

原子間力顕微鏡によるヒト角膜と強膜コラーゲン細線維の観察

山本 晋¹⁾²⁾, 人見 次郎²⁾, 澤口 昭一³⁾
阿部 春樹¹⁾, 繁野 雅次⁴⁾, 牛木 辰男²⁾

¹⁾新潟大学医学部眼科学教室, ²⁾新潟大学医学部第三解剖学教室

³⁾琉球大学医学部眼科学教室, ⁴⁾セイコーインスツルメンツ(株)

要 約

目的: 原子間力顕微鏡(atomic force microscope, AFM)を用いてヒト角膜, 強膜のコラーゲン細線維の形状解析を行う。

対象と方法: 66歳男性の正常摘出眼球から得た角膜と強膜の懸濁液をそれぞれに作製し, コラーゲン細線維をスライドガラスに付着, 自然乾燥させた標本を AFM のノンコンタクトモードにより大気中で観察した。

結果: AFM により角膜および強膜コラーゲン細線維の表面形態が明瞭に観察できた。そこでは角膜コラーゲン細線維の高さは 11.9 ± 1.0 (平均値 \pm 標準偏差) nm で, 強膜コラーゲン細線維の高さは 82.5 ± 35.6 nm で

あった。コラーゲン細線維には周期的な凹凸があり, D 周期(凹凸の 1 周期)は角膜で 65.7 ± 0.8 nm, 強膜で 67.3 ± 1.1 nm であった。また, その凹部の深さは角膜で 1.46 ± 0.50 nm, 強膜で 6.16 ± 1.23 nm であった。

結論: AFM で角膜, 強膜コラーゲン細線維の三次元超微形態の観察およびその定量的解析が可能であった。(日眼会誌 103: 800—805, 1999)

キーワード: 原子間力顕微鏡, 角膜, 強膜, コラーゲン, 超微形態

Observation of Human Corneal and Scleral Collagen Fibrils by Atomic Force Microscopy

Susumu Yamamoto¹⁾²⁾, Jiro Hitomi²⁾, Shoichi Sawaguchi³⁾, Haruki Abe¹⁾
Masatsugu Shigeno⁴⁾ and Tatsuo Ushiki²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Niigata University School of Medicine

²⁾Department of Anatomy, Niigata University School of Medicine

³⁾Department of Ophthalmology, Ryukyuu University School of Medicine, ⁴⁾Seiko Instruments Inc

Abstract

Purpose: We attempted to analyze the three-dimensional ultrastructure of human corneal and scleral collagen fibrils with an atomic force microscope (AFM).

Methods: A normal eye removed from a 66-year-old male was used in the study. Suspended corneal and scleral collagen fibrils were individually attached to glass slides by centrifugation. These collagen fibrils were air-dried and observed with a non-contact mode AFM in air.

Results: AFM imaging provided information on the surface topography of both corneal and scleral collagen fibrils. The corneal collagen fibrils had a height of 11.9 ± 1.0 (mean \pm standard deviation) nm and the scleral fibrils of 82.5 ± 35.6 nm. A periodic

banding pattern of grooves and ridges was clearly found in both types of fibrils; the D-periodicity and the groove depth were 65.7 ± 0.8 nm and 1.46 ± 0.50 nm in the corneal fibrils, and 67.3 ± 1.1 nm and 6.16 ± 1.23 nm in the scleral fibrils.

Conclusions: Surface topographic images of human corneal and scleral collagen fibrils were clearly obtained with the AFM. This technique provides quantitative information on the surface morphology of the collagen fibrils at high resolution. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 800—805, 1999)

Key words: Atomic force microscopy, Cornea, Sclera, Collagen fibril, Ultrastructure

別刷請求先: 951-8510 新潟市旭町通 1-757 新潟大学医学部眼科学教室 山本 晋
(平成 11 年 2 月 3 日受付, 平成 11 年 7 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Susumu Yamamoto, M.D. Department of Ophthalmology Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahimachi-dori Niigata 951-8510, Japan

(Received February 3, 1999 and accepted in revised form July 1, 1999)

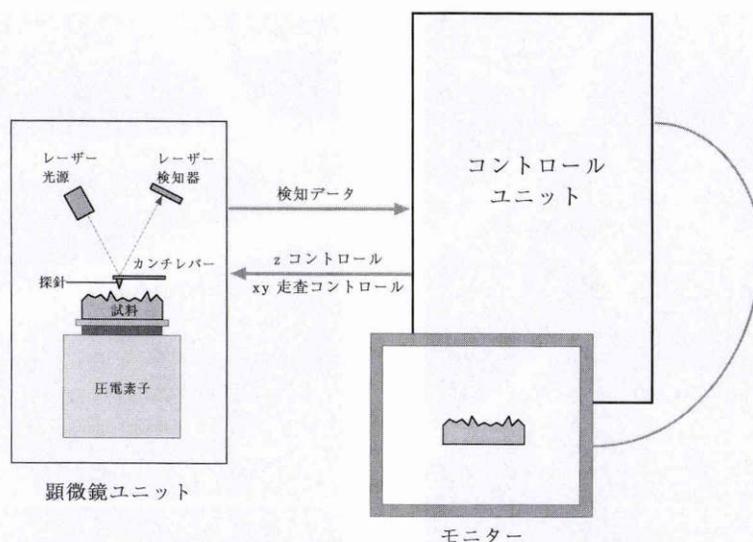


図 1 Atomic force microscope (AFM) の原理図。

I 緒 言

角膜および強膜はともにコラーゲン細線維を主体とし、それは主に I 型コラーゲンで構成されている¹⁾²⁾。しかし、両組織のコラーゲン細線維の構造と配列はかなり異なっており、その配列や太さの相異については、これまで透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) や走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) により詳しく調べられてきた^{3)~8)}。しかし、両組織のコラーゲン細線維自体の微細構造を比較検討した報告は比較的少なく⁹⁾、特にその立体的構造の相異の有無とその詳細については不明な点が多い。そこで、我々はその立体形状の差異を知る目的で、これまでウシの角膜と強膜コラーゲン細線維を原子間力顕微鏡 (atomic force microscope, AFM) により解析してきた¹⁰⁾。

この顕微鏡は 1986 年に発明された新しい装置¹¹⁾で、その分解能の高さと観察環境の自由さから最近では医学生物分野でも応用されるようになってきた¹²⁾¹³⁾。AFM 観察では、板バネ (カンチレバー) の先端にとりつけた探針 (先端径約 10 nm の非常に鋭い針) を試料に近接させ、両者の間に働く微小な力 (原子間力) を板バネのひずみとしてレーザー光線により検知する。その際、探針と試料間の距離が一定になるように原子間力を制御しながら試料表面を走査することで、試料の表面形状をナノメートルの精度で測定することができる画期的な顕微鏡である (図 1)。

今回は、この AFM を用いてヒトの角膜および強膜コラーゲン細線維の三次元構造を観察し、これまでの知見と比較検討したので報告する。

II 実験方法

実験には耳鼻科的疾患のために摘出した 66 歳男性の

正常眼球を用いた。角膜中央部および強膜赤道部の組織片を採取し、既報¹⁰⁾のごとくそれぞれリン酸緩衝液 (0.2 M, pH 7.4) 中で細切した後にホモゲナイザー (Polytron, Kinematica AG, スイス) により破碎し、懸濁液を作製した。この懸濁液にコンドロイチナーゼ ABC (0.1 U/ml, 生化学工業) とケラタナーゼ (0.01 U/ml, 生化学工業) を加え、37°C で 12 時間反応させた後に、遠心 (2,000 rpm 5 分間) によりコラーゲン細線維をシランコートしたスライドガラス上に付着させた。それぞれのスライドガラスは蒸留水で洗浄の後、室温で十分に自然乾燥させた。AFM 観察には市販の走査プローブ顕微鏡システム (SPI 3700, セイコーインスツルメンツ) を使用し、大気中でノンコンタクトモード測定を行った。その詳しい測定条件 (探針の種類, スキャナーの種類, スキャン速度など) は既報¹⁰⁾に準じた。

計測には任意に観察した角膜と強膜の各 20 本のコラーゲン細線維を用い、幅, 高さ, D 周期 (横縞の周期) およびそのギャップ帯の深さを測定した。その際、D 周期は各線維ごとに連続した 10 周期の長さを測定し、平均したものをそれぞれの線維の D 周期の値とした。また、解析用の画像は測定時に探針の走査方向をコラーゲン細線維の長軸方向に設定し、測定中の試料ドリフトの影響を最小限にした。

III 結 果

AFM により角膜, 強膜の単離されたコラーゲン細線維の表面微細形状を明瞭に観察することができた。それぞれの細線維表面にはコラーゲン細線維に特徴的な周期的な凹凸 (横縞) が存在した (図 2, 3)。角膜のコラーゲン細線維は細く均一で、それに対し強膜のコラーゲン細線維は様々な太さであった。角膜, 強膜コラーゲン細線維のそれぞれの幅, 高さ, D 周期 (凹凸の 1 周期), ギャップ帯

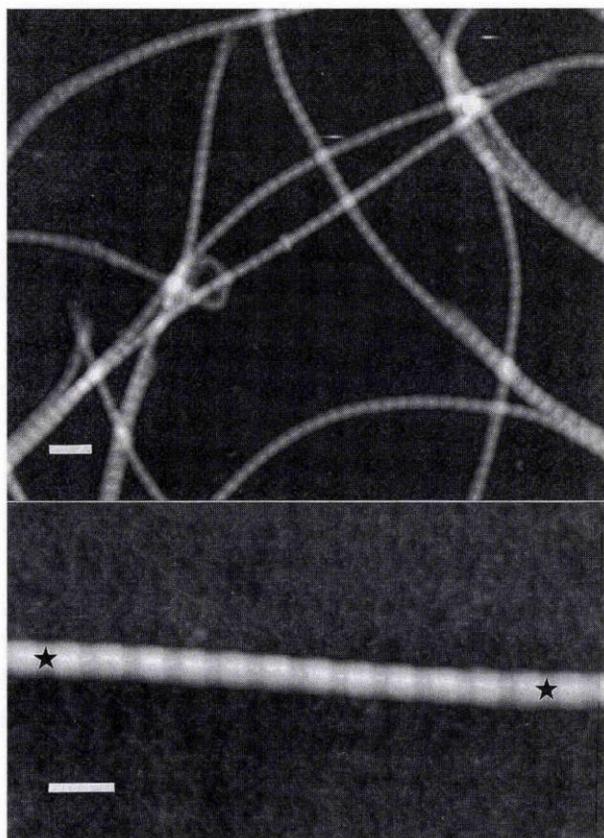


図2 角膜コラーゲン細線維.

太さの均一な線維がみられ,その線維上に周期的な凹凸が存在する.2つの★印の間の断面図を図4に示す.バーは200 nm(上)と100 nm(下)

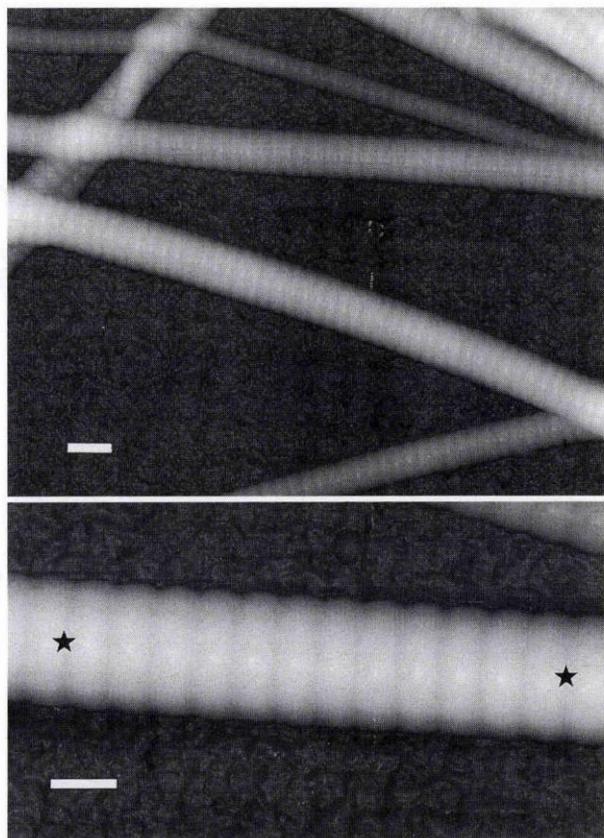


図3 強膜コラーゲン細線維.

様々な太さの線維がみられ,その線維上に周期的な凹凸がみられる.2つの★印の間の断面図を図4に示す.バーは200 nm(上)と100 nm(下)

(凹部)の深さを示したのが表1である.角膜と強膜のコラーゲン細線維の幅,高さ,D周期,ギャップ帯の深さの値でそれぞれ有意差(p<0.01,t-検定)があった.すなわち,角膜に比べ強膜のコラーゲン細線維は太く,D周期が長いことが明らかになった.また,ギャップ帯の深さも強膜のコラーゲン細線維の方が角膜のものより深かった.

次に,コラーゲン細線維の長軸方向の断面図(図4)を解析すると,角膜ではギャップ帯(凹部)とオーバーラップ帯(凸部)の移行は急峻で,しばしばオーバーラップ帯の両端に突出があった.また,ギャップ帯の中央に小さな突出が存在することもあった.一方,強膜のコラーゲン細線維ではギャップ帯とオーバーラップ帯は滑らかに移行しており,角膜のような各帯内の小さな突出はなかった.

強膜の標本ではしばしばコラーゲン細線維の末端と思

われる先細り像がみられた(図5).この像は機械的にちぎれた細線維の断端が鈍に終わったり,花房状に終わっているのとは明らかに異なっていた.先細りの部分では,その先端付近までD周期に一致した凹凸が存在した.

IV 考 按

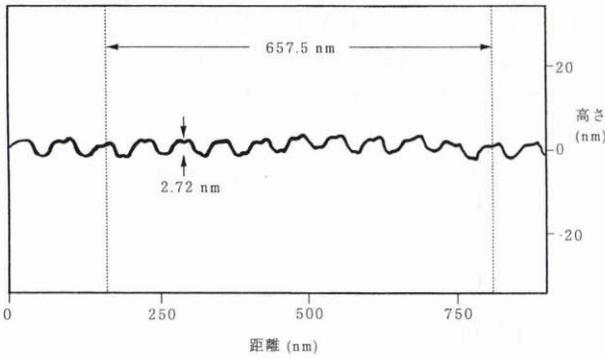
今回,コラーゲン細線維の観察に用いたAFMはBin-nigら¹¹⁾により発明された新しい顕微鏡である.この顕微鏡では,雲母の劈開面の原子配列が観察できるほどの分解能を持つことから,主に材料学の分野で利用されてきた.AFMが電子顕微鏡と異なり試料の導電性を必要としないこと,真空中に限らず大気中や液中での観察が可能なこと,三次元の画像情報において高さを含めた数値解析が可能なことなどの利点を持つことから,医学生

表 1

	高さ	幅	D周期	ギャップ帯の深さ
角膜	11.9±1.0 (9.0~12.8)	87.4±4.7 (78.7~95.8)	65.7±0.8 (64.3~67.2)	1.46±0.5 (0.4~2.3)
強膜	82.5±35.0 (27.1~148.6)	204.2±62.9 (104.8~294.0)	67.3±1.1 (65.5~68.9)	6.16±1.3 (4.3~8.1)

単位は nm 平均値±標準偏差

角膜



強膜

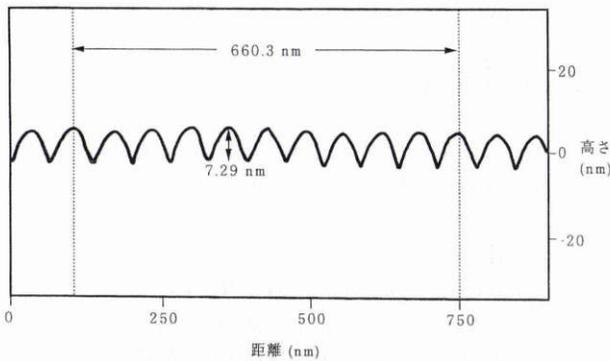


図 4 角膜および強膜コラーゲン細線維の断面像。

図 2, 3 で示したコラーゲン細線維の星印間の断面図を示した。AFM では三次元画像の数値解析が可能である。

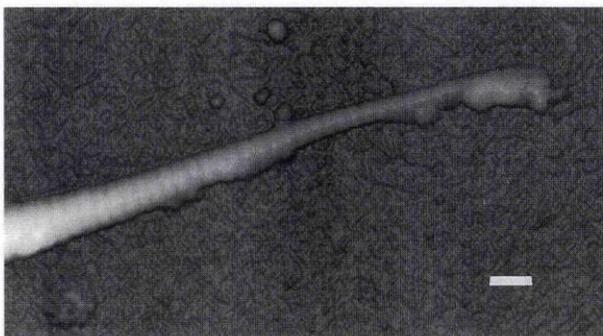


図 5 強膜コラーゲン細線維の末端像。

強膜ではしばしばこのようなコラーゲン細線維の末端像がみられた。バーは 200 nm

物分野でも注目され、応用が始められてきている¹²⁾¹³⁾。

AFM によるコラーゲン細線維の観察については、すでにいくつかの報告がある。角膜と強膜のコラーゲン細線維については、Meller ら¹⁴⁾がヒトの組織切片標本を用いて AFM のコンタクトモード観察を行っている。一方、我々のグループは細線維の微細構造をより正確に解析する目的で、各線維を単離し、平坦なガラスに付着して観察する方法をウシの角膜と強膜で行った¹⁰⁾。また、その際、AFM 観察像からコラーゲン細線維の直径を算出するには、測定した線維の幅の値よりも高さの値が重要である

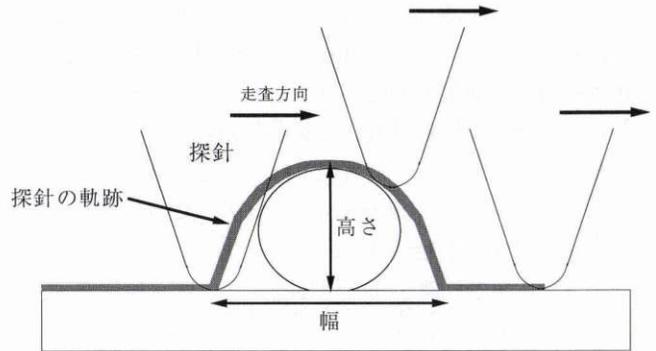


図 6 AFM 測定時の探針の動き。

AFM では探針の形状の影響のため、小さな試料を測定するときは平面上の距離が長く描かれる傾向にある。

ことを報告した。すなわち、AFM で円柱状の試料、コラーゲン細線維などを観察をするとき、走査する探針はまずその側面が試料に近づく。その段階で探針試料間に原子間力が働くためコラーゲン細線維などは半円柱状の像として捕えられ、本来の幅より太く描かれることになるからである(図 6)。今回、我々はこの観察法をヒトの角膜と強膜のコラーゲン細線維観察に利用した。これまでのコラーゲン細線維の AFM 観察では単純に試料を伸展したり^{14)~17)}、組織片を観察したもの¹⁸⁾であったが、コラーゲン細線維の 1 本 1 本を単離する我々の方法は正確な解析ができると考える。

角膜コラーゲン細線維はその透明性の維持のため太さが均一なことが、また強膜では種々の太さのコラーゲン細線維がみられることが知られている¹¹²⁾。今回、我々が観察したヒト角膜、強膜コラーゲン細線維の直径(高さ)はそれぞれ 11.9 ± 1.0 (平均値 \pm 標準偏差) nm, 82.5 ± 35.5 nm であった。我々が今回と同様の方法で解析したウシの角膜、強膜コラーゲン細線維の直径(高さ)はそれぞれ 15.6 ± 1.5 nm, 74.2 ± 55.7 nm であり¹⁰⁾、ヒトの角膜コラーゲン細線維の直径はウシのものより小さかった。このヒトとウシの角膜コラーゲン細線維の直径の違いは、X 線回折で角膜コラーゲン細線維の種差を検討した Meek ら¹⁹⁾の報告に対応している。一方で、今回得られた値は TEM 観察、X 線回折の結果に比べてかなり小さい。例えば、Borcharding ら⁴⁾はヒト角膜中央部から強膜までのコラーゲン細線維を TEM で解析し、角膜では 22.3~33.6 nm、強膜では 10.7~233 nm の直径を持つコラーゲン細線維が観察できたと報告している。また、同様に TEM を用いた観察で、Curtin ら⁵⁾は正常強膜には 40~280 nm の直径を持つコラーゲン細線維が存在したとしている。Komai ら⁷⁾は TEM と細胞消化法を併用した SEM を用いたヒト角膜と強膜の細線維構築の解析で、角膜コラーゲン細線維の直径は 25~35 nm、強膜のものは 25~230 nm の幅であると述べている。また、Meek ら¹⁹⁾の X 線回折の結果では、ヒト角膜のコラーゲン細線維の

直径は 30.8 nm となっている。今回、コラーゲン細線維の直径が従来より小さく測定された理由は不明だが、自然乾燥時の表面張力のためコラーゲン細線維がつぶれている可能性²⁰⁾や探針試料間にかかる相互間力でコラーゲン細線維が変形している可能性なども考えられる。今後、乾燥法の工夫や液中観察を試み、より自然な状態での細線維を観察する予定である。

コラーゲン細線維の D 周期は、コラーゲン細線維中のコラーゲン分子が約 4 分の 1 ずつずれて配列しているためにできるといわれている²¹⁾。これまで TEM 観察の結果から、組織の種類によりコラーゲン細線維の D 周期が異なることが報告²²⁾されてきた。こうした D 周期のばらつきを TEM 標本作製時のアーティファクトと考える人もいたが、本質的に細線維内の構造が異なると考える研究者もいた。例えば、Marchini ら²³⁾は凍結レプリカ法を用いて、ウシの角膜とラットの尾髄のコラーゲン細線維内のサブフィブリルの走行の違いを示し、コラーゲン細線維とサブフィブリルの走行の角度が D 周期に影響していると考えている。我々は既にウシの角膜、強膜コラーゲン細線維の AFM 観察で角膜コラーゲン細線維の D 周期が強膜のものより短いことを示したが¹⁰⁾、今回のヒト角膜、強膜コラーゲン細線維でも角膜コラーゲン細線維の D 周期 (65.7 ± 0.8 nm) が、強膜のもの (67.3 ± 1.1 nm) と比べて有意に小さかった (t-検定, $p < 0.01$)。角膜と強膜の細線維内構造 (サブフィブリル構造) を可視化するのが今後の課題である。

本研究では AFM を用いてギャップ帯の深さについても解析した。これは、電子顕微鏡では解析できない情報である。今回の自然乾燥標本では、角膜のものが 1.46 ± 0.50 nm、強膜のものが 6.16 ± 1.32 nm であった。同じ自然乾燥標本の AFM 観察でも、Meller ら¹⁴⁾の報告では角膜、強膜それぞれのものが 0.23 ± 0.11 nm と 0.42 ± 0.14 nm と我々のものよりかなり浅くなっている。これは、我々が試料作製時にコンドロイチナーゼ ABC とケラタナーゼ処理を行い、プロテオグリカンを消化した標本を用いたことによるかも知れない。実際に、Scott ら²⁴⁾はクプロメロニックブルーを用いたウサギ角膜の TEM 観察で、ケラタン硫酸がコラーゲン細線維のオーバーラップゾーン部に、デルマトン硫酸がギャップゾーン部に存在することを示している。また、Raspanti ら¹⁷⁾はラット尾髄のコラーゲン細線維の AFM 観察で、プロテオグリカン消化の有無による像の違いを明らかにしている。

今回の強膜観察ではコラーゲン細線維の先細り像がいくつかが観察された。今回の実験の中ではコラーゲン細線維が機械的に断列している像もみられたが、この先細り像はそれらとは明らかに異なる形態を示していた。この像はコラーゲン細線維の再形成の実験²⁵⁾で観察されているコラーゲン細線維の先端によく対応しており、コラーゲン細線維の末端である可能性が高い。

以上、今回我々は AFM でヒト角膜、強膜コラーゲン細線維の解析を行った。AFM はこれまでの TEM, SEM と同等、あるいはそれ以上の分解能をもち、また、より生体内環境に近い状態での観察が可能である。SEM 観察における金属コーティングの必要もない。今後、試料作製の改良や液中観察により、より微細な構造解析や生体内環境に近い状態での観察を行いたい。

文 献

- 1) Nishida T: Cornea. In: Krachmer JH, et al (Eds): Cornea. CV Mosby, St Louis, 3—27, 1997.
- 2) Panjwani N, Mohan R: Sclera. In: Krachmer JH, et al (Eds): Cornea. CV Mosby, St Louis, 29—40, 1997.
- 3) Spitznas M: The fine structure of human scleral collagen. Am J Ophthalmol 71: 68, 1971.
- 4) Borcharding MS, Black LJ, Sittig RA, Bizzell JW, Breen M, Weinstein HG: Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. Exp Eye Res 21: 59—70, 1975.
- 5) Curtin BJ, Iwamoto T, Renaldo DP: Normal and staphylococcal sclera of high myopia. An electron microscopic study. Arch Ophthalmol 97: 912—915, 1979.
- 6) 駒井好子, 牛木辰男, 井出千束: 角膜を構成する膠原細線維の配列。細胞消化/走査電顕による観察を中心として。眼紀 41: 499—504, 1990.
- 7) Komai Y, Ushiki T: The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2244—2258, 1991.
- 8) Marshall GE, Konstas AGP, Lee WR: Collagens in the aged human macular sclera. Curr Eye Res 12: 143—153, 1993.
- 9) Yamabayashi S, Ohno S, Aguilar RN, Furuya T, Hosoda M, Tsukahara S: Ultrastructural studies of collagen fibers of the cornea and sclera by a quick-freezing and deep-etching method. Ophthalmic Res 23: 320—329, 1991.
- 10) Yamamoto S, Hitomi J, Shigeno M, Sawaguchi S, Abe H, Ushiki T: Atomic force microscopic studies of isolated collagen fibrils of the bovine cornea and sclera. Arch Histol Cytol 60: 371—378, 1997.
- 11) Binnig G, Quate CF, Gerber C: Atomic force microscope. Phys Rev Lett 56: 930—933, 1986.
- 12) Ushiki T, Hitomi J, Ogura S, Umemoto T, Shigeno M: Atomic force microscopy in histology and cytology. Arch Histol Cytol 59: 421—431, 1996.
- 13) 牛木辰男, 人見次郎, 山本 晋, 小倉滋明: 原子間力顕微鏡。生体高分子から生きた細胞の液中観察まで。生体の科学 47: 601—606, 1996.
- 14) Meller D, Peters K, Meller K: Human cornea and sclera studied by atomic force microscopy. Cell Tissue Res 288: 111—118, 1997.

- 15) **Chernoff EAG, Chernoff DA** : Atomic force microscope images of collagen fibers. *J Vas Sci Technol A* 10 : 596—599, 1992.
- 16) **Baselt DR, Revel JP, Baldeschwieler JD** : Sub-fibrillar structure of type I collagen observed by atomic force microscopy. *Biophys J* 65 : 2644—2655, 1993.
- 17) **Raspanti M, Alessandrini A, Ottani V, Ruggeri A** : Direct visualization of collagen-bound proteoglycans by tapping-mode atomic force microscopy. *J Struct Biol* 119 : 118—122, 1997.
- 18) **Fullwood NJ, Hammiche A, Pollock HM, Hourston DJ, Song M** : Atomic force microscopy of the cornea and sclera. *Curr Eye Res* 14 : 529—535, 1995.
- 19) **Meek KM, Leonard DW** : Ultrastructure of the corneal stroma : A comparative study. *Biophys J* 64 : 273—280, 1993.
- 20) **山本 晋, 人見次郎, 繁野雅次, 牛木辰男** : コラーゲン細線維の観察. *細胞* 31 : 9—12, 1999.
- 21) **Marshall GE, Konstas AGP, Lee WR** : Collagens in ocular tissues. *Br J Ophthalmol* 77 : 515—524, 1993.
- 22) **Chapman JA, Hulmes DJS** : Electron microscopy of the collagen fibril. In : Ruggeri A, et al (Eds) : *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. Martinus Nijhoff, Boston, 1—33, 1984.
- 23) **Marchini M, Morocutti M, Ruggeri A, Koch MHJ, Bigi A, Roveri N** : Differences in the fibril structure of corneal and tendon collagen. An electron microscopy and X-ray diffraction investigation. *Connect Tiss Res* 15 : 269—281, 1986.
- 24) **Scott JE, Haigh M** : 'Small' -proteoglycan : Collagen interactions : Keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the 'a' and 'c' bands. *Biosci Rep* 5 : 765—774, 1985.
- 25) **Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ** : Collagen fibrils *in vitro* grow from pointed tips in the C- to N-terminal direction. *Biochem J* 268 : 339—343, 1990.