

# 走査型電子顕微鏡による Bruch 膜のコラーゲン 線維網の三次元的観察

—低濃度苛性ソーダ処理・水浸軟法による観察—

松岡 徹, 松尾 信彦, 中川 秀樹, 土手 正信

岡山大学医学部眼科学教室

## 要 約

Bruch 膜の膠原線維層を広範かつ鳥瞰図的に観察するため細胞消化法を用い網膜色素上皮細胞をはじめとした細胞要素を除去した。今回は低濃度の NaOH で数日間処理した白色ウサギおよびニホンザルの Bruch 膜を走査型電子顕微鏡で鳥瞰図的に観察した。その結果露出した Bruch 膜の内側膠原線維層が広範に観察できた。また一部切断面において外側膠原線維層も観察できた。両膠原線維層とも網膜面に対して平行に走るコラーゲン細線維による密な格子で形成されていた。コラーゲン細線維は、ことに外側膠原線維層においては束を形成していることが多かった。またニホンザル眼の後極部では若干屈曲したコラーゲン細線維網がみられた。一方内側膠原線維層内のコラーゲン細線維網の隙間からしばしば弾性線維板の窓構造がみられた。今回用いた方法は Bruch 膜の膠原線維層の広範かつ鳥瞰図的な観察に最も適した方法であると考えられた。(日眼会誌 95: 318—324, 1991)

キーワード: Bruch 膜, 膠原線維層, 細胞消化法, 苛性ソーダ, 走査型電子顕微鏡

## Scanning Electron Microscopic Observation of the Collagen Fibrillar Network in Bruch's Membrane by Cell Maceration

Tohru Matsuoka, Nobuhiko Matsuo, Hideki Nakagawa and Masanobu Dote

*Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School*

### Abstract

Cellular elements, including retinal pigment epithelia, were removed by the cell maceration method to obtain a three-dimensional view of the collagen fibrillar networks of Bruch's membrane. A bird's eye view of the inner collagenous zone of Bruch's membrane was obtained using the eyes of albino rabbits and Japanese monkeys. The eyes were treated with a low concentration of NaOH for several days and then observed with a scanning electron microscope. This procedure allowed the exposed inner collagenous zone of Bruch's membrane to be observed. In addition, the outer collagenous zone was also observed in some of the specimens. Both zones were formed by dense lattices of fine collagen fibrils, and these fibrils frequently formed bundles in the outer collagenous zone. In the posterior poles of the eyes obtained from Japanese monkeys, a network of wavy fine collagen fibrils was observed. In both outer and inner collagenous zones, most of the collagen fibrils ran parallel to the retina. Fenestration of the sheet-like elastic layer was frequently observed through gaps in the

別刷請求先: 761-07 香川県木田郡三木町大字池戸1750-1 香川医科大学眼科学教室 松岡 徹

(平成2年6月29日受付, 平成2年9月5日改訂受理)

Reprint requests to: Tohru Matsuoka, M.D. Department of Ophthalmology, Kagawa Medical School.

Iketo 1750-1, Miki, Kita, Kagawa 761-07, Japan

(Received June 29, 1990 and accepted in revised form September 5, 1990)

thin collagen fibrillar network of the inner collagenous zone. The method employed in this study was considered suitable to obtain a wide bird's-eye view of the collagenous zone of Bruch's membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 318-324, 1991)

**Key words :** Bruch's membrane, Collagenous zone, Cell maceration, NaOH, Scanning electron microscope

## I 緒 言

Bruch膜は、特異な細胞外構造であり、その5層構築は透過型電子顕微鏡の観察により従来より明白になっている。しかしBruch膜の5層のうち膠原線維層のコラーゲン細線維の網目構造を鳥瞰図のおよび三次元的に観察した報告<sup>1)2)</sup>は少ない。しかもそれらは網膜色素上皮細胞とその基底膜に偶然人工的にできた亀裂をとおして観察された一部の内側膠原線維層であり、もちろん広範な観察をしたものではない。Bruch膜の病変の分布を電子顕微鏡的に観察するためには、Bruch膜を広範に鳥瞰図的かつ三次元的に観察することが肝要である。このような観察を可能にするためには、神経網膜と網膜色素上皮細胞およびその基底膜などを特異的に除去し、コラーゲン細線維のみをその微細な三次元的構築を変化させず保存せねばならない。最近Ohtaniら<sup>3)</sup>によって開発された低濃度NaOH細胞消化・水浸軟法は、これらの目的を可能にし、細胞要素とコラーゲン細線維以外の細胞外マトリックスを消化除去し、コラーゲン細線維網のみを観察可能にした方法である。今回この方法をBruch膜に応用して、膠原線維層を網膜色素上皮側より広範かつ鳥瞰図的に観察し、その網目構築を明瞭に観察できたので報告する。

## II 実験方法

材料として成熟ニホンザル眼(2頭, 3眼)、成熟白色家兎(4匹, 8眼)を用いた。実験動物はソムノベンチル全身麻酔下に眼球を摘出後2.5%グルタルアルデヒド(pH 7.3~7.4, 0.1M 燐酸緩衝液)で5分間固定後眼球を赤道部で2分割した。硝子体を除去後すばやく網膜脈絡膜の組織片を作成した。さらに同固定液で6~12時間固定した。固定した組織片は2.5NのNaOHに室温(25~30℃)で4~7日間浸漬した。その後約3日間1日1回の割りで蒸留水を交換し、白濁がなくなるまで組織を洗浄した。ついで組織を1%タンニン酸で2時間浸漬し、再度蒸留水で洗浄後1%オ

スミウム酸に1~2時間浸漬しいわゆる導電染色を施行した。組織は50%のt-ブチルアルコールに浸漬し、上昇系列により脱水し100%のt-ブチルアルコールに置換したところでt-ブチルアルコール凍結乾燥装置(ID-2, EIKO)内へ搬入し-20℃で凍結後、1~2時間かけて試料を乾燥した。乾燥した試料は、網膜側の面を上にして試料台に装着しイオンコーター(IB-3, EIKO)で金を軽く蒸着後走査型電子顕微鏡(S-430, HITACHI)で加速電圧20~25KVにて観察した。

## III 結 果

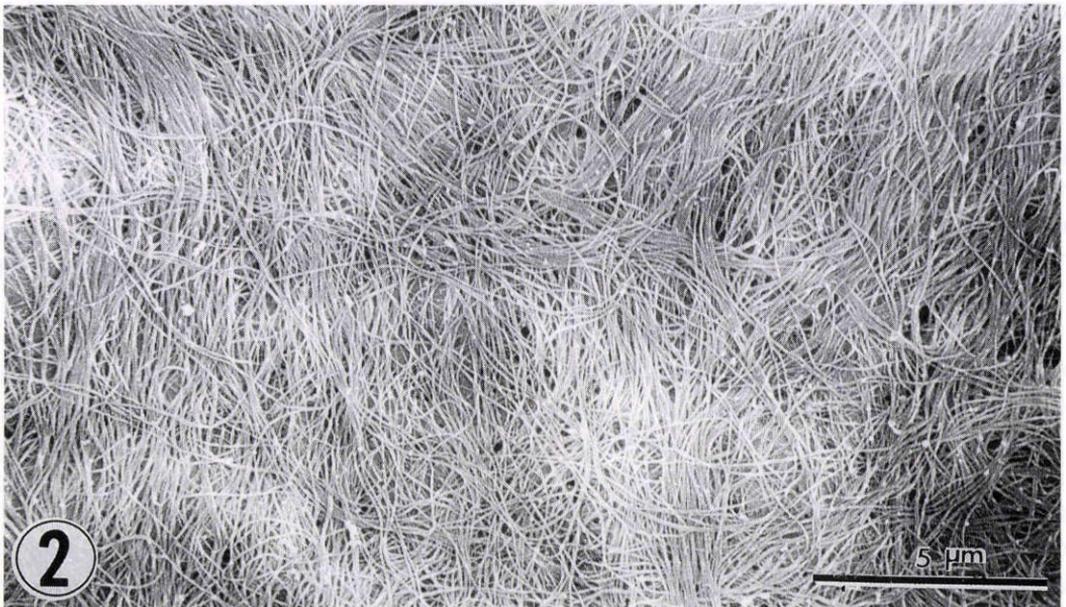
2.5NのNaOHで処理したBruch膜上には網膜色素上皮細胞などの細胞要素は、ほとんど残存してはいなかった(Figs. 1~6)。また処理時間が3日程度のもものでは基底膜が残存しているものもみられた。またニホンザル眼では処理時間が4日以内のものはメラニン顆粒が一部残存している像が認められた。

内側膠原線維層は広範かつ鳥瞰図的に観察できた(Figs. 1~3, 5, 6)。内側膠原線維層のコラーゲン細線維の直径は約50~60nm、横紋の観察できるものではその周期は約60nmであり、密な格子構造を呈していた(Figs. 1~3, 5, 6)。この格子構造には幾分不均一な部分が存在するものの大体均一の密度でコラーゲン細線維が交差しており連続した網目構造を呈していた(Figs. 1~5)。一方コラーゲン細線維の網目構造が不連続な部分は、僅かしか認めなかった(Figs. 1~5)。コラーゲン細線維は、比較的直線的に走る部位(Figs. 1, 4)と屈曲しながら走る部位(Figs. 2, 3, 5)が認められた。この様なコラーゲン細線維の屈曲傾向は、眼球後極部ことにニホンザル眼後極部のBruch膜の内側膠原線維層にしばしば認められた(Fig. 3)。

一方外側膠原線維層は断面や人工的に形成された間隙からのみ観察できたが、約3~15本程度のコラーゲン細線維が束を作っている傾向が認められた(Fig. 4)。内外の膠原線維層ともコラーゲン細線維は殆ど全て網膜面に平行に走行していた(Figs. 1~6)。またウサギ眼ではときどき眼球後極部において内側膠原線維



**Fig. 1** A scanning electron micrograph of the inner collagenous zone of Bruch's membrane in the mid-periphery of an albino rabbit eye. The wide bird's eye view of the collagen fibrillar networks can be obtained by cell maceration method with 2.5N-NaOH. The interwoven collagen fibrils extend nearly straight and form a dense lattice structure.  $\times 3,300$



**Fig. 2** A scanning electron micrograph of the inner collagenous zone of albino rabbit Bruch's membrane in the posterior pole of the eye prepared by the same method as Fig. 1. The collagen fibrils wave and some of them form thin bundles.  $\times 6,000$

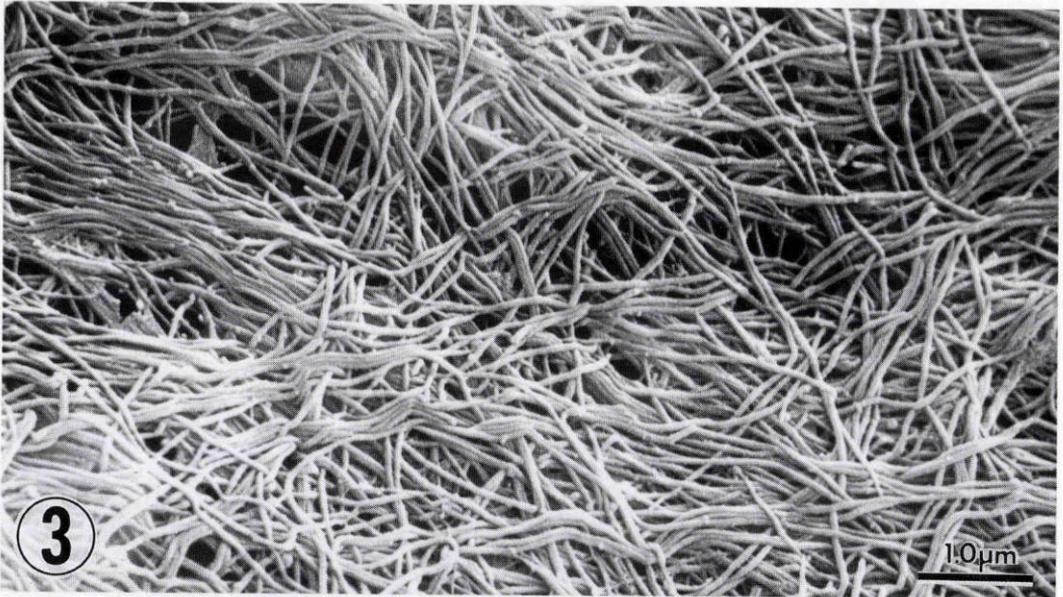


Fig. 3 A scanning electron micrograph of the inner collagenous zone of Japanese monkey Bruch's membrane. In the posterior pole of the eye, the bundles of waving collagen fibrils form a loose lattice structure.  $\times 15,600$

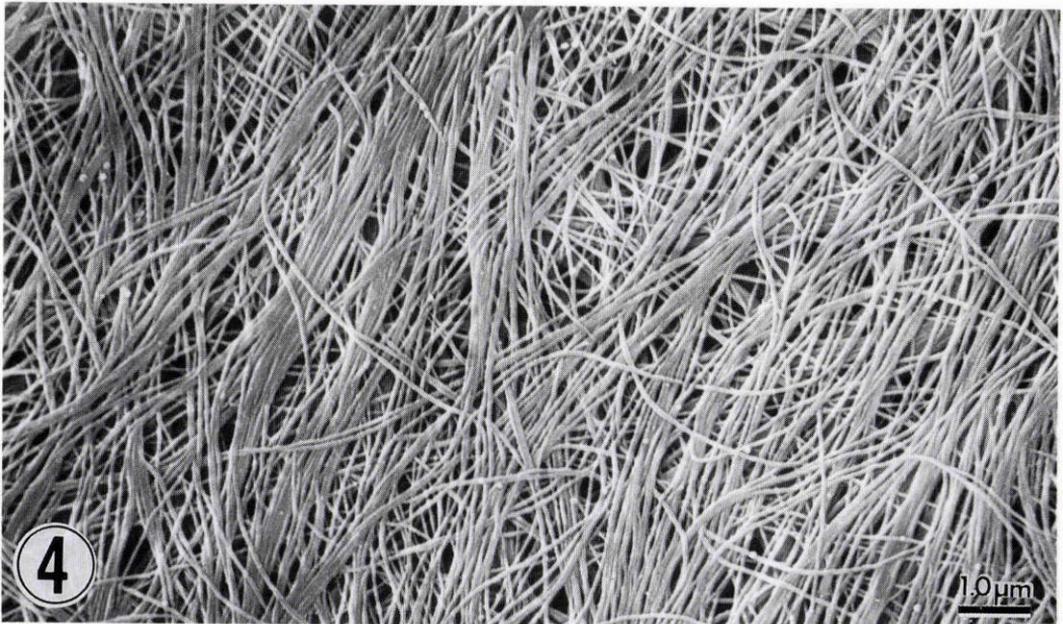
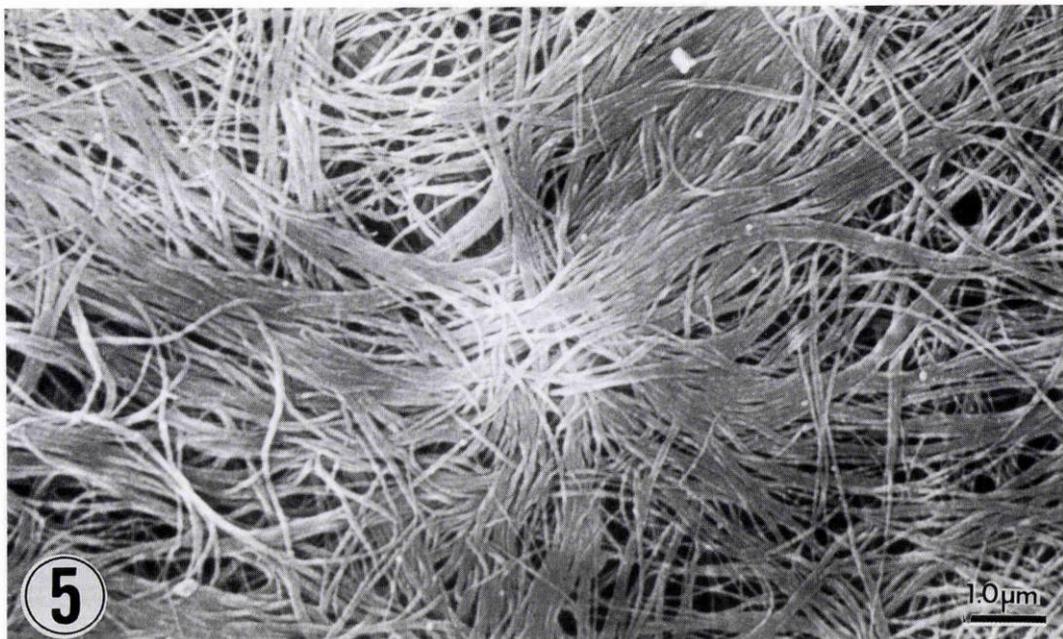
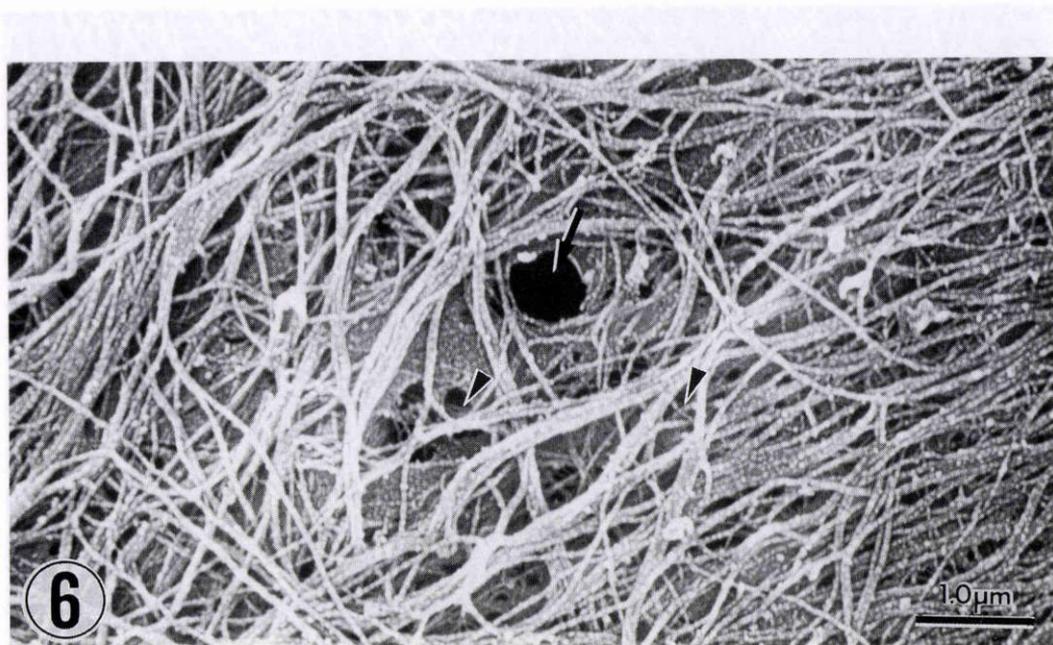


Fig. 4 A scanning electron micrograph of the outer collagenous zone of albino rabbit Bruch's membrane observed through large artifact gaps among the inner collagenous zone and the elastic layer. The loosely arranged collagen fibrils run straight and some of them form thin bundles.  $\times 10,000$



**Fig. 5** A scanning electron micrograph of the inner collagenous zone of Bruch's membrane in the posterior pole of the rabbit eye. Note that the bundles of densely packed collagen fibrils form a large node.  $\times 11,000$



**Fig. 6** A scanning electron micrograph of the inner collagenous zone of rabbit Bruch's membrane. In the posterior pole, the elastic layer can be seen among the loosely running collagen fibrils. The arrow indicates a fenestration in the elastic layer. The arrowhead indicates that the collagen fibrils pass through the fenestration into the outer collagenous zone.  $\times 16,000$

層のコラーゲン細線維の束が集束し大きな結節を形成している場所も認められた (Fig. 5). 一方眼球後極部ではコラーゲン細線維の格子が開大し, 弾性線維板が一部透見できる部分もみられ, 弾性線維板に開放する窓様構造もみられた (Fig. 6).

#### IV 考 按

走査電子顕微鏡を用いた特殊な組織の観察法のなかでは, 細胞の遊離表面を観察する方法が先に発達してきた. 酸による細胞消化法すなわちマセレーションが先に確立し, 様々な臓器で応用されてきたのである<sup>4)</sup>. それに反して細胞外マトリックスの構造を走査型電子顕微鏡で三次元的に観察されはじめたのは最近になってからである. 今回の実験の観察目的である Bruch 膜の細胞外構造を三次元的ことに鳥瞰図的に観察するためには網膜色素上皮細胞を除去する必要がある. これにはオスミウム酸浸漬組織剝離法<sup>25)</sup>や硼酸による除去法<sup>6)</sup>など数種の方法がある. しかしこれらの方法は, 網膜色素上皮細胞の基底膜が残存し, その直下に存在する細胞外マトリックスが広範に観察できないなどの欠点がある. これらの問題を解決し, 簡便で再現性に富むコラーゲン細線維の観察法が前述のごとく Oh-tani ら<sup>3)</sup>によって確立されてきた. この方法を用いることにより室温下で簡単に組織の処理ができ, 細胞成分およびコラーゲン細線維以外の細胞外マトリックスが除去され容易に組織のコラーゲン細線維のみが三次元的に観察できるのである.

Bruch 膜についても広範かつ鳥瞰図的に観察することができれば, 超薄切片法では観察され難い病変を発見できる可能性が生じるものと期待される. 今回本法を用いることにより細胞要素ことに網膜色素上皮細胞が完全に除去され, 網膜側からみた Bruch 膜のコラーゲン細線維網が明らかになった. ただ今回 Bruch 膜の弾性線維層は完全に除去されておらずまたコラーゲン細線維網も外側膠原線維層については, 広く鳥瞰図的に観察できなかった. もちろん組織の断面においては, 脈絡膜毛細血管内皮細胞を取り巻くようにした緻密なコラーゲン細線維網が観察できたが, その鳥瞰図的観察は偶然観察できた一部の部位にとどまった. この外側膠原線維層のコラーゲン細線維網を広範に観察することが困難であることが本法の難点でありさらに工夫が必要などところでもある.

さて今回観察できた内側膠原線維層のコラーゲン細線維の網目構造は, 大部分が直径50~60nmのコラー

ゲン細線維が密に格子状に組み合わされた構造を呈していた. この網目構造については, ウサギ眼とサル眼および眼球の部位により若干の差が認められた. ことにサル眼の後極部においてはコラーゲン細線維が若干屈曲していた. この差は内側膠原線維層がドルーゼンの初期発生部位といわれていること<sup>7)</sup>などに関連があることも推察される. すなわちドルーゼンの発生とともにこの部のコラーゲン細線維が屈曲および変形していくのかもしれない. 眼球の部位によりこの内側膠原線維層の厚みが異なることはよく知られている<sup>8)</sup>. 眼球の後極部をはじめとした部位においては, 疎で薄いコラーゲン細線維網やコラーゲン細線維網の不連続な場所が認められている. このような場所では, Bruch 膜の加齢による異常がすでに早期に生じている可能性が考えられる.

今回の観察でみられた重要な所見の1つとしてコラーゲン細線維網が網膜面と平行に配列していることが確認された. このことはすでに指摘されている<sup>7)</sup>ものの, 三次元的に観察された形態学的証拠を提供できたのは, 今回が初めてである. また網膜色素上皮細胞の基底膜の裏面にもコラーゲン細線維が密に平行していたが, これらのコラーゲン細線維の走行の形式は, 眼球壁に対して接線方向の伸展力が加わった時に抵抗を示し, 網膜絡膜の構造を維持するための合目目的な構造であると考えられる. また今回眼球の後極部では, サル眼やウサギ眼ではコラーゲン細線維の束形成や屈曲が多くみられたが, その反面弾性線維板が透見できるほどこの内側膠原線維層は薄かった. このことと眼球の伸展に伴う抵抗力と関係があるのかもしれない. すなわち後極部ではその内側膠原線維層の薄さを束を形成することで補強しているのかもしれない. またコラーゲン細線維の屈曲は, 前述したように後極部に生じやすいドルーゼン形成の影響をはじめとした一種の病的変化であるのかもしれない.

一方観察できた標本数は少ないものの外側膠原線維層ではコラーゲン細線維の束形成が多く観察できた. この束形成は, 脈絡膜毛細血管腔の拡張伸展に際して外側膠原線維層が抵抗力を補強している構造であるとも考えられる.

一方この膠原線維層の外側血液網膜柵としての関門機構を検討してみると, 大きさについての関門は, 今回観察されたコラーゲン細線維の網目の間隙から推定すると大きくみても1 $\mu$ m未満であると考えられる. すなわち多くの細胞は通常の形では通過困難な構造に

なっているのである。このことも今回観察できた重要な形態学的所見であると考えられる。

一方今回の観察でも弾性線維層とコラーゲン細線維との接着が観察できたが、弾性線維層の構造はアルカリ処理により幾分は傷害されていると考えられる。この弾性線維層の三次元構造も蟻酸処理法により筆者ら<sup>9)</sup>により観察されている。

今回は主に Bruch 膜のコラーゲン細線維網の観察法の方法論についてのみ言及したが、本法は、ドレーゼンの発生部位やこの部の不連続部から生じる可能性のある病変などを観察するために適した簡便な方法であると考えられる。筆者らも本法を用い人眼でこれらの病変の分布を現在観察中である。本法の問題点としては、細胞成分との関係が定かにできないこと、さらに他の細胞外マトリックスとの関係が明らかにできないなどであるが、他の方法<sup>4)5)9)</sup>と組み合わせることで幾分はこの問題に対応できるであろう。

稿を終るあたり貴重なご助言を頂きました本学解剖学第2講座大谷 修助教授に深謝いたします。また技術協力をいただきました本学共同実験室林 信男技官、および当眼科学教室、細田 彰、光岡建之技官に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Goldbaum MJ, Madden K: A new perspective on Bruch's membrane and the retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol* 66: 17-25, 1982.
- 2) Yamamoto T, Yamashita H: Scanning electrom microscopic observation of Bruch's membrane with the osmium tetroxide treatment. *Br J Ophthalmol* 73: 162-167, 1989.
- 3) Ohtani O, Ushiki T, Taguchi, T, et al: Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: A demonstration by cell maceration/scanning electron microscope method. *Arch Histol Cytol* 51: 249-261, 1988.
- 4) Evan AP, Daniel WG, Dammrose D, et al: Scanning electron microscopy of cell surfaces following removal of extracellular material. *Anat Res* 185: 433-446, 1976.
- 5) Komuro T: Fenestrations of the basal lamina of intestinal villi of the rat; scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res* 239: 183-188, 1985.
- 6) Low FN, McClugage SG: Microdissection by ultrasonication: Scanning electron microscopy of the epithelial basal lamina of the alimentary canal in the rat. *Am J Anat* 169: 137-147, 1984.
- 7) Ishibashi T, Patterson R, Ohnishi Y, et al: Formation of drusen in the human eye. *Am J Ophthalmol* 101: 342-353, 1986.
- 8) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE: The choroid, In Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE (eds): *Histology of the Human Eye*. Philadelphia, WB Saunders CO, 328-363, 1971.
- 9) 松岡 徹, 松尾信彦, 中川秀樹, 他: 蟻酸処理法による Bruch 膜の弾性線維の三次元的観察. *日眼会誌* 95: 325-331, 1991.