(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

一機能と形態の接点、その研究法の開発一

第2部 Müller 細胞組織細胞化学の barrier 研究への応用と単離された 網膜色素上皮細胞の形態的・機能的細胞極性の研究 (図82,表16)

上 野 聪 樹 (京都大学医学部眼科学教室)

共同研究者

石鄉間	岡 均・ 美果・	平田 本田	昭治	・安渕 ・高橋	幸男 昌代	・西川 ・晴山	雅子 正志	(京都大学医学部眼科学教室)
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	学医学	部第2	解剖学家	数室)
H.J.	BAMB	AUER	• Н.	UMAR	(Gie	essen 🕇	、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)

 猪俣賢一郎
 (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)

 瀬口
 春道
 (高知医科大学第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
 (武田薬品中央研究所)

 安藤
 孝雄
 (武田薬品中央研究所)

 M. UECK
 (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

II. Newly developed cytochemistry on retinal Müller cells and pigment epithelial cells for interpretation of their contributions in blood-retinal barrier

Satoki Ueno

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

別冊請求先:〒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, M.D. Department Ophthalmology, Ohtsu Red Cross Hospital, 1-1-35, Nagara, Ohtsu-shi 520, Japas. (Received October 11, 1988)

Abstract

During the cytochemistry of paranitrophenylphosphatase activity (NPPase) in the retina, two diffrent reactions, ouabain-insensitive, K-independent NPPase (non K-NPPase) and glucose 6 phosphatase (G6Pase) were discoved to reveal specific localaization restricted to the ER of Müller cells. The characterisity of these enzyme activities were analysed, and they were applied as an eletron microscopic marker to detect precise cellular localization of Müller cells in experimental pathological conditions or in the transitional areas between optic nerve-retina or retina-ciliary body. The perticipation of Müller cells to barrier function was discussed in such conditions or areas. The activity was observed not only under conventional elctron microscope but also under high voltage electron microscope to observe three-dimensional views of cellular changes. Newly developed double staining technique of Müller cell-labeling enzyme activities and various penetrating tracers was also tried to examine the role of Müller cells in blood-retinal barrier under high voltage electron microscopy (HVEM). Developement of heterogenous cell membrane marker for retinal pigment epithelial cells under electron microscopy was tried. Among various kinds of lectin, charged ferritin and enzyme activities, only Mg-ATPase was found to be used as such marker for observation of functional cellular polarity. Utilizing this enzyme cytochemistry, detection of cell membrane changes under isolation or proliferation condition was carried out to simulate those of pathological retinal pigment epithelial cells. It is noteworthy that the enzyme localization was rapidly changed according to morphological change of cell membranes in such retinal pigment epithelial cells. The changing process of membrane polarization during cell-isolation or proliferation was discussed with special reference to the roles of pigment epithelial cells in pathologial conditions. (Acta Soc Ophthalmol Jpn. 92: 1962-2014, 1988)

Key wards: Müller cell, non K⁺-NPPase, High voltage EM, Kuhnt tissue, RPE, membrane polatity

IV Müller 細胞の組織細胞化学および その barrier 研究への応用

綱膜には神経細胞を支持して網膜の全体的構造を支 える網膜固有のグリア細胞として非常に大型のミュ ラー細胞 Müller cell が存在する. (表1) にその模式 図を示すが、この Müller 細胞はその基底部を硝子体 に面している. この基底部はかなり幅広く、しかも互 いに連続して存在する1)2). つまり, 眼球の層構造におい て内境界膜といわれたものの実態は, Müller 細胞の基 底部の細胞膜構造である3). 基底部より網膜外方へ向 かう神経線維層・神経節細胞層, 内網状層においては やや胞体が細くなるが、側面の突起を伸ばして神経線 維間、神経節細胞核部あるいは神経節細胞とニューロ ン細胞とのシナプス結合の間隙を埋める。内顆粒層部 ではやや胞体が幅広くなり、ここに核あるいはゴルジ 装置をもつ。ここから再度細くなって外網状層、外顆 粒層の視細胞胞体間を走る. 視細胞核部やシナプス部 は Müller 細胞の細い細胞体がその隙間をうめるよう に保持し, その細胞配列が一定の規則性をもって保た れている. 視細胞核部が終わり内節部が始まる部位に,

光顕では一列になった膜様構造が観察され外境界膜と なずけられたが、電顕観察によってこの外境界膜は内 境界膜と同様に実態のある膜構造ではなく、単に視細 胞と Müller 細胞の側部細胞膜にデスモゾーム desmosome がこの位置で水平に配列しているにすぎな いことが判明した³⁾⁻⁷⁾. 外境界膜から外方が, Müller 細胞の頂部であるが、視細胞内節の間隙に多数の微絨 毛 microvilli を出している. つまり、感覚網膜におい ては神経細胞が視細胞・ニューロン細胞・神経節細胞 の三段階の構造であるのに対し、この Müller 細胞は その距離を単一の細胞として存在する程長大な細胞体 を持つ. この Müller 細胞は機能的な面でも興味を持 たれ、グリアとしての網膜構造支持作用だけには止ど まらず、最近では各神経細胞への栄養の調節や⁸⁾重要 な電気現象⁹⁾にも関与していると報告されている.

一方, Müller 細胞は網膜脈絡膜変性, 萎縮あるいは 瘢痕化等の病的状態においても盛んに研究されてき た.他の神経組織と同様に, グリア細胞である Müller 細胞の果す役割が大きい事は,現在までの多くの病理 学的研究や実験病理学研究から間違いないものと思わ れるが,幾つかの大きな問題のために病的状態におけ 昭和63年12月10日

inner limiting membrane

nerve fiber laver

神経節細胞層 ganglion cell layer

表 1



内網状層	inner plexiform layer
内顆粒層	inner nuclear layer
外網状層	outer plexiform layer
外顆粒層	outer nuclear layer
外境界膜	outer limiting membrane
錐体·桿体層	cone-rod layer
色素上皮層	pigment epithelial layer
j になる ¹²⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ .	
問題となるのは、網	関連色素上皮細胞が広範に
再生しきれず, その	部をグリアと思われる細
「直接感覚網膜側カ	ら進展して充填した場合
, 2), 蛍光色素か	「漏出しない点である」 網

る Müller 細胞の役割についてはまだまだ不明な点が 少なくないという現状である.

では、その問題点とは何であろうか. ここで話を十 数年前へと戻したい. その当時, 私に与えられた最初 の研究テーマは,実験的に脈絡膜循環を障害し,蛍光 眼底造影を施行して確認した病変部における網膜色素 上皮細胞の変化を形態学的に観察し, この両者を比較 して網膜色素上皮細胞の蛍光色素に対する barrier と しての役割を解明することであった10)~16). 蛍光眼底造 影所見として、障害初期(直後から4日目)には病変 部全体で広範な蛍光色素の漏出が認められ、この時期 にはその漏出部に一致して網膜色素上皮細胞に空胞変 性や細胞脱落などいろいろな壊死性変化が認められ る10)~12). やがて、蛍光色素漏出が止り、顆粒状蛍光や 萎縮性蛍光所見が認められるようになる12)~14)16). 網膜 色素上皮細胞も正常細胞構造ではないにしても再生し たり、あるいは色素を多量に含んだ細胞と共に多重構 造を示すようになる.やがて再生した網膜色素上皮細 胞は再度消失していき,組織学的にも網脈絡膜萎縮像 を示すよう

内境界膜

袖経線維層

ここで提 欠損して再 胞の突起カ でも(図1 膜色素上皮細胞が変性脱落した場合に, 蛍光眼底造影 色素が漏出することはその barrier としての働きを考 えれば充分納得できるし、互いに tight junction を持 つような状態まで再生した後漏出が停止することも納 得できる。ただグリア細胞の突起が周囲から多数集合 した形で充填した場合にも, 何故漏出が止るのだろう か.しかも、電顕で観察してもこれら突起間には特に 細胞間結合装置がみられない、つまり細胞間隙は開大 しているにもかかわらず漏出が阻止されるのは、どの 様な機構によるものであろうか.

もう一つの重要な問題点としては、今グリア細胞と 書いたが、これは Müller 細胞なのかあるいは網膜に 存在する他のグリア細胞であるアストロ細胞 astrocyte やマイクログリア細胞 microglial cell なの





であろうか,この様な重大な点が判然としなかったこ とがあげられる. その理由として,本細胞は正常状態 において網膜の支持細胞としての機能を持つため、網 膜神経細胞の間隙を隙間なく埋めるために非常に複雑 な局在を占めている、そのため、時として電顕レベル でも正確に同定する事が困難である事が少なくない. しかも病的な状況では、さらに細胞突起や胞体の形が 複雑になるため、その同定はなお一層困難になる。 蛍 光色素漏出を停止さすことから見て、この Müller 細 胞と思われる細胞は病的な状況ではある種の barrier として働くことが類推は出来るが、その細胞自体を正 確に同定出来ないとするならば、そこからさらに研究 を進める事など全く無意味である。もし Müller 細胞 を確実にしかもいかなる変性時においても正確にマー ク出来る方法が特に電顕レベルで存在すれば、私が 行ったような実験的網膜脈絡膜変性モデルの作製など の研究においては計り知れない有用性があるものであ ると思われるし、病的状態における Müller 細胞の変 化の経時的な動態あるいはその果たす役割を理解する 事は決して困難ではなくなると考えられる。それが可 能になって始めて, Müller 細胞の barrier としての役 割解明にも近ずく事が出来るようになるのではないだ ろうか.

勿論,これまで幾つかの Müller 細胞をマークする ための組織細胞化学的方法は提唱されてはいるが,後 述するような種々の問題点が指摘され,その信頼性は いささか疑問視されている現況である.この章では, われわれが網膜におけるある種の酵素検出の過程にお いて発見し、その後開発を加えた Müller 細胞同定の ための新しい電顕的酵素組織細胞化学的方法を紹介し たい. さらにその方法応用して、Müller 細胞の barrier 機能解明を試みた研究過程についても述べていきた い.

 網膜におけるウアバイン非感受性、カリウム非異 存性パラナイトロフェニールフォスファターゼ活性 ouabain-insensitive, K-independent paranitrophenylphosphatase (non K-NPPase)の存在につい て

水、イオン輸送酵素として重要な Na-K-ATPase 活 性の検出法については先に第1部,第Ⅱ章網膜色素上 皮細胞の項で述べた.われわれが網膜において本酵素 活性の組織細胞化学的検討を試みたのは,網膜色素上 皮細胞もさりながら,視細胞における活性の局在を明 らかにしたかったためである.

(網膜視細胞における Na-K-ATPase 活性検出の試 み)

多くの電機生理学的研究により, 視細胞(杆体)に おいては, 表2に示すように暗状態では外節と視細胞 内方部にかけて連続的な Na イオンの流れがあること が明らかにされた^{17)~23)}. Na の流れは外節が光に反応 すると著明に減弱して, 視細胞全体の過分極 hyperpolarization が引き起こされることから²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾, この Na イオンの停止こそが, 視細胞電気信号の本態であ ると考えられるに至っている. 流れを作るために, Na イオンは外節原形質膜のイオンチャンネルを通って視 細胞内へと流入するが, その流出は, 外節以外の原形 表 2



質膜に存在する Na-K-ATPase のポンプ作用によっ て能動的におこなわれるという実験結果が報告され た^{19)25)~28)}. このため, 視細胞においては盛んに Na-K-ATPase 酸素活性局在の検討がおこなわれるように なった. 生化学的には,外節を分離してその活性検出 が試みられたが,外節には高い活性が存在するという 意見^{27)~30)}と,内節にしか存在しないという意見^{31)~33)} とにわかれて論議が交わされ,いずれとも決着がつか ない情況であった.

その様な背景をもとに、組織細胞化学的にこの酸素 活性を検出して、その局在を明らかにしようとする試 みが、Wachstein-Meisel による Mg-ATPase 活性検 出法³⁴)に Na やK イオンを添加することから始めら れたが、これら活性はまったくイオン依存性や Na-K-ATPase の特異的阻害剤である ouabain による明ら かな抑制がみられず、信頼性に乏しいという現状で あった^{31)~41)}.そこで次には、この ouabain を tritium ラベルしたオートラジオグラフィーが試みられた. Sterling ら⁴²⁾⁴³⁾はこの方法を用いて視細胞内・外節を 比較した結果、grain は視細胞内節あるいはそれより 内方に多く分布すると報告したが、光顕的な解像力の 限界から微細局在については不明であった.そこで、 われわれは^{44)~48)}電顕的に応用できる組織化学方法と して, Mayahara らが開発した K イオン依存性 paranitrophenylphosphatase (K-NPPase) 活性検出 法⁴⁹⁾⁵⁰⁾を応用して Na-K-ATPase 活性局在の検出を 試みた.

その実験方法について述べると、実験材料としては 体重800~1,000gの正常成熟モルモットを使用した. Pentobarbital sodium 麻酔下に 0~4 ℃, 0.25%グル タールアルデヒドおよび 2 %パラホルムアルデヒド混 液(0.1M カコジル酸緩衝液、8 %庶糖、pH7.4)にて 左心室から10分間潅流固定を行い、後極部から赤道部 までの網膜を脈絡膜を付けて細切し2mm 幅の小片と した. さらに20分間同固定液中で前固定し、その後 1 ~ 2 時間0.1M カコジル酸緩衝液 (8 %庶糖, pH7.4) 中で洗浄を行った.この小片から Vibratome, Microslicer (堂坂 EM 社) あるいは Cryotome (Jung 社) を もちいて光顕用には15 μ m に、電顕用には40 μ m の切 片を作成し浸漬した.

以下に浸漬液の組成を示す.

K-依存性NPPase (Na-K-ATPase) (Mayahara ら⁴⁰⁾⁵⁰⁾)

グリシン-KOH 緩衝液(pH9.0) 250.0mM
 パラナイトロフェニール燐酸(Mg塩)
 (p-NPP) 10.0mM

日眼会誌 92巻 12号

54-(1966)

ジメチルスルフォキサイド	(DMSO)
	25%V/V
レバミゾール	2.5mM
クエン酸鉛(KOH 液中)	4.0mM
	(最終 pH8.8)

コントロール実験として0.001~10mM ウワバイン添 加,浸漬液から賦活イオンである K の除去,1mM PCMB-S の添加,基質である NPP の除去,活性化剤 である DMSO⁵¹⁾の除去,alkaline phosphatase の阻害 剤であるレバミゾール⁵²⁾の除去あるいは浸漬前の熱処 理(60° ,15分)などを行った.反応後,光顕用切片 には1%イオウ化アンモニウムを1分間作用させ,発 色の後グリセリンゼリーにて封入した.電顕用には 1%オスミウム酸にて後固定,エタノール系列にて脱 水し,Spurr のエポキシレジン⁵³にて包埋した.

(図3~5)にモルモット視細胞内・外節部における K-NPPase活性の光顕(図3)および電顕的局在(図 4,5)を示す。光顕でも活性は視細胞内節のほうが 強いことはある程度判別できるが,この部を電顕でみ ると,活性は内節原形質膜にのみ局在することが明ら かとなる(図4)。特に外節の基部には内節の膜の延長 である突起が伸展しているが,この様に複雑に入り組 んだ部位においても電顕的観察をおこなえば、その局 在が完全に識別可能であった(図5)¹¹¹.これらのこと から,視細胞における Na-K-ATPase は外節部を除く 原形質膜に限局することが明らかで,生理学的な推測 を完全にうらずけることとなった。

(網膜におけるウアバイン非感受性,カリウム非異存性 NPPase 活性の存在)

このように視細胞原形質膜に K-NPPase 活性で現 される Na-K-ATPase が局在することは明らかに なったが、同時に網膜には非常に興味ある酵素活性が 併せて存在することも明らかになった。

網膜を K-NPPase 標準浸漬液で反応させると, 視細 胞外節を除く網膜全層で反応がほぼ陽性に認められ た.とりわけ視神経線維層, 内外網状層で反応が著明 であった.理論的に言えば, この反応はコントロール 実験においては全て認められなくなるはずである.と ころが,以下に示すような K-イオンを除去した浸漬液 で反応させた場合(図 6),

K-非依存性 NPPase

グリシン―NaOH 緩衝液	(pH9.0)	250.0 mM
p-NPP(Mg 塩)		10.0 mM
DMSO		25% V/V

レバミゾール	2.5 mM
クエン酸鉛(NaOH 液中)	4.0mM
	(最終 pH8.8)

あるいは Na-K-ATPase の特異的な阻害剤であるウ アバインを添加した場合(図7)にはまだかなりの反 応が残存していた.この場合標準浸漬液による反応と は異なり,内境界膜・視神経線維層あるいは内顆粒層 に強く,とりわけ内顆粒層を外方へ向かう線状の反応 が特徴的であった.しかも,浸漬液から NPP を除去し たり, PCMB-S の添加あるいは浸漬前の熱処理を行う とこれらの反応も完全に消失した(図8).

これら反応を電顕にて観察すると、標準 K-NPPase の浸漬液で反応させると、視細胞外節を除くすべての 部位で原形質膜に反応産物が認められた.同時に Müller細胞基底部の多数の滑面小胞体(図9),内顆粒層 の核膜(図10)、ゴルジ装置にも反応が認められた、小 胞体の反応は内境界膜~神経繊維層~内網状層では豊 富な滑面小胞体に、内顆粒層では核膜およびゴルジ装 置外槽に著明であった. 外顆粒層より外方では Müller 細胞が細く,滑面小胞体も少なくなるため反応を所々 認めるのみであった(図11). また Müller 細胞以外に は、視細胞、ニューロンあるいは神経節細胞の小胞体 には反応産物はまったく見られなかった. 浸漬液への ウアバイン添加,あるいは第二の浸漬液を用いて K-イ オンによる影響を除去すると, 原形質膜の反応はほぼ 完全に消失したが、Müller 細胞の小胞体の反応は全く 変化せず (図12), 基質である NPP の除去, PCMB-S 添加,熱処理を行うとこれら小胞体の反応もまったく 消失した(図13). 一方, 視神経においては K-イオンの 存在の有無にかかわらず、全ての細胞において原形質 膜も小胞体においても反応は認められず、グリア細胞 である astrocyte や oligodendrocyte の小胞体にも反 応産物は見られなかった(図14).

以上の結果から、モルモット網膜においては二種類 の NPPase 活性が存在する事が明らかとなった.まず 第一に、原形質膜における反応は完全に K-イオンに依 存し、さらに Na-K-ATPase の特異的阻害剤であるウ アバインにより阻害を受ける事から、従来の生化学的 報告と一致し^{54)~56)}、Na-K-ATPase の部分反応である K-phosphatase を検出した事は間違いないものと思 われる.これら Na-K-ATPase の網膜における局在と その機能との関連についてはすでに報告してあ る^{44)~46)}.第二の反応はこれら Na-K-ATPase との関 連がない事は明らかであるが、基質に依存し、PCMB-





昭和63年12月10日

57 - (1969)



Sで阻害を受けさらに加熱処理で失活する事から、少 なくともなんらかの phosphatase 活性である事は間 違いない. この様な K-NPPase 酵素組織細胞化学にお ける, K-非依存性, ウアバイン一耐性の NPPase 活性 の存在は生化学的にも, 組織細胞化学的にも示唆され ていた57)~59). 網膜においても、(表3)に示す様な NPPaseの生化学的定量を行ったところ、むしろKイ オンに依存する Na-K-ATPase 部分反応より(上方), Kイオン非依存性の活性の方がやや高く存在するこ とが判明した. そもそも NPPase とは基質であるパラ ナイトロフェニールリン酸 (NPP) を加水分解しうる 酸素の総称であり、その化学反応は表4のごとく行わ れる. ところが、この基質を加水分解することが知ら れている酵素だけでも少なくとも10数種類以上に及 び、本基質を用いて組織化学反応を試みる場合には、 むしろ単一の酵素反応を検出している可能性が少ない という危険が常に伴い、今後 K-NPPase 酵素組織細胞 化学をおこなう場合には、充分この様な活性の存在に も留意し、念入なコントロール実験をおこなう必要が あることを示している.その中には哺乳類に存在せず. 組織化学反応の対象外のものも含まれるが、主だった ものをあげると次ぎのようになる60)61).

- O ouabain-sensitive, K-dependent NPPase
- ouabain-insensitive, K-independent NPPase
- H-K-ATPase
- acid NPPase
- non-specific alkaline phosphatase
- non-specific acid phosphatase

このうち, acid NPPase, non-specific alkaline phosphatase および non-specific acid phosphatase に関し ていえば,モルモット網臓にはこの alkaline phosphatase が基質として β グリセロリン酸を用いても組 織細胞化学的には認められないこと44)~46). あるいは浸 漬液への alkaline phosphatase の特異的阻害剤であ るレバミゾールの併用49)50)さらには浸潰の pH を考え ると,その可能性は非常に少ないものと思われる。 H-K-ATPase に関しては^{62)~64)}, その特異的阻害剤で ある nolinium bromide では阻害されないことから判 別可能であった65)66). これらを含めて、ここで紹介でき ない NPPase の詳細については成書 (1980)⁶⁰⁾を参考 にされるとよい. この様ないわゆる non K-NPPase 活 性の組織細胞化学的局在は組織によってミトコンドリ アであったり67)、微絨毛であったり49)50)、さらには Müller 細胞の様に滑面小胞体であったり67)68)と一致 してはいないし, またこれらが果して同一の酸素活性 であるかどうかという可能性も今の所は不明である. K-NPPase 検出のためには望ましくないこの様な non K-NPPase 活性であるが、それが Müller 細胞の ER にのみ検出されるという点において、膜にのみ存 在する K-NPPase 活性との比較は容易である. それど ころか, 網膜における Müller 細胞のかなり貴重な光 顕・電顕マーカーとなることは明らかである.

(他の Müller 細胞標識法との比較)

現在まで Müller 細胞の組織細胞化学的染色法とし ては, ルテニウムレッド法⁶⁹⁾⁷⁰, あるいは渡銀染色法⁷¹⁾ が提唱されている.しかしながらこれらの方法は決し て常に Müller 細胞にのみ特異性 があるわけではな く,往々にして他の神経細胞も染色される事があり, その信頼性はいささか乏しい.さらにもし一歩譲って, この様な方法でうまく Müller 細胞が染められたとし ても,用いられる染色剤の特性を考えた場合, Müller 細胞の胞体がびまん性に染色される可能性が高く,こ れらの方法が電顕による観察にはまったく適していな いこともまた明らかであろう.

一方、S-100蛋白⁷²⁾あるいは glial fibrillary acidic protein (GFA)⁷³⁾による免疫組織細胞化学的方法を用 いると時として Müller 細胞が染色されることが明ら かとなった^{72)~86)}. この反応は光顕上正確な Müller 細 胞への反応を示し、もし電顕へ応用したとしても Müller 細胞の glial fiber が染色されるので有用な方法で あると考えられる. しかしながら、この方法はそもそ も電顕への応用自体が現在のところは非常に困難であ

58-(1970)

り、さらには Müller 細胞だけではなく、同様に glial fiber をもつ astrocyte や oligocyte なども染色され $\delta^{72)^{-86}}$ という欠点を持っている。特に GFA は組織細 胞化学的に正常 Müller 細胞には反応を示さず、病的 変化を示した場合のみ染色性が増強して Müller 細胞 が染め出されるとされている⁸¹⁾⁻⁸⁶⁹. したがって、これ らの蛋白は現在のところ組織細胞化学的に有用な Müller 細胞単独のマーカーとはとてもいえない状態 であろう。そのため最近では新たに、carbonic anhydrase isoenzyme C (CA-C) による免疫組織細胞化学 が登場してきた⁸⁷⁾⁻⁹¹. これは少なくとも光顕レベルで は astrocyte には正常でも異常でも反応しないことが 示され、非常に有望なマーカーであると考えられる.

さらに、Müller 細胞に対するある種の monoclonal 抗 体, RET-G2, RET-G3⁹²⁾あるいはS-antigen からの monoclonal 抗体⁹³⁾もなど作製されている. これらも 光顕レベルでの免疫組織細胞化学反応がおこなわれ、 少なくとも正常状態でも Müller 細胞にかなり特異的 な局在を示している. ただしこれらの方法も決して欠 点がないわけではなく, 組織細胞化学的反応のために は凍結切片でしかも標識物質に蛍光色素をもちいなけ ればならなかったり⁹²⁾, あるいは固定標本においては かなり著明な artifact である核染色像を呈している所 見⁹³⁾が認められる. さらに現在ではやっと光顕レベル の反応しか行い得ず, 微細な局在性を検討でき得るよ うなところへ到達でき得るにはまだまだ検討の余地が おおいにあるといってよいだろう.

これらに対してわれわれが示したK-非存性 NPPase反応は、視神経では認められず、astrocyteや oligocyteの小胞体にはまったく陰性であった.このこ とからグリア細胞すべてに共通した酵素活性ではな く、Müller細胞にのみ限局しているという利点をも つ.さらには、細胞の中でも小胞体にのみ限局してそ の反応は電子顕微鏡下でも明確に認識でき得るので電 顕観察にもマーカーとしては充分適している.この様 な点から考えれば、最初に述べた様に病理学的応用あ るいは種々の網脈絡膜変性実験へ応用しても、もしそ の反応が検出されるのであれば Müller 細胞の経時的 動態を観察することは決して困難ではないであろうと 考えられる.

2. non K-NPPase と G6Pase 活性の関係

さて、コントロール実験の結果から、この non K-NPPase 活性が少なくともなんらかの燐酸酵素活性で あることが判明したが、この反応が NPP に特異的な 日眼会誌 92巻 12号



ものであるのかあるいは他のリン酸を基質とした酵素 活性を検出した可能性があるのかという点については 今のところ不明である. 基質として NPP のかわりに 用いたリン酸は、(表5)に挙げたものである. これら の反応液中で全く non K-NPPase と同様な処置を 行ってみた. コントロール実験としても同様に 0.001~10mM ウアバイン, 1.0mM PCMB-S の添加, 基質除去, DMSO 除去, alkaline phosphatase の阻害 剤であるレバミゾールの除去あるいは浸漬前の加熱 (60℃、15分) などをおこなった.

(表5)に示した様な種々のリン酸基質を NPP の代 りに用いた場合,網膜にはそれに対応して光顕的に 色々な部位に酵素反応が現れたが,このなかで NPP

表 5

G6P	(Glucose 6-phosphate)	+
G1P	(Glucose monophosphate)	
F1, 6D	P(Fructose 1, 6-diphosphate)	-
F6P	(Fructose 6-phosphate)	±
Beta-g	glycerophosphate	-
ATP	(Adenosine triphosphate)	_
ADP	(Adenosine diphosphate)	-
AMP	(Adenosine monophosphate)	-
TPP	(Thiamine pyrophosphate)	
TMP	(Thiamine monophosphate)	-
ITP	(Inosine triphosphate)	_
IDP	(Inosine diphosphate)	-
IMP	(Inosine monophosphate)	_
UTP	(Uridine triphosphate)	-
UDP	(Uridine diphosphate)	-
UMP	(Uridine monophosphate)	-
СТР	(Cytidine triphosphate)	-
CDP	(Cytidine diphosphate)	-
CMP	(Cytidine monophosphate)	-
GTP	(Guanosine triphosphate)	-
GDP	(Guanosine diphosphate)	-
GMP	(Guanosine monophosphate)	-

昭和63年12月10日

59-(1971)

を用いた場合とまったく同様に Müller 細胞のみに限 局した局在を示したのはグルコース 6 リン酸 G6P を 使用した場合のみであった⁹⁴⁾.反応は内境界膜~神経 線維層に強く,内網状層では外方へ降りていく細長い Müller 細胞の胞体が観察された.外網膜状層よりさら に外方では Müller 細胞の胞体が狭細化するため反応 は著明ではなかった(図15).F6P を用いた場合は非常 に弱いがほぼ同様の局在を示した.G6P による反応 は,基質依存性があり,熱処理や PCMB-S によって完 全に失活した.さらに本反応はウアバインやKイオン の有無によっては変化が認められなかった.また G6Pase 活性検出のコントロール実験である pH 5.0 カコジル酸緩衝液による前浸漬や,1mM Cuイオン、 10mMZn イオン, CN イオン,あるいはFイオンによ る前浸漬によっても完全に失活した.

電顕レベルでこの反応を観察しても、その局在は non K-NPPase 活性の局在とまったく同様であった. 反応は Müller 細胞の小胞体,核膜、ゴルジ装置のみに 限局していた.内境界膜~神経繊維層~神経節細胞層 では Müller 細胞が豊富な小胞体を持つため、非常に 著明な活性を認めた(図16).浸漬液へのウアバインの 添加や K イオンを除去してもこれらの反応にはまっ たく変化を認めなかった.しかしながら基質である G6P を除去したり、PCMB-S 添加あるいは熱や pH 5.0の酢酸緩衝液で前処理をおこなうと、小胞体の反応 は完全に消失した.

視神経においては、全ての部位において反応は陰性 であった.神経要素以外にも、グリア細胞である



60 - (1972)

astrocyte や oligocyte の小胞体には反応産物はまっ たく存在しなかった(図17).

なおこれら各燐酸を用いた燐酸酵素活性の組織細胞 化学検出にはそれぞれの原法が存在するが、グルコー ス6 燐酸(G6P)を基質として用いた場合には non K-NPPase 活性と同様の反応産物の局在を示したた め、G6Pase 活性検出の原法である Wachstein-Meisel 法⁹⁵⁾での検索をすすめた、浸漬液の組成は、

G6Pase (Wachstein-Meisel⁹⁵)

トリスマレイン酸緩衝液	(pH6.7)	80.0mM
G6P(Mg 塩)		1.68mM
硝酸鉛		3.63mM
	(最終	§ pH 6.7)

である. コントロール実験としては, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) による15分間の前浸漬,あるいは1mM 硫酸 銅,10mM 硫化亜鉛,10mM 塩化フッソ(トリスマレ イン酸緩衝液,pH 6.7)%による15分間前浸潰をおこ なった. Wachstein-Meisel による原法で G6Pase 活性 を検出した結果は光顕的にも電顕的にもまったく non K-NPPase と同一で,活性は Müller 細胞の小胞体に のみ限局していた.コントロール実験の結果も同様で あった.固定液中のグルタールアルデヒドの影響につ いて検討した結果も,この両者の間では差は見られな かった.

以上の結果からモルモット網膜においては、組織細胞化学的にはMüller細胞小胞体にのみ限局して G6Pase活性も存在することが明らかとなった。しか もこの活性は視神経におけるグリア細胞である astrocyteやoligocyteの小胞体には見られず, non K-NPPase活性と同様有力なMüller細胞の組織細胞 化学マーカー酵素活性であることは間違いない.

ここで問題となるのは、この Müller 細胞の小胞体 という同一の部位に限局する反応産物が二つの異なっ た酵素活性によるものか、あるいは一つの酵素活性を 異なった基質によって検出した可能性があるかどうか という点であろう.というのは Neil ら⁹⁷⁾⁹⁸⁾によって肝 臓における G6Pase が p-NPP を分解するという報告 がなされている.特に肝臓における G6Pase の至摘 pH は6.0~6.5であるので、p-NPP を基質にしたいわ ゆる acid p-NPPase あるいは acid phosphatase との 鑑別が必要であるとされている⁶⁰⁾.この両者を鑑別す る手段としては、pH5.0の酢酸緩衝液による前浸漬が おこなわれる⁹⁹⁾.すなわち、この前浸漬により G6Pase は完全に失活するが acid p-NPPase は影響を受けな いことを利用したものであるが、本実験の non K-NPPase 活性はこの前浸漬によって失活したため、そ の可能性は否定出来ないものと考えられる.しかしな がら一方では、われわれが検出した non K-NPPase 活 性はアルカリ領域で検出されており、この様なアルカ リ領域に示適性を持つ酵素が酸性領域の緩衝液での前 浸漬で失活することもまた当然であり、この様な方法 だけで同一酵素活性であるかどうか判定することはは なはだ困難であろう.それでは、p-NPP が基質として 働く可能性を持ち、アルカリ領域に至適 pH を持つ非 特異性 alkaline phosphatase が問題となって来るが、 その可能性も少ないことは先程述べた.

G6P 以外の基質が共通性を持たないことはコント ロール実験から明らかである.それでは、non-NPPase と G6Pase は異なった酵素であるが、たまたま同一部 位に局在しているのであろうか.ここで非常に興味あ るデーターを示しておきたい.Yamamoto ら¹⁰⁰⁾は肝 臓における K-NPPase 酵素組織細胞化学で肝細胞の 原形質膜にウアバイン一感受性の反応を検出したが、 小胞体にはまったく反応産物を認めていない、G6Pase は肝細胞小胞体に著明な活性を持つことは有名な事実 であり、組織細胞化学にも実証されている.このこと は、明らかに non K-NPPase 活性とG6Pase 活性とが 異なるものであることをあらわしているのではないだ ろうか.

このように G6Pase の non-K-NPPase は共にモル モット網膜 Müller 細胞小胞体という同一部位に局在 する可能性が強いことが明らかとなった. G6Pase 活 件は初期においては肝細胞に特有な酵素であると考え られていたが、その後の研究によって広く種々の臓器 の細胞に分布するとされている101)102).本酵素活性は、 G6P あるいは carbamyl phosphate 等を加水解する phosphohydrolase activity とこれらが持つリン酸基 を種々の糖や多価アルコールへと転移させる phosphotransferase activity とに分けることができ る103)、本酵素の重要な機能は、ブドウ糖産生臓器にお いては glvcogen の分解や糖新生によって生じた G6P を加水解して, glucose を血中に放出することである と考えられている104). モルモットの様な網膜に血管を 持たない種においては、Müller 細胞に glycogen 顆粒 が非常に豊富に存在することが明らかとなってい る⁸⁾. さらにこれに関連して glycogen 代謝に関連した 酵素活性も高いものと報告されている105). このように Müller 細胞の重要な機能の一つは glycogen の代謝と

蓄積と考えられる.特に網膜無血管動物においては, 網膜神経細胞に対して一種の肝臓の働きをしていると いう意見も存在する.したがって G6Pase 活性が強い ことも,そのグリコーゲン代謝の一環である glucose の放出機能をあらわしているものと考えられる.これ に対して non-KNNppase 活性がどのような働きをし ているのかは不明である.ただ他の glycolytic な酵素 活性と同様に Müller 細胞小胞体に限局して存在する ことは非常に暗示的であるように思われる.

3. non K-NPPase および G6Pase 活性の実験的網 脈絡膜変性おける Müller 細胞マーカーとしての応用

では、次の段階として、non K-NPPase や G6Pase 活性が変性した網膜においても Müller 細胞にマー カーとして検出することが可能なのであろうかという 実験を行わなければならないだろう.実験的網脈絡膜 変性・萎縮の作成方法としては、ジアテルミー疑固, 冷凍凝固およびレーザー光凝固を網膜脈絡膜に加え た106)~112). その理由としては以下のようなことがあげ られる. この様な組織細胞化学的実験に際しては、固 定を通常の形態観察よりはかなり弱い条件で行わなけ ればならない必要がある.必然的に、組織の保持の状 態が悪くなるため、かなり多くの材料を用いる必要が 生じる. それだけでなく, 経時的な変化も追わなけれ ばならないので、そのためにもかなり多くの材料を要 し,非常に難しい手技を必要とするような実験モデル 作成法を行うことにはかなり困難であったからであ る。勿論これまでに、この様な凝固をもちいた実験が 形態病理学的に多く成されているという事も結果の比 較という点からは見逃せない.実験材料としてはレー ザー凝固を行う必要があるため,有色モルモットを使 用した. ジアテルミー凝固は、0.4%塩酸オキシプロカ イン表面麻酔下に結膜を切開し,田川社製ラジオメッ サーをもちいて,経強膜的に0.5mm 針で10秒間凝固を 加え検眼鏡で凝固班の出現を確認した106)~108)。冷凍凝 固としては、ディスポーザブルの凝固装置を用い、眼 底に白い凝固班が出現する条件で行った(図 18)108)112). 次ぎにレーザー凝固であるが, 凝固時間0.1 秒・サイズ200µm・出力50~100mWの条件でアルゴン あるいはクリプトンレーザーにて光凝固を加え た109)~112). これらどちらの凝固群においても、凝固後 1日から2ヵ月の間眼底を観察しつつ, 蛍光眼底造影 も同時に行って、それらの結果をもとに種々の期間に おいて眼球の摘出を行った. 凝固部位を必ず健常部位 を含むように組織片に細切してから(図19)後の操作

は正常の場合と全く同様である106)~112).

凝固直後では、網膜全体の破壊が著明で各所に細胞 脱落による空胞形成が認められるが、この中で Müller 細胞のみはかなり正常に近い形態を保持しているし、 ERの反応も明瞭に認められる.そればかりか、通常で は外境界膜部周辺では Müller 細胞胞体の占める割合 や ER の数も僅かで、光学顕微鏡用厚切切片下でも本 反応はわずかしか認めないが、凝固部やや周辺では中 心に向かうに従って、Müller 細胞体の肥大化や ER の 増加が反応の増強から明らかである(図20).これは電 子顕微鏡による観察では尚一層著明であり、外顆粒層 から外境界膜まで ER が明らかに増加している像が認 められる(図21).

その後の経過は、Müller 細胞細胞核の下方や(図22) 上方への(図23)移動現象さらには網膜全体における 反応の増加などすでに報告した所見が認められる。こ の頃になると Müller 細胞核同志の隣接像が多くみら れるようになる。

変性の最終的段階においては、神経細胞の消失部位 を Müller 細胞が複雑に充填している. この時期に網 膜上方では非常に反応が多い、つまり肥大化した Müller 細胞がさらに外側へ傷害中心部へと向かうのが明 瞭に観察される(図24).一方これよりさらに外方では、 これら Müller 細胞が偏平化した網膜色素上皮細胞に 直接接したり、網膜色素上皮細胞の欠落している部位 においては Bruch 膜に到達する像が見られる(図25).

この様に, non K-NPPase あるいは G6Pase 活性を もちいれば病的網膜においても変性した Müller 細胞 を同定することは可能であった。網膜において反応は Müller 細胞にのみ限局し,変性した他の神経細胞に検 出されることはなかった.ただし、ここにまだ一つの 問題が存在する. それは,変性した神経細胞には本活 性が認められなかったのであるが、他のグリア細胞が 変性した場合,何等かの理由で正常よりも活性が上昇 して反応が認められるのではないかという危惧が残 る. そのためわれわれはさらに追加実験を試みた. ア ストロサイトやオリゴグリアは視神経に多く存在する とされている. そこで, YaG レーザーをもちいて, 視 神経を出来るだけ深部まで凝固した110). この様にアス トロサイトやオリゴグリアが変性するようにして、同 様の条件にて網膜と比較しながら反応を行ったが、そ れでも視神経変性部には全く反応が光顕および電顕と も見られなかった110).以上から、本酵素活性が変性状 態においても Müller 細胞同定に適していることは明



らかとなった.本法をもちいて観察した結果,各種の 凝固あるいは凝固の条件によって Müller 細胞は異 なった変化を経時的に示すことも明らかとなったが, その凝固固条件による相違や時間的変化等の詳細につ いては別著を参照されたい^{106)~112)}.

4. 超高圧電顕をもちいた観察

Müller 細胞の胞体が長大でありしかも複雑に入り 組む突起構造を多数持つことは先に述べた. 通常われ われが光顕で観察する切片の厚さは1~10µm である が,透過電顕で観察する超薄切片は僅か500Å程度の厚 さしかない. したがって光顕レベルではともかく, こ のような細胞を透過型電顕で観察を行っても、ほんの 僅かな断面を見ているにしか過ぎない113).しかもこの 様な超薄の連続切片を得ることの困難さについては電 顕形態学を研究する多くの者が経験しているものと思 われる.したがって,透過型電顕で Müller 細胞の全体 像をある程度観察する事がなかなか難しいことはおわ かり頂けると思う.われわれは Müller 細胞に特異的 に検出される反応を示したが、例えこの様な方法を用 いたとしてもそれを通常の透過型電顕で観察する以上 はその限界を避けては通れない. ここで反応産物の電 子密度が高い事を利用し、これを超高圧電子顕微鏡(超 高圧電顕)による観察へ応用する事を試みた、なぜな ら超高圧電顕では500kVから1000kVという高い加速 電圧領域で観察出来るため, 100kV 以下の加速電圧し か出力できない電顕に比べて電子線の試料透過能が著 しく大きい. この大きな透過能はすなわち厚い切片で も電子線が容易に透過してしまう事を意味する. ただ し,通常の電子染色を施しても、厚い切片ではほんの 表面のみを染色することが出来るだけであるか ら114), 観察対象には何か電子密度の高いマーカーが存 在しなくてはならない113). 幸い, われわれが示してい る反応産物はかなり広範にしかも著明に電子密度が高 いため、それを Müller 細胞固有のマーカーとして利 用するならば光学顕微鏡で扱う様な厚い試料の観察が 可能となり、例え複雑な局在を示す細胞であっても何 とか観察出来るのではないかと考えたからであ 3 115)116)

切片の作成方法としては、前固定、薄切、浸漬、後 固定を行い、その後型のごとくエタノール系列・プロ ピレンオキサイドで脱水し Spurr の epoxy resin に包 埋する所までは全く同様である。ただし、反応の浸漬 時間とオスミウム酸による後固定は通常電顕用の物よ りかなり長めに行わなければならない。この様にして 作成した block から,まず最初に ultratome にて超薄 切片を作成し,これを75~100kV の加速電圧の通常の 透過電顕で観察し,反応の有無や程度について大体の 検索を行った.この際反応の電子密度の状態を知るた めに,電子染色を行わないで観察した.超薄切片を通 常の透過型電顕を用いて観察を行った後,同一のブ ロックから ultrame およびガラスナイフを用いて 1 ~5 μ m 厚さの切片を作り,コロイドコーティングした グリッドにのせた.一部はまったく後染色を施さない ままで,また一部はウラニルアセテートのみで37℃, 30分間後染色を行った.このグリッドを Hitachi 社製 1,000kV 超高圧電子顕微鏡(岡崎基生研)にて加速電 圧1,000kV の条件下で観察を行った.

超高圧電子顕微鏡で3µmの厚さを持つ切片を観察 すると、まったく無染色のままでこれら Müller 細胞 小胞体の反応は明瞭に観察する事が可能であった. さ らに Müller 細胞細胞核も特異的な所見を示し容易に 識別出来るため、二つの顆粒層のオリエンテーション も比較的簡単であり、したがって網膜各部位の判定に は困難をともなわなかった. 2µm 以上の厚さを持つ切 片は、たとえ30分間、37℃でウラニルアセテイト後染 色を施しても切片の表層部のみが染色されかえって観 察が困難になることもあったため、今回の観察はすべ て無染色下に行った. それでは、超高圧電顕をもちい る利点を幾つかに分けて紹介し、それが Müller 細胞 観察において実際どうであったかについて具体的に示 していく.

(複雑な局在を示す対象の観察) 解り易くするために (表6)のシェーマで示すが,仮にかなり曲がりくねっ た対象を観察した場合,通常透過電顕用の50Å超薄切 片であれば,1枚の切片上に観察可能な部位は対象の 切れ切れの断面のみである.この対象の全体像を得る ためには,およそ40枚以上もの連続切片をとぎれるこ となく作製しなければならないことになり,技術的に は非常に困難な作業となる.これを2µmの厚切切片で 超高圧電顕観察を行ったとすると,その1枚の切片の 厚さが超薄切片の40倍に当たるため,1枚の切片のみ の観察で全体像の連続した観察が可能になる.そこで, Müller 細胞における具体的な例を示したい.

(図26) に示すのは non K-NPPase 反応を行いそれ を通常透過型電顕で観察した網膜外網状層付近である が, 内顆粒層の Müller 細胞核膜には反応が認められ, さらに外顆粒層部の Müller 細胞小胞体にも反応が認 められるが, その間に位置する外網状層部では反応は 64-(1976)



ところどころわずかに認められるのみであった. この 様な所見のみでは、これらが同一の細胞であるのか別 個の細胞であるのかはまったく不明である. ところが その部から厚切切片を作製して超高圧電顕で観察する と、内顆粒層の核部から外網状層に向かってこの反応 が連続しているだけでなく、一旦内顆粒層で広くなっ た胞体がふたたび非常に狭くなってシナブスの間を通 過していく像が観察された. さらにこの狭くなった胞 体が外顆粒層内方では再度広くなるという興味ある結 果も得られた(図27). つまり、外網状層部において Müller 細胞はかなり胞体が狭細化するため超薄切片 下では連続して捕らえることができなかったのである が、(図26)と(図27)とを比較して見ると、厚切切片 での超高圧電顕観察の有用性は明らかであるものと思 われる.

網膜内境界部では、Müller 細胞の小胞体の反応が著 明であるが、これを厚切切片で見ると超薄切片で見る よりも小胞体が網目状に連続している事がわかる(図 28).さらに神経繊維と神経節細胞にはまったく反応が 存在せず、Müller 細胞がこれら成分の間を埋めている 様子が明らかとなった、内網状層の反応の無いシナプ ス突起の中でも、反応を認める Müller 細胞を連続し た像として捕える事は厚切切片であるために比較的容 易であった. なおこの部での小胞体の密度は Müller 細胞胞基底部に比べると明らかに少なく,さらに胞体 自身もかなり細くなっていた(図29).内顆粒層におけ る小胞体の分布も内網状層とほぼ同程度であったが, ここでは多くの細胞核の中で Müller 細胞の核にのみ 反応が認められ、連続した小胞体の反応ともあいまっ て印象的な所見を呈していた.

(連続切片観察の容易性)

先に述べたが、超薄切片を連続して作製し、ある特 定の対象をある程度立体的に観察する方法が知られて いる、ところが、作成法自体がかなり技術的に難しい という問題を解決できたとしても, この方法はもう一 つの避けられぬ問題点が残されている. 超薄切片の厚 さは約500Åであるため、もし仮に10枚の切片を電顕用 グリッドメッシュに載せられたとしても, 観察出来う る範囲は5.000Åすなわち0.5µm にしか過ぎない. こ れでは観察対象が非常に小さいかかなり限局した部位 であるかがせいぜいである、ところが(表7)の様に 超高圧電子顕微鏡で観察する厚切切片なら、まず扱い が簡単なためかなり連続してグリッドに載せることが 出来る、それに、切片が2umとしても、5枚連続させ られれば、その観察範囲は10µmにも及ぶ、勿論そのグ リッドを連続して幾つも作製することも簡単であるの で、実際にはかなりの範囲で連続した立体的な広がり を持った観察が可能である.

Müller 細胞の観察においてその例を示す. われわれ は変性網膜においては Müller 細胞の核が明らかに増 加していることを発見した(図30). ただし、これらの 観察は超薄切片をもちいて何枚もの写真を観察して得 られた結果である.かなり多量の写真を検討した結果 であるから,かなりの信憑性はあると考えていたが, それが単に核の多い部位ばかりが撮影されていたとい う偶然性を完全に否定することは困難である. これま での電顕観察の報告は Müller 細胞の核を例に挙げる までもなく、似た様な結果から結論を導き出している ことが多い. その様な危惧も超高圧電顕下で連続した 厚切切片を観察することで解決できる.図にその写真 を示すが、3µmの厚さの連続切片(図31)を幾つかの ブロックで作製し、正常状態と変性網膜における Müller 細胞の単位面積あたりの核数を比較したところ,変 性網膜において Müller 細胞の核はおよそ2.5倍の増 加がみられた(図32, 33). この事は, Müller 細胞は変





昭和63年12月10日

性時には明らかに細胞分裂を行っているという事実を 示すものであるといえる.

(不均一の膜上に位置する対象の観察)

この利点を厳密にいえば、最初に挙げた(複雑な局 在を示す対象の観察)の項に含まれるのかもしれない. ただわれわれが Müller 細胞の核における反応を観察 している時に発見した興味ある結果としてここでは分 けて報告したい。(図34)に示すように核膜は小胞体で 構成されているため、K-NPPase および G6Pase の著 明な反応が観察され、印象的な像を示す、 ところが核 膜には核膜孔と呼ばれる部位が存在し、これは小胞体 の切れ目に当たるため、反応産物は見られない、 超高 圧電顕において同部を観察していると、斜めになった 核膜もかなり面積的に拡がりを持って観察できうる. (図35)に示すように、黒く反応が出ている小胞体の中 に円形に白く抜けた核膜孔117)が明瞭に認められる。こ れを連続切片で観察していけば、核膜の様な複雑な形 態を持った面上の対象の観察が可能になる.もちろん, (表8)の様な面としての観察ならフリーズフラク チャー・レプリカ法をもちいれば観察は十分出来うる. 実際に細胞の核膜孔の分布の局在を示した例もある. ただ、明らかに細胞が同定できるような条件下での観 察であれば問題はないのであるが. Müller 細胞の核と いうような、 内顆粒層の様に多くの種類の細胞の核が 混在して存在している部位における観察にはこの様な 方法の有効性があることは間違いない、まして変性網 膜における複雑な局在を示す Müller 細胞をフリーズ フラクチャー・レプリカ法で正確に同定することは困 難である. 現在われわれは連続切片における変性 Müller 細胞核膜孔の分布について検討中である. (三次元的観察)

厚切切片を用いた観察では切片の厚さの分だけ立体 的な観察をすることは可能である.ただそれはわれわ れが見る場合にはあくまで立体的な分布を平面に投影 し、それを頭の中でつみかさねて観察しているという



制約がある.ところが超高圧電顕をもちいると本当の 意味での立体的な観察が可能である。一定の厚さを 持った対象を角度を変えて観察すればよいわけである が、 超高圧電顕ではそのためにグリッドを載せる台の 傾斜をいろいろ変化さすことが出来るようになってい る。つまり水平面から左右に一定の角度で傾斜をつけ て2枚の撮影を行えば stereo-pair. 撮影された写真自 体は平面であっても、それを偏向のレンズをもちいて 左右眼で別々の像を見るようにするか,あるいは立体 観察用の装置をもちいれば立体感のともなった像が観 察できる(表9). この手法をもちいて,現在ではいろ いろな細胞内小器官の立体的観察が行われているが, Müller 細胞においても同様の観察は可能であった. そ の幾つかの例を示しておくので、立体観察装置をおも ちの方は試みていただきたい. まず網膜内方の Müller 細胞を示す(図35,36)、反応が出ている部が大体の分 布と考えていただけばよい、三次元的な観察を行うと、 Müller 細胞の走行性や突起の局在がよく解る. 核膜の 様な対象では、その凹凸の不均一性がより一層明瞭に なる(図38,39)、それよりも、変性網膜における Müller 細胞の像は立体撮影を行えばよりその三次元的な広が りが観察しやすい. 色素を含んだ細胞の周辺を Müller 細胞がどの様に取り囲むかがよく御解りいただけると 思う(講演の中で, stereo 写真を供覧した). このよう に、Müller 細胞という大きな対象の場合、その複雑な 局在性の変化を正確に見ようとすれば,連続切片をし かもこのように三次元的に観察していくことが絶対必 要となってくることはまちがいない。

5. 網膜一視神経移行部および網膜一毛様体移行部





図36, 37 ±8度で撮影した stereo pair 写真. 網膜内方. 2 つの Müller 細胞体が見 える. 36.+8度. 37-8度×3,000



図38, 39 ±8度で撮影した stereo pair 写真. Müller 細胞核. 38.±8度. 39.-8 度.×8,000

昭和63年12月10日







における Müller 細胞マーカー酵素の組織細胞化学

病的網膜において果たす barrier 機能と並んで,正 常状態でも Müller 細胞が barrier 機能として重要な 役割を演じているのではないかと考えられている部位 が存在する. それがすなわち, 網膜が視神経(図40) あるいは毛様体に(図41)移行する境界部である。特 に網膜一視神経移行部に barrier が存在するのかある いはこの部だけは欠落しているのかという点は、臨床 的にも先天性の optic pit あるいは乳頭浮腫の成因な どとの関係するため、多くの BRB 研究者の注目を集 めている、ただどちらも移行部であるため、細胞の構 成そのものが一層複雑であり、しかも、Müller 細胞自 体も通常とはかなり形態を異にしている事から、これ までの研究でグリア細胞が関与していることまでは明 らかとなったが、それが Müller 細胞であるのかそう でないのかという点については全く不明であった. こ の様な移行部においての Müller 細胞の barrier とし ての働きを追及しようとするならば、それ以前にまず、 Müller 細胞がその構造的構成に関与しているのかど うかを確認する事が必要となってくる. その手段とし て、われわれはこれまで述べてきた方法が有効である のではないかと考えた.

(網膜一視神経移行部)

この境界部において、われわれがその barrier 作用 を検討せねばならない部位は二カ所ある.第一には網 膜が視神経と接する部位であり、第二には脈絡膜とい う血管を多く含んだ組織が視神経と接する部である. 解剖学的にこれら両者は古くから興味をもたれ、その 発見者の名をとって前者は Kuhnt の組織¹¹⁸,後者が Elschinig の 組織 と呼ばれているⁿ. このうち Elschinig の 組織 も barrier という点では興味深いが,構築的にはまずミュラー細胞が関与している可能性は少ないため,ここでは Kuhnt の組織に関しての結果を示したい.

Kuhnt の組織の barrier としての重要性が着目され たのは、臨床上蛍光眼底造影所見から造影後期になる と視神経が染色されるという事実からであっ た119)122).同時に構造学的にも興味を持たれ123)124),網 膜一視神経あるいは脈絡膜一視神経間にはいわゆる barrier の欠落している箇所があると推測した。そこで tracer を用いた組織細胞化学的な研究が試みられた. diaminoacridine, rhodamine B 注入実験ではいずれ も視神経は染色されず¹²⁵⁾、この部には definite barrier が存在するという結論が得られたが, 視神経先端部で はなお不明であると述べられていた. そこで, この視 神経先端部に注目して, fluorescein あるいは HRP 注 入実験をおこなったところ、これらの tracer は Kuhnt の組織は通過できないが126)~132), Elschinigの組織は 通過するという結果が得られた.ただここで問題とな るのは、Kuhnt の組織においては網膜一網膜色素上皮 細胞の連続の中に数個の origin が不明の細胞が見ら れるとされていることである. この細胞は時に単にグ リア細胞と記されていることもあるし¹³¹⁾, astrocyte とはっきり断定してある場合もみられる(図42)133). そ こで Kuhnt の組織における barrier 機能を調べる以 前に、出来ればこれまで述べてきた方法を用いてこの 部位における Müller 細胞を含めたグリア細胞の構成 を明らかにしたいと考えた.



包埋法の問題

(図43) にわれわれがおこなった Kuhnt の組織にお ける Müller 細胞反応の光顕像を示す。網膜移行部に おける,つまり Müller 細胞にとってもその存在の末 端部では細胞自身もかなり変形し, 垂直に細胞が局在 するのではなく, 視神経部へ流れるように斜めに走る のが解る. さらに詳しく見ると、Müller 細胞は網膜色 素上皮細胞と連続しているように見えるが、その詳細 は光顕レベルでは不明である. そこで電顕での観察が 必要となってくるが、ここで問題となるのは、非常に 特定された部位の切片を得ることや、非常に数少ない 物を特定して観察を行おうとした場合, さらには限定 した部位での変性実験の場合等は、組織細胞化学にお ける20~40µmの浸潰切片の一般的な包埋では(図 44), 超薄切片作成時においてまずかなりの数の1µm 切片を作成して, 部位の同定をおこなわなければなら ないという繁雑さである. この様な場合の時間と手間 を省くためわれわれはスタンプ切片包埋法をもちい た134)135). その概略を示しておく.

1)まず円柱包埋板をもちいてあらかじめ円柱型の Epon ブロックを作成しておく.

2) 包埋板の平坦な面に切片状の試料を水平にのせる.

3) Epon を滴下して,上から円柱ブロックで押え, これを加温して硬化さす (図45).

こうして、円柱ブロックに切片を張付けた形で、ブ ロックが完成する.これを実体鏡で拡大して観察すれ ば、容易に目的の部位の同定が可能であり、カミソリ 刃でトリミングすればよい(図46).出来るだけナイフ と試料とのコンタクトには注意を払い、なるべくに水 平な方向にセットする.さらに切片の厚さはせいぜい 40μm しかないため、トリミングで余り厚い切片を最 初に落してはならない.この方法をもちいれば、Kuhnt の組織部を常に含む切片の作製は非常に容易であっ た.

(図47)に Kuhnt の組織における Müller 細胞組織 細胞化学像を示した.この様に Müller 細胞の末端は いわゆる Kuhnt の細胞といわれる origin が不明の数

71-(1983)



72-(1984)

個の細胞と接している. それの細胞の反対側には, 網 **膜色素上皮細胞が連続して連なることも解る。この細** 胞には ER に反応産物が認められないため、少なくと も Müller 細胞でないことは確かである. では astrocyte なのであろうか.われわれがこれまで述べ てきた方法を使って多くの切片を調べたところ、この 様な細胞内に時にメラニン色素顆粒が認められる。こ れらから,この細胞はどうやら網膜色素上皮細胞由来 の物ではないかと推論している. これらの細胞と網膜 色素上皮細胞とは側面細胞膜同志が接しているし. Müller 細胞とも明らかに側面同志の接着形態をとっ ている(図48). 網膜色素上皮細胞と Müller 細胞は共 に細胞学的には頂部と側面・基底部を明瞭に持つ上皮 細胞様形態を示しているが、その細胞の極性は全く正 反対であり、網膜においては頂部同志が向かい合う形 をとる. その様な上皮細胞の形をとる細胞同志が、こ の網膜―視神経移行部で(図48)の様な接着形態をと りえるなら、しかもその細胞間が tight junction 様結 合を持ち得るため、その部においてはかなりしっかり した形態的 barrier となっているのではないだろう D>.

これまでの実験から, 脈絡膜毛細血管を通過した tracer は脈絡膜-視神経移行部である Elschinig の組 織からは視神経内へ侵入するが, Kuhnt の組織の組織 を通過して網膜下へ出現することはないとされてい る.もし, どちらも astrocyte からこれら移行部の細胞 が構成されているとするならば, この様な実験結果を 説明することははなはだ困難である.われわれが考え たように, Kuhnt の組織が網膜色素上皮細胞と Müller 細胞の連続形であるなら, 上皮細胞の barrier 機能を 考えれば説明に不自然さはない.

(網膜一毛様体移行部)

網膜一毛様体移行部(鋸状縁)は多層よりなる神経 網膜が一層の毛様体無色素上皮細胞に移行する部であ るため、やはり特異な細胞構成を示すと考えられてい る^{136)~140)}. 従来の形態学的検索では、この部は主とし て Miller 細胞によって形成されているとする意見が 多いが、一方では移行部の中心には未分化型細胞が存 在するとの反論もある¹³⁷⁾¹³⁸⁾. この論争は、先程述べた Kuhnt の組織の由来についての論議と全く共通して いるように思われる. いずれにせよ、この移行部にお いても Miller 細胞の局在や細胞形態を明らかにする ことは非常に重要な問題である. barrier に関しても、 毛様体部では BAB が存在し¹⁴¹⁾, 網膜部では BRB と いうように区分されている機能が移行するはずである から、同部の細胞構築を新しい観点で見直してみるこ とに意義があることは間違いない.

組織細胞化学的観察は、やはりかなり限局した部位 であることから、Kuhntの組織の観察と同様の方法を もちいた¹⁴²⁾.(図49)に同部の Müller 細胞像を示すが、 通常網膜分とは異なり、網膜外方部においても Müller 細胞 ER の活性が著明である。しかも Müller 細胞の 核は網膜内・外方へかなり偏って存在し、ほぼ全体が Müller 細胞でしめられるというように変性網膜にお ける様式を示す(図50).毛様体無色素上皮細胞にも活 性は見られるが、その程度は Müller 細胞に比べると かなり弱い.反応様式も Müller 細胞では内方部に著 明であるのとは異なり、細胞質全体に均等にみられる. これまで未分化細胞ともいわれた移行部でも活性は著 明であり、反応の様式は Müller 細胞と毛様体無色素 上皮細胞のほぼ中間型、あるいはやや毛様体無色素上 皮細胞に近い形を示していた.

Kuhnt の組織と同時に、網膜一毛様体移行部におい ても Müller 細胞の著明な変化がみられたことは興味 深い. しかも超高圧電子顕微鏡を応用すれば、さらに その全体像の把握が容易になる(図51, 52). Müller 細 胞を主たる構成要素とするこれら両移行部における Müller 細胞の構造変化は、神経網膜部ほぼ全体を Müller 細胞が占めさらに非常に肥大した胞体を持つ ことであろう. この事は、ただ単に網膜に分布して各 神経細胞を規則正しく配列させると言う狭義の支持作 用ということだけでなく,神経網膜全体を両端でしっ かり支えると言う広義での支持作用も有しているので はないだろうか. そのことはグリアという意味を考え る上で,一つの機能的な意義を如実に示しているので はないかという気がする. barrier 機能については未だ 余り詳細が解らないが、この様な BABと BRB との 移行部では、その主たる構成細胞である Müller 細胞 の占める役割がかなり大きいのではないかと考えられ る. 網膜下腔についていえば、その両端部は網膜色素 上皮細胞—Müller 細胞および毛様体無色素上皮細胞 -Müller 細胞の接合で守られていることになる.た だ, Kuhnt の組織においては側面同志の細胞結合とい う形態をとり、鋸状縁では Müller 細胞と毛様体無色 素上皮細胞は頂部同志で接合する。細胞の種類として はほぼ同一であるが,極性的には異なるこれらの事実 がなにを意味するのかも今の所は全く不明である.し かし、この様な問題の追及がある意味で barrier のさ



らなる解明の突破口になる可能性も大きい.

6. Müller 細胞特異酵素活性と tracer の二重染色 法

これまでの章で、K-NPPase および G6Pase 活性は 正常のみならず病的状況においても Müller 細胞の ER に限局し、細胞同定のための良い光顕・電顕マー カーとなることを述べてきた。それでは、複雑な局在 を示す Müller 細胞は確実に同定出来得るわけである から、もし同時に tracer を染色することが可能であれ ば、病的状態における Müller 細胞がどの様に形態的 な barrier となり得るかが明らかになるかもしれな い. この章の始めに、「網膜色素上皮細胞が欠損し、そ の間隙を Müller 細胞の突起が進展して埋めても、そ れまで漏出していた蛍光色素が停止するのは何故であ ろうか」という疑問を持ったと述べた.変性状態にお ける蛍光色素の漏出や停止の組織細胞化学的観察につ いては、fluorescein sodium そのものを tracer とし て、その局在性を凍結未固定クライオスタット切片・ 蛍光顕微鏡で観察した試みがあげられる^{143)~146)}.ただ し、これらはまず蛍光顕微鏡が光顕であること、さら に蛍光顕微鏡の解像力が通常光顕に比べてもかなり落 ちしかも凍結未固定クライオスタット切片がかなり厚 いという数々の制約があるため、細胞の変化の詳細や、 微妙な tracer の局在というようなわれわれが最も知 りたいことを明らかにでき得るレベルでの観察は不可 能である。われわれがこれから試みようとしている二 重染色法は、光顕のみならず電顕的に観察することも 理論的には可能であるため、この様な興味ある点を明 らかにし得る期待はおおいにあるといって良い.病的 状態においてのみならず,例えば先程述べた網膜移行 部の様な Müller 細胞が正常でも複雑な局在をとる部 位においても,その tracer の局在性と Müller 細胞細 胞体の関係を明確に知るにはその利点は計り知れない 物であるといって良いだろう.ただこれまでの組織細 胞化学に関する成書を調べても,同一切片上で二つの 異なった組織細胞化学反応を行うについては,その様 な報告自体も数少ないし,操作においては多くの困難 があると書かれている.もちろん,われわれが行おう としているような試みはこれまで全く成されてはいな い.以下にわれわれが試みた事を失敗も交えて述べて いくが,実験毎に試行錯誤の連続であったことは正直 言って確かである.

(tracerの選択と固定条件)

それでは tracer としては何をもちいれば一番良い のであろうか. これまで barrier 研究にもちいられた tracer の種類についてはすでに第Ⅲ章で述べてある. このうち粒子自体の分子径が大きいものは, 脈絡膜毛 細血管や Bruch 膜も透過出来ないので、この試みにも ちいるには不適当である、少なくとも通常は網膜色素 上皮細胞により阻止されるレベルの tracer でないと 適当とはいえないであろう.現在もちいられる一般的 な tracer でこの条件を満たすのは、硝酸ランタンある いは各種の peroxidase ということが出来る. このう ち. 硝酸ランタン¹⁴⁷⁾は電顕観察可能な tracer¹⁴⁸⁾であ るが、その細胞毒性はかなり強い. 通常この tracer を 使用する場合には、組織は2%あるいはそれ以上のグ ルタールアルデヒドをもちいて,かなり長時間固定し た上で観察せねば、形態の保持は電顕観察に耐えられ ない、これまでの多くの報告を見てきても、例えこの 様な条件の固定を行ったとしても,最終的に形態の保 持が良いなどといえる写真は少ない.われわれがまず 反応させる K-NPPase や G6Pase 活性は酵素反応の ため、当然純形態的な強い固定を行ってしまうと、活 性が全く失活してしまう. ちなみに網膜においてこれ ら酵素反応でもちいる反応前の前固定の条件は,

0.25%グルタールアルデヒドおよび2%パラフォルム アルデヒドの混液で最高30分間である^{44)~48)}. 硝酸ラン タンをもちいるために, 2%グルタールアルデヒドで 1時間固定を行うのに比べると, 固定条件はおよそ16 分の1ということになり, このギャップは決して埋め られるものではない.

それでは, peroxidase 活性はどうかというと, 硝酸

ランタンとは異なり、これらは直接電顕下で可視的な 物質ではない. Graham と Karnovsky が149)開発した この peroxidase は酸化還元酵素そのものである. peroxidase は酵素の一種であり、反応としては peroxidase に二種の基質すなわち水素受容体である加酸化 水素と水素供与体である3-3'diaminobenzidineを働 かすことにより、茶褐色・不溶性のしかも電顕的にも 可視性である色素が産生される事を利用する。この色 素の局在を tracer として観察する方法であるから, 原 理的にいえば酵素組織細胞化学反応そのものである. したがって、強い固定は酵素である peroxidase その ものを不活化してしまう危険があるため、固定に関し ては、これまで出来るかぎり弱い条件がもちいられて きた、この点から言えば、K-NPPase・G6Paseとperoxidase 組織細胞化学ではどちらもなるべく弱い固定 をもちいるという制限があり好都合といえる. (浸漬液における各種問題)

固定の面では、どちらも弱い条件が不可欠であると いう共通した性格があり、確かに好都合であるといえ るが、一方弱い固定条件をもちいなければならないと いう事自体は、形態的観察しかも電顕レベルでの観察 であるという点からは非常に不利な条件であるといえ る.

そもそも,酵素組織細胞化学その物を考えてみると, 形態学である以上は微細な局在の観察のためには形態 の保持を出来るだけ良くしなければならない必要があ る.しかし一方では酵素活性は形態の保持を向上させ るための固定条件を上げるに従って低下したり,失活 したりするという避けられない矛盾がある.これまで の観察特に電顕観察では,出来るだけどちらの条件も 満たす,つまりお互いを歩み寄らすことの出来得るぎ りぎりの条件を検索することが必要不可欠であった.

そのように弱い固定しか施していない組織をまず切 片にして、その後高温の浸漬液中で撹拌しながら反応 させることは、確実に組織をさらにある程度損傷する ということになるだろう.この点からいえば、組織を blockのままで浸潰したほうが、形態の保持は良いも のと思われる.ただし、実際には組織細胞化学の均等 な反応は50µm以下の切片の厚さでないと期待できな いとされている^{150)~152)}.組織細胞化学を行う際には、 この点が何時もわれわれを悩ませる.しかも今回挑戦 しなければならないのは、この様な反応を繰り返し行 う事に他ならない.このことは、反応を二度行うため の時間的・物理的問題から、これまで各々の実験過程

血液眼関門についての研究 第2部・上野

75 - (1987)



において用いることが出来得た固定の条件よりもさら に弱い条件が必要とされることを意味する.一方では、 各々の反応時間も短縮しなければならないことも意味 するかもしれない.この様に異なった反応を二種類同 時に行うことは決して単純な差し引きだけの関係で成 立するものではないことをお解りいただけたと思う. 実際今回の条件設定でもこの点がわれわれを悩ませた 最大の問題の一つであった¹⁵³⁾.

もう一つの問題点としては、それぞれの反応の至適 pHの相違ということがあげられる.HRP法は1966年 Graham と Karnovsky¹⁴⁹⁾が開発したのであるが、そ の後 Simionescu によってさらに鋭敏な変法が開発さ れた¹⁵⁴⁾. この方法における変更点は3-3'diaminobenzidine と 過 酸 化 水 素 以 外 に 賦 活 剤 と し て0.1M imidasole をもちいることである. 確かにこの方法の 方が鋭敏であり,より奇麗な活性局在が得られる. そ のためこの様な二重反応においてはこちらを使用する ほうが勝っていることは先程から述べたように間違い ない. ただし,ここで問題となるのはこの変法の至適 pH が8.8とアルカリ領域にあることである. non K-NPPase の至適 pH はこれと同様の8.8であるため問 題はないが,Wachstein-Meisel による G6Pase 活性検 出の至適 pH は6.8とやや酸性にある. このため,もし G6Pase 活性をもちいようとするなら,その反応をア 76 - (1988)

ルカリ領域で行う必要がある. そこでわれわれは pH 9.0付近に活性の peak をもつ浸漬液の開発を行っ た¹⁵³⁾.

以下にその浸漬液の組成を示す.

G6Pase (Ueno ら¹⁵³⁾)

グリシン一KOH 緩衝液(pH9.	0) 250.0mM
グルコース 6 リン酸(G6P)	10.0 mM
MgCl ₂	3.8mM
レバミゾール	2.5mM
クエン酸鉛(KOH 液中)	4.0mM
	(最終 pH 8.8)

本浸漬液は網膜において著明な活性を示し, Wachstein-Meisel法と比べて遜色はない.しかも反応 液は透明で,その安定性は勝っているものといえる. ただ,生化学的定量にても,組織細胞化学的定量条件 においてもWachstein-Meisel法とは異なり,本反応 には賦活イオンとして Mg が必要である¹¹¹⁾¹¹⁶⁾¹⁵³⁾. (光顕および電顕での反応)

このような問題点を解決して反応を行った実際の G6Pase あるいは non K-NPPase と tracer との二重 染色組織像を示したい.その前に,実際の手技を(表 10)に示しておく.解りやすいように(図53)に G6Pase 活性単独,(図54)に tracer である HRP 単独の組織化 学反応の光顕像をまず示しておく.次の(図55)がこ の両者を同一切片上で二重に反応させたものである. この三者の関係から解るように,両者の単独での反応 所見を加算した反応となっている.正常では HRP は

脈絡膜を染色しているだけであるのが良く解るが、二 重染色を施行してもその反応が拡散するということは ない. また逆に G6Pase 活性にも変化はなく, artifact 所見は認められない. microperoxidase は先にのべた ように, 脈絡膜毛細血管を通過しにくいため, 脈絡膜 毛細血管内意に限局した像を示している. そのため変 件網膜における tracer としてはやや使いずらいとい う欠点がある.そのことは別にして写真が示すように われわれの試みは一応成功したといえる. 正常状態で は Müller 細胞と脈絡膜が接近することはないために 余り印象的な結果は示さないのであるが、先程述べた ように網膜―視神経移行部においては(図56)に示す ような興味ある結果が得られた. この反応から tracer と Müller 細胞の位置的な関係は一目瞭然である。 拡 大してみると、Müller 細胞と網膜色素上皮細胞からな る Kuhnt の組織を越えては tracer が網膜下へ透過す ることはないが、脈絡膜から視神経部に向かっては微 漫性に減少する tracer の侵入が認められる.

次にわれわれの目的の一つである.変性 Müller 細 胞の tracer に対する態度を観察するために, まず同一 眼において時期をずらせてレーザー凝固を加え, 各種 時期の病変を散在性に形成した。そのうち、蛍光眼底 造影をおこなって未だ色素漏出が認められる病変(図 57)とすでに漏出が停止したと考えられる病変(図58) を選択した.こうして選んだ二つの凝固時期が異なり, 当然 Müller 細胞の変化も異なる病変部において、こ れまで述べた二重染色を行った光顕像が,(図59)と(図 60)である。(図59)は未だ漏出が見られる病変であり、 (図60) では漏出が認められない. まだ Müller 細胞も 充分肥大化していないと考えられる時期では(図59) の様にトレーサーは変性した網膜色素上皮細胞を越え てかなり網膜内方へと侵入している. ところが G6Pase 活性の所見から明らかに Müller 細胞が肥 大・伸展している時期においては、もはや Müller 細胞 の領域を tracer が越える所見は認められない.

このように Müller 細胞が変性時においては何等か の barrier としての働きをしていることは明らかと なった.ただ光顕レベルではその詳細が不明なため, 次にこの切片を電顕で観察した、電顕ではやはり二重 反応のための組織損傷の影響は多少見られたことは確 かであるが、(図61)に示すように、Müller 細胞におけ る ER の特徴的な濃い反応と、それよりはやや濃度が 薄い tracer の侵入所見が細胞間に認められた. この病 巣の時期は、凝固後まだ蛍光色素の漏出が多少認めら れる段階である. tracer は網膜色素上皮細胞の破壊部 から網膜内方へと侵入している. と同時に Müller 細 胞の ER はある程度増加し、細胞そのものも肥大化し ていることがわかる。また Bruch 膜に接した Müller 細胞間に tracer が侵入している像も得られている (図 62). このように両者が同一視野に共に存在する場合に は、どちらも黒い反応産物であるがゆえに、同一の濃 さを示す場合には鑑別がなかなか困難な場合もある が、tracerの濃度や反応時間の調整を行えば、ある程 度両者の鑑別は可能であった. しかも一方の反応は細 胞内 ER に局在する物であるし、他方は細胞間隙に局 在するため,形態の保持が一定以上得られればその点 からも鑑別は困難ではないように思われる.

(二重染色法の超高圧電顕への応用)

これらの二重染色の反応産物の局在をふたたび超高 圧電顕で観察することが可能であれば、先に述べたか なり立体的な関係が一層明白になることは間違いな





79-(1991)

い. 超薄切片下の反応が一定以上の濃度がありさえす れば,観察に関しては余り問題は無いように思われる.

その前に tracer 組織化学でも, 超高圧電顕観察をお こなえば、同様の利点が充分期待できる物と考えた. (図63)に網膜色素上皮細胞における HRP 組織細胞化 学を厚切切片で観察した像を示す、この様に反応産物 が塞き止められるために、ある部位において一定の濃 度を保っている場合には立体観察は可能である。とこ ろが、もし tracer が barrier を通過して、しかもその 侵入の濃度が段階的に減少していく様な場合,実際に はこの様な観察の方が重要であるのであるが、一定量 以上に反応濃度が低下してしまうと, 超高圧電顕で観 察する厚切切片においては、反応を全く観察すること が出来なくなってしまう. しかもその様に tracer が barrier を通過していく場合は、組織自体の変性や損傷 も強いということを意味するため、形態の保持をでき るだけ良くしなければならないという問題も生じてく る. そのためには固定の条件を強めねばならないが, それは同時に反応の低下を意味する事になる、それな ら切片の厚さを減少させていけば、その問題もある程 度は解決でき得るのであるが、そうなれば立体的な観 察という点ではかなりマイナス要素となってしまう。 (図64)に Kuhnt の組織周辺における,二重染色の超高 圧電顕を示すが, 組織細胞化学的結果としてもまだま だ改善の余地があるものといえる. しかしこの様な技 術的な点に関していえば、今後の実験の繰り返しで、 適切な条件を見出だすことは不可能ではないと確信し ている。

7. Müller 細胞組織細胞化学のまとめ

以上, Müller 細胞組織細胞化学に関してのこれまで の自分自身の研究の歴史といったものを述べてきた. あるポイントに関してはくどいほど試行錯誤と実験を 繰り返しているかの印象を与えたことは間違いないよ うに自戒している.ただ何故そうであったのかという 間に関しては,以下のような理由があげられると思う. まず Müller 細胞自体が今日になってもその構造的に も機能的にも充分解明されてはいないということであ る.確かに,文献や教科書を読めばある程度の知識が 得られることは確かであるが,それからさらに遡って 調べていくと,余りにも実験的な根拠が薄弱であった り,単なる推論の域にしか止どまっていないような事 柄が平気で記載されていることも時に見受けられる. そうなってくると,われわれのように新しい実験方法 を開発しながら研究を行っていくためには,常に後を

振り返らないといろいろな点で実験そのものの基盤が 危らくなる危険性を孕んでいたように思う、最初に述 べたように、われわれが最初に検出を試みたのは、 Na-K-ATPase つまりK-NPPase であって,決して non K-NPPase ではなかった.それが全く阻害剤の影 響を受けない活性が同時に検出されたことから、これ までに書いてきたような話が始まったといってよいの である、この non K-NPPase 活性は K-NPPase 活性 組織細胞化学においてはあくまで artifact 的存在以外 の何者でもなかった. つまり決して望ましい活性では なかったのである. この様な活性が Müller 細胞とい う限られた細胞に限局する事の正当性だけでも,相当 数の実験を繰り返さねば確証を持つことは出来なかっ た. G6Pase 活性が non K-NPPase と同様の局在を示 すことも, non K-NPPase 活性を検討していくコント ロール実験の過程で見出だすことが出来たものであ る. さらに当初はこれら二つの活性が同一のものでは ないかという危惧が大いにあった. その点は肝臓との 組織細胞化学あるいは生化学的対比から, まったく 別々の活性であるということが明らかになったが、現 在でもこの non K-NPPase のもつ機能的な意味は残 念ながら全く不明である.次に網膜に血管が存在する かしないかという点は Müller 細胞にとって非常に重 要な意味を持つことは間違いない、実際網膜血管をも たない動物種に関していえば, Müller 細胞のグリコー ゲン顆粒の蓄積が非常に顕著であるといわれている. その理由に関しては、これまで血管がない様な網膜は 脈絡膜一網膜色素上皮細胞を通してしか栄養を受ける 事が出来ず、そのため Müller 細胞は網膜の中の肝臓 の様な働きをしなければならないのではないか、また そのため緊急に放出できるようにグリコーゲンを蓄積 しているのではないかといわれている。この点に関し てはかなり理屈にあっているように思えるが、これま で余り実験的に追及されたことがないことも事実であ る. 確かに、われわれが網膜における G6Pase 活性を追 及していく過程で、各種の動物を用いて検討したかぎ りでは、網膜に血管が無い動物において本活性が Müller 細胞に限局したことは事実であり、その仮定をかな り裏ずけるかの感も持った時期もあったのではある が,一方,ある種においては網膜に血管があるにもか かわらず Müller 細胞に強い G6Pase 活性が検出さ れ、しかも神経細胞にもかなり活性が認められた. そ うなってくると、機能的な意味においてもう一度この 酵素活性が持つ意味も考え直さねばならないものと

80-(1992)

思っている.これまでの実験の過程においては,一つ 一つのステップがこの調子であったために,幾度も実 験を繰り返す必要があったことはお解りいただけたの ではないかと思う.

その様な経過であったため、この研究を barrier 研 究のために用いることを考えた時は大いに戸惑いも あったのであるが、われわれがそれを具体的にどの様 に利用しようとしたかは既に述べた。 例えば二重染色 に関していえば、理論的には大いに可能であると確信 して実験に入ったにもかかわらず,その結果は惨澹た るものであった. 恥ずかしいことであるが、何回もの 失敗の後でやっと文献を読み直し,実に単純な点の間 違いに気付くというようなことも度々経験した. それ だけではなく、二重染色法の超高圧電顕への応用のよ うに、現在に至っても至適条件を見つけるために悪戦 苦闘を繰り返していることも少なくない、その様な意 味で、この Müller 細胞の barrier 研究はやっと端緒に ついたというぐらいの意味しかないようにも思うが, 結局はこのように苦労はしても, 何等かの新しい方法 の開発から取り組まねば、その詳細を明らかにする事 は不可能ではないだろうか.

V 単離および培養下における網膜 色素上皮細胞の形態的・ 機能的細胞膜極性

網膜脈絡膜が様々な疾患や眼操作,例えば光凝固, ジアテルミー凝固,冷凍凝固,強度の光等によって損 傷を受けると,網膜色素上皮細胞がしばしば欠損部を 日眼会誌 92巻 12号

補填するために増殖したり, 遊走して他の部位におい て増殖を来すことは組織学的によく観察されることで ある155)~177). 先に述べた実験的脈絡膜循環障害におい ては、 蛍光眼底造影所見として、 障害初期には病変部 全体で蛍光色素の漏出が認められ,この時期では形態 学的に網膜色素上皮細胞には漏出部に一致して空胞変 性や細胞脱落などいろいろな壊死性変化(図65)が広 範に認められる171)~173)177). 蛍光色素漏出が止った時点 で観察してみると、その様な細胞の壊死成変化は見ら れなくなる、この時期の網膜色素上皮細胞は壊死性変 化を起こして脱落した部分を細胞増殖によってすでに 充填しており173)174)177),細胞の形こそ正常とはやや異 なるが、連続した細胞間には tight junction も存在し、 既に蛍光眼底造影色素に対しては barrier 作用を有す ることは明らかである(図66)174).この様に蛍光眼底造 影と形態学的観察の結果がよく一致しているため、こ れまでわれわれは barrier としての働きという点では 納得してしまい. それ以上問題を追及する必要性につ いては考えなかったように思われてならない.

正常網膜色素上皮細胞は脈絡膜と感覚網膜とを境 し、それぞれの組織に面する apical と basolateral と では形態的に異なる様式の細胞膜を有している.第II 章において、これらの細胞膜は機能的にも全く異なり、 この膜極性が、網膜と脈絡膜における生理的環境や機 能調査を司どるための機能的 barrier として重要な意 味を持つ事を明らかにした。それでは、この様に一旦 脱落してから後新たに増殖したような情況では、網膜 色素上皮細胞の膜極性やそれに伴う機能的な側面で全



昭和63年12月10日

く変化を示す事はないのだろうか.その様な網膜色素 上皮細胞は変性した周囲組織の生理学的 balance を 保つために、その機能的な極性をふたたび回復し、も ともと有する役割を果たしているのだろうか.あるい は、異なる環境に適応するために、これまでとは全く 異なる機能的極性を持つ細胞として存続しているので あろうか.

もともと発生の過程において,網膜色素上皮細胞は 他の神経細胞などに比べると,比較的早く細胞分裂や 増殖を終了してしまう細胞である^{178)~184)}.その様に決 して正常状態では分裂増殖を行わないことが前提と なっている細胞が,何等かの障害のために分裂増殖を 行わなければならないような状況下では,果たしても ともと持っている性格をそのまま受け継いだ形で再生 でき得るのであろうか.そういった意味で機能的 barrier としての性格が変化し得るかどうかという点は, 非常に興味ある問題であるといえる.

1. 実験条件の設定

この様な問題の解明の手掛かりをつかむためには, 理想的には実験的病変を作成して,経時的に変性部の 網膜色素上皮細胞における機能的な極性を組織細胞化 学的に観察すれば良いのであるが,この様な方法であ ると,観察する部位の網膜色素上皮細胞が単に変性し ているだけなのか,あるいは一度脱落して増殖してき たのかを鑑別する有効な手段がないという問題があ る.もちろん将来的には工夫を重ねてその様な方法論 に基いた観察を行わなければならないのであるが,実 験条件をなるべく一定にし,しかも組織細胞化学観察 のために多くの材料を得なければならないという制約 のために,現時点では網膜色素上皮細胞を単層分離, 単離さらに培養条件へと環境変化させるという条件で の細胞膜極性の経時的な変化について観察を行ってみ た.

実験材料としては、chick embryo 7日卵の網膜色素 上皮細胞を用いた.これは最終的に培養まで行うとい う条件を考慮して、最も培養を行いやすい^{185)~195)}とい う点から選択した.方法を(表11)に示すが、網膜色 素上皮細胞の単離は、embryoから眼球摘出後、Eagle's medium 中で神経網膜を剝離し、網膜色素上皮細胞 を露出した.次に0.02%EDTA 中に4°C, 20分浸潰し、 それから機械的に網膜色素上皮細胞を Bruch 膜から 単層剝離した.trypsin は細胞膜の構造に影響を及ぼす と考えられるため、4°C、3分間のビベッティングの 繰り返しのみで出来るかぎり細胞を単離することを試

表 11

Cell Dissociation

eye enuculated and retina removed 0.02% (0.67mM) EDTA 8% sucrose in PBS ↓ (pH 7.4) 4℃, 20min RPE removed Pipetting 4℃, 3min Incubation 37℃ 0, 5, 10, 15, 30, and 60min ↓ Centrifugation 100G 4℃, 5min

みた. その後60分までは medium 中でこの状態を保 ち,各時期において100G、4℃、5分間遠沈を行い組 織細胞化学操作を行うために細胞を集めた.あるいは、 (表12)のように37℃、95%空気および5%炭酸ガス培 養下に confluent になるまで15日以上に渡って細胞を 培養し、各時期にシャーレごとあるいはシャーレから 剝離して組織細胞化学検出を行った.さらに、コント ロール実験として chick embryo 7日卵、生後1日目 のヒョコおよび60日目の成鳥からも同様に眼球摘出を 行い、同様の前固定を行い、Vibratome, Microslicer あるいは Cryotome で20~40 μ m 浸漬用組織切片を作 成したうえで同様の操作を行った.

組織細胞化学的反応は、単離した網膜色素上皮細胞 あるいは網膜切片を1%グルタールアルデヒド(0.1M カコジル酸緩衝液)にて、直ちに10分間4℃で前固定 を行い、洗浄の後各種のフェリチン標識レクチン (Con-A, DBA, WGA, PNA, UEA-1, SBA, MPA, BPA, GS-1, GS-2) あるいはカチオン化フェリチン, アニオン化フェリチン、鉄コロイドさらに Mg-ATPase, K-NPPase, non specific alkaline phosphatase, 5'nucleotidase, Ca-ATPase 等の細胞膜酵素 活性について反応を行い、脱水・包埋ののち電顕的に 観察した.

ここに挙げたレクチンとは、特定の糖構造と特異的

82-(1994)

表 12

Cell Culture

eye enuculated and retina removed 0.02% EDTA in PBS r.t., 60min RPE removed Pipetting r.t., 3min Cetrifugation 100G r.t., 5min Eagle's MEM

20% fetal calf serum 37℃, 95% air-5% CO₂

に結合する分子量およそ5~10万の多価性リガンドの 糖結合蛋白質である、レクチンの多くは植物から抽出 されているが、その中でもマメ科植物が大部分を占め ている。細胞には多様な複合糖質が存在していること が知られており、これら複合糖質の糖鎖構造が、細胞 形成や細胞レベルでの認識過程で重要な働きを持つと される196)~199). こうした糖鎖の性状やその変化をレク チン結合性の有無や結合パターンの変化として組織細 胞化学的に捕らえることが可能である200)~217). レクチ ンに関する生化学的研究の発展と共に、組織細胞化学 的に利用することが出来る種類も増加した. レクチン そのものは顕微鏡下で直接観察出来る物質ではないた めに、レクチンに何等かの可視物質を結合させて局在 を観察する必要がある.これら標識としては、蛍光色 素, HRP, ferritin, 金コロイド, アイソトープ等が使 用され,あらかじめレクチンー標識の conjugate を作 製して反応させたり(直接標識法)まずレクチンを組 織と反応させてから改めて標識する間接標識法などが 組織細胞化学的に開発されてきた(表13). これら一連 の組織細胞化学的方法の詳細については成書を参照さ れるとよい200)303)。今回の実験においては細胞単体で の観察など電顕下での観察が必須であるため、HRP およびフェリチンをその標識物質として用いた.

これらレクチンをマーカーとしてもちいる事を試み た理由は、ある種の上皮細胞においてレクチンは細胞



膜表面においても分布の極性がみられるた め^{206)~217)},細胞膜形成の機序や²⁰⁵⁾²⁰⁶⁾,細胞膜の分化過 程²⁰⁷⁾あるいは細胞の極性^{207)~209)}を観察するのに用い られているためである.その他,電荷フェリチンに関 しても,同様に細胞膜における分布の極性が報告され ているし²¹²⁾²¹³⁾,ここにもちいた各種酵素なども特定 の細胞ではその分布に部位における相違が見られるこ とがあるためである.

2. 網膜色素上皮細胞膜極性マーカーとしての適性

まずわれわれは組織中における網膜色素上皮細胞と 単離直後の網膜色素上皮細胞におけるこれらマーカー の局在についての観察を行った.少なくともこれら両 者において, apical と basolateral の細胞膜を組織細 胞化学的に鑑別可能な程度の反応を示すことをマー カーの基準と考えたからである.

まずわれわれが使用したレクチンの種類を(表14) にあげる.結論からいうと,残念ながらこれらレクチ ンの中で網膜色素上皮細胞の apical と basolateral 細 胞膜を組織細胞化学的に鑑別可能な反応を示した種類 は見出だすことが出来なかった.その一例を(図67, 68)に示す.ある種のレクチン(ここでは Con A-HRP と Con A-ferritin を使用している)は細胞膜に非常に 安定した反応を示すが,それらの反応は明らかに apical と basolateral の細胞膜を均一に標識し,網膜 色素上皮細胞膜表面における特定の糖鎖の存在は明ら かになったものの,われわれが目的としている細胞膜 極性のマーカーとして用いる事は不可能であった.以 下電荷フェリチン,各種酵素などを次々に試みたが, 結果はレクチンの場合とほぼ同様であった.特にある

昭和63年12月10日

	表 1	.4
レクチン(略 称)	糖結合特異性
Concanavalin A	(Con A)	α-D-mannopyranoside α-D-glucopyranoside
Dolichos biflorus	(DBA)	Metyl 1, 2-acetamide -2-deoxy-D-galactose
Triticum vulgaris (W	heat Germ) (WGA)	NAc(β 1-4) -D-Glucosaminide N, N ['] -diacetyl-chitobiose
Arachis hypogaea (F	Peanut)(PNA)	Metyl α -D-galactopyranoside
Ulex europaeus	(UEA-1)	α -L-fucose
Glycine max (Soy Bean) (SBA)	a-D-Gal NAc. $\beta-$ D-Gal NAc. a-D-galactose
Maclura pomifera	(MPA)	α -D-Galactopyranoside
Bauhinia purpurea	(BPA)	N-acetyl-D-galactosamine D-galactose
Griffonia Simplicifo	lia (GS-[)	α -D-galactopyranoside
Griffonia Simplicifo	olia (GS-∥)	α -and β -D-liked 2-acetamido-2-deoxy -D-ducopyranoside

種の酵素は切片上の組織細胞化学反応においては明ら かに apical と basolateral 細胞膜において局在性の相 違を示していても、単離等の操作によって直後にその 反応が非常に減弱したり、消失したりすることも多く 非常に不安定であるという問題も明らかになった.

3. Mg-ATPase 活性の局在

(単離網膜色素上皮細胞における活性)

ところがこれらの酵素活性のうちで,Mg-ATPase 活性のみが興味ある局在を示すことを発見した。以下 に使用した浸漬液の組成を上げるが,これらのどの浸 漬液を用いた場合にも,反応は全く同一の局在を示し た.

硝酸鉛法(Wachstein と Meisel²¹⁸⁾)

0.2M トリス・	マレイン酸緩衝液	80 mM
ATP(Na 塩)	(125mg/100ml)	$0.83 \mathrm{mM}$
0.1M MgSO4		10 mM
2%硝酸鉛		3.6mM
	(最終 pH 7.2)
TANK M		210)

クエン酸鉛法(Ogawa と Mayahara²¹⁹⁾) 0.2Mトリス塩酸緩衝液 28mM

ショ糖	8 %
ATP(Na 塩)	3.0mM
0.015M MgSO4	3.8mM
0.5%クエン酸鉛(35mM NaOI	Hに溶解)
	2.0 mM
(最終	pH 9.0~9.4)
クエン酸鉛法(Ando ら ²²⁰⁾)	
1.0M グリシン KOH 緩衝液(p	H9.0) 250mM
レバミゾル	2.0mM
ATP(Na 塩)	3.0mM
100mM (または10, 1, 0.1mM	M) MgSO4
10.0mM (1.0, 0	.1, 0.01mM)
10mM クエン酸鉛(50mMKOF	Iに溶解)
	4 0mM

(最終 pH 9.0~9.4)

chick embryo 7日卵眼球の網膜色素上皮細胞にお ける Mg-ATPase in situ 活性は, apical 細胞膜に著明 な活性, lateral に弱い活性が認められたが, basal の 細胞膜には全く反応が存在しなかった.したがって, これら活性からある程度 apical, lateral と basal 細部 膜の区分を付けても差し支えない物と考えられる. こ の活性局在は機械的に網膜色素上皮細胞を Bruch 膜 から剝離した直後にも全く変化が見られない安定した ものであった(図69). ところが、単離後5分を経過す ると apical 側の villi はまだ形をとどめしかも活性も 組織における場合と同様に著明であるが, basal 側細 胞膜では基底部陥凹いわゆる basal infolding が消失 し、次第に平滑・円形へと変化する. lateral 細胞膜も 次第に陥凹を減弱し、興味あることに最初存在した活 性が全く消失する(図70).単離10分を経過すると、 apical 細胞膜における細胞膜の凹凸も消失して、細胞 はさらに円形に近くなって, 形態学的な膜極性の区分 は全く不明となる. この時期には興味あることに Mg-ATPase 活性が極僅かな部分を除いて全周の細胞膜 で見られる様になる(図71).同時に原形質内には空胞 が多数見られるが、この空胞には活性が著明な物と全 く認められないものの二種類が存在する(図72,73). 15分経過すると、先程まで著明であった表面の膜活性 は消失するが(図74)、原形質に幾つか存在する空胞に は活性が認められるものが依然として存在する(図 75)、この後60分まで観察を続けたが、これ以後の各時 期においては細胞膜にもあるいは空胞にも活性が検出 されることはなかった(図76).

(培養網膜色素上皮細胞における活性)







一方,培養条件下3日までは,網膜色素上皮細胞は 円形から非常に偏平な形を示すようになり,メラニン 色素も僅か存在するのみである.細胞膜には所々大き な陥入が認められるようになるが,概して細胞そのも のが未熟であり,形態的には細胞極性が明瞭であると はいえない段階にある.この時期,Mg-ATPase活性は 細胞膜に全く認められないが,特筆すべきことにER には反応産物が認められた(図77).培養10目になると, apical および lateral の細胞膜は再び著明な陥入を示 す様になってくるが,basal には依然としてその様な 陥入は見られない.形態学的には同様に陥入した膜で あるが,組織細胞化学的には apical には反応が全く認 められず,著明な活性を示す lateral 細胞膜とは対照 的である(図78).15日以後細胞は培養下においても次 第に立方上皮細胞の形態を呈する.apical には著明な villi が存在し, basal には infolding が区別できる.lateral 細胞膜には陥入は認められない.これら細胞で反 応を行うと, 著明な反応産物は apical 細胞膜にのみ限 局する (図79).

(発生過程の網膜色素上皮細胞における活性)

われわれはこれら一連の実験を chick embryo 7日 卵網膜色素上皮細胞という特殊な材料を用いて行っ た.この様な実験を行うに当たってもう一つ確認して おかねばならないのは、出発点が発生段階にある細胞 であるため、正常の発生過程においても Mg-ATPase 活性の局在性が変化するのかどうかという点であろ う.そこで生後1日目のヒョコにおける活性局在を組 織細胞化学的に観察した。発達の過程において形態学

昭和63年12月10日

的に網膜色素上皮細胞は lateral 細胞膜では interdigitation を消失して平滑になる傾向にある²²¹⁾²²⁴⁾. 視 細胞外節は余り発達しておらず, apical villi の長さは 7日卵網膜色素上皮細胞とその変化は見られない. Mg-ATPase 活性はこの時期には活性が全体にやや減 弱するものの,7日卵網膜色素上皮細胞の場合とほぼ 同様に apical に強く lateral には弱い状態を示した. basal 細胞膜には同様に活性は検出されなかった(図 80). 生後60日を経過した成鳥における網膜色素上皮細 胞はヒョコ網膜色素上皮細胞に比べると,形態学的に は apical villi がさらに視細胞外節の大部分を包み込 むほどに延長している位しか変化がないのに対し(図 81), Mg-ATPase 活性は全ての細胞膜で検出されなく なる(図82).

(Mg-ATPase 活性局在の経時的変化について)

われわれの一連の実験で明らかになったのは、単離 されたりあるいは培養という特殊な環境下におかれた 網膜色素上皮細胞は、非常に様々な形態学的極性の変 化を示すという点と共に、Mg-ATPase 活性というあ る程度機能と関連した酵素活性をその極性のマーカー として使用した場合に、その活性の変化が形態上より もさらに目まぐるしく変化したという点であるといえ よう、特に Mg-ATPase 活性局在の変化は、これまで 形態学的観察からのみ単に推定されていたよりも遙か に drastic な変化であったといえる。それらの変化を 解り易くするために、おのおのの場合の網膜色素上皮 細胞の形態学的極性の時間的変化と Mg-ATPase 活 性局在とを(表15)のシェーマに示した。

単離直後から10分程度までは apical villi がかろう じて存在し、しかもそこに Mg-ATPase が局在すると いう点では基本的には余り変化がないものといえるだ ろう. ところが10分を経過すると酵素局在の変化はか なり目まぐるしい. この時点ではこれまで apical だけ に局在した活性が円形になった細胞膜の全周に認めら れる. さらに活性の著明なものとまったく活性のない 二つの異なった種類の空胞が原形質内に混在し、さら にその後細胞膜の反応が全く消失するような情況にお いても,依然として反応が存在する空胞が存在するこ とは、細胞学的な見地からも非常に興味深い現象であ るといえる。細胞を単離した場合、もともと存在した 細胞膜が空胞によって原形質内に陥入していく現象は Fujimoto ら^{225)~228)}によって膀胱上皮細胞で観察され ている. 彼等の実験においては、膀胱上皮細胞におい ては単離15分後に形態的膜極性が失われ、細胞膜表面

は元の apical 細胞膜の特性を示すという. しかも apical 細胞膜のみを選択的に標識する酵素やマー カーは最終的には細胞全周にみられるようになり, basolateral を標識したマーカーは原形質内に陥入し ていった空胞膜内面にしか見られないという興味ある 結果を明らかにしている.

網膜色素上皮細胞においても,最初は apical 細胞膜 にみられた活性がやがて全周の細胞膜で見られ、しか もこの時期に原形質内に活性を示すものと示さないも のとの異なった空胞が多数見られたことは非常に興味 深い.推測の域を出ないが、この事実は basolateral の 細胞膜のほうがかなり選択的に原形質内へと陥入する 可能性を示したものであるのかもしれない.

これまでの実験病理学的観察において、網膜変性に おいては多くの色素を含んだいわゆる macrophage と称される貪食能の著明な遊走細胞がみられ、その origin が論議されてきた。網膜色素上皮細胞由来であ るという意見もあれば^{229)~231)}、余りに形態極性を持た ない点から、一方では別の origin を考える報告²³²⁾も みられるが、今回単離網膜色素上皮細胞が形態を変え るだけでなく、膜における酵素活性まで短時間の内に 変化さすという結果は、この点に関して非常に示唆に 富んでいるようにも思える。

(培養網膜色素上皮細胞における Mg-ATPase 活性の 局在)

われわれの実験から明らかになった第二の点として





は、培養下においても活性局在が変化するという問題 であるといえる(表15). それだけではなく, 培養下の 変化は明らかにシェーマに示す(表16)発生の変化と も異なるものであった221)~224). in vitro における confluent な網膜色素上皮細胞は、これまで in vivo に おける成熟網膜色素上皮細胞の形態学的特性とはやや 異なる点はあるけれども¹⁹¹⁾¹⁹²⁾, 例えば apical villi・ basal infolding, junctional complex 等の存在から, ほぼ極性やその機能が等しいものであるかのように考 えられてきた。簡単にしかも純粋な網膜色素上皮細胞 が容易に入手できる方法として, 培養網膜色素上皮細 胞を材料として使用した数多くの実験が報告されてい る現状である.しかし、今回の結果を見る限り、形態 学的に同じような構造をしているからといって、その 機能的な意味合いも常に同様ではないことが明らかに なった、例えば、培養網膜色素上皮細胞を用いて多く の貪食実験が行われ,いろいろな点で興味ある事実が 明らかにされてきている. ところが、細胞膜表面が in vivo と明らかに相違する構造や性格を持っていると するならば、当然貪食というような最初の過程におい て細胞膜の認識が必要とされる現象では、in vitroと

in vivo における反応や動態も異なっているかもしれ

ないという危惧が生じてくる.その原因が脈絡膜毛細 血管や感覚網膜に挾まれた環境下において存在するべ き網膜色素上皮細胞が,培養のような特殊な条件下に 移されたことだけによるものかどうかは,今回の実験 系のみでは勿論不明であり,今後の課題となる.実際 に,培養液の組成によって,細胞の状態が変化すると いう結果も報告されている²³³⁾.この点が明らかにされ ない限り,培養細胞をもちいて生理的意味合いを持つ 実験を行うことには常に危険が伴うことをわれわれは 心しなければならないであろう.

4. 単離・培養網膜色素上皮細胞の形態・機能的極性 の変化 まとめ

以上,単離され,培養された網膜色素上皮細胞は様々 に形態的極性を変化させるが,それ以上に機能的極性 の変化が顕著であることを述べてきた.もちろん,わ れわれが用い得た膜極性のマーカー自体には未だ多く の問題が残されている.しかし,より正確に極性を示 しうるマーカーを見出だす努力を続けていけば,近い 将来には網膜色素上皮細胞における細胞膜極性の実態 を明らかにできるかもしれない.その様な積極的な意 味合いからは程遠いとしても,一旦変性し分裂増殖し たような網膜色素上皮細胞は形態的には相似していた としても,機能的にはもともとの細胞とは異なる膜の 性格を持つのではないかという可能性はわれわれにい ろいろな示唆を与えてくれたように思う.

これまでの結果を網膜脈絡膜萎縮における網膜色素 上皮細胞の変化に投影して考えてみると非常に興味深 い. 実際に網膜脈絡膜変性や萎縮状態において、網膜 色素上皮細胞の変性脱落部を周囲の網膜色素上皮細胞 が分裂して埋めさらに形態的 barrier 機能が復活して 蛍光眼底造影色素の漏出を止められたとしても、もは や機能的 barrier として完全には働き得ずに,次第に 周囲組織に影響を及ぼす可能性は否定できない. 勿論 その変化の程度にもよるであろうが、網膜色素上皮細 胞の変化がある程度の範囲に及べば、それに栄養を依 存している視細胞等にもかならず変化が及ぶはずであ る. 例えば、ある疾患で網膜剝離が吸収し一見正常に 回復したかのように見えても、その後網膜脈絡膜が次 第に変性萎縮していくことを見ることも決して希では ない. また, 網膜色素上皮細胞は眼底検査でも蛍光眼 底造影でも明らかな変化を示しているにもかかわら ず, 視力が良好に保たれているというような黄斑部疾 患の症例も確かに存在する. ところが, この中で網膜 色素上皮細胞の状態には余り変化がみられないのに,

時間の経過と共に視力が徐々に低下して行くというよ うな症例に遭遇することも決して希ではないように思 う. 少なくともある一定の期間は視機能に変化がない わけであるから, 例え網膜色素上皮細胞が変性したと しても、それがあるレベルまでであり、周囲組織への 影響は少なかったものと推測される。それが徐々に視 機能の変化を来し始めるという背景には,網膜色素上 皮細胞は既に本来とは異なる機能的な側面を示してい る事があるのかもしれない、実験的な網膜変性におい ても,網膜色素上皮細胞の変性の程度には余り変化が みられないのに, 視細胞の変化は進行しているという 場合もみられた. つまりこれらは、網膜色素上皮細胞 のもつ本来の機能的な役割を考えると、代謝・貯蔵・ 蓄積等といった機能以外に,機能的 barrier という面 でも影響を受けており、それが結果として周囲組織に 徐々に影響を与えるということに成ったかもしれない 事を示しているのかもしれない、この様な場合には網 膜色素上皮細胞のみの変化が視力低下の要因という訳 ではないにしても今の所この可能性を全く否定出来得 る根拠も何もない。例えば、ある種の黄斑部疾患にお いてその原因が網膜色素上皮細胞の変化だけではない にしても,その膜極性の変化や機能極性の変化が原因 の一つとして無視出来得るものであると言えるだろう か. 今後, この様な実験をさらに積み重ねていけば. 網膜脈絡膜変性・萎縮の原因の端緒が明らかになるの ではないかとも期待する.

VI 終わりに

以上,主に4章にわけて私なりに研究してきた barrier,勿論その中でも BRB についてのみであるが,に 対する考え方,その研究の進め方について述べてきた.

第一番目には、網膜色素上皮細胞および網膜毛細血 管内細胞における輸送関連酵素や細胞内調節因子に関 連する酵素活性には apical と basolateral, luminal と antiluminal との細胞膜ではその局在性に相違があ り、これらが物質の選択的透過や輸送量の調節に関係 しているのではないかということを述べた。またこれ ら眼組織における barrier 細胞と対応する脳室上衣細 胞および脳毛細血管内皮細胞とを比較してみると、こ れまでは発生学的に同一 origin であり、その barrier としての機能もまた同様ではないかと推測されてきた これら細胞に関しては、いろいろな酵素活性の点では 局在や出現の相違点が認められた。これらから、特定 の物質の輸送に関しては、これらをある程度別けて考 えていかねばならない方向性が示唆されたといえよう.

第二には、網膜色素上皮細胞および網膜毛細血管内 皮細胞における細胞膜荷電 barrier の存在について述 べた.特に脈絡膜毛細血管においてはこれまで分子量 の小さい物質はその fenestration を容易に通過する とされてきた.ところが毛細血管内腔はかなり陰性に 荷電されており、分子量が小さくとも、陰性荷電を有 する物質はかなり通過しにくいことが明らかとなっ た.網膜毛細血管も luminal と antiluminal の細胞膜 は強い陰性荷電を示すのに対して、antiluminal 細胞 膜は陰性荷電性が低くさらに陽性荷電の糖鎖末端もか なり認められる.この様な荷電性は、今後 tracer 研究 や取り込み現象を追及するにあたっては、是非考慮を すべき重要な問題である.

第三には、新しい Müller 細胞研究のための組織細胞化学的方法を示した.これら non K-NPPase や G6Pase 活性は Müller 細胞 ER に特異的に局在し、変 性網膜においても Müller 細胞の変化を十分捕らえる ことができるマーカーとなった.さらにその反応性は 厚切切片下の超高圧電顕でも十分観察可能であり、立 体的電子顕微鏡観察へも応用し得る.この方法を応用 して、網膜一視神経あるいは網膜一毛様体移行部にお ける Müller 細胞の barrier としての役割を考えるこ とも可能となった.またこの酵素活性と tracer 活性と を同一切片上で観察する二重染色法の開発過程につい て述べ、これらが光学顕微鏡だけでなく電子顕微鏡下 でも Müller 細胞の barrier としての役割を追及し得 る手段となることについて論述した.

第四には、変性・再生した網膜色素上皮細胞膜の形 態的・機能的極性について考えた.apical と basolateral 細胞膜とを標識するマーカーの試みについて述べ、 その中で Mg-ATPase をマーカーとして、単層分離、 単離、培養下へとその環境を変化させた場合、網膜色 素上皮細胞は形態的のみならず機能的細胞膜極性をも 目まぐるしく変化さすことが明らかとなった.これら は今後増殖した網膜色素上皮細胞の極性を考えるうえ では、かなり興味ある現象であったと考える.

以上がこれまでおこなってきた研究の要約である. 緒言の中で,これまで形態学的barrier研究は物質を 塞き止める方向性で研究が進められ,生理学的には選 択的透過の方向性研究が進んできたと述べた.私が試 みてきた研究は,形態学的手段はもちいたけれども, 主として後者の方向性を強く持っていると思う.特に 輸送酵素活性や細胞膜素面荷電 barrier は物質を通さ ない存在ではなく,通しにくい存在あるいは一定量を 維持したり、場合によって量を調整する方向に働くの ではないかと考える.したがって,上皮細胞や血管内 皮細胞において通さないという働きの代表として考え られてきた tight junction にしても, それは細胞膜の 極性を連続して維持し、単に欠損部がないようにする ために存在しているものとも考えている.極論すれば, もし単純な barrier としての機能のみが必要であるな ら, 脈絡膜毛細血管の様な fenestration などはまった く無用の物であり、網膜毛細血管と同様な構造をもつ 脈絡膜毛細血管が存在していても全くおかしくないわ けである。それがそうでないということは、生体とい うものを考えた場合,必ず何等かの意味があることを 示すのではないだろうか.このあとがきを書きながら, 何故かそのような気がしてならない.

しかし一方では、余りにも方法の開発に時間を要し たために、その様なbarrier 機能の本質までに迫るこ とができなかったことを深くお詫びしたい.この様な 実験には追試が何度も必要とされ、講演が終わって長 い期間を経た今日までも追試を繰り返して来たが、そ れでもある部分で未だ自分なりの確証を得ることが出 来ないでいる.講演の中では、ここに記した以外の新 しい approach、例えば tracer の蛍光電子顕微鏡への 応用²³⁴⁾あるいは凍結未固定試料を凍結状態のまま電 子顕微鏡観察する cryo transfer system での barrier 研究²³⁵⁾などについても触れたが、まだ現在においても 各種追加実験を行っている情況であり、自分なりの確 証を得られてからまたの機会に報告させていただきた い.

ただ研究を施行して行く過程で、本質まで明らかに は出来ずとも、これまで当たり前のように述べられ、 われわれも当たり前のように受け入れてきたことの中 には、必ずしも正しくないことがあることを沢山経験 することが可能であった。例えば、網膜色素上皮細胞 と脳室上衣細胞、網膜毛細血管内皮細胞と脳毛細血管 内皮細胞とは barrier の総説においては同様のものと してよく例に出されている。また再生した網膜色素上 皮細胞は barrier としても再生するかのように述べて いる報告も、恥ずかしい事ではあるが、私自身が以前 に書いた報告も含めてかなり多いことも事実である。 「必ずしもそうでないこともある」事を示すことは余り 積極的な意味での研究成果ではないかもしれないが、 少なくとも今後何をどの方向で明らかにしていけばよ いかという示唆は与えてくれたような気がする.この ような結果は正直なところ日眼宿題報告の持つ意味合 いから大きく外れるかも知れないという危惧を感じる けれども、宿題報告とはその限られた期間のものだけ ではなく、私にとってはこれからも与えられ続けてい く宿題とその重みを解釈し、今後も BRB の研究を続 ける予定である.

この研究の報告の機会をお与えいただきました日本眼科 学会会員の皆様に擱筆ながら謝意を表します.これまでの 私の研究は多くの方のご指導の賜物であり,barrierという 概念および網膜色素上皮細胞の機能をお教えいただいた塚 原勇関西医科大学学長,電子顕微鏡組織細胞化学の基礎か ら御教授いただいた小川和朗京大解剖学教室教授,脳室系 細胞についてご指導いただいた A, Oksche 西独 Giessen 大解剖学教室教授,生理学の基礎から良き指導者として御 教授いただいた本田孔士京大眼科学教室教授,電子顕微鏡 の基礎と実際を教えていただいた雨宮次生長崎大学眼科学 教室教授,大熊正人博士,浅山邦夫博士の諸先生方に心より 感謝の意を表します.

また本研究は文部省科学研究費補助金(課題番号 60570832, 61440075, 63480394), Alexander von Humboldt 財団研究奨学金(Ueno), DFG(Deutsche Forschunggemeinschaft)研究奨励金(Ue7/12)の研究補助をうけた. また超高圧電子顕微鏡観察に関しては, 岡崎基礎生理学研 究所の研究補助および有井達夫先生のご協力を頂いた.

表説明

- 表1 網膜構造の模式図.層構造との関係を示すが、 Müller 細胞が長大な細胞体を持つことがわかる.
- 表2 暗状態の視細胞における Na イオンの流れは, 光が外節ロドプシンに当たると外節原形質膜のチャ ンネルが閉じてとだえ,細胞の過分極が引き起こさ れる.
- 表3 モルモット網膜における NPPase 活性の生化 学的定量.いずれも上方の部分がウワバインあるい は K イオンに感受性を示した活性であり,下方の反 応が non K-NPPase 活性を示す.モルモット網膜に はかなり non K-NPPase 活性が存在することがわ かる.
- 表4 p-NPPが NPPase によって加水分解されると、 paranitrophenyl (p-NP) とリン酸が産生される。 NPPase 反応は、この遊離したリン酸を補足する。
- 表5 コントロール実験にもちいた各種リン酸.この うち, non K-NPPase と同様の反応局在を示したの は, G6P および F6P のみであった.
- 表6 超高圧電子顕微鏡および通常電顕による観察の 相違点.この様な対象を観察する場合,通常電顕では 下段に投影したほんの一部分を観察しているだけで

ある.

- 表7 超高圧電子顕微鏡では対象の体積的な分布が容 易に観察できる.
- 表8 超高圧電子顕微鏡では通常電顕に比べると複雑 な面上における対象の分布の観察が遙かに容易であ る.
- 表9 超高圧電子顕微鏡傾斜撮影による stereo pair 立体的観察.超高圧電子顕微鏡撮影では, 試料のほう が傾斜する.
- 表10 tracer と non K-NPPase あるいは G6Pase 活 性の二重・同時検出の実際の手技.
- 表11 網膜色素上皮細胞単離の手技の実際.
- 表12 網膜色素上皮細胞培養の手技の実際.
- 表13 細胞膜表面の糖鎖末端とレクチンおよびその標 識材料の関係の模式図.このため,標識が存在する位 置と,実際の糖鎖の微細局在はやや異なる.
- 表14 単離および培養網膜色素上皮細胞の極性観察に もちいたレクチンと、その特異的に結合する糖鎖を 示す.
- **表15** 単離(dissociation)および培養(culture)にお ける,網膜色素上皮細胞の形態的極性および Mg-ATPase 局在の時間的変化を示す模式図.
- 表16 chick embryo 網膜色素上皮細胞が発生学的に 示す.形態的膜極性の変化と Mg-ATPase 活性の局 在の変化を示す模式図.

図 説 明

- 図1 実験的脈絡膜循環障害6ヵ月後におけるサル網 膜の光顕写真.広範に網膜色素上皮細胞(PE)が消 失し、グリア細胞がBruch 膜に接している.×240
- 図2 その部の電子顕微鏡写真.線維状の胞体をもつ グリア細胞が Bruch 膜(BR)に直接接する.×1800
- 図3 モルモット網膜における K-NPPase 活性光顕 写真. 視細胞外節 (OS) には反応がみられないが, 視細胞内節 (IS)には反応がみられる. そのほか,神 経線維層 (NF),外網状層 (OP) にも著明な活性が 存在する. また内網状層 (IP) 内顆粒層 (IN) には 細く垂直に走る反応がみられている.×480
- 図4 モルモット視細胞における K-NPPase 活性電 顕写真.反応は視細胞内節(IS)細胞膜に限局し,視 細胞外節(OS)には見られない.×17.000
- 図5 モルモット視細胞外節部における K-NPPase
 活性電顕拡大写真、外節を保持する内節の細胞膜である calceal process に (矢印) 反応がみられるが、
 外節 (OS) には全く見られない、×28,000
- 図6 モルモット網膜における K-NPPase 活性に対 する浸漬液から Kイオンを除去したコントロール 反応.かなり強い活性が神経線維層 (NF)と内顆粒 層 (IN) に残存する.また内網状層 (IP) 内顆粒層 (IN) には細く垂直に走る反応が依然としてみられ ている.そのほかの層では活性はほぼ消失する.× 480
- 図7 モルモット網膜における K-NPPase 活性に対

する Na-K-ATPase の特異的阻害剤であるウアバ インの影響をみたコントロール反応.全体に活性は 減弱するが、かなり強い活性が神経線維層 (NF)と 内顆粒層 (IN) に残存する.また内網状層 (IP) 内 顆粒層 (IN) には細く垂直に走る反応が依然として みられている.そのほかの層では活性はほぼ消失す る.特にその効果は外網状層(OP)と視細胞内節(IS) で著明である.×480

- 図8 モルモット網膜における K-NPPase 活性に対 する PCMB の影響をみたコントロール反応. 反応は 全て消失する.×480
- 図9 モルモット網膜内方部における K-NPPase 活 性の電顕像. 著明な活性が Müller 細胞 ER に局在 し,特徴的な所見を呈する. IL:内境界膜、×20.000
- 図10 モルモット網膜内顆粒層における K-NPPase 活性電顕像. 著明な活性が Müller 細胞核膜(M)に 局在し,特徴的な所見を呈する.なお,双極細胞(BI) の核には反応が認められない.×18,000
- 図11 モルモット網膜外境界膜(∇)付近における K-NPPase 活性電顕像. この部では Müller 細胞 ER は数少なく,反応は僅かである.しかしその反応に よって(矢印)Müller 細胞は識別可能であった. P: 視細胞核,×14,000
- 図12 モルモット網膜内境界膜(IL)付近における K-NPPase活性に対する浸漬液からKイオンを除 去したコントロール反応、細胞膜の反応産物は見ら れないが,Müller細胞ERの反応は著明である. NF:神経線維、×20,000
- 図13 モルモット網膜内境界膜(IL)付近における K-NPPase活性に対する基質除去の影響をみたコン トロール反応.反応は全て消失し,Muiller細胞のER が認められる.×26,000
- 図14 モルモット視神経(OP)付近におけるK-NPPase活性の光顕写真,網膜とは異なり,視神経に 反応は見られない、PE:網膜色素上皮細胞,×180
- 図15 モルモット網膜における G6Pase 活性の光顕写
 真.反応の局在は non K-NPPase と全く同様である。かなり強い活性が神経線維層 (NF)と内顆粒層
 (IN)に残存する。また内網状層 (IP) 内顆粒層 (IN)
 には細く垂直に走る反応が認められる、×480
- 図16 モルモット網膜内方部における G6Pase 活性の 電顕像. non K-NPPase と同様に,著明な活性が Müller 細胞 ER に局在し,特徴的な所見を呈する. IL:内境界膜,×8,000
- 図17 モルモット視神経(OP)付近における G6Pase
 活性の光顕写真。やはり視神経に反応は見られない。
 PE:網膜色素上皮細胞、×180
- 図18 モルモット摘出眼球におけるジアテルミー凝固 斑 (矢印).
- 図19 モルモット摘出眼球におけるジアテルミー凝固 斑を含んで細切した組織片.
- 図20 モルモット網膜レーザー凝固部1日目における

92-(2004)

Müller 細胞の活性. 矢印で示すごとく, 凝固部にお いては網膜外方で Müller 細胞の反応が増強する.× 480

- 図21 モルモット網膜レーザー凝固部における Müller 細胞の ER 活性の電顕像. ER が著明に増加して、 Müller 細胞が肥大化しているのがわかる.また Müller 細胞核 (M)も増加している.×6,000
- 図22 モルモット網膜レーザー凝固部外境界膜(OL) 部における Müller 細胞の ER 活性の電顕像(M)が 視細胞核 Müller 細胞核(P)と並び、下方へ移動し ているのがわかる、×8,000
- 図23 モルモット網膜レーザー凝固部内境界膜(IL)部 における Müller 細胞の ER 活性の電顕像. Müller 細胞核(M)が内境界膜まで上方移動しているのが明 らかである.
- 図24 モルモット網膜レーザー凝固部における Müller 細胞の ER 活性の光顕像. 全体に反応が昻進し, 病巣中央へ周辺部から Müller 細胞が斜めに伸びて きている.内顆粒層 (IN) は余り反応が著明でなく, 核が移動しているのがわかる.×480
- 図25 モルモット網膜レーザー凝固部 Bruch 膜(BR) 付近における Müller 細胞の ER 活性の電顕像. 反応 を示す Müller 細胞が Bruch 膜に直接接している. (M) Müller 細胞核. ×9,000
- 図26 モルモット網膜外網状層(OP)付近における Müller 細胞の ER 活性の電顕像.内顆粒層(IN)お よび外顆粒層(ON)に見られる Müller 細胞の反応 は外網状層(OP)では見られない、×6,000
- 図27 モルモット網膜状網状層(OP)付近における Müller 細胞の ER 活性の超高圧電子顕微鏡像.活性 は連続し、外網状層(OP)ではかなり細胞体が狭細 化していることが明らかとなった.切片の厚さは2 μm. N:内顆粒層, ON:外顆粒層, M:Müller 細 胞核,×6,000
- 図28 モルモット網膜神経節細胞層および内網状層
 (OP)付近における Müller 細胞の ER 活性の超高圧
 電子顕微鏡像. ER が連続しているのがわかる.また
 Müller 細胞は内網状層ではかなり胞体を細くして
 いる.切片の厚さは1µm.×28,000
- 図29 モルモット網膜内方部における Müller 細胞の
 ER 活性の超高圧電子顕微鏡像.反応が内境界膜
 (IL)から内顆粒層まで連続しているのがわかる.また
 Müller 細胞は内網状層(IP)ではかなり胞体を細くし、しかも突起を伸ばすのがわかる.切片3µm.
 M:Müller 細胞核×2,400
- 図30 モルモット網膜レーザー凝固部内顆粒層(ON) 部における Müller 細胞核(M)の電顕像. この視野 のみで核は5つも見られ,核の数が増加している.× 6000
- 図31 電顕用メッシュにのせた4枚の連続切片(1 ~4). 切片の厚さは3µm.
- 図32 正常内顆粒層(IN)における Müller 細胞の核

日眼会誌 92巻 12号

(M) はこの倍率では、2~3個である.×6,000

- 図33 レーザー凝固による変性網膜においては、同層 を同倍率で撮影すると、平均5~6個の Müller 細胞 核(M)が見られる、×6,000
- 図34 Müller 細胞核(M)の核膜では核膜孔で円形に 反応が欠如する(▼).×9,000
- 図35 Müller 細胞核の超高圧電子顕微鏡撮影. 円い核 腹孔の配列が平面的に観察される. ×16,000
- 図40 モルモット網膜一視神経移行部の光顕写真. 括 弧の部が Kuhnt の組織である.×400
- 図41 モルモット網膜一毛様体移行部の光顕写真. 矢 印が移行部であり、CB は毛様体を示す.×400
- 図42 Kuhnt の組織の電顕写真. 矢印の部に Kuhnt 組 織と呼ばれる細胞が存在するが, 通常形態観察では, その詳細は不明である.×3,000
- 図43 モルモット網膜一視神経移行部における G6Pase活性の光顕写真. 矢印の部で反応がある Müller 細胞と色素を持った網膜色素上皮細胞(PE) が連続するように見える.×180
- 図44 モルモット網膜の Microslicer による非凍結浸 漬用切片.切片の厚さは約40μm.電顕用トリミング で観察できるのはこれぐらいの範囲であるため、特 定の部位を観察するためには、かなりトリミング用 光顕切片を作製して、同定せねばならない.
- 図45 スタンプ標本の実際
- 図46 スタンプ標本の実際.矢印に網膜切片が見える. この方向なら、かなり広い視野が得られる.
- 図47 モルモット網膜 Kuhnt 部の Müller 細胞(M)活 性の電子顕微鏡写真. Müller 細胞先端がかなり網膜 色素上皮細胞 (PE) 側に進展してきている. ×3,000
- 図48 同部拡大.メラニン顆粒を有する網膜色素上皮 細胞(PE)とERに反応を認めるMüller細胞(M) が側面同志で接続している.その細胞間にはtight junction があるかのように見える(矢印).×10,000
- 図49 網膜一毛様体移行部の Müller 細胞活性. 網膜全体に活性がみられる(▼). CB 毛様体.×400
- 図50 同部の電顕写真. Müller 細胞核(M)が外方へ 下降し, 胞体も幅広く, 網膜一視神経移行部と同様の 像を示す. P: 視細胞核, OL: 外境界膜, ×6,000
- 図51 網膜一視神経移行部 Müller 細胞反応の超高圧 電子顕微鏡像. 矢印が Kuhnt の組織を示すが, 網膜 色素上皮細胞 (PE) と Müller 細胞 (M)の関係が良 くわかる.×1,500
- 図52 網膜一毛様体移行部の Müller 細胞活性の超高 圧電子顕微鏡像. Müller 細胞(M)が非常に肥大化 していることがわかる. NPE は毛様体無色素上皮細 胞であるが,その間にある未分化型と呼ばれる細胞 の活性は弱い.×4,000
- 図53 モルモット網膜 G6Pase 活性の光顕像.反応は 主として、神経線維層(NF)と内顆粒層(IN)に強 い、×400
- 図54 モルモット網膜静脈内投与HRP活性の光顕

 像. 視細胞内節 (IS) に内因性 peroxidase 反応がみられるが、脈絡膜毛細血管からの HRP 漏出のため 脈絡膜(CH) は強く染色される.×300

- 図55 モルモット網膜における G6Pase 活性と HRP 反応の同一切片における二重染色像. どちらの反応 も検出されていることは明白である. 図53と図54と を比較されたい.×360
- 図56 同法による網膜一視神経移行部の G6Pase 活性 と HRP 反応の二重染色像. 脈絡膜から漏出した tracer は Müller 細胞の斜めに走る部位で(矢印)止 まっているように見える. 視神経内へは脈絡膜から の漏出が認められる.×200
- 図57 モルモット網膜レーザー凝固直後の蛍光眼底造 影像. 凝固部から蛍光色素の漏出が認められる.
- 図58 モルモット網膜レーザー凝固5日後の蛍光眼底 造影部からの蛍光色素の漏出は認められない。
- 図59 蛍光色素漏出が認められる時期の凝固部における二重染色光顕像. Müller 細胞の反応はまだ弱く, 脈絡膜からの著明な tracer の網膜内侵入が認められる. PE: 網膜色素上皮細胞.×350
- 図60 蛍光色素漏出が停止した時期の凝固部における 二重染色光顕像. Müller 細胞の反応が増強し, tracer も網膜内へとは侵入していないように見え る. CH: 脈絡膜.×350
- 図61 蛍光色素漏出が認められる時期の凝固部外網状 層(OP)付近における二重染色電顕像.濃いERの 反応がMüller細胞細胞(M)の位置を示すが,一方 薄いHRPの反応が細胞間隙に存在するのがわか る.tracerの反応は内顆粒層(IN)より内方ではほ とんど見られなかった.P:視細胞核,N:===-ン細胞核、×5,000
- 図62 蛍光色素漏出が認められる時期の凝固部 Bruch 膜(BR)付近における二重染色電顕像. ER に反応 を示す Müller 細胞(M)突起の間隙に著明な MP の 侵入像がみられた. このように通常は脈絡膜毛細血 管から流出しにくい MP であるが,変性時には容易 、に網膜内へと侵入する.×7,000
- 図63 モルモット網膜色素上皮細胞における tracer の超高圧電子顕微鏡像. 細胞間隙に貯留する(矢印) tracerの像がかなり立体的に認められる. BR: Bruch 膜.×4,500
- 図64 モルモット網膜一視神経移行部における二重染 色の超高圧電子顕微鏡像. Cは毛細血管を示し, tracerの貯留がみられるが, Müller 細胞(M)部へ 向かうかもしれない tracer の漏出は厚切切片では コントラストの問題でとらえるのが困難である.× 2,000
- 図65 実験的脈絡膜循環障害1日後におけるサル網膜 色素上皮細胞の電顕写真.細胞は強く壊死性変化を 来している.×4,000
- 図66 実験的脈絡膜循環障害7日後におけるサル網膜 色素上皮細胞の電顕写真.この時期蛍光色素漏出は

停止するが, 重層した網膜色素上皮細胞間には tight junction が認められた (矢印). ×3,600

- 図67 単離直後の網膜色素上皮細胞における Con A-HRP の標識. 網膜色素上皮細胞細胞膜全体に渡る著 明な標識が認められる.×7,000
- 図68 同条件における網膜色素上皮細胞の細胞膜の Con A-ferritinの反応. 矢印の部にとくに強い標識 が認められる.×24,000
- 図69 chick embryo 7日卵網膜色素上皮細胞単離直 後の Mg-ATPase 活性. apical, basolateral 全ての 細胞膜に陥入が認められるが,反応は apical と lateral 細胞膜のみに限局する.×12,000
- 図70 単離後5分の網膜色素上皮細胞の Mg-ATPase 活性. basal 細胞膜は円形になり, lateral 細胞膜(L) も次第に突起を失いつつある. Mg-ATPase 反応は apical 細胞膜(A) にのみ認められる.×10,000
- 図71 単離後10分の網膜色素上皮細胞の Mg-ATPase 活性.細胞膜は陥入を失い円くなる.反応は(▼)を のぞく膜全体で陽性である.また原形質内には空胞 を多く含むが、反応を示すもの(矢印)と反応がない 空胞(▽)の二種類が存在する.×10.000
- 図72 同空胞の拡大写真.反応あり(▼),反応なし (▽).×17,000
- 図73 同空胞の拡大写真.×18,000
- 図74 単離後15分の網膜色素上皮細胞の Mg-ATPase 活性、細胞膜は陥入を失い円形のままであるが、細胞 膜にみられた Mg-ATPase 活性は消失する. 原形質 内には空胞を含むが、このうちの一部には Mg-ATPase 反応が認められる(矢印).×6,000
- 図75 同空胞の拡大.×15,000
- 図76 単離後30分の網膜色素上皮細胞の Mg-ATPase 活性.細胞は円形であり,膜形態極性もみられず, Mg-ATP反応も全く認められない、×6,000
- 図77 網膜色素上皮細胞培養3日目電顕写真. 膜の形 態極性は判然としない. Mg-ATPaseも細胞膜には 見られない. ただし, ER には所々反応がみられるも のがある. A: apical 側細胞膜,×10,000
- 図78 網膜色素上皮細胞培養10日目電顕写真. apical 部(A)には villi 様陥入が認められる. 特に lateral (L)細胞膜では陥入が著明で, Mg-ATPase 活性も著 明にみられる.×13,000
- 図79 網膜色素上皮細胞培養15日目電顕写真. apical 部には villi が認められ、著明な Mg-ATPase も存在 する. lateral 細胞膜の陥入は見られなくなり活性も 消失する. basal 細胞膜には僅か陥入が出現するが, 活性は局在しない.×15,000
- 図80 生後1日目ヒョコ網膜色素上皮細胞における Mg-ATPase活性の電顕写真.Lateral 細胞膜で陥入 が見られなくなり、反応も減弱する.apical villiに は活性がみられる.basal 細胞膜には活性は局在し ない、×6,000

図81 生後60日目ニワトリ網膜色素上皮細胞おける

Mg-ATPase 活性の電顕写真. apical villi はかなり 延長するが、Mg-ATPase 活性は消失する. basal に も lateral の細胞膜にも活性は見られない. ×7,000

図82 生後60日目=ワトリ網膜色素上皮細胞 apical 細胞膜拡大写真. Mg-ATPase 反応は全く存在しな い、×34.000

Müller 細胞の組織細胞化学および その barrier 研究への 応用 文献

- 1) 上野聡樹, 石鄉岡均, 平田 昭他: 解剖生理学 XV 「視覚器管」. 臨床栄養 71: 333-340, 1987.
- 上野聡樹:網膜の形態と発生.山本 節編.眼科 Mook「目の発達と加齢」,金原出版,東京,(印刷 中).
- Wolff E: Anatomy of the eye and orbit. 6th ed, WB Saunders Company, Philaderphia, 1968.
- Arey LB: Retina, choroid and sclera. in Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, ed, Penfield W, p743-766, Hoeber PB, Inc, New York, 1932.
- Sjöstrand FS: Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea-pig eye as revealed three dimensional constructions from serial sections. J Ultrastruct Res 2: 122–170, 1958.
- 6)山田英智,徳安清輝,岩城 忍:網膜微細構造の電子顕微鏡的研究.III.人の網膜微細構造について、 久留米医学会誌 21:1979-2027,1958.
- Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: Histology of human eye. WB Saunders Company, Philadelphia, 1971.
- Kuwabara T, Cogan DG: Retinal glycogen. Arch Ophthalmol 66: 680-688, 1961.
- Tomita T: Electrophysiological studies of retinal cell function. Invest Ophthalmol Vis Sci 15: 171–187, 1976.
- 10) 上野聡樹,塚原 勇:脈絡膜循環障害による網膜 色素上皮細胞の形態学的変化.第1報.早期崩壊過 程.日眼 80:572-584,1976.
- 11) Ueno S, Ohkuma M, Tsukahara I: Ultrastructural observations of the retinal pigment epithelial cells following experimental occlusion of the posterior ciliary artery in the rhesus monkey. Early changes of the damaged retinal pigment epithelial cells. Jap J Ophthalmol 21: 297-310, 1977.
- 12) Ueno S, Tsukahara I: Ultrastructural observations of the retinal pigment epithelial cells following experimental occlusion of the posterior ciliary artery in the rhesus monkey. Exc Medica Cong Ophthalmol 6: 642-645, 1978.
- 13)上野聡樹,原山憲治,塚原 勇:脈絡膜循環障害による網膜色素上皮細胞の形態学的変化,第2報,中

期変性過程. 日眼 81:728-742,1977.

- 14) 上野聡樹,大田 実,大熊正人他:実験的脈絡膜循 環障害. 循環器科 2:449-463,1977.
- 15)上野聡樹,大田 実,塚原 勇:脈絡膜循環障害による網膜色素上皮細胞の形態学的変化.第3報.後期萎縮過程.日眼 81:1801-1813,1977.
- 16) 上野聡樹,大田 実,塚原 勇:脈絡膜循環障害による網膜色素上皮細胞の形態学的変化.第4報.蛍光眼底造影所見と形態学的変化の比較.日眼 83: 56-71,1979.
- 17) Hagins WA: The visual process: Excitory mechanisms in the priary receptor cells. Ann Rev Biophys Bioenerg 1: 131-158, 1972.
- 18) Hagins WA, Penn RD, Yoshikami S: Dark current and photocurrent in retinal rods. Biophys J 10: 380-412, 1970.
- 19) Zuckerman R: Analysis of photoreceptor membrane currents. J Physiol 236: 333-354, 1973.
- Bortoff A, Norton AL: An electrical model of the vertebrate photpreceptor cell. Vision Res 7: 253-263, 1967.
- 21) Toyoda J, Nosaki H, Tomita T: Lightinduced resistance changes in single photpreceptors of Necturus Gekko. Vision Res 9: 453 -463, 1969.
- 22) Bylor DA, Fuortes MGF: Electrical responses of single cones in the retina of turtle. J Physiol 207: 77-92, 1970.
- 23) Korenbrot JI, Cone RA: Dark ionic flux and the effects of light in isolated rod outer segments. J Gen Physiol 60: 20-45, 1972.
- 24) Tomita T: Light-induced potential and resistance changes in vertebrate photoreceptors. Handbook of Sensory Physiology, Vol VII/2, p283-511, Springer, Berlin, 1972.
- 25) Yoshikami S, Hagins WA: Control of the dark current in vertebrate rods and cones. Langer H, ed, Biochemistry and Physiology of Visual Pigments, p245-255, Springer, Heidelberg, 1973.
- 26) Hagins WA, Robinson WF, Yoshikami S: Ionic aspects of excitation in rod outer segments. Energy transformation in biological systems. Ciba Found Symp 31: 169-189, 1975.
- 27) Frank RN, Goldsmith TH: Effects of cardiac glycosidase on electrical activity in the isolatred retina of the frog. J Gen Physiol 50: 1585-1606, 1967.
- 28) Frank RN, Goldsmith TH: Adenosine triphosphatase activity in the rod outer segments in the pig's retina. Arch Biochem Biophys 110:

517-525, 1965.

- 29) Bonting SL, Caravaggio LL, Canady MR: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. X. Occurence in retina rods and relatin to rhodopsin. Exp Eye Res 3: 47-56, 1964.
- Hemminki K: Localization of ATPase in bovine retinal outer segments. Exp Eye Res 20: 79-88, 1975.
- 31) Bownds D, Brodie A, Robinson WE, et al: Physiology and enzymology of frog photoreceptor membranes. Exp Eye Res 18: 253-269, 1974.
- 32) Zimmerman WF, Daemen FJM, Bonting SL: Distribution of enzyme activities in subcellular fractions of bovine retina. J Biol Chem 251: 4700-4705, 1976.
- 33) Berman AL, Azimova AM, Gribakin FG: Localization of Na, K-ATPase and Caactivated Mg-dependent ATPase in retinal rods. Vision Res 17: 527-535, 1977.
- 34) Wachstein M, Meisel E: Histochemistry of heptic phosphatases at a physiologic pH, with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Amer J Pathol 27: 13-23, 1957.
- 35) Novikoff AB, Drucker J Shin WY, et al: Further studies of the apparent adenosinetriphosphatase activity of cell membranes in formol-calcium-fixed tissues. J Histochem Cytochem 9: 434-451, 1961.
- 36) Farquhar MG, Palade GF: Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. J Cell Biol 30: 359-379, 1966.
- 37) Tormey JM: Significance of the histochemical demonstration of ATPase in epithelia noted for active transport. Nature 210: 820 -822, 1966.
- 38) Marchesi VT, Palade GE: The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membrane. J Cell Biol 35: 385-404, 1967.
- 39) Abel JH Jr: Electron microscopic demonstration of adenosine triphosphate phosphohydrolase activity in herring gull salt glands. J Histochem Cytochem 17: 570-584, 1969.
- 40) Jacobson NO, Jorgensen PL: A quantitative biochemical and histochemical study of the lead method for localization of adenosine triphosphate-hydrolyzing enzymes. J Histochem Cytochem 17: 443-453, 1969.
- 41) **Firth JA**: Cytochemical approaches to the localization of specific adenosine triphos-

phatase Histochem J 10: 253-269, 1978.

- 42) Stirling CE: Radioautographic localization of sodium pump sites in rabbit in testine. J Cell Biol 85: 313-324, 1980.
- Stirling CE, Lee A: (³H) ouabain autoradiography of frog retina. J Cell Biol 85: 313-324, 1980.
- 44) Ueno S, Mayahara H, Tsukahara I, et al: Ultracytochemical localization of ouabainsensitive potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity in the guinea pig retina. I. Photoreceptor cells. Acta Histochem Cytochem 13: 679-694, 1980.
- 45) Ueno S, Mayahara H, Tsukahara I, et al: Ultracytochemical localization of ouabainsensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity in the guinea pig retina. II. Neurons and Müller cells. Acta Histochem Cytochem 14: 186-206, 1981.
- 46) Ueno S, Bambauer HJ, Umar H, et al: Ultracytochemical study of Ca-ATPase and K-NPPase activities in retinal photoreceptotrs of the guinea pig. Cell Tis Res 237: 479-489, 1984.
- 47) 上野聡樹:Na-K-ATPase. 小川和朗, 中根一穂 編, 組織細胞化学の技術. 一細胞膜一. 朝倉書店, 東京, (印刷中).
- 48)上野聡樹:視覚器,小川和朗,永田哲士,安田健次郎編,組織学一組織化学的アプローチー,朝倉書店,東京,(印刷中).
- 49) Mayahara H, Ogawa K: Ultracytochemical localization of ouabain-sensitive, potassiumdependent p-nitrophenylphosphatase activity in the rat kidney. Acta Histochem Cytochem 13: 90-102, 1980.
- 50) 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.
- 51) Albers RW, Koval GJ: Sodium-potassiumactivated adenosine triphosphatase. VII. Concurrent inhibition of Na-K-adenosine triphosphatase and activation of K-nitrophenylphosphatase activities. J Biol Chem 247: 3088-3092, 1972.
- 52) Borgers M: The cytochemical application of new potent inhibitors of alkaline phosphatases. J Histochem Cytochem 21: 812-824, 1973.
- 53) Spurr AR: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26: 31-43, 1969.

96 - (2008)

- 54) Judah DJ, Ahmed K, McLean AEM: Ion transport and phosphoproteins of human red cells. Biochim Biophys Acta 65: 472-480, 1962
- 55) Bader H, Sen AK: K-dependent acylphospatase as part of the Na, K, ATPase of cell membranes. Biochim Biophys Acta 118: 116 -123, 1966.
- 56) Sen AK, Post RL: Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. J Biol Chem 239: 345-352, 1964.
- 57) Ohkubo A, Langerman N, Kaplan MM: Rat liver alkaline phosphatase. Purificatin and properties. J Biol Chem 42: 23-26, 1939.
- 58) Ernst SA: Transport ATPase cytochemistry. Ultrastructural localization of potassiumdependent phosphatase activities in rat kidney cortex. J Cell Biol 66: 586-608, 1975.
- 59) Firth JA, Marland BY: The significance of inhibitor-resistant alkaline phosphatase in the cytochemical demonstration of transport adenosine trihosphatase. J Histochem Cytochem 23: 571-574, 1975.
- 60)馬屋原宏: p-Nitrophenylphosphatase. 武内忠 男,小川和朗編,新酵素組織化学. p290-298, 朝 倉書店,東京, 1980.
- 61) 上野聡樹: Paranitrophenylphosphatase. 小川和 朗, 中根一穂 編, 組織細胞化学の技術. 一細胞膜 一. 朝倉書店, 東京, (印刷中).
- 62) Ganser AL, Forte JG: K-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxyntic cells. Biochem Biophys Acta 307: 169–180, 1973.
- 63) Ganser AL, Forte JG: Ionophoretic stimulation of K-ATPase of oxyntic cell microsomes. Biochem Biophys Res Commun 54: 690-696, 1973.
- 64) Forte JG, Ganser AL, Beesley R, et al: Unique enzymes of purified microsomes from pig fundic mucosa. Gastroenterology 69: 175 -189, 1975.
- 65) Brooks RR, Goldenberg MM: Proceedings of the society for experimental biology and medicine 172: 308, 1983.
- 66) 藤本 和,小川和重,小川和朗:P-nitrophenylphosphate を基質とする phosphatase 検出法.日本組織細胞化学会編,組織細胞化学,1984, p63 -76,学際企画,東京,1984.
- 67) Broderson SH, Patton DL, Stahl WL: Fine structural localization of potassium-stimulated p-nitrophenylphosphatase activity in dendrites of the cerebral cortex. J Cell Biol 77: 13–17, 1978.

- 68) 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 brain. Comparing with the activity of Mg-ATPase and alkaline phosphatase. Acta Histochem Cytochem 13: 394-403, 1980.
- 69) Uga S, Katsume K: Electron microscopic observations on reaction of retinal Müller cells under pathological condition. Jap J Ophthalmol 14: 223-235, 1970.
- 70) 生井 浩: グリア細胞を中心とした網膜の病理. 日眼 78:1245-1263, 1974.
- 71) Cajal SR: Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. Vol II, p298, CSIC, Madrid, 1955.
- 72) Moore BW: A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun 19: 739-744, 1965.
- 73) Eng LF, Van der Haeghan JJ, Bignami A, et al: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res 28: 351-354, 1971.
- 74) Bomberg JS, Schachner M: Localization of nervous system antigens in the retina by immunohistology. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 920-924, 1978.
- 75) Bignami A, Dahl D: The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury, an immunofluoresceince study with antibodies to glial fibril lary acidic (GFA) protein. Exp Eye Res 28: 63-69, 1979.
- 76) O'Dowd DK, Eng LF: Immunocytochemical localization of glial fibrillary acidic (GFA) protein in the Müller cell of the human retina. Soc Neuro Sci 5: 431, 1979.
- 77) Dixon RG, Eng LF: Glial fibrillary acidic protein in the retina of the developing albino rat. An immunoperoxidase study of paraffinembedded tissue. J Comp Neurol 195: 305-321, 1981.
- 78) Terenghi G, Cocchia D, Michetti FK, et al: Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina. 1. Light microscopical immunocytochemistry. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 976 -980, 1983.
- 79) Ohira A, Oshima K, Kikuchi M: The distribution of glial fibrillary acidic (GFA) protein in human eyeball. —An immunoperoxidase study of paraffin embedded tissue. Afro-Asian J Ophthalmol 2: 41—47, 1983.
- 80) Kondo H, Iwanaga T, Nakajima T: An immunocytochemical study on the localization of

S-100 protein in the retina of the rats. Cell Tis Res 231 : 527-532, 1983.

- 81) Molnar ML, Stefannson K, Marton LS: Distribution of S100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. Exp Eye Res 38: 27-34, 1984.
- 82) 大平明弘, 大島健司, 菊池昌弘: Glial fibrillary acidic(GFA)蛋白による網膜の免疫組織化学的検 索. 日眼 85:850-855, 1984.
- 83) 大平明弘, 曽爾 彊, 大島健司:パラフィン包理によるラット網膜のS-100蛋白, GFA, NSEの免疫 組織化学的研究. 福岡大学医学紀要 11: 259 -263, 1984.
- 84) Jacobiec FA, Brodie SF, Haik B: Giant cell astrocytoma of the retina : A tumor of possible Müller cell origin. Ophthalmology 90: 1565 -1576, 1983.
- 85) Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV: Müller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1321-1328, 1984.
- 86) Sarthy PV: Establishment of Müller cell cultures from adult rat retina. Brain Res 337: 138 -141, 1985.
- Musser GL, Rosen S: Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate retina. Exp Eye Res 15: 105-109, 1973.
- 88) Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G: Double labelling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. J Histochem Cytochem 27: 1634—1637, 1979.
- 89) Liesner P, Moscona AA: Carbonic anhydrase C in the neural retina: Transition from generalized to glia-specific cell localization during embryonic development. Proc Natl Acad Sci USA 78: 7190-7194, 1981.
- 90) Nork TM, Ghobrial MW, Peyman GA, et al: Massive retinal gliosis. A reactive proliferation of Müller cells. Arch Ophthalmol 104: 1383 -1389, 1986.
- 91) Nork TM, Wallow IHL, Sramek SJ, et al: Müller cell involvement in proliferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 105: 1424 -1429, 1987.
- 92) Barnstable CJ: Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. Nature 286: 231-235, 1980.
- 93) Chan C, Rozenszajn LA, Nussenblatt RB, et al: Monoclonal antibodies to Müller cells of the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 1007

-1012, 1984.

- 94) Ueno S, Ishigouoka H, Hirata A, et al: Cytochemical studies of Müller cells in the guinea pig retina under high voltage electron microscopy. J Electronmicrosc 35: 1181-1182, 1986.
- 95) Wachstein M, Meisel E: On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphate. J Histochem Cytochem 4: 592, 1956.
- 96) Tice LW, Barrnett RJ: The fine structural localization of glucose-6-phosphatase in rat liver. J Histochem Cytochem 10:754-762, 1962.
- 97) Neil MW, Horner MW: The acid p-nitrophenyl phosphatase activity of adult guinea pig-liver subcellular fractions. Biochem J 84: 32, 1962.
- 98) Neil MW, Horner MW: Studies on acid hydrolases in adult and foetal tissues. Acid p-nitrophenyl phosphatase phosphohydrolases of adult guinea-pig liver. Biochem J 92: 217 -224, 1964.
- 99) DeDuve C, Berthet J, Hers HG, et al: Le systeme hexose - phosphatique. I. Existence d'une glucose-6-phosphatse specifique dans le foie. Bull Soc Chem Biol 31: 1242-1253, 1949.
- 100) Yamamoto K, Mayahara H, Ogawa K: Cytochemical localization of ouabain-sensitive, Kdependent p-nitrophenylphosphatase in the rat hepatocyte. Acta Histochem Cytochem 17: 23 -35, 1984.
- 101) Kanemura S: Demonstration of glucose 6phosphatase activity in hepatocytes following transparenchymal perfusion fixation with glutaraldehyde. J Histochem Cytochem 19: 386 -387, 1971.
- 102) 金村泰輔: Glucose 6-phosphatase. 武内忠男,小 川和朗 編,新酵素組織化学, p322-328, 朝倉書店, 東京, 1980.
- 103) Stetten MR, Burnet FF: Some properties of variously activated microsomal glucose-6phosphatase, inorganic pyrophosphatase and inorganic pyrophosphatase-glucose phosphotransferase shift in pH optimum. Biochem Biophys Acta 132: 138-147, 1967.
- 104) Horecker BL, Stadman ER: Current topics in cellular reguation. Vol 18, p33. Academic Press, New York, 1974.
- 105) Lessel S, Kuwabara T: Phosphatase histochemistry of the eye. Arch Ophthalmol 71: 851 -860, 1964.
- 106) 石郷岡均,上野聡樹,本田孔士:実験的網膜脈絡膜 変性萎縮における Müller 細胞の組織細胞化学的

98-(2010)

観察.網膜脈絡膜萎縮調查研究班,昭和59年度報告書, 116-119, 1985.

- 107) Ishigouoka H, Hirata A, Kitaoka T, et al: Cytochemical studies on pthological changes of Müller cells after retinal coagulation in the guinea pig. J Electronmicrosc 35: 3221-3222, 1986.
- 108) Ishigouoka H, Hirata A, Kitaoka T, et al: Cytochemical study of Müller cells during repairing process after retinal coaguation. Acta Conc Ophthalmol 1: 666-670, 1986.
- 109)石郷岡均,上野聡樹,本田孔士:アルゴンレーザー 光凝固による瘢痕形成過程の Müller 細胞動態に ついて. 一組織化学的検索一. 網膜脈絡膜萎縮調査 研究班,昭和60年度報告書, 132—136, 1986.
- 110) Ishigouoka H, Hirata A, Kitaoka T, et al: Cytochemical studies in pathological Müller cells after argon laser photocoagulation. Invest Ophthalmol Vis Sci (in press).
- 111) Ueno S, Ishigouoka H, Hirata A, et al: Histochemistry of the retina. —Specific enzyme reaction on retinal glial Müller cells and its histochemical application—. Hashimoto H, Kuo H, Lee K, ed, Recent Development of Electron Microscopy, 1988. (in press).
- 112)石郷岡均,平田昭,上野聡樹他:凝固による網膜 脈絡膜変性萎縮における網膜細胞応答の相違。網 膜脈絡膜萎縮調査研究班,昭和61年度報告書,(印 刷中).
- 113)小川和朗,藤本豊士,藤本 和二組織細胞化学新 論,とくに超高圧電子顕微鏡およびフリーズレブ リカ法と細胞化学.日本組織細胞化学会編.組織細 胞化学 1982, p1-18,学際企画,東京, 1982.
- 114) 浜 清,有井達夫:超高圧電子顕微鏡立体写真 からの三次元画像情報の定量化.電子顕微鏡 20: 134-142,1985.
- 115) 上野聡樹, 石郷岡均, 本田孔士: 網膜脈絡膜変性萎縮における Müller 細胞変化過程の三次元的組織細胞化学. 網膜脈絡膜萎縮調査研究班, 昭和60年度報告書, !137-140, 1986.
- 116) Ueno S, Ishigouoka h, Hirata A, et al: High voltage cytochemistry of Müller cells in the guinea pig retina. Acta Histochem Cytochem 20: 367-368, 1987.
- 117) Watson ML: The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes. J Biophys Biochem Cytol 1: 257-270, 1955.
- 118) Kuhnt H: Zur Kenntniss des Sehnerven und der Netzhaut. v Graefe's Arch Ophthalmol 25: 179–288, 1879.
- 119) Ernst JT, Archer D: Fluorescein angiography of the optic dik. Amer J Ophthalmol 75: 973

-978, 1973.

- 120) Ben-Sira I, Riva CE: Fluorescein diffusion in the human optic disc. Invest Ophthalmol Vis Sci 14: 205-211, 1975.
- 121) Rodrigues-Pelata LA: Hematic and fluid barriers in the optic nerve. J Comp Neurol 126: 109 -124, 1966.
- 122) Machemer R: Angiogreaphic-histologic correation f eye vessel permeability with proteinbound fluoresceince dye. Amer J Ophthalmol 69: 27–38, 1970.
- 123) Anderson DR: Ultrastructure of human and monkey lamina cribrosa and optic nerve head. Arch Ophthalmol 82: 800-814, 1969.
- 124) Anderson DR: Ultrastructure of optic nerve head. Arch Ophthalmol 83: 63-73, 1970.
- 125) Peyman GA, Apple D: Peroxidase diffusion processes in the optic nerve. Arch Ophthalmol 88: 650-654, 1972.
- 126) Grayson MC, Laties AM : Ocular localization of sodium fluorescein. Arch Ophthalmol 85: 600 -609, 1971.
- 127) 塚原 勇, 三木弘彦,山下秀明: Peroxidase 投与 による視神経における諸種の関門に関する研究. 日眼 77:1486-1500,1973.
- 128) Tsukahara I, Ohata M: Histologic study on the distribution of sodium fluorescein in the fundus. Francois J, ed, Functional Examination in Ophthalmology, p307—311, Karger, Basel, 1974.
- 129) Tsukahara I, Yamashita H: An electron microscopic study on the blood-optic nerve and fluid optic nerve barrier. v Graefe's Arch Ophthalmol 196: 239-246, 1975.
- 130) Yamashita H, Tsukahara I, Ogawa K: An electron microscopic study on the blood-optic nerve and fluid optic nerve barriers using peroxidase as as tracer. J Clin Electron Micros 7: 438 –439, 1975.
- 131) Tso MOM, Shih C, McLean IW: Is there a blood-brain barrier at the optic nerve head? Arch Ophthalmol 93: 815-825, 1975.
- 132) Okinami S, Ohkuma M, Tsukahara I: Kuhnt intermediary tissue as a barrier between the optic nerve and retina. v Graefe's Arch Ophthalmol 201: 57-67, 1976.
- 133) Cohen AI: Is there a potential defect in the blood-retinal barrier at the choroidal level of the optic nerve canal? Invest Ophthalmol Vis Sci 12: 513-519, 1973.
- 134) 上野聡樹,石郷岡均,平田 昭他:眼領域の組織細 胞化学.日本組織細胞化学会編.組織細胞化学,

1986, p79-93, 学際企画, 東京, 1986.

- 135) Hirata A, Ishigouoka H, Kitaoka T, et al: Ultracytochemical studies of Müller cells in the transitional area between retina and optic disc. J Electronmicrosc 35: 2253-2254, 1986.
- 136) 上野賢一, 猪俣 猛:網膜鋸状緑の電子顕微鏡に よる研究. 眼紀 16:761-765, 1965.
- 137) Pei YT, Smelser GK: Some structural features of the ora serrata region in the primate eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 7: 672, 1968.
- 138) 武井洋一:網膜鋸状縁の微細構造.日眼 75: 1790-1802, 1971.
- 139) Joussen F, Spitznas M: The fine structure of human retina at the ora serrata v Graefe's Arch Ophthalmol 185: 177-188, 1972.
- 140)西田祥藏:人眼鋸状縁部の微細構造について.(1) とくに網膜内層と毛様体偏平部無色素上皮細胞の 移行部の成人眼と乳児眼の相違について.日眼 79:727-737,1975.
- 141) Shabo AL, Maxwell DS: Structural organization of pars plana-ora serrata transition in the human and monkey eye with emphasis on protein barriers. Lab Invest 29: 511-526, 1973.
- 142) 平田 昭,石郷岡均,北岡 隆他:網膜鋸状縁にお ける Müller 細胞の組織細胞化学観察. 眼紀 38: 401-405, 1987.
- 143)太田 実:光凝固と fluorescein 組織化学. 眼紀 24:499-506, 1973.
- 144) 大槻 潔:病的人眼における fluorescein sodium の組織化学. 日眼 77:1501-1524, 1973.
- 145) Laties AM, Rapoport S: The blood-ocular barriers under osmotic stress. Studies on the freze-dried eye. Arch Ophthalmol 94: 1086 -1091, 1976.
- 146) Wallow IHL: Repair of the pigment epithelial barrier following photocoagulation. Arch Ophthalmol 102: 126-135, 1984.
- 147) Revel JP, Karnovsky MJ: Hexagonal array of subunits in intracellular junctions on the mouse heart and liver. J Cell Biol 33: 7-12, 1967.
- 148) 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.
- 149) Graham RC, Karnovsky MJ: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in proximal tubulus of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem 14: 291-302, 1966.
- 150) 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.

- 151) 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編,組織細胞化学,1983, p1-18,1983.
- 152) Mayahara H, Ogawa K: The effect of thickness of specimen on the ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the rat kidney. J Histochem Cytochem 16: 721-724, 1968. 1.
- 153) Hirata A, Ishigouoka H, Kitaoka T, et al: "Double reaction" cytochemistry and its application to high voltage electron microscopy (HVEM) observation of the retinal transitional areas. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 263, 1987.
- 154) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE: Permeability of muscle capillaries to small heme-pepdtide. Evidence for the existance of patent transendothelial channels. J Cell Biol 64: 586-607, 1975.

単離および培養下における網膜色素上皮 細胞の形態的・機能的細胞 極性 文献

- 155) Wallow IHL, Tso MOM, Fine BS: Repair after xenon arc photocoagulation. 1. A comparison between rhesus monkey and rabbit. Amer J Ophthalmol 75: 32-52, 1973.
- 156) Wallow IHL, Tso MOM: Repair after xenon arc photocoagulation 2. A clinical and light microscopic study of evoluation retinal lesions in the rhesus monkey. Amer J Ophthalmol 75: 610-626, 1973.
- 157) Wallow IHL, Tso MOM: Repair after xenon arc photocoagulation. 3. An electron microscopic study of the evaluation of retinal lesions in rhesus monkeys. Amer J Ophthalmol 75: 957 -972, 1973.
- 158)石川祐二郎: クセノン光凝固が施されたサル網膜の修復機転に関する組織学的研究.1.初期修復過程にみられる組織反応の電子顕微鏡研究.日眼78:606-622,1974.
- 159) 吉田秀彦:損傷された網膜視細胞の変性及び再生 に関する組織学的研究.第1報.クセノン光凝固を 施した家兎網膜の凝固周辺の網膜視細胞の損傷及 び修復について.日眼 79:248-257,1975.
- 160) 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.
- 161) 三木徳彦,三井敏子,広森寿郎: Xenon 光凝固後の網膜色素上皮修復に関する実験的研究.一走査型電顕的観察一.日眼 80:608-620,1976.
- 162) Frayer WC: Reactivity of the retinal pigment epithelium. An experimental and histopathologic study. Trans Amer Ophthalmol

100-(2012)

Soc 64: 586-642, 1966.

- 163) Machemer R: Experimental retinal detachment in the owl monkey. 2. Histology of retina and pigment epithelium. Amer J Ophthalmol 66: 396-427, 1968.
- 164) 大熊正人:実験的網膜剝離に於ける脈絡膜及び色素上皮の微細構造.第3報,網膜色素上皮の走査型 電子顕微鏡的観察.日眼 76:377-384,1972.
- 165) 生井 浩, 宇賀茂三, 大島健司他:光凝固ジアテル ミー熱凝固および冷凍凝固が行われた人眼網膜な らびに脈絡膜の組織所見. 眼紀 21: 764-775, 1970.
- 166) Kuwabara T, Gorn RA: Retinal damage by visible light. Arch Ophthalmol 79: 69-78, 1968.
- 167) Kuwabara T: Retinal recovery from exposure to light. Amer J Ophthalmol 70: 187-198, 1970.
- 168) Tso MOM: Photic maculopathy in rhesus monkey. A light and electron microscopic study. Invest Ophthalmol Vis Sci 12: 17–34, 1973.
- 169) Lincoff H, Kreissig I: The mechanism of the cryosurgical adhesin. 4. Electron microscopy. Amer J Ophthalmol 71: 647-689, 1971.
- 170)清宮輝夫:冷凍による脈絡膜変化に関する電子顕 微鏡研究.日眼 75:1331-1350,1971.
- 171)上野聡樹,塚原 勇:脈絡膜循環障害による網膜 色素上皮細胞の形態学的変化.第1報:早期崩壊 過程.日眼 80:572-584, 1976.
- 172) Ueno S, Ohkuma M, Tsukahara I: Ultrastructal observations of the retinal pigment epithelial cells following experimental occlusion of the posterior ciliary artery in the rhesus monkey. Early changes of the damaged retinal pigment epithelial cells. Jap J Ophthalmol 21: 297-310, 1977.
- 173) Ueno S, Tsukahara I: Ultrastructural observations of the retinal pigment epithelial cells following experimental occlusion of the posterior ciliary artery in the rhesus monkey. Exp Media Cong Ophthalmol 6: 642-645, 1978.
- 174) 上野聡樹, 原山憲治, 塚原 勇: 脈絡膜循環障害による網膜色素上皮細胞の形態学的変化.第2報, 中期変性過程, 日眼 81:728-742, 1977.
- 175) 上野聡樹,大田 実,大熊正人他:実験的脈絡膜循 環障害. 循環器科 2:449-463, 1977.
- 176) 上野聡樹,大田 実,塚原 勇: 脈絡膜循環障害による網膜色素上皮細胞の形態学的変化.第3報.後期萎縮過程.日眼 81:1801-1813,1977.
- 177)上野聡樹,大田 実,塚原 勇:脈絡膜循環障害による網膜色素上皮細胞の形態学的変化.第4報.蛍光眼底造影所見と形態学的変化の比較.日眼 83:

56-71, 1979.

- 178) Kuwabara T, Weidman TA: Development of the prenatal rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 13: 725, 1974.
- 179) Fine BS: Limiting membranes of sensory retina and pigment epithelium. Arch Ophthalmol 66: 847, 1961. 3.
- 180) Garron LK: The ultrastructure of the retinal pigment epithelium with observations on the choriocapillaris and Bruch's membrane. Trans Amer Ophthalmol Soc 61: 545, 1963.
- 181) Moyer FH: Development, structure and function of the retinal pigment epithelium, The Retina, University of California, Los Angels, 1 -30, 1969.
- 182) Mund ML, Rodrigues MM, Fine BS: Light and electron microscopic observations on the pigmented layers of the developing human eye. Amer J Ophthalmol 73: 167–182, 1972.
- 183) Greiner JV: Histogenesis of the cat retina. Exp Eye Res 30: 439, 1980.
- 184) Greiner JV, Weidman TA: Histogenesis of the ferret retina. Exp Eye Res 33: 315, 1981.
- 185) Chan RD, Chan MB: Heritability of cellular differentiation: Clonal growth and expression differentiation in retinal pigment cells in vivo. Proc Nat Acad Sci USA 55: 106-144, 1966.
- 186) Eguchi G, Okada TS: Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured in vitro: A demonstration of a switch of cell types in clonal cell culture. Proc Nat Acad Sci USA 70: 1495–1499, 1973.
- 187) Newsome DA, Fletcher RT, Robinson WG Jr, et al: Effects of cyclic AMP and Sephadex fractions of which embryo extract on cloned retinal pigment epithelium in tissue culture. J Cell Biol 61: 369-382, 1974.
- 188) Chader GJ, Newsome DA, Bensinger RE, et al: Studies on the differentiation of retinal pigment epithelial cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 14: 108-113, 1975.
- 189) Crawford BJ: The structure of development of the pigmented retinal clone. Can J Zool 53: 560-570, 1975.
- 190) Redfern N, Israel P, Bergsma D, et al: Neural retinal and pigment epithelial cells in culture. Patterns of differentiation and effects of prostaglandins and cyclic AMP on pigmentation. Exp Eye Res 22: 559-568, 1976.
- 191)林 倫子:網膜色素上皮細胞の組織培養に関する 研究一正常ニワトリ胚網膜色素上皮の培養細胞に ついて一.日眼 81:692-700,1977.

- 192) Hayashi M, Asayama K, Ueno S: Tissue culture of the retinal pigment epithelial cells. Acta Ophthalmologica 56: 83-94, 1978.
- 193) Crawford B: Cloned pigmented retinal epithelium. The role of microfilaments in the differentiation of cell shape. J Cell Biol 81: 301 -315, 1979.
- 194) Goldman AI, O'Brien PJ, Masterson E, et al: A quantitative system for studying phagocytosis in pigment epithelium tissue culture. Exp Eye Res 28: 455-467, 1979.
- 195) Masterson E, Chader GJ: Pigment epithelial cells in culture. Metabolic pathways required for phagocytosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 20: 1-7, 1981.
- 196) Sharon N, Lis H: Lectins: Cell agglutination and sugar specific proteins. Science 177: 949 -959, 1972.
- 197) 大沢利昭,森 良一:レクチン.講談社,東京, 1976.
- 198) Roth J: Membrane internalization into the Golgi apparatus by concanavalin A induces compensatory membrane biogenesis and membrane exocytosis. Exp Pathol 14: 351-354, 1977.
- 199) Goldstein IJ, Hayes CE: The lectins. Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv Carbohydr Chem Biochem 35:127 -340, 1978.
- 200) 平野 寛:フェリチン標識法. 武内忠男, 小川和朗 編, 新酵素組織化学, p519-540, 朝倉書店, 東京, 1980.
- 201) 平野 寛:レクチンの組織細胞化学応用法.日本 組織細胞化学会編,組織細胞化学 1981, p17-39, 学際企画,東京, 1981.
- 202) Debray H, Decout D, Strecker G, et al: Specificity of twelve lectins toward oligosacchrides, and glycopeptides related to Nglycosylproteins. Eur J Biochem 117: 41-55, 1981.
- 203) 平野 寛:レクチンの組織細胞化学応用.日本組 織細胞化学会編,組織細胞化学 1983, p113-132, 学際企画,東京, 1983.
- 204)勝山 努:標識レクチン.日本組織細胞化学会編. 組織細胞化学1986, p209-222, 学際企画,東京, 1986.
- 205) Yokoyama M, Nishiyama F, Kawai N, et al: The staining of Golgi membranes with ricinus communis aggulutinin-horse raddish peroxidase conjugate in mice tissue cells. Exp Cell Res 125: 47-53, 1980.
- 206) Hirano H, Parkhouse B, Nicolson GL, et al:

Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a myeloma-cell homogenates: its implications for membrane biogenesis. Proc Nat. I Acad USA 69: 2945 -2949, 1972.

- 207) Takata K, Hirano H: Changes in soybean aggulutin (SB) and peanut aggutin (PNA) binding pattern in the epidermis of the developing chick embryo. Develop Growth Differ 25: 301 -305, 1983.
- 208) Nishiyama F, Hirano H: Changes in lectinbinding sites on the thyroid follicle cell surface shown by the ferritin-labeling technique. Cell Struct Funct 5: 335—346, 1980.
- 209) Yokoyama M, Nishiyama F, Irimura T, et al: Sugar residues on the cell surface of the dissociated mouse kidney tubule cells by means of ferritin-labeled lectins. Acta Histochem Cytochem 10: 42-50, 1977.
- 210) Yokoyama M: An electron microscopic study on the lectin binding sites and their mobility in human and rat urologic tumor cells. Acta Histochem Cytochem 13: 139–153, 1980.
- 211) Yokoyama M, Nishiyama F, Suzuki T, et al: Distribution and mobility of lectin binding sites on the luminal surfaces of rat urinary bladder and their alterrations during BBN carcinogenesis. Eur J Cell Biol 22: 530, 1980.
- 212) Takata K, Nishiyama F, Hirano H: Double labelling study of anionic sites and concanavalin A binding sites in monkey macrophages. J Histochem Cytochem 29: 858—863, 1981.
- 213) 平野 寛,西山文朗:甲状線小胞上皮細胞膜の極 性.2)細胞表面の陰性荷電ーカチオン化フェリチン結合様式。医学のあゆみ 117:1981.
- 214) Simionesucu N, Simionesucu M, Palade GE: Differential microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. 1. Preferential distribution of anionic sites. J Cell Biol 90: 605-613, 1981.
- 215) Kawagoe K, Kawana T, Sakamoto S: Ultrastructural demonstration of negative surface charge of human trophoblast. Acta Histochem Cytochem 13: 254-269, 1980.
- 216) Kanwar YS, Farquhar MG: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1303–1307, 1979.
- 217) Hirano H, Nishiyama F, Furuya K, et al: Cationized ferritin on the cytoplasmic surface of the axolemma and its effect on the mem-

brane excitation. Proc Jap Acad 59: 140-143, 1983.

- 218) Wachstein M, Meisel E: Histochemistry of hepatic phosphatases at physiologic pH, with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Amer J Clin Path 27: 13-23, 1957.
- 219) Ogawa K, Mayahara H: Intramitochondria localization of adenosine triphosphatase activity. J Histochem Cytochem 17: 487-490, 1969.
- 220) 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.
- 221) Hori Y, Yu H, Miyamoto M, et al: Melanogenesis of retinal pigment epithelium of chick embryo. J Electron Microsc 30: 8-21, 1981.
- 222) Mund M, Rodrigues MM: Embryology of the human retinal pigment epithelium. in The Retinal Pigment Epithelium, Zinn K, Marmor MF, ed, p45–52, Harverd Univ, Press, Cambridge, 1979.
- 223) Breathnach AS, Wyllie LM: Ultrastructure of retinal pigment epithelium the human fetus. J Ultrastruct Res 16: 584-597, 1966.
- 224) Keefe JR, Ordy JM, Samorajski T: Prenatal development of the retina in a jural primate (Macaca mulatta). Anat Rec 154: 759-783, 1966.
- 225) Fujimoto T, Ogawa K: Cell surface alteration in dissociated frog urinary bladder epithelial cells. J Electron Micros 31: 171, 1982.
- 226) Fujimoto T, Ogawa K: Cell membrane polarity in dissociated frog urinary bladder epithelial cells. J Histochem Cytochem 30:131–138, 1983.
- 227) Fujimoto T: Cell membrane of dissociated

epithelial cells. Proc Jap Soc Dermatol 7:3-4, 1982.

- 228) Fujimoto T, Ogawa K: Energy-dependent transformation of mouse gall bladder epithelial cells in a Ca-depleted medium. J Ultrastruct Res 79: 327-340, 1982.
- 229) Gloor BP: Phagocytotsche Aktivitat des Pigmentepithels nach Lichtkoagulation. Zur Frage der Herkunft von Makrophagen in der Retina. Albrecht v Graefes Arch Ophthalmol 179: 105 -120, 1969.
- 230) 菊地 糺: 脈絡膜血行障害と網膜 Acid phosphatase 活性. 2. 修復過程における macrophage の由来. 日眼 80:518-530, 1976.
- 231) Kikuchi T, Mizuno K: Phagocytic activity in the ischemic retinal pigment epithelial cells. An electronmicroscopic histochemical study of acid phosphatase. v Graefe's Arch Exp Ophthalmol 207: 83–90, 1978.
- 232) 松葉賢一: 超低温における網脈絡膜の組織学的研究. 日眼 78:664-680, 1974.
- 233) Israel P, Masterson E, Goldman AI, et al: Retinal pigment epithelial cell differentiation in vitro. Influence of culture medium. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 720-727, 1980.

終わりに 文献

- 233) Nakano T, Koike H, Fujimoto T, et al: Color fluoresceince electron microscopy and cathodoluminesceince spectra analysis. J Histochem Cytochem 36: 915, 1988.
- 234) Tanaka T, Sakai M, Ueno S, et al: Electron microscopic observation of lens gap junctions and vitrous body by using cryo-transfer system. Proc VIth Asia-Pacific Conference and Workshop on Electron Microscopy, p537-538, 198.