

# Deep-etching 法によるモルモット視神経乳頭部微細構造の観察

古田 仁志<sup>1)</sup>, 塚原 重雄<sup>1)</sup>, James D. Lindsey<sup>2)</sup>, Robert N. Weinreb<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>山梨医科大学眼科学教室, <sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, University of California, San Diego

## 要 約

モルモット視神経乳頭部を quick-freeze, deep-etch, rotary-shadow 法にて三次元的に観察した。篩状板を通る視神経軸索は、20~25 nm の microtubule (MT), 10~12 nm の neurofilament (NF), さらにこれから突出している無数の cross-linker から成り立っていた。この cross-linker は、近接する NF 同志, MT 同志, NF と MT を結合していたが、軸索内の mitochondria, axoplasmic reticulum, tubulo-vesicular structure などの小器官も cross-linker によって MT や MF と結合していた。神経膠細胞は 10~12 nm の、突起の少ない、無数の中間系フィラメントを有し、その豊富な突起により篩状板膠原線維を神経軸索から隔絶していた。篩状板膠原線維は主に、特徴的な縞模様と突起を有する 30~60 nm の間質コラーゲンと、5~10 nm の網目状線維から成り立っていることが分かった。篩状板膠原線維を取り巻く基底膜構造も立体的に観察された。(日眼会誌 97: 370-377, 1993)

キーワード: 軸索細胞内骨格, グリア細胞, 篩状板, 急速凍結, ディープエッチング法

## Ultrastructural Study of Guinea Pig Optic Nerve Head Using the Deep-etch Method

Masashi Furuta<sup>1)</sup>, Shigeo Tsukahara<sup>1)</sup>, James D. Lindsey<sup>2)</sup> and Robert N. Weinreb<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical College

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, University of California, San Diego

## Abstract

Normal guinea pig optic nerve heads were examined using the quick-freeze, deep-etch, rotary-shadow technique. This method visualized the three-dimensional organization of the cytoskeleton. The axon cytoplasm was composed of 20~25 nm in diameter microtubules (MTs) and 10~12 nm in diameter neurofilaments (NFs) with numerous cross-linkers. These cross-linkers spanned between adjacent NFs, adjacent MTs, and between NFs and MTs. The membranous organelles such as mitochondria, axoplasmic reticulum, or tubulo-vesicular structures also were attached to the NFs and MTs with the cross-linkers. Abundant intermediate filaments of 10~12 nm diameter within glial cell components segregated axon bundles from laminar collagen fibers. The laminar fibers contained interstitial collagens that were 30~60 nm in diameter with characteristic striae and sidearms, and 5~10 nm wide mesh-like structures connecting the collagen fibril bundles to a surrounding basal lamina. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 370-377, 1993)

Key words: Axon cytoskeleton, Glial cell, Lamina cribrosa, Quick-freeze, Deep-etch

別刷請求先: 409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110 山梨医科大学眼科学教室 古田 仁志  
(平成 4 年 6 月 22 日受付, 平成 4 年 9 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Masashi Furuta, M.D. Department Ophthalmology, Yamanashi Medical College,  
1110 Shimokato, Tamaho-machi, Nakakoma-gun, Yamanashi 409-38, Japan

(Received June 22, 1992 and accepted in revised form September 7, 1992)

## I 緒言

緑内障の視神経障害は、眼圧上昇に伴うだけでなく、正常眼圧でも視神経萎縮が進行する症例（低眼圧緑内障）も見られ、その要因は複雑多岐に亘っていると考えられるが、これらの緑内障のメカニズムを解明するために篩状板は益々重要な要素になってきている。眼圧上昇に伴う篩状板での高速軸索輸送の障害は実験的に証明され<sup>1)2)</sup>、組織学的にも軸索内への小器官の蓄積が認められている<sup>3)</sup>。しかし、この高速軸索輸送障害の具体的な機序については未だ分かっていない。篩状板の構築に関しても、最近になり、免疫組織化学を用いた研究が盛んで各種コラーゲンを始めとした篩状板の構成成分の解析がされてきているが<sup>4)~7)</sup>、これらが分子レベルでどのように関わりあい、構成しているのかまだ十分な研究がされていないのが現状である。

一方、急速凍結、ディープエッチング、回転蒸着（QF-DE-RS）法は従来の凍結割断法より細胞内外の微細構造の解析力に優れ<sup>8)</sup>、神経軸索<sup>9)~12)</sup>、神経膠（グリア）細胞内の構造<sup>13)</sup>、細胞外マトリックスの解析<sup>14)</sup>に威力を発揮している。特に神経軸索の微細構造と機能に関する研究においては、microtubule-associated protein (MAP) が微小細管 (microtubule: MT) の架橋

(cross-linker) を構成している成分であることを証明したり<sup>15)16)</sup>、順行性高速軸索輸送の担体蛋白であることが分かった kinesin の軸索内での同定に使われてきた<sup>17)</sup>。眼組織では家兎角膜膠原線維の微細構造研究に用いられてきたが<sup>18)19)</sup>、細胞内外の微細構造を分子レベルにまで解像でき、立体観察も可能で、免疫組織化学的手法も応用できるこの QF-DE-RS 法を使って、今回モルモットの視神経乳頭篩状板の神経軸索、グリア細胞、並びに細胞外マトリックスを解析したので報告する。

## II 実験方法

眼底検査で視神経、網膜に異常のないことを確認したモルモット 3 匹 6 眼を用いた。クロロホルムで窒息死させ、ただちに眼球を摘出し、60 mM PIPES (piperazine-N,N'-bis [2-ethanesulfonic acid] ; 1,4-piperazinediethanesulfonic acid), 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> の入った 2% グルタルアルデヒド (37℃) 液で浸漬固定しながら視神経乳頭部を切り出し、更に縦断割にした。縦断割された視神経乳頭部試料は同液で 40~60 分固定後、0.02% サポニン液に 10 分浸し、蒸留水で 2 回洗浄し凍

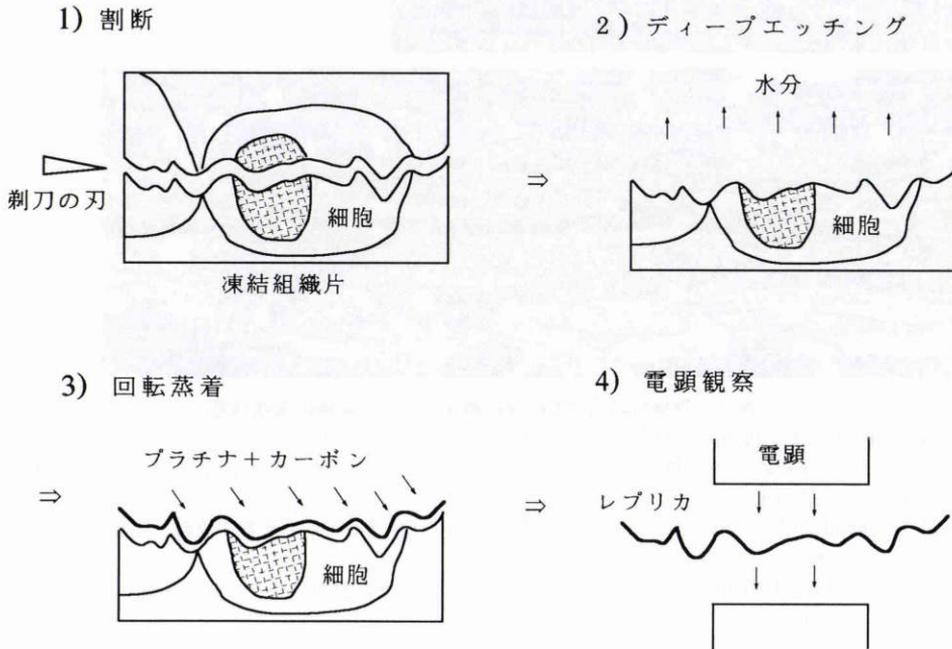


図1 急速凍結、ディープエッチング、回転蒸着法の実験手順。

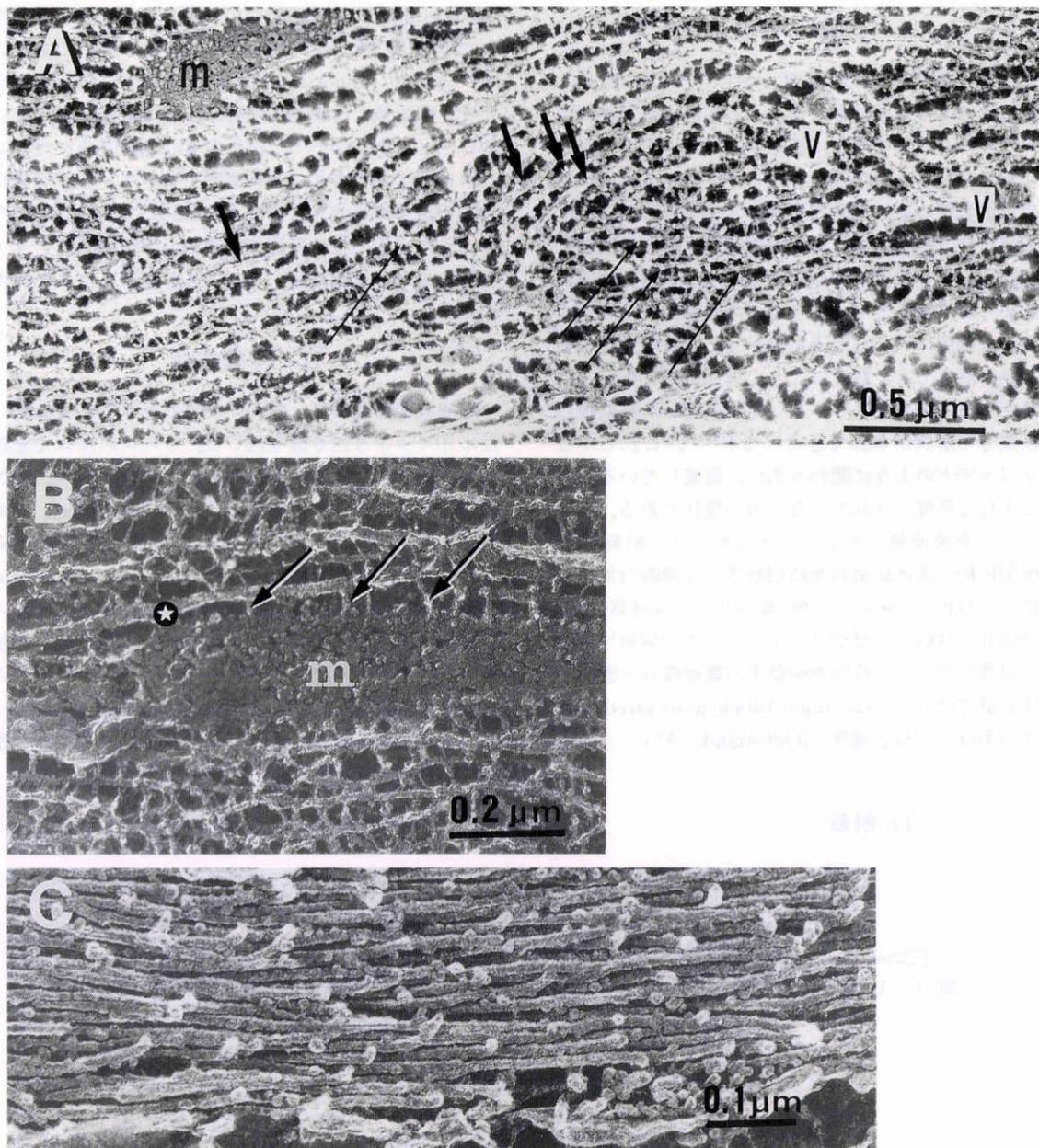


図2 視神経篩状板部の神経軸索とグリア細胞の微細構造。

A: 神経軸索内は10 nmの神経フィラメント(細長い矢印)と20~25 nmの微小細管(太い矢印), 更にこれらを結ぶ細かな架橋からなり, これらの間にミトコンドリア(m), 小胞状器管(v)が散見される。(×41,000)

B: 神経軸索内のミトコンドリア(m)には隣の微小血管(星印)から多数の突起(矢印)が出ている。(×80,000)

C: グリア細胞は10 nmの太さの中間系フィラメントが密に配列してその細胞骨格を形成している。(×12,000)

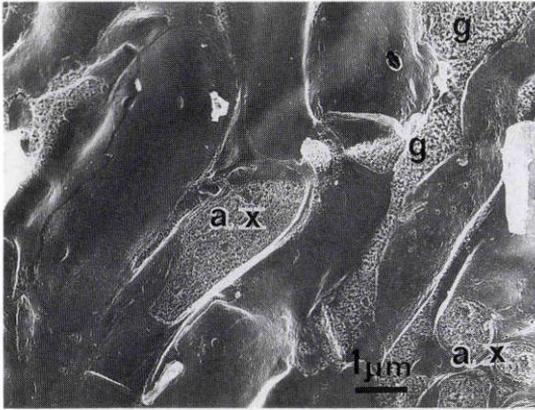


図3 篩状板後部 (retro-lamina).

篩状板後部では神経軸索(ax)は有髄であり、間隙はグリア細胞(g)で占められている。(×8,000)

結した。試料は急速凍結装置 KF 80 (Reichert Jung)にて $-180^{\circ}\text{C}$ で急速凍結され、凍結割断装置(Balzers 400 D)内に素早く搬入された。その後の実験手順を図1に示したが、まず凍結割断装置内の圧が $4 \times 10^{-7}$  Torr 以下において、凍結試料を割断し(図1の1)、 $-95^{\circ}\text{C}$ で10分間ディープエッチングを行う事により割断面上の水分を昇華させ、細胞内外のマトリックス微細構造を浮き上がらせた(図1の2)。次に、エッチングを終了させた試料を回転させながら、その表面に約3 nmの厚さでプラチナを蒸着させ、試料のレプリカを取り、更にカーボン蒸着させてレプリカ膜を作成した(図1の3)。2%コロジオンでレプリカを更に補強し、乾燥させ、次亜塩素酸中に入れ組織成分を完全に溶出させ、蒸留水で洗浄し、フォルンパー膜のグリッドに載せた。レプリカ上のコロジオンを酢酸イソアミルで溶解した後、100 kVの透過型電子顕微鏡(JEOL 100 CX)で観察した(図1の4)。

### III 結 果

視神経軸索の微細構造は図2(AとB)の様に、軸索に平行に並ぶ20~25 nmのMTと10~12 nmの神経フィラメント(neurofilament: NF)が骨格を形成していた。MTもNFも多数の細かい架橋(cross-linker)を有し、これがMTとMTを、NFとNFを、MTとNFを、それぞれ結合していた。また軸索内小器官であるミトコンドリア、軸索小胞体(axoplasmic reticulum)、小胞状器官(vesicular organelle)も軸索内に点在し、これらもMTやNFと架橋で結合してい

た。これらの架橋の長さは8~60 nmと様々であるが、NF間の、またNFとMTとの間の架橋は20 nm以上と比較的長く、一方MT間、MTと軸索内小器官、NFと軸索内小器官との間の架橋は5~20 nmと短い結合になっていた。グリア細胞の骨格の特徴は図2Cのような10~12 nmの細い、小枝様の結合突起をほとんど持たない中間系フィラメントであり、これがグリア細胞内および細胞突起内に密に配列して存在していた。

篩状板より中枢(retro-lamina)部分では(図3)、神経軸索はミエリンで包裹され、その周りをグリア細胞の突起が取り巻いていた。篩状板部では(図4A)神経軸索は厚さ20 nmの軸索鞘に包裹され、篩状板膠原線維からはグリア細胞を介して隔てられていた。篩状板を構成する間質コラーゲンは直径30~60 nmで、周囲はグリア細胞で完全に取り巻かれていた。太い篩状板膠原線維の間には5~10 nm前後の細い網状構造物が見られ、これは基底膜(basement membrane)につながっていた。この基底膜は篩状板膠原線維とこれを取り巻くグリア細胞との境界を成し、互いを隔てていた(図4B)。篩状板部の間質コラーゲンを、エッチングを深くして拡大してみると(図4C)、特徴的な周期性のある縞構造を有する像が認められた。

篩状板前部(pre-lamina)では(図5)、膠原線維は見当たらず、無髄神経軸索はグリア細胞の突起によって幾つかの束に分けられていた。グリア細胞の突起は神経軸索の長軸方向に垂直に走っているものが多かった。

### IV 考 按

従来の電顕超薄切片標本では、神経軸索内のMTやNFは捕らえることができるが、それらの細かい架橋の形態までは捕えることはできなかった。QF-DE-RS法が用いられるようになってから、蛙の脊髄神経<sup>9)</sup>、亀の視神経<sup>10)</sup>、ラットの座骨神経<sup>11)</sup>、兎視神経<sup>12)</sup>などをつかって神経軸索内のこれらの微細構造が明瞭に同定される様になり、軸索輸送の機能に関する研究にも大きく寄与することになった。つまり、図2にも示した様なMTやNF、これらに関わる幾種類もの架橋の分析が行われてきた。たとえば、NFどうしを結合している20~30 nmの架橋は分子量195,000の蛋白である<sup>12)</sup>、MTどうしをつないでいる架橋には、分子量約350,000のmicrotubule associated protein 1A(MAP 1A)なる比較的長いものと、分子量55,000から62,000の“tau”蛋白の短いものがあり、これらが

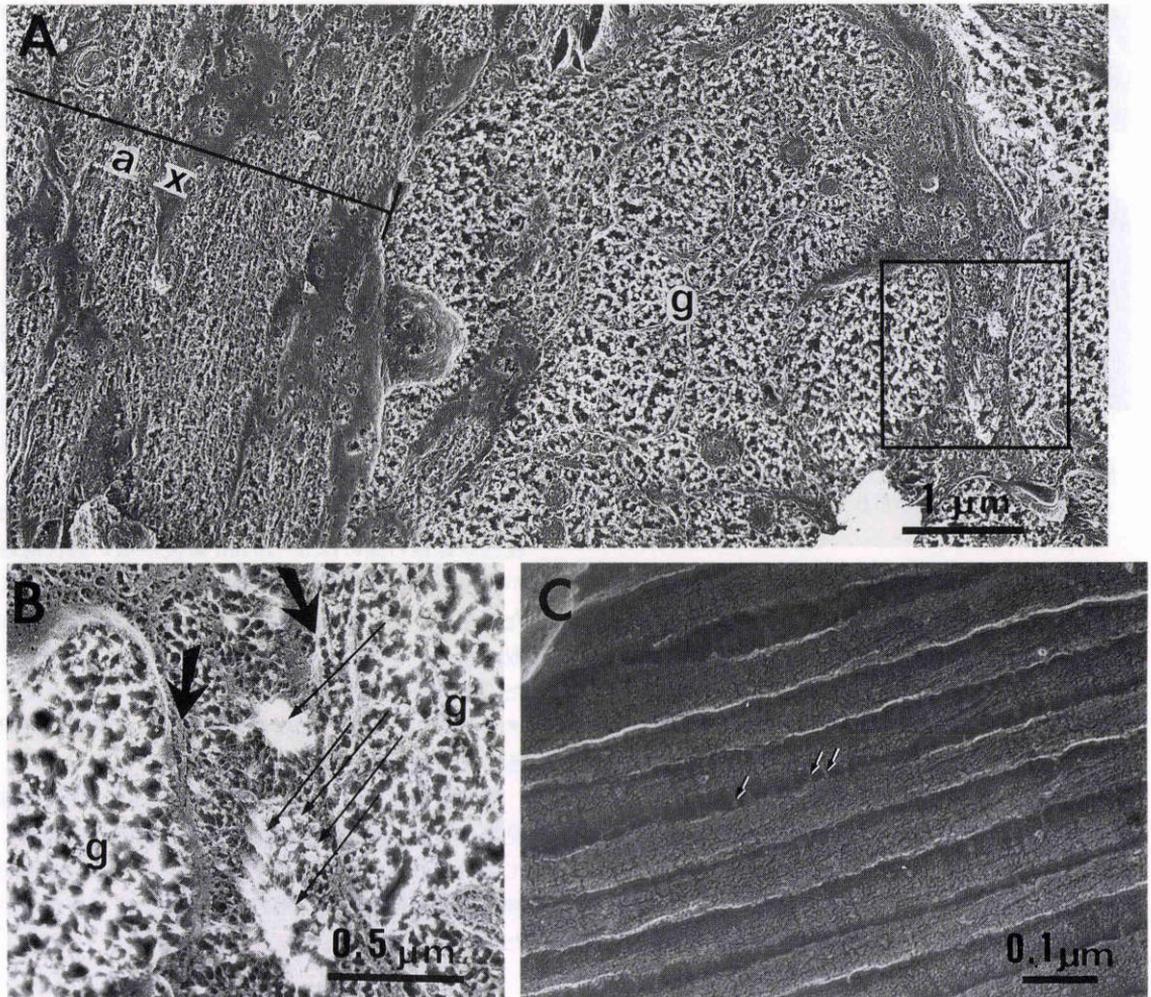


図4 視神経篩状板部 (lamina).

A: 篩状板部では軸索 (ax) は無髄となり束をなして縦走している。篩状板膠原線維 (四角い枠内) は軸索と垂直に走り、その間隙はグリア細胞 (g) によって隔てられている。 (×15,000)

B: A 図の四角い枠の拡大写真。篩状板膠原線維は 30~60 nm の太い間質コラーゲン (細い矢印) とそれを取り巻く網目状の構造物からなっている。篩状板膠原線維を取り囲むグリア細胞 (g) とは基底膜 (太い矢印) により隔絶されている。 (×34,000)

C: 篩状板膠原線維内の間質コラーゲンの拡大像。間質コラーゲンに特徴的な縦縞模様が認められる。コラーゲンどうしも細かな突起 (矢印) により結合し合っている。 (×100,000)

MT の高速軸索輸送の導管として機能する支えになつて<sup>15)16)</sup>ことが分かつてきた。また、MT とミトコンドリア、小胞体などの軸索内小器官との間の架橋のあるものは順行性高速軸索輸送の担体である kinesin である事も報告されている<sup>17)</sup>。今回の実験においても、各々の架橋の同定こそできなかったが、NF に関わる架橋、MT に関わる架橋の所見は捕えることができ

た。これらの架橋の、モルモットの篩状板前後での変化についてはすでに報告したが<sup>20)</sup>、緑内障での高速軸索輸送障害を分子レベルで解析するには、これらの架橋に特に注目する必要があると思われる。というのは、これらの架橋が、あるところでは MT や NF によって形成されている、軸索内小器官の高速輸送のためのレールを構成または支えていると考えられている



図5 篩板前部 (pre-lamina).

篩板前部では膠原線維はみられず、無髄神経軸索が層をなして走り、層間をグリア細胞の突起(g)が占有している。(×13,600)

し<sup>16)</sup>、またある架橋は、例えば kinesin の様に高速軸索輸送の担体であるからである<sup>20)</sup>。実験的緑内障で篩状板部分で軸索輸送が傷害され、軸索内小器官が蓄積されることが分かっているが、この現象は、機械的な障害によるか虚血性変化で生じるかは別として、軸索の主成分である MT や NF だけでなく、軸索輸送にかかわっている架橋にも影響が及んで引き起こされている事も考えられる。マウスの末梢神経結紮により、軸索の逆行性の担体蛋白のひとつである dynein (MAP 1 C) が結紮部位に蓄積する、という実験<sup>21)</sup>は上記を示唆するものである。

モルモット視神経篩状板部のグリア細胞も、QF-DE-RS 法により、特徴的な中間系フィラメントが明瞭に描出され、軸索線維や篩状板膠原線維との関わりも把握できた。グリア細胞突起内のフィラメントは直線的で相互の架橋が少なく、密に分布しているが、細胞内小器官は乏しく、神経軸索線維を幾重にも取り巻くように、軸索線維と篩状板膠原線維の間に介在し、組織構造的にも軸索線維を保護しているようである。特に篩状板部ではグリア細胞とその突起は豊富で、軸索線維の方向と垂直に分布しているのが良く分かった。グリア細胞と神経軸索の境界は互いの細胞膜であり、一方膠原線維とは必ず基底膜を境にして接していた。この基底膜からグリア細胞の細胞膜には、タイプIVコラーゲンやラミニン、ファイブネクチンから成ると

思われる<sup>7)22)</sup>細かな架橋が認められ、また、この基底膜から篩状板膠原線維に向かって多数の架橋が認められた。このように篩状板の基底膜はグリア細胞と篩状板膠原線維との間の密接な結合に関わっていることが分かった。

篩状板の膠原線維は直径 30~60 nm の太い間質コラーゲンから成り、これらは篩状板部分における膠原線維の免疫組織化学により、I 型とIII型のコラーゲンであることが分かっている<sup>6)7)22)</sup>。今回の実験では、エッチング時間が 10 分と比較的短時間であったため、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの描出には不十分であったが、これら間質コラーゲンの同定は容易であるばかりでなく、更にこの間質コラーゲンどうしを結んでいる細かい架橋も観察できた。他の組織でこれらの間質コラーゲン間の架橋が V 型やVI型、更にプロテオグリカンによって構成されていることが分かっている事と<sup>23)~25)</sup>、篩状板でもこれらの成分が免疫組織化学的に証明された事より、今回見られた架橋もこれらの成分から成ると考えられた。また、この間質コラーゲンを含む篩状板には、細かい線維状のマトリックスが沢山認められ、基底膜に向かって突起を出しこれと結合しているのが観察された。これらの成分の中にも V 型、VI型やプロテオグリカンが含まれていると思われるが、詳しい同定はまだされていない。QF-DE-RS 法に免疫組織化学的手法を合わせた immunodecoration technique<sup>12)17)</sup>を応用すればこれらの成分の同定も可能になり、これからの課題である。

今回ラットや家兎より発達した篩状板を持つモルモット<sup>26)</sup>を材料としたが、以上の様に、これまで観察することができなかった視神経篩状板部の軸索内、グリア細胞内、篩状板細胞外マトリックスの微細構造が QF-DE-RS 法により詳細に解明されることが分かった。これから更に、QF-DE-RS 法に免疫組織化学的手法を組み合わせて、眼圧上昇に伴うこれらの変化を検討する事により、緑内障の視神経障害のメカニズム解明に貢献できると思われる。

本論文の一部は第96回日本眼科学会総会において発表した。また本研究は文部省科学研究費一般研究 01570973 の補助を受けた。

#### 文 献

- 1) Anderson DR, Hendrickson A: Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. Invest Ophthalmol

- 13: 771—783, 1974.
- 2) **Gaasterland D, Tanishima T, Kuwabara T**: Axoplasmic flow during chronic experimental glaucoma. I. Light and electron microscopic studies of the monkey optic nervehead during development of glaucomatous cupping. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 838—846, 1978.
  - 3) **Radius RL, Anderson DR**: Rapid axonal transport in primate optic nerve. Distribution of pressure-induced interruption. *Arch Ophthalmol* 99: 650—654, 1981.
  - 4) **Hernandez MR, Igoe F, Neufeld AH**: Extracellular matrix of the human optic nerve head. *Am J Ophthalmol* 102: 139—148, 1986.
  - 5) **Hernandez MR, Luo XX, Igoe F, Neufeld AH**: Extracellular matrix of the human lamina cribrosa; a pressure-sensitive tissue. *Am J Ophthalmol* 104: 567—576, 1987.
  - 6) **Morrison JC, Jerdan JA, L'Hernault NL, Quigley HA**: The extracellular matrix composition of the monkey optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1141—1150, 1988.
  - 7) **Goldbaum MH, Jeng S, Logemann R, Weinreb RN**: The extracellular matrix of the human optic nerve. *Arch Ophthalmol* 107: 1225—1231, 1989.
  - 8) **Hirokawa N**: Quick freeze, deep etch of the cytoskeleton. *Methods in Enzymology* 134: 598—612, 1986.
  - 9) **Hirokawa N**: Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J Cell Biol* 94: 129—142, 1982.
  - 10) **Schnapp BJ, Reese TS**: Cytoplasmic structure in rapid-frozen axons. *J Cell Biol* 94: 667—679, 1982.
  - 11) **Hirokawa N, Bloom GS, Vallee RB**: Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins in regions of axons associated with rapid axonal transport: The  $\beta, \beta'$ -iminodipropionitrile-intoxicated axons as a model system. *J Cell Biol* 101: 227—239, 1985.
  - 12) **Hirokawa N, Glicksman MA, Willard MB**: Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J Cell Biol* 98: 1523—1536, 1984.
  - 13) **Gotow T, Hashimoto PH**: Deep-etch structure of astrocytes at the superficial glia limitans, with special emphasis on the internal and external organization of their plasma membranes. *J Neurocytol* 17: 399—413, 1988.
  - 14) **Larabell CA, Chandler DE**: Quick-freeze, deep-etch, rotary-shadow views of the extracellular matrix and cortical cytoskeleton of xenopus laevis eggs. *J Electron Microsc Tech* 13: 228—243, 1989.
  - 15) **Shiomura Y, Hirokawa N**: The molecular structure of microtubule-associated protein 1A(MAP1A) in vivo and in vitro. An immunoelectron microscopy and quick-freeze, deep-etch study. *J Neurosci* 7: 1461—1469, 1987.
  - 16) **Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S**: Tau proteins: The molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107: 1449—1459, 1988.
  - 17) **Hirokawa N, Pfister KK, Yorifuji H, Wagner MC, Brady ST, Bloom GS**: Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* 56: 867—878, 1989.
  - 18) **Hirsch M, Nicolas G, Pouliquen Y**: Interfibrillar structures in fast-frozen, deep-etched and rotary-shadowed extracellular matrix of the rabbit corneal stroma. *Exp Eye Res* 49: 311—315, 1989.
  - 19) **Yamabayashi S, Ohno S, Aguilar RN, Furuya T, Hosoda M, Tsukahara S**: Ultrastructural studies of collagen fibers of the cornea and sclera by a quick-freezing and deep-etching method. *Ophthalmic Res* 23: 320—329, 1991.
  - 20) **Furuta M, Lindsey JD, Weinreb RN**: The cytoskeletal ultrastructure of guinea pig optic nerve at the lamina cribrosa. *J Glaucoma* 1: 117—124, 1992.
  - 21) **Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Yoshida T, Kawashima T**: Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 111: 1027—1037, 1990.
  - 22) **Morrison JC, L'Hernault NL, Jerdan JA, Quigley HA**: Ultrastructural location of extracellular matrix components in the optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 107: 123—129, 1989.
  - 23) **Birk DE, Fitch JM, Linsenmayer TF**: Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1470—1477, 1986.
  - 24) **Van Kuppevelt THSM, Rutten TLM, Kuyper CMA**: Ultrastructural localization of proteoglycans in tissue using cuproinic blue according to the critical electrolyte concentra-

tion method: Comparison with biochemical data from the literature. *Histochemical J* 19: 520-526, 1987.

- 25) **Keene DR, Engvall E, Glanville RW:** Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for

this filamentous network. *J Cell Biol* 107: 1995-2006, 1988.

- 26) **Johansson JO:** The lamina cribrosa in the eyes of rats, hamsters, gerbils and guinea pigs. *Acta Anat* 128: 55-62, 1987.