

網膜光受容体間基質の分布に及ぼす固定法, 光の影響

上原 文行*, 大庭 紀雄*, Douglas Yasumura**, Matthew M. LaVail**

*鹿児島大学医学部眼科学教室, **カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部解剖学及び眼科学教室

要 約

白色成熟ラットを用い, 眼球摘出及び組織固定時の光の条件を変えて, 光受容体間基質 (IPM) のコロイド鉄染色像について比較検討した。暗順応下, 或いは蛍光灯下で眼球摘出し, 光を遮断して浸潤固定した場合, 視細胞外節全体及び内節先端側半分の領域の IPM がビマン性に染色された。蛍光灯下で眼球摘出し, 浸潤固定中に光をあてた場合, IPM の染色像はその光の強さと時間によって微妙に変化した。即ち, 光の強さと照射時間の増加と共に視細胞外節中間部 IPM の染色性が低下し, 内節の基底部から全体にわたりビマン性に IPM の染色が増強した。とくに蛍光灯下で灌流固定した場合, 内節部全体にわたって IPM が強く染色された。眼球を浸潤固定しかできない場合, IPM を厳密に組織化学的に検索するためには, 固定中の光の影響を完全に除去する必要があり, そのためには固定瓶を眼球摘出後直ちにアルミ фольで覆う方法が有効であると考えられる。(日眼会誌 95: 441-444, 1991)

キーワード: 網膜光受容体間基質, 光, 浸潤固定, 灌流固定, ラット

Effects of Fixation and Light Conditions on Distribution of Interphotoreceptor Matrix

Fumiyuki Uehara*, Norio Ohba*, Douglas Yasumura** and Matthew M. LaVail**

*Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

**Departments of Anatomy and Ophthalmology, University of California, San Francisco, School of Medicine

Abstract

By using albino, adult rats, the effects of different light conditions during enucleation and fixation on the staining of the interphotoreceptor matrix (IPM) with colloidal iron were examined. When the eyes were enucleated in the dark or under a fluorescent lamp, followed by immersion-fixing in the dark, the IPM around the photoreceptor outer segments (OS) and apical inner segments (IS) was uniformly stained. When the eyes were enucleated in the light, and were immersion-fixed in the light, the staining pattern of the IPM was dependent on the light conditions during the fixation. By increasing the intensity and the exposure-time of the light, the intensity of the interstitial IPM-staining around the OS decreased except for the apical-and basal-regions, whereas that of the IPM staining around the IS increased from the basal-to the apical-region. When the rat was perfused with the fixative in the light, the diffuse IPM staining around the IS was especially remarkable. In cases in which it is only possible to apply immersion-fixation, it is necessary to remove the light effects during the fixation in order to obtain consistent results with IPM-histochemistry. For this purpose,

別刷請求先: 890 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行
(平成2年8月24日受付, 平成2年9月20日改訂受理)

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine.

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan

(Received August 24, 1990 and accepted in revised form September 20, 1990)

it may be effective to cover the bottle for fixation with aluminum foil immediately after the enucleation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 441-444, 1991)

Key words : Interphotoreceptor matrix, Light, Immersion-fixation, Perfusion-fixation, Rat

I 緒 言

光受容体間基質(Interphotoreceptor matrix, IPM)は、網膜色素上皮と視細胞外節、内節周囲の網膜下腔を満たし、種々の重要な機能を有している^{1)~6)}。IPMの主要構成成分の一つである光受容体間レチノール結合蛋白(IRBP)が視細胞外節と網膜色素上皮細胞間のビタミンAの運搬を行うことは広く知られているが⁵⁾⁶⁾、その網膜下腔内局在については視細胞外節先端に多いと報告されているだけで⁷⁾⁸⁾、IPMは静的な不変細胞外構造基質としてとらえられてきた。しかしながら最近筆者らは、明暗の光環境の変化に伴ってラットIPMの複合糖質の局在部位が変化することを発見した。このIPM成分の局在の変化は、ラットを固定液で灌流し、IPMを明、或いは暗の光条件下の存在すべき場所に瞬時に固定することによって明瞭に検出されたものである⁹⁾。しかしながら灌流固定法は、生体ヒト眼球の病理組織学的検索には用いることができず、浸潤固定法を用いざるをえない状況にある。この場合、眼球摘出時及び浸潤固定時の光の条件の違いによってその組織化学的結果が異なってくる可能性があり、異なった条件のもとでは厳密な研究結果の比較検討は難しいものと予想される。そこで本研究においては、理想的な眼球浸潤固定法の条件設定を目的として、ラットを用い眼球摘出時及び浸潤固定時の光の条件をいくつか設定して、その条件下のIPM分布について組織化学的に比較検討した。

II 実験方法

白色成熟ラット(RCS-rdy⁺; 8~10週齢)を、明(7AM照明 on: Cage部照度は20ft-c以下):暗(7PM照明 off)=12:12時間周期下に飼育し、2時間(9AM-11AM)、明順応(Cage部照度は20ft-c)あるいは暗順応(絶対暗室)させた後、炭酸ガスを吸引させることによって安楽死させ、直ちに以下の条件にて眼球を固定した。各実験条件ともそれぞれ4匹ずつ(片眼のみ)ラットを使用した。眼球摘出、浸潤固定、灌流固定時の照度は蛍光灯(天井)下では20ft-c、蛍光灯(スタンド)下では100ft-cであった。浸潤固定、灌流固定のた

めの固定液には2.5%glutaraldehyde, 2%paraformaldehyde(0.1M phosphate buffer, pH 7.3, 37°C)を使用した。また浸潤固定に先だって、固定液の移行を早くする目的で角膜をカミソリ刃で穿刺するとともに、浸潤固定は原則として約4°Cのもとで一晩行った。

1. 暗順応後、弱赤色光下で眼球摘出を行い、アルミフイルで被覆した瓶の中で浸潤固定した。
2. 明順応後、蛍光灯(天井)下で眼球摘出し、アルミフイルで被覆した瓶の中で浸潤固定した。
3. 明順応後、蛍光灯(天井)下で眼球摘出し、蛍光灯(天井)下で1時間浸潤固定した後、アルミフイルで固定瓶を被覆して浸潤固定した。
4. 明順応後、蛍光灯(スタンド)下で眼球摘出し、蛍光灯(スタンド)下で1時間浸潤固定した後、固定瓶をアルミフイルで被覆した。
5. 明順応後、蛍光灯(スタンド)下で眼球摘出し、蛍光灯(スタンド)下で3時間浸潤固定した後、固定瓶をアルミフイルで被覆した。
6. 明順応後、蛍光灯(スタンド)下で19G針を用いて50~60mmHgの圧力をかけ、ラットを6分間灌流固定した。眼窩内容除去を行い、眼球をさらにアルミフイルで被覆した瓶の中で浸潤固定した。

一晚浸潤固定の後、眼球を上下方向に2分割し、さらに数時間浸潤固定した後水洗し、methanol-methylcellosolveを用いて脱水、polyester waxに包埋した。8 μ mの組織切片を作成し、Röhlichの方法¹⁰⁾ですべてのラットの切片をコロイド鉄染色した。上記の各実験条件下の網膜色素上皮、視細胞外節、内節部のIPMの染色部位の分布について顕微鏡で観察、比較検討した。なお、顕微鏡レベルでは染色部が細胞表面に限局しているのか、網膜下腔内物質まで分布しているのかを区別するのは困難であり、これらを一括して観察結果にはIPMとして記載した。また、染色性にばらつきが見られる場合には、各実験条件毎にすべての切片を観察し、最も代表的とみなされる所見を結果には記載した。

III 結 果

1. 暗順応後、弱赤色光下に眼球摘出し、アルミフイル

イルで覆った瓶の中で浸潤固定した場合、視細胞外節全体及び内節先端側半分の領域に、IPM のビマン性のコロイド鉄染色像が観察された。だが、内節基底側半分の IPM は殆ど染色されなかった (図 1a)。

2. 明順応後、蛍光灯 (天井) 下で眼球摘出し、アルミフイルで覆った瓶の中で浸潤固定した場合にも視細胞外節全体から内節先端にかけてビマン性の IPM

染色像が観察された (図 1b)。

3. 明順応後、蛍光灯 (天井) 下で眼球摘出し、蛍光灯 (天井) 下で 1 時間浸潤固定した後、アルミフイルで固定瓶を覆って浸潤固定した場合、上記のビマン性の IPM 染色像に加えて、視細胞外節先端部の IPM が带状に染色されるとともに、外節基底部から内節先端部の IPM が弱く染色された (図 1c)。

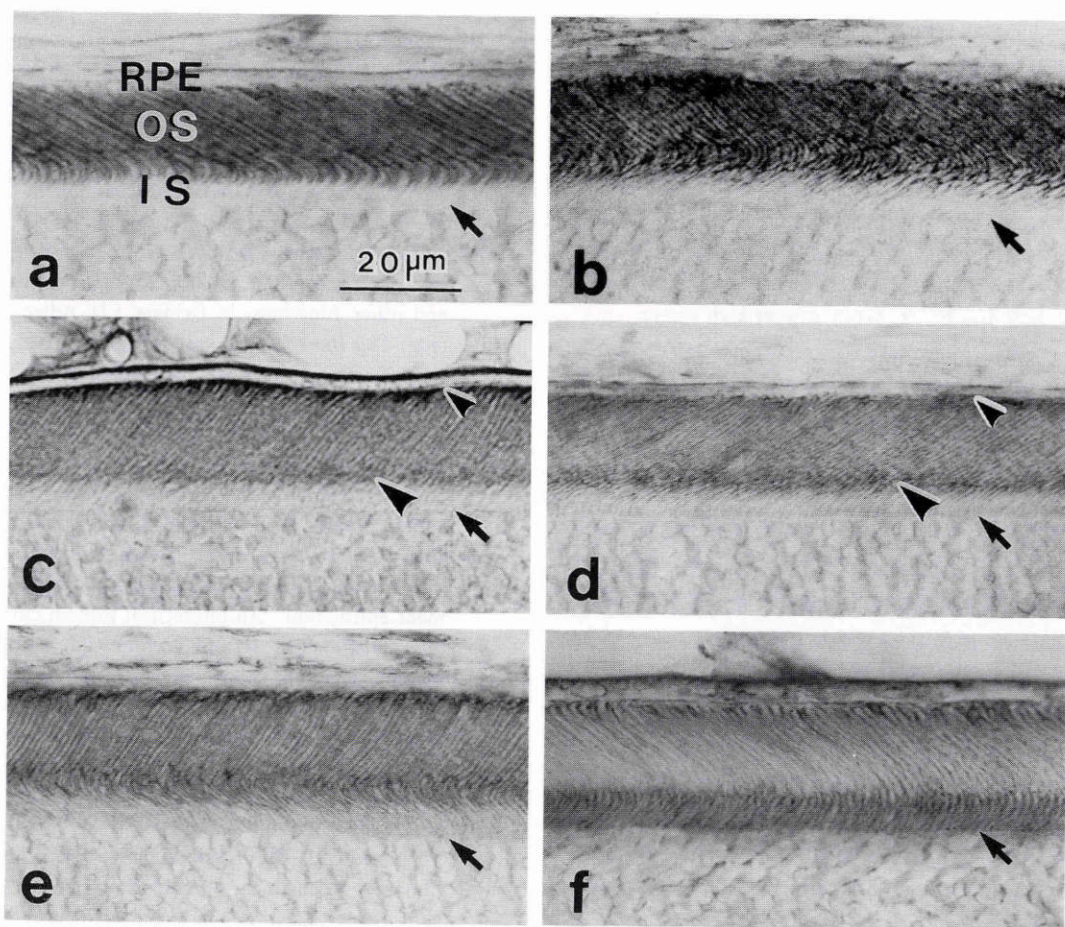


図 1 網膜光受容体間基質 (IPM) のコロイド鉄染色像 (×750)

a) 暗順応下に眼球摘出し、光を遮断して浸潤固定した場合、b) 蛍光灯 (天井) 下で眼球摘出し、光を遮断して浸潤固定した場合。これら a) 及び b) の光条件下では、視細胞外節全体及び内節先端側半分の領域の IPM がビマン性に染色される。一方、内節基底側半分の IPM は殆ど染色されていない (RPE: 網膜色素上皮; OS: 視細胞外節; IS: 視細胞内節; 矢印: 外境界膜)。c) 蛍光灯 (天井) 下で、眼球摘出、1 時間浸潤固定してから光を遮断した場合、上記 (a, b) のビマン性の IPM 染色像に加えて、視細胞外節先端部 (小矢頭) の IPM が带状に染色されるとともに、外節基底部から内節先端部 (大矢頭) の IPM がごく弱く染色される (矢印: 外境界膜)。d) 蛍光灯 (スタンド) 下で眼球摘出、1 時間浸潤固定してから光を遮断した場合、視細胞外節先端部 (小矢頭) 及び外節基底部から内節先端部 (大矢頭) の IPM が带状に染色されるとともに、外節中間部及び内節基底部 (矢印) の IPM が弱く染色される。e) 蛍光灯 (スタンド) 下での固定時間を 3 時間に延長した場合、d) の所見に加えてさらに視細胞内節部の IPM の染色がビマン性にわずかに増強する (矢印: 外境界膜)。f) 蛍光灯 (スタンド) 下で灌液固定した場合、d, e) の所見に加えて視細胞内節全体にわたるビマン性の IPM の染色像が観察される (矢印: 外境界膜)。

4. 明順応後、蛍光灯（スタンド）下で眼球摘出し、蛍光灯（スタンド）下で1時間浸潤固定した後、固定瓶をアルミ фольドで覆った場合、視細胞外節先端部及び外節基底部から内節先端部のIPMが带状に染色されるとともに、外節中間部及び内節基底部のIPMが弱く染色された（図1d）。

5. 蛍光灯（スタンド）下での固定時間を3時間に延長した場合、1時間の場合と同様の所見を呈するとともに、さらに視細胞内節部のIPMの染色がビマン性にわずかに増強した（図1e）。

6. 蛍光灯（スタンド）下で灌流固定した場合、視細胞外節先端部IPMの带状の染色像のほかに内節全体にわたるビマン性のIPMの強い染色像が観察された（図1f）。

1.と6.の実験条件下では、切片間、あるいは異なった眼球部位による染色性（IPM分布）のばらつきは全く見られなかった。2.から5.の実験条件下では、ごく一部（2割以下）の眼球部位で、それぞれの前後の実験条件と類似した染色パターンが見られたが、それは主として赤道部から周辺部にかけてであった。

IV 考 按

暗順応あるいは明順応のいずれの条件下で眼球摘出した場合でも、固定瓶をアルミ фольドで被覆して浸潤固定中の光因子を除去した場合、視細胞外節全体にわたるビマン性のIPM染色像（暗順応パターン⁹⁾）が得られたのに対し、浸潤固定中に光をあてた場合には、IPMの染色像はその光の強さと時間によって微妙に変化した。後者は暗順応パターン⁹⁾と明順応パターン⁹⁾の間の中間型としてとらえた。即ち、浸潤固定の場合、明順応下に眼球摘出しても、その後の完全固定までの光の条件の違いによって暗順応パターン⁹⁾の方へ近づいてしまい、図1fの如き明順応の典型パターンは灌流固定によってのみとらえられた。したがって、灌流固定できる場合には、暗順応パターン⁹⁾と明順応パターン⁹⁾の両者について比較検討することが望ましいが、生体ヒト摘出眼球の組織化学的検査など、浸潤固定しできない状況下においては、コントロールが容易で染色結果に再現性の得られやすい暗順応パターン⁹⁾についてのみその検出を試みるべきであろう。即ち、眼球摘出時の光条件の違いに関係なく、摘出後速やかに暗所下で組織を浸潤固定する必要がある。そのために

は固定瓶をアルミ фольドで覆う方法が最も簡便かつ有効であると考えられる。今後は、視細胞、とくにIPMの厳密な組織化学的検索を行うためには、眼球の浸潤固定中の温度を低く保つだけでなく、光を完全に遮断することにも注意を払う必要があるであろう。

文 献

- 1) Sidman RL: Histochemical studies on photoreceptor cells. *Ann NY Acad Sci* 74: 182-195, 1958.
- 2) Feeney L: Synthesis of interphotoreceptor matrix. I. Autoradiography of ³H-fucose incorporation. *Invest Ophthalmol* 12: 739-751, 1973.
- 3) LaVail MM, Pinto LH, Yasumura D: The interphotoreceptor matrix in rats with inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 658-668, 1981.
- 4) Adler AJ, Evans CD: Proteins of the bovine interphotoreceptor matrix: Retinoid binding and other functions. In Bridges CD, Adler AJ (ed): *The Interphotoreceptor Matrix in Health and Disease*, New York, Alan R Liss Inc, 65-88, 1985.
- 5) Lai Y-L, Wiggert B, Liu YP, et al: Interphotoreceptor retinol-binding protein: Possible transport vehicle between compartments of the retina. *Nature* 298: 848-849, 1982.
- 6) Liou GI, Bridges CDB, Fong S-L, et al: Vitamin A transport between retina and pigment epithelium—An interstitial protein carrying endogenous retinol (interstitial retinol-binding protein). *Vision Res* 22: 1457-1467, 1982.
- 7) Bunt-Milam AH, Saari JC: Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* 97: 703-712, 1983.
- 8) Eisenfeld AJ, Bunt-Wilam AH, Saari JC: Immunocytochemical localization of interphotoreceptor retinol-binding protein in developing normal and RCS rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 775-778, 1985.
- 9) Uehara F, Yasumura D, LaVail MM, et al: Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. *Science* 248: 1633-1636, 1990.
- 10) Röhlich P: The interphotoreceptor matrix: Electron microscopic and histochemical observations on the vertebrate retina. *Exp Eye Res* 10: 80-96, 1970.