

# 網膜色素上皮における塩素イオンの分布

—動物種間の比較— (図4, 表1)

山下 英俊・山本 禎子 (東京大学医学部眼科学教室)

## 要 約

白色家兎, カエル, ニワトリ胚, ヒトの網膜色素上皮における塩素イオンの分布を組織化学的に観察した。組織中の塩素イオンは, 固定液中の銀イオンと反応して塩化銀の沈澱として固定され, 透過型電子顕微鏡で観察した。白色家兎, ニワトリ胚, ヒトにおいては細胞質に塩素イオンが多く存在しているが, カエルでは塩素イオンが少なかった。全ての動物で細胞間隙に塩素イオンが多く存在しているのがみられた。網膜色素上皮のイオン輸送機構及び水輸送の機構について考察を加えた。(日眼会誌 93: 830—835, 1989)

キーワード: 網膜色素上皮, 塩素イオン, 組織化学, 種差

## Histochemical Evaluation of the Distribution of Chloride ion Around Retinal Pigment Epithelium in Various Animal Species

Hidetoshi Yamashita and Teiko Yamamoto

*Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine*

### Abstract

In order to clarify the distribution of chloride ion around pigment epithelium, chloride ion was deposited as silver chloride (AgCl) in the tissue and observed electromicroscopically. Eyes of albino rabbits, bullfrogs, mature chick embryos immediately before hatching and a human patient were used. In the albino rabbit eyes, the chick embryo eyes and the human eye, the concentration of chloride ion in the cytoplasm of retinal pigment epithelium (RPE) was high, and in the bullfrog eyes, the concentration was low. The difference among animal species is probably due to the difference of the ion transport mechanism by retinal pigment epithelium among species. In all the animals examined, chloride ion was concentrated in the intercellular space, which may be related to the isotonic absorption of water by RPE according to the standing-gradient osmotic flow theory of Diamond and Bossert. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 93: 830—835, 1989)

**Key words:** Retinal pigment epithelium, Chloride ion, Histochemical methods, Difference among animal species

## I 緒 言

網膜色素上皮細胞の輸送機構に塩素イオンが関連し

ていることは, 従来からの電気生理学的研究により知られている<sup>1)~10)</sup>。その機構を知るためには細胞内電極を使った細胞内電位や細胞内各種イオン濃度の測定が

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 山下 英俊  
(平成元年3月31日受付, 平成元年7月3日改訂受理)

Reprint requests to: Hidetoshi Yamashita, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Univ. of Tokyo  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received March 31, 1989 and accepted in revised form July 3, 1989)

大切であり、近年その方法によるデータが報告されつつある<sup>11)~19)</sup>。組織化学的方法により組織内の塩素イオンの分布を調べることは電気生理学的方法に比べて不正確ではあるが、手技が比較的容易である。そのため多種動物間の比較が容易であり、解剖学的構造と同時に観察できるという利点もあるため、電気生理学的方法では得にくい情報を得ることが可能である<sup>20)21)</sup>。本研究ではイオン輸送機構に種差が大きいことが示されているので<sup>1)~19)22)23)</sup>、多種動物眼の網膜色素上皮における塩素イオンの分布を組織化学的に比較観察したのでここに報告する。

## II 実験方法

### 1. 材料

白色家兎，食用ガエル，ニワトリ胚，ヒトの眼球を用いた。

白色家兎 6 羽 (体重 2 ~ 2.5 kg) を過剰ネブタール静注で即死させ直ちに眼球を摘出した。眼球を赤道部で前後に二分割し，眼球後方を更に分割して，網膜及び硝子体を除去し，脈絡膜，強膜に付着したままで網膜色素上皮を固定した (固定液については後述)。

食用ガエル (*Rana catesbeiana*) 2 匹 (体重約 100 g) を断頭し眼球を摘出した。白色家兎と同様に切りだし，網膜色素上皮を得た。

ニワトリ胚は白色レグホン卵のふ化後 15 日目 (ステージ 41) のものを 3 個用いた。ニワトリ胚を取り出し眼球を摘出し，白色家兎と同様に切り出して網膜色素上皮を得た。

ヒト眼球は，64 歳男性で眼外傷により角膜ぶどう腫が高度になり，患者の希望により眼球を摘出した。この際患者に本研究の主旨を説明し摘出眼球を使用することに同意を得た。麻酔下に眼球を摘出し，網膜色素上皮を脈絡膜，強膜に付着した状態で切り出した。

### 2. 組織学的方法

1. の項で述べたようにして得た網膜色素上皮を脈絡膜，強膜に付着したまま固定した。塩素イオンを組織内で検出するために Komnick ら及び水平らの方法により処置した<sup>20)21)</sup>。即ち固定液はほう酸ほう砂緩衝液 (pH 7.4) 中に 1% オスミウム酸，0.6% 酢酸銀を含むものを用い，4℃ で 1.5 ~ 2 時間固定した。これにより組織中の塩素イオンは固定液中の銀イオンと反応して塩化銀の沈澱を生じる。この沈澱した粒子を透過型電子顕微鏡で観察した。電顕用試料を作製するため，上記のように固定した後 8% 蔗糖液で一昼夜洗浄し

た，更に 0.1N 硝酸液で 10 分間洗浄した。(この後者の洗浄により塩化銀以外の磷酸銀，炭酸銀の沈澱は殆ど溶解する<sup>21)</sup>。)その後定法にしたがってアルコール系列で脱水し，エポキシ樹脂に包埋し，超薄切片を作製した。超薄切片は無染色で透過型電子顕微鏡 (日本電子，JEM1200EX) にて観察した。対照として酢酸銀を除いた固定液で固定した後 8% 蔗糖液で一昼夜洗浄し，再度酢酸銀を含む固定液で固定して上記の方法と同様に処理した。

切片上の高電子密度の粒子が塩化銀より成ることを確認するため，透過型電子顕微鏡に取り付けた X 線マイクロアナライザーにより元素分析を行った。切片は銅のメッシュ上に無染色のままのせて，日本電子 JEM 2000EX に AN 10000S X 線マイクロアナライザーを取り付け，加速電圧 25 kV で組織内元素分析を行った。

## III 結果

図 1 は白色家兎網膜色素上皮である。図 1a に示すように塩化銀は透過型電子顕微鏡像上，高電子密度の小粒子として観察された。図 1b は対照であり，図 1a にみられた高電子密度の小粒子はみられなかった。又，図 1a の中の A で示した部分を元素分析した結果を図 1c に示す。この部には銀 (Ag)，塩素 (Cl)，イオウ (s) の元素，とくに銀と塩素が多く存在することが示された。多くの点について検討したがすべて同様の結果であった。銅 (Cu) はメッシュによるものである。図 1a に示したように，塩化銀の沈澱，即ち塩素は細胞質内

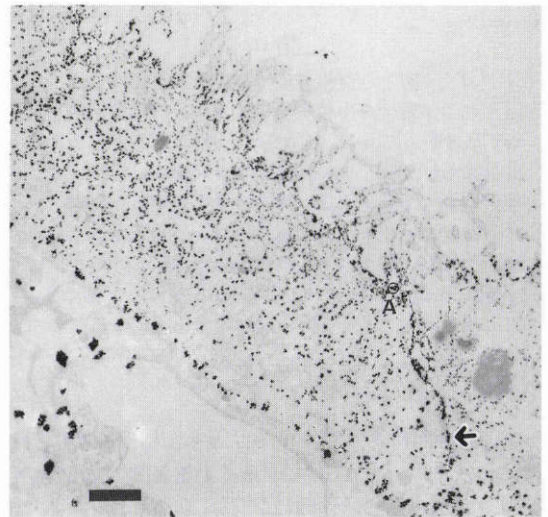


図 1a

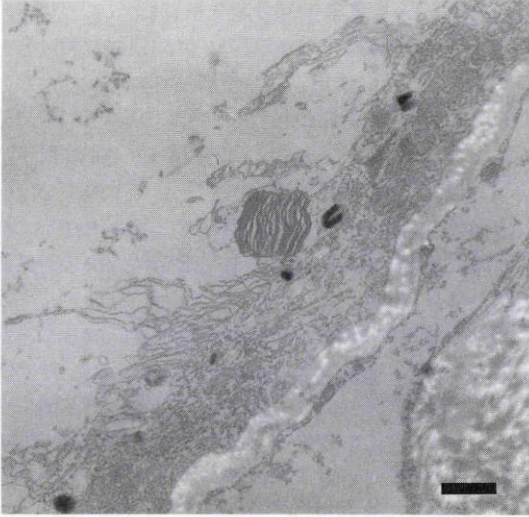


図 1b

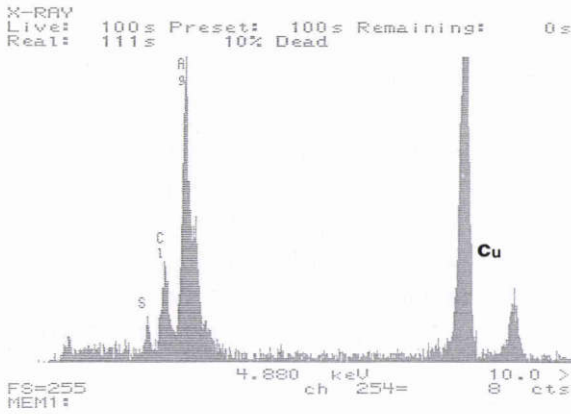


図 1c

図 1 白色家兎の網膜色素上皮

1a: 高電子密度の小粒子が細胞質内及び細胞間隙(矢印)に多数みられる。Aで示した部分の元素分析の結果を図1cに示す。(×6,600, bar=10 $\mu$ m). 1b: 銀イオン(Ag<sup>+</sup>)を含まない固定液中に固定した試料。高電子密度の小粒子は全くみられない。(×7,200, bar=10 $\mu$ m). 1c: 図1aのAの部分の元素分析結果。銀(Ag)、塩素(Cl)、イオウ(S)がみられ、とくにAg, Clが多く存在した。銅(Cu)はメッシュによるものである。

及び細胞間隙に多く存在する。とくに細胞間隙は空間としては狭いにも関わらず多くの沈澱粒子が存在した。

図2はカエル眼の網膜色素上皮における染色の結果

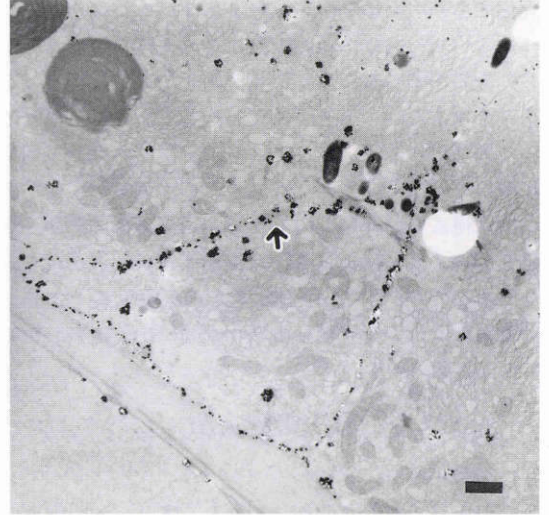


図2 カエルの網膜色素上皮。細胞質内には小粒子が少ない。細胞間隙(矢印)に多くの小粒子が存在する。(×4,800, bar=10 $\mu$ m)

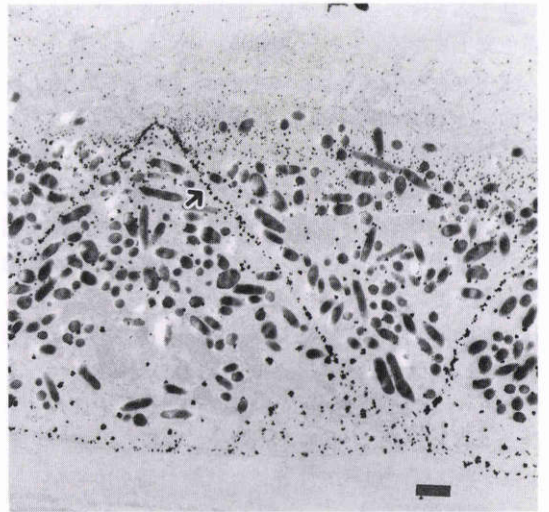


図3 ニワトリ胚網膜色素上皮。細胞質内及び細胞間隙(矢印)に多くの小粒子が存在する。(×4,800, bar=10 $\mu$ m)

を示す。細胞間隙には白色家兎同様多くの沈澱粒子が存在するが、細胞質内の沈澱粒子は白色家兎に比べて少なかった。

図3はニワトリ胚の眼の網膜色素上皮における染色結果を示す。白色家兎と同様に細胞間隙及び細胞質内に多くの沈澱粒子がみられた。

表1 組織学的及び電気生理学的方法の比較

	組織学的方法	電気生理学的方法	
	細胞内塩素イオン	細胞内電位 (mV)	細胞内塩素イオン活動度 (mM)
白色家兎	多	?	?
カエル	少	-88, -78*	20*
ニワトリ	多	-2.2#	?
ヒト	多	-42#	?

\*: 文献14より引用. 頂側細胞膜電位 = -88 mV, 基底側細胞膜電位 = -78 mV.

#: 文献11より引用.

?: 報告のないもの.

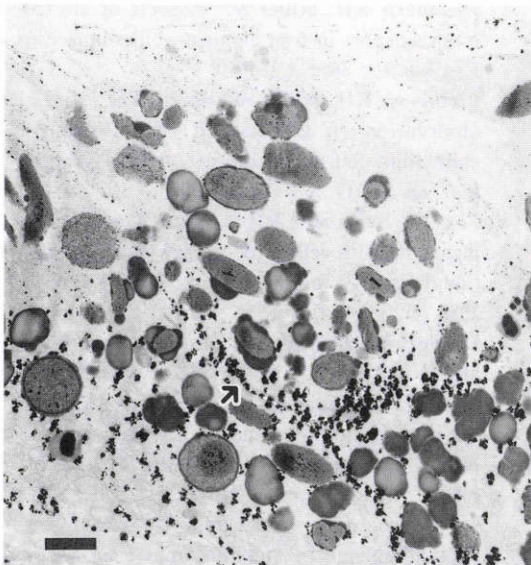


図4 ヒト網膜色素上皮. 細胞質内及び細胞間隙(矢印)に多くの小粒子が存在する. ( $\times 6,600$ , bar = 10  $\mu\text{m}$ )

図4はヒトの眼の網膜色素上皮における染色結果を示す. 白色家兎と同様に細胞間隙及び細胞質内に多くの沈澱粒子がみられた.

#### IV 考 按

多くの電気生理学的研究により<sup>1)-10)</sup>網膜色素上皮細胞が塩素イオンを能動輸送しており, その機能に重要な役割を果たしていることが知られている. 近年細胞内電極法の発達により細胞内電位や細胞内イオン活動度の測定が可能になり, イオン輸送機構の解明がなされつつある<sup>11)-19)</sup>. 今回用いた組織化学的な方法では電気生理学的方法に比べて正確さでははるかに劣るが, その分布状態を解剖学的な構造とともに観察でき

る利点がある<sup>20)21)</sup>. 電気生理学的な結果と併せて考察を加えることにより, 組織化学的方法の結果を検証し, かつ生理学的データを補強できると思われる.

表1に今回の結果及び電気生理学的方法による研究報告をまとめた. 今回得られた細胞質内の塩化銀の沈澱粒子数はカエルでは小数であったが, 白色家兎, ニワトリ胚, ヒトでは多くの沈澱がみられた. 細胞内電極法によると, カエルの細胞内電位は-80~-90 mVで<sup>11)14)16)</sup>, 細胞内塩素イオン活動度は20 mMであった<sup>16)</sup>. 細胞外液の塩素イオン活動度は約100 mMであり細胞内塩素イオン活動度はこれより低く, 組織化学的に細胞内塩素イオンが少ないという今回の結果とよく一致する. 今回観察した中でカエル以外では細胞内塩素イオン活動度の報告はないが, 細胞内電位の低いカエルでは細胞内塩素イオン活動度が低く, 細胞内電位がカエルに比べて高いニワトリ, ヒトでは<sup>13)</sup>今回の観察結果では細胞内塩素イオンが多く存在することが示唆された. 塩素イオン輸送機構に種差が示唆されているが<sup>3)-5)23)</sup>, 細胞内塩素イオン活動度にも種差があることが今回の結果より示唆された.

今回検討した全ての動物種で網膜色素上皮細胞間隙に塩素イオンが多く存在していることが示唆された. 種類の動物の網膜色素上皮は等張性に, 即ち浸透圧差を除外しても代謝に依存した水輸送を行っていることが示されている<sup>8)9)24)</sup>. その輸送機構について, イヌ, サルで塩素イオンの輸送と関連していることを示す報告があり<sup>8)9)10)22)</sup>, 又, Tsuboi等はモデルを提唱している<sup>8)</sup>. そのモデルでは網膜色素上皮は“leaky” epitheliumであり, 細胞間の経路を通して水が塩素イオンとともに等張性に輸送されることを示唆している. このメカニズムは生理学的には吸収上皮を漏洩性上皮 (leaky epithelium) 及び非漏洩性上皮 (tight epithelium) に分けた際, 漏洩性上皮の水吸収メカニズムに

似ている<sup>25)</sup>。即ち、漏洩性上皮は特徴として経上皮抵抗が $6\sim 133\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、上皮電位が $0\sim 11\text{mV}$ で、非漏洩性上皮に比べてともに低い(それぞれ $365\sim 2000\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、 $30\sim 100\text{mV}$ )。水に対する透過性は高く、ナトリウム、塩素などの電解質を吸収しているにも関わらず濃度差が上皮の両側で存在しない。そしてナトリウムや塩素イオンとともに水は等張性に頂側より基底側方向へ輸送されることが知られている<sup>25)</sup>。Diamond及びBosertは漏洩性上皮の等張性水吸収のメカニズムとして局所浸透圧勾配説を唱えた<sup>26)27)</sup>。それによると細胞間隙にイオンが集積して部分的に高浸透圧が形成され、この部分が細胞膜を通して細胞内から及び細胞間結合部を通して頂側より基底側へ水を輸送するとしている。網膜色素上皮における経上皮抵抗はこれまでの報告によると $100\sim 350\Omega\cdot\text{cm}^2$ 、上皮電位は $5\sim 10\text{mV}$ であり<sup>1)~9)11)12)23)</sup>、どちらかというとな漏洩性上皮に近いが、非漏洩性上皮であるとの意見もあり<sup>2)</sup>、このメカニズムが当てはまるかどうかはこれからの問題である。しかし上記のTsuboi等のモデルと合わせ<sup>8)</sup>、網膜色素上皮細胞間隙の塩素イオンの集積が網膜色素上皮の水輸送と密接に関連している可能性は示唆される。

#### 文 献

- 1) Miller SS, Steinberg RH: Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 25: 235-248, 1977.
- 2) Steinberg RH, Miller SS: Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium, in Zinn KM and Marmor MF (eds): *The Retinal Pigment Epithelium*. Cambridge, Harvard University Press, 205-225, 1977.
- 3) DiMattio J, Degnan KJM, Zadunaisky JA: A model for transepithelial ion transport across the isolated retinal pigment epithelium of the frog. *Exp Eye Res* 37: 409-420, 1983.
- 4) Frambach DA, Misfeldt DS: Furosemide-sensitive Cl transport in embryonic chicken retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* 244: F679-F685, 1983.
- 5) 坪井俊児: 摘出イヌ網膜色素上皮における電解質の輸送. *眼紀* 35: 1569-1576, 1984.
- 6) Wiederholt M, Zadunaisky JA: Decrease of intracellular chloride activity by furosemide in frog retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res* 3: 673-675, 1984.
- 7) Tsuboi S, Manabe R, Iizuka S: Aspects of electrolyte transport across isolated dog retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* 250: F781-F784, 1986.
- 8) Tsuboi S: Measurement of the volume flow and hydraulic conductivity across the isolated dog retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1776-1782, 1987.
- 9) Tsuboi S, Pederson JE: Volum flow across the isolated retinal pigment epithelium of cynomolgus monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1652-1655, 1988.
- 10) Tsuboi S: Volume flow across the isolated retinal pigment epithelium of dogs and cynomolgus monkeys. *Proceedings of the International Society for Eye Research Volume V*, 3, 1988.
- 11) Steinberg RH, Miller S: Aspects of electrolyte transport in frog pigment epithelium. *Exp Eye Res* 16: 365-372, 1973.
- 12) Steinberg RH, Miller SS, Stern WH: Initial observation on the isolated retinal pigment epithelium-choroid of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 675-678, 1978.
- 13) Fox JA, Steinberg RH: Patch-clamp recordings from RPE cells. *Proceedings of the International Society for Eye Research Volume V*, 3, 1988.
- 14) LaCour M, Zeuthen T: Transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$  in the frog retinal pigment epithelium. *Proceedings of the International Society for Eye Research volume V*, 3, 1988.
- 15) Miller S, Joseph D, Edelman J: Bovine retinal pigment epithelium (RPE): Apical and basolateral membrane transport mechanisms. *Proceedings of the International Society for Eye Research Volume V*, 3, 1988.
- 16) Fong CN, Bialek S, Hughes BA, et al: Basolateral membrane regulation of intracellular chloride activity ( $\text{A}_{\text{Cl}}$ ) in bullfrog retinal pigment epithelium (RPE). *Proceedings of the International Society for Eye Research Volume V*, 51, 1988.
- 17) Lin H, Miller S: Apical membrane  $\text{NaHCO}_3$  cotransporter helps regulation  $\text{pH}_i$  in frog retinal pigment epithelium (RPE). *Proceedings of the International Society for Eye Research Volume V*, 51, 1988.
- 18) Edelman JL, Miller SS, Hughes BA: Regulation of chloride transport by frog retinal pigment epithelium (RPE). *Proceedings of the International Society for Eye Research Volume V*, 51, 1988.
- 19) Zadunaisky JA, Kinne R, Pearce SF:  $\text{Na-H}$  exchange in the bovine retina pigment epithelium. *Proceedings of the International Society*

- for Eye Research Volume V, 51, 1988.
- 20) **Komnick H**: Elektronenmikroskopische Lokalisation von Na Cl in Zellen und Geweben. *Protoplasma* 55: 414—418, 1962.
- 21) 水平敏知: 腎の電解質代謝と超微構造. 代謝 14: 1947—1859, 1977.
- 22) **Tsuboi S, Pederson JE**: Experimental retinal detachment. XI. Furosemide-inhibitable fluid absorption across retinal pigment epithelium in vivo. *Arch Ophthalmol* 104: 602—603, 1988.
- 23) **Frambach DA, Valentine JL, Weiter JJ**: Initial observation of rabbit retinal pigment epithelium-choroid-sclera preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 814—817, 1988.
- 24) **Hughes BA, Miller SS, Machen TE**: Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium. *J Gen Physiol* 83: 875—899, 1984.
- 25) 星 猛: 経細胞輸送 I. 吸収. 4. 2 低分子物質の吸収. 黒住一昌, 菅野富夫 編: 物質輸送の細胞生物学. 東京, 朝倉書店, 90—107, 1983.
- 26) **Diamond MJ, Bossert WH**: Standing-gradient osmotic flow. A mechanism of coupling of water and solute transport in epithelia. *J Gen Physiol* 50: 2061—2083, 1967.
- 27) **Diamond JM**: Osmotic water flow in leaky epithelia. *J Membr Biol* 51: 195—216, 1979.
-