

結膜上皮ブラッシュサイトロロジーの細胞学的 および組織学的検討

深川 和己¹⁾, 榛村 重人¹⁾, 島崎 潤²⁾, 坪田 一男²⁾, 小口 芳久¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾東京歯科大学眼科学教室

要 約

ブラッシュサイトロロジーにより採取される結膜上皮細胞数はどの程度か、結膜上皮のいずれの層の細胞が採取されているかという点について、白色ウサギ結膜を用い組織学的に検討を加えた。7回、14回、20回のブラッシングによりそれぞれ約1,000個、約3,500個、約10,000個の細胞が採取された。Periodic acid Schiff (PAS) 染色後の光学顕微鏡による観察では、表層細胞、中間細胞のレベルまで上皮細胞の欠損を示すのみならず、基底細胞まで及ぶ欠損を示す部分も認められた。透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡による観察では、結膜上皮全層の欠損を示した部においても、lamina densa が連続していた。このように結膜上皮細胞のみを多数、single cell suspension として採取することができるため、今後、ブラッシュサイトロロジーを利用して採取した結膜上皮細胞の flow cytometry を用いた DNA 量解析や、polymerase chain reaction を用いた遺伝子解析などへの応用が可能であると考えられる。(日眼会誌 97: 1173—1178, 1993)

キーワード: ブラッシュサイトロロジー, 結膜上皮細胞

Histological Evaluation of Brush Cytology of Rabbit Conjunctiva

Kazumi Fukagawa¹⁾, Shigeto Shimmura¹⁾, Jun Shimazaki²⁾,
Kazuo Tsubota²⁾ and Yoshihisa Oguchi¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University

²⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College

Abstract

The number of the cells and the layers of the conjunctiva which can be obtained by brush cytology was studied on rabbit conjunctiva using cytological and histological methods. About 1,000, 3,500, and 10,000 conjunctival epithelial cells can be obtained by 7, 14, and 20 brush strokes histological observations showed that all varieties of the layers including basal cells were obtained without destroying the basement membrane. This study showed that the brush cytology can offer single cell suspension only from the conjunctival epithelium, and that brush cytology is useful to investigate the conjunctival epithelium by flow cytometry, polymerase chain reaction, and other methods. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1173—1178, 1993)

Key words: Brush cytology, Conjunctival epithelium

別刷請求先: 160 新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 深川 和己

(平成4年11月18日受付, 平成5年5月13日改訂受理)

Reprint requests: Kazumi Fukagawa, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University. 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku 160, Japan

(Received November 18, 1992 and accepted in revised form May 13, 1993)

I 緒 言

結膜上皮は、眼感染症において感染経路、防御に重要なだけでなく、アレルギー反応を生じる外来抗原の侵入経路、ドライアイにおける杯細胞の主座、またそれらの炎症の場として非常に重要である。これまで診断や、その病態生理の理解のために生検や結膜擦過細胞診が用いられてきたが、近年、結膜上皮細胞を非侵襲的に採取することが可能で、かつ定量的解析が可能な impression cytology が広く応用されるようになった。しかし、生検は侵襲的であること、結膜擦過細胞診では single cell suspension を得ることが困難で、各々の細胞を観察するには適さないこと、impression cytology では結膜上皮の最表層のみを観察していることが多いことなど、それぞれに問題点がある。

結膜ブラッシュサイトロジーは特殊な小型のブラシを用いて結膜上皮細胞を採取する方法であり、非侵襲的に多くの細胞を比較的容易に single cell suspension として得ることができるため、細胞を個別に観察することが可能であると報告されており^{1)~3)}、今後幅広い応用が可能であると思われる。しかし、ブラッシュサイトロジーにより採取される結膜上皮細胞数はどの程度か、結膜上皮のいずれの層の細胞が採取されているかという検討は行われていない。そこで今回、これらについて組織学的に検討を加えたので報告する。

II 対象と方法

体重 2.5~3.5 kg の白色ウサギ 6 匹 12 眼を対象とした。

1. ブラッシュサイトロジー

ペントバルビタールナトリウムにて静脈麻酔後、各々の上下外側球結膜に 4-0 絹糸にてマーキングをおき、ブラッシュサイトロジーを施行した(図 1)。サイトブラシによる擦過の回数は、2 匹 4 眼ずつそれぞれ 7 回、14 回、20 回とし、方向は経線方向とした。ブラシの端から 5 cm の部位を保持し、ブラシの柄がほとんどたわまない程度の力で擦過した。これはブラシの先端にかかる加重として約 1~3 g であった。

2. 結膜上皮細胞の観察、計測

ブラッシュサイトロジー施行後、サイトブラシを 1 ml のハンクス液 (Hanks' solution) 中で 30 回攪拌して細胞を緩衝液中に浮遊させた後、サイトスピン (1,500 回転 5 分) にてアルブミン処理のスライドガラスに塗布し、乾燥固定後、ライトギムザ染色を加えて

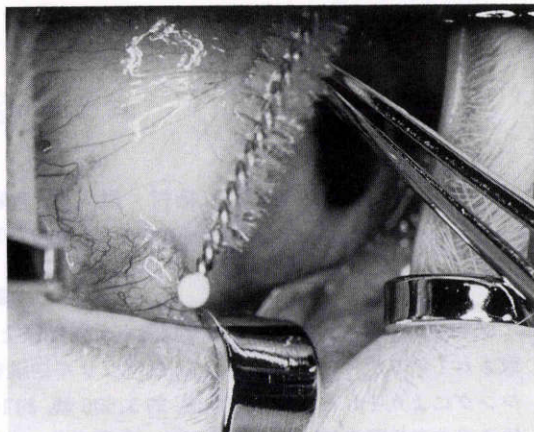


図 1 静脈麻酔後、白色ウサギの球結膜にブラッシュサイトロジーを施行。

長さ 2 mm のナイロンの毛が、幅 6 mm にわたり植えられているサイトブラシの先端から 5 cm の部位を把持した。

観察試料とした。観察はオリンパス AH-2 を用いて行った。また、1 mm²中の細胞数を直接鏡検下にて計測した。

3. 結膜上皮の検体の作成

外眼角に切開を加え、角膜を保持しながら結膜囊底部全周に切開を加えた後に、外眼筋、視神経を切除して眼球を摘出した。角膜中央部を穿孔し、経線方向に強膜、脈絡膜、網膜と一体に結膜を切開し、上下外側と 3 分割した。それぞれをレザーブレードにて経線方向に 2 分割し、1 眼につき 6 検体を作成した。

4. 結膜上皮の観察

1) 光学顕微鏡による観察

2 % ホルムアルデヒドで固定後、アルコール系列で脱水し、パラフィンで包埋した。4 μm 厚の切片を作製し、脱パラフィンを行った後に、PAS 染色を加えて観察試料とした。観察にはオリンパス AH-2 を用いた。

2) 透過型電子顕微鏡による観察

2 % グルタルアルデヒドで固定後、検体を細切し、1 % オスミウム酸-0.1 M リン酸緩衝液で再固定した。アルコール系列で脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。包埋した試料から超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行って、JEM-1200-EX (日本電子製) で観察した。

3) 走査型電子顕微鏡による観察

2 % グルタルアルデヒドで固定後、実体顕微鏡下で強膜、脈絡膜、網膜を除去し、1 % オスミウム酸-0.1

Mリン酸緩衝液(pH 7.2)で再固定した。さらに、2%タンニン酸による導電染色、1%オスミウム酸-0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)による再々固定後、アルコール系列で脱水し、酢酸イソアミルによる置換、CO₂臨界点乾燥、イオンコーターによる金蒸着を順次行い、JSM-6400(日本電子製)で観察した。

III 結 果

1. ブラッシュサイトロジーにて採取された結膜上皮細胞

採取された結膜上皮細胞は、比較的均一にそして個別にスライドガラス上に塗布されていたが、ほとんど

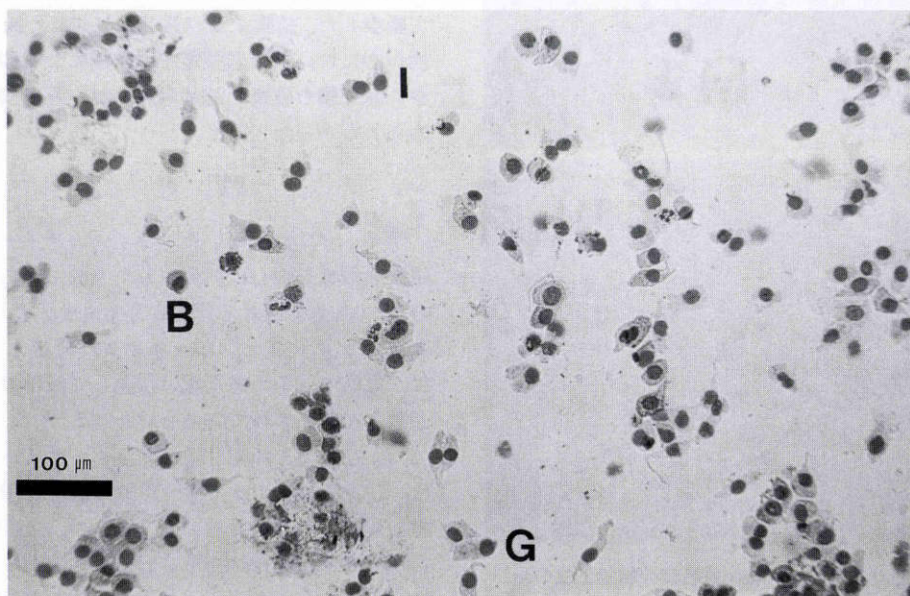


図2 サイトスピンにて、スライドガラスに塗布された結膜上皮細胞(ライトギムザ染色)。

比較的均一であり、個別に塗布されていたが、破壊された細胞や細胞の凝集塊も認められた。

B: 細胞核比の小さいやや小型の基底細胞, I: 細胞核比の比較的大きい中間細胞, G: 核が偏在し他端にブラッシュボーダーを持つ円柱細胞。

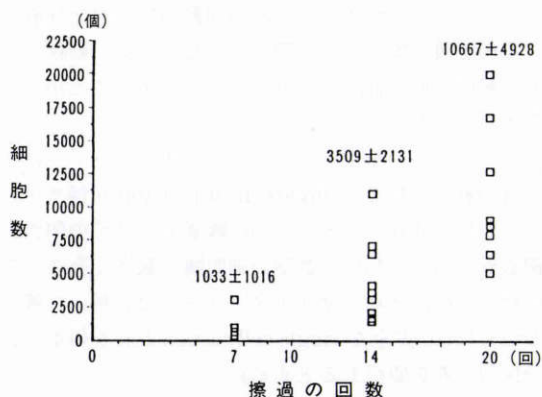


図3 ブラッシュサイトロジーの回数とスライドガラス上に塗布された上皮細胞数(近似)。

ブラッシュサイトロジーの回数が多いほど細胞数は増加した。

の検体中で数個の細胞の凝集塊が認められた(図2)。細胞核比の小さいやや小型の基底細胞(B)、細胞核比の比較的大きい中間細胞(I)、核が偏在し他端にブラッシュボーダーを持つ円柱細胞(G)などが観察された。赤血球は認められなかった。

採取された結膜上皮細胞は、サイトスピンにて25mm²の範囲に均一に塗布されており、1mm²中の細胞数を25倍して近似的に塗布された細胞数とした。7回のブラッシングでは1,033±1,016個、14回では3,509±2,131個、20回では10,667±4,928個の結膜上皮細胞が採取された。ブラッシュサイトロジーの回数が多いほど細胞数は増加した(図3)。

2. 結膜上皮の組織所見

1) 光学顕微鏡所見

ブラッシュサイトロジー7回施行後の結膜上皮では

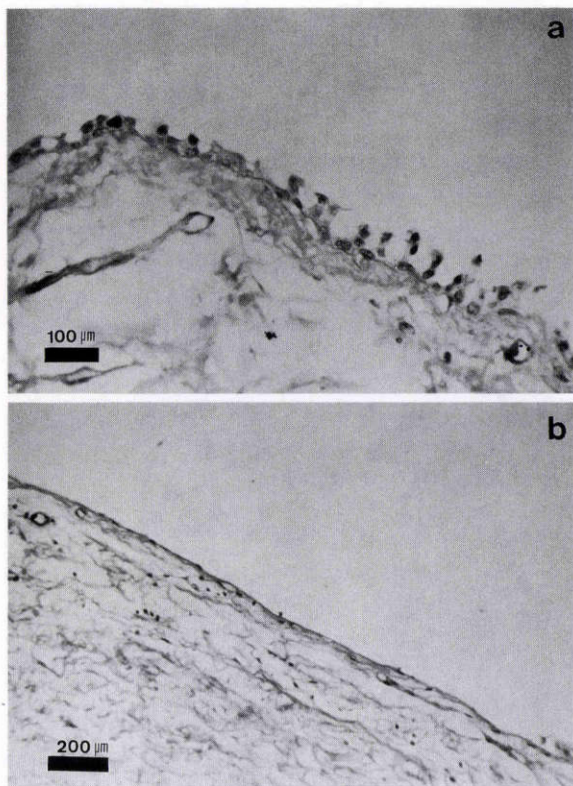


図4 ブラッシュサイトロジー施行後の結膜上皮の光学的顕微鏡所見 (PAS 染色)。

a: ブラッシュサイトロジー7回施行後、表層細胞、中間細胞のレベルまで上皮細胞の欠損を示す部分のほか、一部基底細胞まで及ぶ欠損を示す部分も認められた。

b: ブラッシュサイトロジー14回施行後、基底細胞まで及ぶ欠損が認められた。基底膜はほとんど障害されていなかった。

表層細胞、中間細胞のレベルまで上皮細胞の欠損を示す部分の他、一部基底細胞まで及ぶ欠損を示す部分も認められた(図4a)。ブラッシュサイトロジー14回施行後では欠損の範囲が広がる傾向を示し、20回施行後はほとんど基底細胞まで及ぶ欠損が認められた(図4b)。このようにブラッシュサイトロジーの回数が多いと結膜上皮の欠損が多い傾向があったが、定量的検討はできなかった。また、基底膜の傷害は認められなかった。

2) 透過型電子顕微鏡所見

ブラッシュサイトロジーを20回施行した検体中の、結膜上皮全層の欠損を示した部を透過型電子顕微鏡にて観察した。結膜上皮全層の欠損を示した部において

も、lamina densa はほぼ連続していた。20回施行した検体中のごく一部で、コラーゲンの僅かな脱出を伴う断裂が認められた(図5、矢印)が、固有層の細胞の脱出は認められなかった。

3) 走査型電子顕微鏡所見

ブラッシュサイトロジーを20回施行した検体中の、結膜上皮全層の欠損を示した部を走査型電子顕微鏡にて観察した。結膜上皮は带状に欠如し、20回施行した検体中において透過型電子顕微鏡による観察よりも大きい基底膜の破壊が認められたが、固有層の細胞は認められなかった(図6)。

IV 考 按

サイトブラシを用いたブラッシュサイトロジーは、婦人科領域を中心に開発された方法である。その利点の1つは、採取される細胞が非常に多いことであるが、これはサイトブラシがマイナスに荷電しているために、細胞のマイナス荷電に反発して緩衝液中に細胞が遊離しやすいからであるといわれる^{2)4)~6)}。

ヒト結膜上皮に対するブラッシュサイトロジーの場合、7回の擦過で5,000~10,000個の結膜上皮細胞が採取可能であると報告されているが、今回の結果では白色ウサギの場合は採取される細胞数が少なかった。この理由として、白色ウサギの結膜上皮細胞がブラッシュサイトロジーに際して壊れやすく、細胞のマイナス荷電が減少して緩衝液中に遊離しにくかったことや、白色ウサギの結膜上皮細胞の細胞間接着がヒトに比較して強固であった可能性が考えられ、結膜の状態によって採取される細胞数が異なることが予想される。ブラッシュサイトロジーの回数が多いほど採取される細胞数も多いことが明らかとなったが、結膜の状態や細胞採取の目的により回数を決定することがよいと考えられる。

サイトブラシを用いたブラッシュサイトロジーの2つ目の利点として、single cell suspension が得やすいことが報告されている。今回の観察でも多くの個別の細胞が認められたが、数個の細胞塊も数多く存在していた。今後、フローサイトメトリーなどを用いた解析のためには、完全なsingle cell suspension を得る方法を検討する必要があると思われる。

ブラッシュサイトロジーの3つ目の利点として結膜上皮のみが、各層にわたり採取されるということが今回の実験によって明らかとなった。核細胞比の小さい細胞は表層細胞もしくは中間細胞、核細胞比の大きい

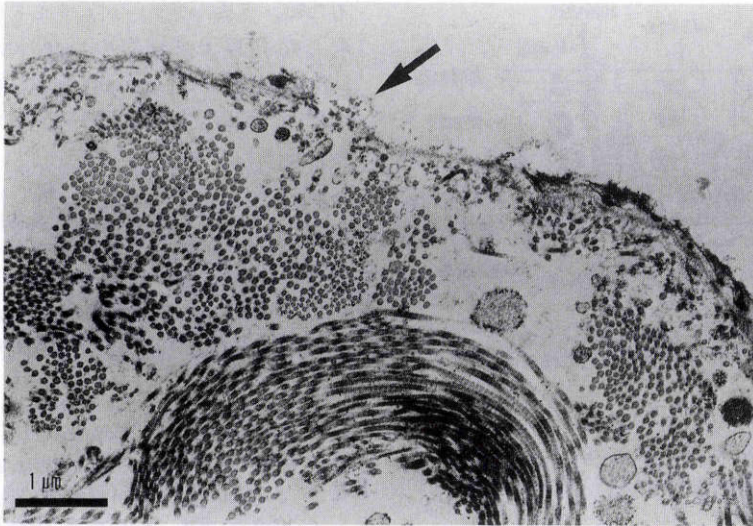


図5 ブラッシュサイトロジー施行後の結膜上皮の透過型電子顕微鏡所見。
結膜上皮全層の欠損を示した部においても, lamina densa は連続していたが, ごく一部でコラーゲンの僅かな脱出を伴う断裂(矢印)が認められた。固有層の細胞の脱出は認められなかった。

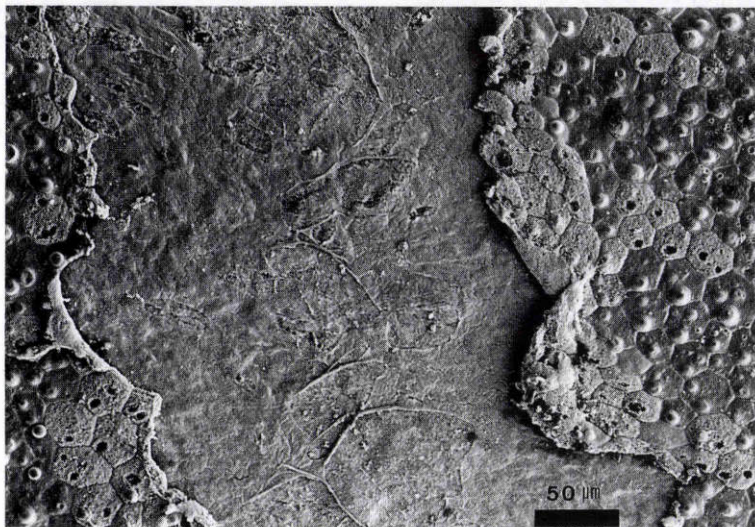


図6 ブラッシュサイトロジー施行後の結膜上皮の走査型電子顕微鏡所見。
結膜上皮は带状に欠如しており, 所々に基底膜の断裂が観察された。

小型の細胞は基底細胞と考えられた。また, ライトギムザ染色のみでは確定しにくいものの, 核が偏在し他端にブラッシュボーダーを持つ円柱細胞はその形態から杯細胞と思われた。ブラッシュサイトロジーを施行した結膜上皮は, 基底細胞までの欠損を示す部位を含め種々の程度で欠損しており, 7回, 14回の施行では

基底膜がほとんど保たれていた。7回, 14回, 20回と施行の回数を増やすと欠損の範囲が広がる傾向を示し, 20回の施行ではかなり広範囲の上皮が欠損していた(図7)。

20回施行後の結膜の透過型および走査型電子顕微鏡による観察で, 基底膜の断裂が僅かに認められた。

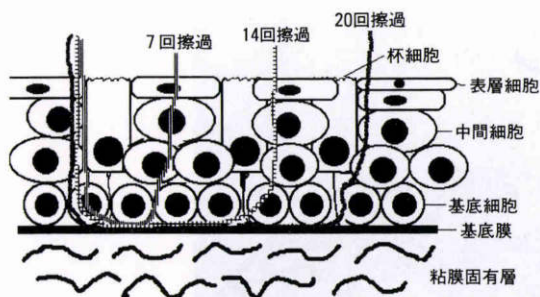


図7 白色ウサギの球結膜に対するブラッシュサイトロジーにより採取される上皮の部位の模式図。

基底細胞までの欠損を示す部位を含め種々の程度で欠損していたが、7回、14回、20回と施行回数が増加すると欠損の範囲は広がる傾向を示した。20回の施行に際して基底膜の断裂が僅かに認められた。

光学的顕微鏡による観察ではほとんど認められなかったこと、透過型よりも走査型電子顕微鏡による観察の方が傷害が大きい傾向であったことから、試料の固定、保存にも問題があった可能性があると考えられた。一方、人眼結膜上皮に対するブラッシュサイトロジーの場合、7回の擦過を行うのみであるため、基底膜に対する傷害はさらに少ないものと考えられる。

このように結膜上皮細胞のみを多数、完全ではないが single cell suspension として採取することができ

るため、今後、ブラッシュサイトロジーを利用して採取した結膜上皮細胞の flow cytometry を用いた DNA 量解析や、polymerase chain reaction (PCR) を用いた遺伝子解析などへの応用が可能であると考えられる。

文 献

- 1) 坪田一男, 宇賀神作次郎, 長谷川寿彦, 梶原一人: 結膜のブラッシュサイトロジー. 眼紀 40: 1456-1460, 1989.
- 2) Tsubota K, Kajiwara K, Ugajin S, Hasegawa T: Conjunctival brush cytology. Acta Cytol 34: 233-235, 1990.
- 3) Tsubota K, Takamura E, Hasegawa T, Kobayashi T: Detection by brush cytology of mast cells and eosinophils in allergic and vernal conjunctivitis. Cornea 10: 525-531, 1991.
- 4) Gupta RK, Naran S, Bakalar J, Fauk R, Buchanan A: Improvement in the quality of gynecological smears using a cytobrush. NZ Med J 100: 532-534, 1987.
- 5) 長谷川寿彦, 高橋峰夫, 木口一成, 筒井章夫: サイトブラシ (Cytobrush) 採取細胞診による頸管内病変の検討. 産婦の実際 36: 1009-1014, 1987.
- 6) 高橋峰夫, 木口一成, 長谷川寿彦, 筒井章夫, 佐川順子, 鈴木キクエ, 他: コルボスコピー不適例におけるサイトブラシ (Cytobrush) 細胞診の有効性に関する検討. 日臨細胞誌 25: 60-64, 1986.