急速凍結・ディープエッチング法によるサル視神経篩状板の微細構造

阿部 圭哲,古田 仁志,塚原 重雄

山梨医科大学眼科学教室

要 約

サル視神経篩状板の微細構造を急速凍結・ディープ エッチング法を用いて観察した.篩状板内の神経膠細胞 は篩状板膠原線維束の周りに細胞体を有し,その主な細 胞骨格蛋白である中間径フィラメントは直径10~12 nmで,細胞体付近では粗に,突起部分では密に配列して いた.この神経膠細胞は,その細胞膜を介して有髄神経 線維と接していた.篩状板の細胞外マトリックス成分は 主に30~60 nm径の太い膠原線維の束から成っていた が,これらの太い線維の間には直径5 nm,長さ20~30 nmの線維性の架橋があり,さらに,細かな網目状の線維 構造物も認められた.篩状板内の血管は基底膜を含む篩 状板膠原線維束内にあり、その外側を神経膠細胞成分で 取り囲まれて神経線維束から隔てられていた.篩状板細 胞外マトリックスを取り囲む基底膜も直径5nmの細い 線維成分から成り、隣接する細胞膜にも突起を出してい た.(日眼会誌 99:889-894,1995)

キーワード:視神経篩状板,神経膠細胞,細胞外マト リックス,急速凍結・ディープエッチング, サル

Quick-freeze, Deep-etch Study of Monkey Lamina Cribrosa

Keitetsu Abe, Masashi Furuta and Shigeo Tsukahara Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical College

Abstract

Quick-freeze, deep-etch method was used to study the ultrastructure of normal monkey optic nerve lamina cribrosa. Glial cell somata were located beside collagen fibril bundles in the lamina cribrosa. Glial intermediate filaments, which were the main cytoskeletal proteins of $10\sim12$ nm in diameter, were loosely packed in the somata and were tightly stacked in the processes. The glial plasma membrane directly abutted onto the myelin sheath of the optic nerve axon. The main component of the extracellular matrix (ECM) in the lamina cribrosa was interstitial collagen fibers of $30\sim60$ nm in diameter, which were bridged by processes 5 nm in diameter and $20\sim30$ nm in length and by 5 nm wide mesh-like

I 緒 言

著者らは、緑内障の発症メカニズムを解明するための 基礎実験として、急速凍結・ディープエッチング法を用 いてモルモットの視神経篩状板部の微細構造¹⁾、篩状板 前後の視神経軸索内微細骨格構造²⁾、視神経篩状板細胞 外マトリックスの微細構造³⁾、篩状板内の血管を取り巻 structures. Small vessels running in the laminar beams were totally surrounded by basement membranes, laminar ECM, and glial cell components and thus were separated from optic nerve axons. The basement membrane which surrounded the laminar ECM was a fine fibrillar structure of 5 nm in diameter and also had numerous fibrils anchoring it to plasma membranes of vascular pericytes and glial cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 889–894, 1995)

Key words : Lamina cribrosa, Glial cell, Extracellular matrix, Quick-freeze and deepetch, Monkey

く微細構造"いこついて報告してきた.サルは、モルモット、ラットなどの囓歯類に比べ、篩状板が多層性でヒトの篩状板によく似ていることから、実験緑内障の動物モデルとして汎用され、緑内障の病因については高眼圧サル眼の視神経篩状板の超薄切片の透過型電子顕微鏡所見を基に論じられてきた^{5)~8)}.しかし、通常の電子顕微鏡 (電顕) 超薄切片は、その作製に過剰な化学固定、熱処理

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 阿部 圭哲 (平成7年3月16日受付,平成7年4月6日改訂受理)

Reprint requests to: Keitetsu Abe, M.D. Department of Ophthalmology, Yamanashi Medical College. 1110 Shimokato, Tamaho-cho, Nakakoma-gun, Yamanashi-ken 409-38, Japan

(Received March 16, 1995 and accepted in revised form April 6, 1995)

などの操作を加えることにより,真の形態とはかなり異 なる像を呈することも指摘されている.一方,急速凍結・ ディープエッチング法では,組織を軽く固定した後,急 速に凍結しレプリカ膜を透過電顕で観察するため,その 特徴として通常の超薄切片組織より真に近い形態を分子 レベルにまで詳細に解析し,しかも三次元的に観察する ことができ⁹,これまで基礎医学分野,特に,神経機能の 基礎的な解明に大きな貢献をしてきている^{10/~12)}.今回, サルを用いた緑内障の病態研究のために,この急速凍 結・ディープエッチング法を用いて,正常サル神視経篩 状板の微細構造を観察したので,ここに報告する.

II実験方法

検眼鏡的に眼底, 視神経に異常のない日本サル (Macacus fuscatus)(体重 6.4~11.5 kg) 3 匹 6 眼を用 いた、塩酸ケタミン (ケタラール®) 50 mg/kg の筋注に よる全身麻酔後, 致死量のペントバルビタールナトリウ ム (ネンブタール®)を静注し、1匹は経心臓的に生理食 塩水で脱血後2%パラフォルムアルデヒドで灌流固定 し眼球を摘出,2匹は呼吸停止後眼球を摘出した。摘出 した眼球から視神経を取りだし、2%パラフォルムアル デヒド内で縦割断し、さらに、30分間固定した.その後、 試料を0.1%リン酸緩衝液で洗浄し、0.5% サポニン液に 30分間浸し、さらに同リン酸緩衝液で洗浄後、急速凍結 した. 急速凍結は FK 400 (日本電子) を用い, 試料を蒸 留水で2回,10%メタノール液で1回洗浄後,液体窒素 で-190°Cに凍結された銅板に瞬間的に圧着することに より凍結した。次に,液体窒素内で凍結試料の表面を手 術用メスで割断し、すばやく真空凍結割断装置 FD-5 A (エイコー) に搬入した. 4×10⁻⁷Torr 以下の真空条件下 で-95°Cまで温度を上昇させ,10~30分間ディープエッ チングを行うことにより割断面で細胞内外を満たしてい た水分を昇華させた。エッチングが終了した試料を回転 させながら約2nmの厚さで白金を蒸着させ、さらに、 カーボンを蒸着させてレプリカ膜を作製した.真空凍結 割断装置から試料を取りだし,次亜塩素酸に浸漬し試料 を溶解し、レプリカ膜を分離した. レプリカ膜をフォル ンバール支持膜を張った銅グリッドに拾い、透過型電子 顕微鏡(日立 H-500, 75 kV)で観察した.

III 結 果

サル視神経篩状板の神経膠細胞の細胞体は篩状板膠原 線維束の近傍に多く位置し(図1A),神経軸索を篩状板 膠原線維から隔てていた。また,篩状板後部では神経膠 細胞の突起は深く神経軸索束内に進展していて(図1 B),神経軸索をさらに幾つかの束に分けていた。神経膠 細胞は,その細胞膜を介して神経軸索の髄鞘と直接,接 触していた(図1C).この神経膠細胞の主な細胞骨格蛋 白は10~12 nm 径の中間径フィラメントから成り,これ



図1 視神経篩状板の神経膠細胞.

A:神経膠細胞の細胞体が(g:神経膠細胞の核),神 経軸索(ax)とそれに直行して走る膠原線維束(矢印) を隔てるように位置している.B:篩状板後部.神経膠 細胞の突起部分(g)は有髄の神経軸索束(ax)の間隙 を埋めるように分布している.C:篩状板後部.神経膠 細胞(g)の細胞膜(矢印)は,神経軸索(ax)の髄鞘に 直接,接している.







らは細胞体付近では比較的粗に配列しているが (図2 A),神経束内に伸びている突起部分では密に配列してい た (図2B). この中間径フィラメントは,神経軸索内の ニューロフィラメントに比べてフィラメント同士を結合 している架橋 (cross-bridge) の数はわずかであった (図 2C).

視神経篩状板を形成する篩状板膠原線維束は神経軸索 束を分割するように配列しているが、その膠原線維を拡 大して観察すると、30~60 nm 径の太い間質コラーゲン の束がその主成分を成し、その1本1本の間質コラーゲ ン間には約5 nm 径の小さな架橋が存在し、また、間質コ ラーゲン束の間には同じく約5 nm 径の細かな網目状の 構造物も認められた(図3).

図2 神経膠細胞と視神経軸索の骨格構造.

A:神経膠細胞体内の骨格構造.細胞骨格蛋白の中間 径フィラメントが比較的,疎に配列している.B:神経 膠細胞突起部分の骨格構造.中間径フィラメントは, 細胞体部分に比べ,密で,互いに平行かつ直線的に配 列している.C:神経軸索内の骨格構造.神経軸索内の 骨格蛋白であるニューロフィラメントはフィラメント 間に細かな突起を有している.A,B,Cは同一倍率.

視神経篩状板内の血管は篩状板膠原線維内を走ってい るため膠原線維層で取り巻かれているが、その周りはさ らに神経膠細胞成分で取り巻かれ、神経軸索束から隔て られていた(図4A).この血管内腔側の拡大所見には (図4B)、血管内皮細胞とその外周に間質コラーゲンが 豊富な細胞外マトリックス成分が認められた.

視神経篩状板には細胞外マトリックスである篩状板膠 原線維が豊富に存在しているが、神経膠細胞、血管周細 胞などとは基底膜を介して接している。この基底膜構造 は5~10 nm 径の線維状構造物から成り、隣接する細胞 膜側には架橋を出し、細胞外マトリックス側には無秩序 な網目状構造を取っていた(図5).

891



視神経篩状板膠原線維. 図3

篩状板膠原線維は,互いに細かい架橋を持つ太い間質コラーゲンから成り,その間には網目状の構造物(矢 印)もみられる.



図4 視神経篩状板内の血管.

A:血管は膠原線維(矢印)内に位置し、神経軸索束 (ax)との間に神経膠細胞成分 (g) が介在している. B:視神経篩状板内血管周囲の微細構造(v:血管内 腔). 血管最内腔に一層の血管内皮細胞(e)が位置し, その外側を細胞外マトリックス層が取り巻いている. 細胞外マトリックス層には細かい網目状構造物の層, 線維芽細胞(f),間質コラーゲン(C)がみられる.ここ ではエッチング時間が短く,細胞外マトリックス部分 では主に太い間質コラーゲンしか表出されていない.

IV 考 按

緑内障発症機序解明のためにサル眼が汎用され、免疫 組織化学的手法による正常サル視神経篩状板の細胞外マ トリックス成分の解明13)~15)とともに、サルの実験的緑内 障眼でのこれら成分の変化について論じられてき た6)~8)16)17). しかしながら,篩状板細胞外マトリックス成



分の微細な骨格構造については、詳しく検討されてこな かった.著者らがモルモット篩状板で既に報告1)~4)した ように、今回用いた急速凍結・ディープエッチング法は このような細胞内外の骨格構造の微細形態描出に優れて いるため,正常サル視神経篩状板について,その微細形 態を観察してみた。

まず, 視神経篩状板に認める豊富な神経膠細胞につい ては,主な細胞骨格蛋白である直径 10~12 nm の中間径 フィラメントがモルモットと同様に明瞭に認められた。 わずかしか架橋を持たないこのフィラメント構造は、や



図5 視神経篩状板の基底膜微細構造.

基底膜(太い矢印)は細かい網目状の構造をとり,神経膠細胞(g)の細胞膜(細い矢印)に向かって多数の微 細な突起を出している.細胞外マトリックス側にも同様に網目状の突起を出しており,基底膜に近接して間 質コラーゲン線維(C)もみられる.

はりモルモット³⁾やラット¹⁸⁾と同様であった.そして, フィラメントの配列密度が細胞体付近から神経軸索束内 に伸びている突起内で高く,神経膠細胞突起が他の組織 圧に拮抗できる構造形態を取っていると考えられた.さ らに,篩状板内では神経膠細胞はその細胞膜を介して神 経線維を取り巻き,血管や膠原線維などの細胞外マト リックスを隔て,神経線維を栄養機能的だけでなく,物 理的外圧に対しても保護する役目を果たしているように 思われた.

視神経篩状板膠原線維には、やはりモルモットと同様 に, 直径 30~60 nm の太い間質コラーゲンの束と, これ に纏わる細かい網目状の成分がみられた。この太い間質 コラーゲン線維は、これまでの報告¹³⁾¹⁴⁾から I 型とIII型 コラーゲンから構成されていると思われた. これらの太 い間質コラーゲン線維間には、強膜コラーゲン19)と同様 に多数の短い架橋が存在していた。この架橋や細かい網 目状の成分は太い間質コラーゲンを互いに結合させ、 そ の三次元的構造により視神経篩状板の力学的構築に関与 し, 強靱な篩状板構造を保つ役割をしているものと思わ れた.篩状板膠原線維束には、I型、III型コラーゲン以 外に免疫組織学的にV型, VI型コラーゲン, プロテオグ リカンが証明されている^{13)~15)}. さらに, ヒトの強膜²⁰⁾, ヒト21)とサル22)の視神経篩状板における電顕組織化学的 研究で, プロテオグリカンがコラーゲン線維同士を結び 付けるように分布していたという報告もあり、今回認め た間質コラーゲン線維間の架橋や細かい網目状の組織の 本体も、V型、VI型コラーゲン、プロテオグリカンが構 成成分であると推測された.一方,ヒトおよびサルの視 神経篩状板にはコラーゲン以外にエラスチンが豊富に存 在しており15)17)23),緑内障眼での視神経篩状板における

エラスチンの形態学的変化も報告⁶⁾¹⁶⁾²⁴⁾²⁵⁾されている.急速凍結・ディープエッチング法でもエラスチンの観察は 可能と思われるが、今回はエラスチンは同定できなかっ た。その原因として、急速凍結・ディープエッチング法 では、試料のすべての割断面で良好な凍結や割断が得ら れるわけではなく、実際に観察できるのは試料の割断面 の一部分であることが多いため、今回作製したレプリカ 中にはエラスチンが含まれなかった可能性も考えられ た。いずれにしろ、急速凍結・ディープエッチング法と 免疫組織化学を組み合わせれば、それらの同定も可能に なると思われる.

視神経篩状板内の血管の部分は、血管内腔側から血管 内皮細胞、膠原線維束を含む細胞外マトリックス成分の 層があり、さらに、その周りに神経膠細胞が位置し、神 経線維と血管を隔絶するという構築をとっていた。この 全体像はモルモットと同様であったが、今回はこの部分 のエッチング時間が比較的短かったこともあり、モル モットの場合⁴¹のような血管周囲細胞外マトリックス層 中の細いコラーゲン線維の分布密度の解析や篩状板の血 管がない部分の細胞外マトリックス層との比較はできな かった。しかし、サルはモルモットに比べ、血管周囲細 胞外マトリックス層の中でも網目状の線維状構造物の層 が多く認められ、それらは血管壁の弾力性、可塑性に貢 献しているものと思われた。

視神経篩状板内の膠原線維束をはじめとする細胞外マ トリックスは、基底膜によって神経膠細胞と隔てられて いる。サルとヒトの視神経篩状板の基底膜はIV型コラー ゲン、ファイブロネクチン、ラミニンから成ることがわ かっているが^{14/26)}、その微細構造については不明な点が 多い。今回、急速凍結・ディープエッチング法を用いて 基底膜の微細構造も明らかにすることができた.それ は、モルモットの視神経篩状板¹¹³⁾やラットの星状膠細 胞¹⁸⁾と同様に、直径 5~10 nm の線維状構造物から構成 されており、基底膜から神経膠細胞の細胞膜側および細 胞外マトリックス側には多数の架橋が伸びていた.この

基底膜の構造は、神経膠細胞と細胞外マトリックスとの 密接な結合を示すとともに、基底膜は視神経篩状板にお ける力学的な構築要素の一つであるとも思われた.

今回,著者らは,モルモットだけでなく,サルでも急 速凍結・ディープエッチング法で視神経篩状板の微細構 造が明らかにできることを示した。今後,本法を用いた 実験的緑内障眼の解析が緑内障の病態解明に役立つもの と期待される。

本論文の要旨は第97回日本眼科学会総会において発表した.本研究は文部省科学研究費(一般研究C04671069)の援助を受けた.

文 献

- 古田仁志,塚原重雄, Lindsey JD, Weinreb RN: Deep-etching 法によるモルモット視神経乳頭部微 細構造の観察. 日眼会誌 97:370-377, 1993.
- 2) **Furuta M, Lindsey JD, Weinreb RN**: The cytoskeletal ultrastructure of guinea pig optic nerve at the lamina cribrosa. J Glaucoma 1:117–124, 1992.
- Furuta M, Lindsey JD, Weinreb RN: Ultrastructure of glial cells and extracellular matrix in the guinea pig lamina cribrosa. J Glaucoma 2:303 -312, 1993.
- 4) Furuta M, Lindsey JD, Weinreb RN: Microvascular associated extracellular matrix in the lamina cribrosa of the guinea pig. In: Weinreb RN, et al (Eds): Biology of The Ocular Microcirculation. Excerpta Medica, 119–128, 1992.
- 5) Quigley HA, Addicks EM: Chronic experimental glaucoma in primates: II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 137–152, 1980.
- 6) Quigley HA, Brown A, Dorman-Pease ME: Alterations in elastin of the optic nerve head in human and experimental glaucoma. Br J Ophthalmol 75: 552-557, 1991.
- Morrison JC, Dorman-Pease ME, Dunkerberger GR, Quigley HA: Optic nerve head extracelluar matrix in primary optic atrophy and experimental glaucoma. Arch Ophthalmol 108: 1020–1024, 1990.
- 福地健郎, 沢口昭一, 原 浩昭, 白柏基宏, 岩田和雄, 海谷忠良: サル実験緑内障眼の視神経篩状板における Sulfated Proteoglycan について. あたらしい眼 科 9: 653-656, 1992.
- Houser J: Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. Trends Biochem Sci 6: 64-68, 1981.
- 10) **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 Nurosci 7: 1461-1469, 1987.

- Hirokawa N, Shimomura Y, Okabe S: Tau proteins: The molecular structure and mode of binding on microtubules. J Cell Biol 107: 1449– 1459, 1988.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Morrison JC, L'Hernault NL, Jerdan JA, Quigley HA: Ultrastructual location of extracellular matrix components in the optic nerve head. Arch Ophthalmol 107: 123–129, 1989.
- 15) 福地健郎:正常サル眼における視神経篩状板,細胞 外マトリックスの免疫組織化学的分析.日眼会誌 94:1024-1030,1990.
- 16) 福地健郎: サル実験緑内障における視神経篩状板, 細胞外マトリックス免疫組織化学的分析.日眼会誌 95:303-310,1991.
- 17) Quigley HA, Dorman PME, Brown AE: Quantitative study of collagen and elastin of the optic nerve head and sclera in human and experimental monkey glaucoma. Curr Eye Res 10: 877–888, 1991.
- 18) Gotow T, Hashimoto PH: Deep-etch structure of astrocytes at the superficial glial limitans, with special emphasis on the internal and external organization of their plasma membranes. J Neurocytol 17: 399-413, 1988.
- 19) Yamabayashi S, Ohno S, Aguilar RN, Furuya T, Hosoda M, Tsukahara S: Ultrastructural studies of collagen fibers of the cornea and sclera by quick-freezing and deep-etching method. Ophthalmic Res 23: 320—329, 1991.
- 20) 沢口昭一,福地健郎,阿部春樹,岩田和雄,海谷忠良: 強膜プロテオグリカンの分布と特性.あたらしい眼科 9:1561-1564,1992.
- 沢口昭一, 岩田和雄, 海谷忠良:正常人眼視神経乳頭 篩状板における Sulfated-proteoglycan の分布と形 態. 日眼会誌 95:311-317, 1991.
- 22) 福地健郎,沢口昭一,原 浩昭,岩田和雄,海谷忠良: サル眼視神経篩状板における Sulfated Proteoglycan. 眼紀 42:1780-1784, 1991.
- 23) Hernandes MR, Luo XX, Igoe F, Neufeld AH: Extracellular matrix of the human lamina cribrosa. Am J Ophthalmol 104: 567-576, 1987.
- 24) Hernandes MR, Andrzejewska WM, Neufeld AH: Changes in the extracellular matrix of the human optic nerve head in primary open-angle glaucoma. Am J Ophthalmol 109: 180-188, 1990.
- Hernandes MR: Ultrastructual immunocytochemical analysis of elastin in the human lamina cribosa. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 2891-2903, 1992.
- 26) Goldbaum MH, Jeng S, Logemann R, Weinreb RN: The extracellular matrix of the human optic nerve. Arch Ophthalmol 107: 1225—1231, 1989.