# 蟻酸処理法による Bruch 膜の弾性線維の三次元的観察

## 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

ニホンザルおよび白色ウサギ眼の Bruch 膜の弾性線維層を三次元的かつ鳥瞰図的に観察するため高温での 蟻酸処理により細胞要素や弾性線維以外の細胞外マトリックスを消化除去した.そして弾性線維のみを抽出し 走査型電子顕微鏡で観察した.その結果弾性線維層は、半透明な1層のシートとして分離されることが多く、 そこには様々な大きさの扇形あるいは楕円形の窓が開放していた.その窓の数も場所により様々であった.さ らに窓を横切るようにして100~200nm の弾性線維が交錯していた.これらの線維同士や弾性線維層の無構造 な部分とを連結するさらに細い線維も認められた.またニホンザル眼では比較的太い弾性線維による格子構造 がしばしば観察された.本法は Bruch 膜の弾性線維層の三次元的構築を観察するためには最適の方法である ことが判明した.(日眼会誌 95:325-331, 1991)

キーワード:Bruch 膜,弾性線維層,蟻酸処理法,走査型電子顕微鏡,フリーズフラクチャー・デイープエッ チング法

Three-dimensional Observation of Elastic Tissue in Bruch's Membrane by Formic Acid Extraction

Tohru Matsuoka, Nobuhiko Matsuo, Hideki Nakagawa and Masanobu Dote Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

#### Abstract

Japanese monkey and albino rabbit choroids were treated with hot-formic acid to remove the cellular elements and the extracellular matrices excluding the elastic tissues so that both threedimensional and bird's eye views of the elastic layer of Bruch's membrane could be obtained. The only elastic layer was extracted and observed with a scanning electron microscope. Elastic layers were frequently extracted as translucent monolayered sheets with oval, sector-shaped fenestrations of varying sizes. Elastic fibers of  $100 \sim 200$ nm in diameter crossed each other in these fenestrations. Other fine fibers connecting these elastic fibers and their sheet-like elastic plate were also observed. In Japanese monkey eyes, lattice structures formed by thick elastic fibers,  $200 \sim 300$ nm in diameter, were conspicuous. This method proved suitable for the observation of the three-dimensional structure of the elastic layer of Bruch's membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 325-331, 1991)

Key words: Bruch's membrane, Elastic layer, Formic acid extraction, Scanning electron microscope, Freeze-fracture deep-etching

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

<sup>(</sup>Received June 29, 1990 and accepted in revised form September 5, 1990)

326

# I 緒 言

Bruch 膜の弾性線維層は、特異な弾性組織であり、 網脈絡膜の弾性支持組織として重要な役割を果たして いる.この弾性線維層の微細構造については、透過型 電子顕微鏡で詳しく観察されている.すなわち眼球壁 に対して接線方向に薄切した Bruch 膜の超薄切片を 観察し、弾性線維による網目構築が確認されている<sup>10</sup>. しかしこの弾性線維層を広範に三次元的かつ鳥瞰図的 に観察した報告はない.走査型電子顕微鏡により偶然 できた内側膠原線維層の間隙から、一部の弾性線維層 が僅かに観察された報告<sup>20</sup>があるのみである.この弾 性線維層を広範に観察するためには、網膜色素上皮細 胞をはじめとした細胞要素ならびにコラーゲン細線維 を主とした弾性線維回をその微細構造を変えるこ となく保存しなければならない.最近 Wasano ら<sup>30</sup>に よって動脈壁の弾性線維の三次元構築が,組織を蟻酸 処理し走査型電子顕微鏡で観察することにより明らか にされてきた.この方法を用いることにより細胞要素 とエラスチン以外の細胞外マトリックスが除去され, 組織のエラスチン骨格が出現するのである.今回この 蟻酸処理法を Bruch 膜に応用し, Bruch 膜の弾性線維 層を三次元的かつ鳥瞰図的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(2頭2眼),成熟白色家 兎眼(4匹,7眼)を用いた.実験動物はソムノペン チル全身麻酔下に眼球を摘出後2.5%グルタールアル デヒド(pH7.3,0.1M 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 網脈絡膜の組織片を作成した.ついで神経網膜を網膜 色素上皮細胞よりスパーテルにて除去後,同固定液で



Fig. 1 A Scanning electron micrograph showing an overall architecture of the elastic layer in Bruch's membrane treated with hot-formic acid. In the midperiphery of an albino rabbit eye. Note that numerous fenestrations with various sizes and shapes are seen in the elastic layer and they are crossed by anastomosing elastic fibers.  $\times 2,200$ 

## 平成3年4月10日

約3~6時間固定した.固定した組織は,88%蟻酸溶 液に浸漬し,恒温漕内で45℃で4~6日処理した.蟻 酸処理した組織片は0.002Nの塩酸で数回洗浄,つい で,蒸留水で24時間洗浄後,1%タンニン酸で1時間 浸漬固定した.その後再度蒸留水で2時間洗浄後1% オスミウム酸で導電染色を施した.組織片は50%t-ブ チルアルコールに浸漬し10%ごとの上昇系列で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時間かけて組織片を乾燥した. 乾燥した組織片は,イオンコーター(IB-3,EIKO)で 金を軽く蒸着した後,走査型電子顕微鏡(S-430, HITACHI)で20~25KVの加速電圧で観察撮影した

一方一部の網脈絡膜組織片は、2.5% グルタールアル デヒド固定後、25%のメタノールまたはエタノールに 浸漬し、凍結処理装置 (FD-2A, EIKO)用の試料台に 装着し、液化フレオン (-158°C) ついで液体窒素 (-196°C)にて凍結した.凍結した組織は、同装置内へ素 早く搬入し、-110~-120°C で組織を割断した.さらに 試料台の温度を上げ-90~-95°C の温度で約30分間の エッチングを施行した.ついで白金バラジウムの回転 蒸着,その後カーボンの補強蒸着を施した。ついで組 織片を次亜塩素酸ソーダで溶解し,レプリカ膜を採取 後透過型電子顕微鏡(HS-9, HITACHI)で Bruch 膜 を主に観察撮影した。

また単離した一部の弾性線維層は,上記と同様に洗 浄後1%タンニン酸固定,1%オスミウム酸固定後エ ポン樹脂に包埋した。ついで超薄切片を作成し透過型 電子顕微鏡で観察し,弾性線維が単離されていること を確認した。

# III 結 果

蟻酸処理を5日以上施したものでは網膜色素上皮細胞やコラーゲン細線維は殆ど残存していなかったが、 ニホンザル眼では、しばしばメラニン顆粒が不規則に 残存していた。弾性線維層は、多くは半透明な1層の 膜として分離できた。

弾性線維層の基本構造は、顆粒状無構造板状構造と そこに開放する窓様構造が主体であった(Figs. 1 ~4). またそこには程度の差はあるものの、直径 100~300nmの直径の弾性線維が付着したり窓の中を 交錯していた(Figs. 1, 2, 4). ニホンザル眼ではこれ



Fig. 2 A scanning electron micrograph showing the elastic fibers, about 200nm in diameter, overlying a sheet-like elastic layer in Bruch's membrane. The elastic layer has large openings of the fenestration and the intersecting elastic fibers form a dense lattice. In the mid-periphery of Japanese monkey eye.  $\times 8,000$ 



Fig. 3 A scanning electron micrograph of the sheet-like elastic layer in Bruch's membrane. In the posterior pole of the albino rabbit eye. Note that only a few oval fenestrations are distributed in the sheet-like elastic layer.  $\times 6,500$ 

らの弾性線維の格子構造が多く認められた(Fig. 2). しかしウサギ眼では無構造な比較的平滑なシート状部 分に直径50nmの細線維が疎に付着しているところが しばしば認められた(Fig. 3). 一方シート状の無構造 の弾性線維板のなかに開放している窓の形は様々で, 楕円形, 円形, 台形および扇形のものなど多彩であっ た(Figs. 1~4). また窓の大きさも最大幅が $0.1~3\mu$ m と同一試料内でも多彩であった. またこの窓のなかに は, さらに微細な直径10nm 程度の線維が認められた (Fig. 4).

一方フリーズフラクチャーデイーブ・エッチング法 でこの弾性線維を観察してみると,弾性線維は,無構 造顆粒状の板として認められたが,そのなかに微細な 直径10nmの線維が分布していた (Fig. 5).

# IV 考 按

Bruch 膜の弾性線維層は,他の臓器の弾性組織と同様にその弾力性により外部からの物理的な力に対して 構造の保持を担っている.この弾性線維層の三次元的 構築を観察できた報告<sup>21</sup>は数少ない.前述したように 透過型電子顕微鏡の観察により弾性線維層内では弾性 線維が格子様構造を形成していることが確認されたと いう報告<sup>11</sup>が僅かにあるにすぎない.従って三次元的 に弾性線維を観察しその構築を明らかな形態学的証拠 として提供できたのは今回が初めてである.Wasano ら<sup>31</sup>は古典的な弾性線維の分離法<sup>41</sup>を応用して主に動 脈壁の弾性線維網を三次元的に走査型電子顕微鏡で観 察することに成功した.さらに動脈硬化症ではその三 次元的構築は正常なものと較べ初期より著しく変化す ることも観察されている<sup>5161</sup>.今回筆者らは,この方法 を Bruch 膜に応用し弾性線維の三次元的観察に成功 した.

今回観察できた弾性線維層には、多少のコラーゲン 細線維と細胞要素の一部が残存していたが、弾性線維 層を鳥瞰図的に観察するために障害とはならなかっ た. 蟻酸処理時間としては Wasano ら<sup>3)</sup>の条件よりや や長い程度、すなわち4日から7日程度でよいものと 考えられる.しかしサル眼では、メラニン顆粒が残存



Fig. 4 A higher magnification view of the elastic layer in Bruch's membrane. In the mid-periphery of the albino rabbit eye. The fenestrations with various diameters can be seen. The arrowheads indicate the fine strands, about 10nm in diameter, linking the elastic fibers with the fenestral rim.  $\times 14,500$ 



Fig. 5 A deep-etching freeze replica of Japanese monkey Bruch's membrane in the peripery of the eye. The elastic fiber (\*) has a granular structure with some fine fibers of 10nm in diameter. The arrowheads indicate the stumps of collagen fibrils in the outer collagenous zone.  $\times 48,000$ 

していることが多く,処理時間によってもこの残存程 度にはあまり差がなかった.メラニン顆粒の除去方法 についてはさらに検討を要するものと考えられる.

さて今回得られた弾性線維層の構造は、筋型動脈と 弾性型動脈の内弾性板の丁度中間のような構築を呈し ていた.すなわち表面の平滑さならびにそこに開放し ている窓の数などの点においていずれの型とも決定し 難いような構築を成していたのである.もっとも低倍 で観察すると同一観察視野のなかに Fig. 2 のような 弾性型動脈の内弾性板に似た部位と Fig. 3 のような 筋型動脈の内弾性板に似た部位が混在するのである.

さて今回観察された弾性線維層内に確認できた窓の 意義については,動脈壁の内弾性板と同一であると考 えられる.標識物質を用いた研究"からも弾性板は、巨 大分子の拡散バリアーとして重要な役割を果たしてい ると考えられている. Bruch 膜においても同様のバリ アーが存在するものと考えられる. 今回観察された窓 の最大のものは、2~3µm程度であったが、通常の細 胞が通常の形態を保持しつつ通過することは困難であ ると考えられる.特に動脈壁では低比重リポタンパク (LDL) やフィブリノーゲンのバリアー機能が重要視 されている8)9)、このような窓が増えることにより、巨 大分子が通過しやすいことになるのか否かは不明であ る. また同一試料内でも窓の密度, 大きさに部位によ る差が認められた、この意義については不明であるが, 窓の大きさは、その部位の細胞の透過性と関連がある ともいわれている10).

さて今回の観察で弾性線維層のなかあるいは表面に 見られる細い100~300nmの弾性線維は弾性線維層を 形成する基本的なエラスチン骨格であると考えられ る. さらに無構造なシート様構造にもデイープエッチ ング法で観察されたように微細な線維が付着してい る. おそらく microfibril であると考えられる. また10 nm 前後のごく細い線維成分は microfibril の一部か あるいは消化されず残ったグリコサミノグリカンの一 部のいずれかであると推定される。このようにエラス チン骨格を保存できる程度の蟻酸処理では、本来単離 できるはずのエラスチン骨格に未消化の他の細胞外マ トリックスが僅かながら残存し、エラスチン骨格に変 形し付着するのは本法の欠点でもある. また消化によ り周囲の細胞外マトリックスことにコラーゲン細線維 の支持から遊離してしまうことの多い Bruch 膜の弾 性線維層は、生体内における本来の像より若干変形こ とに収縮をきたしていることも考えられる.

一方今回観察されたように一見無構造な部分が多い 弾性線維層と100~300nmの線維状のエラスチン骨格 がよく観察される弾性線維層とでは、種差や部位別の 差があるようである。今回はサル眼において弾性線維 が格子構造を形成しているのが多く認められた。一方 この弾性線維のとる形態の多様性の問題については、 個体の成熱度または老化の影響も考えておかねばなら ない。ことに正常人眼の眼組織においても成熟した弾 性線維すなわちエラスチンは、若年者眼では少なく年 齢を重ねるに従って、成熟した弾性線維が増えること も知られている<sup>1)11)</sup>.

さらに老化により異常な弾性線維が再生されたり崩 壊することも知られ、ことに動脈硬化症の動脈壁にお いて、ドーム状に隆起したり異常に線維化し隔壁を持 つエラスチン骨格が観察されている<sup>5)6)</sup>. Bruch 膜でも 老化により結晶様の弾性線維や新生したエラスチン骨 格などが観察されている<sup>1)</sup>.

一方コラーゲン細線維網との関係であるが、Fig. 3 のようにシート状の弾性線維層にコラーゲン細線維が 一部残存付着しているものが認められたが、 デイープ エッチング法の所見からみても弾性線維層とコラーゲ ン細線維とはかなりの程度で密着していると考えられ る、筆者らの低濃度苛性ソーダ処理・水浸軟法による 観察12)でもコラーゲン細線維が弾性線維層板に接着し ている像や窓を貫通し対側の膠原線維層と連絡してい る像が観察されたのである.このコラーゲン細線維と **弾性線維層との密着した構造は、弾性線維層の構造を** 補強しているものと考えられる。本法は、エラスチン 骨格を基本とした弾性線維組織の三次元的構築を観察 するには適している. しかし前述したように Bruch 膜 においては蟻酸処理により弾性線維層は、しばしば遊 離した一枚のシートとして観察される.従ってその周 囲の細胞との関係また他の細胞外マトリックスとの関 係を観察するには適していない、またメラニン顆粒が 長時間の蟻酸処理によっても残存するという問題も 残っている。しかし本法は Bruch 膜の弾性線維層の構 造を広く鳥瞰図的に観察できその病的変化の分布など を検討する上では現時点では最適の方法であると考え られる.

稿を終えるにあたり技術協力を頂きました当教室の細田 彰,光岡建之両技官,進 輝子氏に深謝いたします.

#### 文 献

1) 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.

- Goldbaum MJ, Madden K: A new perspective on Bruch's membrane and the retinal pigment epithelium. Br J Ophthalmol 66: 17-25, 1982.
- 3) Wasano K, Yamamoto T: Tridimensional architecture of elastic tissue in the rat aorta and femoral artery. A scanning electron microscope study. J Electron Microsc 32: 33-44, 1983.
- Hass GM: Elastic tissue 1. Description of a method for the isolation of elastic tissue. Arch Pathol 34: 807-819, 1942.
- 5) Nakatake J, Wasano K, Yamamoto T: Three-dimensional architecture of elastic tissue in early atherosclerotic lesions of the rat aorta. Atherosclerosis 57: 199-208, 1985.
- 6) Nakatake J, Yamamoto T: Threedimensional architecture of elastic tissue in athero-arteriosclerotic lesions of the rat aorta.

Atherosclerosis 64: 191-200, 1987.

- Raviola E, Karnovsky MJ: Evidence for a blood-thymus barrier using electronopaque tracers. J Exp Med 136: 466-498, 1972.
- Smith EB, Staple EM: Distribution of plasma protein across the human aortic wallbarrier functions of endothelium and internal elastic lamina. Atherosclerosis 37: 579-590, 1980.
- Tanaka K: Pathological significance of fibrinolysis. Trans Soc Path Jpn 66: 3-26, 1977.
- 10) 住吉昭信:血管壁.日本臨床 44: 1070-1075, 1986.
- Alexander RA, Garner A: Elastic and precursor fibers in the normal human eye. Exp Eye Res 36: 305-315, 1983.
- 12) 松岡 徹, 松尾信彦, 中川秀樹, 他: 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-. 日眼会誌 95:318-324, 1991.