

## サル眼毛様体筋毛細血管の horseradish peroxidase 透過性

国吉 直美<sup>1)</sup>, 相良 洋<sup>2)</sup>, 長瀧 重智<sup>1)</sup>, 廣澤 一成<sup>2)</sup><sup>1)</sup>琉球大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>東京大学医科学研究所微細形態学研究所

## 要 約

リスザル (*Saimiri sciurea*) 毛様体筋毛細血管の微細形態と西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 透過性を検討した。毛様体筋毛細血管内皮細胞は無窓で、外側を基底膜で覆われ、細胞間は閉鎖帯で接着していた。胞体には小胞が豊富で、輪状筋と放射状筋の毛細血管では直径が 100~500 nm の空胞様構造が観察された。前房を HRP で灌流すると、30 分後に毛様体筋の血管内腔に 3,3'-ジアミノベンチジン反応産物が存在した。一方、HRP を静脈投与すると、15 分後に

は毛様体の筋細胞間の間隙に反応産物が存在した。反応産物は血管内皮細胞胞体内の小胞や空胞様構造の内腔にも観察され、これらの構造が HRP を内腔側から基底膜側、あるいはその逆の方向に輸送していると考えられた。(日眼会誌 99:526-531, 1995)

キーワード: 毛様体筋, 毛細血管, 血管透過性, 西洋ワサビペルオキシダーゼ

## Permeability to Horseradish Peroxidase of the Ciliary Muscle Vessels of Squirrel Monkeys

Naomi Kuniyoshi<sup>1)</sup>, Hiroshi Sagara<sup>2)</sup>, Shigetoshi Nagataki<sup>1)</sup> and Kazushige Hirosawa<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, University of Ryukyus Faculty of Medicine<sup>2)</sup>Department of Fine Morphology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo

## Abstract

The morphology and permeability to horseradish peroxidase (HRP) of the ciliary muscle capillaries of squirrel monkeys were studied. The endothelial cells of the capillaries were of the continuous type and the interendothelial clefts were closed by a zonula occludens. Many vesicles were present in the cytoplasm of the endothelial cells. In addition to these vesicles, large vacuole-like structures, 100~500 nm in diameter, were observed in the cytoplasm of capillary endothelium, especially in the circular and radial ciliary muscles. When HRP was perfused into the anterior chamber, the 3,3'-diaminobenzidine reaction product was observed in the lumen of the

ciliary muscle vessels after 30 minutes. When HRP was administered intravenously, the reaction product was observed among the muscle fiber bundles after 15 minutes. In both cases, the reaction products were also present in the cytoplasmic vesicles and vacuole-like structures, suggesting that these structures are involved in the bidirectional transport of HRP between interstitium and blood. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:526-531, 1995)

Key words: Ciliary muscle, Capillary, Vessel permeability, Horseradish peroxidase

## I 緒 言

房水の循環機構において、毛様体は房水産生だけでなく、毛様体筋の収縮が線維柱帯の間隙を拡大して Schlemm 管への流出を増加させたり<sup>1)</sup>、房水の一部が線維柱帯から毛様体筋束の間隙を通過して上毛様体腔や上脈

絡膜腔へ流れ、強膜を通過して眼外に流出(ぶどう膜強膜流出<sup>2)</sup>)するなど、房水の流出にも深く関わっている。

毛様体突起の血管については血管内皮細胞が有窓で、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) や血清アルブミンのような分子量の大きい物質も透過することなど、微細形態や透過性に関する研究があ

別刷請求先: 903-01 沖縄県中頭郡西原町字上原 207 琉球大学医学部眼科学教室 国吉 直美

(平成 6 年 10 月 24 日受付, 平成 6 年 12 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Naomi Kuniyoshi, M.D. Department of Ophthalmology, University of Ryukyus, Faculty of Medicine, 207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa-ken 903-01, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form December 10, 1994)

り<sup>3)</sup>,最近もサル眼毛様体突起の血管構築について, Morrisonら<sup>4)</sup>, Funkら<sup>5)</sup>が血管鑄型標本を用いて研究している。これに対して毛様体筋の血管については,血管内皮細胞が無窓で毛様体突起の血管内皮細胞よりも厚く<sup>6,7)</sup>,静脈投与したHRPは血管を透過しないとの報告<sup>7)</sup>があるにすぎず, Morrisonら<sup>8)</sup>は毛様体筋血管の房水動態への関与はないと述べている。

しかし,毛様体筋には前毛様体動脈の枝と長後毛様体動脈の枝が毛様体筋内で吻合して形成した血管輪に由来する毛細血管が密に存在し<sup>9)</sup>,単位組織重量当たりの血流量は毛様体突起の3/4,虹彩の3倍と極めて大きい<sup>10)</sup>。また,毛様体筋の緊張はぶどう膜強膜流出に大きく影響し,流出はピロカルピンによる筋収縮で抑制され<sup>11)</sup>,アトロピンで増大する<sup>12)</sup>。さらに,筋線維間を流れる間に房水が毛細血管に吸収あるいは拡散して渦静脈に流出する経路(uveo-vortex outflow)の報告<sup>13,14)</sup>など,房水動態に毛様体筋血管が関与している可能性は否定できない。本研究では,サル眼毛様体筋血管の透過性を知ることを目的に,リスザルの毛様体筋毛細血管の微細形態とHRP透過性を検討した。

## II 実験方法

実験には,体重0.5~1.0 kgのリスザル(*Saimiri sciurea*) 5匹を用いた。麻酔は塩酸ケタミン(ケタラール®)(30 mg/kg)とペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)(30 mg/kg)を使用し,必要に応じてペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)(5 mg/kg)を適宜追加した。血管透過性の標識物質にはHRP(Type II, Sigma Chemical Co, 分子量40,000)を用いた。最初にリスザル毛様体筋血管の微細形態を観察し,次に,前房および静脈に投与したHRPの毛様体筋における分布を観察した。

### 実験1:毛様体筋毛細血管の微細形態

リスザル1匹を用いた。全身麻酔下に開胸し,右心耳から寫血しながら左心室から0.1 M 燐酸緩衝液を灌流し,次いで,2%ホルムアルデヒド-1%グルタルアルデヒドを含む0.1 M 燐酸緩衝固定液を灌流して固定した。眼球を摘出し,2%ホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1 M 燐酸緩衝固定液に浸漬して固定した。眼球を赤道部で二分して水晶体を除去し,毛様体を含んだ約3×5 mmの組織片を1%オスミウム酸で後固定した。エタノール系列で脱水後,エポキシ樹脂に包埋し,包埋試料の超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し,透過型電子顕微鏡(JEM-1200 EX, 日本電子)で観察した。

### 実験2:HRPの前房灌流

リスザル2匹を用いた。全身麻酔下に両眼の前房を穿刺して房水を採取後,27ゲージ注射針を前房に挿入し,Dulbecco 燐酸緩衝液にHRPを100 mg/mlの濃度に溶

解した液を約5 cmの高さから灌流した。15分あるいは30分後に致死量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)静注で屠殺し,眼球を摘出して2%ホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1 M 燐酸緩衝固定液で固定した。細切した組織片を凍結切片用包埋剤(OCT compoud, Miles Inc)に包埋して10 μmの切片を作製し,ポリ-L-リジンコート付きスライドガラスに貼付して乾燥させた。0.1 M 燐酸緩衝液で5分間3回,0.05 M Tris 塩酸緩衝液(pH 7.6)で5分間2回洗浄後,0.05 M Tris 塩酸緩衝液50 mlに3,3'-ジアミノベンチジン(Sigma Chemical Co, diaminobenzidin, DAB)25 mgを溶解した液で30分間,次いで,上記の液に0.5 mlの1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えた溶液で30分間37°Cで反応させた。0.1 M 燐酸緩衝液で洗浄後,光学顕微鏡で観察した。一部は1%オスミウム酸で後固定し,エタノール系列で脱水後,エポキシ樹脂で満たしたゼラチンカプセルをスライドガラスに載せた切片にかぶせて包埋し,作製した超薄切片をクエン酸鉛で染色して電子顕微鏡で観察した。

### 実験3:HRPの静脈投与

リスザル2匹を使用した。全身麻酔下で大腿静脈を露出し,Dulbecco 燐酸緩衝液に溶解したHRPを体重1 kgにつき500 mg静注した。15分あるいは30分後に致死量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)を静注して屠殺し,速やかに眼球を摘出後,実験2と同じ手順で試料を作製して光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。

## III 結果

### 1.毛様体筋毛細血管内皮細胞の微細形態

毛様体筋毛細血管の内皮細胞は無窓で,外側を基底膜で完全に覆われ,細胞間は閉鎖帯で接着していた。内皮細胞は扁平で異染色質に富んだ核をもち,胞体には小胞が豊富にあり,また,輪状筋と放射状筋の毛細血管内皮細胞では直径が100~500 nmと小胞よりも大きい空胞様の構造が観察され,内腔には血漿成分と思われる不定形な構造物や微小管様の構造物が存在していた(図1)。連続切片により詳しく観察すると,空胞様構造が血管内腔側や基底膜側に開口していた。

### 2.前房に投与したHRPの分布

前房に投与したHRPの虹彩毛様体における分布を光学顕微鏡で観察したところ,15分間の灌流では強膜岬近辺の毛様体筋にDAB反応産物がわずかに存在していた。30分間の灌流では,DAB反応産物は毛様体ひだ部から眼球壁にかけて楔状に高濃度に存在していた。透過型電子顕微鏡で観察したところ,灌流15分では毛様体筋の筋細胞間の間隙,血管内皮細胞の基底膜および一部の内皮細胞胞体の小胞にDAB反応産物が存在していたが,血管内腔にはDAB反応産物は存在しなかった(図2)。

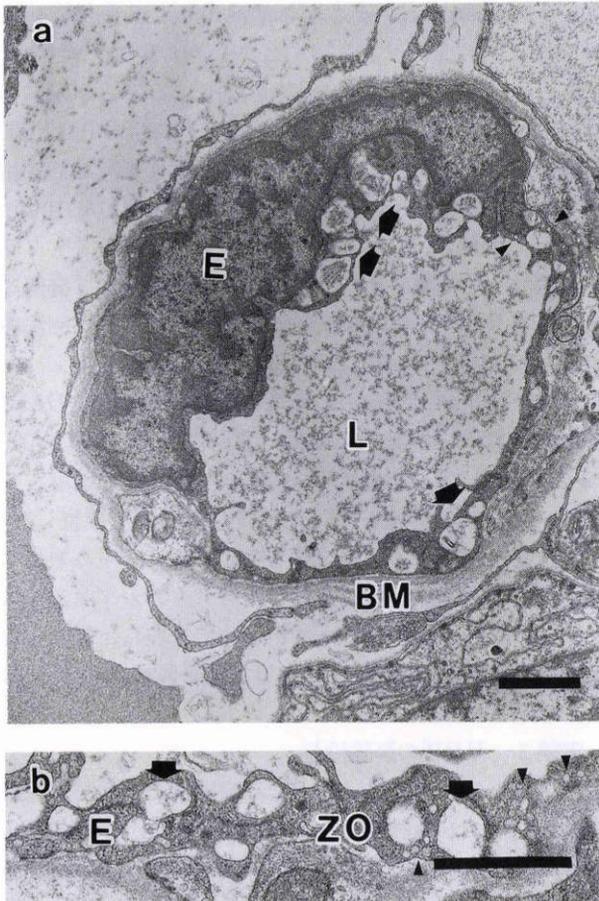


図1 リスザル毛様体筋毛細血管の微細形態。血管内皮細胞 (E) は無窓で、胞体に多数の小胞 (矢じり) と直径 100~500 nm の空胞様構造 (矢印) がみられる。E: 内皮細胞胞体, L: 血管内腔, BM: 基底膜, ZO: 閉鎖帯。バーは 1  $\mu$ m

DAB 反応産物を含んだ小胞は胞体の基底膜側に多く、小胞の融合を思わせる像も観察された。また、空胞様構

造の内腔にも DAB 反応産物が認められた。30 分間の灌流では毛様体筋毛細血管の内腔に DAB 反応産物が観察され、DAB 反応産物を含んだ小胞が胞体の管腔側にも多くみられた (図 3)。虹彩では灌流 15 分で実質結合組織間の空隙、毛細血管内皮細胞胞体の小胞と血管内腔に DAB 反応産物が存在していた (図 4)。内皮細胞間の閉鎖帯は 15 分および 30 分灌流のいずれでも閉じていた。

### 3. 静脈投与した HRP の分布

光学顕微鏡での観察では、15 分および 30 分後ともに毛様体筋全体に DAB 反応産物が存在していた。透過型電子顕微鏡で観察すると、静注 15 分および 30 分ともに毛様体筋毛細血管の内腔、内皮細胞胞体の小胞と空胞様構造、内皮細胞の基底膜および筋細胞間の空隙に DAB 反応産物が存在していた (図 5)。虹彩血管では 15 分および 30 分ともに血管内腔と内皮細胞胞体の空胞に反応産物が存在していたが、血管を囲む組織には観察されなかった (図 6)。

## IV 考 按

今回の実験で使用したリスザルはオマキザル (Ceboidea) 上科に属し、実験動物としてよく用いられる *Macaca* 属に類似した隅角を有する<sup>15)</sup>。リスザルの毛様体筋毛細血管の内皮細胞は無窓で、外側が基底膜で完全に覆われ、細胞間は閉鎖帯で接着していた。内皮細胞の胞体には小胞が豊富に存在し、骨格筋に存在する無窓の血管内皮細胞<sup>16)</sup>と円じ形態であった。輪状筋と放射状筋には直径 100~500 nm の空胞様構造が観察されたが、酵素組織化学的に酸ホスファターゼは検出されず、ライソゾームとは異なる構造と思われた (未発表データ)。次に、HRP を前房灌流あるいは静脈投与して毛様体筋毛細血管の透過性を観察したところ、前房灌流では 30 分後に

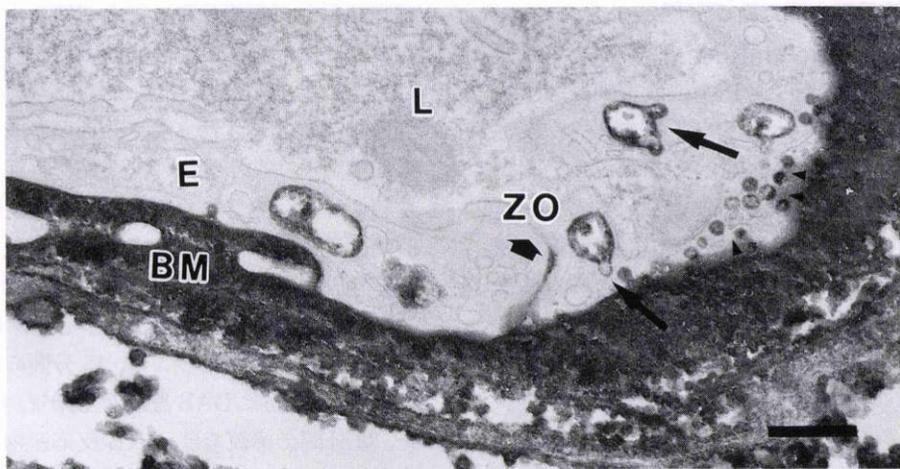


図2 西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 前房灌流 15 分後の毛様体筋毛細血管。ジアミノベンチジン (diaminobenzidin, DAB) 反応産物が血管内皮細胞 (E) の基底膜 (BM)、胞体の小胞 (矢じり)、空胞様構造と小胞とが融合していると思われる構造 (大矢印) の内腔に存在している。内皮細胞間隙の反応産物は閉鎖帯 (ZO) で止まっている (小矢印)、血管内腔に反応産物はみられない。E: 内皮細胞胞体, L: 血管内腔, BM: 基底膜, ZO: 閉鎖帯。バーは 1  $\mu$ m

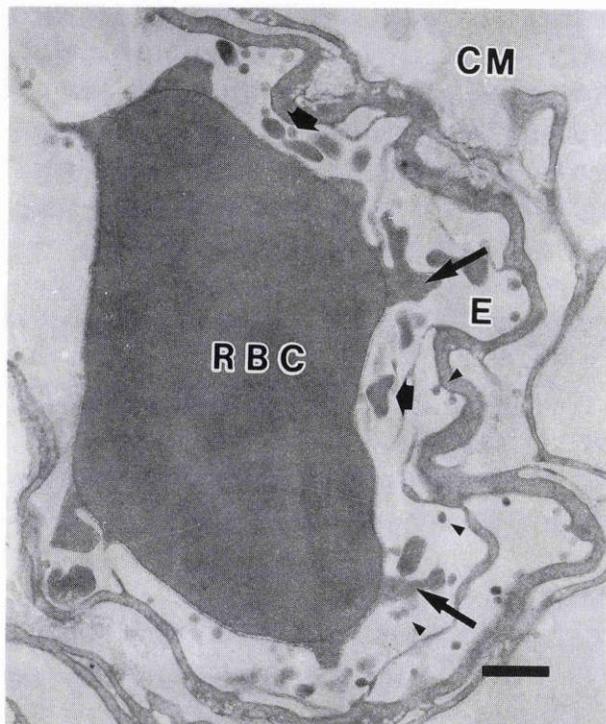


図3 HRP 前房灌流 30 分後の毛様体筋毛細血管。  
DAB 反応産物は内皮細胞胞体の小胞(矢じり), 空胞様構造(小矢印), さらに血管内腔にも存在している(大矢印). E: 内皮細胞胞体, RBC: 赤血球, CM: 毛様体筋細胞. バーは 500 nm

分後に毛様体筋毛細血管の内腔, 内皮細胞胞体の小胞と空胞様構造の内腔, および内皮細胞基底膜や筋細胞間の隙間に DAB 反応産物が観察された. 血管内皮細胞間の閉鎖帯は前房灌流, 静脈投与のいずれの場合も閉じていた.

静脈投与した HRP は, 毛様体突起の血管を透過して毛様体実質内を拡散し前房に到達するといわれる<sup>17)</sup>. したがって, 毛様体筋の血管を囲む組織や筋細胞間の隙間に観察された DAB 反応産物が毛様体突起血管からの HRP による可能性もある. しかし, 静注 15 分後で毛様体筋全体にびまん性に DAB 反応産物が存在し, 強膜近辺や毛様体扁平部にも DAB 反応産物が観察されたことから, その可能性は小さいと思われた.

HRP の網膜血管と虹彩血管透過性については Raviola ら<sup>18)19)</sup>の報告があり, 静脈投与した HRP が網膜血管や虹彩血管の内腔にとどまるのに対し, 硝子体および前房に投与した HRP は内皮細胞胞体の小胞によって網膜血管あるいは虹彩血管の内腔に輸送され, これらの血管では HRP 透過に方向性があると述べている. 著者らも虹彩血管について, HRP の移動を観察した結果, HRP の前房灌流では 15 分後に DAB 反応産物が虹彩実質の結合組織の隙間のみならず血管内腔にも観察されたが, 静脈投与では 30 分後においても反応産物は虹彩血管の内腔にのみ存在しており, Raviola らの所見に一致していた. HRP 透過の方向性については脳血管でも報告<sup>20)</sup>があり, 網膜, 虹彩および脳の血管に共通した現象と考えられる. 一方, 骨格筋の血管では HRP 透過性に方向性

DAB 反応産物が血管内皮細胞胞体の小胞と空胞様構造の内腔, および血管内腔に観察された. 静脈投与では 15

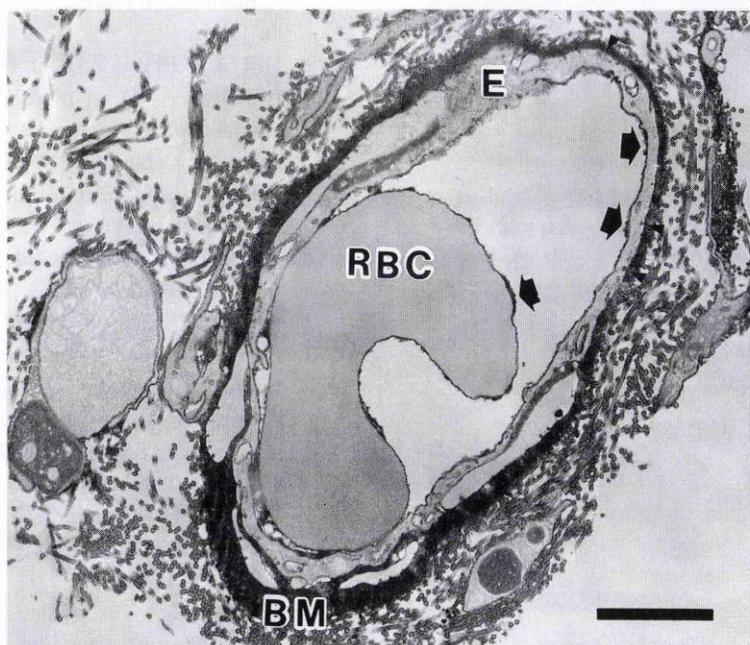


図4 HRP 前房灌流 15 分後の虹彩毛細血管。  
DAB 反応産物は血管を囲む組織に存在し, 赤血球表面(矢印), 内皮細胞の管腔表面(矢印)にも付着している. また, 胞体の小胞(矢じり)にも反応産物は存在している. E: 内皮細胞胞体, BM: 基底膜, RBC: 赤血球. バーは 500 nm

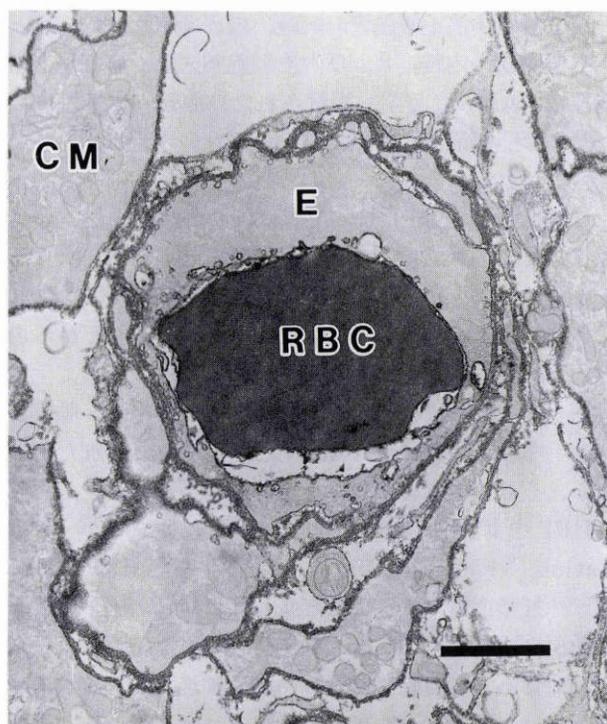


図5 HRP 静注 15 分後の毛様体筋毛細血管.

DAB 反応産物が赤血球表面, 内皮細胞の管腔表面, 胞体の小胞, 血管を囲む組織, 筋細胞間隙に存在している. E: 内皮細胞胞体, RBC: 赤血球, CM: 毛様体筋細胞. バーは 500 nm

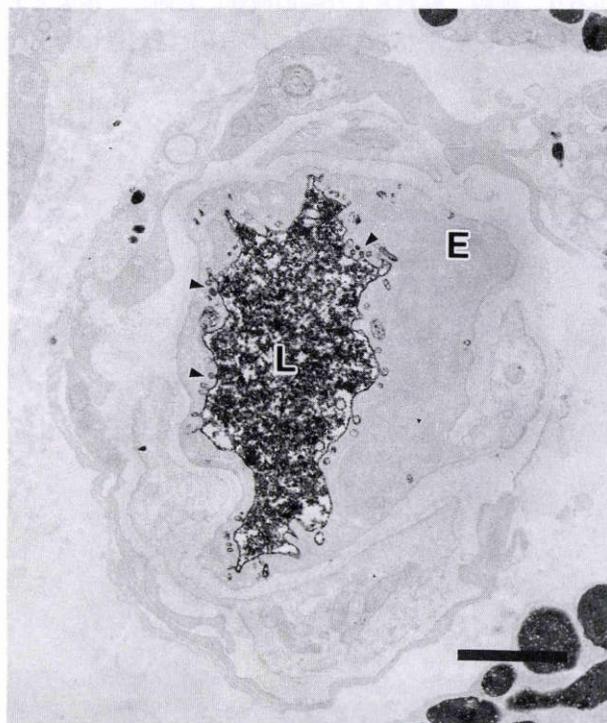


図6 HRP 静注 30 分後の虹彩毛細血管.

DAB 反応産物が血管内腔 (L), 内皮細胞胞体 (E) の小胞 (矢じり) に存在している. 血管を囲む組織に反応産物はみられない. E: 内皮細胞胞体, L: 血管内腔. バーは 500 nm

がないとされている<sup>21)</sup>. 今回著者らが観察した毛様体筋血管でも HRP は血管内腔と血管を囲む組織との間を両方向性に透過しており, 骨格筋と同じであった. HRP は細胞の飲作用 (pinocytosis) により溶液状態で胞体内に取り込まれる (fluid phase endocytosis) とされ<sup>22)</sup>, 静脈および前房に投与した HRP が短時間で毛様体筋の筋細胞間の間隙あるいは血管内腔に出現していたことは, フルオレセイン<sup>14)</sup>のような低分子物質だけでなく, 高分子物質も比較的自由に毛様体筋の毛細血管を透過することを示している.

近年, プロスタグランジン  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) 誘導体や  $\alpha_1$  受容体遮断薬の塩酸ブナゾシンの作用部位としてぶどう膜強膜流出が注目されている.  $PGF_{2\alpha}$  により毛様体筋線維の組織間隙が拡大し<sup>23)</sup>, ぶどう膜強膜流出が増大する<sup>24)25)</sup> ことなどから,  $PGF_{2\alpha}$  による眼圧下降はぶどう膜強膜流出の増加によると考えられている. しかし,  $PGF_{2\alpha}$  がピロカルピンと眼圧下降で相加作用を示す<sup>26)27)</sup> など, ぶどう膜強膜流出が眼圧調整に果たす役割には未知な点が多く残されている. 今回の研究で毛様体筋血管の HRP 透過が両方向にみられたことは, 毛様体筋をぶどう膜強膜流出に対する抵抗の場<sup>2)</sup> としてだけでなく, 房水の吸収ないし拡散の場としても考える必要があることを示唆する.

#### 文 献

- 1) Kaufman PL, Bárány EH: Loss of acute pilocarpine effect on outflow facility following surgical disinsertion and retrodisplacement of the ciliary muscle from the scleral spur in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol* 15: 793–807, 1976.
- 2) Bill A: Physiology of the outflow mechanism. In: Drance SM, et al (Eds): *Glaucoma: Applied Pharmacology in Medical Treatment*. Grune & Stratton, Orlando, 111–133, 1984.
- 3) Bill A: Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiol Rev* 55: 383–417, 1975.
- 4) Morrison JC, Van Buskirk EM: Ciliary process microvasculature of the primate eye. *Am J Ophthalmol* 97: 372–383, 1984.
- 5) Funk R, Rohen JW: SEM studies of the functional morphology of the ciliary process vasculature in the cynomolgus monkey: Reactions after application of epinephrine. *Exp Eye Res* 47: 653–663, 1988.
- 6) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: *Histology of the Human Eye*. WB Saunders, Philadelphia, 311, 1971.
- 7) Raviola G: The structural basis of the blood-ocular barriers. *Exp Eye Res* 25: 27–63, 1977.
- 8) Morrison JC, Van Buskirk EM, Freddo TF: Anatomy, microcirculation, and ultrastructure of the ciliary body. In: Ritch R, et al (Eds): *The Glaucomas*. CV Mosby, St. Louis, 75–88, 1989.

- 9) **Morrison JC, Van Buskirk EM**: Anterior collateral circulation in the primate eye. *Ophthalmology* 90: 707—715, 1983.
- 10) **Alm A, Bill A**: The effects of pilocarpine and neostigmine on the blood flow through the anterior uvea in monkeys. A study with radioactively labelled microspheres. *Exp Eye Res* 15: 31—36, 1973.
- 11) **Bill A, Wälinder PE**: The effects of pilocarpine on the dynamics of aqueous humor in a primate (*Macaca irus*). *Invest Ophthalmol* 5: 170—175, 1966.
- 12) **Bill A**: Effects of atropine on aqueous humor dynamics in the vervet monkey (*Cercopithecus ethiops*). *Exp Eye Res* 8: 284—291, 1969.
- 13) **Pederson JE, Gaasterland DE, MacLellan HM**: Uveoscleral aqueous outflow in the rhesus monkey: Importance of uveal reabsorption. *Invest Ophthalmol* 11: 1008—1017, 1977.
- 14) **Sherman SH, Green K, Laties AM**: The fate of anterior chamber fluorescein in the monkey eye. I. The anterior chamber outflow pathways. *Exp Eye Res* 27: 159—173, 1978.
- 15) **Rohen J**: The histologic structure of the chamber angle in primates. *Am J Ophthalmol* 52: 529—539, 1961.
- 16) **Bruns RR, Palade GE**: Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle. *J Cell Biol* 37: 244—276, 1968.
- 17) **Barsotti MF, Bartels SP, Freddo TF, Kamm RD**: The source of protein in the aqueous humor of the normal monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 581—595, 1992.
- 18) **Raviola G, Butler JM**: Unidirectional vesicular transport mechanism in retinal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1465—1474, 1983.
- 19) **Raviola G, Butler JM**: Unidirectional transport mechanism of horseradish peroxidase in the vessels of the iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 827—836, 1984.
- 20) **Van Deurs B**: Vesicular transport of horseradish peroxidase from brain to blood in segments of the cerebral microvasculature in adult mice. *Brain Res* 124: 1—8, 1977.
- 21) **Johansson BR**: Permeability of muscle capillaries to interstitially microinjected horseradish peroxidase. *Microvasc Res* 16: 340—353, 1978.
- 22) **馬屋原宏**: 巨大分子の膜輸送. I. サイトーシス概論. 星 猛, 他(編): 新生理科学大系. 第3巻. 膜輸送の生理学. 医学書院, 東京, 219—230, 1987.
- 23) **Lütjen-Drecoll E, Tamm E**: Morphological study of the anterior segment of cynomolgus monkey eyes following treatment with prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *Exp Eye Res* 47: 761—769, 1988.
- 24) **Gabelt BT, Kaufman PL**: Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 49: 389—402, 1989.
- 25) **Nilsson SFE, Samuelsson M, Bill A, Stjernschantz J**: Increased uveoscleral outflow as a possible mechanism of ocular hypotension caused by prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -1-isopropylester in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 48: 707—716, 1989.
- 26) **Fristrom B, Nilsson SEG**: Interaction of PhXA41, a new prostaglandin analogue, with pilocarpine. *Arch Ophthalmol* 111: 662—665, 1993.
- 27) **山本哲也, 沢 啓民, 北澤克明**: UF-021 とピロルカルピンの併用による眼圧下降作用—原発開放隅角緑内障および高眼圧症における検討—. *日眼会誌* 98: 202—205, 1994.