

# 猿毛様体筋の凍結切断およびエッチング像について

近藤 三博, 樺山 力, 西田 祥藏

愛知医科大学眼科学教室

## 要 約

毛様体筋および筋原線維の立体的微細構造を観察する目的でカニクイザル3頭3眼の毛様体筋を使用し、凍結切断およびエッチング像を観察した。その結果、隣接する筋細胞間の立体的構造が明かとなった。筋細胞質内には、多数の筋原線維が非常に複雑な形で見られ細胞質を満たしていた。筋原線維は細胞の長軸方向の一方向のみならず、斜め方向にも走行し、その所々で **dense body** を形成していた。また細胞膜直下や、核膜、ミトコンドリア、限界膜に直接付着していた。細胞膜直下では筋原線維は、10 nm フィラメントと共に **dense plaque** を形成していた。このことから筋原線維は筋細胞の形態の維持に重要な役割を果たし、更に 10 nm フィラメントと共に毛様体筋細胞の構築および機能の特性に重要な役割を果たしていることが示された。(日眼会誌 96:51-56, 1992)

キーワード：凍結切断法，ディープエッチ法，猿毛様体筋，筋原線維，10 nm フィラメント

## Freeze-Fracture and Deep Etch Replica of Monkey Ciliary Muscle

Mitsuhiro Kondo, Chikara Kabayama and Shozo Nishida

*Department of Ophthalmology, Aichi Medical University*

### Abstract

The author observed freeze fracture and deep etch replica of monkey ciliary muscle in order to study its fine three dimensional structure. A three dimensional structure of the ciliary muscle cell and the relationship between the adjoining cells were elucidated. A lot of myofilaments which were meshy in shape were observed in the cytoplasm of ciliary muscle cells, and adhered to just beneath the cell membrane, nucleus membrane and limiting membrane of mitochondria directly. The arrangement direction of myofilaments was either parallel or oblique to the longitudinal axis of the cell, and then myofilaments formed dense bodies together with 10 nm filaments in some places. Myofilaments and 10 nm filaments also formed dense plaques together just beneath the cell membrane. Myofilaments and 10 nm filaments suggested to concern the cytoskeleton and the functional characteristics of the ciliary muscle cell. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:51-56, 1992)

Key words: Freeze fracture, Deep etch replica, Monkey ciliary muscle, Myofilament, 10 nm filament

## I 緒 言

眼調節機構および眼房水動態において、重要な役割

を演じると考えられる毛様体筋は、光顕、電顕で様々な研究が既になされている。しかしながら、平滑筋である毛様体筋細胞内には、規則性を有しない多数の微

別刷請求先：480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又 21 愛知医科大学眼科学教室 近藤 三博

(平成3年3月9日受付，平成3年5月23日改訂受理)

Reprint requests to: Mitsuhiro Kondo, M.D. Department of Ophthalmology, Aichi Medical University.

21 Karimata, Ōaza Yazako, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi 480-11, Japan

(Received March 9, 1991 and accepted in revised form May 23, 1991)

細線維が存在するため、通常の超薄切片ではその立体的微細構造の詳細を明らかにすることは困難である。しかし、凍結切断法およびエッチング法を用いることにより、細胞膜 EF 面、細胞膜 PF 面の微細構造や細胞内フィラメント系さらには細胞骨格を解明するといった 3 次元構造の研究が可能となってきた<sup>1)~5)</sup>。

今回我々は、猿毛様体筋における筋原線維の立体的微細構造を明らかにする目的で本研究を行った。

## II 材料および方法

材料は、3 歳、6 歳および 13 歳のカニクイザル (*Cynomolgus monkey*) 3 頭 3 眼の毛様体筋を使用した。

方法は、ケタミン麻酔下に摘出した眼球を前後半部に 2 分割して、2.5% グルタルアルデヒドで前固定。その前半部を眼軸を中心に楔型に細切した後、毛様体を強膜岬で分離して更に 3×3×3 mm に細切し、組織片とした。40% グリセリン液に浸漬した組織片をシャーベット状の液体窒素で急速凍結し、凍結資料作成装置 (JFD-7000, 日本電子) の真空中 (-130°C, 2×10<sup>-6</sup> Torr 以下) で凍結切断した。その後切断面に白金炭素、炭素を回転蒸着した後、家庭用漂白剤 (次亜塩素酸ソーダ) で組織を消化しレプリカ膜を作成した。得られたレプリカ膜は透過電顕 (JEM-2000 EX, JEM-100 SX, 日本電子) で観察した。

一部の試料についてはディープ・エッチングを行うために、凍結切断の前処置として 3×3×3 mm に細切した組織片を、Tsukita ら<sup>6)</sup>の方法に従って細胞内液に近いイオン組成をもつ溶液とともに 1% TritonX 100 で膜処理、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、50% メタノールに浸漬した。その後は液体窒素で急速凍結、凍結切断した後、凍結資料作成装置の中で -107°C から 6 分間エッチングし、切断面に白金炭素、炭素を回転蒸着してレプリカ膜を回収し、透過電顕で観察した。

## III 結 果

### 1. 毛様体筋の凍結切断像

毛様体筋の断面には、大小多数の筋細胞の複雑な割断面が見られるが、筋細胞膜表面は平滑で、筋細胞膜 PF 面および EF 面には貪食小胞と関連した小孔を認めた。また筋細胞質内には多数のミトコンドリアの集族や小胞体、封入体、また細胞膜近くには貪食小胞が認められ、隣接筋細胞間は密接しているが、その間隙

に膠原線維や神経線維が認められた。しかし、筋細胞内の微細線維の構造はエッチングなしには不明瞭であった (図 1)。

### 2. Triton 処理後ディープ・エッチングした毛様体筋細胞

隣接筋細胞と入り組んだ複雑な形態を示す筋細胞内には多数の筋原線維が複雑に絡み合うように存在し、細胞質を満たしていた。また、核には核膜孔を認め、筋原線維が核膜に直接附着している状態が認められた (図 2)。

筋細胞の横断面では、核の周囲には多数のミトコンドリアを認めた。筋原線維は一部で集合し、細胞膜直下に附着し、dense plaque を形成しているのが見られた (図 3)。

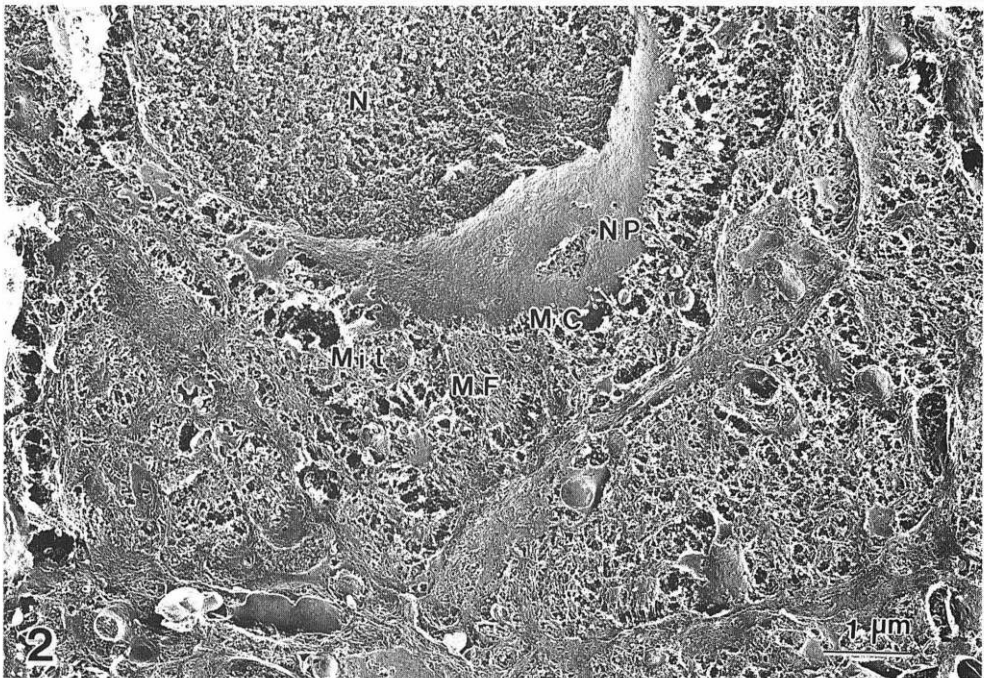
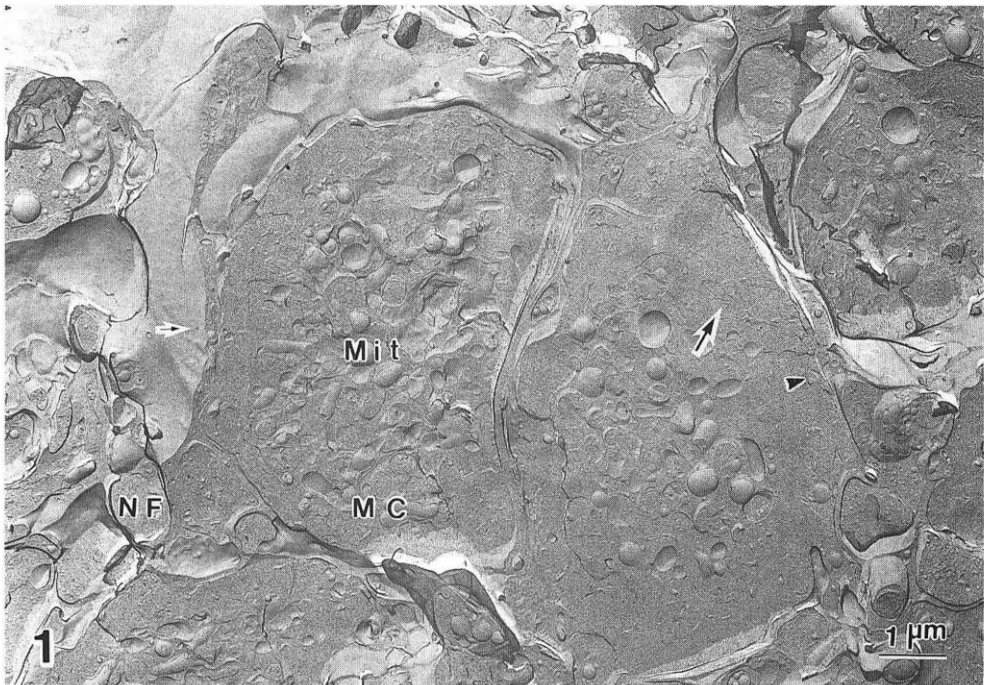
筋細胞の縦断面では、集合したミトコンドリアと筋原線維を認め、筋原線維はグループを作るような形で胞体を走行し、グループ間で互いに移行し、一方向のみならず斜め方向にも伸び、互いに密に絡み合い、ところどころで集合して dense body を形成していた (図 4)。

筋原線維が細胞膜に附着して形成される dense plaque を、Triton 処理しディープ・エッチング後観察すると、筋原線維は 10 nm フィラメントと共に、扇状に開いて細胞膜面に附着し、dense plaque を形成していた (図 5)。

## IV 考 按

毛様体筋は、眼調節機構および眼房水動態において重要な役割を演じていると考えられている。毛様体筋は平滑筋細胞で構成され切片上では、輪状、放射状、経線線維に分けられているが、Rohen ら<sup>8)</sup>、Lütjen<sup>9)</sup>によるとそれは強膜岬の起始部を離れる時の Y 字型の角度の相違によるもので、基本的には単一の筋組織と考えられている。また各線維の役割については不明瞭な点が多いが、輪状線維が調節に重要な役割を果たすことは多くの研究者により認められつつある。しかし、経線、放射状線維についてはその機能は殆ど不明であったが、最近猿眼についての実験から調節緊張時、毛様体筋が前内方へ変形し、輪状線維の割合が調節安静時よりも増加することから、経線線維は調節緊張時の毛様体筋の前方変形に、放射状線維は調節緊張時に輪状線維に移行してその機能の強化に関与することが示唆されている<sup>10)11)</sup>。

毛様体筋の機能を解明する上でその配列、隣接細胞



- 図1 凍結切断像，筋細胞（MC）と筋細胞間に神経線維（NF）を認める，筋細胞胞体内には，多数のミトコンドリア（Mit），小胞体（矢印），貪食小胞（矢じり）が数多く認められ，細胞膜には貪食細胞と関連した小孔（小矢印）が見られる，3歳， $\times 8,000$ 。
- 図2 Triton 処理したディープ・エッチング像，切断された筋細胞（MC）内にはディープ・エッチングにより核（N），核膜の核膜孔（NP），ミトコンドリア（Mit），筋原線維（MF）が3次的に認められる，3歳， $\times 13,000$ 。

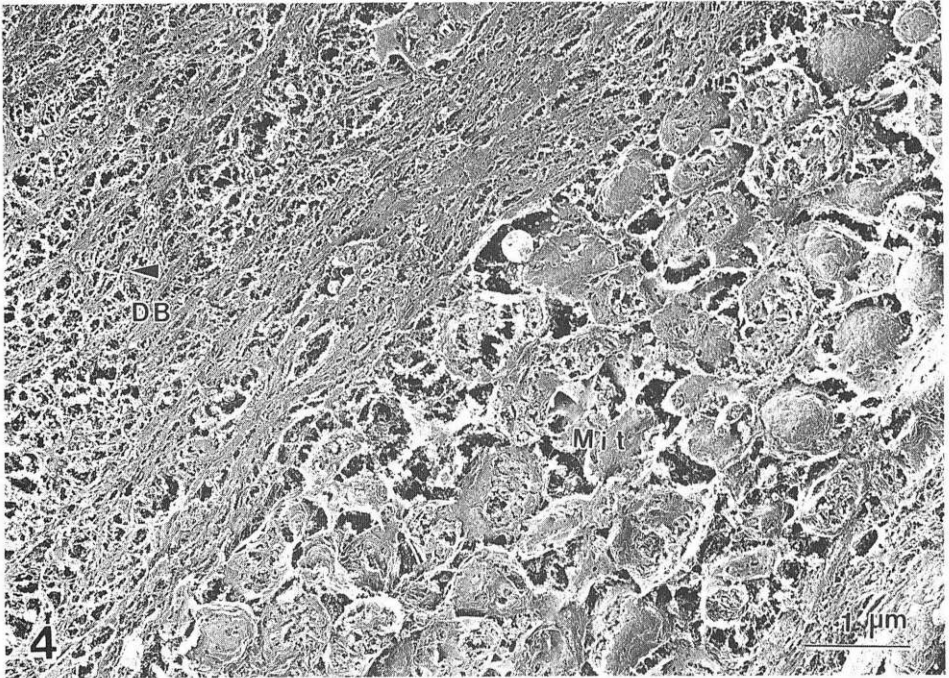
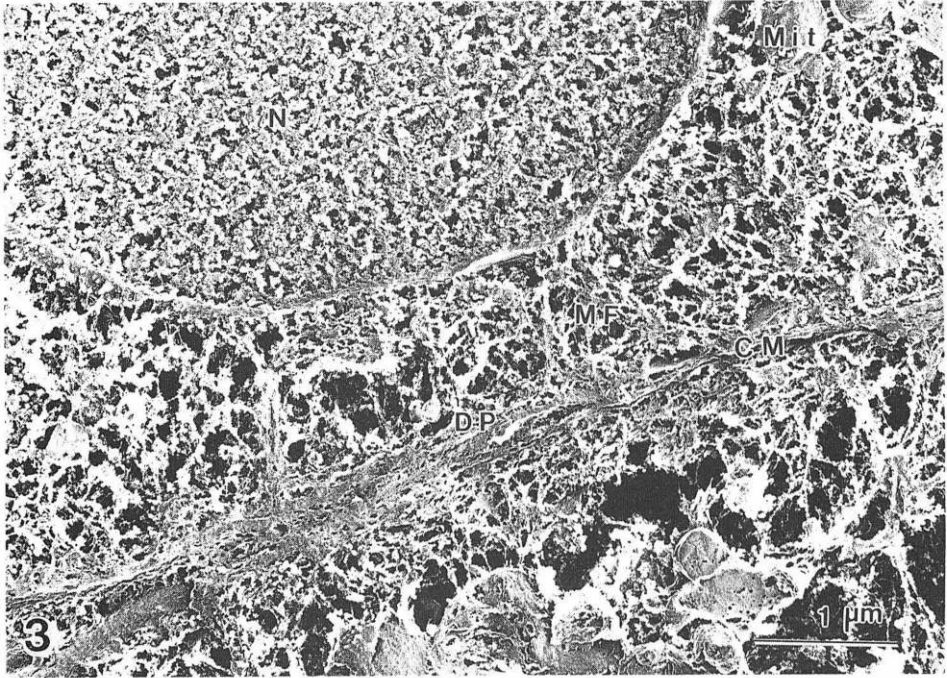


図3 Triton 処理した筋細胞横断面のディープ・エッチング像。切断された核 (N)、ミトコンドリア (Mit)、筋原線維 (MF)、細胞膜 (CM) を認める。細胞膜直下には、dense plaque (DP) を認める。6歳、 $\times 21,000$ 。

図4 Triton 処理した筋細胞縦断面のディープ・エッチング像。集合したミトコンドリア (Mit) と細胞の長軸方向に走行する筋原線維が見られる。筋原線維のところどころに dense body (DB) や 10 nm フィラメント (矢じり) を認める。6歳、 $\times 16,000$ 。

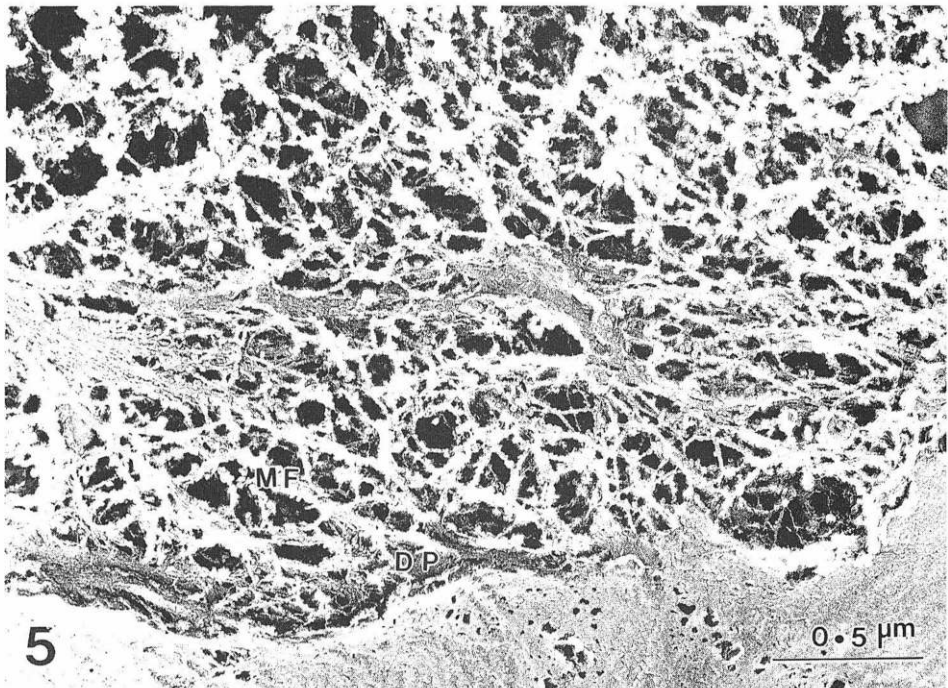


図5 筋原線維と細胞膜の状態。筋原線維(MF)が10 nm フィラメント(矢じり)と共に扇状に細胞膜に付着し、dense plaque (DP)を形成しているのが見られる。6歳、 $\times 42,000$ 。

間の関係と共に形態的特徴を十分に明らかにし、理解することが重要である。そして細胞の形態的特徴としては、細胞内の微細構造、とくに細胞骨格を解明する事は重要なことであると考え、毛様体筋は、平滑筋で細胞質内は数多くの筋原線維をはじめとする微細な線維で占められていて、超薄切片による透過電顕の観察では、その観察にはどうしても限界がある。

毛様体筋については凍結切断およびエッチング法により、筋細胞の立体的微細構造や細胞間結合装置については、これまでに報告が見られるが筋原線維をディープ・エッチング法で観察した報告は殆ど見られない。

今回我々は、凍結切断およびディープ・エッチング法を用いて細胞内微細線維について立体的微細構造について観察を試みた。

毛様体筋の細胞質内は、多数の微細線維が存在し細胞膜面では筋原線維が10 nm フィラメントと思われる微細線維と共に扇状に直接付着することでdense plaqueを形成し、一方その筋原線維は直接核膜やミトコンドリアの限界膜とも付着しているのが見られた。

Dense plaqueは月田ら<sup>7)</sup>によると、アクチンとミオ

シンの相互作用から発生する収縮力を細胞膜に伝えるものと説明し、dense plaqueが線維構造の付着部位と成っていると報告している。今回の我々の結果からは、dense plaqueが線維構造の付着部位ということは十分に考えられたが、機能面の収縮力に関しては明らかになっていなかった。

筋原線維の走行に関しては、細胞の長軸方向に沿ってはいるが規則的な配列を示さず、それらはグループを作るような形で走行し、隣接グループ間で移行すると同時に、所々で互いに交叉し、集合してdense bodyを形成していた。その周囲には表面が滑らかな10 nm フィラメントが筋原線維を支えるように走行し、両微細線維に特別な親和性の存在が示唆された。

Dense bodyと線維構造の位置関係は、dense bodyは10 nm フィラメントの付着部位との見解<sup>12)</sup>もあるが、10 nm フィラメントを束ねることによって主に細胞骨格としての機能を営む<sup>13)</sup>と考えられてきており、更に月田ら<sup>7)</sup>によると横紋筋内におけるZ帯との相似性を示唆している。しかし今回の観察では、月田ら<sup>6)</sup>が平滑筋について報告しているような細胞の収縮機構にどの様に関係しているかと言うところまでは、明ら

かにすることは出来なかった。

これらのことより毛様体筋においても、他の平滑筋と同様に細胞内に多く見られる微細線維は細胞の機能と共に、細胞の形態の維持に大きく関わり合っていることが示唆された。しかし、それらの微細線維の機能的な点について今回は明らかにすることは出来なかった。

今後は、毛様体筋細胞内の、個々の微細線維の形態的特徴を更に明確にすると同時に収縮、弛緩時の細胞内微細線維の変化や、それが加齢に伴いどの様に変化するかについて検討することで、毛様体筋細胞の機能を形態的特徴から考察し、その加齢の影響について検討が可能と考えられる。

本研究は文部省科学研究費（一般研究B課題番号63480399）の補助によって行われたもので、記して感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Heuser JE, Kirschner MW: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell Biol* 86: 212-234, 1980.
- 2) Tsukita S, Usukura J, Tsukita S, et al: The cytoskeleton in myelinated axons: A freeze-etch replica study. *Neuroscience* 7: 2135-2147, 1982.
- 3) 廣川信隆: 急速凍結置換法およびディーブエッチ法. *細胞* 16: 518-527, 1984.
- 4) 柴田洋三郎: 急速凍結レプリカ法. *細胞* 16: 528-534, 1984.
- 5) 磯部雄二, 嶋田 裕: 培養細胞の凍結切断法. *細胞* 16: 535-540, 1984.
- 6) Tsukita S, Tsukita S, Ishikawa H: Association of actin and 10 nm Filaments with the dense body in smooth muscle cells of the chicken gizzard. *Cell Tissue Res* 229: 233-242, 1983.
- 7) 月田早智子, 月田承一郎: 平滑筋細胞. *代謝* 19: i-ii, 1982.
- 8) Rohen JW, Lütjen E, Bárány EH: The relation between the ciliary muscle and the trabecular meshwork and its importance for the effect of miotics on aqueous outflow resistance A study in two contrasting monkey species macaca irus and cereopithecus aethiops. *Albrecht v Graefes Arch klin exp Ophthalmol* 172: 23-47, 1967.
- 9) Lütjen E: Histometrische Untersuchungen über den Ciliarmuskel der Primäten. *Albrecht v Graefes Arch klin exp Ophthalmol* 171: 121-133, 1966.
- 10) 西田祥藏: 眼の老化. 眼組織の老化と調節. *日眼会誌* 94: 93-119, 1990.
- 11) 勝 安彦: 加齢に伴うサル眼毛様体の調節反応に関する形態学的研究. *愛知医大誌* 8: 57-68, 1990.
- 12) Small JV, Sobieszek A: The contractile apparatus of smooth muscle. *Int Rev Cytol* 64: 241-306, 1980.
- 13) Cooke P: Filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. *J Cell Biol* 68: 539-556, 1976.