

急速凍結ディープエッチング法による水晶体線維微細構造の観察

大西 健夫¹⁾, 今井 正之¹⁾, 谷口 重雄¹⁾, 荻野 總夫¹⁾, 藤井 靖久²⁾, 大野 伸一²⁾

昭和大学藤が丘病院眼科¹⁾, 山梨医科大学第一解剖学教室²⁾

要 約

水晶体線維内部の細胞骨格構造に関して検討するため、8週齢のWistar系雄ラット5匹を用い、水晶体を皮質部と核部に分け、急速凍結ディープエッチング法により観察した。皮質部では細胞骨格を構成する直径10~15 nmおよび約5 nmの細線維が不規則に走行し、途中で分岐しながら網目状構造を形成していた。一方、核部での細線維は平行の配列が多く、皮質部に比べて線維間が密になる傾向があり、網目状というよりは柵状に近い構造

を示した。この細線維が示す走行パターンが皮質部から核部に至る過程で変化することは、水晶体線維細胞の分化、伸長によって説明され、水晶体の透明性維持にとって重要であると思われた。(日眼会誌 99: 1236-1241, 1995)

キーワード：水晶体皮質，水晶体核，水晶体線維，細胞骨格，急速凍結ディープエッチング法

Ultrastructural Study of Lens Fiber Cells by Quick-freezing and Deep-etching

Takeo Onishi¹⁾, Masayuki Imai¹⁾, Shigeo Yaguchi¹⁾, Toshio Ogino¹⁾, Yasuhisa Fujii²⁾ and Shinichi Ohno²⁾

Department of Ophthalmology, Fujigaoka Hospital, Showa University¹⁾

1st Department of Anatomy, Yamanashi Medical University²⁾

Abstract

The ultrastructure of lens fiber cytoskeleton was studied by quick-freezing and deep-etching. Lenses of 5 Wistar male rats were divided into lens cortex and lens nucleus. Filamentous structures were clearly observed in the cortical fiber cells, which had diameters in 10~15 nm or about 5 nm. They showed a meshwork structure. On the other hand, the filamentous structures showed a linear, dense, and laminar pattern in the nuclear fiber cells. These

ultrastructural changes of cytoskeletons may be related to the elongation and differentiation of lens fiber cells and may be important for maintaining transparency of the lens. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1236-1241, 1995)

Key words: Lens cortex, Lens nucleus, Lens fiber, Cytoskeleton, Quick-freezing and deep-etching method

I 緒 言

水晶体線維の細胞骨格系に関する研究は1970年代から始められ、細胞骨格系の構成要素として、マイクロフィラメント、中間径フィラメント、微小管、ビーズ状フィラメントなどが局在することが、透過型電子顕微鏡を用いて確認されている^{1)~3)}。一方、細胞骨格系の三次元的な観察は、1978年 Hazlettら⁴⁾によって、続いて1980年、Bradleyら⁵⁾によって初めて走査型電子顕微鏡を使用して行われたが、このときに中間径フィラメントとビーズ状

フィラメントによる網目状構造の存在が報告されている。また、近年一般的になってきた急速凍結ディープエッチング法を用いた透過型電子顕微鏡による観察では、走査型電子顕微鏡よりも高分解能で細胞組織内微細構造がより生体内に近い状態で観察できるといわれている⁶⁾⁷⁾。しかし、この方法による水晶体線維細胞膜の微細構造に関する報告⁸⁾はあるが、細胞骨格系の三次元的な観察に関しての詳細な報告はない。今回、著者らは同方法を用いてラットの水晶体線維細胞骨格系の観察を行い、若干の知見を得たので報告する。

印刷請求先：227 神奈川県横浜市青葉区藤が丘1-30 昭和大学藤が丘病院眼科 大西 健夫
(平成7年4月6日受付、平成7年8月15日改訂受理)

Reprint requests to: Takeo Onishi, M.D. Department of Ophthalmology, Fujigaoka Hospital, Showa University,
1-30 Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 227, Japan

(Received April 6, 1995 and accepted in revised form August 15, 1995)

II 実験方法

材料として、8週齢のWistar系雄ラット5匹を使用した。ジエチルエーテルを用いて麻酔屠殺した各ラットの水晶体を摘出し、直ちに4°C、2%パラホルムアルデヒドで30~120分間浸漬固定を行った後、実体顕微鏡下で4分割し、さらに、皮質部と核部に分割した。これらの試料を0.1Mリン酸緩衝液で洗浄後、0.5%サポニンで30分間浸漬処理し、再び洗浄した後、0.25%グルタルアルデヒドで30分間再固定した。さらに、液体窒素冷却銅ブロックを用いて急速凍結し、液体窒素中でメス刃で凍結割断後、EIKO-FD 5 A および 3 AS 装置を用いて-95°C、20~30分間ディープエッチングを行った。次いで、白金とカーボン回転蒸着し、試料を取り出した後レプリカ膜を回収し、透過型電子顕微鏡(日立 H-7000 型)で観察した。

III 結果

1. 皮質部

水晶体皮質部では線維様構造物が不規則に走行し、途中で分岐しながら網目状構造を形成しており、水晶体線維細胞膜付近では細線維がそのまま細胞膜と連絡している像が観察された(図1)。水晶体線維内部には、表面が平滑で直径10~15 nmの細線維と、さらに細い直径約5 nmの細線維、そして直径10~20 nmの顆粒状物質が直線状に並ぶ構造物が観察された(図2)。皮質部において

は、これらの中で最も多く観察されるのは表面の平滑な直径10~15 nmの細線維であったが、表面のすべてが平滑なものは少なく、部分的に表面の不整な凹凸を示すものが多くみられた。また、顆粒状物質が整然と直線状に並ぶ構造物もわずかであるが観察された。

2. 核部

水晶体核部では分岐した直径10~20 nmの線維様構造物が認められたが、平行の配列が多く、皮質部に比べて細線維間が密となる傾向があり、網目状というよりは柵状に近い構造を示した(図3)。核部では表面が平滑な直径10~15 nmの細線維は観察されず、直径10~20 nmの顆粒状物質が直線状に並ぶ構造物がそのほとんどを占めていた(図4)。また、核部でみられるこのタイプの細線維には、表面に不整な凹凸がわずかにあるものから、顆粒状物質が整然と並ぶ線維、あるいは大小不揃いの顆粒状物質が線状に密に近接して並ぶ線維など、その形態変化が観察された(図3)。

IV 考 按

水晶体は、水晶体上皮細胞から分化する線維細胞が層状に整然と高密度で配列する組織である。その線維細胞に含まれる蛋白質は他の組織と比べると高い濃度で存在しており、水晶体がレンズとしての機能を果たすことができる一要因となっている。この水晶体蛋白はクリスタリンと呼ばれ、高濃度で存在しても凝集しない性質を持っている⁹⁾。今回、急速凍結ディープエッチング法によ

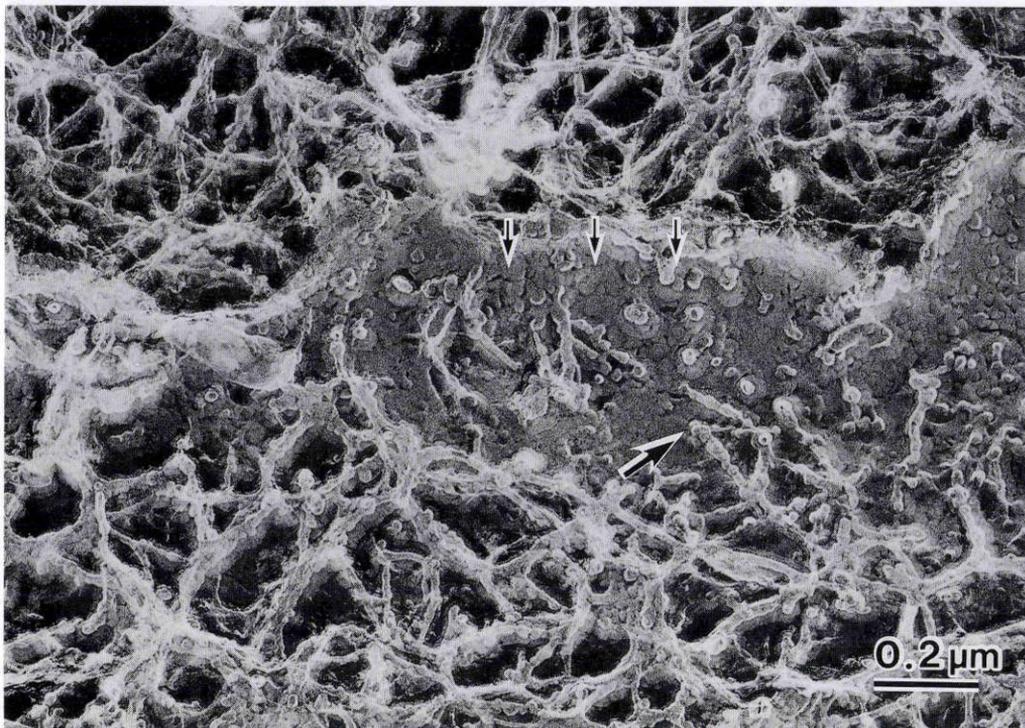


図1 水晶体皮質部(弱拡大)。

線維様構造物が網目状構造を形成しており、写真中央には線維細胞膜が帯状にみられ(小矢印)、細線維がそのまま細胞膜と連絡しているのが観察される(大矢印)。

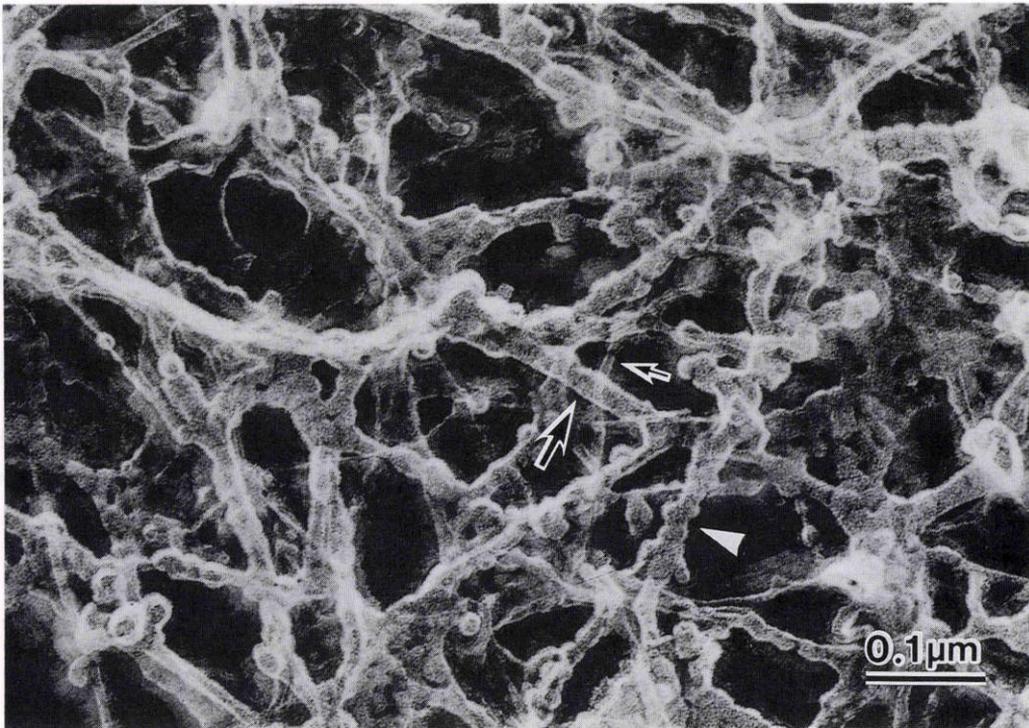


図2 水晶体皮質部(強拡大).

水晶体線維内部には、表面が平滑で直径10~15 nmの細線維(大矢印)と、さらに細い直径約5 nmの細線維(小矢印)、そして直径10~20 nmの顆粒状物質が直線状に並ぶ構造物(矢じり)が観察される。



図3 水晶体核部(弱拡大).

直径10~20 nmの線維様構造物が認められるが、平行の配列が多く、皮質部に比べて細線維間が密となる傾向があり、柵状に近い構造を形成している。核部で観察される細線維には、表面に不整な凹凸がわずかにあるもの(小矢印)から、顆粒状物質が整然と並ぶ線維、あるいは大小不揃いの顆粒状物質が線状に密に近接して並ぶ線維(大矢印)など、その形態変化が観察される。

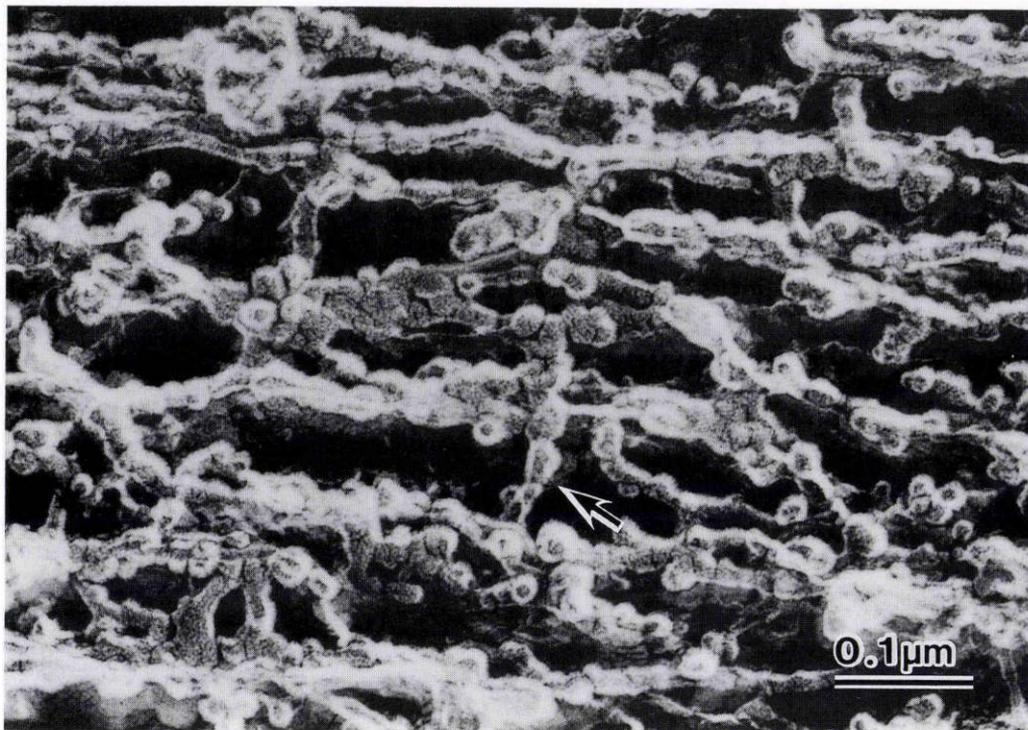


図4 水晶体核部(強拡大).

直径10~20 nmの顆粒状物質が直線状に並ぶ構造物がほとんどを占めている(矢印).

り水晶体線維細胞内部の観察を始めたところ,このクリスタリンのため,線維細胞内の様子は均質で無構造なものでしかなかった.そこで,試料を0.5% サポニンで浸漬処理し,その後に急速凍結ディープエッチング法を行い観察することによって,初めて線維細胞内の細胞骨格系が確認できた.サポニン処理は,細胞内可溶性蛋白質のために細胞骨格が明瞭に観察できない場合に用いられる化学的処理法の一つであり,細胞膜にコレステロールのミセルを作って小孔を開ける方法である¹⁰⁾.これを急速凍結ディープエッチング法に併用すると,その細胞膜破壊作用により可溶性蛋白質が除去され,細胞骨格が観察できるようになった.クリスタリンを高濃度に含む特徴をもつ水晶体の観察には,このサポニン処理は非常に有効であると考えられた.

こうして細胞骨格系が露出し観察可能となったが,水晶体線維の細胞骨格系の構成要素は,マイクロフィラメント,中間径フィラメント,微小管,ビーズ状フィラメントなどであるといわれている¹¹⁻³⁾.今回の観察では直径約5 nmの細線維と直径10~20 nmの細線維が認められたが,それぞれの形態,直径からマイクロフィラメントと中間径フィラメントが考えられ(図2),一方,核部のほとんどを占めた細線維は顆粒状物質が直線状に並ぶ形態とその直径からビーズ状フィラメントと考えられた(図4).それらよりもやや径の太い細線維もみられたが,はっきりと微小管と同定できなかった.中間径フィラメントに関してはニワトリの水晶体を対象に,皮質部だけに局在し,核部には存在しないとする報告¹¹⁾がある.また,ビーズ状

フィラメントに関しては,やはりニワトリの水晶体を対象に,皮質部では直径7~9 nmの中心軸となる細線維(アクチン)に直径12~15 nmの球状小片が不規則に付着した形で存在すること,核部ではより凝集され,集合した形となって存在することが報告⁵⁾¹¹⁾されている.さらに,水晶体の中心部に近づくにつれて中間径フィラメントは徐々に減り,ビーズ状フィラメントが増えることも報告⁵⁾¹¹⁾されている.これらは,遠心分離によって細胞骨格線維を単離した状態,またはグリセリン処理を施した状態での観察結果であるが,今回の観察でも皮質部においては中間径フィラメントが比較的多く存在し,核部において観察された細線維はいくつかの形態上の変化がみられるが,ほとんどがビーズ状フィラメントであった.また,中間径フィラメントは細胞骨格の主要構成線維であるとともに,細胞の分裂,分化などにおいて重要な役割を果たしていると考えられている^{12)~16)}.皮質部において中間径フィラメントが多くみられ,核部ではみられなかったことは,Lieskaら¹⁷⁾が皮質部線維細胞を分化の中間の状態にあるものとして,最終的に分化した細胞としての核部線維細胞と区別した報告と一致しており,皮質部細胞が分化途上の細胞であることの特徴を示していると考えられた.

以上のように細胞骨格線維を単離した状態ではなく,急速凍結ディープエッチング法を用いることによって,いわば生体内に近い形で,かつ明瞭に観察することができたが,これら細胞骨格系の役割としては,調節に伴う水晶体の形状の変化に対する機能³⁾,膜蛋白合成に関する

枠組みとしての機能¹⁸⁾、上皮細胞から皮質部、核部へと至る分化に関する機能¹⁹⁾などが提案されている。そうした機能との関連性において、細線維走行に規則性が存在することは十分に考えられたが、今回の観察では細線維の走行パターンとしては、皮質部においては網目状構造を示し、核部においては柵状構造を示していた(図1, 3)。この皮質部と核部の走行パターンの相違は水晶体線維細胞の分化、伸長の点から説明しやすいと思われる。すなわち、水晶体は赤道部上皮細胞が細胞分裂を起こして順次水晶体線維に成長し、徐々に水晶体中心部に移動していくことによって大きくなるため、水晶体皮質部には含水量の多い水晶体線維が配列しているが、中心部に近づけば近づくほど圧縮され、脱水硬化した水晶体線維が並ぶことになる。これが水晶体核部であり、水晶体皮質部と区別される。この皮質部と核部の水晶体線維構造の差異に関する報告は多数なされており、内部構造に関しては脱核現象、細胞内小器官の消失、細胞内クリスタリン粒子密度の増加などがあげられる²⁰⁾²¹⁾。この線維細胞の周辺部から中心部へ向かっての移動と変化を考えると、皮質部の線維細胞は水晶体上皮細胞から分化してまだ間もない線維細胞であるから、細胞骨格としての細線維配列は比較的疎な網目状構造になっていると考えられる(図1)。これに対して核部の線維細胞は中心部への移動の際に圧縮され扁平化し、これに伴い線維内部の細線維配列も細胞の長軸と垂直の方向に圧縮され、重層化し、柵状を呈するようになったと考えられる(図3)。また、今回観察された核部での細線維の柵状配列は非常に整然としており、細線維がこのような配列をとるようになるためには、水晶体線維が中心部に移動するに従って各フィラメントが一方向に平行に配列するための、何らかのメカニズムが存在するのではないかと考えられる。

水晶体の透明性を成立させているさまざまな因子の中に、水晶体線維細胞自体の整然とした規則正しい配列と、その線維細胞内の構成蛋白質の規則的な層状分子配列がある。また、水晶体を通過する光の散乱の半分は、線維細胞の原形質、その中でも特に細胞内に豊富に存在する細胞骨格系が原因となっている⁹⁾。これらのことから、今回の実験でみられた細胞骨格系を構成する中間径フィラメント、ビーズ状フィラメントなどの細線維が細胞内で示す走行パターンが、皮質部の網目状構造から核部に至って重層化した規則的な柵状構造を呈するようになることも、光の散乱を防ぎ、透明性維持の一要因として働いているのではないかと考えられた。

今回の実験に用いた水晶体は、球形で調節力のないラットのものであるが、Rafferty ら³⁾は、水晶体の形状および調節力の有無により、水晶体上皮細胞、水晶体線維細胞内での細線維の分布が異なると報告しており、このように調節機能と細胞内微細構造の関連があるとすれば、今後、調節力を有する種の水晶体について、その細胞骨格

の構造を比較検討することも必要と思われた。

稿を終えるにあたり、昭和大学藤が丘病院電子顕微鏡室、中野清子氏、鬼木弘明氏に心から感謝いたします。なお、本論文の要旨は、第98回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) Maisel H, Perry M: Electron microscopic observations on some structural proteins of the chick lens. *Exp Eye Res* 14: 7-12, 1972.
- 2) Kuwabara T: The maturation of the lens cell: A morphological study. *Exp Eye Res* 20: 427-443, 1975.
- 3) Rafferty N, Goossens W: Cytoplasmic filaments in the crystalline lens of various species: Functional correlations. *Exp Eye Res* 26: 177-190, 1978.
- 4) Hazlett LD, Bradley RH: Spontaneous cataract in nude athymic mice: Ultrastructural analysis. *Exp Eye Res* 26: 207-217, 1978.
- 5) Bradley RH, Lo WK, Kuszak J, Maisel H: The cytoskeleton of the chicken lens fiber cells: A scanning and ultrastructural analysis. *Exp Eye Res* 31: 487-494, 1980.
- 6) 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.
- 7) Ou B, Ohno S, Yamabayashi S, Chen HB, Fujii Y, Tsukahara S: Ultrastructural study of basal lamina of retinal pigment epithelium by quick-freezing and deep-etching method. *Ophthalmic Res* (in press), 1995.
- 8) Hatae T, Iida H, Kuraoka A, Shibata Y: Cytoplasmic surface ultrastructures of gap junctions in bovine lens fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2164-2173, 1993.
- 9) 尾羽澤大: 1. 3, 生理機能/代謝. 増田寛次郎, 他(編): 眼科学大系, 2B, 水晶体. 中山書店, 東京, 27-40, 1993.
- 10) Hirokawa N: Quick freeze, deep etch of the cytoskeleton. *Methods Enzymology* 134: 598-612, 1986.
- 11) Bradley RH, Ireland M, Maisel H: The cytoskeleton of chick lens cells. *Exp Eye Res* 28: 441-453, 1979.
- 12) Bartek J, Durban EM, Hallows RC, Taylor-Papadimitriou J: A subclass of luminal epithelial cells in the human mammary gland defined by antibodies to cytokeratins. *J Cell Sci* 75: 17-33, 1985.
- 13) Chesa PG, Rettig WJ, Melamed MR: Expression of cytokeratins in normal and neoplastic colonic epithelial cells. Implications for cellular differentiation and carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 10: 829-835, 1986.
- 14) Vassy J, Rigaut JP, Hill AM, Fouchier J: Analysis by confocal scanning laser microscopy imaging of the spatial distribution of intermediate

- filaments in fetal and adult rat liver cells. *J Microsc* 157: 91—104, 1990.
- 15) **Moll R, Hage C, Thoenes W**: Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: Modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 65: 74—86, 1991.
- 16) **Hemmi A, Komiyama A, Ohno S, Fujii Y, Kawaoi A, Katoh R**, et al: Different organization of intermediate filaments in columnar cells of rat large intestinal mucosa as revealed by confocal laser scanning microscopy and quick-freezing and deep-etching method. *Virchows Arch* 426: 401—410, 1995.
- 17) **Lieska N, Shao D, Kriho V, Yang HY**: Expression and distribution of cytoskeletal IFAP-300kD as an index of lens cell differentiation. *Curr Eye Res* 10: 1165—1174, 1991.
- 18) **Ramaekers FCS, Selten-Versteegen AME, Benedetti EL, Dunia I, Bloemendal H**: *In vitro* synthesis of the major lens membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 725—729, 1980.
- 19) **Ramaekers FCS, Boomkens TR, Bloemendal H**: Cytoskeletal and contractile structures in bovine lens cell differentiation. *Exp Cell Res* 135: 454—461, 1981.
- 20) **Kuwabara T, Imaizumi M**: Denucleation process of the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 973—981, 1974.
- 21) 矢島保道, 水川 淳, 沖坂重邦: 水晶体の構造. あたらしい眼科 1: 3—17, 1984.
-