Anatomisches Institut der Medizinischen Akademie Iwate (Prof. T. OHKURA)
Morioka, Japan

**Baueinhistochemische Analyse der Mucosubstanzen der
Oberflächendeckschicht des Ziliarepithels
im Elektronenmikroskop**
**I. Blockierungsverfahren der Polysaccharid-Eisenreaktion
mit Invertseifen***

Takuji OHKURA (大倉卓治)

Eingegangen am 30. August, 1969

Saure Mucopolysaccharidsäuren werden bekanntlich mit quaternären Ammoniumbasen wie Cetylpyridiniumchlorid (CPC) präzipitiert. Über den Blockierungseffekt des CPCs auf die Färbungen mit den basischen Kupferphthalocyaninfarbstoffen wie Alcianblau, Astrablau und die Eisenbindungsreaktion wurde bereits von BLOOM und KELLY (1960), GEYER (1961), QUINTARELLI, SCOTT und DELLOVO (1964), OHKURA (1965) und KELLY, BLOOM und SCOTT (1968) berichtet.

Das unlängst von SCOTT und DORLING (1965) eingeführte Färbeverfahren mit Alcianblau in der Salzkonzentrationsreihe ist andererseits für die polysaccharidhistochemische Analyse saurer Glucosaminoglycane recht leistungsfähig; dieses Verfahren ist auch als wertvoll für die histochemische Klassifizierung von Glycane in einer Neuauflage des Lehrbuchs von PEARSE "Histochemistry, Theoretical and Applied, Vol. 1, 1968" betrachtet.

Zum Zwecke einer Klassifizierung der sauren Mucosubstanzen der Oberflächendeckschicht des Ziliarepithels wurde in der vorliegenden Untersuchung eine minimale Invertseifenkonzentration für die Blockierung der Eisenbindungsreaktion licht- und elektronenmikroskopisch bestimmt.

Material und Methode

Kleine Stückchen des Ziliarkörpers aus einem albinotischen Kaninchen wurden in eiskaltem 2%igem Glutaraldehyd (mit Cacodylat auf pH 7.2 gepuffert) 4 Stunden lang fixiert. Gewebstückchen wurden 3–20 Minuten lang bei Zimmertemperatur in den wässrigen Lösungen von Invertseifen inkubiert. Für unsere Untersuchungen standen Cetylpyridiniumchlorid (CPC), Benzetoniumchlorid (BC), Acrinol, Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid (CDAC) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zur Verfügung. Die Stückchen wurden 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 2.5%ige Essigsäure (pH 2.5) eingelegt.

Als Eisenbindungsreaktion wurden hauptsächlich die Varianten von MOWRY (1958) und von WETZEL, WETZEL und SPICE (1966) verwandt. Wir ließen dann die Gewebstückchen nachosmieren und in Epon 812 einbetten. Untersuchung der Dünnschnitte erfolgte ohne vorherige Kontrastierung in einen Hitachi HU 11-Ds Elektronenmikroskop.

*Herrn Prof. Dr. T. Iro gewidmet.

Mit Unterstützung des Japanischen Unterrichtsministeriums.

Ein Teil der Stückchen war nach Durchführung der Berlinblaureaktion nach Mowry, die zum lichtmikroskopischen Sichtbarwerden der Reaktionsprodukte erforderlich ist, mittels der Zelloidin-Paraffin Methode in Paraffin eingebettet worden. Gegenfärbung wurde hier mit Kernechtrot vorgenommen. Andererseits wurden die entparaffinierten Schnitte aus den Kontrollpräparaten mit den $MgCl_2$ zugesetzten

Abb. 1: Ausschnitt aus dem apikalen Bereich einer hochprismatischen Zylinder-epithelzelle (hinterer Abschnitt des Ziliarfortsatzes). Pfeil: Innere Grenzmembran (Oberflächendeckschicht) des Ziliarepithels; Gestrichelter Pfeil: Apikale Einfaltung der Zellmembran; Zeichen * weist auf hintere Augenkammer. $\times 44,000$

Alcianblau 8GS-Lösungen (0.05 %, pH 2.5) gefärbt.

Resultat und Diskussion

Der hintere Abschnitt der Ziliarfortsätze ist von einem hochprismatischen Zylinderepithel überzogen. An der freien Oberfläche der Zylinderzellen existiert eine schmale Schicht mit wenig kontrastgebendem Material. Die Dicke der genannten Schicht beträgt durchschnittlich 35nm, wie HOLMBERG (1959) bereits berichtet hat. Apikale Einfaltungen sowie die seitlichen Verzahnungen der Zytoplasmamembran sind gut ausgebildet, und die innere Grenzmembran ist nicht in ihnen miteinbezogen (Abb. 1). Die Mitochondrien und eine kleine Gruppe von Ribosomen sind reichlich im apikalen Zytoplasma vorhanden. Ebenso ist der Zellabschnitt unterhalb des Zellkerns, wenn auch weniger ausgeprägt, mit feinen Granula und Vesikeln angefüllt. Die Zellen der darunterliegenden sog. Pigmentepithelschicht werden von zahlreichen, verhältnismäßig kleinen rundlichen unpigmentierten Granula, die von einer einfachen Membran umgeben sind, durchsetzt. Entsprechend den frühen Beobachtungen finden sich vielerorts interplasmatische Verzahnungen und Desmosomen zwischen beiden Epithelschichten (vgl. PAPPAS und SMELSER, 1958; BAIRATI und ORZALESI 1966). Wie ROHEN (1957), KITAJIMA (1964) und KOZART (1968) bereits bemerkt hatten, überkleidet ein Plattenepithel die Oberfläche des vorderen Abschnitts der Ziliarfortsätze; die Epithelzellen unterscheiden sich in ihrer Zytoplasmastruktur jedoch nicht wesentlich von jenen der hinteren Abschnitten.

Bevor wir uns den Ergebnissen des Blockierungsverfahrens mit den verschiedenen Invertseifen zuwenden, seien die Befunde der Eisenbindungsreaktion an den Kontrollpräparaten erwähnt. Unter dem Lichtmikroskop färbt sich die Zelloberfläche des Ziliarepithels nach Methode von MOWRY (1958) intensiv blau an, wobei sowohl apikaler Abschnitt des Zytoplasmas als auch laterale Zellwände unter angewandten Bedingungen praktisch nicht gefärbt werden. Im Elektronenmikroskop stellt sich die innere Grenzmembran mittels einer modifizierten Eisenbindungsreaktion (WETZEL, WETZEL und SPICE, 1966) als schattenreiche Doppelmembran dar (Abb. 2). Die Dicke der Membran beträgt insgesamt 70–100nm. Eine schmale Schicht der kontrastgebenden Niederschläge (ungefähr 30 nm breit) liegt dicht an der Oberfläche der Epithelzellen an, die bis zum apikalen Drittels des Zytoplasmas heranreichen. Das äußere Blatt der Doppelmembran tritt mit der Eisenbindungsreaktion deutlich hervor. Es weist einen Abstand von Plasmalemm von weniger als 30 nm auf, wodurch der Zwischenspaltraum der inneren Grenzmembran hell erscheint. In diesen Spalträumen sehen wir eine spärliche Ablagerung von Eisenhydroxydteilchen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Blockierungseffekt der verschiedenen Invertseifen geprüft; die in eine $3 \times 10^{-3}M$ Lösung von Invertseifen vorinkubierten Gewebsstückchen wurden nach Mowryschen Methode tingiert. In Tabelle 1 sind die Färbeargebnisse zusammengestellt, und die Stärke der Färbung ist dabei mit der Anzahl von + gezeigt.

Zu der Tabelle 1 ist hinzuzufügen: Bei der Verwendung von Benzetoniumchlorid (BC), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und Acrinol tritt eine kräftige Blaufärbung an der Zelloberfläche des Zylinderepithels auf, wobei das Plattenepithel am vorderen Teile zartblau erscheint. Durch die Vorbehandlung mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC) oder Cetyldimethylammoniumchlorid (CDAC) wird der Ausfall der

Abb. 2: Positive Eisenbindungsreaktion an der apikalen Oberflächendeckschicht des Ziliarepithels (hinterer Abschnitt des Ziliarfortsatzes). Gestrichelter Pfeil deutet auf apikale Einfaltung der Zellmembran. $\times 26,000$

Reaktion beinahe vollständig unterdrückt; die Zylinderzellen am hinteren Abschnitte zeigen dabei noch einen allerdings schwächeren Eisenbesatz.

Weiterhin hatten wir einen Grenzwert der Konzentration des CPCs für die Blockierung der Eisenbindungsreaktion genauer untersucht.

Tabelle 1. Eisenbindungsreaktion des mit Invertseifen vorinkubierten Ziliarepithels

Invertseife	Eisenbindungsreaktion	
	Vorderer Abs.	Hinterer Abs.
BC	+	++
CTAB	+	++
Acrinol	+	++
CDAC	±	+
CPC	—	+
H ₂ O	++	++

Tabelle 2. Blockierungseffekt des CPCs auf die Eisenbindungsreaktion des Ziliarepithels

CPC ($\times 10^{-3}$ M)	Eisenbindungsreaktion	
	Vorderer Abs.	Hinterer Abs.
0	++	++
1	+	++
3	±	+
5	±	±
10	—	±

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß das Ziliarepithel beider Abschnitte auf das vollkommen verschiedene Verhalten gegen die CPC-Blockierung hinweisen, und daß die Blaufärbung des Ziliarepithels am vorderen Abschnitten beispielsweise bereits von $3 \times 10^{-3}M$ ab ziemlich unterdrückt wird (Abb. 3, Abb. 4A–4D).

Abb. 3. Übersichtsbild von Ziliarfortsätzen eines Kaninchens. Hämatoxylin-Eosin Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahme. $\times 250$

Abb. 4A–D: Eisenbindungsreaktionen der mit CPC vorbehandelten Stückchen des Ziliarkörpers. Gegenfärbung mit Kernechtrot. Lichtmikroskopische Aufnahme. $\times 720$

Aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme der Schnitte von oben geschilderten Versuchsreihe (Zylinderepithel am hinteren Abschnitte, $3 \times 10^{-3}M$ CPC) ergibt sich, daß die 10–30 nm großen, kontrastreichen Partikel hauptsächlich an der apikalen Zellmembran liegen (Abb. 5A). Es gelang aber mit einer CPC-Lösung von viel geringerer Konzentration ($10^{-4}M$) eine schwache Hemmung der Eisenbindungsreaktion zu erzielen; Teilchen des adsorbierten Eisens sind sowohl auf der apikalen Zellmembran als auch auf ihren Einfaltungen nachzuweisen. Die Zonulafasern zeigen in vorliegender Abbildung einen stärkeren Eisenbesatz (Abb. 5B).

In diesem Zusammenhang schien uns die Frage wichtig, auf welche Weise sich das Ziliarepithel mit Alcianblau in der Salzkonzentrationsreihe färbt? Daher wurden die Paraffinschnitte des Ziliarkörpers eines albinotischen Kaninchens nach Methode von SCOTT und DORLING (1965) gefärbt.

Abb. 5A und B: Eisenbindungsreaktion des Ziliarepithels (hinterer Abschnitt des Ziliarfortsatzes). Nach Blockierung mit 3×10^{-3} M CPC (Abb. 5A) bzw. mit 1×10^{-4} M CPC (Abb. 5B). Zeichen X weist auf eine stärkere Eisenreaktion an den Zonulafasern. $\times 20,000$

Wie man aus Tabelle 3 ersieht, kann die Blaufärbung des Plattenepithels durch 0.2–0.6 M MgCl_2 beinahe vollständig aufgehoben werden. Beim Zylinderepithel liegen die Grenzkonzentrationen des Magnesiumchlorids zwischen 0.8–1.4 M. Nahelegend ist daher der Schluß, daß der wesentliche Polysaccharidbaustein der Oberflächendeckschicht (Glycocalyx nach BENNETT 1963) des Plattenepithels eine carboxylgruppenhaltige Polysaccharidsäure wie Hyaluronsäure ist. Hinsichtlich einer Glycocalyx des Zylinderepithels kommen vermutlich nicht nur die Hyaluronsäure sondern die Schwefelsäureestern der Polysaccharidsäuren als die prosthetischen Kohlenhydratkomponenten in Betracht. In Bezug auf diesen Befund scheint uns die Mitteilung von GRAUMANN und ROHEN (1958) beachtenswert; das unpigmentierte Epithel im hinteren Abschnitte des menschlichen Ziliarkörpers enthält "eher Sulfomucopolysaccharide als Hyaluronsäure." Aus der Fülle von Veröffentlichungen zu diesem

Tabelle 3. Resultat der Alcianblaufärbung des Ziliarepithels eines Kaninchens

MgCl_2 (M)	Vorderer Abs.	Hinterer Abs.
0	+	+
0.2	$\pm$	+
0.6	$\pm$	+
0.8	$\pm, -$	$+, \pm$
1.4	-	$\pm$

Thema, geht klar hervor, daß an den Ziliarfortsätzen des Kaninchens zwei sowohl morphologisch als auch funktionell unterscheidbare Abschnitte vorliegen (vgl. ROHEN, 1957; PAPPAS und SMELSER, 1958; TORMEY, 1963; WEGNER, 1967; KOZART, 1968). Durch die Bestimmung einer Grenzkonzentration der Invertseife für die Blockierung der Eisenbindungsreaktion wird es möglich, die Mucosubstanzen von Oberflächendeckschicht des Ziliarepithels bausteinhistochemisch weit besser zu analysieren.

Zusammenfassung

Die Oberflächendeckschicht des Ziliarepithels eines Kaninchens wurde elektronenmikroskopisch-histochemisch untersucht. In Bezug auf den Blockierungseffekt für die Eisenbindungsreaktion lassen sich die verschiedenen Invertseifen in folgender Reihe anordnen: Cetylpyridiniumchlorid (CPC) > Cetyldimethylbenzylammoniumchlorid (CDAC), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Acrinol > Benzetoniumchlorid (BC). Die Eisenbindungsvermögen des Plattenepithels (vorderer Abschnitt der Ziliarfortsätze) sind durch $3 \times 10^{-3} \text{M}$ CPC beinahe vollständig blockiert, während für die Blockierung der positiven Reaktion des Zylinderepithels (hinterer Abschnitt) $5 \times 10^{-3} \text{M}$ CPC erforderlich ist. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Kohlenhydratkomponenten der polysaccharidreichen Oberflächendeckschicht diskutiert, und die beschriebenen Blockierungsverfahren für die feine histochemische Analyse solcher sauren Mucosubstanzen als geeignet vorgeschlagen.

イエウサギの毛様体上皮のムコ物質の超局所化学的観察

I. 逆性石鹼による多糖体鉄反応の封鎖実験 (内容自抄)

イエウサギの毛様体の表面は, その前部では扁平上皮で, 後部は柱形上皮で被われる. 上皮の多糖体鉄反応を阻止するセチルピリジニウム塩 (CPC) の限界濃度を測定すると, 扁平上皮では $3 \times 10^{-3} \text{M}$, 柱形上皮では $5 \times 10^{-3} \text{M}$ であった. 比較のために 毛様体上皮のアルチアン青染色を阻止する塩化マグネシウムの濃度を測定した結果, 毛様体の前部では $0.2-0.6 \text{M}$, 後部では $0.8-1.4 \text{M}$ であった. 扁平上皮の表面のムコ多糖体の主成分は, 例えば ヒアルロン酸のようなカルボキシル基をもつ弱酸性のものであり, 柱形上皮では なお硫酸基をもつ強酸性の成分が存在するらしい. CPC は種々の逆性石鹼のうちで 多糖体鉄反応を阻止する作用が はなはだ強い. CPC で阻止された上皮の鉄反応を電子鏡で観察すると, CPCが 10^{-4}M のときは, 上皮細胞の頂部の細胞膜とその褶入に水酸化鉄の微粒子が沈着するが, 濃度が 10^{-3}M に達すると, 細胞膜の褶入に見られた反応は消失した.

Literatur

- Bairati, A. jr. and N. Orzalesi: The ultrastructure of the epithelium of the ciliary body. A study of the junctional complexes and of the changes associated with the production of plasmoid aqueous humour. Z. Zellforsch. 69: 635-658 (1966).
- Bennett, H. S.: Morphological aspects of extracellular polysaccharides. J. Histochem. Cytochem. 11: 14-23 (1963).

- Bloom, G. D. and J. W. Kelly:** The copper phthalocyanin dye "Astrablue" and its staining properties, especially the staining of mast cells. *Histochemie* 2: 48-57 (1960).
- Geyer, G.:** Zur Blockierung mit quarternären Ammoniumbasen. *Acta histochem.* 12: 343-345 (1961).
- Graumann, W. und J. Rohen:** Chemohistologische Befunde am menschlichen Auge (Cornea, Sclera, Uvea). *Z. mikr.-anat. Forsch.* 64: 652-671 (1958).
- Holmberg, A.:** Ultrastructure of the ciliary epithelium. *Arch. Ophthalmol.* 62: 935-948 (1959).
- Kelly, J. W., G. D. Bloom and J. E. Scott:** Quaternary ammonium compounds in connective tissue histochemistry I. *J. Histochem. Cytochem.* 11: 791-798 (1968).
- Kitajima, S.:** Electron microscopic studies on the ciliary epithelium I. On the fine structure of ciliary epithelium in normal rabbits (in Japanese). *Fol. ophthalmol. jap.* 15: 218-227 (1964).
- Kozart, D. M.:** Light and electron microscopic study of regional morphologic differences in the processes of the ciliary body in the rabbit. *Invest. Ophthalmol* 7: 15-33 (1968).
- Mowry, R. W.:** Improved procedure for the staining of acid polysaccharides by Müller's colloidal-(hydrous)-ferric periodic acid-Schiff reactions. *Lab. Invest.* 7: 566-576 (1958).
- Ohkura, T.:** Electron microscopic observation of the rat chamber angle with special reference to the localization of acid mucopolysaccharide. *Arch. histol. jap.* 25: 229-240 (1965).
- Pappas, G. D. and G. K. Smelser:** Studies on the ciliary epithelium and the zonule I. Electron microscopy observations on changes induced by alteration of normal aqueous humour formation in the rabbit. *Amer. J. Ophthalmol.* 46: 299-317 (1958).
- Quintarelli, G., J. E. Scott and M. C. Dellovo:** The chemical and histochemical properties of alcian blue, III. Chemical blocking and unblocking. *Histochemie* 4: 99-112 (1964).
- Rohen, J. W.:** Über zwei morphologisch und funktionell verschiedene Abschnitte des Ziliarkörpers. *Ophthalmol.* 133: 103-109 (1957).
- Scott, J. E. and J. Dorling:** Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. *Histochemie* 5: 221-233 (1965).
- Tormey, J. M.:** Fine structure of the ciliary epithelium of the rabbit, with particular reference to "infolded membranes," "vesicles," and the effects of Diamox. *J. Cell Biol.* 17: 641-659 (1963).
- Wegner, K.:** Regional differences in ultrastructure of the rabbit ciliary processes: The effect of anesthetics and fixation procedures. *Invest. Ophthalmol.* 6: 177-191 (1967).
- Wetzel, M. G., B. K. Wetzel and S. S. Spice:** Ultrastructural localization of acid mucosubstances in the mouse colon with iron-containing stains. *J. Cell Biol.* 30: 299-315 (1966).
-