網膜内境界膜の超微細構造

ー第2報 ポリエチレンイミンによる網膜内境界膜・ 陰性荷電部位の観察一

西原浩美

岡山大学医学部眼科学教室

要 約

陽イオントレーサーのポリエチレンイミン (PEI) による浸漬法を用いて,家免の網膜内境界膜の陰性荷電 部位 (anionic sites) を透過型電子顕微鏡で観察し,以下の結果を得た.1) この方法は手技が簡単で,網膜内 境界膜の anionic sites を正確にかつ短時間に観る上で非常に有効である.2) 網膜後極部(視放部, 髄翼部) では PEI 粒子が網膜内境界膜の透明層中にほぼ均等に付着していた.3) PEI 粒子の直径は平均20nm で, 40~50nm の間隔で並んでおり,透明層の細線維の間隔と一致した.4) 網膜周辺部では透明層中の PEI 粒子 の分布は疎で,不均一に付着していた.5) 眼球の全部位において,網膜内境界膜の緻密層には PEI 粒子の付 着が観られなかった.6) 残存硝子体線維には PEI 粒子が付着していた.今回の結果より,網膜内境界膜の anionic sites は荷電関門 (charge 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 た.(日眼会誌 95:951-958, 1991)

キーワード:網膜内境界膜,陰性荷電部位,ポリエチレンイミン,荷電関門,透過型電子顕微鏡

Studies on the Ultrastructure of the Inner Limiting Membrane of the Retina —Distribution of Anionic Sites in the Inner Limiting Membrane of the Retina—

Hiromi Nishihara

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

For demonstrating ultrastructurally the distribution of anionic sites (AS) in the inner limiting membrane (ILM) of the rabbit's retina, the immersion method with cationic tracer, polyethyleneimine (PEI) was applied. This method was found to be simple and useful for the observation of AS in the ILM. In the posterior pole of the eyeball (visual streak and medullary ray), PEI particles were arranged evenly in the lamina rara (LR) of the ILM. The mean diameter of PEI particles was 20 nm, and intervals between them (40~50 nm) were the same as those of fine strands in the LR. However, the peripheral retina, the distribution of PEI particles were sparse and random, while in the lamina densa (LD) of each ILM, PEI particles were absent. AS stained with PEI were present in the residual

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

⁽平成2年11月16日受付,平成3年1月19日改訂受理)

Reprint requests to: Hiromi Nishihara, M.D. Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School.

²⁻⁵⁻¹ Shikata-cho, Okayama 700, Japan

⁽Received November 16, 1990 and accepted in revised form January 19, 1991)

vitreous fibers. These results may provide the morphological basis for the theory that AS of the ILM act as a charge barrier between the retina and the vitreous cavity. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95:951 -958,1991)

Key words: Inner limiting membrane of the retina, Anionic sites, Polyethyleneimine, Charge barrier, Transmission electron microscopy

I 緒 言

著者は前報¹⁾にて家兎の網膜内境界膜の網目構造を 観察し,網目が形成する篩(sieve)が容積関門(size barrier)として,血管からの高分子の侵入を防御する 役割を果たして硝子体の透明性を維持していること²⁰ を考察した.しかし,網膜硝子体間の物質移動を容積 関門だけで規制することはできない.と言うのも,網 膜内境界膜の篩の穴,即ち孔(pore)の直径はアルブ ミン分子の長径³⁾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からである.では,他の関門と して何が存在するであろうか.血液中の蛋白質はその 等電点の関係から陰性荷電を帯びているとされてい る⁴⁾.網膜内境界膜も陰性荷電部位(anionic sites,以 下 ASと略す)を有し,網膜硝子体間の荷電関門 (charge barrier)の主体を成している事が予想される が,未だかつて形態学的な証明はなされていない.

網膜内境界膜の荷電状態を形態学的に観察するに は、浸積法(immersion method)が可能なトレーサー 物質が必要である.なぜなら、静注法ではトレーサー は硝子体に達するまでに血液網膜関門で阻止されてし まう⁵⁾からである.Schurerら⁶⁾⁷⁷はこの浸積法に適し た polyethyleneimine⁸⁾(以下 PEI と略す)という陽イ オントレーサーを用いて、ラットの腎糸球体基底膜の ASを観察していた.そこで、著者は PEI の分子量、濃 度、浸積時間、使用する緩衝液、固定液を変えて検討 し、超薄切片法、透過型電顕により網膜内境界膜の AS の観察に成功した.また、前報と同様、眼球の部位別 に AS の状態を検討できたので、ここに報告する.

II 実験方法

実験動物として,体重2.0~2.5kgの成熟白色家兎 (7匹14眼)を使用した.ネンブタール麻酔下に眼球を 摘出し,角膜周辺部で割断してから,角膜,虹彩,水 晶体,硝子体を除去した.摘出眼球を実体顕微鏡下に 網膜剝離を起こさない様に注意しながら,視放部,髄 翼部,周辺部に分けた.0.5,1.0,2.0%のグルタール

アルデヒド(以下 GA と略す)液で30分間前固定を行 い. 0.15. 0.5. 1.0. 2.0%の PEI 溶液に 5, 15, 30, 45分間浸漬した後、0.2mol カジコル酸緩衝液又は0.1 mol 燐酸緩衝液にて30分間洗浄した. PEI は分子量 600 (SIGMA Chem. Comp.) と1800 (Polysciences, Inc.)の低分子のものを2種使用した.次に2.0% 燐タ ングステン酸と1.0%GA 混合液に1時間反応させ, 0.2mol カコジル酸緩衝液又は0.1mol 燐酸緩衝液で30 分間洗浄し、2.0%オスミウム液で後固定を2時間行 なった。0.2mol カコジル酸緩衝液, 0.1mol 燐酸緩衝 液, GA 液, PEI 溶液, 燐タングステン酸液, オスミウ ム液は蔗糖を用いて浸透圧を400mOsm に全て調整し た. PEI 溶液は IN 塩酸を、燐タングステン酸液は1N 水酸化ナトリウムを用いて pH 7.4に調整した. 0.2 mol カコジル酸緩衝液, 0.1mol 燐酸緩衝液とGA 液 は未調整で pH 7.4であった. エタノールにて上昇系列 脱水,エポン包埋を行い,超薄切片を作成し,鉛染色 を施した後,透過型電子顕微鏡(HS-9)にて観察撮影 した. 1 眼は GA 液による前固定をしないで, 眼球摘 出後すぐに PEI 溶液に浸漬した. 全例, 残存硝子体に は化学的物理的処理を全く施さなかった.

III 結 果

1. カコジル酸緩衝液使用群

1) PEI の分子量1800

(1) 濃度: 0.5%と1.0%PEI 溶液使用例では PEI 粒子の付着状態は良好であったが、1.0%の方が粒子の コントラストが良かった。0.15%では PEI 粒子の付着 及びコントラストが悪かった。2.0%溶液使用例では網 膜内境界膜の亀裂が観られた。

(2) 浸漬時間:1.0%PEI 溶液を30分間浸漬した例 は PEI 粒子の付着が良好であった.5分,または15分 間浸漬した例は PEI 粒子の付着が悪く,透明層まで達 していなかった。45分浸漬した例は透明層の開大と ミュラー細胞膜の陥凹が観られた(Fig.1).

2) PEI の分子量600

PEI 溶液の全ての濃度,浸漬時間においても PEI 粒



Fig. 1 Electron micrograph of the ILM treated with immersion in 1.0%PEI (M.W. 1800) solution for 45 minutes. Enlargement of the LR and notching on the Müller cell membrane (arrows) are noted. ×50,000

子がミュラー細胞中に侵入し,空胞を形成していた (Fig. 2).

2. 燐酸緩衝液使用群 PEI(分子量1,800,600共) を燐酸緩衝液に溶解させると、液が白濁沈殿した.



Fig. 2 The ILM treated with immersion in 1.0% PEI (M.W. 600) for 30 minutes. PEI particles invade into the Müller cell and form vacuoles (asterisk). ×12,500

3. 固定液の条件 0.5%GA 液にて前固定した例は PEI 粒子の付着が良好であった.GA 液の濃度を上げ ると PEI 粒子の付着が低下した.前固定を省略した例 は硝子体線維の残存が多く,網膜内境界膜への PEI 粒



Fig. 3 The ILM in the visual streak treated with immersion in 1.0% PEI (M.W. 1800) for 30 minutes. PEI-positive particles (Ca. 20 nm in diameter, arrows) are arranged evenly in the LR at intervals of 40~50 nm. In the LD, PEI particles are absent. ×50,000



Fig. 4 The ILM in the medullary ray treated with the same method as Fig. 3. The distribution of PEI particles (arrows) are similar to that of the visual streak. PEI stained particles (arrowheads) are found on the residual vitreous fibers. $\times 50,000$



Fig. 5 The ILM in the peripheral retina treated with the same method as Fig.
3. In the LR, PEI particles (arrows) are distributed sparsely and randomly. In the LD, PEI particles are also absent. ×50,000

子の付着が悪かった.

4. 部位別差 0.5%GA 液で前固定し, 1.0%PEI (分子量1,800) 溶液に30分間浸漬させてから燐タング ステン酸で染色し, オスミニウム後固定, 脱水, エポ ン包埋を行なった.超薄切片を作成し,鉛染色を施し て透過型電顕にて部位別差を検討した.

1) 網膜後極部(視放部 visual streak): PEI 粒子が 網膜内境界膜の透明層中にほぼ均等に付着していた。 平成3年10月10日



Fig. 6 Schema of ultrastructure of the inner limiting membrane of rabbit's retina (posterior pole). The lamina densa (LD) of the inner limiting membrane (ILM) expands three-dimensionarily into the meshwork structure with numerous sieves. The sieves are composed of fine strands with 10 nm in diameter, and elongate to form channels just like a junglegym. The pore diameter varies from 10 to 25 nm (mean 13.5 nm). Fine strands in the lamina rara (LR) of the ILM are $6 \sim 8$ nm in diameter and $40 \sim 50$ nm in intervals, connect the LD with the Müller cell plasma membrane. Vitreous fiber, $14 \sim 16$ nm in diameter, invades the LD directly, perpendicularly or obliquely.

日眼会誌 95巻 10号

PEI 粒子の直径は平均20nm で,40~50nm の間隔で並んでいた。網膜内境界膜表面の残存硝子体線維には PEI 粒子が付着していたが、緻密層には全く見られなかった(Fig. 3).

2) 髄翼部(medullary ray): PEI 粒子の付着状態は 視放部とほぼ同様であった(Fig. 4).

 周辺部 (peripheral retina):透明層中の PEI 粒 子の分布は疎で不均一に付着していた。緻密層には PEI 粒子の付着はみられなかった (Fig. 5).

IV 考 按

Schurer ら⁶¹⁷¹以来, PEI による浸漬法を用いて他組 織の AS の分布が多数報告されている^{9)~111}. 浸漬法の 利点は生検組織を用いて臨床応用できる点であり¹⁰, 各種糸球体腎炎における腎糸球体基底膜の AS の減少 と配列の乱れが蛋白尿の出現に関与していることが明 らかにされた⁶⁾¹⁰⁾¹¹⁾.

PEIは ethyleneimine の重合体で,活性の陽イオン 性をもつ水溶性ポリマーとして,工業製品に使用され ている⁸⁾.又,上記の操作条件下では塩基性であるた め,酸性物質と結合する.それ自体は電子密度は高く ないが,その中に含まれる窒素原子が重金属イオンと 結合するので,燐タングステン酸を反応させると高電 子密度をもつ粒子を形成し,電子顕徴鏡下で観察する ことができる⁶⁾.

Fig. 6 は著者の前報¹¹と片山¹², 松岡¹³のデータを もとに描いた家兎の網膜内境界膜(後極部)の模式図 である.前報¹¹にて緻密層の網目構造中の孔(pore)の 直径を計測し,眼球の部位別の差なく10~25nm(平均 13.5nm)の値を得た. PEI 分子はこの孔を通って透明 層に達し, 燐タングステン酸と反応して平均直径20nm の粒子を形成し, AS と結合するものと思われる. 緻密 層 とミュラー細胞膜とを連結する細線維(fine strands)の間隔と透明層に付着した PEI 粒子の間隔 (40~50nm)は一致することから,網膜内境界膜の AS は透明層の細線維中に存在することが推測できる. 一 方,主にIV型コラーゲンで構成される緻密層¹⁴⁾には眼 球のすべての部位において PEI 粒子は付着しておら ず,網膜内境界膜の緻密層において AS は存在してい なかった.

AS を形態学的に観察する方法として、塩基性の ruthenium red¹⁵⁾⁻¹⁷⁾, colloidal iron¹⁶⁾, cationized ferritin¹⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾などのトレーサーが知られているが、こ れらは分子量が大きい点で浸漬法には不向きであ る⁹⁾. Pino ら¹⁶⁾は ruthenium red, colloidal iron, cationic ferritin を用いた浸漬法で, ラットの Bruch 膜の AS を観察している. しかし, 40μ mの厚さに細片 化したものを長時間(2時間から24時間)浸漬してお り, 自然な状態とは言えない. これに比べ, PEI を用 いた方法は細片化することがなく, 短時間にかつ正確 に網膜内境界膜の AS を観察できる点で優れている.

Essners ら⁹は,白色家兎の Bruch 膜の AS を PEI による浸漬法で観察している.彼らは分子量1,800と 40,000から60,000の PEI を使用しているが,後者は Bruch 膜への付着が悪く,前者がこの研究に適してい るとしている.今回,著者は分子量600の PEI も使用し たが,PEI 粒子がミュラー細胞中に侵入し,空胞を形 成していた.このように分子量が小さすぎても不適で, 網膜内境界膜の観察においても分子量1,800の PEI が 最適であった.換言すれば,分子量1,800の物質は緻密 層の孔を通過する事ができると言えよう.

また, Essner ら⁹は Bruch 膜に付着した PEI 粒子の 直径が18nm で, 粒子の間隔が50nm と報告しており, 今回の網膜内境界膜の結果とほぼ一致した.しかし, 彼らは眼球の部位別差までは検討していない.

腎糸球体基底膜の AS の本態は内外透明層中に豊富 に存在するプロテオグリカンのヘパラン硫酸とされて いる²⁰⁾.また、Pinoら¹⁶⁾は、ヘパリナーゼで処理する と網膜色素上皮細胞、Bruch 膜、脈絡膜毛細血管内皮 細胞の基底板の AS が消失する事から、ヘパラン硫酸 の存在を指摘している。ヘパラン硫酸はヘパリンと同 様に抗凝血作用を有しているので、腎炎の発症に重要 な役割を演じている糸球体毛細血管内の凝血機転に対 して阻止的に作用していると考えられている.現在の 処、網膜内境界膜のヘパラン硫酸は検出されていない が、透明層の細線維中に存在し、網膜硝子体間の病変 において抗炎症作用の役割をはたしていることが充分 推測できる.

Tolentino ら²は硝子体の透明性を維持するための 関門を血液硝子体栅 (blood-vitreal barrier) といい, 網膜内境界膜の他に硝子体皮質層 (cortex layer)をあ げている.そして皮質層での濾過機構は硝子体中のコ ラーゲン線維とヒアルロン酸の密度状態による篩効果 と考えている.Balazs²¹⁾は硝子体中のヒアルロン酸は 強い陰性荷電を持ち,電荷相互の斥力で硝子体は膨張 し,また,陽性荷電分子の侵入を中和することにより 阻止するという仮説を立てた.今回の結果から残存硝 子体線維には PEI 粒子が付着しており,これは硝子体 中のヒアルロン酸が陰性に荷電しているという Balazs の説を立証している.

他組織では通常0.5%の濃度の PEI 溶液を使用して いるが、今回の実験結果から、網膜内境界膜では1% のものが最適であると思えた。これ以上濃度を上げる と PEI 粒子のコントラストは良くなったが、PEI の組 織障害性¹⁰¹¹¹により網膜内境界膜に亀裂が生じた。浸 漬時間は30分が最適であり、それより短ければ透明層 まで達せず、逆に30分以上浸漬すると網膜内境界膜の 透明層の開大とミュラー細胞膜の陥凹が生じた。使用 する緩衝液はカコジル酸緩衝液が良く、白濁沈澱す るⁿため燐酸緩衝液は不向きである。

また,腎蔵研究者達は,GA 溶液による前固定により PEI 粒子が細分化されて腎基質膜への付着が悪くなっ たり,上皮細胞表面のASも瀰漫性に連続して分布す る,などの変化を来すため省略することが多い¹⁰¹¹⁾.し かし,網膜内境界膜では硝子体線維から分離させ,PEI 粒子の網膜内境界膜への付着を良くするために, Schurer らⁿと同様,GA 溶液による前固定を行なうべ きである.

では、網膜内境界膜の AS の他の役割は何であろう か. 組織細胞化学を用いて, 網膜色素上皮細胞 膜16)17)19), Bruch 膜9)16)17)19), 脈絡膜毛細血管内皮細胞 膜16)~19), 網膜毛細血管内皮細胞膜15)19)(管腔側)のAS が現在までに証明されている. 脈絡膜毛細血管の有窓 の直径よりも分子径が小さくても, 陰性荷電を有する 物質は通過しにくいことを Pino ら22)が荷電状態の異 なるヘム蛋白を, 上野¹⁹⁾が horse radish peroxidase を トレーサーに使った実験で明かにした. 同様, 網膜内 境界膜と硝子体線維の AS も荷電関門として網膜硝子 体間の物質移動の関門を果たしていると考えられる. しかし太田23)は、腎糸球体の濾過について荷電関門の みで説明するのは困難であり、 電気的斥力は容積関門 の存在する狭い空間内においてのみ有効に作用するの であることを指摘しているが、同じことが網膜内境界 膜についてもいえるであろう.

著者は前報¹⁾で眼球の部位別に篩の分布状態を検討 し、硝子体と網膜の接着がゆるく、篩が豊富な後極部 が網膜硝子体間の物質移動の主たる場であることを考 察した.物質移動が盛んな部位ほど関門も発達してい る、と考えることは理に適っている.同じ後極部でも 視放部と髄翼部では構造的にも機能的にも異なってい ると考えられるが、今回の実験結果では PEI 粒子の分 布状態はほぼ同様であった.一方、網膜周辺部の透明 層の AS は網膜後極部と比べ疎でかつ不均一であるこ とからも,網膜硝子体間の関門は網膜後極部が主であ ると推察できた.

PEIによる浸漬法は手技が簡単であり, 網膜内境界 膜の AS を正確にかつ短時間に観察する上で非常に有 効な方法である.また, 網膜硝子体間の病変を実験的 に作成し, 網膜内境界膜の AS の変化をこの方法で観 ることは興味深い.

稿を終えるにあたり,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,直接御指導下さった松岡 徹講師,腎臓の基底膜 についてお教え下さった本学第三内科槇野博史講師に御礼 申し上げます.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.本論文の要旨は第56 回日本中部眼科学会にて報告した.

文 献

- 西原浩美: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.日眼会誌 93:429-438,1989.
- Tolentino FI, Schepens CL, Freeman HM: Review of Physiology and Biochemistry. Vitreoretinal Disorders. Philadelphia, WB Saunders Co, 25-44, 1976.
- Peters T Jr: Serum albumin, In Putnam EW (ed): The Plasma Protein. vol 1. New York, Academic Press, 133-181, 1975.
- 4) 倉光成紀,浜口浩三:タンパク質定数表.日本生化 学会編,生化学データブックI.東京,東京化学同 人,91-135,1979.
- Raviola G: The structural basis of the bloodocular barriers. Exp Eye Res: 27-63, 1977.
- Schurer JW, Hoedemaeker J, Molenaar I: Polyethyleneimine as tracer particle for (immuno) electron microscopy. J Histochem Cytochem 25: 384-387, 1977.
- 7) Schurer JW, Kalicharan D, Hoedemaeker J, et al: The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and in collagen fibrils. J Histochem Cytochem 26: 688-689, 1978.
- 8)長久保国治:化学大事典.東京,共立出版,742, 1984.
- Essner E, Pino RM: Distribution of anionic sites in Bruch's membrane of the rabbit eye. Europ J Cell Biol 27: 251-255, 1982.
- 川上浩一郎,岡田 要:各種の糸球体腎炎における glomerular anionic sites の電顕的検討.日腎誌

27:1385-1395, 1985.

- 11) 相原吉雄: ラット Aminoucleoside 腎炎の GBM 陰性荷電粒子に対する各種薬剤の影響について. 日腎誌 30:895-904,1988.
- 12) 片山 優:網膜硝子体境界面の超微細構造の研究.第1報.ディーブ・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.
- 13) 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. 2. 硝子体線維と線維間の 微細構造. 日眼会誌 92:1221-1229, 1988.
- 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) Ausprunk DH, Boudreau CL, Nelson DA: Proteoglycans in the microvasculature. I. Histochemical localization in microvessels of the rabbit eye. Am J Pathol 103: 353-366, 1981.
- 16) Pino RM, Essner E, Pino LC: Location and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. J Histochem Cytochem 30: 245-252, 1982

- 17) Caldwell RB, Slapnick SM, Mclaughlin BJ: Decreased anionic sites in Bruch's membrane of spontaneous and drug-induced diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1691–1697, 1986.
- 18) Pino RM: The cell surface of a restrictive fenestrated endothelium. Cell Tissue Res 243: 157-164, 1986.
- 上野聡樹:血液眼関門についての研究.機能と形態の接点-その研究法の開発-.日眼会誌 92: 1961-2014, 1988.
- 20) Kanwar YS, Farquhar MG: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1303 -1307, 1979.
- 21) Balazs 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) Pino RM, Essner E: Permeability of rat choriocapillaris to hemeproteins. Restriction of tracers by a fenestrated endothelium. J Histochem Cytochem 29: 281-290, 1981.
- 23)太田善介:基底膜分子篩の機能と構造、代謝 19: 1289-1299, 1982.