イヌ眼毛様体無色素上皮細胞の三次元的観察

一水酸化ナトリウム消化法を用いた走査型電子顕微鏡法の毛様体上皮細胞への応用ー

板 持 知恵美

鳥取大学医学部眼科学教室

要 約

イヌ眼毛様体を60°Cに加温した6N水酸化ナトリウムで,10~15分間消化処理を行って試料を作製した後, 走査型電子顕微鏡で観察した.この消化処理によって毛様体上皮の内境界膜と毛様小帯が完全に消化されたが, 細胞膜の形態は十分保持されていたので,毛様体無色素 上皮の真の表面を三次元的に把握することができた.毛様体ひだ部前部は平坦であったが,毛様小帯の付着部位 である毛様体ひだ部中部および後部の側面に樹枝状の複 雑な細胞膜突起構造が認められた.この突起は中部に多く,後部になるにつれて突起の高さが低くなっていた.特異な所見として,毛様体突起の前頂部には,細胞膜の小窩 様構造と有柄小球状構造物が認められた.(日眼会誌 100:11-17,1996)

キーワード:水酸化ナトリウム消化法,走査型電子顕微 鏡,毛様体,無色素上皮細胞,イヌ

Three-dimensional Structures of the Nonpigmented Epithelium of the Dog Ciliary Body —Application of Sodium Hydroxide Digestion to Scanning Electron

Microscopic Observation of the Ciliary Epithelium-

Chiemi Itamochi

Department of Ophthalmolgy, Faculty of Medicine, Tottori University

Abstract

The nonpigmented epithelium (NPE) of the dog ciliary body was three-dimensionally observed by scanning electron microscopy (SEM) using sodium hydroxide digestion. The inner limiting membrane of the NPE and the zonular fibers covering the NPE were completely dissolved in 6N sodium hydroxide for $10\sim15$ minutes at 60° C, although the surface structures of the plasma membrane were remarkably preserved despite the rather rigorous treatment. Thus, the entire surface of the NPE was exposed for SEM. The surface of the NPE at the anterior part of the pars plicata was flat, but many complex processes were observed in the surfaces of

I 緒 言

毛様体は, 房水やムコ多糖の産生と分泌機能を有する 器官である¹⁾.その表面は無色素上皮細胞(nonpigmented epithelium, NPE)によって覆われており, 房水の産生 the NPE as lateral walls of the middle and posterior parts of the pars plicata, to which the zonular fibers had adhered. The processes were more prominent in the middle portion and gradually flattened near the posterior portion. Many pit-like structures and drumstick-like processes of the plasma membrane were localized at the apex of the ciliary process. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 11-17, 1996)

Key words : Sodium hydroxide digestion, Scanning electron microscopy, Ciliary body, Nonpigmented epithelium, Dog

の場であるとともに毛様小帯の付着部でもある.この細胞の微細形態については,従来から多数の報告がある.しかし,NPE表面は毛様小帯や内境界膜で覆われているため,従来の試料作製法を用いて走査型電子顕微鏡(以下,走査電顕)で観察しても,その細胞の表面形態の全貌

別刷請求先:683 鳥取県米子市西町86 鳥取大学医学部眼科学教室 板持知恵美 (平成7年6月20日受付,平成7年8月19日改訂受理)

Reprint requests to: Chiemi Itamochi, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University. 86 Nishi-machi, Yonago-shi, Tottori-ken 683, Japan

⁽Received June 20, 1995 and accepted in revised form August 19, 1995)

を明らかにすることはできなかった.

近年,細胞表層を取り囲む結合組織を除去し,細胞の表 面構造を走査電顕で観察する方法として,数々の結合組 織消化法が考案されてきた^{2)~6)}.本研究では水酸化ナト リウム消化法⁴⁾⁶⁾をイヌ眼の毛様体に応用したところ,毛 様小帯,内境界膜などの結合組織成分が除去され,NPE の真の表面形態を三次元的に観察することができ,若干 の知見を得たので報告する.

II実験方法

材料として,成犬4匹(体重6.0~8.0kg)の8眼を用 いた.ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®) (25 mg/kg 体重)を腹腔内に投与して麻酔した後,2匹 は腹大動脈にカニューレを挿管し,生理食塩液を灌流し て脱血した後,2.5%グルタールアルデヒド(0.1 M 燐酸 緩衝液, pH 7.4)を灌流して固定を行い眼球を摘出した. 他の2匹は麻酔後直ちに眼球を摘出し,眼球を赤道部で 前・後半部に2分割して同固定液で浸漬固定を行った.い ずれの試料も,子午線方向に切開して毛様体ひだ部を切 り出し,0.1 M 燐酸緩衝液で洗浄後,60°Cに加温した6 N 水酸化ナトリウムで10~15分間消化処理を行った、次い で,1%四酸化オスミウムで1時間後固定した後,2% タンニン酸と1%四酸化オスミウムで導電染色"し、上 昇エタノール系列で脱水した後,t-ブチルアルコールに 置換して凍結乾燥を行った8.乾燥した試料は金属製の 試料台に接着し,白金スパッタコーティング(厚さ5nm) を施して,走査電顕(日立 HFS-2 ST)で加速電圧 20 kV で観察した.一部の組織は水酸化ナトリウム消化処理を 省略し,従来の方法で試料を作製し観察した.

透過型電子顕微鏡(以下,透過電顕)の試料作製法とし ては,固定した組織を0.2 M 蔗糖加燐酸緩衝液で一晩洗 浄した後,1%四酸化オスミウムで1時間後固定し,上 昇エタノール系列で脱水してプロピレンオキサイドに置 換し,エポン812に包埋した.ダイヤモンドナイフを用い てウルトラミクロトーム(RMC MT 6000-XL)で超薄切 片を作製し,酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施し て透過電顕(日本電子 JEM-100 CXII)で加速電圧 80 kV で観察した.また,水酸化ナトリウム消化法によって作製 した 試料の微細形態を確認するため,一部の組織は 60°C,6N水酸化ナトリウム消化処理を10~15分間施 し,1%四酸化オスミウムで後固定後,常法に従いエポン 包埋し,超薄切片を透過電顕で観察した.

なお,本研究では,毛様体ひだ部の前部,中部,後部の側 面および突起頂の表面を観察対象とした.

III 実験結果

水酸化ナトリウム消化法を施さずに従来の方法で走査 電顕試料を作製して観察すると,毛様体の中部と後部の 表面は毛様小帯で覆われており,毛様体の表面形態を観 察することはできなかった(図1a). 試料乾燥後に, 毛様 小帯の一部をピンセットや小針を用いて機械的に剝離す るとNPEのものと思われる膨らみが観察できたが,そ の表面は内境界膜とそれに付随する膠原細線維や膠原線 維束によって覆われており, NPE の真の細胞表面を観 察することはできなかった(図1b).内境界膜に付随す る膠原細線維は直径 30~50 nm であったが,多数の膠原 細線維が絡み合って全体として繭のような網目構造を 作っていた.さらに,膠原細線維の一部は,幅0.6~1.0 µmの膠原線維束と結合していた.透過電顕で観察する と、NPEの基底側の細胞膜は、基底陥凹と呼ばれる複雑 な陥入構造を成していた.その表面は複雑に入り組んだ 基底膜様構造物から成る内境界膜で覆われており,膠原 細線維の断端も観察できた(図1c).

水酸化ナトリウム消化法を施して,内境界膜,膠原細線 維,膠原線維束を消化除去すると,NPEの真の表面が剖 出され,その微細形態を三次元的に観察することができ た(図2a).毛様体前部の表面はほぼ平滑であったが,中 部と後部には毛様体稜に平行に走る幅20μmの隆起が 十数本認められた.強拡大でNPEの基底側表面を観察 すると,細胞膜の多数の突起が認められ,全体として凸凹

図1a	毛様体の走査型電子顕微鏡像	(通常の試料作製法による)
-----	---------------	---------------

毛様体の中部(M)と後部(P)は毛様小帯で覆われているが,前部(A)には毛様小帯の付着は認められない.

- 図1b 毛様体内境界膜の走査型電子顕微鏡像(通常の試料作製後,毛様小帯を機械的に剝離したもの).
- 上皮細胞の基底側に膠原細線維(矢じり)と膠原線維束(矢印)が認められる.
- 図1c 毛様体上皮細胞の透過型電子顕微鏡像(通常の試料作製法による).

無色素上皮細胞の基底側には基底陥凹(矢印)が認められ、その表面は複雑に入り組んだ基底膜様構造物から成る内境界膜 (*)で覆われている、矢じりは膠原細線維の断端を示す。

- 図2a 毛様体表面の走査型電子顕微鏡像(水酸化ナトリウム消化法による).
- 前部(A)は平滑であるが、中部(M)と後部(P)には毛様体稜に平行に走る隆起構造が認められる.

図2b 毛様体無色素上皮細胞表面の走査型電子顕微鏡像(水酸化ナトリウム消化法による). 線維成分と内境界膜は完全に消化除去されて,無色素上皮細胞の基底側が露出されている.その表面には複雑な走行を成す 細胞膜の突起が認められる.

図2c 毛様体上皮細胞の透過型電子顕微鏡像(水酸化ナトリウム消化法による).

ミトコンドリア(矢印)は微細形態が損なわれているが,細胞の全体の形態と基底陥凹の形態は十分保持されている.内境界 膜は完全に消化除去されている。



図 1

図 2

した迷路状の表面形態を呈していた(図2b).透過電顕 で水酸化ナトリウム消化処理を行った試料を観察する と,ミトコンドリアの微細形態は損なわれているものの, 細胞の全体の形態と基底陥凹の形態は十分保たれていた.また,内境界膜は水酸化ナトリウム消化処理によって 完全に消化除去されていることが確認できた(図2c).



図3a 毛様体前部の無色素上皮細胞表面の走査型電子顕微鏡像(水酸化ナトリウム消化法による). 以下図6bまではすべて水酸化ナトリウム消化法によって試料を作製したもの、縫合状を呈する細胞境界の部分と,平滑な細胞表面(*)の部分が混在している。 図3b 毛様体前部の無色素上皮細胞表面の強拡大像、

隣接する細胞は横にのびた突起が嚙み合って接合している.



図4a 毛様体中部の無色素上皮細胞表面の走査型電子顕微鏡像. 樹枝状を呈する複雑な細胞膜の突起構造が認められる. 図4b 毛様体中部の無色素上皮細胞表面の強拡大像. 細胞膜突起は不規則に分岐し,樹枝状を呈している.

毛様体前部の NPE の表面は,弱拡大像では図2aに 示したようにほぼ平滑であったが,強拡大でその表面を 観察すると,NPE の中央部は平滑な面が認められ,細胞 の境界部分は隣接する細胞と噛み合って縫合状を呈して いた(図3a).細胞境界の部分を拡大すると,隣接する細 胞から横にのびた突起がお互いに噛み合って接合してい る様子が観察できた(図3b).

毛様体中部の NPE の表面は,幅約0.3μm で不規則 に分岐して樹枝状を呈する細胞膜の突起が認められた (図4a,b).これらの突起は,細胞膜の基底陥凹に伴って できたものであり,突起間の空隙部は,内境界膜を構成す る基底膜様構造物で満たされていた部分であると考えら



図5a 毛様体後部の無色素上皮細胞表面の走査型電子顕微鏡像. 細胞膜突起構造を有するものと平滑なものとが混在している. 図5b 毛様体後部の無色素上皮細胞表面の強拡大像. 細胞膜突起と,比較的平坦な細胞膜表面が認められる.



図 6 a 毛様体突起頂の無色素上皮細胞の走査型電子顕微鏡像. 小窩様構造物と小球状構造物(矢印)が多数認められる.

図6b 小窩様構造物と有柄小球状構造物の強拡大像.

小窩様構造物は大小不同で,不整形を呈するものもある.小球状構造物には柄が付着(矢印)している.この 構造物は単独で存在することが多いが,多数の球状構造物が集合しているもの(右下)も認められる. 図6c 小窩様構造物と小球状構造物の透過型電子顕微鏡像(通常の試料作製法による).

小窩様構造物は,細胞膜の陥凹部(*)に相当する.小球および柄(矢印)の内部は均一な細胞質から構成されている.

れた.

毛様体後部の NPE の表面は,樹枝状の突起を有する NPE と表面が比較的平滑な NPE が混在していた(図 5 a).表面が平滑にみえる NPE も拡大してその表面を観 察すると、細胞膜には陥凹構造が認められた(図 5 b).

毛様体突起頂の NPE の表面には,中部~後部に認め られた樹枝状の突起構造は認められず,細胞膜の小窩様 構造と小球状構造物が認められた.小窩様構造物は直径 が $0.5\sim1.5 \mu m$ 前後の円形〜卵円形を呈するものもあ れば,不整形を成すものも認められた(図 6 a).小球状構 造物の直径は $0.4\sim0.6 \mu m$ で,この小球に幅 $60\sim80$ nm の柄が付着しており,陥凹構造の深部から突出している ように見受けられた.この小球状構造物は,単独で存在す ることが多いが,中には多数の球状構造物が集合してい るものも認められた(図 6 b).これらの構造物は透過電 顕でも確認できたが,有柄小球状構造物は NPE の基底 面から基底膜の中に突出していた(図 6 c).小球状と柄の 内部は,均一な細胞質で構成されており,細胞小器官やマ イクロフィラメントなどの細胞骨格成分は観察されな かった.

IV 考 按

化学消化法は、1976年に Evan ら²⁾が開発した方法で ある.彼らは8N塩酸およびコラゲナーゼを用いて細胞 を覆っている基底膜や結合組織を除去し、これまで観察 できなかった細胞の表面構造を走査電顕で観察すること に成功した.その後、水酸化カリウムおよびコラゲナーゼ を用いて観察する方法³⁾、6N水酸化ナトリウム消化法⁴⁾、 水酸化カリウム消化法⁵⁾などが開発されてきた.このよ うな種々の化学的消化法の中で、岩永ら⁶⁾は塩酸消化法 と水酸化ナトリウム消化法を比較したとき、後者の方が 膠原線維や基底膜の除去効果が大きく、表面にゴミの付 着が少ない試料が得られると報告している.また、高木 ら⁹⁾は水酸化ナトリウム消化法を初めて眼組織へ応用 し、ラット角膜上皮基底側の観察に成功した.

NPE の基底膜は内境界膜とも呼ばれ, I, III, IV型の コラーゲンとラミニンから構成されている¹⁰⁾.また,毛様 小帯は生化学的性状が弾性線維の細線維と類似している といわれている¹¹⁾¹²⁾が,水酸化ナトリウム消化法によっ て, NPE を覆っている基底膜や毛様小帯をほぼ完全に 消化でき, NPE の表面を剖出することができた.

これまでにも化学消化法を毛様体組織に応用した報告 はある.家兎毛様体毛細血管の外表面観察¹³,塩酸消化法 によるサル眼毛様体筋の観察¹⁴,サル眼毛様体扁平部の 観察¹⁵⁾が行われてきたが,毛様体ひだ部の NPE を詳細 に観察した報告はない.

水酸化ナトリウム消化法は結合組織成分を加水分解に よって消化するという方法で,微細形態への影響が危惧 される.しかし,超薄切片法で確認すると細胞の軽度の膨 化とミトコンドリアの破壊は認められたものの,細胞膜 の形態は十分保持されることが確認された.このため,水 酸化ナトリウム消化法を用いた走査電顕法は NPE の真 の表面観察に有用であると考えられた.

NPEの部位による形態学的相違については、これま でにもいくつかの報告がある.Haraら¹⁶⁾は、サル、ヒト 毛様体ひだ部中部は他の部位と比較し細胞膜陥凹が著明 であると報告しており、今回の著者の結果とよく一致し ている.西田¹⁷は,サル毛様体突起側面を観察し,NPE に は複雑な細胞膜突起が著明であると報告しているが,こ の所見も今回の所見と一致した.

今回の観察で、毛様体中部の NPE 表面は、弱拡大で観 察しても樹枝状の複雑な構造を呈したのに対し、毛様小 帯が付着しない前部や付着の少ない後部側面の NPE 表 面は、全体的に平坦な表面形態を呈していた。もっとも、 弱拡大で平滑に見える毛様体後部の NPE 表面も強拡大 で観察すると、細胞膜の陥凹構造があり、これは毛様小帯 の付着に関与すると考えられる。サル眼毛様体の扁平部 を観察した Sano¹⁵⁾は、小帯線維の枝のいくつかは表面陥 凹に挿入しており、表面陥凹が多いと小帯線維の付着強 度は増加すると述べている。今回観察された樹枝状構造 も、細胞膜の表面積を広げることにより小帯線維の付着 を強固するのに役立っていると考えられる。

今回の観察によって,突起頂に限局して細胞膜の小窩 様構造と有柄小球状構造物が存在することが明らかに なった.これらの構造物は透過電顕の所見から判断して, 前者は細胞膜が陥凹し,後者は細胞膜が突起して生じた ものと考えられる.すなわち,後者は細胞膜突起の一形態 であると思惟されるが,このような構造物は著者の知り 得る限りまだ記載されておらず,その機能については今 後の検討を要する.小窩様構造物と有柄小球状構造物が 存在する突起頂は房水産生領域であることから判断し て,両者は房水産生に何らかの関わりがあるのかも知れ ない.

本研究で用いた6N水酸化ナトリウム消化法を用い た走査電顕法は,毛様体の上皮の表面形態を三次元的に 観察するのに有用であり,薬物を使用した際の動態薬理 学的ないし病理学的な毛様体の表面形態の解明にもまた 有用であると思われる.また,この方法を他の眼組織に応 用することにより,これまで剖出されていない新たな表 面形態をとらえることができるかも知れないと思われ る.

稿を終えるにあたり,終始懇親なる御指導,御校閲を賜りま した鳥取大学医学部解剖学第二教室井上貴央教授,同眼科学 教室玉井嗣彦教授に深謝いたします.また,直接御指導いただ きました解剖学第二教室鹿島 譲技官,本研究に種々の御助 力をいただきました解剖学第二教室の皆様に厚く感謝の意を 表します.

本論文の要旨は,第98回日本眼科学会総会(平成6年4月, 横浜)において発表した。

文 献

- 1) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE**: Ciliary body and posterior chamber. Histology of the Human Eye. WB Saunders, Philadelphia, 260– 319, 1971.
- 2) Evan AP, Dail WG, Dammrose D, Palmer C: Scanning electron microscopy of cell surfaces

following removal of extracellular material. Anat Rec 185 : 433-446, 1976.

- Miller BG, Woods RI, Bohlen HG, Evan AP: A new morphological procedure for viewing microvessels: A scaning electron microscopic study of the vasculature of small intestine. Anat Rec 203: 493-503, 1982.
- 4) Takahashi-Iwanaga H, Fujita T: Application of a NaOH maceration method to a scanning electron microscopic observation of Ito cells in the rat liver. Arch Histol Jpn 49: 349-357, 1986.
- Ushiki T, Murakumo M: Scanning electron microscopic studies of tissue elastin components exposed by a KOH-collagenase or simple KOH digestion method. Arch Histol Cytol 54: 427-436, 1991.
- 6) 岩永ひろみ,安達一男,藤田恒夫:走査電顕のための 結合織消化法の検討とその応用。医生物走査電顕 19:62-65,1990.
- Murakami T: A revised tannin-osmium method for non-coated scanning electron microscope specimens. Arch Histol Jpn 36: 189–193, 1972.
- Inoué T, Osatake H: A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze-drying method. Arch Histol Cytol 51: 53-59, 1988.
- 9) 高木 茂,長田正夫,板持知恵美,玉井嗣彦,井上貴 央:NaOH 処理法によるラット角膜上皮の三次元 構造の観察. 眼紀 45:608-613,1994.

- 10) Marshall GE, Kanstas AGP, Abraham S, Lee WR: Extracellular matrix in aged human ciliary body: An immunoelectron microscope study. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 2546-2560, 1992.
- 11) Raviola G: The fine structure of the ciliary zonule and ciliary epithelium with special regard to the organization and insertion of the zonular fibers. Invest Ophthalmol 10: 851-869, 1971.
- 12) Takei Y, Smelser GK: Electron microscopic studies on zonular fibers. II. Changes of the zonular fibers after the treatment with collagenase, α-chymotryps in and hyaluronidase. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 194: 153—173, 1975.
- 小関 武:酵素消化法による家兎毛様体血管観察の 試み.日眼会誌 87:1157-1168,1983.
- Nishida S: Scanning electron microscopy of ciliary muscle of monkey eye. Jpn J Ophthalmol 30: 351-359, 1986.
- 15) Sano Y: The fine surface architecture of the primate ciliary body with special regard to the pars plana. Jpn J Ophthalmol 33: 251-259, 1989.
- 16) Hara K, Lütjen-Drecoll, Prestele H, Rohen JW : Structural differences between regions of the ciliary body in primates. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 912-924, 1977.
- 西田祥藏:サル眼毛様体上皮および毛様体小帯の電子顕微鏡的研究.日眼会誌 85:1317-1329,1981.