

# 家兎前房隅角線維柱網内皮細胞のアクチン細線維の蛍光 組織化学的, および電顕細胞化学的研究 (図7)

小林 誉典<sup>1)</sup>・山下 秀明<sup>1)</sup>・西村 哲哉<sup>1)</sup> (1) 関西医科大学眼科学教室)  
宇山 昌延<sup>1)</sup>・小川 和朗<sup>2)</sup>・藤本 和<sup>2)</sup> (2) 京都大学第2解剖学教室)

## 要 約

家兎前房隅角線維柱網内皮細胞内に多量のアクチン細線維が存在することを, 蛍光組織化学的方法, および電顕細胞化学的方法によって証明し, その局在について観察検討をおこなった. その結果, 従来, 強膜岬を持たない家兎において不明瞭であった線維柱網が, nitrobenzoxadiazole-phalloidin (NBD-ph) を用い, 蛍光組織化学的にアクチン細線維を観察することによって, aqueous plexus 内側に存在することを確認した. 更に, heavy meromyosin (HMM) を用いた電顕細胞化学的観察によって, 内皮細胞内にアクチン細線維が trabecular collagen sheet に沿って基底膜に平行に存在し, 収縮能を有する可能性を明らかにした. これらのことより, 房水流出抵抗がアクチン細線維を含む内皮細胞の形態変化と深い関連性のあることが推察された. (日眼会誌 93: 389-395, 1989)

キーワード: 隅角線維柱網, アクチン細線維, nitrobenzoxadiazole-phalloidin (NBD-ph), heavy meromyosin (HMM), 房水流出抵抗

## Cytochemical localization of actin filaments in endothelial cells of rabbit trabecular meshwork

Takanori Kobayashi\*, Hideaki Yamashita\*, Tetsuya Nishimura\*  
Masanobu Uyama\*, Kazuo Ogawa\*\*, Kazushi Fujimoto\*\*

\* Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

\*\*Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kyoto University

### Abstract

Localization of actin filaments in the endothelial cells of rabbit trabecular meshwork was studied by the nitrobenzoxadiazole-phalloidin (NBD-ph) staining method for fluorescence microscopy and modified heavy meromyosin (HMM) decoration method for electron microscopy.

Endothelial cells stained with NBD-ph exhibited intense fluorescence which was apparently associated with the basal plasma membrane area. By the modified HMM decoration method, labeled actin filaments were readily detected in the prefixed endothelial cells, because of the distinctive arrowhead-like appearance, observed beneath the basal plasma membrane facing the trabecular collagen sheet. The actin filaments were arranged with dual directionality within the bundle. In contrast, intermediate (10nm) filaments in the deeper region of endothelial cells were always unlabeled with HMM.

別刷請求先: 570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 小林 誉典  
(平成元年1月12日受付, 平成元年2月15日改訂受理)

Reprint requests to: Takanori Kobayashi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kansai Medical Univ.  
1 Fumizono-cho, Moriguchi 570, Japan

(Received January 12, 1989 and accepted in revised form February 15, 1989)

The function of the actin filament bundles in endothelial cells may be to maintain the cell shape and provide contractility of the trabecular meshwork resulting in an alteration of the outflow resistance of aqueous humor drainage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 389-395, 1989)

**Key words:** trabecular meshwork, actin filaments, nitrobenzoxadiazole-phalloidin (NBD-ph), heavy meromyosin (HMM), outflow resistance

## I 緒 言

最近,  $\beta$  交感神経作働薬による眼圧降下機序は, 房水流出抵抗の減弱によるとの知見が得られており, この際, 前房隅角線維柱網内皮細胞がその形態を変化させることによって, 房水流出抵抗に影響を及ぼしていると推定されている<sup>1)2)</sup>. また, 内皮細胞のような非筋細胞の細胞形態の変形, 運動能, 貪食能, 分泌能など, いわゆる“細胞の動き”は, 胞体内のアクチン細線維 (actin filament) によって行われることが推測されている<sup>3)</sup>. これらのことは, アクチン細線維の内皮細胞内存在様式や極性を観察することによって, その細胞の運動性を解明することが可能であることが示唆される. これまでにも, Gipson<sup>4)</sup>はヒト眼, Ringvold<sup>5)</sup>はサル眼の線維柱帯内皮細胞のアクチン細線維を電顕的に観察しているが, これらの研究で用いられた検出方法は長時間を要するなど, 方法論的に問題があり, 示された写真では微細形態の損傷が著しく, その成果は充分とはいえない. 我々は内皮細胞の運動機能を解明する手段として, その形態変化が房水流出抵抗に関係すると考えられている内皮細胞内のアクチン細線維の局在部位を, NBD-phalloidin を用いた蛍光組織化学的方法<sup>6)7)</sup>と, 前固定試料の heavy meromyosin 修飾法<sup>7)8)9)</sup>による電顕的細胞化学的方法によって検討し, 細胞の運動機能と房水流出抵抗について考察を行ったので報告する.

## II 実験方法

実験動物としては成熟白色家兎を用い, sodium pentbarbiturate (Nembutal) にて麻酔後, 眼球摘出を行った.

### 1. 蛍光組織化学的方法

Barak ら<sup>6)</sup>と Ohtuki ら<sup>7)</sup>の方法を併用した.

眼球摘出後直ちに角膜を切開し, 前房を燐酸塩緩衝液 0.25% グルタルアルデヒド (pH7.4) に浸漬しながら隅角部を1~2mm のブロックに細切し, 30分間前固定を行った. 燐酸緩衝液で洗浄後, cryostat で厚さ

12~20 $\mu$ m に薄切し, 切片をアルブミンスライドに伸展, 室温乾燥後, 0.5% saponin 液に10分間浸漬した. 燐酸塩緩衝液で洗浄後, キノコ (*Amanita phalloides*) の毒素で F-アクチンと特異的に結合する phalloidin に, 蛍光物質の NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole; 励起波長510~650nm, 吸収波長460~470 nm) をラベルした NBD-phalloidin (NBD-ph) (2 unit/ml) 液中で, 室温, 1時間反応させた. 反応後, 燐酸塩緩衝液で洗浄, グリセリンに封入し, 蛍光光学顕微鏡にて観察した.

対象実験方法は, 上記と同様の過程で, NBD-ph を除いて行った.

### 2. 電顕細胞化学的方法

Ohtuki ら<sup>7)</sup>, Ishikawa ら<sup>8)</sup>, Fujimoto ら<sup>9)</sup>の方法を併用した.

眼球摘出後, 角膜を切開し, 輪部を垂直に1mm の厚さに細切した試料を, HEPES 緩衝 (pH7.4) 0.1% グルタルアルデヒド (GLA) で10分間固定を行った. ついで, HEPES 緩衝リンゲル液で洗浄後, 0.5% saponin 液に30分間浸漬した. potassium buffer (ptb) で洗浄後, heavy meromyosin (H.M.M.) (0.5mg 蛋白/ml) で室温1時間反応させた. ptb にて洗浄後, 2% GLA を含む0.1% タンニン酸溶液中で30分間再固定を行った. 水洗, 1% 酢酸ウラニールのブロック染色, 水洗, 2% 緩衝四酸化オスミウム液にて後固定後, エタノール系列で脱水し spurr 包埋した. ついで, 超薄切片を作製し, 無染色にて電顕観察した.

## III 結 果

正常家兎前房隅角には, ヒト眼と異なり強膜岬は存在せず, 虹彩根部及び隅角底部には一帯に密度の粗な結合織性の網目様構造の組織で, 線維柱網部の確定が困難であった. 隅角底部の最も強膜側に微細な管腔 (aqueous plexus) (図1のA)があり, これは強膜(図1のS)を貫く集合管へつながっていた<sup>10)</sup>.

蛍光顕微鏡による観察では, NBD-ph 染色によって, 隅角底部強膜沿いの狭い範囲に, 帯状の強い蛍光

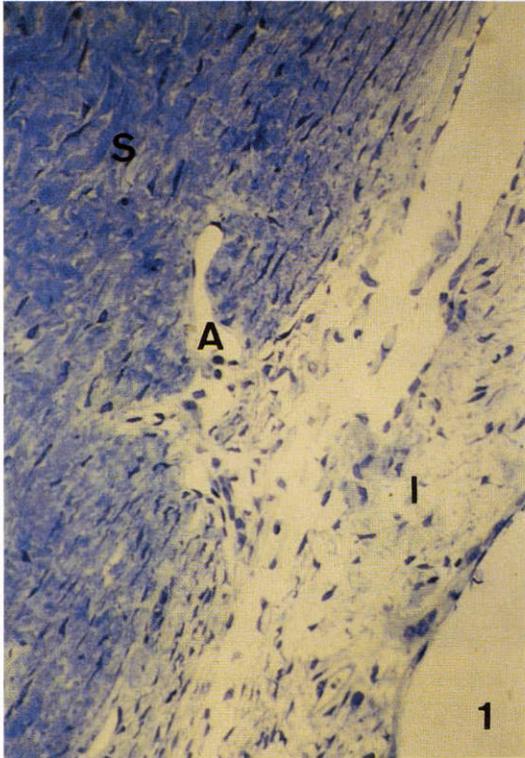


図1 正常家兎隅角；強膜岬がなく，線維柱網が不明瞭であった。(トルイジンブルー染色). A: aqueous plexus, S: 強膜, I: 虹彩. (×150)

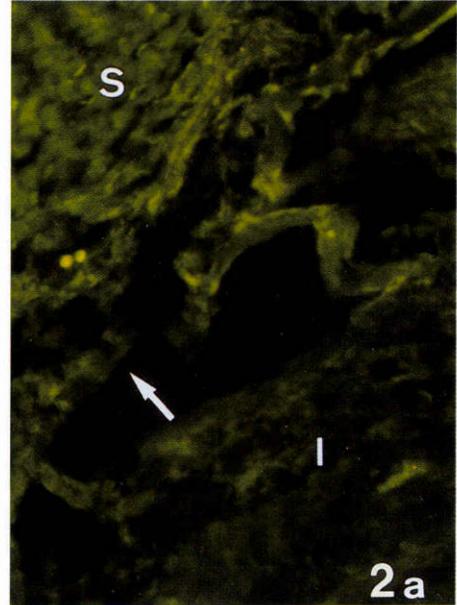


図2a NBD-phalloidin 無処理；隅角部に蛍光は認められなかった(矢印). S: 強膜, I: 虹彩. (×180)

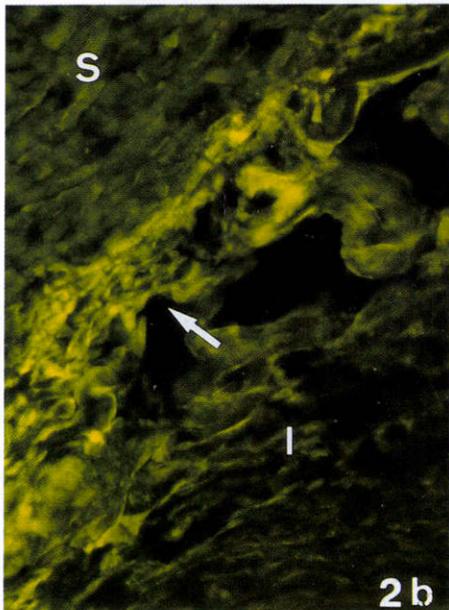


図2b NBD-phalloidin 処理；隅角部で強膜内側に沿って，帯状の強い蛍光部が認められた(矢印). S: 強膜, I: 虹彩. (×180)

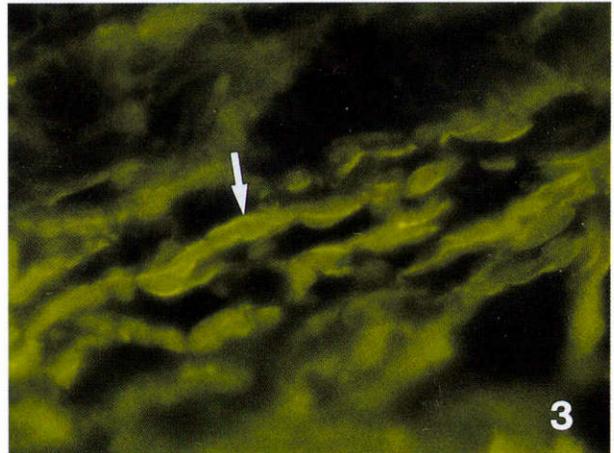


図3 強蛍光部，拡大；線維柱に沿って線状の強い蛍光が認められた(矢印). (×400)

部位が認められた(図2b, 矢印). 強拡大では, trabecular sheet の外側に線状の蛍光として観察された(図3, 矢印). 対照の NBD-ph 無処理によるもので



図4 heavy meromyocin で修飾されたアクチン線維束(\*印)は trabecular collagen sheet 側 (TC) に多量に見られ, trabecular space 側 (TS) には少なかった. アクチン細線維束内に dense body も認められた (矢印). (バー,  $1\mu\text{m}$ )

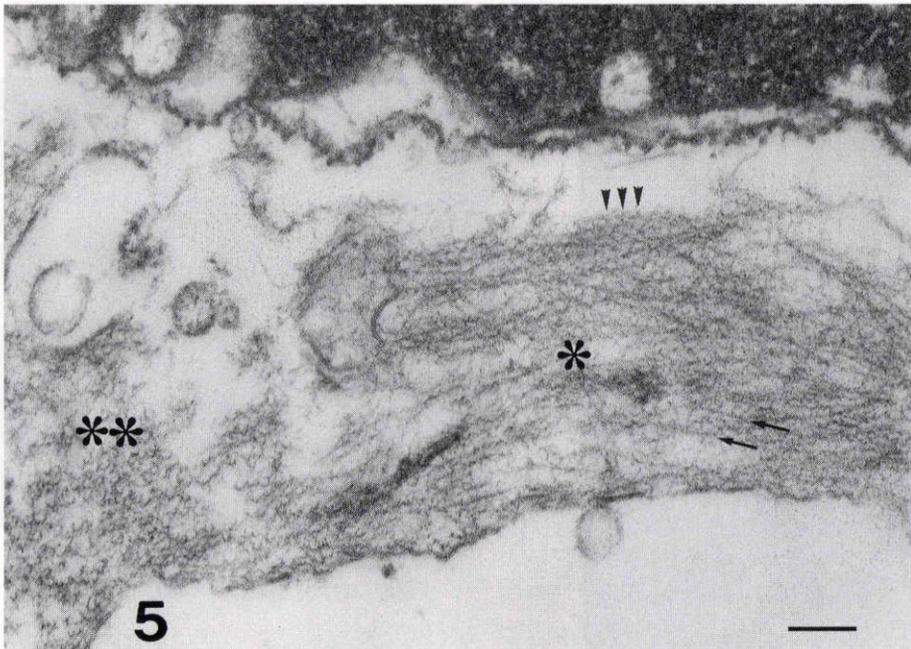


図5 アクチン細線維は HMM と結合し, 矢じり構造として観察された(▼▼▼). また細線維束は, 縦断面の部分 (\*印) と, 横断面の部分 (\*\*印) が認められた. ミオシン様線維も見られた (矢印). (バー,  $0.1\mu\text{m}$ )

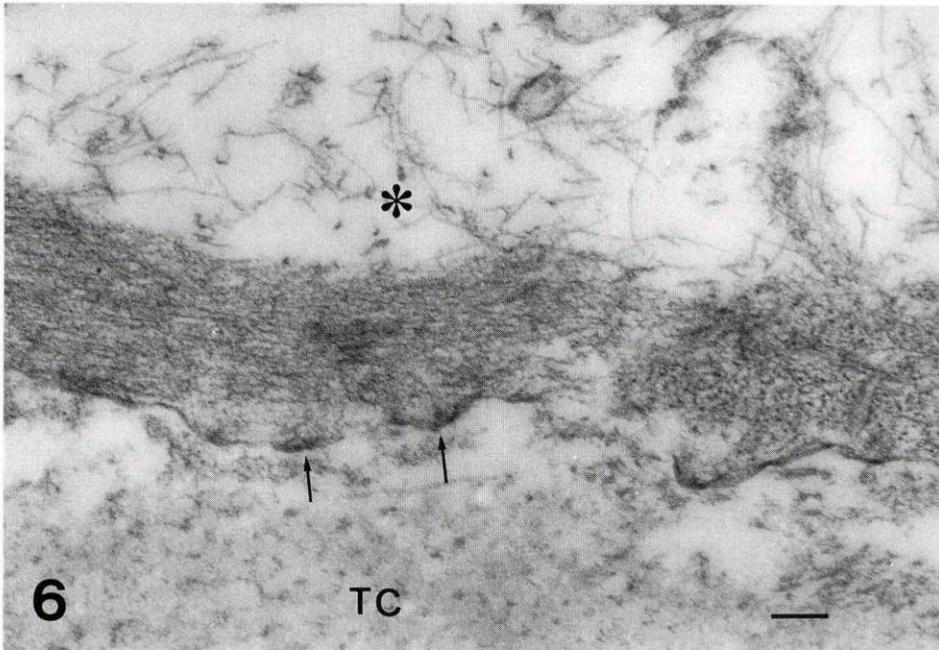


図6 collagen sheet側(TC)に存在するアクチン細線維と細胞膜との接着部に dense material が認められた(矢印). 細胞質内では中間径(10nm)線維も見られた(\*印). (バー, 0.1 $\mu$ m)

は隅角に、蛍光部位は認められなかった(図2a, 矢印). 電子顕微鏡による観察では、内皮細胞の trabecular collagen sheet に沿った基底部に、HMM によって修飾されたアクチン細線維束(図4, \*印)がみられた. しかし、アクチン細線維は線維柱網間隙側には少なかった. 界面活性剤である saponin を用いて可溶性蛋白質を洗浄流出させているために、細胞質は明るくぬけて見えるが、ミトコンドリア、核等の細胞内小器官の微細形態はよく保持されていた. また、アクチン細線維束内には dense body が認められた(図4, 矢印). アクチン細線維束は HMM との結合によって特有の“矢じり構造”として観察された(図5). 線維束は縦断面の部分(図5, \*印)と、横断面の部分(図5, \*\*印)がみられた. 矢じり方向で示されたアクチン細線維の走行は、基底側形質膜と水平方向に、帯状で連続しているが、一定の方向性は認められなかった. また、アクチン細線維に混在してミオシン様線維も認められた(図5, 矢印). 細胞膜には線維束と結合する部に dense material (図6, 矢印)が認められたが、矢じりの方向は不明瞭であった. 又、アクチン細線維束の内側に散在する中間径(10nm)細線維も観察された(図

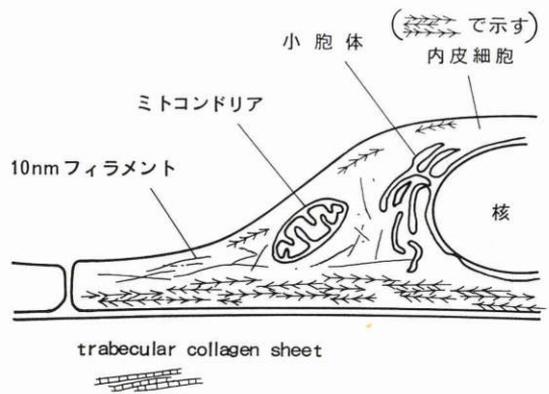


図7 HMM 修飾法によるアクチン細線維存在部位

6, \*印). 更に、アクチン細線維束は細胞周辺部へも広がりを見せ、trabecular collagen sheet 側に帯状に存在していた(図7).

#### IV 考 按

最近のフルオロフォトメトリー (fluorophotometry) 研究の進歩によって、従来より使用され

ていた緑内障治療薬で、交感神経作働薬（エピネフリン等）は房水流出量を増加させることによって眼圧を低下させていることが明らかにされた<sup>12)</sup>。我々はこの房水流出量の増加は、隅角線維柱網の形態変化による流出抵抗の減少によるものと考え、本研究では、特に隅角内皮細胞の細胞形状の変化と房水流出抵抗との関係について検討した。

細胞形態と深く関連する細胞内構造として、細胞骨格系を構成する細胞内線維が最近注目されている。線維成分は線維の太さによって微小管、微細線維（いわゆるアクチン細線維）と、両者の中間型として中間径細線維（10nm フィラメント）の3種類に分類されている<sup>11)</sup>。このうち、中間径細線維は細胞の形態保持に関与し、微細線維は細胞の分泌能、貪食能や運動能など形態変化において主要な役割を荷っていると考えられており、アクチン細線維の機能はG-アクチンからF-アクチンへの重合やミオシン線維との共働により発揮されるとされている<sup>3)12)13)</sup>。

従来より、アクチン細線維の光顕レベルでの証明として、蛍光標識アクチン抗体法<sup>14)</sup>、蛍光標識HMM法<sup>15)</sup>等が用いられていた。これまでに、Griersonら<sup>16)</sup>が、ヒト眼培養隅角線維柱網内皮細胞に蛍光抗体法によって多量のアクチン細線維が存在することを証明している。しかし、この方法は長時間を要し、生体組織での応用は困難である。本研究において用いたNBD-phalloidin法は操作が短時間で細胞膜浸透処理が容易であるために、細胞の微細形態が良好に保たれ、生体組織にても使用が可能である。

この方法を用いた結果、隅角線維柱網部において、アクチン細線維の存在を示す強い蛍光部位はaqueous plexusの内側に、脈絡膜方向へ帯状に連続して観察された。これにより、正常家兎隅角では、強膜岬がなく周囲組織と区別できなかった隅角線維柱網が、この蛍光所見からaqueous plexusに接して存在していることが明らかにされた。また、強拡大で強い蛍光は、隅角線維柱に接して線状に認められ、アクチン細線維は内皮細胞内に存在することが示唆された（図3）。

隅角線維柱網内皮細胞内のアクチン細線維の局在の電顕レベルにおける観察に関しては、Gipsonら<sup>4)</sup>によってヒト眼で、又、Ringvoldら<sup>5)</sup>によってサル眼で、HMM修飾法を用いて試みられている。しかし、いずれもHMM浸透のために、未固定の試料を長時間グリセロール処理しているために、内皮細胞の形態の損傷が著しく、それに伴いアクチン細線維の細胞外流出も

増加し、本来の全線維の観察には支障がある。本研究では、我々は前固定した試料をsaponinで処理する<sup>7)</sup>ことにより、微細構造を良好に保持し、また、HMM修飾後タンニン酸固定を行うこと<sup>17)</sup>によって、内皮細胞内に明瞭なやじり構造を示す、アクチン細線維を観察することができた。

その結果、アクチン細線維は、内皮細胞内のtrabecular collagen sheet側、特に基底膜沿いに、水平方向で束状に存在し、さらに周辺部にまで連続していた。このようなアクチン細線維は、細胞運動と機械的支持の、二重の構造を有していると推察される<sup>3)</sup>。細線維は細胞膜にみられたdense materialとも結合していたが、この部での矢じり構造の方向は不明瞭であった。このアクチン細線維束内には、又、ミオシン様細線維が認められ（図5、矢印）、アクトミオシン反応でこの線維束が収縮し得る可能性を示唆している。又、細線維束内にdense bodyも見られ、これはアクチン細線維束の収縮実験<sup>18)</sup>で認められるdense bodyと類似していたことから、収縮能が存在することが推察された。この収縮能を持つアクチン細線維を多量に含む内皮細胞は、細胞自身の収縮変形によって線維柱網間隙を広げ、房水流出抵抗を減少させることが示唆される。

しかし、アクチン細線維の脱重合剤であるcytochalasin Bをサル眼前房内へ注入し、内皮細胞を変形させたり、動きを止めると流出抵抗が減少する<sup>19)</sup>、あるいはCa-free緩衝液による灌流ないしキレート剤であるEDTA（ethylenediaminetetraacetic acid）を作用させ低Ca状態にすると、間腔にまたがっている内皮細胞の突起内のアクチン細線維が脱重合され、流出抵抗が減少するという報告もある<sup>20)</sup>ので、内皮細胞内アクチン細線維の収縮能、すなわち内皮細胞の形態的变化と房水流出抵抗の減少との詳細な関係は、今後の研究に待たなければならない。

#### 文 献

- 1) Nagataki S, Brubaker RF: Early effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye. *Ophthalmol* 88: 278-282, 1981.
- 2) Lee DA, Brubaker RF, Nagataki S: Acute effect of thymozamine on aqueous humor formation in the epinephrine-treated normal eye as measured by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 165-168, 1983.
- 3) 石津春律: 細胞骨格の微細構造。蛋白質・核酸・酵素 28: 624-635, 1983.

- 4) **Gipson IK, Anderson RA**: Actin filaments in cell of human trabecular mesh work and Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 547-561, 1979.
- 5) **Ringvold A**: Actin filaments in trabecular endothelial cells in eyes of the vervet monkey. *Acta Ophthalmol* 56: 217-225, 1978.
- 6) **Barak LS, Yocum RR, et al**: Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 980-984, 1980.
- 7) **Ohtsuki I, Manzi RM, et al**: Entry of Macromolecular tracers into cells fixed with low concentrations of aldehydes. *Biol Cellulaire* 31: 119-126, 1978.
- 8) **Ishikawa H, Bischoff R, et al**: Formation of arrow head complex with heavy meromyosin in variety of cell types. *J Cell Biol* 43: 312-328, 1969.
- 9) **Fujimoto K, Ogawa KS, Ogawa K**: Prefixation with dimethylsuberimidate is useful for identifying actin filaments using heavy meromyosin. *J Electron Microsc* 33: 295, 1984. (Abstract).
- 10) **Tripathi RC**: Comparative physiology and anatomy of the outflow pathway. In Davson H Ed: *The Eye*, vol 5: Academic Press, London and New York, 241-270, 1977.
- 11) **Ishikawa H**: Identification and distribution of intercellular filament. In Hatano S, Ishikawa H, Sato H, Ed. *Cell Motility, Molecules and Organization*, University of Tokyo Press, Tokyo, 414-444, 1979.
- 12) **大槻警男**: 収縮タンパク質. *細胞生物学—6*, 編集 小川和朗, 理工学社, 1-38, 1978.
- 13) **Tilney LG**: Actin filament in the acrossmal reaction of limulus sperm. *J Cell Biol* 64: 289-310, 1975.
- 14) **Lazarides E, Weber K**: Actin antibody: The specific visualisation of actinfilaments in non-muscle cells. *Proc Not Acad Sci USA* 71: 2268-2272, 1974.
- 15) **Sanger JW**: Changing patterns of actin localization during cell division. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 1913-1916, 1975.
- 16) **Grierson I, Rahi AH**: Microfilament in the cells of the human trabecular meshwork. *Br J Ophthalmol* 63: 3-8, 1979.
- 17) **La Fountain JR, Zobel CR, et al**: Fixation and staining of F-actin and microfilaments using tannic acid. *J Ultrastruct Res* 58: 78-86, 1977.
- 18) **Owaribe K, Kodama R, et al**: Demonstration of contractility of circumferential actin bundles and its morphogenetic significance in pigment epithelium in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 90: 507-514, 1981.
- 19) **Kaufman PL, Barany EH**: Cytochalasin B reversibly increases outflow facility in the eye of cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 16: 47-53, 1977.
- 20) **Bill A**: The drainage of aqueous humor. *Invest Ophthalmol* 14: 1-3, 1975.