATPase は apical 側 の細胞膜に局在すると考えた. このようにわれわれの 結果と Steinberg らの結果55)~60)とは今のところ相反 しているし、トリチュウムウアバインをもちいたオー トラジオグラフィーの結果においても Sterling⁶¹⁾と Bok の結果では相違がみられる. ただここで問題とな るのは網膜色素上皮細胞は果して分泌上皮細胞に属す るのであろうか、それとも吸収上皮細胞なのであろう かという点であるが、残念ながらこの重要かつ基本的 な問題に関してもいまだに結論がでていない。一つの 手掛かりとして,最近臨床的に非常に興味あるデー ターが示される様になった. その一つは感覚網膜と網 膜色素上皮細胞の接着力の重要な因子として網膜色素 上皮細胞による水の脈絡膜側への移動があげら れ62)63), さらには網膜剝離においては網膜下液が網膜 色素上皮細胞によってかなり脈絡膜側へ汲み出される と考えられている64)~66).実験的にもこの現象が証明さ れており67)、少なくとも水に関しては網膜色素上皮細 胞の apical から basolateral に向かって輸送されてい る可能性が高いという事実が明らかにされてきた68). 網膜色素上皮細胞における basolateral の Na-K-ATPaseの局在がこの様な水の動きと直接結びつい ているのかどうかは未だ不明であるにしても、少なく とも net での Na イオンと K イオンとの動きだけで Na-K-ATPaseの局在を述べるのも,他の上皮系細胞 での結果を考えれば,いささか早計という気がしてな らない.

脳室における水輸送に関しても、早くから網膜色素

上皮細胞とまったく同様の議論が繰り返されてきた。 したがって、上衣細胞細胞膜における Na-K-ATPase 活性も興味を持たれ、組織細胞化学的にもその局在が 示されている.ただ,上衣細胞においてもその局在性 は全く二つの異なった意見に別れ, apical に存在する という意見と⁶⁹⁾,弱いながら basolateral に存在する という意見70)とに別れていずれとも決着が付いていな い、興味あることに、これまでいろいろな上皮細胞に おける本酵素の組織細胞化学的局在が相次いで報告さ れて来たが、不確定であるにせよ apical 細胞膜に局在 するという結果や意見は網膜色素上皮細胞と脳室上衣 細胞にだけしか見られていない。これら両上皮細胞に おいて局在の同一性があるかどうか、あるいはこれら 両細胞のみが他の上皮細胞と異なる異端児的存在であ るのかという点に関しては、より確実な方法の出現を 待たねばならないだろう.

(Ca-ATPase)

現在, Caイオンは種々の細胞機能の調整因子として 重要な役割を果しているのではないかと注目されてい る34)71)~73). 上皮細胞においても, 細胞としての通常の 機能維持以外に, 分泌や吸収といった独自の働きにも 直接関与しているのではないかという研究が無数にな されてきた. Ca イオンを細胞内で messenger として 有効に働かすため、細胞は複離な細胞内 Ca イオン調 整機構を形成していることも明らかにされてきた. 一 般に細胞内は、非常に低い Ca イオン濃度に保たれて いるが、これは微量な Ca イオンの増減でも、それが messenger として働ける様に効率をよくしているの であろうとされている.また特定の細胞においては, 積極的に Ca イオンを貯蔵したり71), さらには Ca イオ ンを細胞外に分泌する74)75)と考えられている、この様 な一定の細胞内 Ca イオン濃度を保つための機構とし て,細胞は種々の工夫をこらしているが34),代表的なも のは(表5)にあげるような機構であると考えられて いる34)

このうちでも Ca-ATPase は Ca チャンネルと並び Ca イオン 輸送に 果す 役割が大きいとされてい る^{74)~76)}. Ca-ATPase は一般に細胞膜・筋小胞体・ミ トコンドリアに存在し細胞内 Ca イオンの能動輸送系 として働くが,これ以外に筋収縮に関与するミオシン ATPase や繊毛運動に関与するダイニン ATPase な ど幾つかの異なった種類の物が存在する.またミトコ ンドリアは ATP が関与する Ca イオン取込み機構, 保持機構さらに free な放出機構をもち、主として細胞 表 5

Ca[#] regulating mechanism



内全体の Ca イオン濃度を調整していると考えられて いる^{77)~81)}.

この様な背景から、Ca-ATPaseの局在が興味をも たれ近年その検出が試みられてきたが、初期の酵素組 織細胞化学的方法ではCaイオン自身が反応の activator でなく補促剤としてもちいられたり⁸²⁾⁸³⁾, 至 適 pH で浸漬されていない⁸⁴⁾など数多くの基本的な問 題点が指摘された. これらを解決して Ando ら87)88)に よって新しい検出方法が提唱され、 心筋をはじめとし た筋組織で組織化学的検出がおこなわれ76)88)90)満足す べき結果が得られている、上皮細胞でも検出が試みら れ多くの報告がなされている. 視細胞外節においては、 Caイオンは光受容過程における光刺激変換系の重要 な因子と考えられている³⁴⁾⁸¹⁾.従って視細胞外でCa イオンの動きもまた極めて活発であろうと考えられ, 網膜色素上皮細胞が視細胞外の Ca イオン調整に関与 して一定の環境を形成する働きをしていることは大い に可能性があり、この事も一種の機能的な barrier 機 構と言えるのではないだろうか.実際,網膜色素上皮 細胞にはかなり Ca が多く存在するという報告もみら れる91).

(図8)に網膜全体の、(図9)に網膜色素上皮細胞 における Ca-ATPase 活性の局在を示す.このように、 網膜色素上皮細胞では反応産物は basolateral の原形 質膜とミトコンドリアに陽性であり、apical 側の膜に は反応が認められない.ここで興味あることに、本酵 素活性局在が網膜色素上皮細胞と同様の働きをすると 考えられてきた脳室脈絡膜叢 choroid plexus (図10)43) やパラフィーゼ paraphyse(図11)の上皮細胞⁷⁰⁾⁷⁶⁾では apical に著明で、網膜色素上皮細胞とは全く異なる局 在を示す、これ以外の組織でも,例えば気道上皮細胞88) では活性は apical 側の細胞膜に局在し、胃臓の duct cell⁸⁷⁾や毛様体の無色素上皮細胞⁹⁰⁾では反対に basolateral 側で活性が強い. ミトコンドリアにおける 活性は活発な Ca イオン輸送や貯蔵に関与する細胞に 発見されていることより76)81)87)~90),おそらくは網膜色 素上皮細胞もその範疇に入るのであろうと考えられる が、basolateral における原形質膜の活性は何を意味す るのであろうか、それよりも、網膜色素上皮細胞と脳 質上衣細胞とでは全く異なる細胞内局在を示す。 例え その発生学的originが同様であるとしても、Ca-ATPase 活性の極性に関しての結果からは、両細胞が Ca イオンに関しての機能的 barrier として全く同一 機能を有しているとはとても考えにくい.

(Adenylcyclase • Guanylcyclase)

本酵素は ATP および GTP から環状 nucleotide で ある cAMP および cGMP を産生する酵素である.環 状 nucleotide は、1958年 Surtherland⁹²⁾によってその 存在が明らかとされ、その後多くの研究により、細胞 における重要な second messenger と考えられてい る. ホルモンや neurotransmitter などの外的因子が細 胞膜の特有な receptor を刺激すると、それに連動する





cyclase が活性化されて cyclic nucleotide を産生し, これらが second messenger として細胞内小器官に作 動し様々な機能がおこなわれている³⁴⁾⁹³⁾⁹⁴⁾.(表 6)に その産生と分解の模式図を示す.上皮細胞における cyclase 活性の存在も活発に研究され,様々な細胞機 能との関係が論議されているが,網膜色素上皮細胞に おいても本酵素の存在は生化学的に証明されてい る⁹⁵⁾.

そこで問題となるのはその網膜色素上皮細胞におけ る局在性であるが、Fujimoto らが開発した DMSO を 使用する組織細胞化学法96)をもちいて adenylcyclase を検出したのが(図12)である.反応産物は apical の 細胞膜に局在しているのがわかる。一方 guanylcyclase 活性も網膜色素上皮細胞の apical の細胞膜に局 在するが(図13, 14), adenylcyclase とは異なり著明 な活性が視細胞外節にもみられる。 生化学的研究から 視細胞外節における光刺激変換機構において、 ロドプ シンが光によって bleach されたのち外節原形質膜の Naチャンネルを閉じて視細胞の過分極を惹起する second messenger は、Ca イオンと共に cGMP ではな いかと考えられている97)98).従って視細胞外節におい ては adenylcyclase より guanylcyclase 活性が優位で あるとされ⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾, 組織細胞化学的に adenvlcvclase で はなく著明な guanylcyclase の局在が視細胞外節にお いて検出されたことは、われわれの結果の正当性を示 しているものと思われる.

これに対して、網膜色素上皮細胞の apical 側の細胞 膜ではこれら両酵素共発生の段階から陽性であっ た¹⁰¹⁾. つまり、網膜色素上皮細胞の apical の原形質膜 には cAMP 系の receptor と、cGMP 系の receptor も 共存していると考えられる. Ogino ら¹⁰²⁾は培養網膜色 素上皮細胞をもちいた実験から、網膜色素上皮細胞の 概日的な視細胞外節貪食作用は、視細胞側からの刺激 因子であるメラトニンが網膜色素上皮細胞 apical 側 の細胞 膜内 receptor-adenylcyclase 系に作用し、

cAMPを messenger として貪食を停止させること と、逆にタウリンが guanylcyclase-cGMP 系に働きこ の停止作用を解除して貪食を再開することでコント ロールされているのではないかとの仮説を提唱した. われわれの示した apical 側の細胞膜における両酵素 の局在はこの機構に一部関与しているのかもしれな い、それだけではなく、もっとより多くの刺激因子に よって網膜色素上皮細胞が様々に対応できうる可能性 を示した結果であるとも考えられるだろう.加えて、 網膜色素上皮細胞の gap junction にもこれらの酵素 活性が陽性であることが明らかとなった(図12,14). ある種の細胞ではgap junction に cylclase が局在 し¹⁰⁴⁾, ATPase などと共に¹⁰⁵⁾細胞間連絡に関与する ことが明らかとなっている. RPEの gap junction に おけるこれら酵素の局在も RPE 間の細胞連絡となん らかの関係があるのかもしれない.

(cAMP または cGMP-phosphodiesterase)

本酵素は cyclase とは逆に, cAMP あるいは cGMP を分解する酵素である.(表6)のように cAMP は cAMP-phosphodiesterase(PDEase)により分解され, cGMP は cGMP-PDEase で分解される. つまり cvclic nucleotide のレベルはこれら産生および分解酵素の両 者によってコントロールされるといえるだろう.現在 までの本酵素に対する酵素組織細胞的検出法の基本原 理は以下の通りである。基質である cAMP や cGMP が cyclic mononucleotide phosphodiesterase によっ て分解され 5'nucleotide (5'AMP または 5'GMP)へと 分解される課程ではリン酸の放出がないため,反応産 物である 5'nucleotide をさらに 5'nucleotidase によっ て加水分解させ、この二次的反応の課程で遊離された リン酸と補足因子である鉛イオンとを結合させ、最終 反応産物であるリン酸鉛として組織化学的に検出す る。一般に浸漬液に加えられる外因性の5'nucleotidase として各種の蛇毒が用いられているが105)106). これに含まれる 5'nucleotidase 以外の各種分解酵素の 存在は、浸漬液の不安定化さらには形態の破壊という 組織細胞化学には時として到命的な問題を含んでい る. さらにもし検出しようとする組織にもともと無視 出来ぬ程度の内因性の 5'nucleotidase 活性が存在して いる場合には、反応が cvclic mononucleotide phosphodiesteraseによるものかあるいは内在の5'nucleotidaseによるものか判別困難な危険も出てくる. この事は固定によって簡単に失活するような特異性の ある cvclic mononucleotide phosphodiesterase 活性



表 7



暗状態

を検出しようとする場合には決して無視出来る事では ない.

そこでわれわれは内因性の 5'nucleotidase をもちい る新しい方法を提唱した107)~110). (図15, 16)に示す様 に、視細胞外節では cGMP を基質にすると著明な反応 が見られるが、一方 cAMP を基質にすると反応は著明 に減弱し(図17), Panbacker¹¹¹⁾や Chader ら¹¹²⁾の生化 学的研究の結果113)とまったく一致する.これらの結果 は、視覚生化学研究者がいう、明状態ではcGMP-PDEase が活性化され,その結果視細胞外節原形質内 cGMP レベルの低下が原形質膜 Na チャンネルを閉 塞して過分極を起こす(表7)という説を裏付けるも のである.ところが網膜色素上皮細胞では cAMP を基 質にしても (図18) cAMP を基質にしても (図19), ほ ぼ同様に apical 側の原形質膜に反応が認められ る114)~117). このことは先程示した網膜色素上皮細胞の apical 側の膜に cyclase がどちらも認められたことを 伴せて考えると興味深い、つまり網膜色素上皮細胞の apical 側には細胞内 cAMP も cGMP のレベルをコン トロール出来得る酵素系が存在し、ここでは視細胞外 節における様な cGMP の優位性はないのである.とす れば他の細胞でいわれる様に cAMP と cGMP はなん らかの機能に対して互いに干渉し抑制しあう Yin明状態

Yan 説¹¹⁸⁾が行われるのではないだろうか. 例えば実験 的に網膜色素上皮細胞における水輸送は cAMP ある いは PDEase の特異的阻害剤である IBMX (図20) で 非常に強い抑制をうけることが知られ, 網膜から脈絡 膜への水の流れをコントロールしているといわれてい る¹¹⁹⁾. この様な刺激伝達系酵素の apical 側細胞膜の 局在は, 水の輸送調節という重要な barrier 機能が網 膜側からの因子によって行われる可能性を示している のかもしれない. さらに興味深いのは, 同様な生理学 的機能を持つとされる脳質上衣細胞では cyclase 活性 と同様に, phosphodiesterase 反応は同一条件では全 く検出されず対照的である.

(GTPase)

Ca-ATPase の結果で示した様に,網膜色素上皮細胞の apical 側の原形質膜には ATPase 活性は検出されなかった.ところが基質に GTP をもちいてわれわれが開発した GTPase 活性検出液¹²⁰⁾で反応させたところ,(図21)の様に著明な反応が認められる.電子顕微鏡で観察すると,視細胞外節先端部あるいは網膜色素上皮細胞 apical 細胞膜において著明な活性が認められた(図22).Wheeler ら¹²¹⁾は視細胞外節において, 光ーロドブシン反応後の cGMP-PDEase 活性上昇には GTPase 活性が必要であると報告した.詳しく述べ





ると, GTP と GTPase をもつポリペプチド複合体が 必要であり、これは現在 G-protein とあるいは transducin と呼ばれている. これで視細胞外節においては、 光一 ¤ ドプシン—G • protein-cGMP • PDEase という 一つの系が考えられているが122)123),他の細胞におい ては、この G-protein が adenylcyclase に働くという 報告もある. 例えば、赤血球膜ではエピネフリンとい う刺激にたいして β·adrenergic-G·proteinadenylcyclaseという系が考えられている(表 8)^{124)~126)}. 網膜色素上皮細胞の apical 原形質膜には adenylcyclase 活性も著明であるので、この GTPase 活性がこのどちらの系に関係するのかは今後の問題点 である.ただどちらであるにせよ,網膜色素上皮細胞 の原形質膜は basolateral 側では ATP 優位であり, 逆 に apical 側の原形質膜は視細胞外節と同じく GTP 優位という膜基質特性に関しても異なるという結果が 得られたことは興味深い. ところが, 脳質上衣細胞で は先程のように apical で ATP 優位であり、しかも cyclic nucleotide 系酵素は GTPase 活性を含めて全 く検出されない、

2. 網膜毛細血管内皮細胞と脳毛細血管内皮細胞

1960年代になって、電顕的観察から脳毛細血管と網 膜毛細血管は共に隣接する内皮細胞膜の外葉が tight junctionによって完全に閉鎖されさらに細胞膜に fenestration も存在しないことが示され,他の組織に おける毛細血管の構築とは異なることが明らかになっ た²⁶⁾. この様な構築においては、電顕的 tracer の細胞 内自由拡散は勿論のこと fenestration や細胞間を通 過しての侵入も認められないし5)8)9)127)~133), それどこ ろかこの両血管とも通常は pinocytotic vesicle によ る輸送も非常に数少ないとされている8)9). そのため, これら毛細血管内皮細胞を通過しての輸送は、ある種 の carrier-mediated や輸送関連酵素によるものでは ないかと考えられてきた13)24)25)134)~142)、たとえば多く の上皮細胞と同様に tight junction を境にして管腔 luminal 側細胞膜と反管腔 antiluminal 側細胞膜とで の活性局在が異なることにより、ある種の物質の輸送

方向や選択性が決定されるという論理である¹³⁸⁾¹⁴⁰⁾¹⁴¹⁾.この様にtransendothelial transportにかなりの依存性を示すことは、これら血管内皮細胞におけるミトコンドリアの数が他の毛細血管細胞に比べて非常に多いこととも関連するといわれている¹⁴²⁾¹⁴³⁾.

これ以降多くの研究者によって幾種類もの酵素活性 の検出、たとえば Na-K-ATPase や alkline phosphatase 活性の検出が試みられた. ところがこれらの 酵素は細胞膜には局在するものの, luminal 側細胞膜 と antiluminal 側細胞膜とでの明瞭な相違は見出ださ れなかった. 1984年 Inomata ら145)はさらに多くの酵 素活性について検討し、中に luminal 側細胞膜と antiluminal 側細胞膜とでの明らかな局在性の相違を 見せる酵素活性があることを報告し、これまで言われ ていた, 脳毛細血管内皮細胞が metabolical な意味に おいて細胞膜極性 polarity を持つことを証明し、これ らの機能が少なくとも BBB の選択的透過性に関与し ているとした. そこで, これらの酵素群について脳毛 細血管内皮細胞と網膜毛細血管内皮細胞における局 在,活性の相違について比較検討を行うことは,両者 の barrier としての機能を比較することは大いなる意 味を持つものと考えられる。

(Thiamine 系酵素活性)

ビタミン B1 は体内でリン酸エステル化されてチア ミン 2 燐酸として糖代謝に重要に果たしている. thiamine pyrophosphatase 活性はこの thiamine diphosphate を thiamine monophosphate へと分解し, cocarboxylase 量を調整することで代謝を調節してい る¹⁴⁶⁾.本酵素は一般に Golgi 層板に見られるが,神経 細胞では細胞膜にも認められている¹⁴⁷⁾¹⁴⁸⁾.

脳あるいは脊髄毛細血管において本酵素の局在を見 ると明らかに anti-luminal 側の細胞膜のほうに著明 な活性が検出される(図23).ところが全く同一動物に おいて同条件下に本酵素を検出してみると,網膜毛細 血管内皮細胞においては反応は認められるものの(図 24),電顕下での反応産物は luminal, anti-luminal 側 の細胞膜にも均一に見られる(図25).つまり,この酵 素系に関しては脳毛細血管内皮細胞と網膜毛細血管内 皮細胞とでは全く異なる極性を示す.

thiamine triphosphatase 活性は thiamine triphosphate を thiamine diphosphate とリン酸に加水解す る酵素である. 神経組織においては, thiamine triphosphate はビタミン B1 の活性型でないかと言われ, あ る種の脳脊髄疾患においてその欠乏が認められてい

る¹⁴⁹⁾.本酵素反応も脳・脊髄毛細血管内皮細胞では luminal と anti-luminal 側の細胞膜とで活性の相違が 認められ, anti-luminal 側の細胞膜で反応が著明であ る(図26).ところが本酵素活性は先程の thiamine pyrophosphatase 活性とは異なり,網膜毛細血管内皮 細胞においては全く活性が認められず(図27),この酵 素系に関しても両者での極性は異なる.

(その他の phosphatase 活性)

Inomata ら145)の報告によれば、彼らが検討した各種 D phosphatase, Mg-ATPase · Non specific alkaline phosphatase · K-NPPase · 等の中で, luminal と antiluminal 側の細胞膜とで活性局在の相違つまり極性を 示したものに 5'nucleotidase 活性がある. この事は, Betz ら138)140)141)によってすでに脳毛細血管内皮細胞 の fraction 分画による生化学的定量では特定の fraction 中に活性が強いと報告されていたことである.こ れらの結果からその fraction には anti-luminal 側の 細胞膜成分が多く含まれると推測されている. Non specific alkaline phosphatase は全ての膜分画におい て優位の差がないとされ、この事は組織化学的にも確 認されている. Na-K-ATPase の部分反応である K-NPPase はある特定の分画に多いとされているが、組 織化学的にこの活性は脳毛細血管内皮細胞膜自身には 検出されていない.

5'nucleotidase は AMP・GMP IMP 等の nucleotide 5'monophosphate を分解する酵素であり, nucleotide の糖とリン酸との間にエステル結合を加水解する。例 えば AMP が本酵素によって分解されると adenosine を産生し, GMP であると guanosine が産生される(表 6).本酵素が血管に存在することの組織化学的歴史は かなり古い¹⁵⁾. そもそも血管は adenosine 量が減少す ると血流量が減少するという報告もみられる¹⁵¹⁾. これ 以外にある種の物質の血管内から外方への輸送と関係 するとも言われている.

5'nucleotidaseの組織化学検出法は、古く1947年 Gomori が alkaline phosphataseの浸漬液において adenylateにかえることにより、さらに1957年には Wachstein と Meisel¹⁵²により acid phosphatase 浸 漬液を基本にした反応液が報告されている.いずれに せよ、検出の原理は酵素による基質の加水分解により 生じたリン酸を金属イオンで補足し、その場に沈澱さ す方法である.しかしながら、補足剤として用いた Pb 濃度が高いため、反応液が作成時から白濁したすると いうような欠点が指適され、必ずしも良好な結果が得 られていない情況であった¹⁵³⁾¹⁵⁴⁾. そこで, この Wachstein と Meisel 法¹⁵²⁾を基に反応液中の金属濃度を低 下させて比較的安定した状態に持っていたとされるの が, Uusitalo-Karnovsky 法¹⁵⁵⁾である. 一方, Robinson ら¹⁵⁶⁾は最近になって, Pb のかわりにセリウム Ce を補 足剤として用いる組織化学法を報告した. Ce を補足剤 として用いる方法は, 多くの phosphatase 検出に際し て, Pb を用いた場合に起こる濃度依存性酵素阻害作用 あるいは基質の Pb による分解などの欠点が少ないと される. ところが, この Ce 法は現時点では第一次反応 産物を光顕レベルで可視反応産物に変換する方法がな く, そのことが組織化学法として一つの大きな neck になっている.

われわれが、網膜において本酵素の組織化学的検出 を試みた時, Wachstein と Meisel 法¹⁵²⁾では, 前述した 浸漬液の白濁が決して無視できない程度に起こり,し かも反応自体は固定条件を下げたにもかかわらず非常 に弱い情況にあった. Uusitalo-Karnovsky 法155)にお いても白濁は存在し、反応も弱く加えて artifact であ る核染色も認められた. Robinson の Ce 法ではやはり 浸漬液に白濁を生じるが、それよりも本法は光顕によ る観察ができないため非常に限局した部位での反応の 観察には困難さが伴う.反応液の白濁は別として、な ぜこれらの方法によると網膜における 5'nucleotidase の反応自体が弱いのであろうか.われわれは Reisの生 化学的報告157)における,本酵素の至適 pH がかなり広 い. あるいは組織や動物によりかなり異なるという点 に注目した107)~110). これまで述べた反応液は、全てそ の作成 pH を7.2~7.4の中性領域においている. とこ ろが、脳や肝臓においては pH がそれより高いとの報 告もみられる、そのため酸性およびアルカリ性の領域 において検討した結果,網膜においてはアルカリ性の 方に強い至適 pH を示すことがわかった.ただ,反応 pH をアルカリ性に移行さすと、この問題は勿論中性 領域においても無視出来ぬ問題であるが, nonspecific alkaline phosphatase 活性の混入という危険が生じ る. そこで反応液にnonspecific alkaline phosphatane 活性の特異的かつ強力な阻害剤である bromotetramisol¹⁵⁸⁾を添加した. さらに、賦活イオンとして、Mg よりその効果が強い Mn イオンを添加し活性のより 増強を期した.

以下にその浸漬液の組成を示す.

5'-nucleotidase (Ueno 6^{107)~110})

グリシン-KOH 緩衝液 (pH 9.0) 250.0mM





AMP または GMP (Na 塩)	10.0 mM
塩化マグネシウム	3.8mM
レバミゾール	2.5mM
クエン酸鉛(KOH 液中)	4.0mM
	(最終 pH 9.0)

この方法を用いて、網膜を浸漬したところ、(図28) の様に非常に強い反応が網膜視細胞の細胞膜に限局し てみられるようになった。反応は内方においてちょう ど視細胞とニューロン細胞が連絡する外網状層のほぼ 中間部分までに限局する。本反応はこれまで細胞膜に 限局してみられ、そのため細胞膜マーカー酵素ともい われている。視細胞においても cAMP あるいは cGMP 代謝に重要な関与があるとされ、その代謝がさ かんな視細胞細胞膜に反応を検出したことは意義深 い. ところが, 脳脊髄毛細血管細胞膜で見られるよう な anti-luminal 側細胞膜の方が活性が著明という結 果(図29)は, 例え固定条件を下げても反応自体が網 膜毛細血管内皮細胞膜においては全く見られず(図 30),この両網細血管細胞膜における酵素活性が全く異 なることが示された.

3. BRB および BBB 構成細胞における機能関連酵 素局在の barrier 機構への関与 まとめ

以上,網膜色素上皮細胞と脳質上衣細胞および網膜 毛細血管と脳・脊髄毛細血管内皮細胞というこれまで その形態学的特徴から barrier としての共通点が多い ように推定されてきた細胞における,ある種の物質輸 送や移動に関与すると考えられる酵素の組織化学的局 在性の面からの比較を行ってきた.しかしながら,こ

昭和63年12月10日

れら一連の実験を行ってみた結果,驚いたことにこれ ら酵素活性は,時には一方でしか検出されなかったり, 例え共に検出された場合でも,全く異なる細胞内局在 を示したことである.

この章を終えるにあたってそのことをもう少し整理 して考えてみたい.まず,網膜色素上皮細胞であるが, われわれが本篇において示した酵素活性だけに限って みても、網膜色素上細胞の細胞膜においては basolateral と apical とに明瞭な局在の相違を示し た. つまり, 同じ網膜色素上皮細胞の細胞膜とはいっ ても junctional complex を境にしてはその膜の性格 や機能にはかなりの違いがあるものと思われる(表 9). 形態学的には、これまで barrier としての働きに 細胞間に存在する tight junction が重要視された. し かしながら、極論ではあるが、(表10)に示す様に網膜 色素上皮細胞が junctional complex でつながってい る異なった二枚の連続した機能が異なる細胞膜という 様に解釈して見ると、 例えば脈絡膜毛細血管に相対す る基底部細胞膜の機能的 barrier が浮き彫りになって 見えては来ないだろうか. 勿論, その逆の意味での apicalの膜も特性を持っていることは間違いない. こ の点に関しては、網膜毛細血管においてもまったく同 様の解釈が可能と考えられる.

つぎに,網膜色素上皮細胞と脳質上衣細胞における 酵素活性の比較では,網膜色素上皮細胞に検出された 酵素で脳質上衣細胞には検出出来ぬものが多く,この 両者でかなりの相違点がある.その中で,特筆すべき



は Ca-ATPase ではないだろうか. この酵素活性は, 網 膜色素上皮細胞では基底部に, 脳質上衣細胞では apical に活性が顕著であり, その局在に関して言えば 全く逆, つまり Ca イオンの能動輸送の方向が全く異 なっている.

この様な膜酵素極性の相違は、脳・脊髄と網膜にお ける毛細血管内皮細胞でも見られた.これらは、形態 的によく似ているからというようなことからだけで、 これら両者の機能が全て同じであると論じることが早 計であることを示す結果である.それは単に細胞間は しっかりと tight junction で守られているという点だ けが同じであったにすぎないだろう.酵素活性だけで 論じることもまた些か早計であると言う謗りはまぬが れないにしても、この点だけから見ても、これらがと



ても同様な細胞としての機能を持っているとは信じ難 い. そのことは結局機能という点から見た barrier と しての面からも再度検討せねばならないことを示して いる. これらの上皮および内皮細胞は発生学的な点で 同一 origin ともされている. その点から, これら細胞 を同様なものとして論じられる研究者もある. それは それで傾聴に値する意見ではあるが、考えてみれば、 細胞の発生の origin が同一であるからといって、やは り細胞は周りの環境やその組織の持つ特性によって変 化するのかもしれない、例えば、眼球組織において、 発生が全く同一originである網膜色素上皮細胞と毛 様体色素上皮細胞それに虹彩上皮とが全く同一の機能 を持っているという証拠など何もない. さらに、網膜 色素上皮細胞はBRBに関与し、毛様体上皮細胞は BAB に関与していることも明らかである。われわれ の前にはまだまだ解決すべき基本的な問題が横たわ 3.

III 網膜毛細血管および脈絡膜毛細 血管における細胞膜荷電バリアー surface charge barrier の存在に ついて

これまでのbarrierに関する幾つかの総説を読まれ た方でも、これから述べる「細胞膜荷電バリアー」と いう言葉は耳慣れないものと思う。実際にこの様な現 象を発見したわれわれにも、そのbarrier 機能をどの 様に呼べば良いのか、果たして「細胞膜荷電バリアー」 と呼称してしまうことが適切であるのかどうかの確証 はない。それではこの細胞膜荷電バリアーというもの がいったいどのようなbarrierとしての現象や機能を 意味するかを説明しなければならないが、われわれが この様な結論に達した背景にはこれまでに行われてき た二つの大きな研究の流れが存在する。まず、これら の歴史的背景を説明してから、本論に入ったほうが理 解して頂きやすいものと考える。そのためには、一旦 話を昭和36年まで遡って論述したほうが良いだろう.

1. これまでの tracer 研究について

緒言の中で述べたように,barrierの形態的研究は血 管や組織にその存在が明らかに他のものと鑑別可能な 可視物質,つまりtracer,を注入し,組織切片の上で それら物質の局在する位置からその浸透性を検討する ことにあった.初期には光顕レベルで行われた実験も, その分解能に限界があるため詳細にはあと一歩踏み込 めず,その後の研究の主流は光顕レベルから電顕レベ

ルヘと移行していった. 眼科領域において最初に用い られた電顕的 tracer は炭素粒子 colloidal carbon で あり,昭和36年の日眼に山田が報告している159)次い て桜木¹⁶⁰⁾は43年日眼にトロトラスト, colloidal thorium dioxide 注入実験の研究結果を発表した. これら の tracer 注入実験は炎症等による毛細血管透過性の 亢進を見る意図で行われたものであるが、これら tracer は網膜網膜血管や脈絡膜毛細血管から直接的 に漏出する傾向は全く認められず、かえって正常にお いてはこれら組織は tracer を阻止するという事実が 明らかにされた. しかし, colloidal carbon の粒子径は 約250A であり、トロトラストのそれは約150A と、一 般の生理的物質のそれに比べるとまだかなり巨大であ るといえる. そのため, さらに粒子径が小さい tracer の注入が試みられ,登場してきたのがフェリチン粒子 である.フェリチン粒子は分子量約900.000であり、そ の粒子径はおよそ100~120Aの含鉄タンパクである。 フェリチンは分子の中央部を電子密度の高い鉄ミセル として占め,透過型電顕で十分なコントラストを示し, 個々の分子を同定することも可能である161).その性質 が利用され,電子顕微鏡的 tracer として用いられるよ うになったが、臓器や動物種の違いによってその毛細 血管透過性がかなり異なるとされている. たとえば腎 glomerulus の毛細血管では fenestration を自由に通 過するが、筋毛細血管では pinocytosis のみにより透 過するとされている^{162)~164)}.一方, 脈絡膜毛細血管にも fenestration が存在し165)166), 家兎においてはフェリチ ンの fenestration からの通過がわずかは見られると いう意見と^{165)~167)}, pinocytosis によってのみ Bruch 膜側へわずか透過するとする意見168)とに別れ、さらに ラットではこれらのどちらの現象もみられていな い169)170). ところが、このフェリチンにしても粒子径が 100Å以上のものであり、例えば生理的な意味でその透 過性が注目されるタンパクすなわちヘモグロビンやア ルブミンの粒子径のオーダーである数十Åに比べると はるかに大きい. そこでほぼ20Åの粒子径である硝酸 ランタン colloidal lanthanum がもちいられ た171)172). 血液中に注入された硝酸ランタンは即座に 脈絡膜毛細血管の fenestration を通過して Bruch 膜 を染色し, さらに網膜色素上皮細胞細胞間隙へと入り その tight junction で塞き止められた¹⁷³⁾.

ここまでの研究で用いられた tracer を比較してみ ると(表11), 脈絡膜毛細血管の fenestration の通過に 関しては, その tracer の粒子径が最も重要な因子とな

-	
无	- 11
25	

分	子	径
	-	_

fluorescein	(5.5)~11 Å
colloidal carbon	250 Å
throtrast	100~150 Å
ferritin	100 ~ 120 Å
colloidal lanthnum	20 Å
dextran	125 ~ 225 Å
glycogen	200 ~ 300 Å

るかの印象を受ける.実際に、いくつかの論文には、 outer retinal barrier の構成は脈絡膜毛細血管・Bruch 膜・網膜色素上皮細胞からなり、物質の透過性は、ま ず巨大なものは脈絡膜毛細血管の fenestration を通 過出来ず, それより小さいものは通過しても粒子径が ある程度大きいと Bruch 膜で補足される、さらに小さ なものはこの両者を通過するが. 最終的には網膜色素 上皮細胞を通過することが出来ないと要約されてい る。ただし、硝酸ランタンは分子量こそ小さいものの 生理的物質ではなく、それどころかかなり生体に対し て強い毒性を持つ. これは生体注入する tracer として は致命的であり、その毒性が強ければ透過性そのもの が毒性と生体の耐性との関係によって成立してしまう 危険がある、(勿論、透過しないと言う現象に関しては、 ある程度の意味を持つものであるが)その観点から出 来るかぎり粒子径が小さくしかも出来得るかぎり毒性 も少ない tracer の出現が期待された.

Straus^{174)~178)}, Karnovsky¹⁷⁹⁾, Graham と Karnovsky¹⁸⁰⁾は 3-3'diaminobenzidine を電子供与体 として働かすことにより, peroxidase (西洋ワサビか ら抽出した peroxidase のため horseradish peroxidase HRP と呼ばれる)が過酸化水素により茶褐色・ 不溶性の色素となること、さらにこの色素は電顕的に も可視性である¹⁸⁰⁾¹⁸¹⁾ことを報告した、peroxidase は 酸化還元酵素の一種であり,必ず過酸化物に由来する 酵素を介して酸化作用が営まれるという特徴を持つ. この反応には(表12)に示すような二種の基質すなわ ち水素受容体と水素供与体が必要である。前者の代表 が過酸化水素であり、後者の代表が芳香族アミンすな わち benzidine 系の薬品である. その反応を一般式で 示すと表のようになるが、即時に反応が完成するので はなく、Complex I. II. III と呼ばれる酵素一水素受容 体中間結合体の発生が認められている。 この結合体が 最後に酵素と水とに分解し, 遊離する原子状の酸素が 水素供与体を酸化・発色せしめる。そもそもこの方法 は細胞内に存在する peroxisome の検出のために開発 されたものであるが, peroxidase 自身が比較的容易に 抽出可能であるため、しかも分子量40,000、粒子径約 50~60Åとかなり微粒子タンパク酵素であり、その毒 性も少なく類似の径を持つタンパクなどの物質の透過 性を観察するにはかなり期待出来得る tracer である と考えられた。

HRPを用いた tracer 研究は現在までも広く各組織 で行われてきた. 網膜毛細血管や脈絡膜毛細血管にお ける HRP の通過性ついても, Shiose¹⁸³⁾をはじめこれ までに多くの研究結果が報告されている¹⁸⁴⁾⁻²⁰³⁾. 血管 内に注入された HRP は, 網膜毛細血管から漏出する ことはないが, 脈絡膜毛細血管からは即座に fenestration を通過し Bruch 膜及び RPE 細胞間隙を染色し, 最終的に RPE の tight junction および細胞膜によっ て塞き止められる. これらの多くの実験結果は一致し, かなり信頼性の高いものと考えられ今日に至ってい る. この HRP による実験結果および先程から述べて きた他の tracer 実験結果から, 脈絡膜毛細血管を透過 するかしないかは, その物質の粒子の大きさによって 抑制されるという概念がさらに一般化したことは事実 である. 言い換えれば, 脈絡臓毛細血管に存在する



表 13

	分子量	分子径
HRP	40000	50~60 Å
catalase	240000	52 Å
myeloperoxidase	160000	44 Å
lactoperoxidase	82000	36 Å
hemoglobin	68000	28 Å
myoglobin	17800	17 Å
cytochrome C	12300	15 Å
heme-undecapeptide (microperoxidase)	1880	10 Å
heme-nonapeptide	1630	10 Å
heme-octapeptide	1550	10 Å

fenestrationの大きさを潜り抜けられるかどうかとい う物理的な因子が係わる問題であるといえ、その概念 に矛盾する結果はこれまで一見したところ何もない.

2. 螢光眼底造影と tracer 実験との相関について

先ほど述べたように、HRPの粒子径は50~60Åで ある.したがって、HRPより粒子径がさらに微細なも のに関しても、fenestrationの大きさという物理的な 制限という点から考えれば当然透過していくものと推 測されてきた。硝酸ランタンはそれよりも更に小さく 約20Åであるが、このtracer は通過が阻止される場合 にはある程度の信頼性があるが、脈絡膜毛細血管の様 に通過してしまう場合には、その毒性による細胞障害 の影響を頭から無視してしまうのはいささか都合が悪 い.これら tracer の透過性の問題は、生理的な意味合 いでも重要であるが, BRB を考える場合には螢光眼底 造影所見との相関性という点で臨床的にもわれわれに とって特に重要な意味をもってくる.

螢光眼底造影において、barrierの破綻と特に関連す るのは螢光眼底造影色素である fluorescein が inner barrier である網膜毛細血管と outer barrier である網 膜色素上皮細胞をこえて漏出現象 leakage を起こす ことであろう. outer barrier の障害としては,中心性 漿液性脈絡膜症や脈絡膜毛細血管よりの新生血管を伴 う黄斑症等による網膜剝離があげられる. inner barrierの障害としては、糖尿病性網膜症や網膜静脈閉塞 症における毛細血管閉塞性変化のための網膜浮腫があ げられる、これら障害の in situ での変化を見るために これまで様々の方法で障害を実験的に惹起し, HRP に代表される tracer の注入187)~203)や螢光眼底造影に 使用する fluorescein を注入して凍結乾燥し螢光顕微 鏡による観察204)~207)が試みられてきた。それらの観察 結果から,網膜色素上皮細胞や網膜毛細血管という細 胞レベルでの障害がある場合には, tracer や fluorescein の invasion が起こることが確かめられ, 臨床的に 推測されてきたいくつかの仮説の正当性が証明され た.ただここで問題になる点がなかったわけではない. まず,fluorescein 注入による観察は光学顕微鏡のレベ ルでしか行えないという制約がある。しかも螢光顕微 鏡という通常光学顕微鏡よりさらに解像力の点での制 約があるため、細胞の微細な障害というレベルまで踏 み込むことなど到底不可能である.したがって、今後 われわれが治療や予防という点で大いに考えねばなら ない,疾患の初期における細胞の微細変化の観察につ いては期待できる観察方法ではない. HRP 等の電顕

表 14



的に観察可能な tracer は電子顕微鏡的なレベルでも 観察可能であるが、fluorescein の粒子径である5 ~11Åに比べれば粒子径という点のみに限ってもまだ まだずれがあり、得られた結果について直接的に比較 することはまだまだ困難である。

microperoxidase (MP) について

一つの試みとしては、fluorescein になるべく粒子径 が近いより 微細な電顕 tracer の使用を試みることで あろう.その様な眼科だけの問題を少し離れて、HRP よりもさらに 微細に tracer の開発の重要性は各組織 の生理的な現象を解明するためにも非常に重要であ り、これまでも盛んに行われてきた。先ほど述べた HRP の検出反応を用いて、HRP に似たしかもより微 細な粒子の組織細胞化学的検出が試みられた.それは、 例えば毛細血管の fenestration の透過性の観察や、 tight junction の透過性をより 微細な tracer を用いる ことで観察する 必要に迫られてのことであっ た²⁰⁸⁾²⁰⁹⁾.それら tracer の一覧表を(表13)に示す。こ こにあげた agent は全て peroxidase 様活性 peroxidatic activity の性格を持つものであり、その検出法 理論は HRP と全く同じである²¹⁰⁾²¹¹⁾.

この中で, catalase は52Åというほぼ HRP と同様 かそれ以上のの粒子径を持つし^{212)~215)}, myeloperoxidase (144180)215), lactoperoxidase (136216), hemoglogin は28²¹⁷⁾と未だ比較的大きい存在である. myogloblin は17²¹⁸⁾²¹⁹⁾, cytochrome c は15¹⁸¹⁾とかなり微細 になるが、そのヘムグループが粒子の中に埋もれてい ることから peroxidatic activity はかなり弱いという 欠点がある. そのため, この cytochrom c という比較 的微細な分子からヘムだけを出来るかぎり取り出せ ば, 粒子径もさらに小さくなるし, peroxidatic activityの増強も見込まれる222)~224). そこで(表14)の模式 図のように cytochrom c を塩酸及び pepsin で処理し アミノ酸を104から11にしたものが、hemeundecapeptide である. これは分子量1,880で、その粒 子径は約10と計測されている²²⁵⁾. しかも cytochrom c と比べると、その peroxidatic activity は約100倍増強 する. この heme-undecapeptide をさらに trypsin で 処理し、アミノ酸を2個落としたものがhemenonapeptide, 3 個落としたものが heme-octapeptide であり、分子量は1,630と1,550で粒子径はおよそ10Å である²²⁵⁾. しかも, これら agent の生体に対する影響 も cytochrom c などに比べると cremaster test の結 果からも非常に少ないという利点も示されてい

る²²⁶⁾. これら微細ヘムタンパクのなかで、hemeundecapeptide は別名 microperoxidase と呼ばれて いる^{222)~224)}.

4. BRB における microperoxidase の tracer 実験

以上から、およそその粒子径が10Åとflouresceinの 粒子径にほぼ等しいmicroperoxidaseやhemeoctapeptideを注入し、その局在を調べることは tracer研究としてはかなりの意味を持つものと思わ れる.実は、われわれが最初に述べた"細胞膜荷電バ リアー"という現象が存在するのではないかというこ とに気付いたのは、まずHRPの注入実験を行いこれ までの網膜毛細血管や脈絡膜毛細血管の透過性に関し てのを報告を再確認し、つづいでmicroperoxidase で も同様に確認のうえ別の実験系に応用しようとしたこ とに始まった.

まずHRP注入実験であるが、材料としてはモル モットおよびラットをもちいた. 体重100g あたり10~ 15mgを大腿静脈より注入し、直後より24時間まで の間隔で灌流あるいは浸漬固定を行った。組織細胞化 学的手技に関しては先程のべた Graham-Karnovsky 法180)に準じて行い227)228), それぞれ光顕と電顕切片を 作製し観察した.これまで述べられてきたように、 HRP は脈絡膜毛細血管を注入後すぐに通過し(図 31), Bruch 膜を通過して網膜色素上皮細胞細胞間隙 に達し(図32), 細胞間 tight junction によって寒き止 められた(図33). 続いて, microperoxidase 注入実験 であるが、体重100g あたり10~15mg と HRP と同量 を注入後 HRP と同様の時間に切片を作製して調べて も, 光顕上では脈絡膜血管や毛細血管管腔にはその酵 素反応が著明に認められるが、その局在や状態は HRPとは異なり、これらの血管から外部へと流出す る傾向が認められなかった(図34). 電顕切片を作製し て、さらに詳細に観察しても(図35)、かなりに時間を 経過した場合わずかに Bruch 膜中や網膜色素上皮細 胞基底細胞膜に反応産物が見られるのみであり(図 36), HRP がこれらの組織を即座に通過するのに比べ ると非常に対照的な結果が得られた. microperoxidase のこのような傾向は、さらに何度も実験を繰 り返したが変わることはなかった。一方、網膜毛細血 管に関しては、これまでの報告の通り229)230), HRP・ microperoxidase 共に管腔内からの流出は全く認めら れなかった.

それでは何故この様な現象が起こったのであろうか. 粒子径から考えれば, HRPの有効粒子径がほぼ

24-(1936)

		表 15	
		有効分子径	pl
HRP	cationic	30.0 Å	8.4~9.2
	neutral	29.8 Å	7.4
	anionic	31.8 Å	4.0
MP		10 Å	4.85

30Åであるのに対して, microperoxidase は10Åであ り、これまでのトレーサー研究から考えられていた、 透過性は物質の粒子径の大きさに依存するという概念 が全く当てはまらない、これは、tracer というものの 本質を考える場合には,非常に興味ある大問題である. 少なくとも脈絡膜毛細血管に関しては, fenestration の口径とは異なる要因が存在しなければ, この様な結 果は得られないであろう. 逆に言うなら, HRP と microperoxidase がもつ何か異なる要素が、この様な現 象を明らかにしたのであろう、そこで、これら二つの tracer の粒子系以外の性質というものを対比してみ た. tracer として粒子系以外に重要な因子は、次のよ うな物が考えられる.まず, tracer 粒子が持つ電荷・ 血液中タンパクとの結合能・peroxidatic activity・粒 子の細胞毒性・組織細胞化学反応の条件など色々なも のがあげられるが、これらの点に関しては Simionescu の非常に詳細を極めた報告があり225), isoelectric point つまり粒子荷電状態以外は問題がないことが明 らかである.そこで(表15)に示した isoelectric point を見ていただくと, microperoxidase は4.85で, われ われが使用した HRP Type II, IX のそれは7.4および 8.4~9.2であることがわかる. つまり, tracer 粒子の 荷電状態としては, microperoxidase は anionic 陰性 であり、われわれが使用した HRP は cationic 陽性な いし neutral 中性である.

この様に tracer 粒子の荷電状態が異なることが, 脈 絡膜毛細血管透過性を修飾する因子であるとするなら ば, tracer に相対する毛細血管細胞膜特に luminal 内 腔側の細胞膜の荷電状態が大いに問題となってくるだ ろう.そこで, われわれは次に網膜および脈絡膜毛細 血管内皮細胞における膜荷電の in situ での研究を試 みた.

5. 網膜および脈絡膜毛細血管内皮細胞における膜 荷電の in situ での研究

Singer と Nicolson による fluid mosaic model²³¹⁾に

日眼会誌 92巻 12号

表 16



よって示されたように、細胞膜は主としてhospholipid からなる脂質とタンパク質とから構成されて いる. 脂質は ion および polar head を外側に向け, 内 方には脂肪酸の chain を伸ばした bilayer の状態で存 在する. タンパク質はこの lipid bilayer のなかに polypeptide chain を折れ込ませ、一部は埋まった形 で, または両側に突出した形で存在する. その表面か ら突出した部分には色々な糖鎖の末端が露出している が、これがその種類によって+か-に荷電している(表 16). そのおのおのの荷電を総合すると, net の状態と しては細胞膜表面は陰性に荷電していると考えられて いるが(polyanionic),結局その程度はどちら側に荷電 している末端が多いか,或いはどの様な局所的集束を 見せるかによるとされる.したがって、もし管腔側に 陰性荷電の局在が著明であれば, microperoxidase の 様に陰性荷電粒子は細胞膜からの反発があり、逆に陽 性荷電を持つ分子は細胞膜に引き寄せられやすい状況 が予想される。

この様な細胞膜の荷電局在を観察する(少なくとも 細胞膜レベルでの局性を観察するためには電顕での観 察が不可欠である)組織細胞化学的方法としては、コ ロイド鉄法 ferric colloid、ルテニウムレット ruthenium red 法あるいはカチオン化フェリチン cationized ferritin 法があげられる.

(コロイド鉄法)

鉄コロイド粒子の表面には無数の FeO2 基が露出している。これらは細胞表面の負荷電基との間に多くの静電結合を形成し、共有結合(50~100Kcal/mol)に匹敵する強固な結合であるとされる²³²⁾²³³⁾.ただ、この方法はpH2.0以上で不安定になり、それ以上のpH領域では使用出来ない点である.そのため、この方法は生理的な条件では用いられにくかったが、Seno 6^{234)~238)}によってコロイド鉄にカコデル酸緩衝液を加えるとそ



26 - (1938)



れ以上の pH 域でも安定することが明らかにされた. そのコロイドである Fe-Cac は正荷電を維持したま ま, pH 1.6~7.6の間で安定である.また,理論的には pH 1.4で染色すればムコ多糖類の硫酸基を,4.0では ムコ多糖の硫酸基とカルボキシル基を,さらに蛋白の 等電顕点以上ではこれらと共にタンパクの酸性基に結 合する.ただし,欠点としてコロイド鉄自体の形や大 きさの点で不揃いである事があげられる.

(ルテニウムレッド法)

本法は Luft²³⁹⁾²⁴⁰により細胞表層ないしは細胞間基 質中の酸性物質の検出に広くもちいられてきた. ルテ ニウムレッドは6価のカチオンであり, 試料中の酸性 基と静電的に結合すると考えられている. ルテニウム レッドが後固定に用いるオスミウム酸と反応すると電 子密度が上がり, 試料切片上で高いコントラストを示 す. ただし, ルテニウムレッドは原則的には細胞内へ 侵入することがないので, 例えば細胞中の構造が細胞 腹と連続するかというような点を検討するには有用で あるが, われわれが行おうとしている, 組織内の荷電 の分布を広く検討するためには適していない.

(荷電化フェリチン)

通常フェリチン native ferritin は等電点 pI=4.6 で、中性領域では陰性荷電である。フェリチン分子の 遊離カルボキシル基を carbodiimide で活性化した 後、N,N-dimethyl-1,3-propanediamine や 1,6diaminohexane 等の R-NH₂形親核試薬と反応させて 4 級か 1 級アミン化合物に変換させると、フェリチン を正荷電状態 (pI=8.5) にできる。これが標識用のカ チオン化フェリチンで、生理的 pH の範囲でも使用可 能であり、コロイド鉄とは異なりその形や大きさは一様である^{241)~244)}. アニオン化フェリチンの方は、通常フェリチンをさらに succinylation し、pI およそ3.4から3.8へと下げて安定化さす^{245)~247)}.

(組織細胞化学的検出法とその問題点)

コロイド鉄や荷電化フェリチンをどの様に組織化学 的に陰性化した部位に局在させるかという方法に関し ては、これまで直接的に en bloc で浸漬させる方法, あるいは section を作成して浸漬する方法が用いられ てきた、ただここで問題となるのは、先程も述べたよ うにフェリチン自身が電顕の高倍率下で充分識別でき るだけの大きさを持った粒子(粒子径約100~120Å) であることである. この事は電顕でその receptor が識 別可能であるという利点とは全く逆の意味で、例えば 生体膜を貫通しないあるいは固定された組織であって も section が光顕レベルで用いるほど厚ければ、(表 17)の左側のシェーマで示すように目的の部位までに 均等な浸透が期待できないという欠点を持つ.実際に, 組織化学的には完全に溶解した物質を組織に浸漬させ た場合でも、均等に局在する限度はおよそ40~50µm といわれている248)~250). 勿論, 直接的に外表に露出し ているような部位における結合部位の観察は en bloc でも充分な結果が得られるけれども, それ以外の部位 になれば sect ion のほんの表面から近い部分だけが旨 くすれば標識されるということにもなりかねない. そ こで、例えば血管内腔 luminal の結合部位などの観察 にはこの様な方法を用いることは好ましくない. Simionescu をはじめ多くの研究者^{251)~263)}は、血管に おけるこれら receptor の詳細な観察を報告している が、彼らの用いたのは lumina 側の細胞膜の receptor の観察には血管内に直接的に潅流注入することであ り, collagen でおおわれる abluminal の細胞膜の観察 では、前処置として collagenase 等の酵素でそれら線 維を除去して浸清を行う方法をとっている254).確かに これらの方法でも, その結合部位をある程度観察する ことは可能であるが、そこに酵素処理という一つの好 ましいとはいえない条件での処置が追加されるため, ある程度局在が修飾される危険もまた増すわけめあ 3.

ここで一つの例を示したい.われわれもまた脈絡膜 血管の陰性荷電部位の検出のために、まず凍結で20 µm 程度の切片を作成して、鉄コロイドで染色してみ た.結果は先ほど述べたように、切片のほんの一部で のみ脈絡膜血管内皮細胞特に luminal 側に結合(図37)

表 18

Freeze fracture labeling

(Pinto da Silva et al., J. Histochem. Cytochem., 29, 917, 1981)

- 1. Infusion in 10-30% glycerol.
- 2. Rapid freezing by liquid propane.
- 3. Crushing with a liq. nitrogen-precooled copper hammer.
- 4. Thawing at 37°C
- 5. Washing in 1mM glycil glycine.
- 6. Reaction with 20/4g cationized ferritin/ml in PBS for 30min, 4°C.
- 7. Washing with PBS.
- 8. Postfixation with 1% osmium tetroxide.
- 9. Washing.
- 10. Uranyl staining.
- 11. Routine procedures for EM.
- 12. Examination under a JEM 100CX EM.

を認めたが、多くの部位では反応がまったく認められ なかったり,あるいは逆に強い拡散傾向が認められた り(図38)、かなり不均一な染色性を示した、これまで、 特に Bruch 膜における荷電状態もまた tracer 通過に 影響があるのではないかという考えから、この領域に おいてもこれらマーカーを用いて検討を行った報告が みられている.しかし、いまいったような浸透性の問 題が重要であるにも拘らず、これまでの報告では切片 での浸漬やひどいものでは en bloc での浸漬を用いた ものもみられる258)~263).中には非常に奇麗な局在を示 して,その機能的意味合いについて論じている報告も 見られるが、いまいったように基本的にその様な方法 で均等な局在を得るのは不可能であり、ほんの一部分 の局在を取り上げて検討してみたところで, その正当 性にはいささか疑問が残る.

freeze-fracture labeling 法

それでは、この浸漬という問題に関してはどの様に 解決へ近ずいていけばよいであろうか. ここに二つの 可能性を示してみたい.まず最初は freeze-fracture labeling 法^{264)~268)}である、この方法は、特に細胞内に 存在するような器官の表面を標識するのに適してい る. つまり浸漬したい部位の表面を奇麗に割断して. 均等に原形質内や細胞小器官の内部をも外方へ露出し た上で標識する方法である(表17). その方法(表18) および実例を示すと269), 視細胞外節内にある円板膜の さらに内部を標識しようとした場合、単に外節をその まま浸漬しても、フェリチンは細胞膜を容易には通過 しないし、さらに円板膜自体も閉鎖された膜であるた め、その膜内部へ浸透するチャンスは非常に少ない、 それならば,外節部において円板膜を含めて,奇麗な 面として割断してしまい,マーカーを浸透させてみた.

表 19

Frozen thin-section labeling (Tokuyasu, J. Cell Biol., 1973)

Fixation: 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.4, 1hr, 4°C

Washing : 0.1M PB, 30min, 4°C.

- 1. Infusion in 2.0M sucrose in 0.1M PB overnight at room temperature.
- 2. Rapid freezing by liquid nitrogen.
- 3. Cryomicrotomy according to the method of Tokuyasu. (J. Cell Biol., 57, 551, 1973)
- 4. Recovering to Formvar coated grids.
- 5. Washing to remove sucrose with PBS containing 10mM glycine.
- Reaction with 20/µg cationized-ferritin (E.Y. laboratory Inc. San Mateo) / ml in PBS at room temperature for 30min. 7. Washing with PBS.
- 8. Refixation with 1% glutaraldehyde for 10 min at room temperature.
- 9. Washing with PBS.
- 10. Uranyl staining.
- 11. Embedding in methylcellulose.
- 12. Examination under JEM 100CX electron microscope (EM).

この方法で、うまく割断された部位を観察すれば、(図 39)のように浸透しにくい円板膜内部における標識も 可能である. ただし、この方法は割断された表面だけ しか見られないと言う欠点は全く変わらないため、広 く結合部位を観察するというような目的には適さな い. 写真は網膜色素上皮細胞 apical 部(図40), (図41) は基底部カチオン化フェリチン結合部位をこの方法を 用いてみたものであるが,表面からほんの一部のみ観 察可能であることがわかる.

凍結超薄切片浸漬法

もう一つの可能性は、超薄切片をもちいて反応させ る方法である. もちろん, クライオスタットで得られ るような数µmの厚さでももはや問題にならないの で,まず凍結試料を作成し、これを凍結装置が付いた 電顕の超薄切片を作成するミクロトームを使用し、そ のナイフ部の温度を下げて,出来るだけ薄い切片を得 るのがこの方法の原理である270). こうして得られた凍 結の超薄切片の厚さはおおよそ500Åであり、浸透件の 悪い物質でもこれぐらいまでなら容易に反応部位に結 合する(表17). 例えば免疫組織細胞化学において抗体 をフェリチン等の可視物質と結合した場合、やはりそ の浸透性が問題になるが、本法はもともとこの様な問 題を解決するために Tokuvasu²⁷⁰⁾によって開発され たものである(表19). その例を示すと、視細胞外節内 には浸透しがたいと述べたが、この凍結超薄切片法を 用いると(図42)のように円板膜におけるレクチン結 合部位が容易に検出できる.

(網膜色素上皮細胞における荷電フェリチンの結合 部位)

そのような結果から見れば、これら二つの浸漬方法 のうちで,広い範囲での分布を観察出来うるという点



29-(1941)



では、凍結超薄切片法が優っていると思われる.勿論、 凍結超薄切片自体は通常われわれが透過電子顕微鏡で 観察している樹脂から得られる超薄切片よりはかなり 厚いため、本当に微細な局在性を観察したければ freeze-fracture labeling 法の法が適している.した がって、この両者を併用して観察をおこなうことが、 正確かつ均一な標識部位の検討には必要であると考え られる.

そこで、凍結超薄切片法を用いて網膜色素上皮細胞 においても荷電フェリチンの結合部位の観察を行っ た.(図43,44)の様に apical 部においても基底部にお いてもカチオン化フェリチンは細胞膜に著明に結合す るが、アニオン化フェリチンの結合はどちらの膜にも 見られず(図45,46), freeze-fracture labeling 法と同 様の所見(図40,41)が得られる.この事は、網膜色 素上皮細胞膜はこと荷電という点に関してだけいえば 細胞膜の部位による極性は持っていないことを示すも のであるし、膜表面全体が強く負に荷電している状態 を示す結果である.

(網膜細胞血管における荷電フェリチンの結合部位) 網膜血管におけるカチオン化フェリチンとアニオン 化フェリチンの局在について観察をを行った.まず, (図47,48)にカチオン化フェリチン結合部位を示す. 網膜毛細管内皮細胞においては興味あることに、カチ オン化フェリチンは管腔内面の細胞膜に著明に結合す るが基腔側胞膜での結合性は明らかに低下している. これをアニオン化フェリチンで標識すると(図49,50), 管腔内にはまったく結合が見られないが,逆に反管腔 側には僅かであるが結合性が見られる.この事は,網 膜毛細血管内皮細胞は管腔内は陰性に強く荷電する傾 向にあるが,反管腔側細胞膜はむしろ陽性荷電末端も 比較的多く存在するという,異なった荷電極性を示し たことになる.

(脈絡膜毛細血管における荷電フェリチンの結合部 位)

網膜色素上皮細胞は全体として陰性に荷電している ことがわかったが,網膜色素上皮細胞とならんで outer BRBを形成しているとされている Bruch 膜や 脈絡膜細血管細胞膜の荷電はどうであろうか.(図51) の様に Bruch 膜はやはりカチオン化フェリチンがよ く結合している.Bruch 膜は主としてコラーゲン線維 から形成されているが,これは恐らくコラーゲン線維 が陰性に荷電していることによるものと思われる.(図 52)の様にアニオン化フェリチンはほとんど結合性を 示していない.

脈絡膜毛細血管内皮細胞においては、管腔側に著明 なカチオン化フェリチンの結合が認められる.この結 合性は脈絡膜毛細血管の fenestration の部において もかなり顕著に認められている.Bruch 膜に面する反 管腔側においても、程度はやや減弱するもののカチオ ン化フェリチン結合は著明であった(図53).これに対 して、アニオン化フェリチンはどちら側の細胞膜にも ほぼ結合性を示さない(図54).このことから、脈絡膜 毛細血管は網膜毛細血管内皮細胞とはやや異なり、管 腔および反管腔側細胞膜とも陰性の荷電末端が多く配 列している可能性を示す.

6. 網膜および脈絡膜毛細血管細胞膜荷電と tracer の透過性について

(網膜毛細血管細胞膜荷電と tracer 透過性)

網膜毛細血管から網膜内に向かっては microperoxidase, HRP とも流出は認められなかった. この荷電状 態の異なる tracer がどちらも塞き止められるわけで あるから, 網膜毛細血管細胞膜においては余り荷電状 態が tracer 透過性には関係する可能性は少ないもの と考えられる. 解剖学的にも, 網膜毛細血管内皮細胞 膜はいわゆる窓構造 fenestration はなく, この点から 考えても, 荷電状態だけで透過性が all or none に影響 されることは考えにくい. それでは全く無関係なので あるかと言えば, 膜荷電はこの様な tracer の即座の透 過性に関与するよりは, むしろ細胞膜に tracer が近寄 りやすいか, 近寄りにくいかというような状況には関 与するのかもしれない.

網膜毛細血管における HRP の透過性に関しては, これまで幾つもの報告がなされている.これらの結果 は一様に HRP は網膜毛細血管の管腔内から管腔外へ の透過を認めていない.それでは,管腔外方から管腔 内方に向かう透過性はどの様になっているのであろう か.Raviola ら¹⁹⁶⁾が報告したサルの実験では,血管に 投与した HRP は網膜毛細血管管腔内細胞膜で完全に 塞き止められるが,硝子体に投与した HRP は網膜毛 細血管管腔外から管腔内へ透過するという興味ある結 果を示している(表20).ただし,管腔外から内方への 透過は多数の pinocytotic vesicle によって運ばれる という.この事実は一つの重要な結果を示している.

脈絡膜毛細血管とは異なり,基本的に fenestration を有しない網膜毛細血管においては, tracer の荷電状 態には関係なく全て細胞膜が阻止すると考えられるこ とは妥当であろう.がしかし,血管内腔は陰性荷電が





昭和63年12月10日

血液眼関門についての研究 第1部・上野

33-(1945)





	12 22	
	有効分子径	pl
hemoglobin	28~32 Å	7.0
lactoperoxidase	36 Å	8.0
catalase	52 Å	5.7

強く、反管腔側は陽性末端もかなり存在するという異 なる荷電性が、反管腔側から内腔側へ向から一方通行 の vesicular transport と何か密接に関係する可能性 は大いにあるのかもしれない. 網膜色素上皮細胞の貪 食性がその対象の荷電性によってある程度変化するこ とが報告されているが271),一般に細胞膜表面が負荷電 状態にあるため、正荷電の物質の方が取り込まれやす いとされる272)~273).しかし細胞によってはこれとは逆 の貪食性を示す場合も観察されている272)273).その場 合には細胞膜の負荷電性が低いかあるいは正荷電領域 を特に持つのではないかと推測されている272). Raviola らがもちいた HRP は Type II の中性であっ たため、今後もさらに検討を加える必要があるが、網 膜毛細血管内皮反管腔側細胞膜は、陰性荷電の分布が 少なく, 陽性荷電末端も多いという特殊な構造を有し ていたことから、物質の移動に関してはかなり特異な 性格を有していることは間違いないものと思われる (表19). 血管内皮細胞原形質内を例え pinocytosis に よって透過するにせよ、細胞膜の荷電状態は一つの方 向性を持った barrier 作用に関与しているに違いな 1.

(脈絡膜毛細血管細胞膜荷電と tracer 透過性)

脈絡膜毛細血管は解剖学的に fenestration をもつ ため²⁷⁴⁾, これまでいろいろな物質が容易に通過できる と考えられてきた. 最終的にこの透過性を制約する因 子は, 物質の分子径と fenestration の直径であると考 えられてきたことは先に述べた. しかしそれでは, 分 子径の大きい HRP が容易に透過するのに, それより 小さい microperoxidase が通過しにくいことは全く 相反する事実である. ここに, もし脈絡膜毛細血管管 腔内細胞膜の荷電が影響するとすればこの事実が説明 できるのではないだろうか.



荷電の局在から、脈絡膜毛細血管内腔細胞膜は fenestrationの部をも含めてかなり強く陰性に荷電し ていることがわかった。そうすれば(表21)のように, 陰性の荷電をもつmicroperoxidase が管腔内細胞膜, 特に fenestration の部に近寄りにくいことから,透過 性が悪くなることは充分納得できる。逆に,正荷電を もつあるいは中性の HRP の方が内腔細胞膜へ近寄り やすいため,全体として,この差が透過性の違いになっ ているものと考えられる。

ここで少し話を戻して, microperoxidase と同様な 各種ヘム蛋白の透過性を脈絡膜毛細血管でみた興味あ る実験が Pino らによってなされている²¹¹⁾. 用いられ たヘム蛋白を(表22)に示すが、中性の hemoglobin(粒 子径約28~32Å)は時間の経過と共に通過し、さらに カチオンである lactoperoxidase(粒子径約36Å)も同 様である.ところがアニオンである catalase (粒子径 約52Å)はかなりの時間が経過しても通過しない.こ れからも,物質の荷電状態が,脈絡膜毛細血管透過性 に深く関与していることがわかる. もちろんこの様な 実験だけでは各 tracer の粒子径が異なるという問題 があるため、次にわれわれは同じ HRP でも荷電状況 が異なる Type をもちいて275)~278), 脈絡膜毛細血管透 過性の実験を行った227)228). これによると全ての HRP は透過するが, 脈絡膜毛細血管, Bruch 膜を通過して 網膜色素上皮細胞に到達する時間がやはり陰性化 HRP (Type VIII) で最も遅いという重要な結果が明 らかとなった(表23). Bruch 膜も陰性に荷電している とのべたが、この事も陰性荷電物質の透過性を遅くす る重要な要素であることも間違いないであろう.実際 ある種の実験的変性眼においては261), Bruch 膜の荷電 性が変化すると報告しているものもみられる.

7. 細胞膜荷電 barrier について まとめ

以上のように、血管内皮細胞膜はそれ自体の荷電の 状況で、各種の物質の透過性をある程度コントロール している可能性があることは確かである。これまでの 単一のトレーサーを用いるのみの実験では単に通すか 通さないかを観察するのみ、つまりどちらかといえば 通過させないための機構についての推論しか出来な かった。しかも tracer に関していえばその分子径のみ が問題とされ、そのため透過性は分子径という物理的 制限によってコントロールされるかのような概念が広 く一般化してしまった。今回われわれが示した細胞膜 荷電 barrier は通し易くあるいは難くする関所の働き をするものではないかと思われる。実際にこの様な

barrier がどのような働きをしているのかの確証を得 るのはまだまだ先のことであるとしても,網膜の生理 的環境を一定にするためには, barrier が全ての物質を 塞き止めてしまうなどということは考えにくい、 例え ば血液中を移動する物質単位時間・単位面積あたりの 透過性を制御し、それによって全体としての透過性を コントロールするという様な働きをしているのかもし れない. もちろん all or none の barrier とは異なり. ある程度周囲の環境にもその透過性は影響され得るだ ろうし、ある程度荷電情況が変化してもさらにそれを back up するような機構も存在するのであろう、それ が脈絡膜毛細血管からさらに内方に位置し別の意味で の barrier の役割を果たす網膜色素上皮細胞であり、 網膜毛細血管周囲に存在するグリア細胞ではないかと 思う. 先の章で述べた, これら細胞における膜輸送機 構は、その前に血管の透過性によってコントロールさ れているのかもしれない.

この barrier 機能に関しては,正常状態においても やっとその端緒が明らかになりつつあるといってよい ため、それが病的な情況でどの様な意味合いを持つの かという点に関してなどにもわからない状態である. しかしここに一つの非常に興味ある組織が存在してい る. 腎糸球体における蛋白の透過性は、その蛋白の分 子径および荷電の状態によって左右されると考えられ ている.正常における糸球体毛細血管蹄係においては これまでの研究から、カチオン化フェリチン結合部位 が多く存在する. このようにかなり負に荷電している ため (polyanion), 正荷電の蛋白は通過しやすいが, 負荷電の蛋白例えば albumin 等は通過しにくいとさ れている. この polyanion を形成するおもな因子は. シアル酸やグリコスアミノグリカン等の酸性ムコ多糖 類であり252)~257), 組織細胞化学的にはコロイド鉄に よって青色の色調に染まることが確かめられている. ところが,実験的腎炎の動物においては,蛋白尿が著 しい時期においてそれら酸性ムコ多糖類による色調が かなり低下しているのが観察される。ヒト腎炎におけ る biopsy 組織においても、病型別に染色を行うと、著 しい蛋白尿を示す症例ほど、これら polyanion 現象も 著しく減少するとされている279). これこそわれわれが 述べてきた細胞膜表面における荷電の barrier として の役割を暗示しているような印象をうける. 脈絡膜や 網膜血管におけるこれら細胞膜荷電 barrier は,正常 においては蛋白の透過性をかなりコントロールする要 因ではないだろうか. 一旦それが破壊されると, 脈絡

膜から網膜下あるいは網膜毛細血管から網膜内へ異常 な蛋白の漏出がみられるのかもしれない.実際かなり 高蛋白で非常に吸収が遅い網膜剝離や網膜浮腫をきた す疾患をわれわれは臨床的にもよく経験しているので はないだろうか.今後,実験的に病巣を作製して,こ の様な荷電 barrier の損傷についてさらに多面的に検 討していく事を一つの目標にしたいと思っている.

表説明

- **表**1 形態的 barrier 研究と生理学的 barrier 研究の 概念の相違
- 表 2 BRB における inner BRB と outer BRB 構成 細胞
- 表3 BRB, BAB, BBB の各 barrier における血管内 皮型 barrier と上皮型 barrier 構成細胞.
- 表4 Na-K-ATPase enzyme complex における反応 模式図.①はリン酸化反応を,②は脱リン酸化反応を 示す.反応においては、Naイオン3個が細胞外へ、 Kイオン2個が細胞内へ能動的に輸送される.この うち、K-NPPase 活性は②の脱リン酸化反応を代表 する.この反応の場合、リン酸は細胞膜内方へと放出 される.
- 表5 代表的な細胞 Ca イオン調整機構の模式図. な お, Na-Ca 交換反応においては, Na イオンの動きが Na-K-ATPase との相関するといわれている.
- 表 6 cGMP および cGMP 代 謝 模式 図. なお5' AMPase および 5'GMPase は 5'nucleotidase と 同 義である.
- 表7 暗状態および明状態における,視細胞外節円板 膜上の PDEase 活性の変化と外節原形質膜の Na チャンネルの開閉の関係を示す.
- 表 8 組織における刺激とGTPase, Cyclase, PDEaseの関係を示す.この場合反応はAdenyl cyclaseを賦活化して,細胞内cAMPレベルを上昇 さす場合と,PDEaseを活性化して,cAMPあるいは レベルを下げる可能性がある.
- 表9 網膜色素上皮細胞における各酵素活性の局在の 模式図
- 表10 上皮細胞および血管内内皮細胞の膜極性の模式 図
- 表11 各 tracer の分子径
- **表12** 光顕・電顕における Peroxidase 反応の一般化 学式
- 表13 各種 Peroxidase tracer の分子量と分子径
- 表14 Microperoxidase をはじめとする低分子 peroxidase 作製の原理. Cytochrome Cを pepsin や trypsin で消化してアミノ酸結合を切断する.
- 表15 HRP および Microperoxidase の有効分子径と 等電点. HRP には各荷電が異なる Type が存在す る. MP は負に荷電している.
- 表16 細胞膜表面の模式図.細胞膜に埋めこまれるか

たちで存在するタンパク質の末端の糖鎖はその種類 によって正か負に荷電している.

- 表17 凍結超薄切片標識法と Freeze fracture 標識法 の模式図. 切片がある程度の厚みを持っていると, 標 識の情況がかなり異なる危険がある.
- 表18 Freeze fracture 標識法の手技の実際
- 表19 凍結超薄切片標識法の手技の実際
- 表20 網膜毛細血管における硝子体内投与された HRP と血管内投与された HRP の動き,およびそれ ぞれに面する細胞膜の荷電状態を示す模式図.血管 内腔は強く負に荷電しているが,反管腔側では正荷 電を示す部分も存在する.vesicular transport は反 管腔側からのみ認められる.
- 表21 脈絡膜毛細血管における荷電状態と,血管内へ 投与された各 tracer の動き.内腔側は強く負に荷電 しているため,負荷電の tracer は通過しにくい.さ らには脈絡膜毛細血管のみでなく Bruch 膜,網膜色 素上皮細胞膜も強く負に荷電されており,総合的に 負荷電 barrier を形成している.
- 表22 各 peroxidase tracer の有効分子径と等電点
- 表23 HRPの荷電が異なる type における, 脈絡膜毛 細血管・Bruch 膜の通過情況. 中では負に荷電してい る Type VIII の通過が最も遅い. この結果は MP の 通過性とかなり近似している.

図説明

- 図1 モルモット血管内へ投与された HRP は Bruch 膜(BR)を染めるが,網膜色素上皮細胞基底および 側部細胞膜でその移行が阻止される,OS: 視細胞外 節.×5,000
- 図2 その tight junction 部(矢印)の拡大写真. HRP が阻止されているのがわかる.×46,000
- 図3 モルモット網膜色素上皮細胞の電顕写真. 網膜 内方へは apical villi をもち,基底部には basdal infolding をもつ形態的極性を示す. OS: 視細胞外節. BR: Bruch 膜,×3,500
- 図4 ラット網膜毛細血管の電顕写真,内皮細胞(EN)
 によって囲まれ、その脇に pericyte (PC) が存在する、×2,500
- 図5 モルモット網膜における K-NPPase の光顕的
 活性.光顕レベルでは,他の部分に比べると網膜色素
 上皮細胞(PE)の活性は判然としない、×400
- 図 6 モルモット 網膜色素上皮細胞における K-NPPase の電顕的活性.反応産物は,基底部細胞膜 (二重矢印)にのみ見られ, apical 細胞膜(矢印)に は認められない、×4,500
- 図7 モルモット網膜色素上皮細胞基底細胞膜におけ る K-NPPase の電顕的活性の拡大写真.反応産物 は、細胞膜の原形質寄りに認められる.この局在は、 Na-K-ATPase における K-NPPase のリン酸放出 方向に一致する、×24,000
- 図8 モルモット網膜における Ca-ATPase の光顕的 活性、反応は視細胞内節(IS)および網膜色素上皮細

36 - (1948)

胞(PE)に認められる.×400

- 図 9 モルモット網膜における Ca-ATPase の電顕的 活性.反応産物は、基底部細胞膜(二重矢印)にのみ 見られ、apical 細胞膜(矢印)には認められない. さ らに活性は細胞膜以外にミトコンドリア(\blacktriangle)にも見 られる.×5,000
- 図10 モルモット脳室上衣細胞における Ca-ATPase の電顕的活性.反応は apical 細胞膜に限局する.さ らに繊毛にも反応が認められる.×5,000
- 図11 カエルバラフィーゼ上皮細胞における Ca-ATPase の電顕的活性.非常に強い反応が apical 細胞膜に局在する.さらに活性はミトコンドリア(矢印)および繊毛の basal body にも認められる.× 5,000
- 図12 ラット網膜色素上皮細胞における adenylate cyclase の電顕的局在.反応産物は網膜色素上皮細胞 apical villi 細胞膜にみられるが,視細胞外節(OS) には僅かに見られるのみである.さらに強い活性が gap junction(矢印)にも存在する.×15,000
- 図13 ラット網膜における guanylate cyclase の光顕 的局在.活性は視細胞外節先端部(OS)および網膜 色素上皮細胞(PE)にのみ存在する.網膜毛細血管 (矢印)には反応は見られない、×480
- 図14 ラット網膜色素上皮細胞における guanylate cyclase の電顕的局在. 強い活性が, 視細胞外節円板 膜(OS), 網膜色素上皮細胞 apical villi 細胞膜さら には gap junction に見られる.×13,000
- 図15 ラット網膜における cGMP-PDEase の光顕的 局在.著明な活性が視細胞外節先端部(OS)および 網膜色素上皮細胞(PE)にのみ存在する.網膜毛細 血管(矢印)には反応は見られない、×480
- 図16 ラット網膜視細胞外節 (OS) における cGMP-PDEase の電顕的局在. 反応は円板膜, 原形質膜に局 在する. 弱い反応が視細胞内節(IS)細胞膜にも認め られる.×14,000
- 図17 ラット網膜における cGMP-PDEase の光顕的
 局在. cGMP を基質にした場合とは異なり,視細胞
 外節 (OS) の反応はかなり弱い.新たに外網状層
 (OP) に反応が出現する.×480
- 図18 ラット 網膜色素上皮細胞における cGMP-PDEase の電顕的局在.強い活性が,視細胞外節円板 膜(OS),網膜色素上皮細胞 apical villi 細胞膜に見 られる.cyclase とは異なり,gap junction に(矢印) 反応は存在しない.×19,000
- 図19 ラット網膜色素上皮細胞における cGMP-PDEase の電顕的局在.活性は網膜色素上皮細胞 apical villi 細胞膜に見られるが, 視細胞外節円板膜 (OS)にはほとんど見られない.また gap junction に (矢印) 反応は存在しない.×17,000
- 図20 ラット網膜色素上皮細胞における cGMP-PDEase に対する阻害剤の IBMX の効果の電顕写 真. 視細胞外節円板膜 (OS), 網膜色素上皮細胞

apical villi 細胞膜の活性はほぼ阻害されている.× 18,000

- 図21 ラット網膜における GTPase 活性の光顕的局 在.強い活性が視細胞外節先端部 (OS) および網膜 色素上皮細胞 (PE) に存在する.×480
- 図22 ラット網膜における GPT ase 活性の電顕的局 在.強い活性が,視細胞外節円板膜(OS),網膜色素 上皮細胞 apical villi 細胞膜に見られる.×15,000
- 図23 ラット脳血管内皮細胞における Thiamine pyrophosphatase 活性の電顕的局在.反応産物は反 管腔側細胞膜にのみ局在し,管腔側(L)細胞膜には 認められない、×9,000(猪俣賢一郎博士の御好意に よる)
- 図24 ラット網膜における Thiamine pyrophosphatase 活性の光顕的局在.反応は外網状層(OP) にある毛細血管に認められる(矢印). 視細胞外節 (OS) 矢網膜色素上皮細胞(PE)には見られない.× 650
- 図25 ラット網膜血管内皮細胞における Thiamine pyrophosphatase 活性の電顕的局在.反応は脳毛細 血管内皮細胞とは異なり、管腔側(L)・反管腔側細 胞膜共に認められる.×25,000
- 図26 ラット脳血管内皮細胞における Thiamine triphosphatase 活性の電顕的局在.反応産物は反管腔 側細胞膜にのみ局在し,管腔側(L)細胞膜には認め られない.×16,000(猪俣賢一郎博士の御好意によ る)
- 図27 ラット網膜血管内皮細胞における Thiamine triphosphatase 活性の電顕的局在.反応産物は反管 腔側細胞膜にも,管腔側(L)細胞膜にも全く認めら れない.×13,000
- 図28 ラット網膜における 5'nucleotidase 活性の光顕 的局在.反応は外網状層(OP)から視細胞節(OS) にかけて著明であり,視細胞に限局していることが わかる.基質として GMP をもちいた.×480
- 図29 ラット脳血管内皮細胞における 5'nucleotidase
 活性の電顕的局在.反応は管腔側(L)細胞膜に弱く,
 反管腔側細胞膜で強い.×22,000
- 図30 ラット網膜血管内皮細胞における5'nucleotidase活性の電顕的局在.反応は管腔側(L)細胞膜にも反管腔側細胞膜にも見られない、×6,000
- 図31 モルモット網膜における静脈内注入された HRP の局在の光顕的反応. 脈絡膜毛細血管を通過した tracer は脈絡膜(CH)を強く染めている. なお視細胞内節(IS)には、内因性 peroxidase 活性がコントロール実験でも見られる.×400
- 図32 モルモット網膜色素上皮細胞における静脈内注 入された HRP の局在の電顕的反応. HRP は Bruch 膜(BR)を通過するが, 網膜色素上皮細胞細胞間隙 (矢印)を越えることはない.×4,000
- 図33 モルモット網膜色素上皮細胞内方部における静 脈内注入された HRP の局在の電顕的反応. HRP は

tight junction (矢印) で通過を阻止される.×30,000

- 図34 モルモット網膜における静脈内注入された MP の局在の光顕的反応。MPは HRPと異なり脈絡膜 毛細血管を通過し難く,脈絡膜毛細血管(白矢印)の 輪郭がはっきりと見えている。図31における脈絡膜 (CH)と比較するとその相違が良くわかる、×400
- 図35 モルモット脈絡膜-Bruch 膜(BR) -網膜色素
 上皮細胞(PE)における静脈内注入された MP の局
 在の電顕的反応. MP は脈絡膜毛細血管(CC)を通
 過し難く,管腔内に止どまっているのがわかる.×
 4,000
- 図36 モルモット脈絡膜-Bruch 膜(BR) 網膜色素 上皮細胞における静脈内注入された MP の局在の電 顕的反応. MP は時間の経過とともに脈絡膜毛細血 管(CC)から侵入するが,僅かに Bruch 膜(BR), 網膜色素上皮細胞(PE)基底部細胞膜に見られるの みである.×10,000
- 図37 ラット脈絡膜-Bruch 膜(BR) -網膜色素上皮
 細胞(PE)における、20µm 切片で標識したコロイド鉄の局在.反応は脈絡膜毛細血管(CC)管腔側に
 認められる.×2,000
- 図38 ラット脈絡膜-Bruch 膜(BR) -網膜色素上皮 細胞(PE)における,20µm 切片で標識したコロイ ド鉄の局在.反応は脈絡膜毛細血管(CC)管腔側に 認められるが,網膜色素上皮細胞基底細胞膜などで はかなり不均一である.赤血球(R)表面も標識され ているのがわかる.×10,000
- 図39 ラット視細胞外節円板膜内面における freezefracture 法によるフェリチンの標識. 矢印の方向に 割断されている. 視細胞外節円板膜内方がフェリチ ンで標識されているのがわかる(▲).×21,000
- 図40 ラット網膜色素上皮細胞 (PE) apical 細胞膜の freeze-fracture 法によるカチオン化フェリチンの標 識.標識は割断された部分でほんの一部にみられる (矢印)、×28,000
- 図41 ラット網膜色素上皮細胞(PE)基底部細胞膜お よび Bruch 膜(BR)の freeze-fracture 法によるカ チオン化フェリチンの標識.標識は割断された部分 でほんの一部にみられる(矢印).×29,000
- 図42 ラット視細胞外節円板膜内面における凍結超薄 切片法によるフェリチンの標識.かなり広範かつ均 等に円板膜が標識されていることがわかる.× 18,000
- 図43 ラット網膜色素上皮細胞 (PE) apical 細胞膜の 凍結超薄切片法によるカチオン化フェリチンの標
 識. 網膜色素上皮細胞の apical villi は強く標識され る.×33,000
- 図44 ラット網膜色素上皮細胞(PE)基底部細胞膜の 凍結超薄切片法によるカチオン化フェリチンの標 識.網膜色素上皮細胞の基底部細胞膜も強く標識される.×26,000

図45 ラット網膜色素上皮細胞(PE) apical 細胞膜の

凍結超薄切片法によるアニオン化フェリチンの標
 識. 視細胞外節(OS)も網膜色素上皮細胞の apical
 villi も全く標識されることはない、×33,000

- 図46 ラット網膜色素上皮細胞(PE)基底部細胞膜の 凍結超薄切片法によるアニオン化フェリチンの標 識。Bruch 膜(BR)も網膜色素上皮細胞の基底部細 胞膜も全く標識されることはない、×18,000
- 図47 ラット網膜毛細血管内皮細胞における凍結超薄 切片法によるカチオン化フェリチンの標識。管腔側 細胞膜(L)はかなり標識されるが(二重の矢印), 反管腔側細胞膜(矢印)には標識部は少ない.× 24,000
- 図48 ラット網膜毛細血管内皮細胞における凍結超薄 切片法によるカチオン化フェリチンの標識拡大写 真.管腔側細胞膜(L)の著明な標識(二重の矢印) と対照的に,反管腔側細胞膜(矢印)には標識部は少 ない、×32,000
- 図49 ラット網膜毛細血管内皮細胞における凍結超薄 切片法によるアニオン化フェリチンの標識. 管腔側 細胞膜(L)は全く標識されないが,反管腔側細胞膜 (矢印)には僅かではあるが標識部(矢印)が見られ る.×26,000
- 図50 ラット網膜毛細血管内皮細胞における凍結超薄 切片法によるアニオン化フェリチンの標識. 反管腔 側細胞膜(矢印)には僅かではあるが標識部(矢印) が見られる.×23,000
- 図51 ラット Bruch 膜の凍結超薄切片法によるカチ オン化フェリチンの標識. Bruch 膜にも標識は著明 である、PE: 網膜色素上皮細胞.×26.000
- 図52 ラット Bruch 膜の凍結超薄切片法によるアニ オン化フェリチンの標識. Bruch 膜も, 網膜色素上皮 細胞(PPE)も全く標識されない.×18,000
- 図53 ラット脈絡膜毛細血管内皮細胞(CE) Bruch 膜(BR) 網膜色素上皮細胞(PE)におけるカチオン化フェリチンの標識、いずれも著明に標識されている. 脈絡膜毛細血管内皮細胞(CE)では内腔(L) 側細胞膜,特に fenestration部(矢印)での標識が強い. また血管反管腔側細胞膜にも標識がみられる.×40,000
- 図54 ラット脈絡膜毛細血管内皮細胞(CE) Bruch 膜(BR) 網膜色素上皮細胞(PE)におけるアニオン化フェリチンの標識.いずれも全く標識されることはない. 矢印は fenestration 部を示す.×40,000
 緒言 文献
- Goldmann GE: Vitalfarbung am Zentralnervensystem. Abhandl Konignl Preuss Akad Wiss 1: 1-60, 1913.
- Ehrlich P: Das Sauerstoff-Bedurfis des Organismus. Eine Farben-analytische Studie, Berlin, 1885.
- 3) Ehrlich P: Zur therapupetischen Bedeutung der substituirenden Schwefelsauregruppe. Ther

38 - (1950)

Monatsch 1: 88-90, 1887.

- Stern L, Gautier R: Rapports entre le liquide cephalorachinden et la circulation sanguine. Arch Int Physiol 17: 138–192, 1921.
- Reese TS, Karnovsky MJ: Fine structural localization of blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol 34: 207-217, 1967.
- 6) Becker NH, Novikoff AB, Zimmerman HM: Fine structure observations of the uptake of intravenously injected peroxidase by the rat choroidal plexus. J Histochem Cytochem 15: 160-165, 1967.
- Becker NH, Almazon R: Evidence for the functional polarization of micropinocytotic vesicles in the rat choroidal plexus. J Histochem Cytochem 16: 278-279, 1968.
- Brightman MW, Klatzo I, Olsson Y, Reese TS: The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. J Neurol Sci 10: 215-239, 1970.
- Brightman MW, Reese TS: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J Cell Biol 40: 648-677, 1969.
- Novotony HR, Alvis DL: A method of photographing fluoresceince in circulating blood of the human eye. Circulation 24: 82-86, 1961.
- Tsukahara I, Ohta M: Histologic study on the location of sodium fluorescein in the fundus. Jap J Ophthalmol 15: 125-131, 1971.
- Grayson MC, Laties AM: Ocular localization of sodium fluorescein. Arch Ophthalmol 85: 600 -609, 1971.
- 13) Dobbing J: The blood-brain barrier. Physiol Rev 41: 130-188, 1961.
- 14) Davson H: Physiology of cerebrospinal fluid. Churchill, London, 1967.
- 15) Lee JC: Evoluation in the concept of the blood-brain barrier phenomenon. Prog. Neuropathol 1: 84-145, 1971.
- 16) Davson H: The blood-brain barrier. Structure and function of the nervous system. Bourne GH, ed, pp321-445, Academic Press, New York, 1972.
- Bradbury M: The concept of a blood-brain barrier. John Wiely and Sons, Chichester, 1979.
- 18) Pollay M, Roberts PA: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. Neurosurg 6: 675-685, 1980.
- 19) Milhorat TH, Hammock MK, Fenstermacher JD, et al: Cerebrospinal fluid production by

the choroidal plexus and brain. Science 173:330 -332, 1971.

- 20) Milhorat TH: Structure and function of the choroid plexus and other sites of cerebrospinal fluid formation. Int Rev Cytol 47: 225-288, 1977.
- 21) Deurs B, Moller M, Amtorp O: Uptake of horseradish peroxidase from cerebrospinal fluid into the choroid plexus of the rat, eith special referrence to transepithelial transport. Cell Tis Res 187: 215-234, 1978.
- 22) Deuras B: Structural aspects of brain barriers, with special referrence to the permeability of the cerebral endothelium and choroidal eoithelium. Int Rev Cytol 65: 117-191, 1980.
- 23)若井 晋:血液脳関門,血液脳脊髄関門の発生.脳 神経 33:1077-1092,1981.
- 24) Rapoport SI: Blood-brain Barrier in Physiology and Medicine. Raven Press, New York, 1976.
- 25) Perdy JI, Bondy SC: Blood-brain barrier: Selective changes f during maturation. Neuroscience 1: 125-129, 1976.

網膜毛細血管内皮と網膜色素上皮細胞におけ る機能的酵素局在の barrier 機 構の関与 文献

- 26) Shakib M, Cunha-Vas JG: Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Role of the junctional complexes of the retinal vessels on the permeability of the blood-retinal barrier. Exp Eye Res 5: 229-234, 1966.
- Shiose Y: Electron microscopic studies on blood-retinal barrier and blood-aqueous barrier. Jap J Ophthalmol 14: 73-79, 1970.
- 28) Raviola G: The structural basis of the bloodocular barriers. Exp Eye Res Supple 27-63, 1977.
- 29) 塩瀬芳彦: 眼内 barrier 機構とその臨床的意義.
 臨眼 31: 875-887, 1977.
- 30) Ashton N: The blood-retinal barrier and vasoglial relationship in retinal disease. Trans Ophthalmol Soc UK 85: 199-229, 1965.
- 31) Ashton N, Cunha-Vas JG: Effect of histamine on the permeability of the ocular vessels. Arch Ophthalmol 73: 211-223, 1965.
- 32) Bito LZ, Mayers RE: The ontogenesis of haematoencephalic cation transport processes in the rheusus monkey. J Physiol 208: 153–170, 1970.
- 33) Cserr HF: Physiology of the choroid plexsus. Physiol Rev 51: 273-311, 1971.
- 34) Rasmussen H, Goodman DBP: Relationship

between calcium and cyclic nucleotides in the activation. Physiol Rev 57: 421-509, 1977.

- 35) DiBona DR, Mills JW: Distribution of Napump sites in transport epithelia. Fed Proc 38: 134-143, 1979.
- 36) Skou JC: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nervous. Biochim Biophys Acta 23: 394-401, 1957.
- 37) Skou JC: Enzymatic basis for active transport Na and K across cell membranes. Physiol Rev 45: 596-617, 1965.
- 38) Epstein F: The role of sodium and potassium ATPase in the renal sodium reabsorption. Renal transport and diureties. Thurau K, Jahrmarker H, ed, p67—87, Springer Publishing Inc, New York, 1969.
- 39) Stirling CE: Radioautographic localizatin of sodium pump sites in rabbit intestine. J Cell Biol 53: 704-714, 1972.
- 40) Kyte J: Immunoferritin determination of the distribution of (Na+K) ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules.
 I. Distal segment. J Cell Biol 68 : 287-303, 1976.
- 41) Kyte J: Immunoferritin determination of the distribution of (Na+K) ATPase over the plasma membranes of renal convoluted tubules. II. Proximal segment. J Cell Biol 68: 304-317, 1976.
- 42) Ernst SA: Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. I. Biochemical characterization of a cytochemical medium for ultrastructural localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the avian salt gland. J Histochem Cytochem 20: 13-22, 1972.
- 43) Ernst SA: Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. Cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the secretory epithelium of the avian salt gland. J Histochem Cytochem 20: 23-38, 1972.
- 44) Ernst SA: Transport ATPase cytochemistry. Ultrastructural localization of potassiumdependentand potassium-independent phosphatase activities in the rat kidney cortex. J Cell Biol 66: 586-608, 1975.
- 45) Tostensen DC, Blaustein MP, Molulton RH: Phosphomonoesterase and Na+K activated ATPase. Fed Proc 20: 138, 1961.
- 46) Mayahara H, Ogawa K: Ultracytochemical localization of ouabain-sensitive, potassiumdependent p-nitrophenylphosphatase activity in

the rat kidney. Acta Histochem Cytochem 13: 90—102, 1980.

- 47) Mayahara H, Fujimoto K, Ando T, et al: A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassiumdependent p-nitrophenylphosphatase activity. Histochemistry 67: 125–138, 1980.
- 48) Dartt DA, Moller M, Poulsen JH: Lacrimal gland electrolyte and water secretion in the rabbit. Localization and role of (Na+K)activated ATPase. J Physiol 321: 557-569, 1981.
- 49) Ueno S, Mayahara H, Ueck M, et al: Ultracytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity in the rat lacrimal gland. Cell Tis Res 234: 225-518, 1983.
- 50) Forte JG, Ganser AL, Ray TK: The Kstimulated ATPase from oxyntic glands of gastric mucosa. Gastric hydrogen ion secretion. Kasbekard D, Rehm WR, Sachs G, ed, p302 -320, Marcel Dekker Publishing Inc, New York, 1976.
- 51) Swanson CH, Solomon AK: Evidence for Na-H exchange in the rabbit pancreas. Nature New Biol 236: 183-184, 1972.
- 52) Seder AW, Friedman MHF: Correlation of the gastric parietal cell with functinal activity of the stomach. J Biopys Biochem Cytol 11: 349 -360, 1961.
- 53) Riley MV, Winkler BS, Benner J, et al: ATPase activities in retinal pigment epithelium and choroid. Exp Eye Res 26: 445–455, 1978.
- 54) Frizzel RA, Field M, Schultz SG: Sodoumcoupled chloride transport by epithelial tissues. Amer J Physiol 236: 1–8, 1979.
- 55) Steinberg RH, Miller SS: Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium. Zinn KH, Marmor MF, ed, p205 -225, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 56) Steinberg RH, Miller SS: Aspects of electrolyte transport in frog pigment epithelium. Exp Eye Res 16: 365-372, 1983.
- 57) Ostwald TJ, Steinberg RH: Localization of frog retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 31: 351-360, 1980.
- 58) Miller SS, Steinberg RH: Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. J Membr Biol 36: 337-372, 1977.
- 59) Miller SS, Steinberg RH: Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium.

日眼会誌 92巻 12号

40 - (1952)

Exp Eye Res 25: 235-248, 1977.

- 60) Miller SS, Hughes BA, Machen TE: Fluid transport across retina pigment epithelium is inhibited by cyclic AMP. Proc Natl Acad Sci USA 79: 2111–2115, 1982.
- 61) Stirling CE, Lee A: (^aH) ouabain autoradiography of frog retina. J Cell Biol 85: 313-324, 1980.
- 62) Fatt I, Shantinath K: Flow conductivity of retina and its role in retinal adhesin. Exp Eye Res 12: 218-226, 1971.
- 63) Bilel A: Some aspects of tissue fluid dynamics in the eye. Vision and circulatin. Cant JS, ed, p333-338, CV Mosby, Co St Louis, 1976.
- 64) Zauberman H: Measurement of retinal adhesion. Isr J Med Sci 8: 1604–1614, 1972.
- 65) Zauberman H: Adhesive forces between the retinal pigment epithelium and sensory retina. The Retinal Pigment Epithelium. Zinn K, Marmor MF, ed, p192-204, Harvard University Press, Cambridge, 1979.
- 66) Lincoff H, Kreissing i: Results with a temporary ballon buckle for the repair of retinal detachment. Amer J Ophthalmol 92: 245-251, 1981.
- 67) Negi A, Marmor MF: The resorption of subretinal fluid after diffuse damage to the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1475–1479, 1983.
- 68) Bito LZ: Intraocular fluid dynamics. Exp Eye Res 10: 102—116, 1970.
- 69) Masuzawa T, Saito T, Sato F: Cytochemical study of the electron microscopical localization K-dependent p-nitrophenylphosphatase activity on choroidal ependymal epithelium in normal rat barain. Comparing with the activity of mg-ATPase and alkaline phosphatase. Acta Histochem Cytoche 13: 394-403, 1980.
- 70) Umar H, Ueno S, Bambauer HJ, et al: Electron microscopical studies of the Ca- and Mg-ATPase activity in the paraphyseal epithelial cells of the frog, Rana esculenta. Verh Anat Ges 78: 587-589, 1984.
- Mizuhira V, Ueno M: Calcium transport mechanism in molting crayfish revealed by microanalysis. J Histochem Cytochem 31: 214 -218, 1983.
- 72) Case RM, Clausen T: The relationship between calcium exchange and enzyme secretion in the isolated rat pancreas. J Physiol 235: 75-102, 1973.
- 73) Carafoli E, Crompton M: The regulation of

intracellular calcium. Current topics in membrane and transport. Bronen F, Kleinzeller A, ed, Vol 10, p151–216, Academic Press, New York, 1978.

- 74) Schatzman HJ, Vincenzi FF: Calcium movements across the membrane of human red cells. J Physiol 201: 369-395, 1969.
- Schatzman HJ: ATP-dependent Ca extrusion from human red cell. Experientia 22: 364-365, 1966.
- 76) Ueno S, Umar H, Bambauer HJ, et al: Ultracytochemical localization of Ca-ATPase activity in the paraphyseal epithelial cells of the frog, Rana esculenta. Cell Tis Res 235: 3 -11, 1984.
- 77) Romero PJ, Whittam R: The control of internal calcium of membrane permeability to sodium and potassium. J Physiol 214: 481-507, 1971.
- 78) Rasmussen H: Mitochondrial ion transport: Mechanism and physiological significance. Fed Proc 25: 903-911, 1966.
- Rasmussen H: Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. Science, 170: 404-412, 1970.
- 80) Rasmussen H, Goodman DBP, Friedman N, et al: Ions and the control of metabolic process. Hanbdook of Physiology, Endocrinology. Sec 7, Vol 17, p225—264, Amer Physiol Soc Washington DC, 1976.
- 81) Ueno S, Bambauer HJ, Umar H, et al: Ultracytochemical study of Ca-ATPase and K-NPPase in retinal photoreceptors of the guinea pig. Cell Tis Res 237: 479-489, 1984.
- 82) Padykula HA, Herman E: Factors affecting the activity of adenosine triphosphase as mesured by histochemical techniques. J Histochem Cytochem 3: 161–167, 1955.
- 83) Guth L, Samaha FJ: Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Exp Neurol 25: 365-367, 1969.
- 84) Tice LW, Barnett RJ: The adenosinetriphosphatase of striated muscle. J Histochem Cytochem 8: 352, 1960.
- 85) Tice LW, Smith DS: The localization myofibrillar ATPase activity in the flight muscle of the blowfly, Calliphora erythrocephala. J Cell Biol 25: 121–135, 1965.
- 86) Moran DT, Rowley JC, Asher DL: Calcium binding sites on sensory process in verteblate hair cells. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3954 --3958, 1981.

- 87) Ando T, Fujimoto K, Mayahara H, et al: A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca-ATPase activity. Acta Histochem Cytochem 14: 705-726, 1981.
- 88) Ando T, Mayahara H, Fujimoto K, et al: Ultracytochemical localization of Ca-ATPase activity on the epithelial cells of rat trachea. Acta Histochem Cytochem 15: 812-826, 1982.
- 89) Fujimoto K, Ogawa K: Enzyme cytochemical study of rat cardiac muscle. II. Ca-ATP ase and ouabain-sensitive, K-dependent p-nitrophosphatase. Acta Histochem Cytochem 15: 338-354, 1982.
- 90) Yasubuchi Y, Ueno S, Tsukahara I, et al: Ultracytochemical localizatin of Ca-ATPase activity in the epithelial cells of guinea pig ciliary body. Acta Histochem Cytochem 18: 1 -12, 1985.
- 91) Hess H: The high calcium content of retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 21: 471-479, 1975.
- 92) Surtherland EW, Rall TW: Formation of cyclic adenosine ribonucleotide by tissue particles. J Biol Chem 232: 1065-1076, 1958.
- 93) Berridge MJ: The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. Adv Cyclic Nucleotides Res 6: 1-98, 1975.
- 94) Ross EM, Gilman AG: Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Ann Rev Biochem 49: 533-564, 1980.
- 95) Newsome DA, Fletcher RT, Chader GJ: Cyclic nucleotides vary by area in the retina and pigmented epithelium of the human and monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 864 --869, 1980.
- 96) Fujimoto K, Toibana M, Ogawa K: New cytochemical method for adenylate cyclase and guanylate cyclase with dimethyl sulfoxide. Acta Histochem Cytochem 14: 687-704, 1981.
- 97) Goridis C, Virmaux N, Urban PF, et al: Guanyl cyclase in mammalian photoreceptor. FEBS Letters 30: 163-169, 1973.
- 98) Orr HT, Cohen LAI, Ferrendelli JA: Distribution of 3',5'-cyclic AMP and 3',5'-cyclic GMP in rabbit retina in vivo: Selective effects of dark and light adaptation and ischemia. Proc Natl Acad Sci 73: 4442-4445, 1976.
- 99) Pannbacker RG: Control of guanylate cyclase activity in the rod outer segment. Science 182: 1138—1140, 1973.
- 100) Bensinger RE, Fletcher RT, Chader GJ:

Guanylate cyclase : Inhibition by light in retinal photoreceptors. Science 183 : 86-87, 1974.

- 101) Zhan Y, Ueno S, Amemiya T: Histochemical study on guanylatlate cyclase activity in the retina of developing rat. Acta Histochem 20: 639-645, 1987.
- 102) Ogino N, Matsumura M, Shirakawa H, et al: Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelial cells from chick embryo: Inhibition by melatonin and cyclic AMP, and its reversal by taurine and cyclic GMP. Ophthalmic Res 15: 72-89, 1983.
- 103) Espey LL, Stutts RH: Exchange of cytoplasm between cells of the membrane granulosa in rabbit ovarian follicles. Biol Reprod 6: 168 -175, 1972.
- 104) Dracher LA, Jasitis AA, Kaulen AD, et al: Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H-ATPase and bacteriorhodopsin. Nature 249: 321-324, 1972.
- 105) Florendo NT, Barnett RJ, Greengard P: Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: Cytochemical localization in cerebral cortex. Science 173: 745-747, 1971.
- 106) Sugimura K, Mizutani A: Electronmicroscopic cytochemical study of cyclic nucleotide phosphodiestrase in rat brain. Histochemistry 55: 97-105, 1978.
- 107) Ueno S, Bambauer HJ, Umar H, Ueck M: A new histo- and cytochemical method for demonstration of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase activity in retinal rod photoreceptor cells of the rat. Histochemistry 81: 445-451, 1984.
- 108) Ueno S, Bambauer HJ, Umar H, et al: Localizatin and function of cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase activity in the retinal rods of the rat by means of a newly developed cytochemical method. Cell Tis Res 238: 453-457, 1984.
- 109) Ueno S: Histochemistry of the retina. Recent development of electron microscopy. Hashimoto H, Kuo KH, Lee K, ed, p307-312, Business Center for Academic Societies, Tokyo, 1986.
- 110) Ueno S, Ueck M: Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity: Histochemical and cytochemical methods. Method Enzymol 159: 477-489, 1988.
- 111) Pannbacker RG, Fleischman DE, Reed DW: Cyclic nucleotide diesterase: High levels in a mammalian photoreceptor. Science 175: 757 -758, 1972.

42 - (1954)

- 112) Chader, R.J., Herz LR, Fletcher RT: Light activation of phosphodiesterase activity in retinal rod outer segment. Biochem Biophys Acta 347: 491-493, 1974.
- 113) Goridis C, Virmaux N: Light-regulated guanosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of bovine retina. Nature 248: 57-58, 1974.
- 114) Ueno S, Ueck M: Localization of cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase activities in retinal pigment epithelial cells of the guinea pig. Acta Histochem Cytochem 21: 45-54, 1988.
- 115)上野聡樹,本田孔士:網脈絡膜萎縮と変性網膜色素上皮細胞の組織細胞化学.網膜脈絡膜萎縮調査研究班,昭和58年度報告書,52-55,1984.
- 116) 塚原 勇,上野聡樹:ラット網膜色素上皮細胞に おける cyclic nucleotide 合成,分解酵素活性の局 在. 眼紀 35:1929-1934, 1984.
- 117) 上野聡樹:網膜色素上皮細胞の組織化学的検索. 機能的 barrier と関連して.塚原 勇編,眼科領域 における最新の進歩, p34-49, 医学教育出版社, 東京, 1985.
- 118) Goldberg ND,Fhaddox MK, Dunham E, et al: The Yin-Yang hypothesis of biological control: Opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP in the regulation of cell proliferation and other biological processes. Cold Spring Habor Symposium on the Regulation of Proliferation in Animal Cells. Clarkson B, Baserga R, ed, p609-625, Academic Press, New York, 1974.
- 119) Miller SS, Hughes BA, Machen TE: Fluid transport across retinal pigment epithelium is inhibited by cyclic AMP. Proc Natl Acad Sci USA 79: 2111–2110, 1982.
- 120) Ueno S, Bambauer HJ, Umar H, et al: Histo- and cytochemical demonstration of guanosine triphosphatase activity in the outer segments of rods in the rat retinal by means of newly developed method. Cell Tis Res 234: 225 -230, 1983.
- 121) Wheeler GL, Bitensky MW: A lightactivated GTPase in vertebrate photoreceptors: Regulation of light-activated cyclic GMP phosphodiesterase. Proc Natl Acad Sci USA 74: 4238-4242, 1977.
- 122) Bitensky MW, Wheeler GL, Aloni B, et al: Light- and GTP-activated photoreceptor phosphodiesterase: Reguation by a light-activated GTPase and identification of rhodopsin as the phosphodiesterase binding site. Adv Cyclic Nucleotide Res 9: 553-572, 1978.
- 123) Stein PJ, Rasenik MM, Bitensky MW: Bio-

chemistry of the cyclic nucleotide-related enzymes in rod photoreceptors. Progress in Retinal Research, Osborne N, Chader G, ed, p227-243, Pergamon Press, Oxford, 1982.

- 124) **Rodbell M**: The role of hormone receptors and GTP regulatory proteins in membrane transductin. Nature 284: 17-22, 1980.
- 125) Ross EM, Gilman AG: Adenylate cyclase. Ann Rev Biochem 49: 533-564, 1980.
- 126) Bitensky MW, Rasenik MM, Shinozawa T, et al: Altered cyclic nucleotide metabolism and the pathogenesis of hereditary dystrophies. Adv Cyclic Nucleotide Res 12: 227–238, 1980.
- 127) Hirano A, Becker NH, Zimmerman HM: Pathological alterations in the cerebral endothelial cell barrier to peroxidase. Arch Neurol 20: 300-308, 1969.
- 128) Hirano A, Becker NH, Zimmerman HM: The use of peroxidase as atracer in studies of alterations in the blood-brain barrier. J Neurol Sci 10: 205-213, 1970.
- 129) Westergaad E: The blood-brain barrier to horseradish peroxidase under normal and experimental conditions. Acta Neuropathol 39: 181-187, 1977.
- 130) Van Deurs B, Amtorp O: Blood-brain barier in rats to the hemepeptide microperoxidase. Neurosci 3: 737-748, 1978.
- 131) Bundgaard M, Cserr H, Murray M: Impermeability of hag fish cerebral capillaries to horseradish peroxidase. Cell Tis Res 198: 65 -77, 1979.
- 132) Bundgaard M, Cserr H: Impermeability of hag fish cerebral capillaries to radiolabelled polyethylene glycois and to microperoxidase. Brain Res 206: 71-81, 1981.
- 133) Bundgaard M: Brain barrier systems in te lamprey. I. Ultrastructure and permeability of cerebral blood vessels. Brain Res 240: 55-64, 1982.
- 134) Oldendorf WH: Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using tritiated water internal standard. Brain Res 24: 372 -376, 1970.
- 135) Oldendorf WH: Saturation of blood brain barrier transport of amino acids in phenylketonuria. Arch Neurol 28: 45-48, 1973.
- 136) Orlewski M, Sessa G, Green JP: γ-glutamyl transpeptidase in brain capillaries possible site of blood-brain barrhier for amino acids. Science 184: 66-68, 1974.
- 137) Pollay M: Regional transport of phenyla-

昭和63年12月10日

alanine across the blood-brain barrier. J Neurosci Res 2:11-19, 1976.

- 138) Betz AL, Goldstein GW: Polarity of the blood-brain barrier; neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. Science 202: 225-227, 1978.
- 139) Pollay M, Srevens A: Simultaneous measurement of regional blood flow and glucose extraction in rat brain. Neurochem Res 4: 109-123, 1979.
- 140) Betz AL, Csejtey J, Goldstein GW: Hexose transport and phosphorylaton by capillaries isolated from rat brain. Amer J Physiol 236: 96 -102, 1979.
- 141) Betz AL, Firth JA, Goldstein GW: Polarity of blood-brain barrier; distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. Brain Res 192: 17-28, 1980.
- 142) Olsson Y, Klatzo I: Blood-brain barrier to albumin in embryonic new born and adult rats. Acta Neuropathol 10: 117-122, 1968.
- 143) Oldendorf WH, Brown WJ: Greater number of capillary endothelial cell mitochondria in brain than in muscle. Proc Soc Exper Biol Med 149: 736-738, 1975.
- 144) Polly M, Roberts PA: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. Neurosurgery 6: 675-685, 1980.
- 145) Inomata K, Yoshioka T, Nasu F, et al: Ultracytochemical studies of capillary endothelial cells in the rat central nervous system. Acta Anat 118: 243-248, 1984.
- 146) Osinchak J: Electron microscopic localization of acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity in hypothalamic neurosecretory cells of the rat. J Cell Biol 21: 35-47, 1964.
- 147) Ogawa K, Ago Y, Tanaka T: Ultrastructrual cytochemistry of phosphatase related to thiamine metabolism. Thiamine, p179–193, Wiley Interscience, New York, 1976.
- 148) Ogawa K, Sakai M, Inomata K: Recent findings on ultracytochemistry of thiamine phosphatases. Ann NY Acad Sci 378: 188-214, 1982.
- 149) 斎藤多久馬: Thiamine pyrophosphatase. 武内忠 男,小川和朗編,新酵素組織科学,p340-348,朝 倉書店,東京,1980.
- 150) Hardonk MJ: 5'-nucleotidase. I. Distribution of 5'-nucleotidase in tissues of rat and mouse. Histochemie 12: 1-17, 1968.

- 151) Berne RM, Knabb RM, Ely SW, et al: Adenosine in the local regulation of blood flow. A brief overview. Fed Proc 42: 3136-3142, 1983.
- 152) Wachstein M, Meisel E: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. Amer J Clin Pathol 27: 13-23, 1967.
- 153) 斎藤多久馬: 5'-nucleotidase. 武内忠男, 小川和朗 編, 新酵素組織科学, p314-328, 朝倉書店, 東京, 1980.
- 154) 小川和重,小川和朗: Phosphatase II: 5'nucleotidase, 組織細胞化学 1985, 日本組織細胞化 学会編, p23-35, 学際企画,東京, 1985.
- 155) Uusitalo RJ, Karnovsky MJ: 5'-nucleotidase in different populations of mouse lymphocytes. J Histochem Cytochem 25: 97-103, 1977.
- 156) Robinson JM, Karnovsky MJ: Ultracytochemical localization of 5'-nucleotidase in guinea pig neutrophils based upon the use of cerium as a capturing agent. J Histochem Cytochem 31: 1190—1196, 1983.
- 157) Rais MJ: La nucleotidase et sa relation arec la desamination des nucleotides dans le coeur et dans le muscle. Bull Soc Chim Biol 16: 385 -399, 1934.
- 158) Borgers M: The cytochemical application of new potent inhibitors of alkaline phosphatases. J Histochem Cytochem 21:821-824, 1973. 網膜毛細血管および脈絡膜毛細血管における 細胞膜荷電バリアーの存在

について 文献

- 159) 山田酉三: 脈絡膜の電子顕微鏡的研究, 第1報, 生 体染色時の家兎脈絡膜所見, 特に墨粒貧食細胞を 中心として一, 日眼 65: 1213-1221, 1955.
- 160) 桜木章三: 眼球における Leaking Vessel の電顕 的観察. 日眼 72: 1920-1935, 1968.
- 161) Ferrant JL: An electron microscopic study of ferritin. Biochem Biophys Acta 13: 569-576, 1954.
- 162) Farquhar MG, Wissing SL, Palade GE: Glomelular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomelular capillary wall. J Exp Med 113: 47-66, 1961.
- 163) Florey L: The endothelial cell. Brit Med J 2: 487-490, 1966.
- 164) Burns RR, Palade GE: Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. J Cell Biol 37: 277-299, 1968.
- 165) Bernstein MH, Hollenberg MF: Moment of electron opaque markers through the capillaries of the retina. Structure of the eye. Rowen

日眼会誌 92巻 12号

44 - (1956)

EW, editor, p129—140, Schautatuer-Verlag, Stuttgart, 1965.

- 166) Bernstein MH, Hollenberg MF: Fine structure of the choriocapilalaris and retinal capillaries. Invest Ophthalmol Vis Sci 4: 1016-1025, 1965.
- 167) 塩瀬芳彦,小栗正己:血液網膜柵と血液房水柵に 関する電子顕微鏡的研究.日眼 73:1606-1622, 1969.
- 168) 大熊正人,宇山昌延: 脈絡膜血管の透過性に関す る電子顕微鏡的研究. I. フェリチンの脈絡膜毛細 血管外移行について. 日眼 76:323-330,1972.
- 169) Nomura T: Electron microscopic study on permeability of intraocular capillaries in young rabbits. Yamada E, Mishima S, ed, The Structure of the Eye III, p395—405, Jap J Ophthalmol Tokyo, 1976.
- 170) Pino RM, Essner E: Structure and permeability to ferritin of the choriocapillary endothelium of the rat eye. Cell Tis Res 208: 21-27, 1980.
- 171) Revel JP, Karnovsky MJ: Hexagonal array of subunits in intracellular junctions on the mouse heart and liver. J Cell Biol 33: 7-12, 1967.
- 172) 大熊正人,西占 貢:フリーズフラクチャー及び ランタントレーサーによる毛様体細胞間結合の解 明.日眼 78:1419-1430, 1974.
- 173) 大熊正人:光凝固による網膜色素上皮細胞間結合 の破壊と修復.日眼 79:258-268,1975.
- 174) Straus W: Segregation of an intravenously injected protein "droplets" of the cell of the rat kidney. J Biophys Biochem Cytol 3: 1037-1043, 1957.
- 175) Straus W: Localization of intravenously injected horse raddish peroxidase in the cells of the convoluted tubules of rat kidney. Exp Cell Res 20: 600-603, 1960.
- 176) Straus W: Cytochemical observatins on the radish peroxidase and the development of phagosomes in the cells of kidney of the rat. Exp Cell Res 22: 282-291, 1961.
- 177) Straus W: Inhibition of peroxidase by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. J Histochem Cytochem 19: 682-688, 1971.
- 178) Straus W: Phenylhydrazine as inhibitor of horseradish peroxidase for use in immunoperoxidase procedures. J Histochem Cytochem 20: 949-951, 1972.
- 179) **Karnovsky MJ:** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in

electron microscopy. J Cell Biol 27: 137A, 1965.

- 180) Graham RC, Karnovsky MJ: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14: 291 -302, 1966.
- 181) Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as atracer. J Cell Biol 35: 213-236, 1967.
- 182) Shiose Y: Electron microscopic studies on blood-aqueous barriers. Jap J Ophthalmol 14: 73-87, 1970.
- 183) Shiose Y: Morphological study on permeability of blood-aqueous barrier. Jap J Ophthalmol 15: 17-26, 1971.
- 184) Vegge T: An epithelial blood-aqueous barrier to horse raddish peroxidase in the ciliary process of the vervet monkey (Cercopithecus aethiops). Z Zellforsch 114: 309—320, 1971.
- 185) Vegge T: An epithelial blood-aqueous barrier to horse raddish peroxidase in the iris capillaries of the vervet monkey (Cercopithecus aethiops). Z Zellforsch 121: 74-81, 1971.
- 186) Smith RS: Ultrastructural studies of bloodaqueous barrier. I. Transport of electron dense tracer in the iris and ciliary body of the mouse. Amer J Ophthalmol 71: 1066–1077, 1971.
- 187) Peyman GE, Spitznas M, Straastma BR: Peroxidase diffusion in the normal and photocoagulated retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 10: 181-189, 1971.
- 188) Peyman GE, Spitznas M, Straastma BR: Chorioretnal diffusion of peroxidase before and after photocoagulaton. Invest Ophthalmol Vis Sci 10: 489-495, 1971.
- 189) Peyman GE, Bok D: Peroxidase diffusion in the normal and laser-coagulated primate retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 11: 35-45, 1972.
- 190) Shabo AL, Maxwell DS: The blood-aqueous barrier to tracer protein A light and electronmicroscopic study of primate ciliary process. Microscop Res 4: 142–158, 1972.
- 191) Peyman GE, Vlchek J, Seth N: Chorioretinal diffusion process following pigment epithelial degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 14: 58-62, 1975.
- 192) Pederson OO, Tonjum AM: Protein diffusion barriers in the anterior uvea of the rabbit eye. Acta Ophthalmol 21: 67-76, 1975.
- 193) **Tso MO OM**: Pathology of the blood-retina barrier. Cunha-Vaz J, ed, The Blood-retinal

Barriers, p235—250, Plenum Publishing, New York, 1980.

- 194) Flage T, Ringvold A: The retinal pigment epithelial diffusion barrier in the rabbit eye after sodium iodide injection. A light and electron microscopic study using horse raddish peroxidase as atracer. Exp Eye Res 34: 933 -940, 1982.
- 195) Anstadt B, BLare N, Rusin M: Alteration of the blood-retinal barrier by sodium iodide: Kinetic vitrous fluorophotometry and horse raddish perxidase tracer studies. Exp Eye Res 35: 653-662, 1982.
- 196) Raviola G, Butler JM: Undirectional vesiclar transport mexchanism in retinal vessels. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1465-1474, 1983.
- 197) Korte GE, Bellhorn RW, Burns MS: Ultrastructure of blood-retinal barrier permeability in rat phototoxic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 962, 1983.
- 198) Wallow IHL: Posterior and anterior permeability defects? Morphologic observations on streptozotocin-treated rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1259-1268, 1983.
- 199) Toris CB, Pederson JE: Experimental retinal detachment. VII. Intravenous horseradish peroxidase diffusion across the blood-retinal barrier. Arch Ophthalmol 102: 752-756, 1984.
- 200) Korte GE, Bellhorn RW, Burns MS: Urethane-induced rat retinopathy. Plasticity of the blood-retinal barrier in disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1027-1034, 1984.
- 201) Wallow IH: Repair of the pigment epithelial barrier following photocoagulation. Arch Ophthalmol 102: 126-135, 1984.
- 202) Toris CB, Pederson JE: Experimental retinal detachment. VIII. Retinochoroidal horseradish perxidase diffusion across the blood-retinal barrier. Arch Ophthalmol 103: 266-269, 1985.
- 203) Bunt-Milam AH, Black RA, Bensinger RE: Breakdown of the outer blood-retina barrier in experimental commotio retinae. Exp Eye Res 43: 397-412, 1986.
- 204) 太田 実:光凝固と fluorescein 組織化学. 眼紀 24:499-506, 1973.
- 205) 大槻 潔:病的人眼における fluorescein dosium の組織化学.(1)異常漏出と毛細血管瘤.日眼 77: 1501-1524, 1973.
- 206) Laties AM, Rapoport S: The blood-ocular barriers under osmotic stress. Studies on the freeze-dried eye. Arch Ophthalmol 94: 1086 -1091, 1976.

- 207) Wallow IH: Repair of the pigment epithelial barrier following photocoagulation. Arch Ophthalmol 102: 126-135, 1984.
- 208) Plattner H, Wolfram D, Bachmann A, et al: Tracer and freeze-etching analysis of intracellular membrane-junctins in Paramecium. With a note on a new heme-nonpeptide tracer. Histochemistry 45: 1-21, 1975.
- 209) Plattner H, Wachter E, Gröbner P: A heme-nonapeptide tracer for electron microscopy. Separation, characterization and comparison with other heme-tracers Histochemistry 53: 223-242, 1977.
- 210) Simionescu N: Enzyme tracers in the study of vascular permeability. J Histochem Cytochem 27: 1120—1130, 1979.
- 211) Pino RM, Essner E: Permeability of rat choriocapillaris to hemeproteins. Restriction of tracers by a fenestrated endothelium. J Histochem Cytochem 29: 281-290, 1981.
- 212) Sibley CP, Baumann KF, Firth JA: Permeability of the foetal capillary endothelium of the guinea-pig placenta to haem proteins of various molecular sizes. Cell Tis Res 223: 165–178, 1982.
- 213) Venkatachalam MA, Fahimi DH: The use of beef liver catalase as aprotein tracer for electron microscopy. J Cell Biol 42: 480-489, 1969.
- 214) Venkatachalam MA, Karnovsky MJ, Fahimi DH, et al: An ultrastructural study of glomerular permeability using catalase and peroxidase as tracer proteins. J Exp Med 132: 1153 -1167, 1970.
- 215) Keilin D, Hartree EF: Catalase, peroxidase, and metmyoglobin as catalysts of coupled peroxidatic reactins. Biochem J 63: 310–318, 1955.
- 216) Graham RC, Kellermyer RW: Bovine lactoperoxidase as a cytochemical protein tracer for electron microscopy. J Histochem Cytochem 16: 275-283, 1968.
- 217) Rossi FA, Antonini E, Caputo A: Hemoglobin and myoglobin. Adv Protein Chem 19: 73 -80, 1964.
- 218) Kendrew JC, Bodo G, Dinitzis HM, et al: A three dimension model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. Nature 181: 662—666, 1958.
- 219) Anderson WA: The use of exogenous myoglobin as an ultrastructural tracer. Reabsorption and translocation of protein by the renal tubule. J Histochem Cytochem 20: 672-684, 1972.
- 220) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE:

Permeability of muscle capillaries to exogenous myogobin. J Cell Biol 57: 427-452, 1973.

- 221) Karnovsky MJ, Rice DF: Exogenous cytochemic as an ultrastructural tracer. J Histochem Cytoche 17: 751-753, 1969.
- 222) Feder N, Reese TS, Brightman MW: Microperoxidase, a new tracer of low molecular weight. A study of the interstitial compartments of the mouse brain. J Cell Biol 43: 35-36, 1969.
- 223) Feder N: A heme-peptide as an ultrastructural tracer. J Histochem Cytochem 18: 911-913, 1970.
- 224) Feder N: Microperoxidase. An ultrastructural tracer of low molecular weight. J Cell Biol 51: 339-343, 1971.
- 225) Simionescu N, Simionescu A, Palade GE: Permeability of muscle capillaries to small hemepeptides. Evidence for the existance of patent transendothelial channels. J Cell Biol 64: 586-607, 1975.
- 226) Mahler ER, Cordos EH: Biological cytochemistry. p96, Harper and Row Pub New York, 1971.
- 227) Hirata A, Ishigouoka H, Kitaoka T, et al: Influence of molecular charge on rat choriocapilary permeability and its relation to anionic and cationic site distribution. Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 246, 1988.
- 228) **Hirata A, Kitaoka T, Ishigouoka H,** et al: Effect of molecular charge on choriocapillaris permeability of the rat: Tracer studies with peroxidase enzyme tracers and in situ studies of charge distribution. (in preparation)
- 229) Gordon SR, Essner E: Plasma membraneassociated vesicles on retinal capillaries of the rat. Amer J Anat 174: 161–172, 1985.
- 230) Lin W, Essner E: Diffuse cytoplasmic staining of retinal capillary endothelium. J Histochem Cytochem 10: 1325-1330, 1986.
- 231) Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731, 1972.
- 232) Mowry RW: Improved procedure for the staining of acidic polysaccharides by Muller's (hydrous) ferric oxide and its combination with the Feulgen and periodic acid-Schiff reactions. Lab Invest 7: 566-576, 1958.
- 233) Mowry RW: The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins.

With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue G8X and their combination with acid-Schiff reaction. Ann NY Acad Sci 106 : 402-423, 1963.

- 234) Seno S, Ono T, Tsujii T: Macromolecular charge and cellular surface charge in adhesion, ingestion, and blood vessel leakage. Ann NY Acad Sci 416: 410-425, 1983.
- 235) Seno S, Ono T, Tsujii T: The anionic barrier of blood vessel walls and the possible pathologic changes due to the deionization of the barrier plasma proteins. Biorheology 20: 653 -662, 1983.
- 236) Tsujii T, Naito I, Ukita S, et al: The anionic barrier system in the mesonephric renal glomerlus of the arctic lamprey, Entosphenus Japonicus (Martens) (Cylostomata). Cell Tis Res 235: 491-496, 1984.
- 237) Tsujii T, Naito I, Ukita S, et al: The anionic barrier system in the mesonephric renal glomerlus of the brown hagfish, Paramyxine atami Dean (Cylostomi). Anat Rec 208: 337-347, 1984.
- 238) Seno S, Akita M, Ono T, et al: Fine-granular cationic iron colloid. Its preparation, physiological characteristics and histochemical use for the detectipn of ionized anionic groups. Histochemistry 82: 307-312, 1985.
- 239) Luft JH: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat Rec 171: 347-368, 1971.
- 240) Luft JH: Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in annimal tissues. Anat Rec 171: 369-416, 1971.
- 241) Dannon D, Goldstein L, Marikovsky Y, et al: Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surface. J Ultrastruct Res 38: 500-510, 1972.
- 242) Skutelsky E, Rudich Z, Dannon D: Surface charge properties of the luminal front of blood vessel walls. An electron microscopic analysis. Thromb Res 7: 623-631, 1975.
- 243) Skutelsky E, Dannon D: Redistribution of surface anionic sites on the luminal front of blood vessel endothelium after interaction with polycationic ligand. J Cell Biol 71: 232-241, 1976.
- 244) 高田邦昭,平野 寛:細胞膜表面荷電の検索.組織 細胞化学,1983,日本組織細胞化学会編,p133 --145,学際企画,東京,1983.
- 245) **Krotz IM**: Succinylation. Methods Enzymol 9:576-580, 1967.

- 246) Rennke HF, Patei YA, Vnekatachalam A: Glomerular filtration of proteins: Clearaneutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat. Kidney Int 13: 324-328, 1978.
- 247) Burry RW, Wood JG: Contributions of lipids and proteins to the surface charge of membranes. An electron microscopy study with cationized and anionized ferritin. J Cell Biol 82: 726-741, 1979.
- 248) 藤本豊士,小川和朗:電顕的酵素組織化学,武内忠 男,小川和朗編,新酵素組織化学,p32-53,朝倉 書店,東京,1980.
- 249) 斎藤多久馬:酵素組織化学.一基本的な原理と術 式一.日本組織細胞化学会諸,組織細胞化学,1983, p1-18.
- 250) Mayahara H, Ogawa K: The effect of thickness of specimen on the ultrastructrual localization of alkaline phosphatase activity in the rat kidney. J Histochem Cytochem 16: 721-724, 1968.
- 251) Kelly VE, Cavallo TO: Glomerular permeability. Transfer of native ferritin in glomeruli with decreased anionic sites. Lab Invest 39: 547 -553, 1978.
- 252) Kanwar YS, Farquhar MG: Partial characterization of anionic sites in glomerular basement membrane. J Cell Biol 79: 150a, 1978.
- 253) Kanwar YS, Farquhar MG: Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. J Cell Biol 81: 137-153, 1979.
- 254) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE: Differentiated microdomains on type luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites. J Cell Biol 90: 605-613, 1981.
- 255) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE: Differentiated microdomains on type luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites. J Cell Biol 90: 614-621, 1981.
- 256) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE: Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium : Distribution of lectin receptors. J Cell Biol 94 : 406-413, 1982.
- 257) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE: Preferntial distribution of anionic sites on the basement membrane and the abluminal aspect of the endothelium in fenestrated capillaries. J Cell Biol 95: 425-434, 1982.

- 258) Pino RM, Essner E, Pino L: Anionic sites in Bruch's membrane. J Cell Biol 87: 116a, 1980.
- 259) Essner E, Pino RM : Distribution of anionic sites in Bruch's membrane of the rabbit eye. Eur J Cell Biol 27 : 251-255, 1982.
- 260) Pino RM, Essner E, Pino L: Location and chemical composition of anionic sites in Bruch' s membrane of the rat. J Histochem Cytochem 30: 245-252, 1982.
- 261) Coldwell RB, Slapnick SM, McLaughlin BJ: Decreased anionic sites in Bruch's membrane of spontaneous and drug-induced diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1691-1697, 1986.
- 262) Pino RM: The cell surface of a restrictive fenestrated endothelium. I. Distribution of lectin-receptor monosaccharides on the choriocapillaris. Cell Tis Res 243: 145-155, 1986.
- 263) Pino RM: The cell surface of a restrictive fenestrated endothelium. II. Dynamics of catinic ferritin binding and the identification of heparin and heparan sulfate on the choriocapillaris. Cell Tis Res 243: 157–164, 1986.
- 264) Pint da Silva P, Nicolson GL: Freeze-etch localization of concanavalin A receptors to the membrane intercalated particles in human erythrocyte membranes. Biochem Biophys Acta 363: 311-319, 1974.
- 265) Pint da Silva P, Parkison C, Dwyer N: Fracture-label; Cytochemistry of freezefracture faces in the erythrocyte membrane. Proc Natl Acad Sci USA 78: 343-347, 1981.
- 266) Pint da Silva P, Parkison C, Dwyer N: Freeze-fracture cytochemistry. II. Thin sections of cells and tissues after labeling of fracture faces. J Histochem Cytochem 29: 917-928, 1981.
- 267) Pint da Silva P, Torrisi MR, Kachar B: Freeze-fracture cytochemistry. Localization of wheat germ aggulutinin and concanavalin A binding sites on freeze fractured pancreatic cells. J Cell Biol 91: 361-372, 1981.
- 268) Pint da Silva P, Torrisi MR: Freeze-fracture cytochemistry. Partition of glycophorin in freeze fractued erythrocyte membranes. J Cell Biol 93: 463-469, 1982.
- 269) Kitaoka T, Fujimoto K, Ueno S, et al: Anionic sites and glycosyl residues on rod outer segments. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 341, 1987.
- 270) Tokuyasu KT: Immunochemistry on ultrathin frozen sections. Histochem J 12: 381-403, 1980.
- 271) 金井清和, 大熊 紘, 宇山昌延: 網膜色素上皮細胞

48-(1960)

の貧食の研究.2. 被貧食物質の荷電状態と貧食. 日眼 88:1293-1305,1984.

- 272) Seno S, Tanaka A, Urata M, et al: Phagocytic response of rat liver capillary endothelial cells and Kupffer cells to positive and negative charged iron colloidal particles. Cell Struct Funct 1: 119-127, 1975.
- 273) Tanaka T: Phagocytic properties of lung alveolar wall cells. Acta Med Okayama 28: 69 -79, 1974.
- 274) Bernstein MH, Hollenberg MJ: Fine structure of the choriocapillaris and retinal capillaries. Invest Ophthalmol Vis Sci 4: 1016-1025, 1965.
- 275) Shannon LM, Kay E, Lew JY: Peroxidasse isozymes from horseradish roots. J Biol Chem

241:2166-2172,1966.

- 276) Klapper MH, Hacket DP: Investigation on the multiple components of commerical horseradish peroxidase. Biochem Biophys Acta 96: 272-282, 1965.
- 277) Welinder KG: Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Eur J Biochem 96: 483-502, 1979.
- 278) Tiggeman R, Plattner H, Rasched I, et al: Quantative data on peroxidatic marker for electron microscopy. With a note on actin identification in paramecium cells. J Histochem Cytochem 29: 1387—1396, 1981.
- 279)長澤俊彦:腎疾患一腎生検材料を用いて一. 組織 細胞化学,1983,日本組織細胞化学会編,p147 -155,学際企画,東京,1983.