

# 網膜内境界膜の超微細構造

第1報 臨界点乾燥表面レプリカ法による網膜内境界膜の観察(図9)

西原 浩美(岡山大学医学部眼科学教室)

## 要 約

コラゲナーゼ処理と臨界点乾燥表面レプリカ法を用いてウサギの網膜内境界膜の超微細構造を透過型電子顕微鏡で観察し、以下の結果を得た。1) この方法は手技が比較的簡便で、再現性が高く、広範囲、かつ鳥瞰図的に網膜内境界膜を観察できる点で優れている。2) 網膜内境界膜は基底膜の特徴である網目構造をとり、篩が三次元的に重なりあって広がっていた。3) 孔の直径は10~25nmに集中し、視放部(直径の平均値は13.43nm)髄翼部(13.59nm)網膜周辺部(13.40nm)で統計学的な部位による有意差は認められなかった。4) 網膜周辺部では硝子体線維が密に残り、網膜内境界膜の透見できる部分が非常に少なく、篩の分布が疎でその形も他と多少異なっていた。今回の結果より、これらの網膜内境界膜の篩は **size barrier** として網膜硝子体間の物質移動の関門の役割を果たすと考えられる。そして、篩の分布が疎で硝子体線維が密な網膜周辺部より網膜後極部、特に視放部で物質移動がより多く行われているのではないかと推察した。(日眼会誌 93:429-438, 1989)

キーワード: 網膜内境界膜, 臨界点乾燥, 表面レプリカ法, コラーゲン, 篩状構造

## Studies on the Ultrastructure of the Inner Limiting Membrane of the Retina I. Surface Replication Study on the Inner Limiting Membrane of the Retina

Hiroimi Nishihara

*Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School*

### Abstract

In order to clarify the ultrastructural details, electron microscopic observations of the inner limiting membrane (ILM), critical point drying and surface replication methods with collagenase digestion were performed on rabbit's ILM. The results were as follows: 1) This method was simple, the electron microscopic image is highly reproducible and a bird's-eye view of the ILM is possible. 2) The ILM was composed of a fine three-dimensional meshwork structure with numerous pores (sieves). 3) The diameter of the pores varied from 10 to 25nm. Mean diameter of the pores is 13.43nm in the visual streak, 13.59nm in the medullary ray, 13.40nm in the peripheral retina, and there were no statistical differences among these three regions. 4) In the peripheral retina, it was difficult to observe the ILM because vitreous fibrils lay densely on it. The pore's shape in the peripheral retina was different from that in the posterior pole retina. These results may provide the morphological basis for the theory that the pores of the ILM act as the main filtration barrier between the retina and the

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 西原 浩美

(昭和63年12月15日受付, 平成元年2月22日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroimi Nishihara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Okayama Univ. Medical School  
2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(Received December 15, 1988 and accepted in revised form February 22, 1989)

vitreous cavity. It is supposed that the bulk of substances are transported from the retina mainly through the ILM of the posterior pole, because dense vitreous fibrils of the peripheral retina disturb that transport. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 429-438, 1989)

**Key words:** Inner limiting membrane, Critical point drying, Surface replication, Collagen, Meshwork structure

## I 緒 言

眼内透明相 (intraocular transparent phase) の終点である硝子体は、その透明性を維持するための特徴をいくつか有している<sup>1)</sup>。そのうち血管からの巨大分子の侵入を防御する barrier system, 即ち血液-硝子体柵 (blood-vitreous barrier) として網膜毛細血管壁, 網膜内境界膜, 硝子体皮質層の3つが推察されている<sup>1)</sup>。網膜内境界膜は Müller 細胞の基底膜であるが、基底膜形態の最近の観察法によると腎糸球体や角膜の網目構造 (篩状構造) が報告されている<sup>2)-5)</sup>。網膜内境界膜も同様の構造が推測され、篩 (sieve) が閘門の役割を果たしていると予想されているが、未だかつて形態学的な証明はなされていない。なぜなら、網膜内境界膜を硝子体側より観るには硝子体線維が障壁となるからである。

筆者は今回の観察を始める前に、酵素で硝子体を除去する目的でマウスとイエウサギを使い、コラゲナーゼ<sup>6)7)</sup>とトリプシン<sup>8)</sup>の浸漬時間、眼球切断の方法を色々変えて予備実験を行った。硝子体の粘弾性を支持する高分子であるコラーゲン様線維タンパク質 (collagen-like fibrous protein) 即ち vistrosin を破壊し、かつ基底膜コラーゲンにあまり影響しない<sup>9)10)</sup>とされるコラゲナーゼを用いても網膜が傷害され、網膜内境界膜の微細構造を観ることはできない。またトリプシンを用いた標本は硝子体線維が消化しないまま残るなどで問題が残った。

そこでさらに硝子体の除去法を検討し、臨界点乾燥表面レプリカを用いてウサギの網膜内境界膜の超微細構造を観察撮影することに成功した。また、篩の大きさと形態を眼球の部位別に検討できたのでここに報告する。

## II 実験方法

### 1. 予備実験

実験動物のマウス10匹20眼を用いてコラゲナーゼとトリプシンによる硝子体の消化試験を行った。摘出眼

球の切断方法は角膜周辺部で切断する方法と視神経周囲で直径約5mmの小窓を作成する方法との二通りとした。切断後0.1%の割合で Clostridium histolyticum collagenase (Boehringer Mannheim GmbH) を0.033 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した液<sup>6)7)</sup>とトリプシン (Difco Laboratories) を0.4%塩化ナトリウムと0.1%フッ化ナトリウムを含む0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) に0.1%の割合で溶解した液<sup>8)</sup>とにそれぞれ浸漬し、37°Cで5分、10分、30分、1時間酵素処理を行った。2.5%グルタルアルデヒドにて固定し、エタノールによる上昇系列脱水をした後、臨界点乾燥を施した。次に金イオンをコーティングし、走査型電子顕微鏡 (S-430) にて硝子体の残存状態を検討した。対照として、酵素処理を全くしないで綿棒により物理的にのみ硝子体を除去した。得られた結果を参考にし、ウサギ眼球をもちいて同酵素処理をした後、2.5%グルタルアルデヒド (pH 7.4, 0.1M 磷酸緩衝液) により2時間固定し、エタノールにて上昇系列脱水した。組織片を酢酸イソアミルで処理して臨界点乾燥を施し、次にFD-2A凍結処理装置内に組織片を挿入して試料台を回転させながら60°の角度より白金パラジウム、続いてカーボンの蒸着を行った。蒸着した組織片を次亜塩素酸ソーダにて徐々に溶解した後、レプリカ膜をメッシュですくい、透過型電子顕微鏡 (HS-9) で観察撮影した。ネガは電子顕微鏡用フィルムに密着反転し、陰画像を印画紙に焼き付けた。

### 2. 本実験

実験動物として体重2.0~2.5kgの成熟白色イエウサギ (4羽6眼) を使用した。ソムノベンチル麻酔下に眼球を摘出し、視神経周囲の直径約5mmの強膜を切開して小窓を作った。眼球を0.1%コラゲナーゼ溶液 (Clostridium histolyticum collagenase を0.033M 磷酸緩衝液 <pH 7.4> に37°Cで溶解) に10分間浸漬した後、蒸留水でよく洗い、角膜周辺部で切断してから、角膜、虹彩、水晶体、硝子体を除去した。再度蒸留水でよく洗った後、Fig. 1の如く綿棒で網膜に接触しないように眼球内面を丁寧に擦過し、残った硝子体で



Fig. 1 Removal of the vitreous body with the aid of an applicator.

きるかぎり除去した。眼球をもう一度蒸留水でよく洗い、実体顕微鏡下で網膜剝離を起こさないように注意しながら後極部（視放部）、周辺部、髄翼部に分けた。2.5%グルタルアルデヒドにて2時間固定後、予備実験と同様にしてレプリカ膜を作成し、透過型電子顕微鏡(HS-9)にて観察撮影した。ネガは電子顕微鏡用フィルムに密着反転し、陰画像を印画紙に焼き付けた。

### III 結 果

#### 1. 予備実験

ウサギの摘出眼球を先に角膜周辺部で切断して、0.1%コラゲナーゼに10分間浸漬して作った標本は、網膜が直接コラゲナーゼの侵襲を受けて傷害され、微細構造を観ることはできなかった(Fig. 2)。また、角膜周辺部よりと視神経周囲のいずれの切断方法にても0.1%トリプシンに30分間浸漬した場合、硝子体線維は消化されないで変性したまま残ってしまった(Fig. 3)。両酵素とも、またどちらの切断方法でも、1時間の消化では網膜は膨化して原型をとどめていなかった。綿棒による非酵素処理群も硝子体線維の残存が多く、擦過しすぎると網膜の傷害が生じていた。

#### 2. 本実験

##### 1) 網膜後極部（視放部 visual streak）

網膜硝子体の結合が比較的弱く、容易に硝子体の除

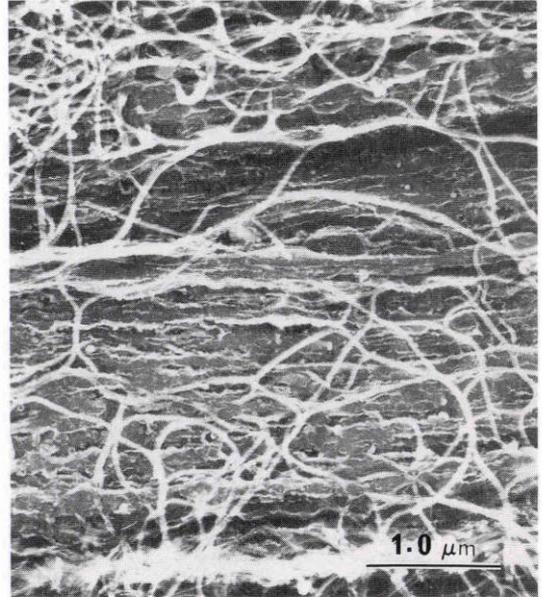


Fig. 2 After an enucleated eyeball was bisected at the corneal limbus, the vitreous body was digested by collagenase. The ultrastructure of the inner limiting membrane (ILM) of the retina is not clearly observed in details because of its damage during this experimental procedure. ( $\times 17,000$ )

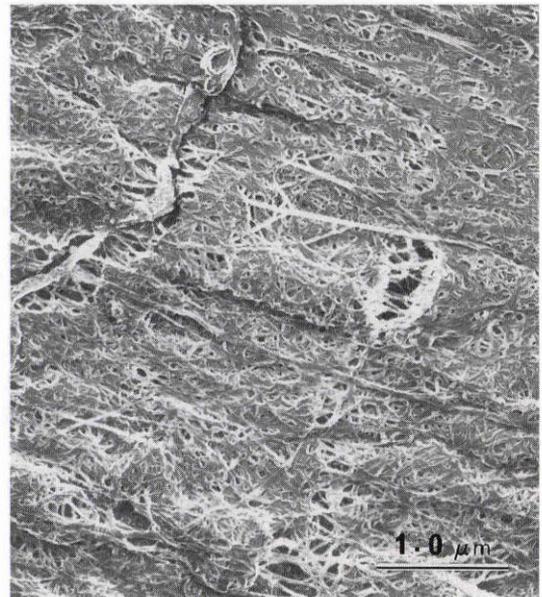
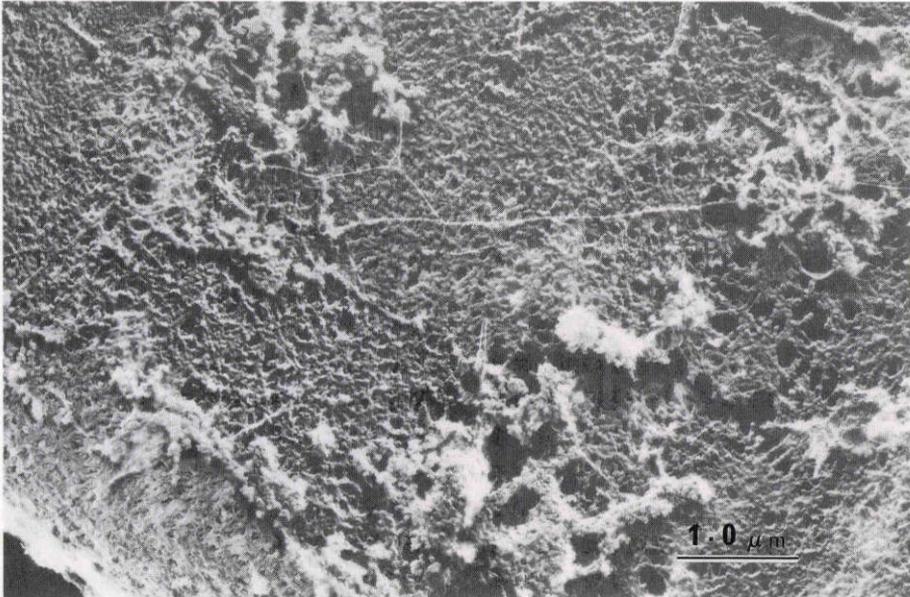
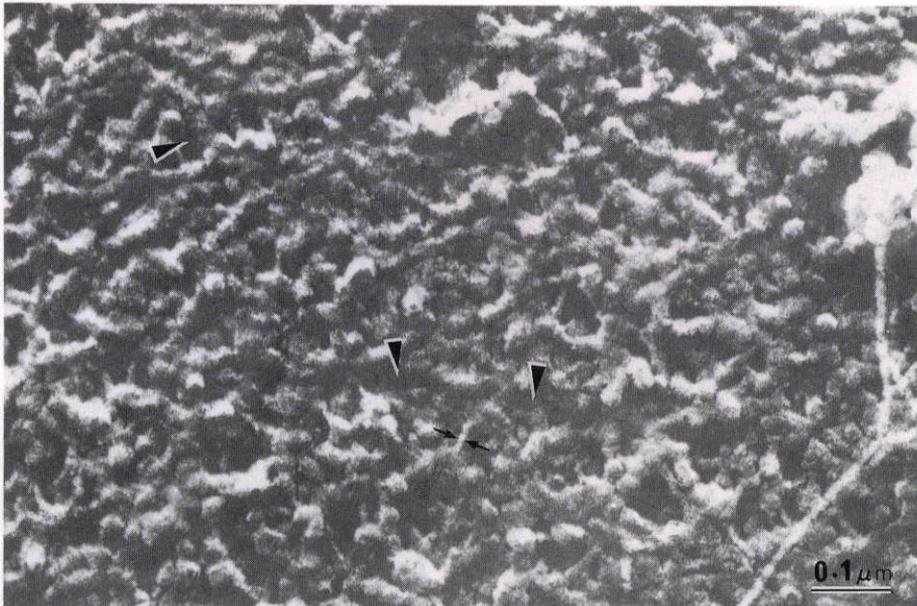


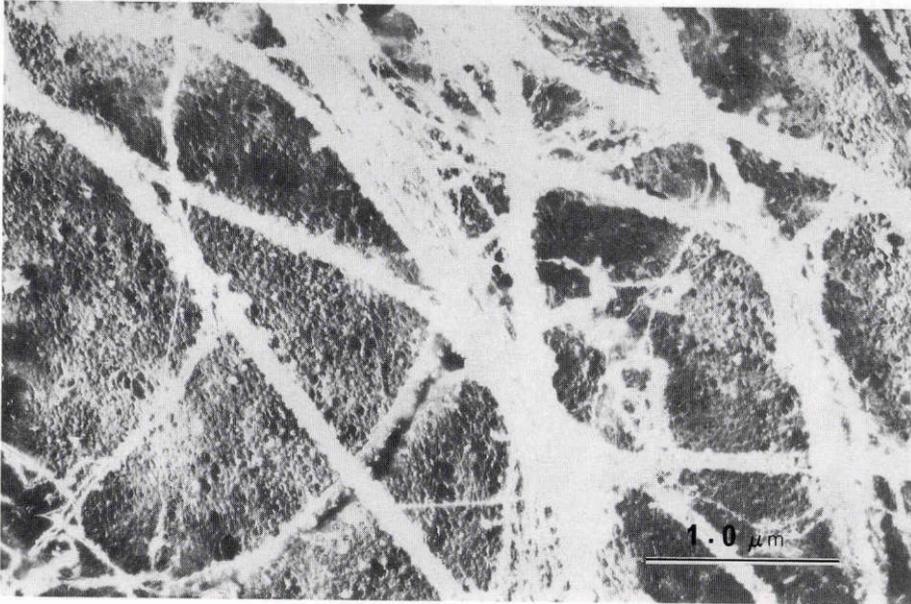
Fig. 3 With after tryptic digestion of the vitreous body, the degenerated vitreous fibrils are not digested and remain. ( $\times 17,000$ )



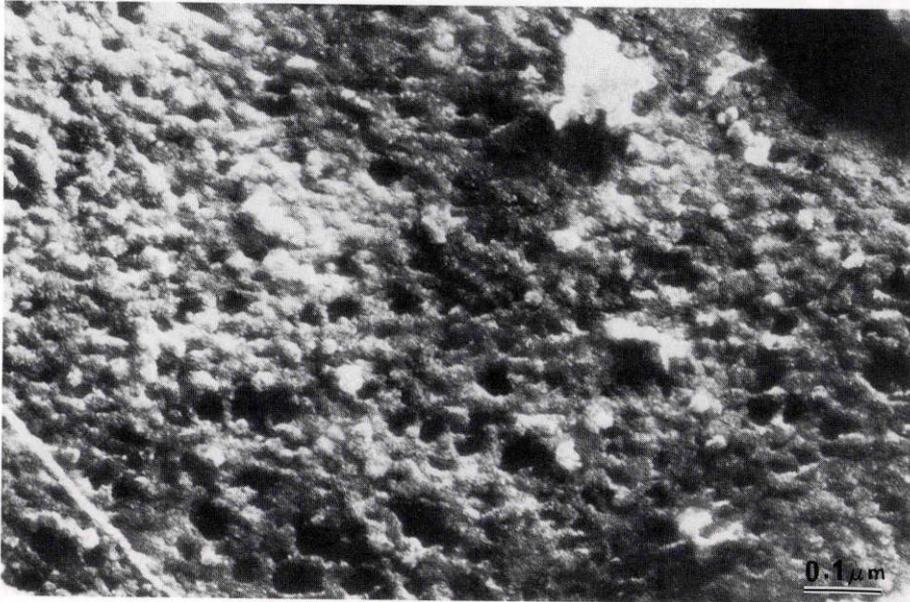
**Fig. 4a** Surface replica images of the ILM in the visual streak. The meshwork structure three-dimensionally expands. ( $\times 25,000$ )



**Fig. 4b** Higher magnification view of Fig. 4a. The sieves are composed of strands, and their mean diameter is about 10nm (between short arrows). Pore's shape is round, oval and polygonal, and some of them elongates to form a part of a channel (arrow heads). ( $\times 100,000$ )



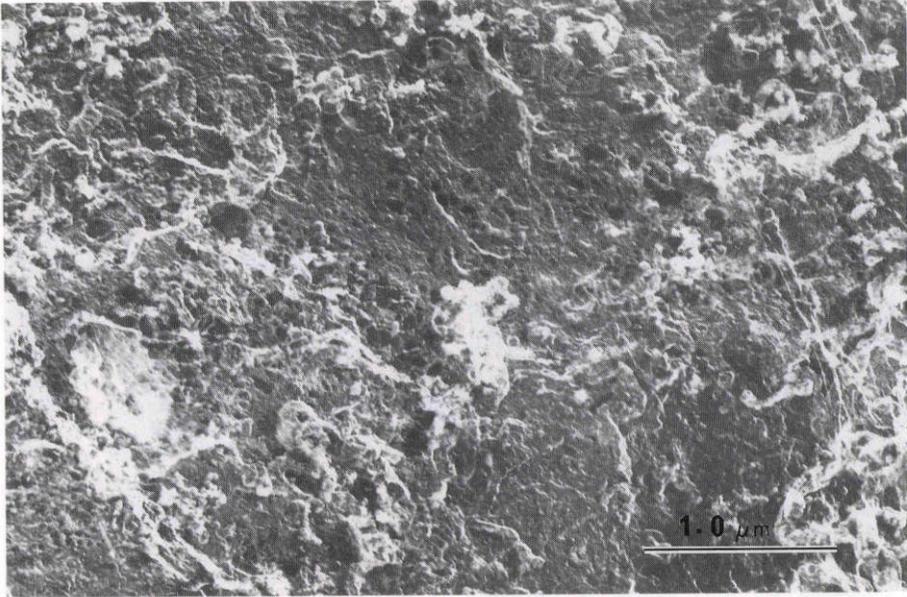
**Fig. 5a** In the medullary ray. Vitreoretinal adherence is stronger than in the visual streak, so some vitreous fibrils remain. And the meshwork structure of the ILM can be seen through the vitreous fibrils. ( $\times 25,000$ )



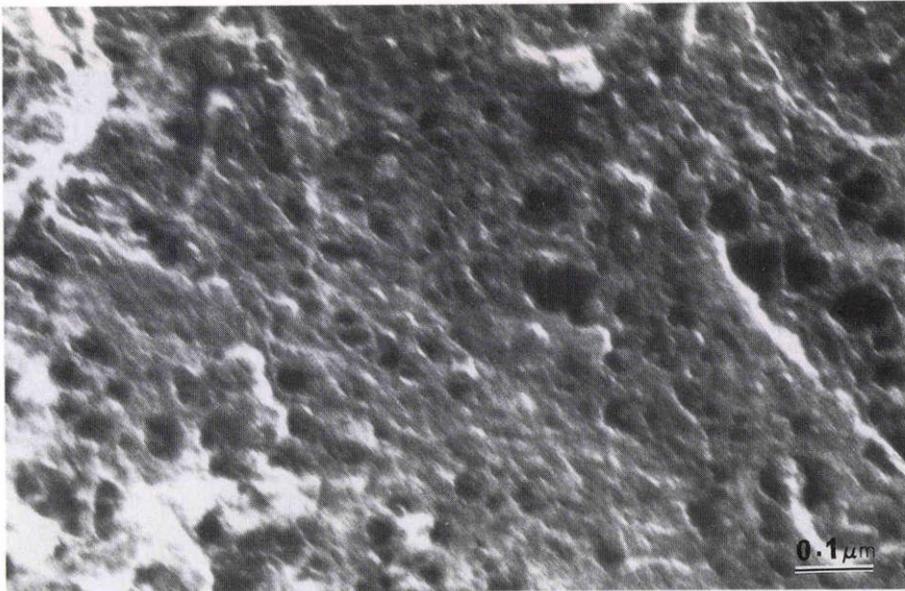
**Fig. 5b** Higher magnification view of Fig. 5a. Note the pores. ( $\times 100,000$ )

去と網膜内境界膜の観察が可能であった。網膜内境界膜は基底膜の特徴である網目構造をとり、篩 (sieve) が三次元的に重なりあってひろがっていた (Fig. 4a)。

所々に硝子体線維の断端が残っていた。拡大してみると (Fig. 4b) 約10nmの細線維が篩を形成していた。篩の中の網目、即ち孔 (pore) は正円、楕円、多角形



**Fig. 6a** In the peripheral retina. It is difficult to observe the ILM because the vitreous fibrils still remain densely on it. ( $\times 25,000$ )



**Fig. 6b** Higher magnification view of Fig. 6a. The pores have irregular shape, and the peripheral retina has more channels than the visual streak and the medullary ray. ( $\times 100,000$ )

をしており、孔について300個の直径(最長径)の計測を行った結果、Fig. 7の如く10から25nmに集中していた。平均値は13.34nmであった。拡張した大孔、即

ち孔に連続した管(channel)が所々にみられた。  
2) 髄翼部(medullary ray)  
視放部に比べてやや強い網膜硝子体の癒着があり、

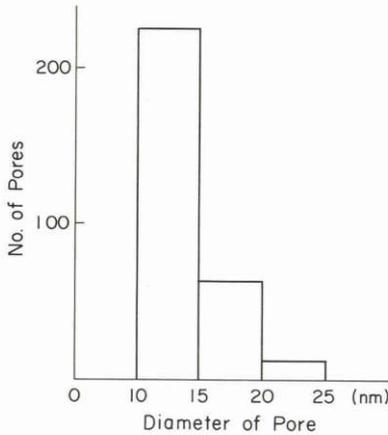


Fig. 7 Histogram of pore's diameter in the visual streak. Mean diameter of three hundred pores calculated is 13.43nm.

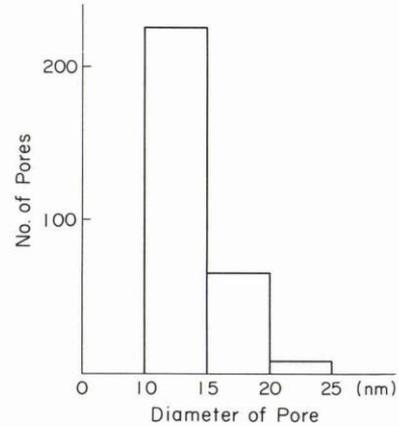


Fig. 9 Pore's diameter in the peripheral retina. Mean of those in 13.40nm. There were no significant statistical differences among three regions.

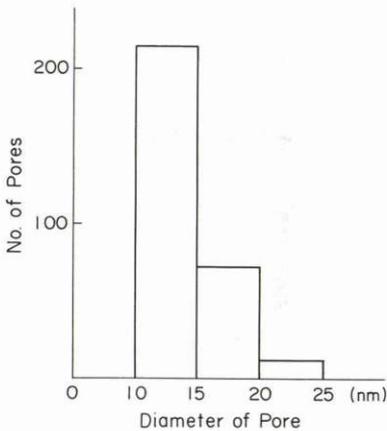


Fig. 8 Pore's diameter in the medullary ray. Mean of those is 13.59nm.

硝子体線維がかなり残っていたが、疎になった硝子体線維の隙間から網膜内境界膜が観察できた (Fig. 5a). 拡大してみると (Fig. 5b) 視放部と類似した孔と管が認められた. 孔の直径は視放部と同様に10から25nmに集中し, 平均値は13.59nmであった (Fig. 8).

### 3) 網膜周辺部 (peripheral retina)

網膜硝子体の癒着が非常に強く, 硝子体の除去が困難であった. 硝子体線維が密に残り, 網膜内境界膜の透見できる部分が少なく, 節も視放部や髄翼部と比べ, 非常に疎であった (Fig. 6a). 拡大してみると (Fig. 6b) 視放部や髄翼部と比較し, 孔の辺縁が不整で, 管がやや多い点で違っていた. 孔の直径は他と同様

10~25nmに集中し, 平均13.40nmであった (Fig. 9).

### 4) 統計

孔の直径が部位別に差があるか否か確認する目的で, ヒストグラムが正規分布をとっていないので  $\chi^2$  検定を行った. その結果, 3部位とも統計学的有意差 (危険率 1%, 5% 共) は認められなかった.

## IV 考 按

網膜内境界膜は Müller 細胞の基底膜であり<sup>11)</sup>, 他の組織と同様に基底膜としての特徴を有する. 基底膜は特殊な細胞外マトリックスであり, 細胞構築の維持に関与し, 細胞の増殖や分化に影響を与えたりする<sup>12)</sup>. また, 選択的物質通過の関門として働く<sup>13)</sup>. 基底膜の主要構成成分はコラーゲンと糖蛋白質であり, 若干のグリコサミノグリカンが含まれる<sup>12)14)</sup>. 基底膜コラーゲンは単一でなく, IV型, V型コラーゲン, その他さまざまなコラーゲンペプチドが分離されている. IV型コラーゲンでは分子の構造の中に折れ曲がりがある為, 10nm以下の細線維がずれて並ぶと立体的な網目構造を呈する<sup>15)</sup>. 今回の結果, 計測された細線維は10nm前後であり, 従来の切片法のそれに比べ径がやや大である. これはIV型コラーゲンが網目状に会合した骨格にラミニン, フィブロネクチン, プロテオヘパラン硫酸などが結合しているからであろう. また, レプリカ膜作成の際, 白金パラジウムやカーボンを蒸着する角度やレプリカ膜の厚さによっても径が多少異なってくるのも事実である.

基底膜の網目構造（篩状構造）を形態学的に証明したものの中に Hernandez<sup>2)</sup>や Ota ら<sup>3)4)</sup>の報告がある。即ち、分離した腎臓の糸球体基底膜 (GBM) にネガティブ染色を施して観察しており、このような篩状構造は糸球体の濾過作用と密接な関係をもつことを指摘している。彼らや他家たちは、基底膜の網目構造自体を篩 (sieve)、篩の中の網目を孔 (pore) と通称している。今回、網膜内境界膜についても同様に使用した。また、Sawada<sup>5)</sup>はフリーズ・エッチレプリカ法を用いて牛の角膜デスメ膜を三次元的に観察し、桿状構造をしたコラーゲン成分と球状の形をした非コラーゲンより成る六角形の格子のひろがり进行を明らかにした。松岡<sup>16)17)</sup>はディープ・エッチング法で脈絡膜毛細血管の内皮細胞の基底膜の超微細構造を報告している。しかし、これらは超微細な像が得られる反面、高度な技術を要し、目的とする部分の切断面が出現する確率が低いという欠点がある。これに比べ、今回の方法は次の点で優れていると言える。

- (1) 手技が比較的簡単である。
- (2) 再現性が高い
- (3) 広範囲にかつ鳥瞰図的に網膜内境界膜の超微細構造を観察できる
- (4) 走査型電顕で観察するよりはるかに解像度がよい
- (5) 網膜内境界膜の限局した病巣の微細構造も観察できる

短所は組織表面を大気に暴露する為、ディープ・エッチング法ほど超微細構造の保存が良好でない点である。

基底膜コラーゲンのもう一つの特徴としてはコラーゲナーゼに対して抵抗性のあることである<sup>9)10)</sup>。今回、筆者はこの性質を利用して細菌性コラーゲナーゼである *Clostridium histolyticum* collagenase (type 1)<sup>6)7)</sup> を使用し、硝子体の除去に成功した。Jensen & Prause<sup>18)19)</sup>はコラーゼナーゼ、トリプシン、ヒアルロニダーゼを用い、frozen resin-cracking と dry-cracking 法にて網膜各層を走査型電顕で観察し、網膜内境界膜の観察にはヒアルロニダーゼが最適であるとしている。しかし、彼らの電子顕微鏡写真では網膜内境界膜は1枚の扁平なシート状に表されており、決して超微細構造とは言えない。その理由には次の点が挙げられる。1) 組織を細片化してから酵素に浸漬している。2) 酵素に浸漬する時間が1時間と長すぎる。1), 2) の為、網膜内境界膜が直接酵素の侵襲を受けて傷害されてい

る。コラーゲン線維と共に、硝子体の固形成分(基質)の大部分を構成するのはヒアルロン酸である<sup>20)21)</sup>。ヒアルロン酸の除去はヒアルロニダーゼを使用するまでもなく、蒸留水での洗浄を繰り返すことで充分であると筆者は考え、この酵素を最初から除外した。また、予備実験の結果で示した様に、硝子体はトリプシンによる消化作用は受けず、vistrosin はトリプシンにより破壊されないという Tolentino ら<sup>1)</sup>の見解と一致した。従って網膜内境界膜の観察にはトリプシンは不適であると思った。Heegaard ら<sup>22)</sup>はさらにコンドロイチナーゼとプロテアーゼによる消化と cracking 法で網膜内境界膜を観察しているが、得られた写真はやはり超微細構造とは言いがたい。筆者の予備実験の結果の如く、いかなる酵素も直接網膜に暴露させると網膜に傷害が生じてしまうからである。

コラーゲナーゼを使用しないで特理的にのみ硝子体を除去した場合でも同じ像が得られたが、硝子体線維の残存が多く、綿棒で過度に擦過すると網膜内境界膜を損傷する為、切断前にコラーゲナーゼに浸漬した方が良いと考えた。なぜなら、コラーゲナーゼは硝子体中の vistrosin を加水分解し、次の過程の蒸留水による洗浄をより円滑にさせるからである。以上の結果より、網膜内境界膜を観察するには視神経周囲で小窓を作ってから0.1%コラーゲナーゼに10分間浸漬し、次に眼球内面を丁寧に擦過して硝子体を除去する方法が最良と考えた。蒸留水で充分に洗浄することも重要である。

硝子体は眼内透明相 (intraocular transparent phase) の重要な最終点であるが、この透明性を維持する為に Tolentino ら<sup>1)</sup>は幾つの特徴を挙げている。その中の1つに selective barrier が血管からの巨大分子 (細胞やタンパク質などの高分子) の侵入を防止する、というのがある。硝子体における柵機構を一般に血液-硝子体柵 (blood-vitreous barrier) といい、barrier の構成要素としては網膜毛細血管壁 (wall of retinal capillaries)、網膜内境界膜 (inner limiting membrane)、そして硝子体皮質層 (cortical layer) が考えられている。Balaz<sup>20)21)</sup>は molecular-sieve theory を提唱し、網膜内境界膜は直径15~20nm 以上の分子の侵入を防ぎ、バクテリア、ウイルス、蛋白質などに対する関門になると推測している。また、Tolentino ら<sup>1)</sup>の推測値は10~15nm である。今回筆者の研究の結果でも視放部、髄翼部、周辺部とも孔 (pore) の直径は10~25nm に集中し、彼らの値とほぼ一致した。

Ota ら<sup>3)</sup>は、腎臓の糸球体基底膜 (GBM) の三次元

的篩構造は多角形の線維構築より成る数多くの蛇行かつ分岐した管 (channel) が貫通しており, 幼児の遊具のジャングルジムに例えている. 表面レプリカ法では網膜内境界膜の奥行きまで判断することはできない. しかし, 網膜内境界膜も管が貫通していると思う. 片山はディープ・エッチング凍結切断法を用いてウサギの網膜硝子体境界面の超微細構造を観察しており<sup>23)</sup>, 彼は孔や管について考察はしていないが, この電子顕微鏡写真と今回の結果を合わせて網膜内境界膜の緻密層中の管が貫通しているのが確認できた.

臨界面乾燥法は凍結乾燥法と並ぶ優れた生検試料の乾燥法であるが, 試料の変形が100%生じないわけではなく, 多少の組織の収縮は起きてしまう. 今回, 網膜周辺部では孔の形が不整で, かつ管が多く覗かれたのは網膜硝子体癒着が画鋲の役割を果たして組織の収縮に不均衡が生じた為であり, 一方, 後部硝子体剥離の完成した視放部では組織が均等に収縮し, 管の部分があまり露出しなかったのではないかと思う.

硝子体線維と網膜内境界膜の接着は硝子体基底部で強く, 網膜後極部に向かうにつれて弱くなることが知られている<sup>23)24)</sup>. 今回, 網膜周辺部で網膜内境界膜の露出に困難を極めた理由として, このこととまたこの部では網状層が存在する<sup>23)</sup>為であると推察した. これに対して網膜後極部では硝子体線維が疎であり, また硝子体線維は連結糸を介すことなく直接緻密層に接着している<sup>23)</sup>ので, 筆者の実験でも網膜後極部の硝子体線維の除去と網膜内境界膜の観察が容易であった. Matumoto ら<sup>25)</sup>はウサギの網膜内境界膜と硝子体の接面の topographical variation を透過型電子顕微鏡で観察し, Trese ら<sup>26)</sup>は, ウサギ眼を用いた実験的網膜剥離の研究で, 髄翼部は網膜硝子体の癒着が非常に強いといっている. 今回の結果では, 髄翼部は視放部よりは癒着は強いが網膜周辺部よりはるかに弱かった. 彼らは超薄切片を用いており, 筆者の実験とは切片法などで異なる. しかし, 網膜周辺部における網膜硝子体の癒着の強さは硝子体線維の残存状態からも明らかである. 以上より, 硝子体線維の密度と網膜硝子体間の癒着の強さ, 物質の透過性は一概に相関すると言えないが, 網膜硝子体間の物質移動は, 篩の分布が疎で硝子体線維が密な網膜周辺部より網膜後極部, 特に視放部で主に行われているのではないかと想像できる.

では一体どのような物質が網膜硝子体間を移動しているのだろうか. 水, 電解質, ある種の糖, タンパク

質などが予想されるが, これに関する詳細な報告はない. アルブミン分子は分子量66,210でその形は回転楕円体であり, 長軸は14.0nm, 短軸は4.0nm と測定されている<sup>27)</sup>. 従ってウサギの網膜内境界膜の孔の直径はアルブミンの長径と等しいかまたは大きく, アルブミンを通過させてしまう. では size barrier としての篩以外に何が物質移動を規制しているのであろうか. この問題については, 眼以外の組織の基底膜で腎臓の糸球体基底膜 (GBM) がよく研究されている<sup>34)</sup>. GBM も無数の小孔が立体的篩構造を持ち, main filtration barrier の役割を果たしている. 一方, Rennke<sup>28)</sup>や Kanwar ら<sup>29)</sup>は, GBM において透明層に強い陰性荷電を証明した. これは GBM の透明層にヘパラン硫酸が含まれているため<sup>30)</sup>といわれ, 等電点の関係から陰荷電を帯びているとされる血中のタンパク質の通過を規定する. このような charge barrier も物質の通過に影響を及ぼす1つの因子であり, 同じことが網膜内境界膜についてもいえるであろう. しかし, 大部分の物質が網膜内境界膜に達するまでに, Müller 細胞のレベルで移動を阻止されているのではないか<sup>31)</sup>と筆者は想像し, 現在 tracer で網膜内境界膜を標識し超薄切片法による観察と研究を進めている.

また, 病的変化, 例えば網膜剥離や硝子体出血後の網膜前増殖組織を実験的に作った上, 網膜内境界膜の変化をこの方法で観ることも可能である.

稿を終えるに当たり, 本研究の主題を賜り, 御懇篤なる御指導と御校閲をいただいた恩師松尾信彦教授に深謝致します. また, 直接ご指導くださった松岡 徹講師, 御助言をくださった本学第三内科榎野博史講師に厚く御礼申しあげます. さらに技術協力をいただいた当教室の細田 彰, 光岡建之の諸氏, ならびに本学共同実験室の斉藤敦彦, 岡本浩志の諸氏に感謝致します. なお本研究は, 文部省科学研究費 (一般研究 C-63570830 研究代表者松岡徹) の援助を受けた. 付記して謝意を表する.

#### 文 献

- 1) Tolentino FI, Schepens CL, Freeman HM: Review of physiology and biochemistry. Vitreoretinal disorders. Diagnosis and management. Philadelphia, WB Saunders Co, 25-44, 1976.
- 2) Martinez-Hernandez A: The basement membrane pores. Biology and Chemistry of Basement Membrane. New York, Academic Press, Inc 99-109, 1978.
- 3) Ota Z, Makino H, Miyosi A, et al: Molecular sieve in glomerular basement membrane as revealed by electron microscopy. J Electron

- Microsc 28 : 20—28, 1979.
- 4) 太田善介 : 基底膜分子篩の機能と構造. 代謝 19 : 33—43, 1982.
  - 5) Sawada H : The fine structure of the bovine Descemet's membrane with special reference to biochemical nature. Cell Tissue Res 226 : 241—255, 1982.
  - 6) Carneiro J, Leblond CP : Suitability of collagenase treatment for the radio autographic identification of newly synthesized collagen labeled with  $^3\text{H}$ -glycine or  $^3\text{H}$ -proline. J Histochem Cytochem 14 : 334—344, 1966.
  - 7) Quintarelli G, Dellovo MC : The effects of clostridium histolyticum collagenase on amino sugar containing compound collagen complexes. Histochemie 8 : 216—218, 1967.
  - 8) Casselman WGB : Enzymes. Histochemical Technique. London, Methuen & Co Ltd, 162—179, 1959.
  - 9) Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR : Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from metastatic murine tumor. Proc Natl Acad Sci USA 76 : 2268—2272, 1979.
  - 10) Timple R, Risteli J, Bachinger HP : Identification of a new basement membrane collagen by acid of a large fragment resistant to bacterial collagenase. FEBS Lett 101 : 265—268, 1979.
  - 11) 松尾信彦, 喜多島昌二, 長谷川栄一 : 人眼網膜内境界膜の電子顕微鏡的研究. 眼紀 14 : 428—441, 1963.
  - 12) Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS, et al : Models for the self-assembly of basement membrane. J Histochem Cytochem 34 : 93—102, 1986.
  - 13) 梶川欽一郎 : 基底膜の構造. 代謝 19 : 1259—1265, 1982.
  - 14) Laurie GW, Leblond CP, Martin GR : Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate, proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. J Cell Biol 95 : 340—344, 1982.
  - 15) 林利彦 : 細胞外マトリックスの成分とその機能. 細胞 21(1) : 3—7, 1989.
  - 16) 松岡徹 : フリーズ・レプリカ法による脈絡膜毛細血管内皮細胞の研究. 第1報. Fenestrationの隔膜における超微細構造の三次元的観察. 日眼 87 : 1065—1076, 1983.
  - 17) 松岡徹 : フリーズ・レプリカ法による脈絡膜毛細血管内皮細胞の研究. 第3報. 内皮細胞をとり囲む環境. 日眼 89 : 1221—1235, 1985.
  - 18) Jensen OA, Prause JU : Frosen resin-cracking and enzyme-digestion methods in SEM as applied to ocular tissues. Curr Res Ophthalm Electron Microsc 3 : 73—82, 1979.
  - 19) Prause JU, Jensen OA : Scanning electron microscopy of frosen-cracked dry-cracked and enzyme-digested retinal tissue of a monkey (*Cercopithecus aethiops*) and man. Curr Res Ophthalm Electron Microsc 3 : 127—136, 1979.
  - 20) Balaz EA : The molecular morphology of the vitreous, in Smeller GK (ed) : The structure of the Eye. New York, Academic Press, 293—310, 1961.
  - 21) Balaz EA : The molecular biology of the vitreous, in McPerson A (ed) : New and Controversial Aspects of Retinal Detachment. New York, Harper & Row Publishers, 3—15, 1968.
  - 22) Heegaard S, Jensen OA, Prause JU : Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. SEM on frozen resin-cracked and enzyme-digested retinas of *Macaca mulatta*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 224 : 355—360, 1986.
  - 23) 片山優 : 網膜硝子体境界面の超微細構造の研究. 第1報. デイープ・エッチング凍結割断法によるウサギ網膜内境界膜の観察. 眼紀 37 : 147—155, 1986.
  - 24) Foos RY : Vitreoretinal juncture ; topographical variations. Invest Ophthalmol 11 : 801—809, 1972.
  - 25) Matumoto B, Blanks JC, Ryan SJ : Topographical variations in the rabbit and primate internal limiting membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 25 : 71—82, 1984.
  - 26) Trese MT, Spitznas M, Foos RY, et al : Experimental tractional retinal detachment in rabbits ; clinical picture and histopathologic features. Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 214(4) : 213—222, 1980.
  - 27) Peter T Jr : Serum albumin, in Putnam EW (ed) : The Plasma Protein. vol 1. New York, Academic Press, 133—181, 1975.
  - 28) Rennke HG, Cotran RS, Venkatachalam MA : Role of molecular charge in glomerular permeability. Tracer studies with cationized ferritins. J Cell Biol 67 : 638—646, 1975.
  - 29) Kanwar YS, Farquhar MG : Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. J Cell Biol 81 : 137—153, 1979.
  - 30) 小出輝, 角原孝 : 蛋白尿の選択性. 臨床病理 36 : 197—207, 1977.
  - 31) 上野聡樹 : 血液眼関門についての研究. 一機能と形態の接点, その研究法の開発一. 日眼 92 : 1961—2014, 1988.