

## 急速凍結ディープエッチング法による遺伝性 白内障ラット水晶体微細構造の研究

大西 健夫<sup>1)</sup>, 佐藤 知明<sup>1)</sup>, 谷口 重雄<sup>1)</sup>, 荻野 總夫<sup>1)</sup>  
鬼木 弘明<sup>2)</sup>, 中野 清子<sup>2)</sup>, 藤井 靖久<sup>3)</sup>, 大野 伸一<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>昭和大学藤が丘病院眼科, <sup>2)</sup>昭和大学藤が丘病院電子顕微鏡室

<sup>3)</sup>山梨医科大学第一解剖学教室

### 要 約

白内障を起し混濁を生じた水晶体の線維細胞内部の微細構造を検討するため, 16週齢と26週齢の遺伝性白内障雄ラット ICR/f 各1匹を用いて, 水晶体を皮質部と核部に分け, 急速凍結ディープエッチング法により観察した。皮質部では, 直径10~20 nmの顆粒状物質に覆われた直径10~15 nm および約5 nmの2種類の細線維が不規則に分岐, 連結しながら網目状構造を形成するのが認められ, 正常に比べ顆粒状物質の増加を認めた。核部では, 顆粒状物質が凝集, 融合し, 正常でみられた柵状構

造が崩壊しており, さらに, 空洞化した部分が所々に観察された。また, 線維間隙には多数の球状構造物が観察された。これらの細胞骨格の変化は, 白内障による線維細胞変性を表していると考えられた。(日眼会誌 101: 312-317, 1997)

キーワード: 遺伝性白内障ラット, 水晶体線維, 細胞骨格, 急速凍結ディープエッチング法

## Ultrastructural Study of Lens in Rat Hereditary Cataract by Quick-freezing and Deep-etching

Takeo Onishi<sup>1)</sup>, Tomoaki Sato<sup>1)</sup>, Shigeo Yaguchi<sup>1)</sup>,  
Toshio Ogino<sup>1)</sup>, Hiroaki Oniki<sup>2)</sup>, Kiyoko Nakano<sup>2)</sup>,  
Yasuhisa Fujii<sup>3)</sup> and Shin-ichi Ohno<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Fujigaoka Hospital, Showa University

<sup>2)</sup>Laboratory of Electron Microscopy, Fujigaoka Hospital, Showa University

<sup>3)</sup>1st Department of Anatomy, Yamanashi Medical University

### Abstract

The cytoskeleton of lens fiber cells in rats with hereditary cataract (ICR/f) was studied by quick-freezing and deep-etching. Two kinds of filamentous structure with diameters of 5 and 10~15 nm were observed in the cortical fiber cells. They showed meshwork structures which were buried in globular particles. These filamentous structures were mostly absent in the nucleus fiber cells, but aggregated and fused globular particles with diameters of 10~20 nm were observed. Small cavities were sometimes ob-

served in their cytoplasm. Between lens fiber cells, many globular structures were also seen. These changes might represent the degeneration of the lens fiber cells in cataract lenses. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 312-317, 1997)

Key words: Rat hereditary cataract, Lens fiber cell, Cytoskeleton, Quick-freezing and deep-etching method

## I 緒 言

水晶体線維内部微細構造の加齢変化や白内障的变化については, 人眼やラット, マウス, 家兎などを用いて数多

くの検討がなされている。加齢による変化としては, 水晶体線維の膨化・融解・断裂・配列不整<sup>1)</sup>, 線維細胞内空洞の出現<sup>1)2)</sup>, 線維細胞間の球状および渦巻様構造物<sup>1)3)4)</sup>, 顆粒状物質<sup>5)</sup>などが観察されている。白内障による変化とし

別刷請求先: 227 神奈川県横浜市青葉区藤が丘1-30 昭和大学藤が丘病院眼科 大西 健夫  
(平成8年3月22日受付, 平成8年12月2日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Onishi, M.D. Department of Ophthalmology, Fujigaoka Hospital, Showa University,  
1-30 Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 227, Japan

(Received March 22, 1996 and accepted in revised form December 2, 1996)

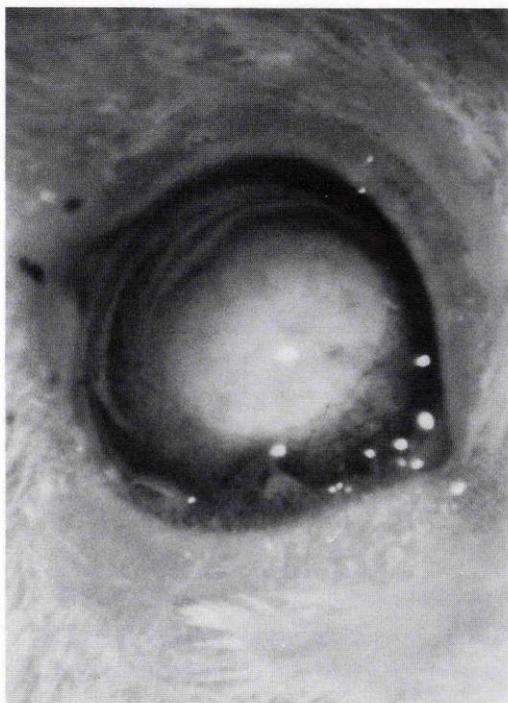


図1 細隙灯写真.

ICR/f ラットの前眼部, 水晶体全体に及ぶ混濁を認める.

ては, 水晶体線維の膨化や線維細胞膜の破壊<sup>6)~10)</sup>, 細胞間空胞<sup>6)11)</sup>, 水晶体線維間の塊状構造物<sup>12)</sup>や顆粒<sup>10)13)</sup>, 球状

構造物<sup>9)14)~19)</sup>などが観察されており, 加齢による変化と共通するものも多く, 多様な病理組織像が報告されている. 著者ら<sup>20)</sup>は既報において, ラット正常水晶体線維細胞を急速凍結ディープエッチング法を用いた透過型電子顕微鏡によって観察し, 水晶体皮質部では網目状を示し, 核部では柵状の規則的な細胞骨格構造を示すことを報告した. しかし, 白内障水晶体の線維細胞について細胞骨格の観点から論じた報告はない.

今回, 白内障水晶体の線維細胞内部の変化を細胞骨格の観点から検討するため, 遺伝性白内障ラット ICR/f<sup>21)</sup>を用い, 急速凍結ディープエッチング法により水晶体を三次元的に観察し, 水晶体混濁と線維細胞内微細構造の関連について超微形態学的知見を得たので, 若干の考按を加えて報告する.

## II 実験方法

材料として, 細隙灯で白内障を認めた 16 週齢と 26 週齢の雄 ICR/f ラット各 1 匹を使用した. 水晶体混濁の程度は使用した週齢による差はなく, 核と皮質ともに一様に混濁した成熟白内障を認めた(図 1). ラットを麻醉屠殺後, 水晶体を摘出し, 4°C, 2% パラホルムアルデヒドで 30~120 分間浸漬固定後, 実体顕微鏡下で分割した. この時, 皮質部および核部に同程度の混濁が認められた. その後, 既報<sup>20)</sup>に準じて, 4°C 下で 0.5% サポニン処理と

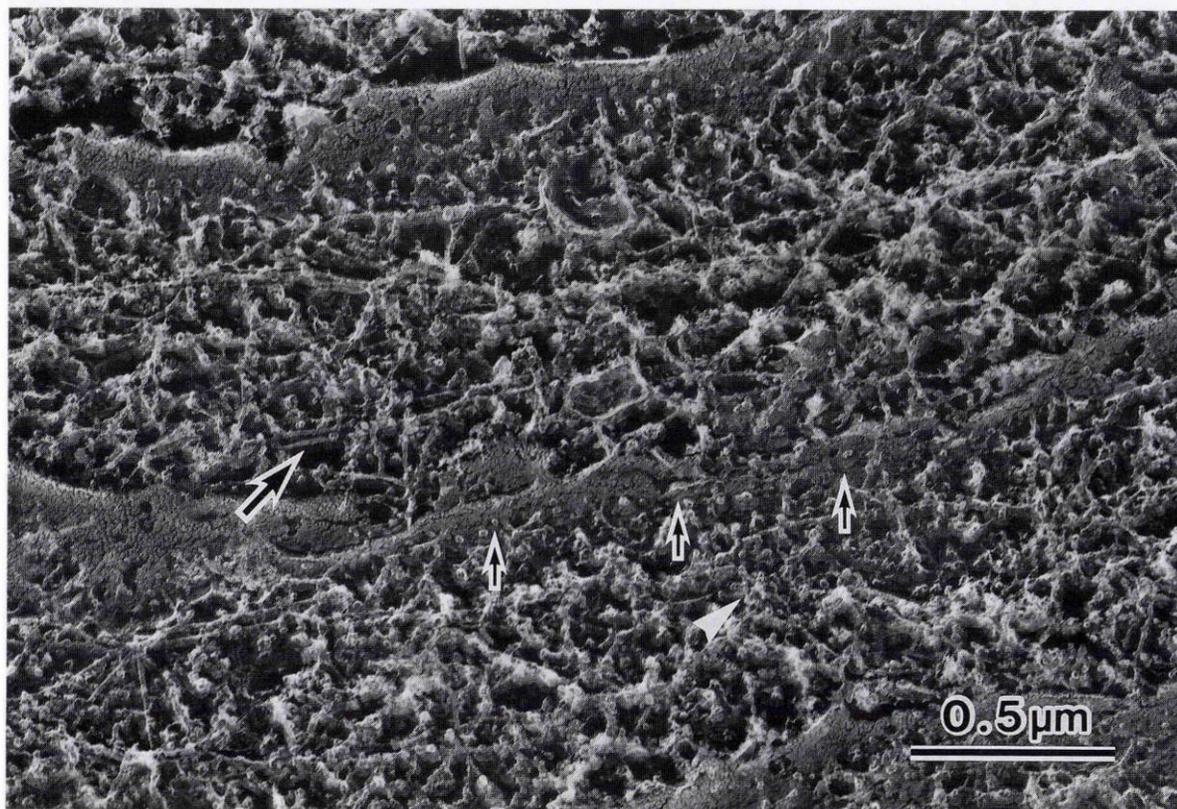


図2 水晶体皮質部の電子顕微鏡レプリカ写真 (16週齢).

線維細胞膜 (小矢印) が規則正しく並び, 細胞質内に細線維の走行 (大矢印) が認められる. 細線維は顆粒状物質 (矢じり) に覆われているものが多い.

0.25% グルタルアルデヒドによる再固定を行った。試料を凍結割断後、EIKO-FD 5 A および 3 AS 装置(エコーエンジニアリング社製)を用いてディープエッチングを行い、白金とカーボン蒸着により得られたレプリカ膜を透過型電子顕微鏡(日立 H-7000)で観察した。

### III 結 果

#### 1. 皮 質 部

皮質部では線維細胞膜が規則正しく並ぶのが観察され、細胞内部は直径 10~20 nm の多数の顆粒状物質に覆われた細線維が不規則に分岐、連結しながら走行しているのが認められた(図 2)。細線維が比較的是っきりと認められる部分では、表面にやや不整な凹凸がある直径 10~15 nm の細線維と、それよりも細い直径約 5 nm の細線維が認められ、正常水晶体と類似した網目状構造を示していたが、正常と比べてやや不鮮明であり、直線状に長く延びた細線維が多く認められた(図 3)。

#### 2. 核 部

核部の線維細胞内部は顆粒状物質が不規則に並んだ構造であり、正常水晶体核部においてみられた顆粒状物質の柵状の配列は観察されず、無秩序に局在する顆粒状物質が凝集、融合し、細胞内には空洞化した部分が多数観察された(図 4)。また、一部の隣接する線維において、顆粒

状物質が均一にみられる線維や、凝集が進み、空洞化が目立つ線維など、内部の形態が異なる線維細胞が認められた(図 5)。線維細胞間には、直径 0.3~0.5  $\mu\text{m}$  の球状構造物が不規則に散在する部位が観察され(図 5, 大矢印)、球状構造物は内部に顆粒状物質を含んでいた。この顆粒状物質は、細胞質にみられる顆粒状物質と同様、直径約 20 nm であり、凝集が認められた。さらに、この球状構造物の外壁を成す膜様構造の一部が線維細胞膜と連絡しているところが観察された(図 5, 矢じり)。

以上の皮質部、核部に認められた所見に関して、週齢による差はなかった。また、各 2 眼で所見の差はなかった。

### IV 考 按

ICR ラットは、Ihara<sup>21)</sup>により Wistar 系ラットの累代選択交配によって作られた常染色体劣性遺伝を示す遺伝性白内障の動物モデルである。その下位系統種の一つである ICR/f ラットの水晶体病理組織学的所見については、Uga ら<sup>9)</sup>による報告があり、10 週齢に後皮質の混濁が出現し、11 週齢には混濁が急速に進行し、水晶体核周辺と皮質深層に及んで、成熟白内障となる発症過程が示されている。水晶体混濁は進行性のものであるが、今回の実験に用いた 16 週齢と 26 週齢の水晶体は、ともに核部と皮質部が高度の混濁を示す成熟白内障に至っており、細

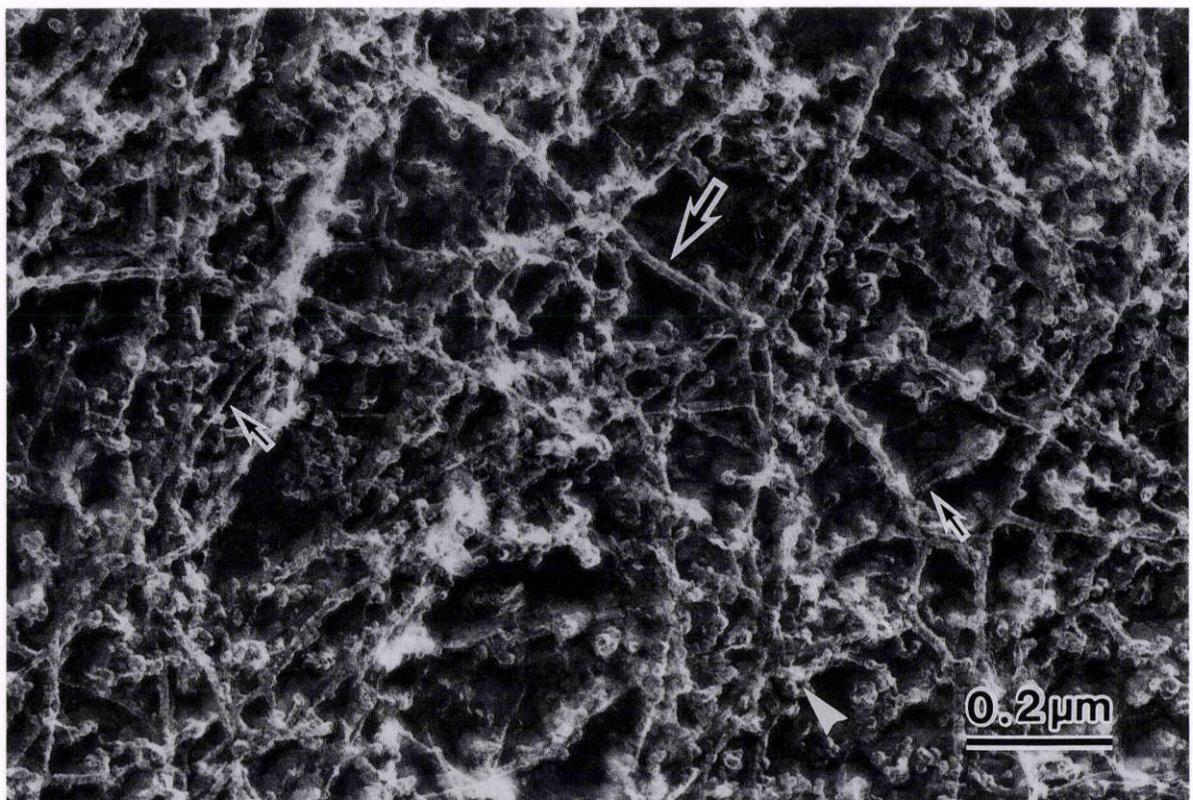


図 3 水晶体皮質部の強拡大電子顕微鏡レプリカ写真(16週齢)。

直径約 5nm の細線維(小矢印)と、表面にやや不整な凹凸がある直径10~15nm の細線維(大矢印)が観察され、分岐、連結して網目状構造を形成しているのが認められる。細線維を覆うように直径10~20nm の顆粒状物質が局在している(矢じり)。

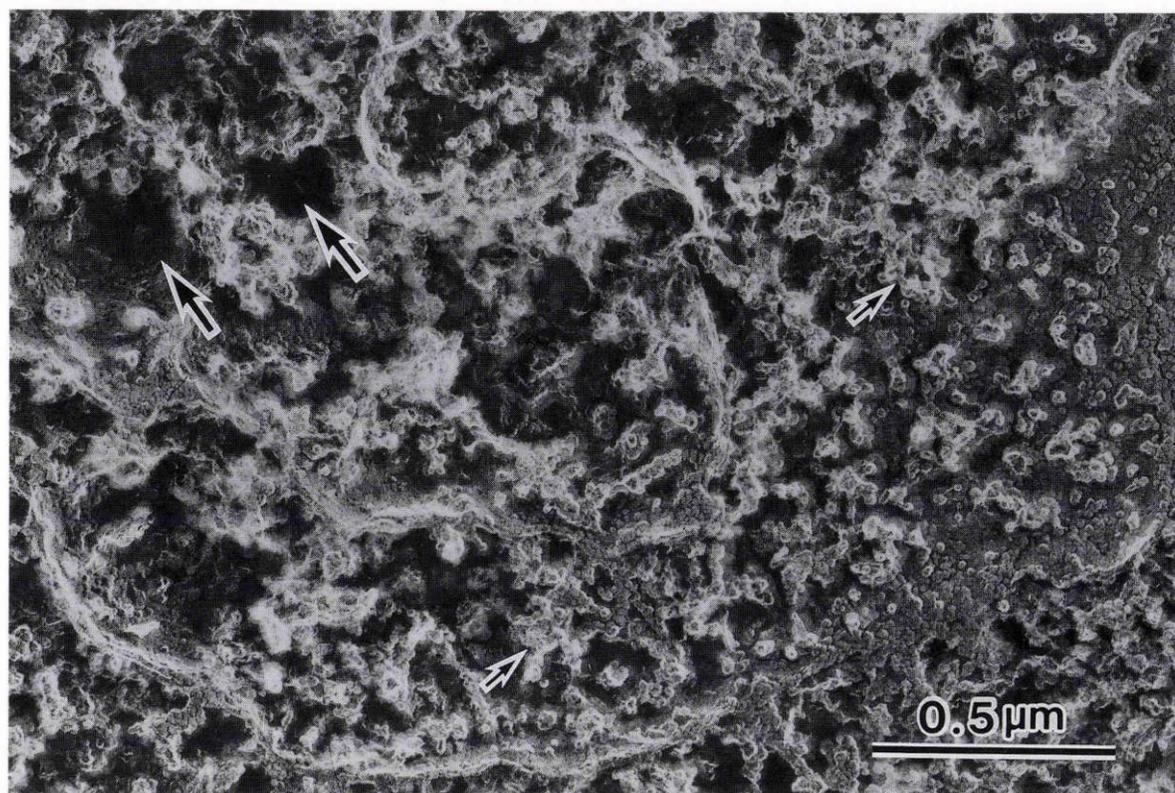


図4 水晶体核部の電子顕微鏡レプリカ写真(26週齢).

多量の顆粒状物質が存在し、そのほとんどが凝集、融合している(小矢印). 所々に空洞化した部分(大矢印)が認められる.

隙灯および実体顕微鏡下で、部位による混濁の差はみられなかった.

今回の観察において、皮質部の線維細胞内部では、細胞骨格系としての細線維は、すでに報告した正常構造に比べて直線状で形態がやや異なるが、網目状構造を形成しており、細線維の種類としては直径約5 nmと直径10~15 nmの2種類が観察され(図2, 3), それぞれの形態、直径からマイクロフィラメントと中間径フィラメントと考えられた. これらは、正常ラット水晶体の皮質部に局在する主要な細線維であり、白内障水晶体でも各細線維の構造は保たれており、網目状構造が正常と比較して不鮮明であったのは、細線維を覆うように顆粒状物質が多く局在することが原因であった. 水晶体は摘出前に皮質部の混濁が確認されており、線維細胞内の顆粒状物質が正常に比してやや多いことは、白内障による線維細胞変化を示すものと考えられた. 白内障における水晶体蛋白質の変化としては、不溶性蛋白質分子の増加、クリスタリンの会合や変性蛋白質の凝集による high molecular weight protein(HMW)の増加、変性蛋白質の凝集、糖・脂質との複合体形成などがあるが<sup>22)</sup>、今回の実験に用いたサポニン処理は細胞内可溶性蛋白質を除去する方法であり<sup>23)</sup>、顆粒状物質が正常水晶体より多く観察されるのは、白内障変化によって線維細胞内の不溶性蛋白質分子や異常蛋白質分子が増加したためではないかと考えられ

た.

核部の線維細胞内部は、多量の顆粒状物質が凝集、融合した状態であり、顆粒状物質が均一にみられる線維や、凝集が進み、空洞化が目立つ線維など、形態の異なるものがみられたが、皮質部に比べて、線維の変性、崩壊が進行していると考えられた. この多量の顆粒状物質の凝集、融合は、前述した白内障における水晶体蛋白質の変化の結果、変性が皮質部よりも進んだ状態にあるものと推察された. 正常水晶体核部の細胞骨格は、皮質部と異なり、ほとんどビーズ状フィラメントによって構成されているが<sup>20)24)25)</sup>、その構造は太さ7~9 nmの中心軸となるアクチン細線維に、直径12~15 nmの球状小片が不規則に付着するものであるといわれている<sup>24)25)</sup>. 今回の観察において、白内障水晶体核部は、正常水晶体にみられたビーズ状フィラメントによる柵状構造の細胞骨格がほとんど観察されず、凝集、融合した顆粒状物質によって占められていた. この顆粒状物質がビーズ状フィラメントの球状成分だとすると、正常水晶体では、顆粒状物質がビーズ状に連なり柵状であるのに対して、顆粒状物質が規則性のある構造を示さず、凝集や融合のような変化も含め無秩序となっていることが核部線維細胞の白内障変化と考えられた.

今回観察された線維間隙の球状構造物に関してはいくつかの報告<sup>3)8)14)~19)26)27)</sup>があり、それぞれ直径0.05~20

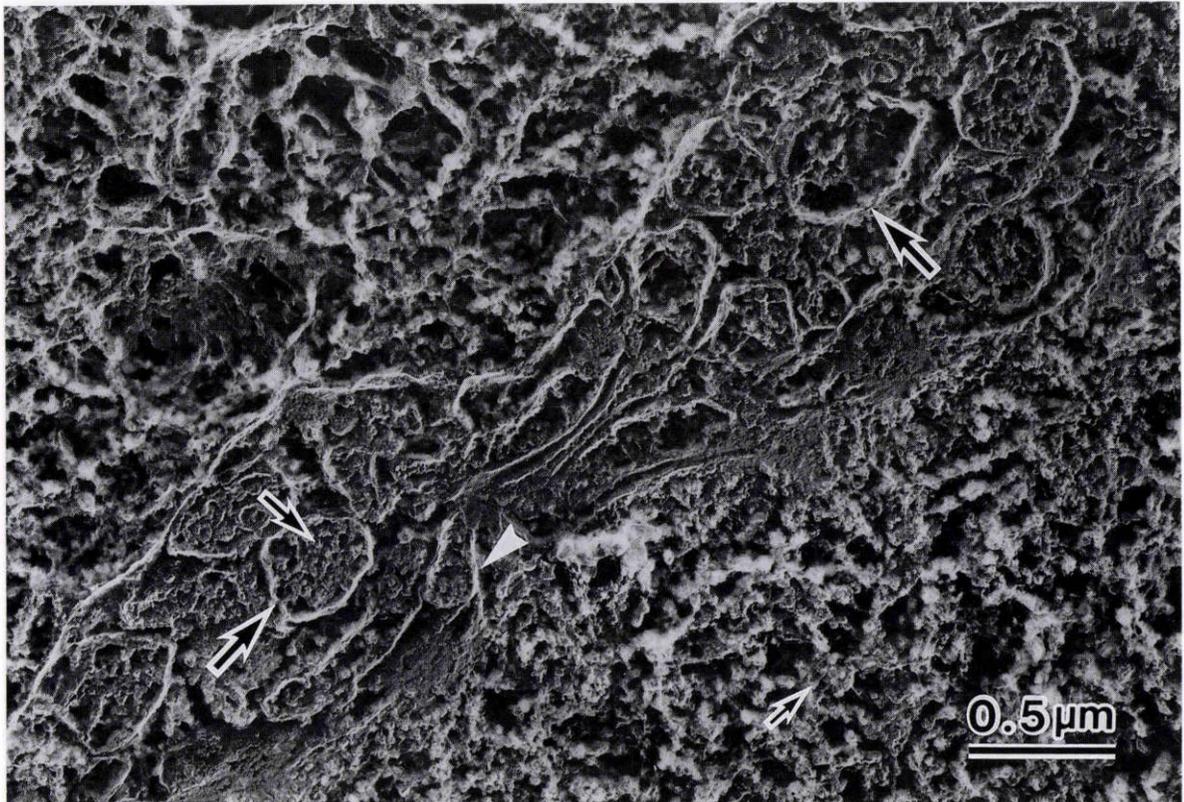


図5 水晶体核部の電子顕微鏡レプリカ写真(16週齢).

顆粒状物質が不規則に局在している(小矢印). 線維間隙に直径約20nmの顆粒状物質(中矢印)を含む直径0.3~0.5 $\mu\text{m}$ の球状構造物(大矢印)が観察され,さらに,この球状構造物の外壁を成す膜様構造の一部が線維細胞膜と連絡している(矢じり). また, 図中右下の線維は, 顆粒状物質が均一にみられ, 左上の線維では凝集が進み, 空洞化が目立つなど, 異なる形態学的変化が認められた.

$\mu\text{m}$ , 0.15~0.75  $\mu\text{m}$ , 0.5~1  $\mu\text{m}$  と異なり, 種々の大きさのために, 球状体, 球状顆粒などと表現されている. 起源としては線維突起に由来する形態像が示され<sup>14)17)18)</sup>, また, その形成に関しても家兎を用いて, 線維細胞膜から徐々に膨隆, 突出し, 遊離していく像が示されている<sup>14)</sup>. その本態については, 低級蛋白質による産物<sup>26)</sup>, 変性蛋白質の濃縮もしくは解離によるもの<sup>17)</sup>, 不溶性蛋白質分子の凝集体<sup>16)</sup>などが推測されている. 図5に示すような直径0.3~0.5  $\mu\text{m}$ の球状構造物は, 正常ラット水晶体にはみられないものであり, 白内障による異常形態と考えられた. また, これらは単位膜が顆粒状物質を内包する構造であり, さらに延びて線維細胞膜に連絡している部分が観察されたが, 細胞質内においては空洞化が観察されるのみで, 球状構造物は観察されなかった. このことから, これらの球状構造物は, 線維細胞膜が細胞質内の顆粒状物質をその内部に包み込みながら線維間隙に突出し, 細胞膜から分離することによって形成されたものと推察される. これは富永<sup>14)</sup>も指摘しているように, 線維細胞内変性蛋白質を細胞外へ排出しようとする機構によるものと考えられた. また, 顆粒状物質や細胞骨格の変化が線維細胞変性の一次変化とすると, この球状構造物は線維細胞の二次的な変化によって形成された異常産物と考えられ

た.

以上の所見は, 成熟白内障まで進行したICR/fラット水晶体の線維細胞内微細構造であるが, Ugaら<sup>9)</sup>は, 同ラットの18週齢までの水晶体変化を詳細に報告し, その特徴的所見として, 水晶体線維の液化が白内障進行とともに出現すること, 混濁の急速な進行と後極水晶体縫合の離開が密接な関係にあることを指摘している. 今回の観察は, 水晶体を皮質部と核部の2種類に分類しただけで, それ以上の部位分類をしていないので, Ugaらが指摘した所見との関連を述べることはできないが, 同報告が示した水晶体線維変性を顆粒状物質と細胞骨格の観点から観察し得たと思われる.

水晶体の透明性は, 様々な形態学的特性や生理学的メカニズムによって維持されているが, 既報<sup>20)</sup>で示したように, 細胞骨格系による線維細胞内微細構造もその重要な要素と考えられる. 本実験で観察された細胞骨格系の変化, すなわち水晶体核部でのビーズ状フィラメントによる柵状構造の崩壊は, 顆粒状物質の凝集, 融合や線維間隙の球状構造物などと同様に, 白内障の病理組織像の一面として理解される. 今回, 急速凍結ディープエッチング法を用いて, ラット遺伝性白内障水晶体の微細構造変化が三次元的に明らかになり, 線維細胞の変性と細胞骨格

の関連性が示唆された。

最後に、本実験では Wistar と ICR/f の 2 系間の相違は考慮に入れておらず、厳密な比較検討の場合、問題点として残る。また、用いた ICR/f ラットは 16 週齢と 26 週齢の各 1 匹、2 眼ずつと少なく、比較している既報の正常 Wistar ラットは 8 週齢であり、週齢数が異なる。今回、16 週齢と 26 週齢で細胞骨格所見の週齢による差はなかったが、観察された変化が線維変性の病的過程である白内障による変化だけではなく、個体差や、水晶体線維の加齢による変化を含んでいることも考えられ、今後、複数の ICR/f ラットを用いた経時的な観察や、白内障片眼発症の ICR/ul ラットを用いた検討などが必要と思われる。

本論文の要旨は、第 25 回臨床電子顕微鏡学会、第 20 回水晶体研究会で発表した。

#### 文 献

- 1) 奥間政昭：ラット水晶体の加齢による形態学的変化。日眼会誌 95: 209—221, 1991.
- 2) Gorthy WC: Cataracts in the aging rat lens: Their morphological characterization and evaluation as a model for human senile cataracts. Ophthalmic Res 9: 329—342, 1977.
- 3) 野田幸作：遺伝性白内障マウス水晶体の微細構造に関する研究。米子医誌 32: 1—16, 1981.
- 4) 宇賀茂三, 小原真樹夫, 石川 哲：マウス水晶体の加齢に関する形態学的研究。日眼会誌 86: 1313—1320, 1982.
- 5) Kuwabara T: The maturation of the lens cell: A morphologic study. Exp Eye Res 20: 427—443, 1975.
- 6) Gorthy WC, Abdelbaki YZ: Morphology of a hereditary cataract in the rat. Exp Eye Res 19: 147—156, 1974.
- 7) Hamai Y, Fukui HN, Kuwabara T: Morphology of hereditary mouse cataract. Exp Eye Res 18: 537—546, 1974.
- 8) 木島 裕：遺伝性白内障マウス(いわゆる中野マウス)水晶体の走査電子顕微鏡的観察。眼紀 32: 888—895, 1981.
- 9) Uga S, Ihara N: Morphological study of a hereditary rat cataract. Exp Eye Res 50: 665—670, 1990.
- 10) Uga S, Kador PF, Kuwabara T: Cytological study of Philly mouse cataract. Exp Eye Res 30: 79—92, 1980.
- 11) Hazlett LD, Bradley RH: Spontaneous cataract in nude athymic mice: Ultrastructural analysis. Exp Eye Res 26: 207—217, 1978.
- 12) 松戸武夫：実験的ナフタリン白内障の走査電顕的研究。眼紀 27: 885—889, 1976.
- 13) 松浦啓之：諸種白内障の電子顕微鏡的研究。第 3 報。実験的ナフタリン白内障と人眼白内障の電顕的比較観察。日眼会誌 73: 146—152, 1969.
- 14) 富永暁子：ナフタリン白内障の走査電子顕微鏡による初期像の研究。臨眼 33: 1015—1020, 1979.
- 15) 小林康紀：人眼水晶体の電子顕微鏡的研究。第 1 報。正常水晶体線維の逐年齡的観察及び高齢者に認められる老人性白内障への近接像。日眼会誌 73: 1098—1130, 1969.
- 16) 松戸武夫：人眼水晶体線維構造の走査電顕的研究。日眼会誌 77: 853—871, 1973.
- 17) 尾羽澤大：白内障に於ける水晶体核の電顕的研究。第 1 報。老人性白内障に就いて。日眼会誌 71: 1019—1028, 1967.
- 18) 松浦啓之：諸種白内障の電子顕微鏡的研究。第 2 報。老人性白内障および前極白内障の電子顕微鏡的観察。眼紀 19: 348—361, 1968.
- 19) 松浦啓之, 長田正夫, 三浦孝博, 魚谷 純, 藤永 豊：人眼水晶体における後囊下混濁の微細構造—とくに後囊下の上皮細胞について—。眼紀 35: 474—479, 1984.
- 20) 大西健夫, 今井正之, 谷口重雄, 荻野總夫, 藤井靖久, 大野伸一：急速凍結ディープエッチング法による水晶体線維微細構造の観察。日眼会誌 99: 1236—1241, 1995.
- 21) Ihara N: A new strain of rat with an inherited cataract. Experientia 39: 909—911, 1983.
- 22) 小原喜隆：4.2 病因。増田寛次郎：眼科学大系 2B 水晶体。中山書店、東京、113—126, 1993.
- 23) Hirokawa N: Quick freeze, deep etch of the cytoskeleton. Methods in Enzymology 134: 598—612, 1986.
- 24) Bradley RH, Ireland M, Maisel H: The cytoskeleton of chick lens cells. Exp Eye Res 28: 441—453, 1979.
- 25) Bradley RH, Lo WK, Kuszak J, Maisel H: The cytoskeleton of the chicken lens fiber cells: A scanning and ultrastructural analysis. Exp Eye Res 31: 487—494, 1980.
- 26) 木村一雄, 西尾 彪, 北村正信：人眼水晶体の電子顕微鏡学的研究。其の 2。老人性白内障の電子顕微鏡的観察。日眼会誌 65: 1165—1176, 1961.
- 27) 松尾恒己：人工白内障の電子顕微鏡学的研究。其の 1。ナフタリン白内障について。日眼会誌 66: 1302—1317, 1962.