凍結割断法による硝子体の三次元的観察

2. 硝子体線維と線維間の微細構造 (図9)

松岡 徹・松尾 信彦・辻 優* (*川鉄水島病院眼科学教室)

Relationship of Collagen Fibril and Interfibrillar Ultrastructure in Three-Dimensional Visualization of the Vitreous Body by Freeze-Fracture

Tohru Matsuoka, Nobuhiko Matsuo and Suguru Tsuji

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School *Department of Ophthalmology, Kawatetsu Mizushima Hospital

要 約

硝子体ゲルの真の微細構築を観察するには、眼球を凍結し割断することが望ましい。今回凍結時の氷晶やグ リコサミノグリカンの流出などの問題を解決するため、凍結割断法を工夫し、硝子体線維の走行と硝子体線維 間の構造について観察した。マウス眼の全硝子体、一部はニホンザル眼および白色ウサギ眼の硝子体組織片を 用い、眼球は、種々の濃度の cetylpyridinium chloride (CPC)を固定液に加え固定した。凍結眼球は、凍結 割断ディープエッチング法でレプリカを作成し、一方では dimethyl sulfoxide 凍結割断レプリカ法でレプリ カを作成し、透過型電子顕微鏡にて観察した。その結果硝子体線維は、直線的に走り、密な格子を形成してい ることが判明した。低濃度の CPC 固定、低濃度のエタノール浸漬によるディープエッチング法を用いることに より、硝子体線維の格子に絡まるグリコサミノグリカンの細線維が明瞭に観察された。この方法により硝子体 腔内における2重網目の微細構造を形態学的に証明できた。(日眼 92:1221-1229、1988)

キーワード:硝子体、凍結割断法、ディープエッチング法、硝子体線維、ヒアルロン酸

Abstract

Freezing the eyeball before cutting is effective in preventing deformation of the ultrastructure of the vitreous body. The authors developed freeze-fracture deep-etching methods in order to avoid ice crystal damage to the ultrastructure of the vitreous body and the disappearance of glycosaminoglycan in the vitreous body, and successfully observed the course of collagen fibril formation and the interfibrillar ultrastructures. The vitreous bodies of mouse eye and the vitreous fragments of monkey and rabbit eyes were observed three-dimensionally. A combined pretreatment of low-concentration ethanol immersion and low-concentration cetylpyridinium chloride fixation before freezing the eyeball revealed the lattice structure formed by collagen fibrils and the fine filaments $3\sim10$ nm in diameter which twined around the collagen fibrils. From these observations, morphological evidence has been given for the first time that the vitreous gel is formed by a double network structure. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1221–1229, 1988

Key words: Vitreous body, Freeze-fracture, Deep-etching. Collagen fibril, Hyaluronic acid

別刷請求先:700 岡山市鹿田町 2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 松岡 徹 (昭和63年3月28日受付) Reprint requests to: Tohru Matsuoka, M.D. Dept. of Ophthalmol., Okayama Univ. Medical School 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan (Accepted for publication March 28, 1988)

I 緒 言

硝子体内の硝子体線維の走行や線維間に存在するヒ アルロン酸をはじめとするグリコサミノグリカンの超 微細構築を組織学的に観察するためには, 現在行われ ている組織学的方法では、多くの問題が存在する、す なわち眼球を通常に化学固定し、そのまま眼球を切割 し、小組織片を型通り包埋観察すると、硝子体腔は著 しい変形を生じ、硝子体ゲルの緊張は、当然のことな がら本来のものとは異なったものとなる. そこで眼球 を切割する前に凍結固定する方法が望ましい. すでに 眼球を凍結割断乾燥し,閉鎖硝子体腔の硝子体ゲルを 走 査型電子顕微鏡を用い、観察する努力がなされてい る1)2). しかし無処理でそのまま凍結すると、大きな氷 晶が形成され、硝子体ゲルの微細構造は変形する、こ のことは,ごく低い解像力の走査型電子顕微鏡で観察 するには、さほど支障はないが、透過型電子顕微鏡レ ベルの解像力で硝子体線維やその間のグリコサミノグ リカンの細線維を観察をすることは不可能である。そ こで筆者らは、凍結割断レプリカ法を工夫し、透過型 電子顕微鏡の解像力レベルで硝子体ゲルにおける硝子 体線維の走行について観察してきた3). しかし固定中 や、凍結保護剤を浸透させる過程で、ヒアルロン酸を はじめとするグリコサミンノグリカンなどの拡散消失 が生じ,硝子体線維間の構造は,充分に観察できなかっ た. そこで今回さらに凍結割断レプリカ法を工夫し. 硝子体腔内の真の微細構築とくに硝子体線維と硝子体 線維間の微細構造を中心に観察できるようになった. とくにディープエッチング法を用いることにより、硝 子体線維により形成される格子と硝子体線維間のグリ コサミノグリカンの細線維構造が観察可能となり、 そ の結果硝子体ゲルの2重網目構造4)~6)の具体的な形態 学的証拠を得ることができたので報告する.

II 実験方法

実験動物として、マウス(A/St, 10~20週齢)眼13 匹26眼を用いた.一方網膜硝子体組織片は、成熟ニホ ンザル眼(1頭2眼)および成熟白色ウサギ眼(3羽 5眼)より得た.眼球を摘出後,眼球は、2.5%グルター ルアルデヒド(GA)単独、または同液と1%パラホル ムアルデヒド(PA)との混合液で5~40分間固定した. 凍結割断ディーブエッチング法に用いる眼球の一部 は、0.02~0.1%の cetylpyridinium chloride (CPC) をグルタールアルデヒドに混じ固定した. 1. 凍結割断ディープエッチング法

2.5%GA 単独,または同液と0.02~0.1%の CPC と の混合液で5~40分間固定したマウス眼球を3%また は10%エタノールに3~10分間浸漬した後,FD-2A 型 凍結処理装置(EIKO)用の試料台に装着し,液化フレ オン12,液体窒素にて眼球をそのまま凍結した.その 後上記の凍結処理装置内に試料台をすばやく搬入 し,-110~-120℃で眼球を凍結割断した.ついで -90℃の温度で約40分間ディーブエッチングを施行し た.つぎに割断面に対して回転シャドウイングおよび カーボンの補強蒸着を行い,割断面のレプリカを作成 した.眼球は,次亜塩素酸ソーダおよび5%水酸化カリ ウムにて溶解し,得られたレブリカ膜をHS-9型透過 型電子顕微鏡(HITACHI)で観察影した.撮影し得ら れたネガは,密着翻転し陰画像として表現した.

2. 無固定試料の急速凍結割断ディープエッチング 法

摘出したマウス眼球を無処理でただちに切割し,約 1~2mm³の硝子体組織片を切り出し,液体窒素で冷 却した RF-1型急速凍結器 (EIKO)の銅板上に落下し 圧着急速凍結した.凍結した組織片は予め-196℃に冷 却した FD-2A型凍結処理装置用の試料台に装着し, 同凍結処理装置内へすばやく搬入し,-110℃で凍結割 断,-90℃で約30~40分間ディープエッチングを施行 した.ついで割断面に対し,前記と同様の方法でディー プエッチングレプリカを作成し,透過型電子顕微鏡で 観察撮影した.観察は,銅板圧着面に近い部分の組織 片のレプリカを主体に行った.

3. 固定網膜硝子体組織片試料の凍結割断ディープ エッチング法

2.5%GA 単独,または同液と0.02~0.1%の CPC と の混合液で5~40分間固定したマウス,ニホンザルお よび白色ウサギ眼を切割し,同固定液内で網膜硝子体 の小組織片を切り出した.組織片は,10~20%エタノー ルに約20分間浸漬し,ついで FD-2A 型凍結処理装置 用の試料台に装着し,液体フレオン,液体窒素で凍結, 前記と同様に凍結割断,ディープエッチングを施行後 前記と同様にレプリカを作成し,観察撮影した.

4. DMSO 凍結割断一臨界点乾燥-レプリカ法

2.5%GA単独,または同液と1%PAとの混合液で 約15~30分固定したマウス眼球を5%DMSO (dimethyl sulfoxide)に5分間浸漬し、その後漸次濃度を上げ 10%,25%,50%と各々5分間ずつ浸漬した。ついで 液体窒素で-196℃に冷却されたTF-1型凍結割断器 昭和63年7月10日

(EIKO)上にて眼球を DMSO 凍結割断した. その後 DMSO を洗浄除去し, 1%オスミウム酸で固定し,上 昇エタノール系列にて脱水,酢酸イソアミル処理をし て臨界点乾燥を施行した. ついで割断面を上にして FD-2A型凍結処理装置用の試料台に置き,試料台を凍 結処理装置に搬入した. ついで割断面に対し回転シャ ドウイングおよびカーボンの補強蒸着を行い,割断面 のレプリカを作成した. 得られたレプリカ膜は同じ透 過型電子顕微鏡で観察撮影した.

III 結 果

2.5% グルタールアルデヒドに低濃度(0.02%) CPC を混じ,低濃度エタノールに短時間(3%,5分)浸漬 し,凍結割断ディープエッチング法で観察したマウス 硝子体腔では, 直線的に走る密な硝子体線維の格子と それに絡まる径 3 ~10nm と細線維構造が, 比較的均 ーに分布しており 2 重の網目を形成している像が観察 された (Figs. 1, 2A, 2B). また硝子体線維の形成する 格子は, 1辺約0.3~0.5 μ mの四辺形により成り立っ ていた.硝子体線維間の細線維構造を拡大してみると, 細線維は, 硝子体線維同士を連結しながら, 一部では 硝子体線維間には, 蜂の巣状構造もわずかではある が認められ, 軽度の氷晶傷害が疑われた.

また CPC を使用せず GA の単独の固定でも,短時間(5分~10分)で,低濃度短時間(3%,5分間)の エタノールの浸漬処理をし,凍結割断ディーブエッチ ング法により観察したマウス硝子体では,硝子体線維



Fig. 1 A freeze-fracture deep-etching replica of mouse vitreous body. The eyeball is fixed with 0.02% cetylpyridinium chloride (CPC) for a short duration of $3 \sim 5$ minutes and is immersed in $3 \sim 5\%$ ethanol as cryoprotectant. Collagen fibrils extend straight and form a dense lattice. Fine filaments resembling glycosaminoglycan filaments fill spaces between the collagen fibrils and they twine around the collagen fibrils. The fine ivy-like filament and the linearity of collagen fibril and lattice structure seen in this figure are thought to be closest to the true fine structure in the mouse vitreous cavity. $\times 75,000$



Fig. 2A&B High magnification views of freeze-fracture deep-etching replicas of mouse vitreous body prepared with same fixatives as figure 1. Note that the fine ivy-like filaments twine around the collagen fibrils. The diameter of the filaments in figure 2B are smaller than that in figure 2A. It is assumed that this difference depends on the depth of the etching and the shadowing angle. Fig. $2A \times 170,000$, Fig. $2B \times 140,000$



Fig. 3 A freeze-fracture deep-etching replica of mouse vitreous body. In eyeball prepared by a short duration of immersion in low-concentration ethanol (3 \sim 5%) and without using CPC, fine ivy-like filaments resembling glycosaminoglycan are seen, though only in small amounts. The vitreous gel and its lattice structure do not shrink as compared with the vitreous gel treated with CPC. \times 90,000

昭和63年7月10日

が形成する密な格子の一部に、径3~10nmの細線維構 造が. 硝子体線維に絡まるように分布している像が観 察された(Fig. 3). 硝子体線維の格子の四辺形は, 1 辺約0.3~0.7µmで,低濃度のCPCを混ぜたものより 若干大きかった(Fig. 3)また無固定のマウス硝子体組 織片をディープエッチング法で観察したものでは、疎 で幾分屈曲した硝子体線維の格子の間に、密な羊歯状 および蔦状の細線維構造が分布している像が観察され た(Fig. 4). この像は、Fig. 1,2,3 で観察された硝子 体線維間の微細線維構造と酷似していた.一方 GA と PA の混合液で固定し, DMSO 凍結割断したマウス硝 子体では, 直径約20nm の大きさの粒状構造が, 20~40 nm の間隔で硝子体線維表面に多数付着している像が 観察された (Fig. 5). また GA 単独で比較的長時間 (20~40分間)固定し、エタノール浸漬処理も比較的長 時間(10%,10分間)行い、ディープエッチング法で 観察したマウス硝子体では, 硝子体線維は, 整然とし た密な格子を形成していたが, 硝子体線維間は, 空虚 で特別な線維構造は認められなかった(Fig. 6). 一方 Fig. 1 と同様に処理し観察したマウス眼において, 硝 子体皮質、おそらく後部硝子体膜とおもわれるところ では, 硝子体線維は互いに平行かつ密に走行し, 硝子 体線維間隙も認められない程であった (Fig. 7). 一方 網膜内境界膜近傍の硝子体腔では、いずれのディープ エッチング法での観察においても、硝子体線維は、互 いに平行に走行し、硝子体線維同士を梯子状に連結す る直径6~9nm の細線維構造が観察された. この傾向 はマウス、ウサギ眼でも認められたが、ニホンザル眼 で著明であった (Fig. 8). 以上の結果を基にして硝子 体ゲルの微細構築の模式図を作成した (Fig. 9).

IV 考 按

硝子体ゲルの基本分子構築は, 硝子体線維とそれに 絡むヒアルロン酸の2重網目構造として Balazs⁽¹⁾⁻⁶⁾ により提唱されている.しかしこれを裏付ける具体的 な形態学的証拠は, まだ提出されていないのが現況で ある.さらに硝子体腔を開放せず, 硝子体線維やヒア ルロン酸などが, 緊張を保ったままで, 透過型電子顕 微鏡の解像力レベルで観察された報告はない.筆者ら も³⁾この問題に取り組み, 凍結割断法を工夫し, 硝子体 ゲルのうち硝子体線維の走行について検討してきた. その結果硝子体線維は, 直線的に走り, 互いに四辺形 の格子を形成していることが判ったのである.しかし 固定処理や凍結保護剤への浸漬により, ことに比較的



- Fig. 4 A freeze-fracture deep-etching replica of quickly frozen mouse vitreous fragment from cut unfixed eyeballs. Widely spaced collagen fibrils, which states do not seem to present the original density, are seen and interfibrillar ultrastructures composed of glycosaminoglycan fine filaments are quite similar to those in the figures 1 and 2. $\times 80,000$
- Fig. 5 A dimethyl sulfoxide (DMSO) freeze-cracking replica of mouse vitreous body with glutaraldehyde and paraformaldehyde fixation. Node-like substances which distribute at intervals of $20 \sim 40$ nm on the collagen fibrils are found. \times 120,000



- Fig. 6 A freeze-fracture deep-etching replica of mouse vitreous body with 10% ethanol immersion for 15 minutes. The eyeball is fixed without CPC. The collagen fibrils also extend straight and form a lattice. No filamentous structure is found between the collagen fibrils. $\times 60,000$
- Fig. 7 A freeze-fracture deep-etching replica of posterior vitreous membrane of the mouse vitreous cortex. The dense packed collagen fibrils are fastened in bundles and the spaces between them are too narrow to be observed. $\times 80,000$
- Fig. 8 A freeze-fracture deep-etching replica of monkey vitreous fragment very close to the inner limiting membrane (ILM). The connecting filament (arrowheads) are found in the spaces among neighboring parallel collagen fibrils. \times 145,000



Fig. 9 A schematic representation of ultrastructure of mouse vitreous gel and double network formed by collagen fibrils and glycosaminoglycan filaments on the basis of these observations. Many quadrilatelals with $0.4 \sim 0.7 \mu m$ length of each side are formed by collagen fibrils. And the glycosaminoglycan filaments twine around the collagen fibrils and they occupy the spaces between the fibrils.

長時間グルタールアルデヒドで化学固定したもので は、硝子体線維間を充填するヒアルロン酸をはじめと するグリコサミノグリカンは、拡散消失し、硝子体線 維間の構造は、空虚になり、確認が困難であった。今 回の実験により、前報³⁾まで不明瞭であった硝子体線 維間の微細構造が明かになってきた。今回使用した cetylpyridinium chloride (CPC)は、グリコサミノグ リカンを沈着させる薬剤であるが、一般に組織を CPC で処理することにより組織は収縮する。硝子体におい ても、このことが確認されている⁴⁾. 超薄切片法による 電子顕微鏡的観察でも、この CPC を使用し、硝子体内 のグリコサミノグリカンの存在形式が検討されてい る⁷⁾⁸⁾. そこで筆者らは、今回 CPC 処理を通常より低濃 度で短時間にすることにより、硝子体腔内のグリコサ ミノグリカンを保存し、かつ硝子体ゲルの収縮を最小 限にとどめることにしたわけである。一方凍結保護剤 に関しては、形成される氷晶の大きさを重要視すると、 凍結保護剤としてのエタノールは、高濃度のものほど よいことは明らかである。しかしエタノール浸漬処理 により、グリコサミノグリカンが、さらに拡散消失す るものと考えられる。一方硝子体線維の走行の観察の みを考えると、CPCを使用せず、グルタールアルデヒ ド単独の固定で、低濃度のエタノールでの短時間の浸 漬処理が、硝子体ゲルの収縮も少なく、最良の方法で あると考えられる。10%で10分間程度のエタノール浸 漬処理では、硝子体線維の走行を変えるほどの大きさ の氷晶は形成されていないようである。

硝子体線維間の微細構造は、各種の組織化学的方法

により観察検討されている7)~9). CPC を使用すること により, ヒアルロン酸をはじめとするグリコサミノグ リカンはかなり保存されるようである. 今回の実験で は、3~10nmの直径をもつ羊歯状およびコイル状の細 線維構造が, 硝子体線維に蔦のように巻きついている 像として観察できた. このような硝子体線維間のグリ コサミノグリカンと考えられる構造は、固定液や、 CPC 固定処理あるいは処理液中の塩類により修飾さ れているという懸念があり,実際には,存在しない構 造であるかもしれない. そこで無固定および無処理の 硝子体組織片を急速凍結ディープエッチング法で観察 してみることにしたわけである. ここでは、グリコサ ミノグリカンの細線維と思われる細線維構造が、硝子 体線維間に認められるが,硝子体線維の走行の変形は, 当然のことながら著しかった。しかし硝子体線維間に は、小さい氷晶による傷害が混在するにしても、今回 のグルタールアルデヒドおよび CPC 固定処理による ディープエッチング法で認められたような、羊歯状あ るいは蔦状の細線維構造が存在することが確認でき た. 筆者らは, 組織化学的にも, hyaluronidase 処理に より, このような構造が消えることを, 硝子体組織片 で確認検討中である.しかしこの組織化学的方法も、 閉鎖された眼球には応用できず問題を多く残してい る. また CPC を使用しない眼球でも, 若干のグリコサ ミノグリカンと思われる同様の細線維構造が観察され た. 今回の実験で, 硝子体ゲルの2重網目構造を観察 する最良の方法は、CPC に関しては、低濃度のものを 使用し,かつ処理時間は,短時間でよいということが 判明した. 一方 DMSO 凍結割断法は, 氷晶形成による 傷害にのみ着目するのであれば、最良の方法であると 考えられるが、DMSO のような極性の高い薬剤を使用 することにより、硝子体ゲルの変形が、かなり生じる ものと考えられる. DMSO 凍結割断法により観察され た硝子体線維上に付着している粒状構造は、他の組織 化学的方法によりヒアルロン酸が凝集したものである と考えられている7/~9). しかしこれらは、化学固定処 理,あるいは組織化学的処理により、本来は伸びてい たヒアルロン酸の細線維が,球状に変形凝集したもの と推定される。今回用いた DMSO 凍結割断法におい ても同様のことが生じているものと考えられる. 一方 後部硝子体膜には,硝子体線維間隙がない程,硝子体 線維が密集していたが、これは他の方法でも確認され ている¹⁰⁾. ここでは, グリコサミノグリカンは, 長い線 維形態をとっていないようである. このことは網膜内

境界膜近傍の硝子体線維間に認められた梯子状の架橋 細線維にも当てはまる.一般にI型の膠原原線維にお いて膠原原線維が,密に平行に並んでいるところでは, プロテオグリカンのモノマーは小さく,膠原原線維の 周期に応じた架橋細線維構造をとることが知られてい る¹¹⁾.今回観察された架橋細線維構造のように,II型の 膠原線維である硝子体線維にも,このことが当ては まることが判明したのである.また組織化学的方法に より,硝子体線維間にも,架橋状の細線維が認められ ている⁸¹¹².

今回の実験では、低濃度の CPC 処理、低濃度のエタ ノール浸漬によるディープエッチング法による像が, 真の硝子体ゲルの微細構築に最も近い像を表している ものと考えられる。しかし CPC 使用による硝子体ゲ ルの多少の収縮を考慮すれば、本来の硝子体ゲルは、 今回得られた像より若干疎な構築をなしているものと 考えられる. さらに多少の氷晶の傷害も存在するよう である. このような結果を基にして、マウス硝子体ゲ ルの超微細構築の模式図を、組み立ててみた. すなわ ち硝子体ゲルは、1辺約0.4~0.7µmの硝子体線維に よる四辺形の格子の板が縦横に組み合わさっている. そしてこの格子は、周囲の影響で、幾分ずれたり変化 する動的な構造であると想像される. さらに格子の間 を, 蔦のようにグリコサミノグリカンの細線維が絡ん でおり、Balazs の2重網目構造説4)~6)を裏付けるもの である.しかし硝子体ゲルの特性は、動物種によりか なり異なり6)、今回主に観察したマウスのように、終生 硝子体ゲルが液化しない動物では、ある程度堅固な構 築を持っているものと考えられる。今回のように、マ ウスという最も小さいほ乳類の眼球を使用しても、氷 晶の問題を完全に克服したものではなく、これよりは るかに大きいサル眼や人眼の硝子体ゲルを凍結割断法 で観察することは、因難を極める. さらに凍結の技術 の改善が必要である。

稿を終えるにあたり技術協力をいただいた当教室の細田 彰,光岡建之技官,本学共同実験室の斉藤敦彦および岡本浩 志技官に深謝いたします.また本研究は,文部省科学研究費 補助金(一般研究 C 63570830 研究代表者松岡 徹)の援助 をうけた付記して謝意を表する.

本論文の要旨は、第92回日本眼科学会総会で発表した.

文 献

- 原 彰:凍結乾燥法による硝子体腔内硝子体全 体の観察法一走査電顕所見一.日眼 89:1267 -1271,1985.
- 2) 成田清美, 吉本弘志: 硝子体基本構築の検討. 第2

報. いわゆる前部硝子体膜について. 眼紀 37: 1617-1622, 1986.

- 2) 松岡 徹, 松尾信彦, 辻 優: 凍結割断法による 硝子体の三次元的観察. 1. 硝子体線維の走行につ いて. 眼紀 38:1749-1757, 1987.
- Balazs EA: Molecular morphology of the vitreous body. in Smelser GK (ed): The Structure of the Eye. New York, Academic Press, 293 -310, 1961.
- 5) Balazs EA: The molecular biology of the vitreous. in McPherson A (ed): New and Controversial Aspects of Retinal Detachment. New York, Hoeber, 3-15, 1968.
- 6) Balazs EA: Functional anatomy of the vitreous. in Jakobiec FA (ed): Ocular Anatomy, Embryology, and Teratology. Philadelphia, Harper & Row, 425-450, 1982.
- 7) Rhodes RH: An ultrastructural study of the complex carbohydrates of the mouse posterior vitreoretinal juncture. Invest Ophthalmol Vis Sci 22: 460-477, 1982.

- 8)朝倉章子:硝子体におけるヒアルロン酸存在様式 一組織化学的研究一.日眼 89:179-191,1985.
- Smith JW, Serafini-Fracassini A: The relationship of hyaluronate and collagen in the bovine vitreous body. J Anat 101: 99-112, 1967.
- Theopold H, Faulborn J: Scanning electron microscopic aspects of vitreous body: Technique of preparation. Grafes Arch Klin Exp Ophthalmol 214: 33–38, 1980.
- 11) Ruggeri A, Benazzo F: Collagenproteoglycan interaction, in Ruggeri A, Motta PM (eds): Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix. Boston, Martinus Nijhoff, 113 -124, 1984.
- 12) Rentsch FJ: The fine structure of the normal and pathological vitreous body as revealed by ruthenium-red. in Yamada E, Mishima S (ed): The Structure of the Eye, III, Jpn J Ophthalmol, Tokyo, 19–37, 1976.

(第92回日眼総会原著)