

凍結乾燥法による硝子体の研究(2) (図5)

原 彰・三浦 雅博・清水 由規 (日本医科大学眼科)

Vitreous Study by Freeze dry Method

Akira Hara, Masashiro Miura and Yoshinori Shimizu

Department of Ophthalmology, Nippon Medical School

要 約

家兎眼を用い半切眼球硝子体面の構造を走査電顕で観察しようとした。このような試みは急速凍結法を用い乾燥条件を適合させれば可能であることが提示できた。乾燥条件の内では冷却凝集捕捉器の面積が大きな因子となっているようである。(日眼 91:293-297, 1987)

キーワード：走査電顕，硝子体，凍結乾燥

Abstract

Scanning electron microscopic study for vitreous surface in semidissected eye ball was experimented. These approach was succeeded in the rapid freeze method as long as drying procedure in specimen was chosen appropriately. Volume of cold trap seemed to be most important factor to succeed it. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 293-297, 1987)

Key words: Scanning electron microscopy, Vitreous, Freeze dry

緒 言

半切眼球硝子体腔を満たしている硝子体全体の構造を保存し形状を観察するには、半切眼球を凍結して硝子体腔の硝子体各成分(水、コラーゲン、他)が元来存在しているその場所で凍結固定するのが理想的である。しかし凍結法の技術的な操作は臨界的法に比べると難かしく特殊な器具も必要になるため、余り行なわれる事はなかった。さて硝子体腔に存在する硝子体は99%の水分とわずかの硝子体コラーゲタンパク質、ヒアルロン酸等から構成されている¹⁾。この為硝子体を研究する為には形態面からの研究だけでは不十分であり、水の物性の研究という物理学的な方面からの研究がなされなくてはならず、より硝子体の研究を難かしいものになっている。

水の物性は1気圧(760mmHg)、760Torrでは100℃

で水が沸騰する事を示す。しかし富士山頂では平地の約2/3気圧、507Torrであり水が87℃で沸騰することも示す。気圧を低くすると0.1Torrの低気圧下では-40℃で水は沸騰する。しかし-40℃では水は液状でなく氷(固体)として存在するので、-40℃以上に温度を上げると昇華潜熱として熱が利用され固体(氷)は気体となり、水は蒸発したという事になる²⁾³⁾。

この様な水の物性を理解し眼球硝子体に対し凍結乾燥処理を行うには、硝子体腔中の硝子体の有する共晶点以下に硝子体を凍結し、水蒸気を除去する必要がある。硝子体の水分を溶媒、硝子体のコラーゲン線維を溶質と考えたとき、溶質、溶媒と一緒に固体状態となる温度つまり共晶点、又は共晶温度は電気抵抗が大から小へ低下する温度をみつけて測定する方法もあるが、著者らは前回の実験で⁴⁾ドライアイス・アセトン法により測定した。この共晶点の測定は凍結乾燥法の基

別刷請求先：〒113 東京都文京区千駄木1-1-5 日本医科大学眼科学教室 原 彰

Reprint requests to: Akira Hara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Nippon Medical School

1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(昭和61年10月17日受付) (Accepted October 17, 1986.)

盤となるものであり、もし研究目的とする試料の共晶点を知らずに予備凍結の段階を不十分に行うと、昇華乾燥中の試料の劣化現象が起り、部分的な融解や軟化をみることになり形態保存観察を不可能にしてしまうものである。

さてこの様に生物試料を凍結させる場合、低温や凍結操作が試料に悪い影響を与え形態を破壊してはならない。凍結速度が低下するにつれて氷結晶粒サイズが増大し細胞に損害を与える。きわめて緩慢な凍結速度(0.1℃/分)では細胞が長時間に亘って濃縮塩類の害作用を受けるために細胞の死滅する割合が増大する。反対に余り急速な凍結(100~1,000℃/分)では致命的な細胞内凍結を起こすので避けなくてはならないとも考えられる⁵⁾⁶⁾。

更に室温から-80℃までの氷結晶の生じる温度帯を素早く通過し氷の結晶が成長しないような低い温度(-90℃以下)に試料を保存することも十分に検討されなくてはならない⁷⁾。

これ等述べたような水の物性が硝子体の形態研究に応用できるものなのかどうか、前回の研究では、1) 共晶点、2) 予備凍結、3) 凍結速度、4) 蒸着法、5) 乾燥温度等について検討した。前回の研究からは硝子体腔を氷結固定化し、半切眼球硝子体を乾燥させる事により硝子体中のコラーゲン線維を硝子体腔中に乾燥保存し走査電顕下で観察でき得る事が判かってきた。

今回は基礎的な研究の一環として、気圧を一定に保った場合硝子体中の水分の昇華が水蒸気凝集器(コールド・トラップ)の温度変化及び面積にどのように影響され、いかなる条件下での硝子体乾燥が走査電顕研究に実用的なものなのか主に検討した。

実験方法

実験動物として白色家兎1.2~1.6kgを用いた。凍結乾燥を行う条件として急速凍結の速度、真空条件を前回にならない同一のものとし、実験系を2つに分けて検討した。

実験1：眼摘後眼球を液体窒素で冷却したインペタン(-90℃)に浸漬し急速凍結した。インペタン浸漬下で眼球を電動ノコギリで半切した。半切眼球は低温槽(-80℃)で数日間予備凍結した。予備凍結後半切眼球は試料棚温度-40℃、冷却凝集捕捉器温度-80℃、冷却凝集捕捉器総面積2540cm²、気圧1×10⁻³Torrの条件下で凍結乾燥を5日間行い、最終的に棚温を0℃、30℃で12時間~1日乾燥させ、硝子体試料を

大気中にとり出し真空回転蒸着器で蒸着し、走査電顕及び透過電顕で観察した。

実験2：眼摘後カルノブスキー液(2%パラホルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド)で30分前固定した後カミソリで眼球を半切し、半切眼球を再びカルノブスキー液に浸漬して数時間固定した。その後半切眼球は液体窒素で冷却したインペタン中に浸漬し超低温槽(-130℃)で3日間予備凍結した。予備凍結後半切眼球は試料棚温度それぞれ-100℃と-80℃のものに分けられ、冷却凝集捕捉器温度-135℃、冷却凝集捕捉器総面積92cm²、気圧1×10⁻³Torrの条件下で凍結乾燥を2~3週間行なった。乾燥終了時に真空中に窒素ガスを注入し空気と試料の接触をさせた。試料は蒸着後走査電顕で観察した。

結果

実験1：前回の実験同様半切眼球硝子体は肉眼的に淡く白い綿花様線維構造を残すものとして硝子体腔中全体を満たしていた。走査電顕による観察では線維構造が保存されている事がみとめられ、線維の太さは平均200~900nm程であった(図1)。高倍率による観察で線維間に横たわる非常に細かい線維が橋渡しをしているのが観察された(図2)。これ等凍結乾燥硝子体を透過電顕で観察してみると直径約30nm大の硝子体線維であることが裏付けされた(図3)。

実験2：半切硝子体を棚温-100℃で乾燥させた場合、1週間たっても硝子体の乾燥は行こらなかった。硝子体は氷状に凍結固形したままの状態であった。棚

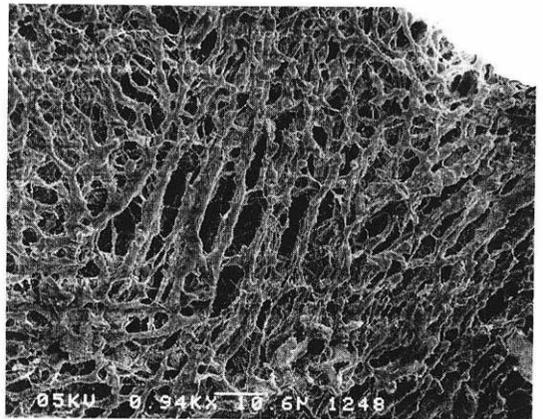


図1 未固定半切眼球硝子体の凍結乾燥硝子体の走査電顕像線維は平行して走行している。(白線バーは10.6μ)

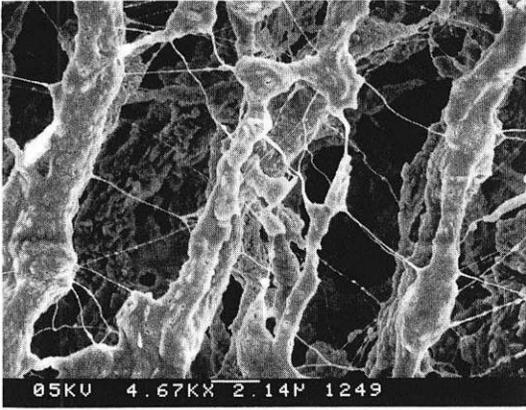


図2 拡大像。太い線維間を橋渡ししている細い線維がみられる。凍結乾燥状態が良好であることを示している。細い線維はヒアルロン酸又はファイブロンクチンと考えられる。(白線バーは2.14μ)

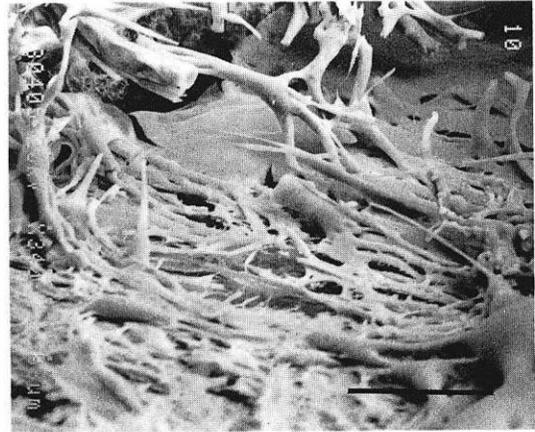


図4 カルノブスキー固定。硝子体の網状線維構造は残らなかった。全体に線維状というよりは索状を示す。(バーは83μ)

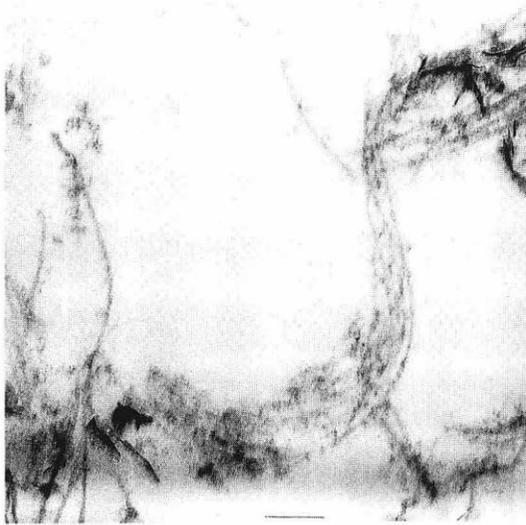


図3 凍結乾燥硝子体を透過電顕で調べてみると硝子体コラーゲン線維であることが裏付けされた。(バーは1,200nm)

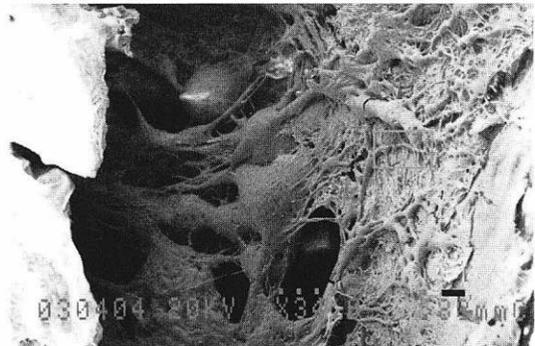
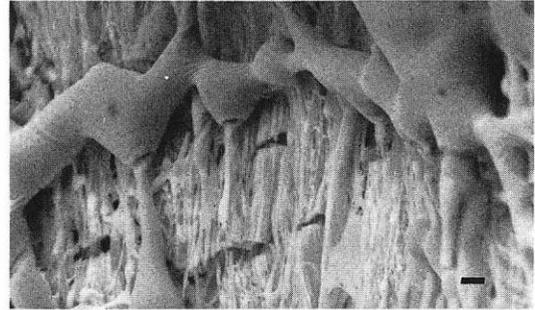


図5 拡大像。乾燥状態が不完全なために硝子体の劣化所見がみられる。(バーは上方が8.8μm, 下方が88μm)

温を-80℃に下げると乾燥が徐々ではあるが始まった。半切眼球の硝子体腔は凍結硝子体で満たされていたが、やや硬い感じのする線維塊としてみとめられた。走査電顕により観察すると硝子体に淡い線維構造は認められず、太く大きな凝集した索状物構造が観察された(図4)。高倍率による観察でも線維間の橋渡し構造はみられなかった(図5)。

考 按

半切眼球の硝子体腔中の硝子体は、臨界点乾燥法を用いた従来の方法によっては形状を保存する事が出来ず、凍結乾燥法によって始めて硝子体の形状が保存さ

れ走査電顕下で観察できる事は前報で述べた¹⁾、今回の実験1と実験2とから得られた半切眼球硝子体の乾燥状態を比べてみると、実験1の方法では硝子体が淡く軟かく網状線維を保ったいかにも硝子体コラーゲンらしい形状を肉眼的には示していた、これに比べ実験2の方法では半切眼球硝子体は硬くゴツゴツして余り網状線維状を形成せず不完全乾燥されており、いかにも硝子体コラーゲンとは違ったものである印象が肉眼的にはみられた。実験1の結果から、走査電顕で観察していた網状線維構造が氷などの人工結成産物ではなく硝子体コラーゲンである事が観察され、凍結乾燥が良好に行なわれた場合の肉眼的所見と走査電顕所見の判断基準が提示できた。実験1と実験2の試料乾燥結果を各目ごとに比較検討してみる。

乾燥条件についての検討。実験1と実験2との1つの違いは予備凍結を末固定で行ったか又は固定を施した後に行ったかである。実験1での共晶点は -40°C ～ -50°C であり、予備凍結は -80°C で十分である。しかし実験2では固定を施したので共晶点温度は -50°C 以下になっており、予備凍結温度を -130°C 程度に低下させて実験を行なっている。その為乾燥後に見られた半切眼球硝子体試料の劣化像は予備凍結が不十分な為とは考えられない。

冷却凝集捕捉器の能力についての検討。これは氷結固化した硝子体の水分を除去し硝子体を乾燥する能力のことで、一般に同一条件の真空中であるならば極低温を作り出す温度条件の方が試料を乾燥させるに好い条件と考えられている。実験1の冷却凝集捕捉器はコイル状のパイプから成り総表面積を計算すると $2,540\text{cm}^2$ で -80°C の冷却能力をもっていた。実験2の冷却凝集捕捉器は円筒形であり総表面積は 92cm^2 で -135°C の冷却能力をもっていた。実験1の条件下では半切眼球硝子体の乾燥は3～4日間で極大に達するが、実験2の条件下では試料棚温度が -100°C 以下のときは肉眼的に見て全く乾燥が行なわれていず、試料棚温度を -80°C に上げた時に徐々に乾燥が始まっている。実験2から云える事は、氷の結晶が成長しないような -90°C 以下の低い温度では氷から水の蒸発(昇華)速度がきわめて遅くなり、細胞内の結合水も蒸発しにくく結局試料の乾燥に時間がかかるという事実と一致したという事である⁸⁾。実験2の場合は、試料温度を -100°C という極低温に氷結させた乾燥操作がこれに当たった訳である。しかしながら試料温度を -80°C に上げて冷却凝集捕捉器 -135°C との間に 55°C の温度落差

を作ってもほぼ同じ結果を得てしまった。実験1では試料温度 -40°C で冷却凝集捕捉器温度 -80°C であるから温度落差は -40°C でありその上試料温度が硝子体共晶点温度かそれ以上であるので乾燥条件としては実験1の方が悪いはずである。にも拘らず実験1の操作で良い硝子体乾燥を得たという事は、試料乾燥には温度落差以上に水蒸気冷却凝集捕捉器の効力が大きく影響するという事ではなからうか。実験1の捕捉器の総面積は $2,540\text{cm}^2$ で実験2の捕捉器の総面積 92cm^2 の27.6倍の広さをもっている。半切眼球の直径 1.5cm とすると半切硝子体の体積は 0.88cm^3 となり、このような僅かの水分を蒸発させるのに想像以上の捕捉器面積が必要となっている事が理解できる。この事は硝子体を純粋な水分として考えるよりも結合水として考えると硝子体の乾燥に大きな捕捉器が必要なのか理解できるのではなからうか。

さて 1g の水が水蒸気になるとき 0.1Torr の気圧下では 10m^3 ($1,000\text{l}$)の気体となる²⁾。この膨大な蒸気を除去するため乾燥剤を用いる方法と極低温をもうけて水蒸気を凝集捕捉する方法とがある。乾燥剤を用いる場合アルミナ(Al_2O_3)は 1mg で約 6l の湿気を乾燥できる効力があり、 1l 中の空間では 0.0008mg/l の湿気が残る。これは $4 \times 10^{-4}\text{Torr}$ の気圧下で -70°C の温度下での空気中に含まれる湿気分 0.0008mg/l と同じ値となり、アルミナは実質的に -70°C の大気温度を作り出しているのと同じと換算される²⁾。前回の実験では乾燥剤として五酸化二磷を用いたが、五酸化二磷は -80°C の大気温度を作り出すものとして計算され実験された。しかし硝子体の乾燥保存は中等度で、微妙な温度コントロールを行うには冷却凝集捕捉器を用いた方が使用し易かったのである。冷却凝集捕捉器を用いて試料を乾燥する場合、乾燥する試料の水蒸気圧よりも低い飽和水蒸気圧をもった冷却面を真空中に設置し、試料より発生する水蒸気をこの冷却面に凝集捕捉(トラップ)する訳であるが、今回の実験からは硝子体の乾燥に影響を与える要因として冷却面温度よりも冷却面の面積が重要であることが知れた。

さて実験1の走査電顕像と透過電顕像でみられた硝子体コラーゲン線維の太さが違るのはなぜだろうか。走査電顕像は末固定のものであるから、透過電顕での有機溶媒の影響が無く、硝子体コラーゲン線維と結合した結合水、糖タンパク等が残留したため、透過電顕でみるよりも太い線維として観察されたのではなからうかと考えられる。一般に生物細胞には通常 $65\sim 80\%$

程度の水が含まれており、約90%は凍結し得る水で残りは-80℃まで冷却しても凍結しない水である。この不凍水分は結合水と呼ばれている⁶⁾。試料に例をとると試料を直接水に接触させることなく保持させ得る最大の水量(分)を吸湿水とよび、水に直接接触させ、吸湿水より以上保持した過剰水分を自由水とよび、吸湿水以前の水分を結合水とよぶことになる²⁾。つまり乾燥試料中にある結合水は簡単に氷結昇華せず乾燥しにくいと考えられる。実験1の走査電顕像での硝子体コラーゲンの線維が太い理由はこのような結合水の為と考えられる。結合水の処理に関しては今後試料の結合水を気化熱の小さいフロン113液等に置換し乾燥すれば良好な形状保存が得られるのではないかと考えられる⁸⁾。

さて試料の保存条件として真空>窒素>空気の順で保存性がよいと考えられている⁶⁾。実験2では乾燥試料を外気に取り出すとき窒素ガスを真空チャンパー内に注入し空気による試料損傷を防いだが、冷却凝集捕捉器の能力の違いほどの影響は与えていない。硝子体乾燥に関しては保存性の優劣因子とはならないよう

ある。

第90回日眼総会で発表した。

文 献

- 1) Hogan MJ, Alvarado JA, Wedell JE: Histology of the human eye. WB Saunders Co, Philadelphia, p607—636, 1971.
- 2) 小林正和: 凍結乾燥装置と操作. 冷凍 56: 10—24, 1981.
- 3) 益子正教: 真空技術講座, 日刊工業出版社, 東京, 8巻, 1964.
- 4) 原 彰, 清水由規: 凍結乾燥法による硝子体内硝子体全体の観察法. 日眼会誌 89: 123—127, 1985.
- 5) 花房尚史: 生体高分子の凍結乾燥について. 冷凍 48: 19—36, 1973.
- 6) 森地敏樹: 生物細胞の凍結乾燥について. 冷凍 48: 29—36, 1973.
- 7) 廣川信隆: 急速凍結置換法およびディープエッチ法. 細胞 16(13): 518—527, 1984.
- 8) 赤堀 宏: SEM 試料のための凍結乾燥. 細胞 11(4): 137—141, 1979.

(第90回日眼総会原著)