

脈絡膜メラニン細胞間の dye-coupling (図4)

船田みどり・広瀬 晶
氏家 和宣・所 敬 (東京医科歯科大学眼科学教室)

片山 芳文 (東京医科歯科大学難治疾患研究所自律生理学部門)

Dye Coupling Between the Choroidal Melanocytes

Midori Funata, Akira Hirose, Kazuyoshi Ujiie
and Takashi Tokoro

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Yoshifumi Katayama

*Department of Autonomic Physiology, Medical Research Institute,
Tokyo Medical and Dental University*

要 約

脈絡膜メラニン細胞の機能については、まだ明らかでない点が多いが、電子顕微鏡的には gap junction 様構造が観察されており、隣接細胞間で情報伝達が行なわれている可能性が示唆されている。多くの場合 gap junction においては、イオン、低分子物質、さらに各種色素の細胞間移動が報告されている。そこで本研究では、蛍光色素 (Lucifer Yellow) を用いて、脈絡膜メラニン細胞間の dye-coupling の有無を検討した。有色家兎の脈絡膜伸展標本を作製し、微小電極を用いて細胞内に色素を注入した。色素を注入した70例のうち蛍光像の撮影に成功した11例中4例において明らかに周辺細胞に色素が広がり dye-coupling が存在することが確認され、脈絡膜メラニン細胞間に機能的な gap junction が存在することが示唆された。(日眼 92: 251—254, 1988)

キーワード：脈絡膜メラニン細胞, gap junction, dye-coupling, Lucifer Yellow, 有色家兎

Abstract

Recently, gap junction-like structures have been found between melanocytes in the choroid by electron microscopy. The present study, therefore, was undertaken to determine whether or not there are substantial interactions between/among the choroidal melanocytes. A fluorescent dye, Lucifer yellow, was ionophoretically injected into the individual melanocytes of the choroid isolated from pigmented rabbits. In 4 cases, multiple cell staining was obtained after single cell injection of the dye. Thus the present experiments demonstrated that there is dye-coupling between the melanocytes. It can be speculated that the dye-coupling is probably brought about by the gap junction-like structure. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 92: 251—254, 1988)

Key words: choroidal melanocyte, gap junction, dye-coupling, Lucifer Yellow, rabbit

別刷請求先：113 東京都文京区湯島 1—5—45 東京医科歯科大学医学部眼科学教室 船田みどり
(昭和62年 8月31日受付)

Reprint requests to: Midori Funata, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tokyo Med. and Dental Univ. School of Med.
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Accepted August 31, 1987)

I 緒 言

脈絡膜の血管周囲組織には、線維芽細胞とともに多くのメラニン細胞が存在する。メラニン細胞の機能としては、瞳孔以外から入って来る光をさえぎる暗箱様の役割の他は明らかでない¹⁾。脈絡膜メラニン細胞は神経走行と接して網目状構造を形成しながら三次元的に広がっていることから、遮光の他にも重要な機能を果たすのではないかと以前から指摘されている²⁾。近年、松坂は隣接する脈絡膜メラニン細胞間に細胞結合(gap junction)様構造があることを電子顕微鏡的に凍結切断レプリカ法を用いて示し³⁾、メラニン細胞の緊張により脈絡膜循環が調節されているのではないかと推論している⁴⁾。

ところで、gap junctionでは多くの場合、イオン、低分子物質、さらに各種色素の細胞間移動が報告され、gap junctionが認められる細胞間では情報伝達が行なわれていると考えられている⁵⁾。低分子量(MW. 457.2)の蛍光色素である、Lucifer Yellow CHを、微小電極を用いて細胞内に注入するとgap junctionを通して隣接細胞に移動し、dye-couplingと呼ばれる状態を示す⁶⁾。この色素を用いて、カメ網膜水平細胞⁷⁾、ラット⁸⁾と、モルモット⁹⁾の海馬の錐体細胞、コイ¹⁰⁾と、カエル¹¹⁾の脊髄運動ニューロン、ラット膀胱ランゲルハンス島細胞¹²⁾等で、dye-couplingが証明された。

脈絡膜においては、メラニン細胞間に形態的にgap junction様構造が観察されているものの、物質移動あるいは、電気的結合は明らかにされていない。本研究では、Lucifer Yellowを用いて脈絡膜メラニン細胞間で実際に色素が移動することを証明し、メラニン細胞間にgap junctionが存在する可能性を明らかにした。

II 実験方法

本研究には、生後3ヵ月から1年の有色家兎ダッチ種を用いた。ネブタール(耳静脈内注射、0.5mg/kg)麻酔下に両眼球を摘出し、95%O₂ 5%CO₂の混合ガスで飽和したKrebs液に浸した。眼球を赤道部で半割し、後半球をさらに5mm角に細切しシャーレに移し、実体顕微鏡下でスパーテルで強膜及び色素上皮を含む網膜を脈絡膜より鈍的に剝離した。得られた脈絡膜片を伸展し、直径20 μ mのピンを用いて標本灌流槽のレジ床に固定し、さらに眼科顕微鏡手術用のスプリング剪刀でメラニン細胞が一層のシート状になるように可能な限り剝離し標本とした。この標本をニコン倒立

型落射蛍光顕微鏡の架台に設置し、36 $^{\circ}$ ~37 $^{\circ}$ Cに加熱した混合ガス飽和Krebs液で灌流しながらメラニン細胞にガラス微小電極を刺入した。本実験で使用したKrebs液は次の組成を持つ(mM): NaCl, 117; KCl, 4.7; CaCl₂, 1.2; Mg Cl₂, 1.2; NaHPO₄, 1.2; NaHCO₃, 2.5; グルコース, 11.5。

微小電極は外径1mm内径0.58mmのフィラメント入りのガラス管(Hilgenberg GmbH)より作製し、その中に0.5M KCl溶液に溶かした0.5%Lucifer Yellow CH (Polyscience Inc.)を詰めた¹³⁾。この時の電極抵抗は100~150M Ω であった。メラニン細胞に刺入したLucifer Yellow充填電極を通じて負荷流パルス(0.5nA, 500msec, 1Hz)を、少なくとも3分間通電した。通電後、Lucifer Yellowの分布を落射蛍光顕微鏡で観察し写真撮影した(Kodak ASA 400)。さらに、標本を1%グルタルアルデヒド3%ホルムアルデヒド溶液で30分間固定し、標本灌流槽からはずしてスライドガラスに移し、無蛍光グリセリン封入後、ニコン正立型落射蛍光顕微鏡で精査し写真撮影した。

III 結 果

メラニン細胞に電極を刺入すると-40mV~-60mVの電位が得られ、電極を抜去すると消失した。この電位はメラニン細胞の膜電位と考えられ、Lucifer Yellow注入中も通常変化せず、この電位が保持されない場合は、Lucifer Yellow細胞内染色の成功率が低下する傾向があった。

今回Lucifer Yellowを細胞内に注入した70例のうち写真撮影により精査できたのは11例であった。そのうち7例では刺入細胞のみに蛍光色素がとどまり、4例では刺入細胞以外にも色素が確認された。即ち、2例においては隣接する2細胞に、他の2例では多数の細胞に色素の広がりが認められた。

図1は、単一細胞のみに色素がとどまった例の蛍光像を示す。蛍光色素を詰めた電極の先端に明るい核の部分と、やや蛍光の弱い胞体を認めることができる。図2は、同一部位を通常の光源で撮影した像で、周囲より色素顆粒の濃い同型のメラニン細胞を同定することができた(図2の矢印は細胞を、三角は核をそれぞれ示す)。同標本を固定封入することにより、より詳細に観察することができた(図3)。核の部分は明るい均一な蛍光を発生し、胞体は細胞膜の明瞭な輪廓内に顆粒状及び繊細な細網状の蛍光が認められた。胞体の蛍光が核の部分に比し弱いのは、メラニン顆粒により蛍光



図1 電極刺入中の脈絡膜メラニン細胞の蛍光像×100



図2 図1の細胞の通常光源撮影像×100. 矢印は細胞を示し、三角は核を示す。



図3 図1の細胞の固定封入後の蛍光像×200



図4 dye-coupling が認められた脈絡膜メラニン細胞群の固定封入後の蛍光像×200

がさげられることが一因であると考えられた。

蛍光色素を注入した細胞に隣接する細胞に蛍光色素が広がった例を図4に示す。隣接細胞への色素の移動は早いものでは30秒から1分で認められ、さらに周辺の細胞への広がりも2~3分で観察できた。図4に示す例では、色素を注入した胞体の輪廓が明瞭な細胞と、その周囲に強く蛍光を発する核と弱い蛍光の胞体を有する細胞が10~12個観察された。注入細胞に近い胞体ほど明るく、周辺になるに従い蛍光は薄くなっていた。

IV 考 按

今回脈絡膜メラニン細胞間に明らかなdye-couplingが存在することがLucifer Yellow細胞内注入法によって示された。dye-couplingは、gap junctionの証拠として度々利用されるもので、三次元的に広がる脈絡膜メラニン細胞においても隣接細胞間にgap junctionが存在することが強く示唆されている。

gap junctionは細胞間の機能的結合の一型式と考えられ、狭義には電気シナプスとしての連結を指し、形態的には特異な顆粒の集合した円板状の構造を示し、細胞間の物質移動も可能であるとされている⁵⁾。さらに、gap junctionは神経細胞や平滑筋では電気シナプスあるいはネクサスとして隣接細胞間の情報伝達に関与することが明らかにされている。また、線維芽細胞及び上皮細胞など非興奮性の細胞間にも形態的にgap junctionと同一の構造が示されているが、その機能については明らかでない。

今回の実験では脈絡膜メラニン細胞間における蛍光色素の移動、即ちdye-couplingからgap junctionの可能性を推定することができる。しかし脈絡膜メラニン細胞間にgap junctionが存在するにしても、現時点ではその機能的意義を具体的に挙げることは不可能である。したがって隣接細胞にそれぞれ電極を刺入し、

メラニン細胞における電気的結合の有無を検討することは今後の重要な研究課題である。最近、メラノーマ培養細胞が約 -50mV の静止電位を示し、ナトリウム依存性の活動電位を発生すると報告された¹⁴⁾。本研究における脈絡膜メラニン細胞では、膜幅位は $-40\text{mV}-60\text{mV}$ で、ほぼ一致すると思われるが、活動電位を発生させることはできなかった。したがって、脈絡膜メラニン細胞とメラノーマ培養細胞の電気生理学的特性が異なる可能性が考えられる。そこで、脈絡膜メラニン細胞の電気生理学的特性を明らかにすることがまず要求される。いずれにしても、脈絡膜メラニン細胞の機能として今までに単に遮光としての意義しか与えられていなかったが、gap junctionによって機能的に連結している可能性が考えられ、脈絡膜においてさらに重要な機能が今後追加検出されるべきであろう。

この論文の要旨は昭和62年、第91回日本眼科学会で発表した。尚、本研究は文部省科学研究費補助金奨励研究(A)61771346の援助を受けた。稿を終えるにあたり終始御援助いただいた本学難治疾患研究所自律生理学部門辰己仁史先生、神経生理学部門伊藤 拳先生、本学動物実験施設谷口博一先生に深く謝意を表します。

文 献

- 1) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: Histology of the Human Eye. Philadelphia, WB Saunders Company, 320-322, 1971.
- 2) Woltr JR, Mich AA: Melanoblasts of the normal human choroid. Arch Ophthalmol 53: 211-214, 1955.
- 3) Matsuzaka T: Cytoarchitecture of choroidal melanocyte. Exp Eye Res 35: 461-469, 1982.
- 4) 松坂利彦: 脈絡膜循環。大阪, 厚生社, 149-171, 1986.
- 5) Gilula NB: Gap junction and cell communication. International Cell Biology. Rockefeller

Univ Press NY, 61-69, 1977.

- 6) Stewart WW: Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. Nature 292: 17-21, 1981.
- 7) Stewart WW: Functional connections between cells as revealed by dye coupling with a highly fluorescent naphthalimid tracer. Cell 14: 741-759, 1978.
- 8) MacVicar BA, Dudek FE: Dye-coupling between CA3 pyramidal cells in slices of rat hippocampus. Brain Research 196: 494-497, 1980.
- 9) Knowles WD, Furch PG, Schwartzkroin PA: Electrotonic and dye coupling in hippocampal CA1 pyramidal cells in vitro. Neuroscience 7: 1713-1722, 1982.
- 10) Hargiotta JF, Walcott B: Conduction and dye permeability of a rectifying electrical synapse. Nature 305: 52-55, 1983.
- 11) Brenowitz GL, Collins WF III, Frulcar SD: Dye and electrical coupling between frog motoneurons. Brain Research 274: 371-375, 1983.
- 12) Michaels RL, Sheriden JD: Islets of Langerhans: Dye coupling among immunocytochemically distinct cell types. Science 214: 801-803, 1981.
- 13) Katayama Y, Lees GN, Pearson GT: Electrophysiology and morphology of vasoactive intestinal-peptide-immunoreactive neurons of the guinea pig ileum. J Physiol 378: 1-11, 1986.
- 14) Maruyama T: Electrical activity of the plasma membrane in cultured melanoma cells and the effect of MSH. Biomed Res 4(Suppl): 229-232, 1983.

(第91回日眼総会原著)