

rds マウス網膜の形態学的研究

—視細胞と網膜色素上皮細胞との関係—

田原 昭彦

九州大学医学部眼科学教室

要 約

rds マウスの発達期および変性期の網膜を光学顕微鏡, 電子顕微鏡を用いて形態学的に検索した。*rds* マウスの網膜は生後6日までは同じ時期の正常マウス網膜と大差なかった。しかし, その後, 視細胞外節は発達せず, 全経過を通じて外節は観察されなかった。生後14日後, 視細胞内節および線毛は一定の方向に配列し, その方向に向かって網膜色素上皮細胞の微絨毛がまっすぐに伸びていた。生後21日以降の網膜では, 多数の内節や線毛が先端を網膜色素上皮細胞の微絨毛に囲まれて, 長く伸びていた。中には胞体側は正常の形態を示したが, 色

素上皮細胞の微絨毛に囲まれた遠位側が細くなって, 変性した内節や線毛も存在した。網膜色素上皮細胞の細胞質内には視細胞内節の一部と思われる物質が観察された。生後28日以降, 胞体や内節が変性, 崩壊した視細胞が多く見られた。以上の結果は, *rds* マウス網膜の視細胞の変性に網膜色素上皮細胞も関与する可能性を示す。(日眼会誌 99: 277-285, 1995)

キーワード: *rds* マウス, 網膜色素変性, 視細胞, 網膜色素上皮細胞, 電子顕微鏡

Histopathological Studies on the *rds* Mouse Retina —Relationship between Photoreceptor and Pigment Epithelial Cells—

Akihiko Tawara

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

We used light and electron microscopy to examine detailed ultrastructural changes in the course of the development and degeneration of the *rds* mouse (*rds/rds*) retina with particular reference to the relationship between the photoreceptor and retinal pigment epithelial cells. During the first 6 postpartum days, the mutant retina showed the same developmental pattern as in normal mice. After that, however, *rds* mouse retinas failed to develop the photoreceptor outer segments. After 14 days, the photoreceptor inner segments and the cilia were all arranged parallel in the same direction in which the pigment epithelial cells extend their long microvilli. The inner segments and the cilia were very long and surrounded by the microvilli of the retinal

pigment epithelial cells in the mutant retinas 21 days postpartum or latter. Some inner segments and cilia showed cytoplasmic degeneration in the part surrounded by the microvilli, while the other part appeared normal. There were pigment epithelial cells that contained fragments of the inner segments. The photoreceptor nucleus and inner segment were reduced in number after 21 days. These findings indicate that the pigment epithelial cells play a role in photoreceptor degeneration in *rds* mice. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 277-285, 1995)

Key words: *rds* mouse, Retinal degeneration, Photoreceptor cell, Pigment epithelial cell, Electron microscopy

I 緒 言

rds マウスは網膜色素変性の動物モデルの一種類で,

遺伝子の異常で発症する。*rds* マウスは retinal degeneration slow mouse の略で, *rd* マウス (retinal degeneration mouse) に比べて視細胞の変性がゆっくりと進行す

別刷請求先: 813 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学部眼科教室 田原 昭彦
(平成6年8月15日受付, 平成6年10月18日改訂受理)

Reprint requests to: Akihiko Tawara, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 812, Japan
(Received August 15, 1994 and accepted in revised form October 18, 1994)

ることから、このように命名されている。 *rds* マウスの遺伝子異常は17番目の染色体上にあつて、常染色体劣性遺伝の形式を取るとされる¹⁾²⁾。

ホモ接合体 *rds* マウス網膜の形態学的な特徴は、発育、変性の全過程を通じて視細胞外節が形成されることがなく、生後2週目から視細胞が徐々に変性し、消失して行くことである³⁾。そして、このような視細胞の変性の原因は視細胞自身にあり、自らが変性、崩壊して行くと考えられている⁴⁾⁵⁾。しかし、視細胞の変性機序や変性に網膜色素上皮細胞が関与するか否かについては不明である。そこで、*rds* マウスの網膜の発達および変性過程を視細胞と網膜色素上皮細胞との関係に注目して形態学的に検討した。

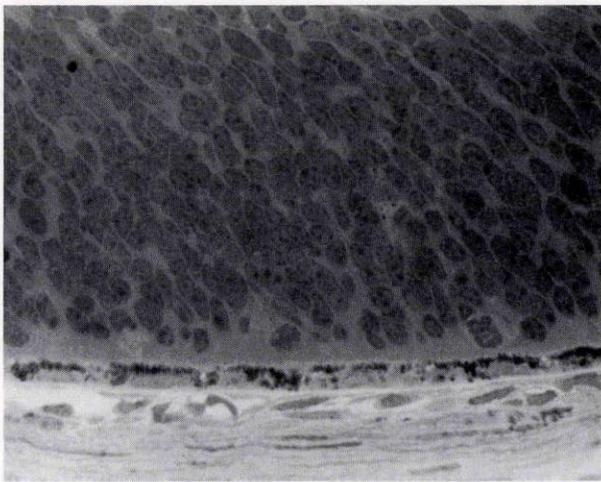


図1 生後2日の *rds* マウス網膜の光学顕微鏡写真。
網膜外層は未熟な細胞で占められ、層構造は見られない。アズールII染色

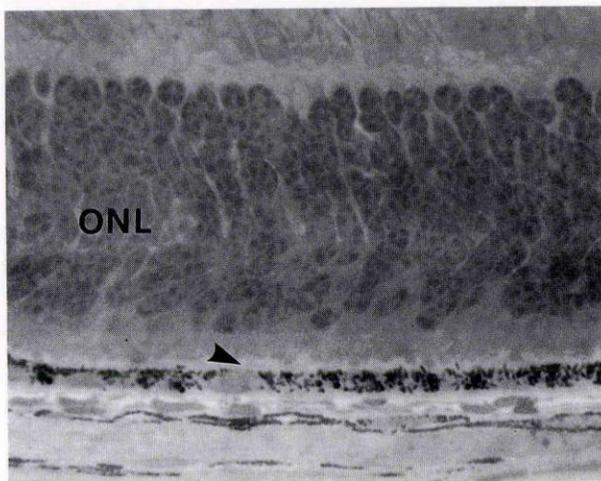


図2 生後10日の *rds* マウス網膜の光学顕微鏡写真。
外顆粒層 (ONL) が形成され、視細胞内節と網膜色素上皮層との間に視細胞間隙 (矢じり) が存在するが、外節は見られない。アズールII染色

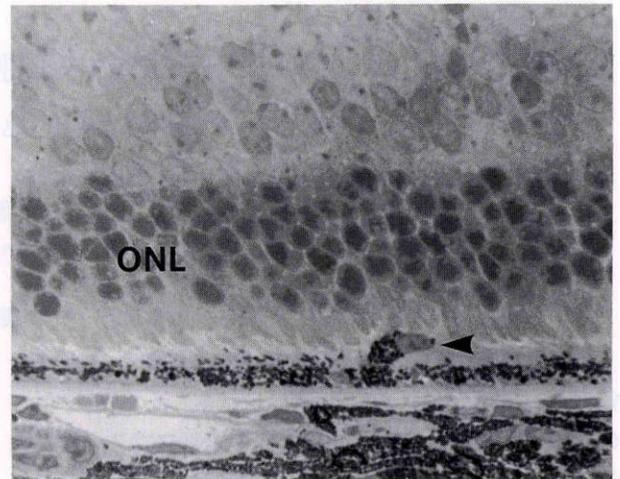


図3 生後2か月の *rds* マウス網膜の光学顕微鏡写真。

若い時期と比べて外顆粒層 (ONL) は薄くなっている。視細胞外節は存在しない。視細胞間隙に貪食細胞 (矢じり) が見られる。アズールII染色

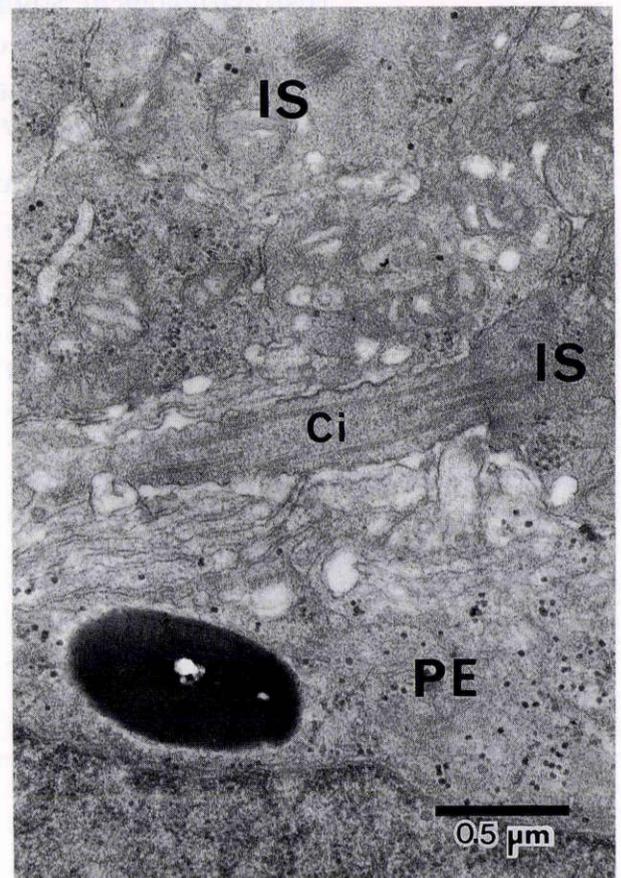


図4 生後6日の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。
視細胞内節 (IS) の先端は、一層の膜で囲まれた線毛 (Ci) が存在する。線毛の表面は波打つようにわずかに凹凸が見られる。外節は観察されない。視細胞と色素上皮細胞 (PE) とは接して存在し、その間に間隙はほとんど存在しない。

II 実験方法

1. 材料

今回の実験には、生後0日、2日、4日、6日、8日、10日、11日、2週、3週、1か月、2か月のC3H系ホモ接合体 *rds* マウス (遺伝子型: *rds/rds*) の網膜を使用した。

2. 方法

rds マウスの摘出眼球は直ちに2%ホルマリン、2.5%グルタルアルデヒド、0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) に浸し、角膜と水晶体を除去した。網膜を含む後眼部を4分割し、数日間固定液中に保存した。その後、組織を0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄して1%オスミウム酸で1時間、後固定し、アルコール系列で脱水してエポキシ樹脂に包埋した。ウルトラミクロトームで厚さ約1 μ mの切片を作成し、アズールIIで染色して光学顕微鏡で観察した。さらに、超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して電子顕微鏡で観察した。今回の観察には後極部網膜を使用した。

III 結果

1. 光学顕微鏡所見

生後2日の *rds* マウス網膜は未熟で、網膜全体は未熟な細胞で占められ、層構造は見られなかった(図1)。その後、徐々に細胞が層状に配列し、生後8日の網膜では成熟マウスと同様の層構造が形成されていた。生後10、11日の *rds* マウス網膜では、視細胞内節と網膜色素上皮層との間に間隙 (以下、後視細胞間間隙) が存在していたが、外節は見られなかった(図2)。生後14、21、28日の網膜では成長とともに外顆粒層の厚さが減じていた。時に視細胞の核が視細胞間間隙に見られた。生後21日以降の *rds* マウスで網膜の外顆粒層や視細胞間間隙に貪食細胞が見られた(図3)。しかし、全過程を通じて網膜外層の貪食細胞はわずかであった。生後2か月の網膜では若い時期と比べて外顆粒層はさらに薄くなっていた。いずれの時期においても視細胞の外節は存在しなかった(図1~3)。

2. 電子顕微鏡所見

生後2日および4日の *rds* マウスの網膜では、視細胞の胞体から、視細胞とミュラー細胞との接着装置を越え

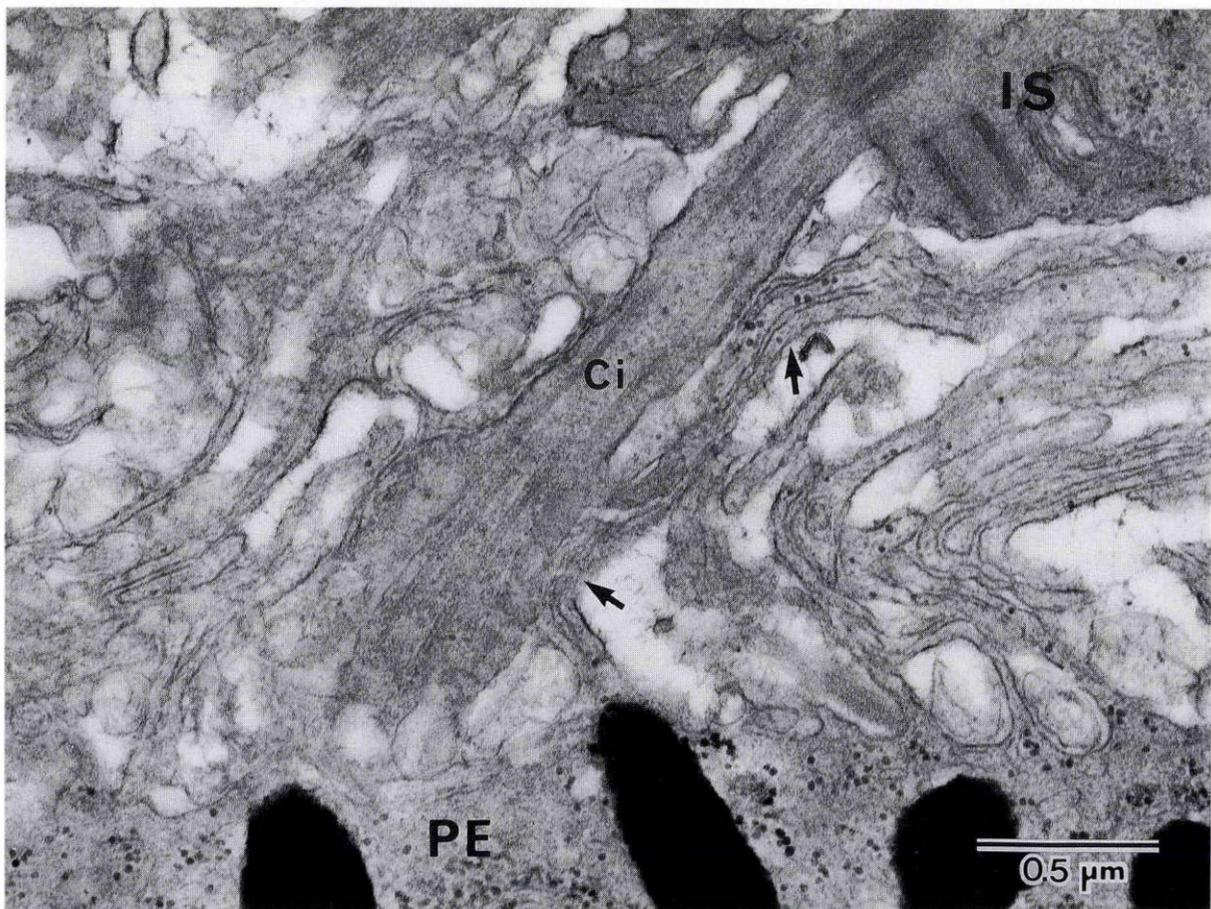


図5 生後10日の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。

視細胞内節 (IS) と網膜色素上皮細胞 (PE) との間には視細胞間間隙が形成されており、良く発達した網膜色素上皮細胞の微絨毛が内節および線毛 (Ci) に向かって伸びている (矢印)。外節の形成は見られない。

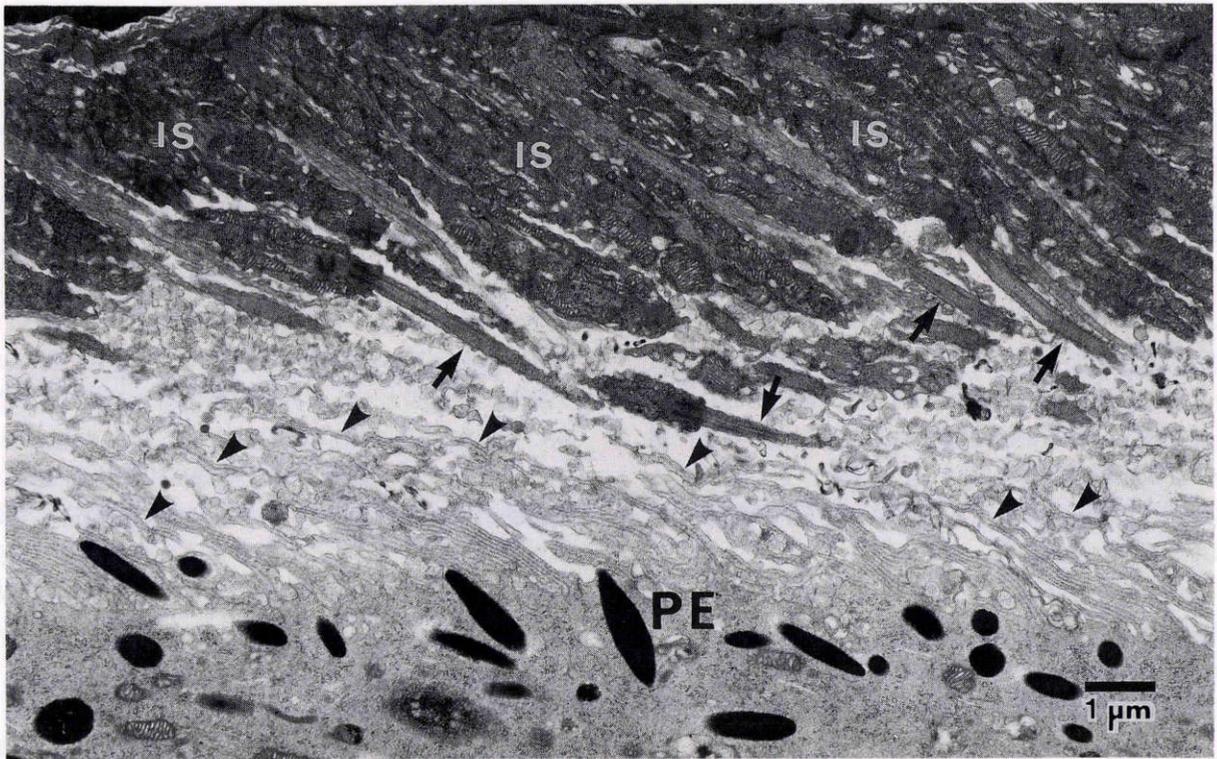


図6 生後14日の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。

早い時期の網膜と比較して視細胞内節 (IS) は長く、その先端に長く伸びた線毛 (矢印) を有している。内節および線毛は一定方向に配列して、その方向に向かって網膜色素上皮細胞の微絨毛 (矢じり) がまっすぐに伸びている。

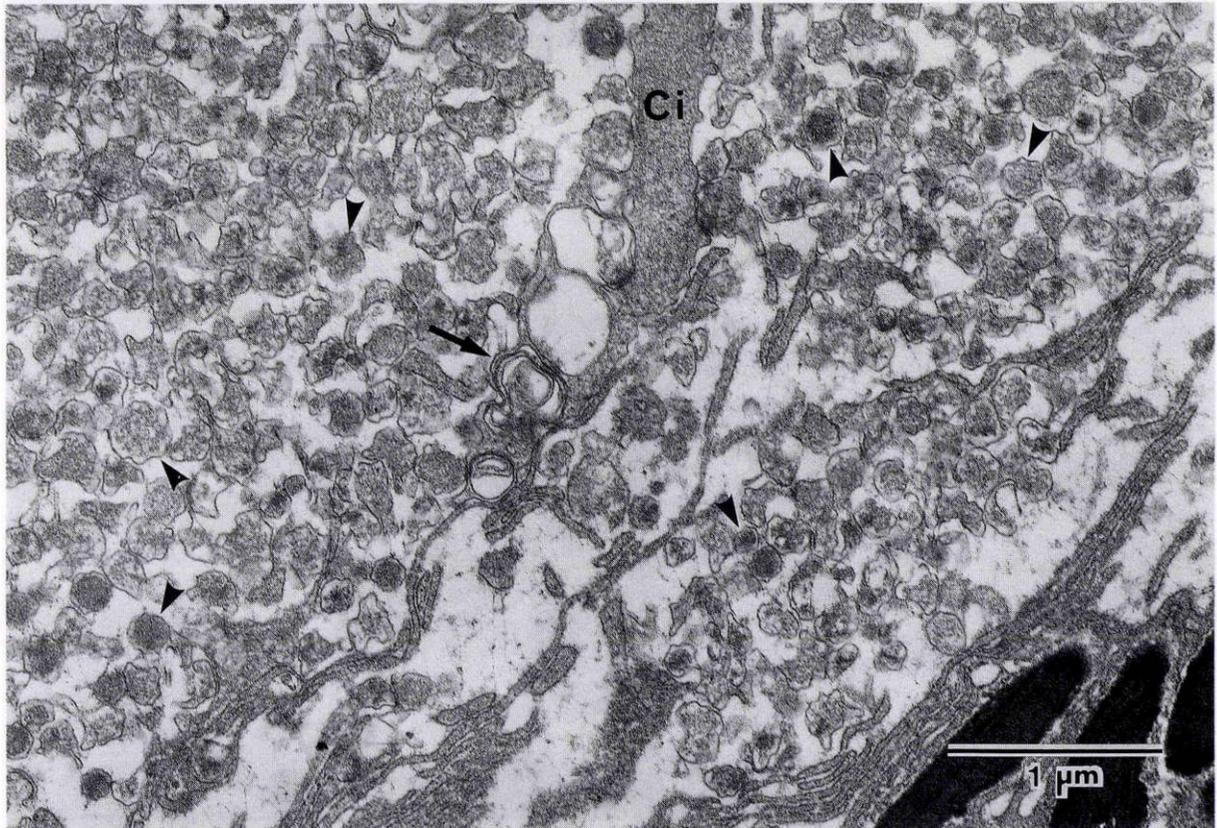


図7 生後21日の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。

線毛 (Ci) の先端に外節円板様の構造 (矢印) が存在するが、外節は見られない。視細胞間間隙は大量の vesicular structure (矢じり) で満たされている。

て、短い視細胞内節が存在した。視細胞外節は見られなかった。色素上皮細胞は視細胞内節と接して存在していて、両組織間にはほとんど間隙は存在しなかった。色素上皮細胞の微絨毛は短かった。視細胞および色素上皮細胞に変性所見はなかった。

生後6日の *rds* マウス網膜では、視細胞内節は早い時期のものに比べて、より長かった。内節の先端には、正常網膜では結合線毛に発達する、一層の膜で囲まれた突起（以下、線毛）がしばしば観察された（図4）。線毛の表面は波打ったようにわずかに凹凸が見られた。外節は観察されなかった。色素上皮細胞の微絨毛は早い時期よりわずかに長く、線毛や内節に向かって伸びている部位もあった。視細胞と色素上皮細胞とは接して存在し、その間に間隙はほとんど存在しなかった。視細胞に変性は見られなかった（図4）。

生後8日および10日のマウス網膜では、線毛の先端に外節円板様の膜組織がわずかに観察される部位もあった

が、外節の形成は見られなかった。内節および線毛は早い時期のものに比べて長さが長かったが、表面が凹凸不正になった部位が多く見られた。視細胞の明らかな変性所見はなかった。網膜色素上皮細胞は良く発達した微絨毛を有し、微絨毛は内節、線毛に向かって伸びていた。色素上皮細胞の微絨毛は、凹凸不正な内節や線毛の突出部にしばしば接触していた（図5）。視細胞の長軸に対して直角な平面で切った切片で、視細胞内節や線毛は表面の凹凸のある不正円形を呈し、突出部に色素上皮細胞の微絨毛が接触していた。網膜色素上皮細胞は、先端側の細胞質中に空胞がわずかに観察された。視細胞層と色素上皮細胞層との間には狭い視細胞間隙が存在し、数層の膜構造を示す不正円形の高電子の物質が観察された。またこの間隙には、Jansen ら⁶⁾が vesicular structure と呼んだ一層の細胞膜で囲まれたほぼ円形の構造物がしばしば見られた。この構造物は様々な電子密度を示した。生後11日、14日、21日の網膜では、視細胞内節はさ

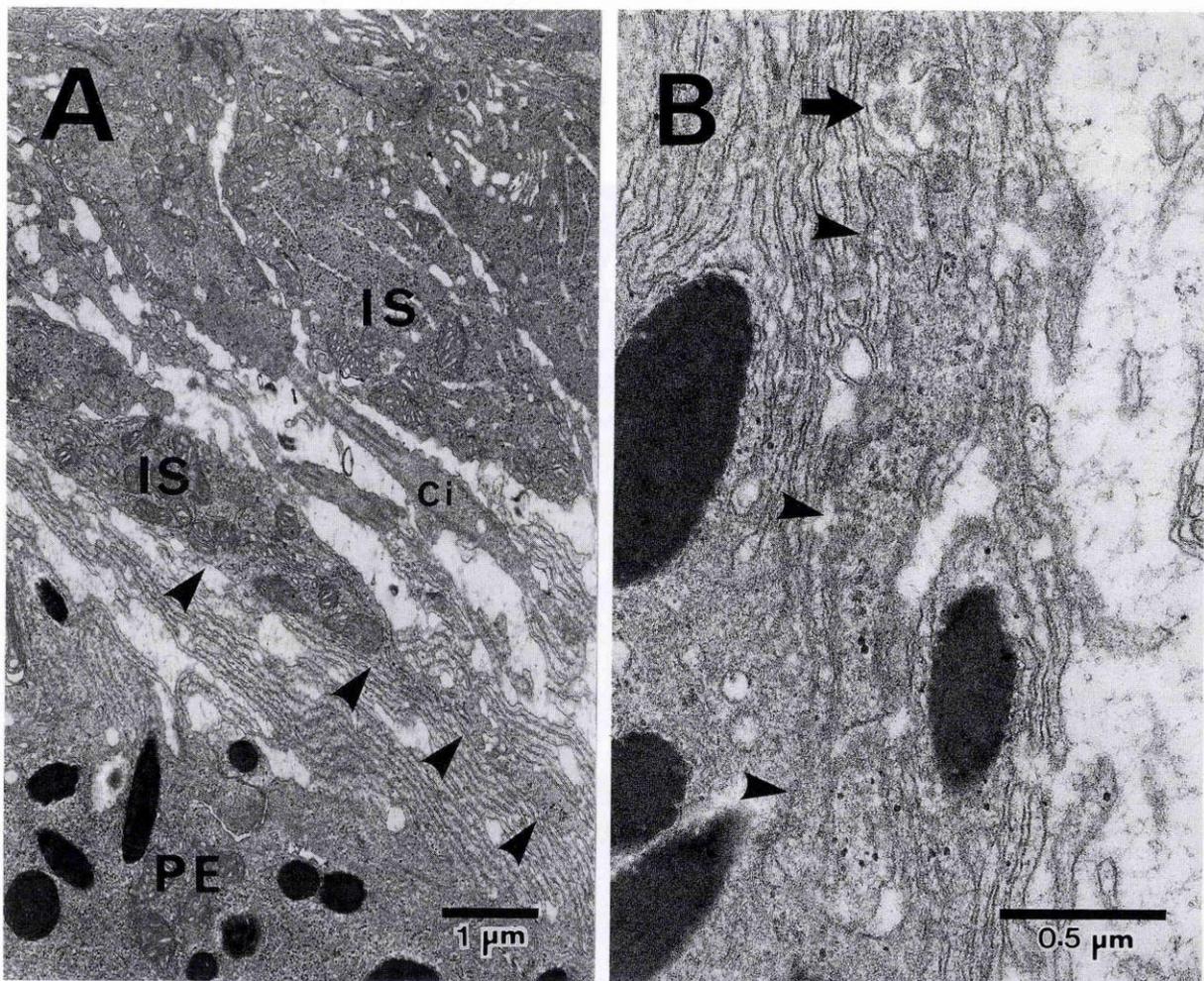


図8 生後28日の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。

A：先端を多数の網膜色素上皮細胞の微絨毛に囲まれて、長く伸びた内節（矢じり）が存在する。その内節の胞体側は正常の形態を示す。B：Aの内節の色素上皮細胞の微絨毛に囲まれた遠位側（矢じり）の拡大。先端は細くなり電子密度も低下して変性している。細胞質内には空胞（矢印）が存在する。IS：内節、PE：網膜色素上皮細胞、Ci：線毛

らに長く、その先端に長く伸びた線毛を有していた。内節および線毛は一定方向に配列して、その方向に向かって網膜色素上皮細胞のすべての微絨毛がまっすぐに伸びていた(図6)。この状態は切片の方向に関係なく見られた。視細胞内節は表面が凹凸不正であった。内節の中には細胞質中に多くの空胞が存在するものがあった。線毛は色素上皮細胞に向かって長く伸びていて、その先端は色素上皮細胞の微絨毛に接しているものが見られた。一部の線毛はその先端に外節円板様の構造が観察されたが、外節は存在しなかった(図7)。視細胞間隙は出生早期のものに比べてさらに広く、大量の vesicular structure で満たされていた(図7)。また、この間隙には高電子の膜構造物も観察された。網膜色素上皮細胞は視細胞内節や線毛に向かう長い微絨毛を有していた。しかし、視細胞間隙が広く、vesicular structure で満たされているため、色素上皮細胞の微絨毛が直接内節に接する部位は出生の早い時期と比べて少なかった。網膜色素上皮細胞の細胞質内には多数の空胞が存在し、細胞質全体が多量の空胞で占められた細胞も見られた。空胞の中に貪食物が存在するものもあった。また、視細胞間隙で観察された高電子の物質を取り込んだ空胞も見られた。色素上皮細胞に変性はなかった。

生後28日の *rds* マウス網膜では、核が濃縮し、核周囲部が変性した視細胞胞体が存在した。このような変性した胞体は、色素上皮細胞近くの視細胞間隙中にも見られた。内節は数が減少し、長さも短くなっていた。先端を多数の網膜色素上皮細胞の微絨毛に囲まれて、長く伸びた内節が存在した。その内節の胞体側は正常の形態を示したが、色素上皮の微絨毛に囲まれた遠位側は細くなり、細胞質内に空胞が存在して、変性していた(図8)。内節には大きな空胞を持つもの、細胞質が変性したものの、崩壊したものが観察された。内節が欠損した部位も見られたが、そのような部位では、多数のミュラー細胞の突起が色素上皮細胞に向かってまっすぐ伸びていた。線毛は細長く伸び、先端部が色素上皮細胞の微絨毛で囲まれて、極端に細く、不正形を示すものが多数見られた(図9)。生後14日、21日の網膜に比べて、視細胞間隙は狭く、vesicular structure も少なかった(図8, 9)。色素上皮細胞の微絨毛はこの間隙を横切って視細胞に向かって伸びていて、内節や線毛に接していた。網膜色素上皮細胞の細胞質内に、電子密度が高く、変性したミトコンドリアを有する貪食物が観察された。貪食物の直径は約 $1\mu\text{m}$ で、細胞質が大部分を占めていた(図10)。色素上皮細胞に明らかな変性は見られなかった。

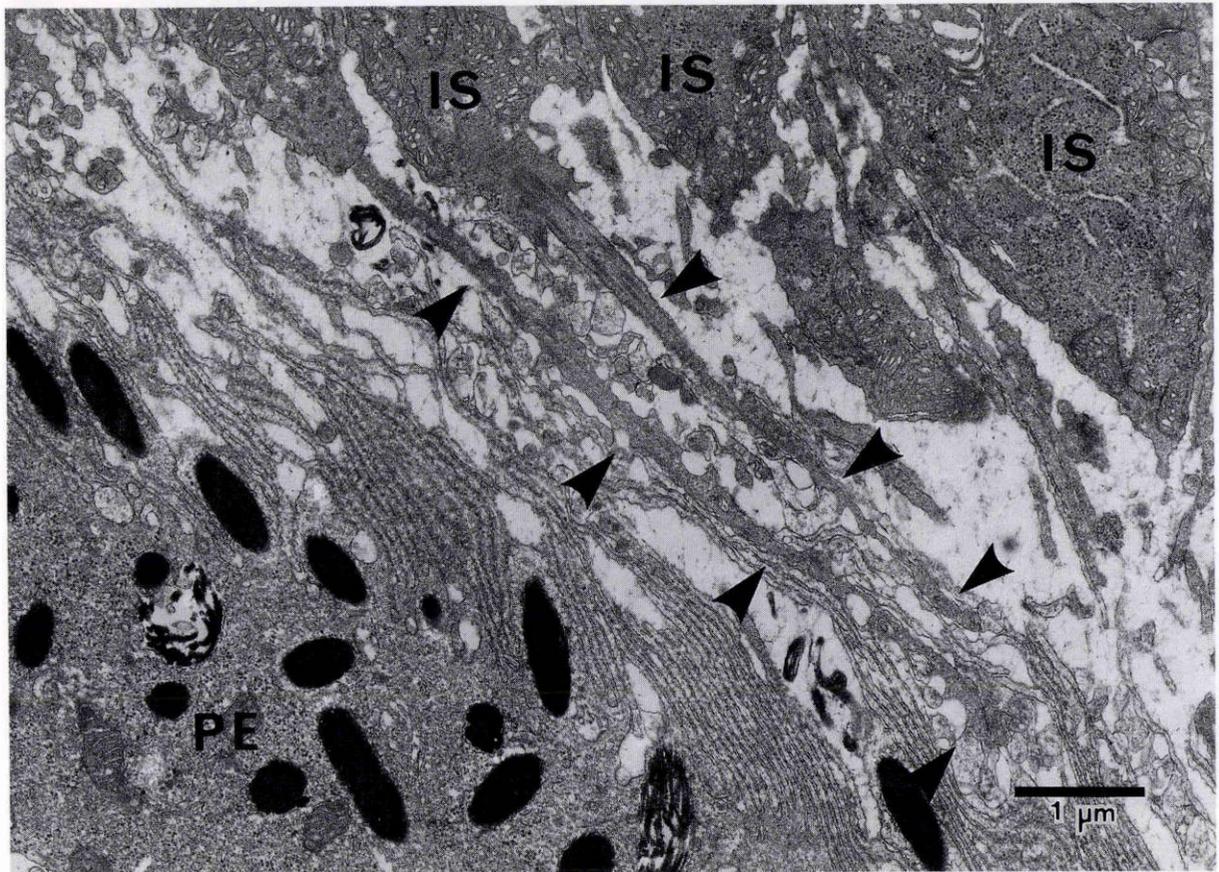


図9 生後28日の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。

線毛(矢じり)は細長く伸び、先端部が色素上皮細胞の微絨毛で囲まれて、極端に細く、不正形を示している。IS:内節, PE:網膜色素上皮細胞

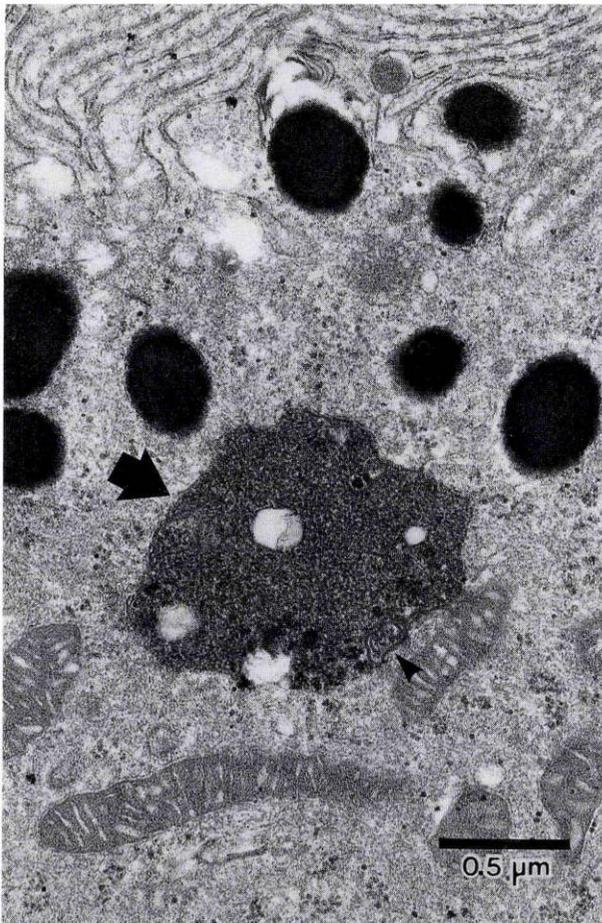


図10 生後28日の *rds* マウス網膜の網膜色素上皮細胞の電子顕微鏡写真。

細胞質内には、視細胞内節の一部と思われる変性した物質(矢印)が存在する。変性物は変性した細胞内小器官(矢じり)を含んでいる。

生後2か月の *rds* マウス網膜は生後28日の網膜と類似していたが、視細胞内節の数はさらに少なく、長さもより短かった。また、変性した内節の数も多かった(図11)。

IV 考 按

rds マウス網膜の視細胞の経時的变化を、先に報告した正常C3Hマウス網膜⁷⁾と比較すると、生後6日までは視細胞の発達に *rds* マウスと正常マウスとで差はなかった。しかし、6日以降、正常マウス網膜では視細胞外節が徐々に形成されたが、*rds* マウスでは全経過を通じて外節が形成されることはなかった。また、生後21日以降、*rds* マウス網膜では視細胞の変性、崩壊が進み、核や内節が徐々に減少した。以上の所見は、*rds* マウス網膜では視細胞は外節を形成することなく徐々に変性、消失して行くとの報告⁶⁾⁸⁾⁹⁾と一致する。

正常マウス網膜で視細胞外節が形成され始める生後6日以降、*rds* マウスでは網膜色素上皮細胞の微絨毛が線毛や内節に向かって伸び、凹凸不正となった内節や線毛

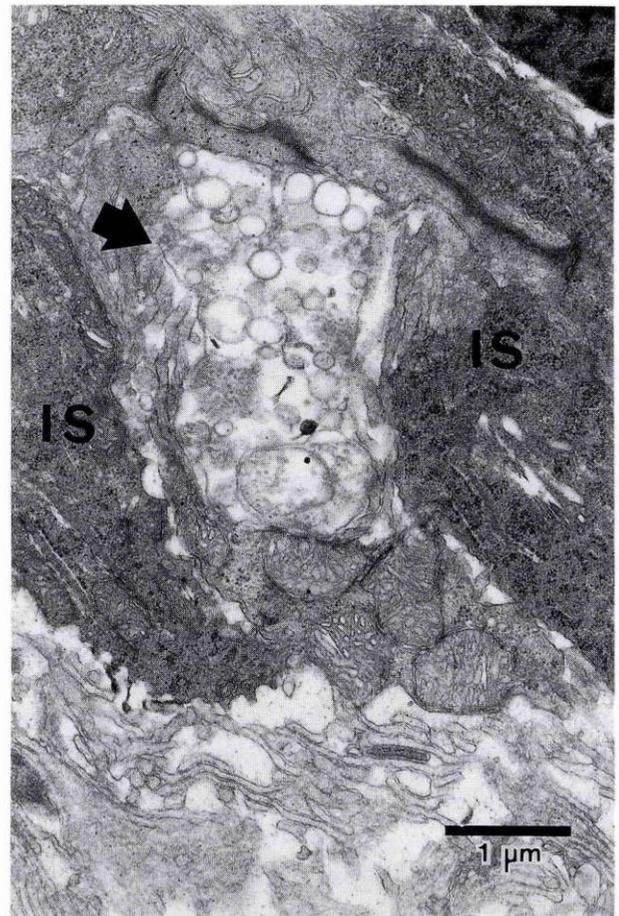


図11 生後2か月の *rds* マウス網膜の電子顕微鏡写真。

内節(IS)は非常に短くなり、一部崩壊している(矢印)。

の表面の突出部としばしば接触していた。また、正常マウスで外節が整然と配列してくる生後14日以降、*rds* マウス網膜では視細胞の内節や線毛が一定方向に配列して、その方向に向かって網膜色素上皮細胞のすべての微絨毛がまっすぐに伸びていた。網膜色素上皮細胞は視細胞外節の発達や分化に関与する⁷⁾¹⁰⁾。また、視細胞間基質にプロテオグリカンや糖蛋白を産生して、視細胞と網膜色素上皮細胞との接着を保つ⁷⁾¹¹⁾。このように正常網膜で、網膜色素上皮細胞は視細胞の発達や形態保持に密接に関係しており、*rds* マウス網膜で見られた上記の所見は、*rds* マウスでも網膜色素上皮細胞と視細胞とが互いに作用していることを示すものと考えられる。先に *rds* マウス網膜をクプロメロニックブルーを使用して組織化学的に調べた結果では、正常マウス網膜と同様に *rds* マウスでも視細胞の発育とともにプロテオグリカンが出現し、視細胞と網膜色素上皮細胞との間隙を埋めていた。そして、視細胞が完全に消失した生後20か月の網膜ではプロテオグリカンはわずかに存在したのみで、間隙も消失していた¹²⁾¹³⁾。視細胞間隙のプロテオグリカンの産生に網膜色素上皮が関与する⁷⁾。したがって、*rds* マウス

網膜で視細胞の変化に伴ってプロテオグリカンが変化することは、*rds* マウス網膜における視細胞と網膜色素上皮細胞との相互作用を示すものと考えられる。

rds マウス網膜の視細胞変性の原因は視細胞自身にあると考えられ、網膜色素上皮細胞の関与はあまり重視されていない⁴⁾⁵⁾¹⁴⁾。生後14日以降の *rds* マウス網膜で、網膜色素上皮細胞の微絨毛に囲まれた線毛や内節が長く伸びて、変性していた。このような内節や線毛は、胞体に近い部分は比較的正常の構造を保っていたが、色素上皮細胞の微絨毛に囲まれた先端の部分が細く、不整になっていた。正常マウス網膜では、生後14日頃から視細胞外節が網膜色素上皮の微絨毛と指状陥合を形成し、外節の脱落が盛んになる。この視細胞と網膜色素上皮との相互作用が確立する時期に、*rds* マウス網膜で網膜色素上皮細胞の微絨毛に囲まれた内節や線毛が変性し、網膜色素上皮細胞と直接接しない部は正常構造を示した所見は、*rds* マウス網膜で視細胞の変性に網膜色素上皮細胞が積極的に関与することを示唆する。正常網膜では網膜色素上皮細胞が視細胞を変性させることはない。網膜色素変性の他の動物モデルである RCS ラットでは網膜色素上皮細胞に異常があり、そのために正常な視細胞が変性するとされる¹⁵⁾。このことは網膜色素上皮細胞と視細胞とのいずれか一方に異常がある場合、他方も正常とは異なった状態になり得ることを示しており、視細胞に異常がある *rds* マウス網膜で、網膜色素上皮細胞が視細胞の変性を助長するという正常とは異なる行動をとる可能性のあることを支持する。

rds マウス網膜で、網膜色素上皮細胞中に貪食物が観察された。生後28日の網膜で見られた貪食物は変性したミトコンドリアを有し、細胞質の一部と同定された。この貪食物は直径が約1 μ mと大きく、細胞質が大部分を占めていたことから自家食胞とは考え難く、内節の一部と思われた。*rds* マウスの網膜色素上皮細胞が正常の貪食能を有することが知られている⁴⁾⁵⁾。正常網膜では視細胞外節が定期的に脱落して、網膜色素上皮細胞が脱落した視細胞外節を貪食する。この外節の脱落に網膜色素上皮細胞が関与することが示唆されている¹⁶⁾。したがって、*rds* マウス網膜色素上皮細胞中に観察された内節の一部は細胞構造が比較的良く保たれていたことから、色素上皮細胞が、視細胞間隙中に存在する崩壊した視細胞の断片を貪食した可能性とともに、微絨毛で囲まれて変性した視細胞の一部を貪食した可能性も否定できない。つまり、*rds* マウス網膜では、網膜色素上皮細胞が視細胞の変性を積極的に促進させ、さらに変性した視細胞を貪食している可能性も考えられる。

今回の形態学的研究から、*rds* マウス網膜の視細胞の変性は視細胞自身が有する異常のために起こるとともに、網膜色素上皮細胞も視細胞の変性を促進させるように作用している可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、論文をご校閲していただいた猪俣孟教授に深謝いたします。また、NEI grant EY06841 を通じて *rds* マウスの眼球を供給していただいた Erasmus University (Rotterdam) の Dr. Somye C. Sanyal に深謝いたします。

文 献

- 1) van Nie R, Iványi D, Démant P: A new H-2 linked mutation, *rds*, causing retinal degeneration in the mouse. *Tissue Antigens* 12: 106-108, 1978.
- 2) Démant P, Iványi D, van Nie R: The map position of the *rds* gene on the 17th chromosome of the mouse. *Tissue Antigens* 13: 53-55, 1979.
- 3) Snyal S, Jansen HG: Absence of receptor outer segments in the retina of *rds* mutant mice. *Neurosci Lett* 21: 23-26, 1981.
- 4) Sanyal S, Zeilmaker GH: Development and degeneration of retina in *rds* mutant mice: Light and electron microscopic observations in experimental chimeras. *Exp Eye Res* 39: 231-246, 1984.
- 5) Sanyal S: Cellular site of expression and genetic interaction of the *rd* and the *rds* loci in the retina of the mouse. In: Hollyfield JG, et al (Eds): *Degenerative Retinal Disorders. Clinical and Laboratory Investigations*. Alan R Liss Inc, New York, 175-194, 1987.
- 6) Jansen HG, Sanyal S: Development and degeneration of retina in *rds* mutant mice: Electron microscopy. *J Comp Neurol* 224: 71-84, 1984.
- 7) Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. II. Origin and development of proteoglycans. *Exp Eye Res* 48: 815-839, 1989.
- 8) Sanyal S, De Ruiter A, Hawkins RK: Development and degeneration of retina in *rds* mutant mice: Light microscopy. *J Comp Neurol* 194: 193-207, 1980.
- 9) Cohen AI: Some cytological and initial biochemical observations on photoreceptors in retinas of *rds* mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 832-843, 1983.
- 10) Weidman TA, Kuwabara T: Postnatal development of the rat retina: An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 79: 470-484, 1968.
- 11) Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. I. Histochemical studies using cuproline blue. *Exp Eye Res* 46: 689-704, 1988.
- 12) Tawara A, Hollyfield JG: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. III. Changes during photoreceptor development and degeneration in the *rds* mutant. *Exp Eye Res* 51: 301-315, 1990.
- 13) Tawara A, Hollyfield JG: Proteoglycans in the *rds* mouse interphotoreceptor matrix before and after photoreceptor loss. In: Hollyfield, JG, et al (Eds): *Retinal Degenerations*. CRC Press, Boca Raton, 217-225, 1991.

- 14) **Travis GH, Brennan MB, Danielson PE, Kozak CA, Sutcliffe JG**: Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (*rds*). *Nature* 338: 70—73, 1989.
 - 15) **Bok D, Hall MO**: The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol*, 49: 664—682, 1971.
 - 16) **Bok D**: Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions: Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1659—1694, 1985.
-