ムチンの浄化作用 (図11)

庄司 純*・崎元 卓* (*日本大学医学部眼科学教室) 北野 周作*・石井 康雄** (**新川橋病院

Trapping Role of Mucin

Jun Shoji, Takashi Sakimoto, Shusaku Kitano* and **Yasuo Ishii

*Dept. of Ophthalmol., School of Med., Nihon Univ. **Shinkawabashi Hospital

要 約

ocular surface の備えている防御機構の中でも、特にムチンに注目し、その物理的な防御機能について、形態学的に検討した。白色家兎に200ppm 次亜塩素酸を点眼し、ocular surface に均等な障害を与えた後、10° CFU/ml 緑膿菌浮遊液0.07ml を点眼した。点眼後10分、30分、60分、及び16時間経過したところで、験結膜を含めて眼球摘出し、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡及び透過型電子顕微鏡にて観察した。点眼後10分では、接種された緑膿菌は、角結膜の表面に散在して認められたが、点眼後30分になると緑膿菌は殆ど塊状、膜状ムチンにからみ取られた形で円蓋部に認められた。また、円蓋部に存在するムチンの中には、障害され脱落した上皮や緑膿菌を貪食した多核白血球も認められ、ocular surface の障害あるいは感染に際し、特に初期では、ムチンが、表面の浄化を行っており、物理的な防御機能として働いていると考えられた。(日眼 92:2038—2047、1988)

キーワード:ムチン,浄化作用,防御機能, 段結膜, 緑膿菌

Abstract

Experimental histological studies the ocular surface were carried out with special reference to the defense mechanism of surface mucin. Diffuse and mild damage to the superficial layer of the conjunctival epithelium of rabbits was induced with instillation of 200ppm hydrochloride (HOCL). After ten minutes of HOCL application, Pseudomonas aeruginosa (0.07ml, 10°CFU/ml) was inoculated into the conjunctival sac. Both cornea and palpebral conjunctiva were excised for light microscopy and scanning or transmission electronmicroscopy at 10, 30, 60 minutes and 16 hours postinoculation. Pseudomonas aeruginosa which were observed at ten minutes after application were gradually trapped with mucin threads and gathered mostly into the conjunctival within thirty minutes. In the membranes or lumps of mucin threads, not only the damaged epithelial cells but polymorphonuclear leukocytes were also detected. These trapping processes with mucin threads were considered to play an important role in the defense mechanism on the ocular surface as a physical celansing role against initial infection of ocular tissues. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 2038—2047, 1988)

Key words: Mucin, Trapping role, Defense mechanism, Palpebral conjunctiva, Pseudomonas aeruginosa

別刷請求先:173 東京都板橋区大谷口上町30-1 日本大学医学部眼科学教室 庄司 純

(昭和63年7月12日受付,昭和63年9月7日受理)

Reprint requests to: Jun Shoji, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Nihon Univ.

30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received July 12, 1988 and accepted September 7, 1988)

I 緒 言

角結膜の表面,ocular surface は,様々な外部環境にさらされながらも,ocular surface を被っている涙液層の中に存在する抗体,補体,リゾチーム,ラクトフェリンなどの生物学的な防御因子によって保護されている 11 . さらに,異物あるいは細菌の侵入に対して,特に初期においては,ocular surface に存在するムチンの物理的な浄化作用も重要な防御反応の一つとなっている 21 .

goblet 細胞から分泌されたムチンは、種々の形態を とりながら ocular surface を移動し、表面の浄化に作 用していると考えられる。今回、ocular surface の中 でも特に瞬目運動を通して浄化作用に最も関係が深い と考えられる験結膜表層のムチンに注目し、その浄化 作用さらには非特異的な感染防御に果たす役割につい て白色家兎を用いて実験し、形態学的に検討したので 報告する。

II 実験材料および実験方法

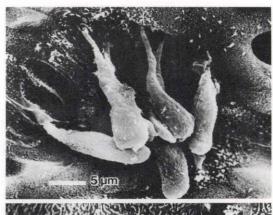
- 1. 実験材料:実験動物には、体重 $2.0\sim2.5$ kg の白色家兎を用いた。角結膜の表面を均等に障害するために、200ppm 次亜塩素酸を点眼液として用いた。細菌は日本大学医学部徴生物学教室に保存されている緑膿菌(IID1117、elastase (+)、protease (+))を用い、緑膿菌は、trypticase soy broth にて37%、20時間培養し、10%CFU/ml の菌浮遊液として用いた。
- 2. 実験方法:実験は、次亜塩素酸によって ocular surface を障害した後に緑膿菌を接種した群 (A 群)、正常眼に緑膿菌を接種した群(B 群)、次亜塩素酸の点眼のみを行った群 (C 群)の3群に分けて行った。

A群は、以下の方法を用いて試料を作製した。白色家兎をペントバルビタールにて静脈麻酔した。次に、200ppm 次亜塩素酸を ocular surface 全体に十分作用するように0.2ml 点眼した後,10分間放置し、生理食塩水にて十分に洗眼した。洗眼直後に、緑膿菌浮遊液0.07ml を点眼した。緑膿菌点眼後10分、30分、60分、及び16時間(A群10分、A群30分、A群60分、A群16時間)経過したところで更に過剰のベントバルビタールを追加し屠殺した。死後、涙液層をなるべく保存するために、2.5%グルタールアルデヒド液(0.15Mカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.2))を点眼し、固定した後、 験結膜を含めて眼球摘出した。摘出した試料を、 験結膜一角膜の小片に分けた後、更に

2.5%グルタールアルデシド液 (0.15M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2)) にて再固定した。試料の一部をアルコール系列にて脱水し,臨界点乾燥,金蒸着を行って,走査型電子顕微鏡にて観察した。残りの試料は,オスミウム酸にて後固定した後,アルコール系列にて脱水,エボンにて包埋し,光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。光学顕微鏡用切片は,トルイジンブルー染色にて,透過型電子顕微鏡用切片は,ウラニールアセテートおよびクエン酸鉛の二重染色にて観察した。

B群は,正常な家兎眼に緑膿菌浮遊液0.07ml を点眼し,点眼後10分,30分(B群10分,B群30分)後にA群と同様の方法で試料を作製したものを観察した.

C群は、家兎眼に200ppm次亜塩素酸0.2ml点眼した後、10分間放置し、生理食塩水にて洗眼し、無処置のまま更に10分、30分、60分、16時間放置し(C群10分、C群30分、C群60分、C群16時間)、A群と同様の方法で試料を作製したものを観察した。



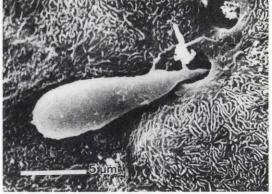


図1 C 群30分 除結膜. goblet 細胞から塊状のムチン が噴出しており, goblet 細胞の開口部は直径1~2 μm である.

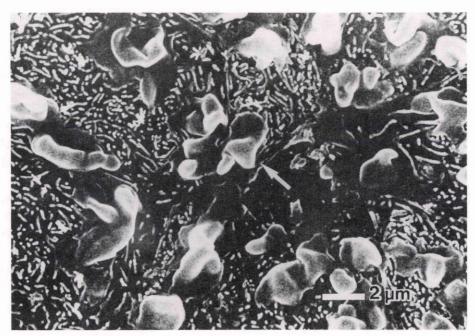


図2 C 群60分験結膜, 験結膜を被っているムチンは増加し, 花弁状を呈して結膜上皮に付着している (矢印).

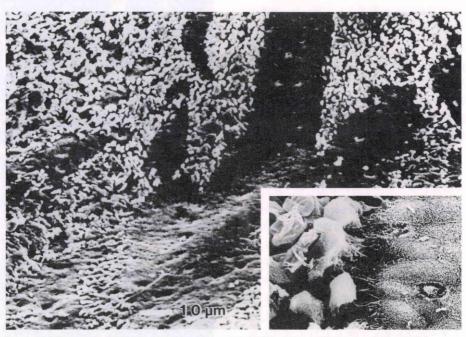


図3 A 群10分験結膜、次亜塩素酸による障害が強く表れた部分では、表層の結膜上皮が変性し、脱落直前の状態を呈しているが、障害が軽い部分では、microvilli の変化のみにとどまっており、それらは、豹紋状を呈していた。障害が強く表れた部分と軽い部分との境界は比較的明瞭である(写真右下)。

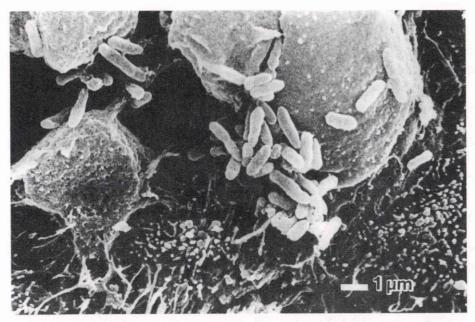


図4 A 群10分験結膜、障害を強く受けた結膜上皮は microvilli を消失し、円形に収縮、変性し、そこに接種された緑膿菌が多数、塊状となってムチン糸とともに付着している。

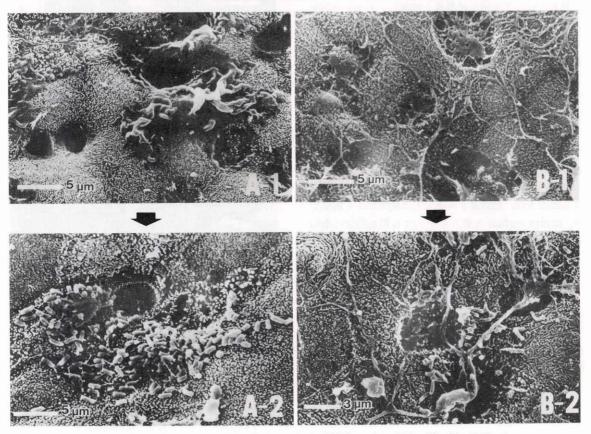


図5 C 群10分 (A-1, B-1) A 群10分 (A-2, B-2) 瞼結膜。goblet 細胞の開口部の周囲には 膜状または、クモの巣状を呈したムチンが付着している。接種した緑膿菌は、膜状、クモ の巣状のムチンの中にからみ取られている。

III 結 果

C群の試料を用いて200ppm次亜塩素酸によって障 害された険結膜の状態を観察した。C群10分の瞼結膜 上皮では、次亜塩素酸の上皮に対する障害が強く、最 表層の上皮が脱落したり, 脱落直前の状態を呈する部 位と、障害が軽く、microvilli の変化程度にとどまる部 位とが豹紋状に存在し、その境界は比較的明瞭であっ た. またムチンは、正常の結膜よりも明らかに分泌が 増加しており、糸状、膜状の形態をとって上皮表面を 被うように存在していた(図5). C群10分およびC群 30分では、goblet 細胞の開口部から塊状をしたムチン が噴出していたが、その開口部は直径1~2µm を呈し ていた (図1)。また、その周囲には、成熟型をした goblet 細胞の開口部も多数認められた。C群60分にな ると、C群10分で見られたような変性した上皮は認め られず, ocular surface を被っているムチンが花弁状 の塊りとなって存在している部位が認められた (図 2).

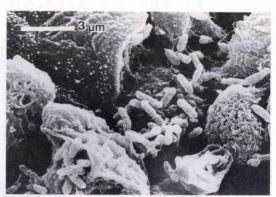
B群では、正常眼に緑膿菌を接種し、ムチンと緑膿菌の関係を観察した。B群10分では、瞼結膜の至るところで、極めて細いムチンにからまった緑膿菌の集団が認められた。B群30分では、ocular surface に緑膿菌は認められなかった。

A 群10分の試料では、やはり次亜塩素酸によって 結膜の上皮は豹紋状に障害を受けていた(図 3)。次亜 塩素酸による障害が強く表れた上皮は microvilli を消 失し、円形に収縮、変性し、脱落直前となり、そこに 接種された緑膿菌が多数、ムチン糸と共に付着してい た(図 4)。また、障害が microvilli の変化程度にとど まる部位では、緑膿菌とムチンとの関係がよく観察で き、ocular surface を被うムチンは A 群と同様に増加 して、糸状、膜状の形態をとっていた。緑膿菌は、ほ とんどが糸状、膜状をしたムチンにからみ取られている状態が認められた(図 5)。

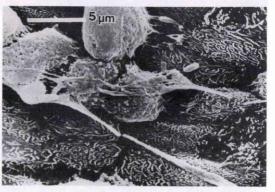
A 群30分の試料において、険縁近傍の険結膜では、A 群10分とくらべて結膜上皮に付着している緑膿菌は極めて少なくなり、変性した表層の上皮も激減して次の層の上皮が露出していた(図 6)。更に険縁側から円蓋部に向かって観察を進めていくと、ムチンとからまって紐状に集族した緑膿菌や、膜状に付着しているムチンの中に多数の緑膿菌がからみ取られていた。円蓋部近傍の険結膜では、緑膿菌や脱落した上皮を含んだムチンが大きな塊りとなって付着していた(図 7)。

A 群30分の角膜および球結膜の表面には、緑膿菌は認められず、これらの上皮細胞の中にも緑膿菌は認められなかった。A 群60分では、もはや ocular surface に菌は認められなかったが、その表面では、A 群60分および16時間においてもムチンの増加は続いており、ムチンにからまった多核白血球もみとめられた(図8).

A群10分から30分の試料において、円蓋部の険結膜を中心に、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。円蓋部の結膜上には走査型電子顕微鏡で観察した時と同様に、大きなムチンの塊りが付着していた。円蓋部に存在しているムチン塊は、いくつかの mucin thread によって結膜上皮の microvilli や goblet 細胞と連絡していた(図9). また、ムチン塊の中には、脱落した上皮、多核白血球、および緑膿菌が多数含まれていた(図10). ムチン塊の中に認められた多核白血球はすでに緑膿菌の貪食をしていたり、ムチンにからまった緑膿菌を貪食しようとしている所見が認められ



10min



30min

図6 A 群10分(上段)30分(下段) 験結膜、緑膿菌 点眼後30分になると接種した緑膿菌も変性した上皮 も激減し下層の上皮が露出してきている。

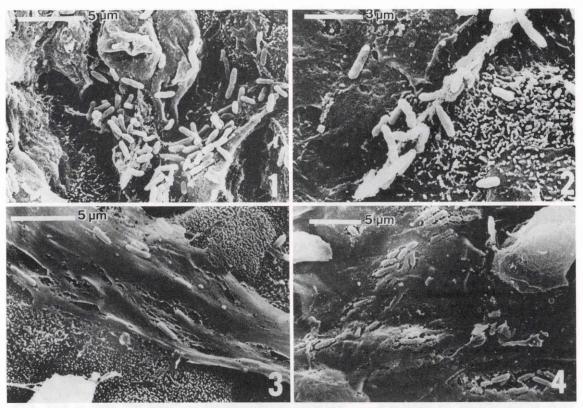


図7 A 群10分から30分験結膜から円蓋部。緑膿菌を接種すると、初期には、険結膜の表面に散在しているが(1)、次第に、ムチンにからみ取され(2)、円蓋部に集積していく過程を示している(3、4)。

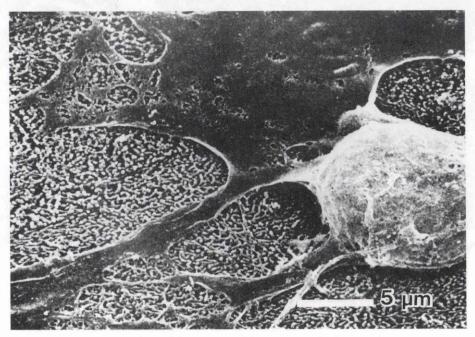


図8 A 群60分眸結膜、結膜表面には、緑膿菌は認められず、膜状に付着したムチンと多核白血球が認められる。

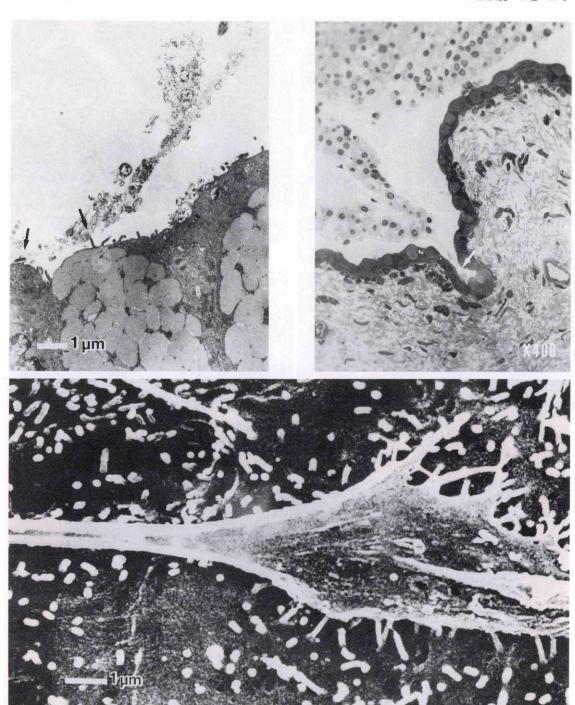


図9 A 群10分から30分円蓋部(上段:光学顕微鏡(右),透過型電子顕微鏡(左),下段:走査型電子顕微鏡)。大きなムチン塊は,mucous thread によって結膜上皮のmicrovilli や goblet 細胞と連絡している(矢印)。下段はこの所見に相当する走査電子顕微鏡像(光顕:トルイジンブルー染色,×400)。

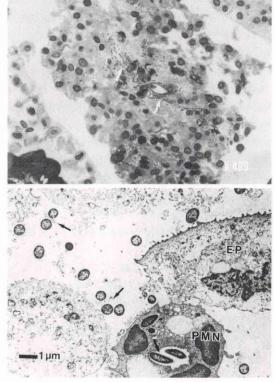


図10 A 群30分円蓋部(上段:光学顕微鏡,下段:透 過型電子顕微鏡).大きなムチン塊の中に緑膿菌(矢 印),変性した上皮細胞(EP)および多核白血球 (PMN)を認めた(光顕:トルイジンブルー染色,× 400).

た (図11).

IV 考 按

従来,ocular surface の防御には涙液層中の種々の物質が関与していることが知られていたが $^{1/4}$)、ムチンも例外ではなく,物理的ならびに生物学的な防御機能という面で重要な働きをしていると言われている $^{2/3/5}$ 〕. 今回我々は, 200pm 次亜塩素酸を用いてocular surface を均等に障害し 7)、障害時のムチンが細菌の侵入時にはたしてどのような働きをしているのかということを,正常眼の場合と比較しながら白色家兎を用いた実験において形態学的に検討した.

今回の実験では、試料の固定にグルタールアルデヒド液を使用した。グルタールアルデヒドのみを使用した固定法では涙液層中のムチンは固定されないと報告されている⁶. しかし、涙液層中のムチンまで固定してしまうと走査型電子顕微鏡による観察が困難になるこ

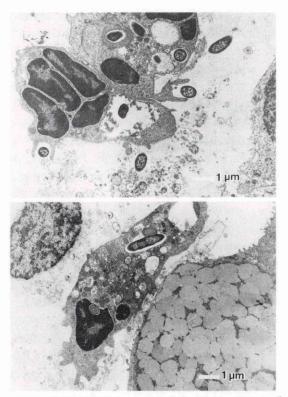


図11 A 群30分円蓋部. ムチンの中に遊走してきた多核白血球内には, 貪食された緑膿菌が多数存在し, 一部の緑膿菌はまさに貪食されようとしている.

と、基礎実験より mucin thread やムチン塊はグルタールアルデヒドのみ使用した固定法でも十分観察できたためこの固定法を使用し、走査型電子顕微鏡と光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて比較検討した。

吉村ら n は、200ppm 次亜塩素酸を用いて結膜に障害を与えると、goblet 細胞からの内容の放出が起こると報告している。今回の実験においても goblet 細胞は、さかんにムチンを放出している所見が認められ、その分泌孔は直径 $1\sim2\mu$ m であった(図 1)。Greiner ら $^{10)110}$ は、結膜表面にみられる crypt について、直径 $1\sim2\mu$ m の small crypt は、分泌終了後の goblet 細胞の開口部であると報告しており、図 1 でみられた所見は goblet 細胞が一度に内容を放出し、その開口部が分泌後の状態を呈しているものと考えられた。また、結膜表面に存在するムチンは、糸状だったものが、時間の経過とともに花弁状となっていた(図 2)。このように、ocular surface に障害を与えるとムチン分泌が増加し、結膜の表面は、正常時に比し過剰のムチンで被われているのではないかと推察された100

次亜塩素酸によって障害を与えた家兎眼に緑膿菌浮 遊液を点眼すると(A群),点眼後10分経過した時点で は、菌は、まだ ocular surface の表面に散在していた が、時間が経過するにつれて200ppm次亜塩素酸に よって変性した上皮や多核白血球とともにムチンにか らみ取られていく所見が認められた. 緑膿菌や変性し た上皮をからみ取った個々の小さなムチン塊や mucin thread は、互いに癒合しながら帯状のシートと なって円蓋部に向かって流れて行き、円蓋部では、緑 膿菌、変性した上皮および多核白血球などを含んだム チンが、大きな塊りとなって認められた(図5,7). これらの所見は、ムチンの動きによって結膜表面の緑 膿菌や変性した上皮を捕らえ, 円蓋部に集積させる表 面の浄化作用を表しており、円蓋部に見られたムチン 塊は、眼脂として排泄される前段階のものと考えられ た. Adams¹⁴⁾, 北野²⁾は, インディアンインクを用いて 結膜表面のムチンの状態を形態学的に観察している. 今回の実験では、ムチンが緑膿菌を捕える様子が観察 できたが、そのムチンの形態は、Adams、北野が報告 しているムチンの形態と酷似しており、緑膿菌も単な る異物と同様に処理され、円蓋部に集められてから眼 外に排泄されていると考えられた。また、緑膿菌を角 膜に接種すると、30分後には角膜内に侵入すると言わ れているが12)13), 今回の実験では、緑膿菌浮遊液点眼後 10分では ocular surface の表面に散在していた緑膿 菌が点眼後30分では激減し、特に球結膜や角膜にはほ とんど認められず, 角膜および結膜の上皮細胞中にも 緑膿菌は認められなかった. したがって、緑膿菌は、 ほとんどムチンによってからみ取られ、眼外に排泄さ れたと考えられ、しかも、ムチンの turn over は、か なり速い時間で行われており、細菌感染に対する物理 的な防御機能という面でムチンは有効に働いているも のと考えられた.

正常眼に緑膿菌浮遊液を点眼した群(B群)と次亜塩素酸で障害した眼に緑膿菌浮遊液を点眼した群(A群)とを比較してみると、B群30分では ocular surface に緑膿菌は認められなかったが、A群30分では緑膿菌は、円蓋部においてムチンにからみ取られている状態で認められた。ocular surface に障害を与えると、goblet 細胞からのムチン分泌が増加し、異物あるいは細菌の侵入にたいして有効な防御機能を発揮する反面、異物あるいは細菌が眼内に停滞する時間も増加しているのではないかと考えられた。しかし、円蓋部に存在するムチンは眼脂として排泄される直前のものであり、

そのムチン塊の中には緑膿菌を貪食している多核白血球が認められ、異物あるいは細菌が ocular surface に侵入してからムチンによってからみ取られ排泄されるまでの間には、いろいろな防御因子が作用しあっているのではないかと推察された。

ocular surface が障害された時や、コンタクトレンズ装用時および異物飛入時などには眼脂が増加することは臨床的にも認められている。これらの眼脂およびムチンの増加は ocular surface に厚いムチンの膜を形成し、細菌の adherence を防ぐだけでなく、表面の浄化をも行い、物理的な防御に役立っていると考えられた。また、増加したムチンの中では、遊走してきた多核白血球やマクロファージが貪食を行っているなど、その他の生体防御因子が巧みに作用しているのではないかと推察された。

文 献

- Lemp MA, Blackman HJ: Ocular surface defence mechanism. Ann Ophthalmol 13: 61 -63, 1981.
- 2) **北野周作**: Ocular surface―その生理と病態―. 日眼会誌 91:1―26,1987.
- 3) 北野周作: Ocular surface の防御反応. あたらしい眼科 4:149-157, 1987.
- Bron AJ, Seal DV: The defences of the ocular surface. Trans Ophthalmol Soc UK 105: 18
 —25, 1986.
- 5) **中谷林太郎**: 粘膜の感染防御機構,病態生理 2: 560-566, 1983.
- 6) Nichlos BA, Chiappino ML, Dawson CR: Demonstratin of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 464—473, 1985.
- 7) 吉村 久,吉沢 徹,崎元 卓他:塩素における角 結膜障害―走査電子顕微鏡的観察.第1報.次悪塩 素酸,三塩化窒素を用いた障害実験における角結 膜表層の病態. 眼紀 37:975-984,1986.
- Pfister RR: The normal surface of conjunctiva epithelium: A scanning electron microscopic study. Invest Ophthalmol 14: 267—279, 1975.
- Greiner JV, Korb DR, et al: Human ocular mucus: Scanning electron microscopic study. Arch Ophthalmol 100: 1614—1617, 1982.
- 10) Greiner JV, Covington HI, Allansmith MR: Surface morphology of human upper tarsal conjunctiva. Am J Ophthalmol 83: 892—905, 1977.
- 11) Greiner JV, Henriquez AS, Covington HI, et al: Goblet cell of the human conjunctiva.

- Arch Ophthalmol 99: 2190-2197, 1981.
- 12) **Stern GA, Lubniewski A, Allen C:** The interaction between pseudomonas aeruginosa and the corneal epithelium. Arch Ophthalmol 103: 1221—1225, 1985.
- 13) Stern GA, Weitzenkorn D, Valenti J: Adherence of pseudomonas aerginosa to the mouse
- cornea: Epithelial stromal adherence. Arch Ophthalmol 100: 1956—1958, 1982.
- 14) Adams AD: The morphology of human conjunctival mucus. Arch Ophthalmol 97:730—734, 1970.