

急速凍結—凍結置換法によるラット角膜表面涙膜の微細構造の観察

陳 海波¹⁾, 欧 波¹⁾, 山林 茂樹²⁾, 大野 伸一³⁾, 塚原 重雄¹⁾¹⁾山梨医科大学眼科学教室, ²⁾医療法人碧樹会山林眼科, ³⁾山梨医科大学第一解剖学教室

要 約

急速凍結—凍結置換法により走査型電子顕微鏡でラット涙膜の微細構造を観察し, 従来の化学固定法と比較した。ラット眼を麻酔下で急速凍結し, 摘出した後, 角膜表面に割断を加えた。2%オスミウム酸を含有したアセトンで凍結置換を行い, 臨界点乾燥法で乾燥し, 白金コーティングしてから, 走査型電子顕微鏡で観察した。従来の化学固定法では, 角膜表層細胞の微絨毛が明瞭に観察されたが, 急速凍結—凍結置換法では, 角膜表面は一層の無構造で非常に薄い膜様物質に覆われ, さらに, その膜様物

質と角膜表面の間に細い線維から成る網目様構造が観察された。ラット涙膜の構造は, 従来の3層構造説と異なる可能性が示唆された。また, 今回の方法では, 涙膜が生体に近い状態で保存でき, 涙膜の研究に有力な方法であると思われた。(日眼会誌 100: 453—457, 1996)

キーワード: 涙膜, 角膜表面, 微絨毛, 急速凍結—凍結置換法, 走査型電子顕微鏡

Ultrastructural Study on Rat Precorneal Tear Film by Quick Freezing-freeze Substitution Method

Hai-Bo Chen¹⁾, Bo Ou¹⁾, Shigeki Yamabayashi²⁾, Shinichi Ohno³⁾ and Shigeo Tsukahara¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical University²⁾Yamabayashi Eye Clinic, ³⁾Department of First Anatomy, Yamanashi Medical College

Abstract

The ultrastructure of rat precorneal tear film was visualized by the quick freezing-freeze substitution (QF-FS) method and the conventional fixative method under the scanning electron microscope (SEM). In the QF-FS method, the eyeballs of rats were quickly frozen with an isopentane-propane mixture cooled by liquid nitrogen applied directly to the eyes. After enucleating the eyes and fracturing the frozen corneas, the corneas were prepared for SEM observation. In contrast to the conventional fixative method, by which the microvilli of the surface epithelial cells could be visualized clearly, a very thin membrane-like structure was observed to cover the corneal surface in the eyes prepared by the

QF-FS method. Between the membrane-like structure and corneal surface, a homogeneous and fine network-like structure was observed. The results suggest that the structure of the tear film might be different from the one we have believed to consist of three layers until now. The QF-FS method is considered to be useful for the morphological study of the precorneal tear film. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 453—457, 1996)

Key words: Precorneal tear film, Corneal surface, Microvilli, Quick freezing and freeze substitution, SEM

I 緒 言

角膜表面の走査型電子顕微鏡(以下,電顕)的研究は,各種動物において数多く行われてきた^{1)~4)}。従来の走査型電顕の試料は,主に化学固定法,つまり,グルタールアルデヒドおよびオスミウム酸二重固定法を用い,アルコー

ルおよびアセトンで脱水,臨界点乾燥,イオンコーティングすることによって作製されてきた^{1)~4)}。この方法を用いることにより,角膜表面に関する知識が多く得られてきた。しかしながら,この方法では角膜表面を覆っている涙膜を保存できないため,観察することができなかった。したがって,涙膜の構造に関する形態的知見はいまだに

別刷請求先: 409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110 山梨医科大学眼科学教室 塚原 重雄
(平成7年11月17日受付,平成8年2月5日改訂受理)

Reprint requests to: Shigeo Tsukahara, M.D. Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical University,
1110 Shimokato Tamaho-cho, Nakakoma-gun, Yamanashi-ken 409-38, Japan

(Received November 17, 1995 and accepted in revised form February 5, 1996)

非常に乏しい。我々は生体内急速凍結—凍結置換法を用いることにより角膜表面の涙膜が保存できることを報告⁵⁾したが、今回、さらにこの方法を走査型電顕試料の作製に応用し、三次元的に角膜表面の涙膜を観察できたので、従来の作製法による試料のものと比較し、報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物

15～20週齢のWistar種のラット、雄9匹を用いた。従来の方法には3匹6眼、急速凍結—凍結置換法には6匹6眼を使用した。麻酔は、ペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®、4 mg/100 g、腹腔内注射)を用いた。なお、実験動物の取り扱い、山梨医科大学動物実験指針に従った。

2. 従来の走査型電顕試料作製法

ラットをペントバルビタールナトリウム(ネンプタール®)による致死麻酔下で眼球摘出を行い、2.5%グルタルアルデヒド液(0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.4)で前固定を室温で4時間行った。角膜縁に沿って角膜片を切り出し、一晚磷酸緩衝液で洗浄したのち、2%オスミウム酸で1時間後固定を行った。その後、アルコールならびにアセトンで脱水、酢酸イソアミルによるアセトンの置換、臨界点乾燥装置(日立 HCP-2 型)で試料乾燥した。イオ

ンコーティング装置(日立 E-1030)を用い、白金コーティングをし、走査型電顕(日立 S-4500, 5 kV)で観察した。

3. 急速凍結—凍結置換による走査型電顕試料作製法

ラットを麻酔した後、液体窒素で冷却したイソペンタン—プロパン混合液(−193°C)を直接角膜にかけ、凍結し、直ちに眼球を取り出した。凍結した状態で角膜表面を数か所切断し、ディープフリーザー(−80°C)で冷却した2%オスミウム酸を含むアセトン液に入れて、−80°Cに20時間、−20°Cに2時間、4°Cに2時間置き、最後に室温に移し、凍結置換を行った。置換後にアセトンで数回洗浄し、角膜片を切り出し、酢酸イソアミルでアセトンを置換してから、従来の方法と同様に臨界点乾燥法で乾燥、白金コーティング、走査型電顕で観察した。

III. 結果

1. 従来の方法での所見

以前の報告と同じように、角膜表層細胞の表面は、明るさの違う3種類の細胞、つまり微絨毛の多い明細胞、微絨毛の非常に少ない暗細胞およびその両者の間にある中等度の明るさの中間細胞が観察された(図1)。高倍率では微絨毛が明瞭にみえ、また明細胞の微絨毛の間にはごく少量の繊維状構造が認められたが、他の構造は観察されなかった(図1)。

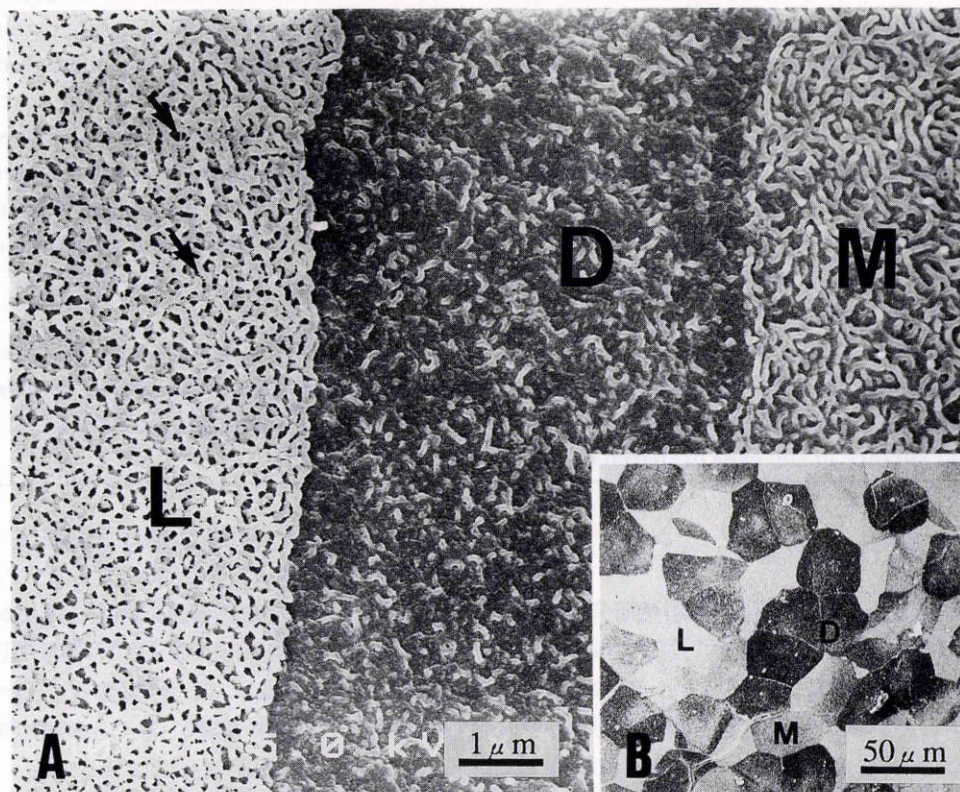


図1 従来の方法による角膜表面の走査型電子顕微鏡の写真。

- A: 角膜表層細胞の表面は、微絨毛の多い明細胞(L)、微絨毛の非常に少ない暗細胞(D)および中等度の明るさの中間細胞(M)が観察される。明細胞の微絨毛の間にはごく少量の線維状構造(矢印)が認められる。
B: 角膜表面の低倍率の所見では、3種類の明るさの細胞および細胞の輪郭が明瞭に観察される。

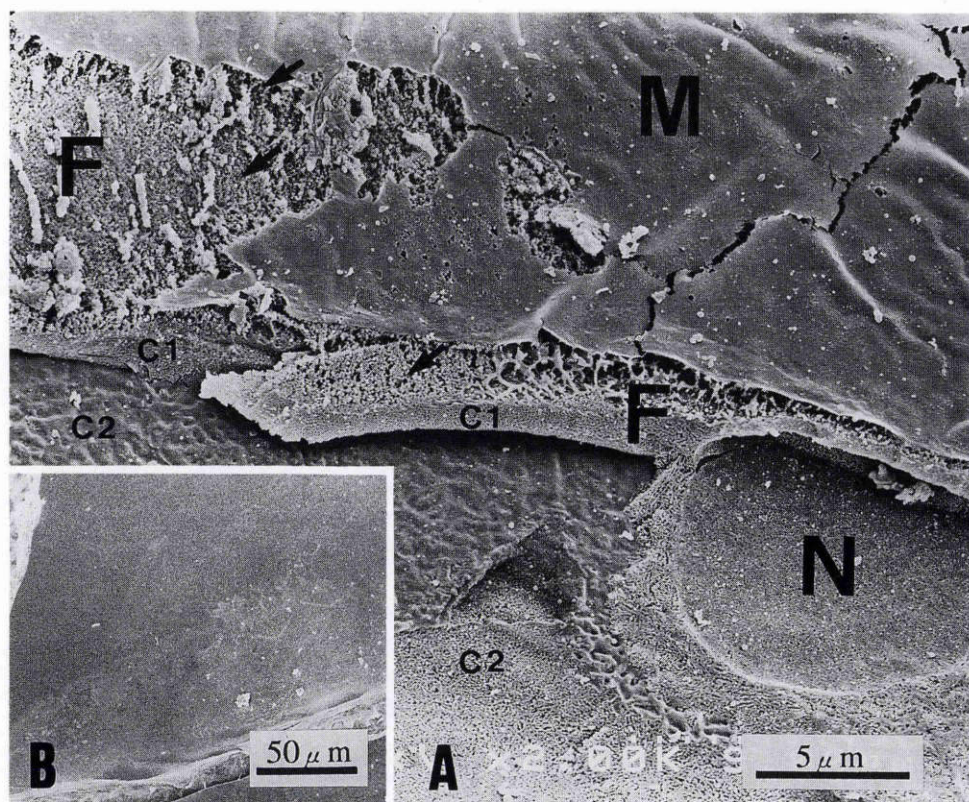


図2 急速凍結一凍結置換法による角膜表面の走査型電子顕微鏡の写真。

A: 角膜表面は一層の無構造物質(M)に覆われ、表面細胞の輪郭および微絨毛は観察されない。切断された場所(F)をみると、その無構造物質は非常に薄い膜様のもので、その下方と表面細胞(C1)の間には、細い線維から成る均一な網目様構造(矢印)が観察される。2層目(C2)の上皮細胞も観察される。Nは切断された細胞核を表す。

B: 角膜表面の低倍率の所見は、従来の方法による所見と明らかに違う。

2. 急速凍結一凍結置換法での所見

角膜表面は一層の無構造物質に覆われ、表面細胞の輪郭および微絨毛は観察されなかった(図2, 3)。しかし、切断された場所をみると、その無構造物質は非常に薄い膜様のもので、その下方と最表面の細胞の間には、細い線維から成る均一な網目様構造が観察され、さらに、細い線維が無構造物質の膜様物質と繋がっているのが認められた(図2, 3)。網目構造が厚いとみられる場所では微絨毛が観察されなかったが(図3A)、薄いともみられる場所では網目様物質に覆われている微絨毛が観察された(図3B)。

IV 考 按

角膜の表層細胞は、扁平な細胞で、表面に微絨毛が多数認められることが多くの研究により明らかにされている。走査型電顕領域では、表面の微絨毛の量によって、明るさの違う3種類の角膜表層細胞(明, 中間, 暗細胞)が以前から観察され^{1)~4)}、また、微絨毛の多い明細胞は、角膜上皮細胞のturn overにより表面に新しく到着した細胞で、微絨毛の少ない暗細胞は、表面に達してから古く、脱落していく細胞であることが知られている^{1)~4)}。今回、

我々の観察も従来の説と完全に一致した。しかし、角膜表面の涙膜については、従来の方法では保存できないため、いまだあまり知見が得られていない。したがって、涙膜の構造や表層細胞との関係などに関する知識がごく限られたものになっている。今まで涙膜は、3層構造、つまり最表面から約0.1 μmの油層、約7 μmの涙液層および角膜表面と接着している約0.02~0.05 μmの粘液層から成るとされているが⁶⁾、形態的な証拠がまだ得られていない。近年、涙膜の3層構造説に対する疑問を持っている著者が増えている^{5)7)~12)}。Nicholsら⁷⁾は急速凍結の金属圧着法、またHazlettら⁸⁾はその浸漬法を用い、透過型あるいは走査型電顕で角膜表面に約1 μmの厚さの均一な構造を観察でき、涙膜の粘液層であると指摘、従来の粘液層の厚さを否定した。しかし、これらの著者はその構造が、涙膜の粘液層であることを証明しておらず、また、Nicholsらは金属圧着法による形態への影響も考慮しなかった。さらに、Hazlettらはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を点眼してから観察したので、いずれかの疑問が残った。最近、Gipsonら⁹⁾およびWatanabeら¹⁰⁾は角膜表面に一層の角膜からのムチン様の蛋白質が存在していることを免疫電顕法で証明したが、従来の方法により作

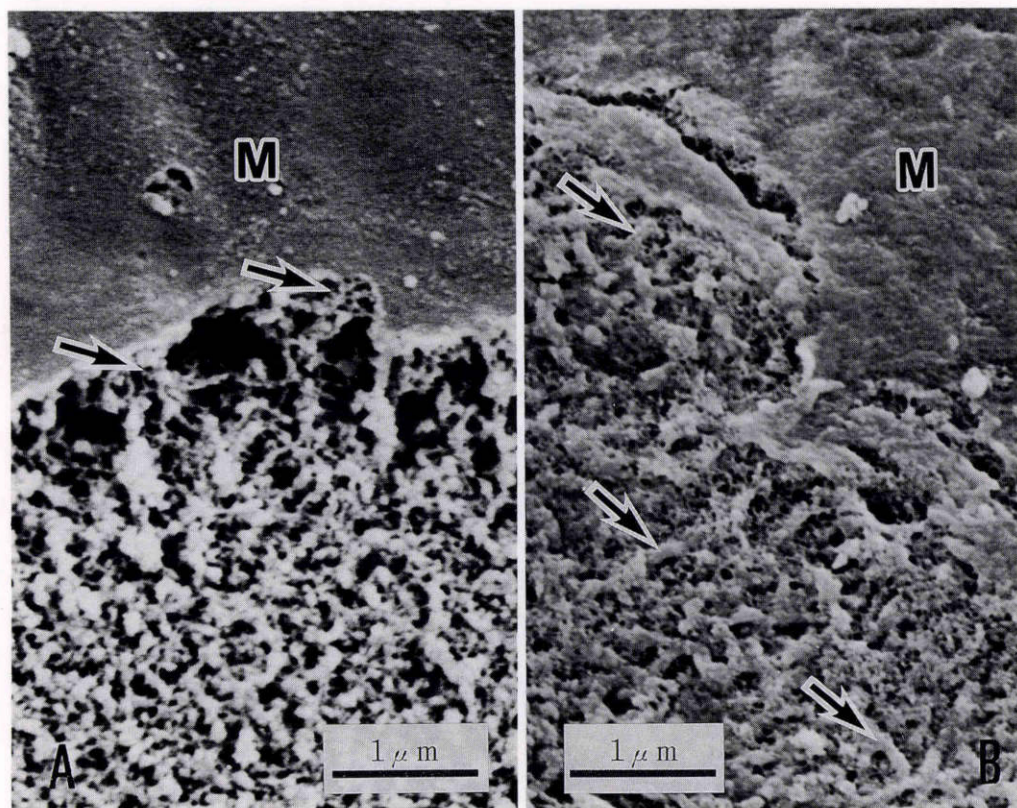


図3 急速凍結—凍結置換法による角膜表面の走査型電子顕微鏡の写真。

A：無構造の膜様物質(M)およびその下方の網目構造の強拡大像を示す。網目構造が厚いとみられる場所で微絨毛が観察されない。網目構造の細い線維が膜様物質に繋がっているのが認められる(矢印)。

B：網目構造が薄いとみられる場所で、網目様物質に覆われている微絨毛が観察される(矢印)。Mは表面の無構造の膜様物質を示す。

製した電顕試料のため涙膜が保存できず、さらに詳しい情報は得られなかった。興味深いのは、Prydal ら¹¹⁾¹²⁾の結論で、彼らは従来の涙膜の測定法の誤りを指摘し、共焦点顕微鏡などで涙膜を測定した上、涙膜はフリーな涙液層がなく、粘液から成る一層のゲル様構造であると推測しており、我々の考えとほぼ一致している。我々は急速凍結—凍結置換法を用いることにより、透過型電顕で角膜表面を覆っている一層の均一な網目様構造、さらに、その構造の最表面に一層の非常に薄い膜様構造が観察された⁵⁾。その均一な網目構造は涙膜の全層に認められ、また、最表面の膜様構造が油層ではないかと考えられた⁵⁾。今回の走査型電顕で観察された角膜の表面にある構造が既報の透過型電顕の所見⁵⁾と一致し、涙膜の構造物質以外に考えられない。さらに、走査型電顕で立体的に角膜の構造を観察できたことにより、透過型電顕でみられる涙膜最表面にあった膜様構造が、やはり一層の非常に薄い膜であることが確認された。その下方の網目様構造は涙膜の一部、例えば粘液層だけではないかという議論が考えられるが、そうすると、その薄い膜の表面にさらに涙液が載ることになる。このように粘液層と涙液層の間に境界となる膜様構造の存在は考えられにくい。我々のトレーサーを使った実験で、光学顕微鏡下でトレーサーが

角膜表面の涙膜の表面に載っているのを確認されている¹³⁾。この事実を加え、角膜の表面に観察された構造物は、涙膜の全層であると考えられた。したがって、網目構造の表面にある膜について、最も考えられるのは涙膜の油層であると推測された。

角膜表面の粘液は結膜の杯細胞から、また、涙液は主、副涙腺から分泌された物質から成ることが認められている⁶⁾⁷⁾¹⁴⁾。今までの涙膜の三層構造説では、涙液と角膜表面細胞との間に親水性のよい粘液層が存在し、涙液の分布、安定および付着に大きな役割を果たしていると考えられている⁶⁾¹⁴⁾。しかし、前述したように、この説はあくまでも推測であり、形態的な証拠がない。我々の結果では、透過型電顕あるいは走査型電顕でも類似の構造が観察されず、涙膜の実際の構造は従来の三層構造説とは異なる可能性が示唆された。粘液の分子構造は、糖蛋白と炭水化物から成る大きな分子量の分子で、二硫化物の架橋によりポリマーが形成され、また、炭水化物の鎖の弱い相互作用によりポリマーが互に結合し、ゲル化しているとされている¹⁵⁾。このような構造は、電顕下では粘液多糖体が主な成分から成る glycocalyx¹⁶⁾と同じく網目様にみえるのではないかと考えられる。実際、我々の透過型電顕の写真⁵⁾、あるいは Nichols ら⁷⁾の写真からみても、glyco-

calyx と網目様構造は混在し、形態的に分別できず、濃淡の差だけであった。したがって、我々の観察した網目様の構造は、恐らく涙液を多く含んでいる粘性性の構造物だと推測された。換言すれば、ラット涙膜の構造は、フリーな涙液層が存在せず、多量の涙液と粘液を混合した薄めのゲル様の構造で、その表面に油層が覆っているのではないかと思われた。

涙膜の厚さについて、Prydal ら¹¹⁾¹²⁾の測定では、従来の説より顕著に厚く、さらに、角膜の各場所の厚さが同じであると主張している。今回の研究では走査型電顕を用いたことで、正確な測定が難しいと考え、厚さは測定しなかった。しかし、図3に示すように、場所によって涙膜の厚さの違いが確認できている上、また、透過型電顕の結果⁵⁾も同様の所見が観察されており、Prydal ら¹¹⁾¹²⁾の結果と一致しなかった。この点について、今後さらに検討したい。

今回の実験対象は比較的瞬目の少ないラットであり、勿論ヒトの涙膜の構造と完全に一致するとは限らないが、涙膜の構造を解明するのに大いに参考になると思われる。また、将来これらの所見について免疫組織化学的手法を応用して確認する予定である。

本論文は文部省科学研究費(課題番号 07407050)の援助を受けたことを付記し深謝します。

文 献

- 1) Hoffmann F: The surface of epithelial cells of the cornea under the scanning electron microscope. *Ophthalmic Res* 3: 207—214, 1972.
- 2) Pfister RR: The normal surface of corneal epithelium: A scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol* 12: 654—668, 1973.
- 3) Harding CV, Bagchi M, Weinsieder A, Peters V: A comparative study of corneal epithelial cell surfaces utilizing the scanning electron microscope. *Invest Ophthalmol* 13: 906—912, 1974.
- 4) Hazlett LD: Corneal and ocular surface histochemistry (Review). *Prog Histochem Cytochem* 25: 1—60, 1993.
- 5) Chen HB, Yamabayashi S, Ou B, Ohno S, Tsukahara S: Ultrastructural studies on the corneal superficial epithelium of rats by *in vivo* cryofixation with freeze substitution. *Ophthalmic Res* 27: 286—295, 1995.
- 6) Milder B: The lacrimal apparatus. In: Moses RA, et al (Eds): *ADLER'S physiology of the eye, clinical application*. 8th ed. The C.V. Mosby Company, Washington, 15—35, 1987.
- 7) Nichols BA, Chiappino ML, Dawson CR: Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 464—473, 1985.
- 8) Hazlett LD, Barrett R: Sodium hyaluronate eye drop. A scanning and transmission electron microscopy study of the corneal surface. *Ophthalmic Res* 19: 277—284, 1987.
- 9) Gipson IK, Yankauckas M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Rinehart W: Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 218—227, 1992.
- 10) Watanabe H, Fabricant M, Tisdale AS, Spurr-Michaud SJ, Lindberg K, Gipson IK: Human corneal and conjunctival epithelia produce a mucin-like glycoprotein for the apical surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 337—344, 1995.
- 11) Prydal JI, Campbell FW: Study of precorneal tear film thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1996—2005, 1992.
- 12) Prydal JI, Campbell FW: Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2006—2011, 1992.
- 13) 陳 海波, 山林茂樹, 欧 波, 塚原重雄, 大野伸一: ラット涙膜の形態および組織化学的観察. *日眼会誌* 99 (臨時増刊号): 212, 1995.
- 14) Holly FJ, Lemp MA: Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol* 22: 69—87, 1977.
- 15) Allen A: Mucus—A protective secretion of complexity. *Trends Biochem Sci* 8: 169—173, 1983.
- 16) 小川和郎, 他(編): 組織学. 文光堂, 東京, 30—58, 1987.