

トリプシン消化法を用いた網膜血管網の 走査電子顕微鏡観察法の開発

張 大 行

新潟大学大学院医歯学総合研究科

視覚病態学分野

(主任：阿部春樹教授)

**Scanning Electron Microscopy of Trypsin Digested Retinal Tissues for
the Three - dimensional Visualization of the Retinal Vascular Network**

Hiroyuki CHO

Division of Ophthalmology

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Haruki ABE)

要 旨

網膜血管の観察法としてはトリプシン消化法により単離した血管の光学顕微鏡観察と、血管鑄型標本の走査電子顕微鏡 (SEM) 観察が一般的である。しかし前者の方法では分解能に限界があること、後者の方法では血管壁の直接観察ができないことや固定標本を利用できないことなどの問題が残されている。そこで、本研究では、トリプシン消化法と SEM 観察を組み合わせることで、網膜血管の微細構造を立体的に解析できる手法を開発した。材料にヒト、ブタおよびラットの眼球固定標本を用いた。トリプシン消化については、とくにホルマリン固定標本において、安定した網膜血管の単離が可能であった。この標本を SEM で観察すると、網膜血管の三次元立体構築を鑄型標本と同様に観察することができた。またステレオ画像を得ることで、より立体的な構造解析が可能になった。高倍率の観察では、表面は基底膜様の構造に覆われており、平滑筋細胞や周皮細胞の立体構造を直接観察することができなかったが、従来の光学顕微鏡観察と併用することで、多様な情報を得ることが可能となった。このトリプシン消化/SEM法は、鑄型標本の作製が不可能なホルマリン固定を施した病理標本や、鑄型注入ができない眼球の網膜血管網の立体構造解析に広く利用できることから、糖尿病網膜症の血管瘤をはじめとした多様な血管病態の解析に役立つことが期待される。

キーワード：網膜血管, 走査電子顕微鏡, トリプシン消化法

Reprint requests to: Hiroyuki CHO
Division of Ophthalmology and Visual Science
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学医歯学総合研究科生体機能調節専攻
感覚統合医学講座視覚病態学分野 張 大 行

緒 言

網膜血管の構造解析は、網膜血流の自動調節などの生理機能の解明に加えて、糖尿病網膜症や未熟児網膜症などの網膜血管性病変の病態解析に非常に重要である。そのため、これまでに数多くの方法で網膜血管の構造解析が行われてきた。

このうち光学顕微鏡による網膜血管の観察法としては、Kuwabaraら(1960)が報告したトリプシン消化法が広く用いられている¹⁾。この方法はトリプシンにより血管以外の網膜組織を消化して網膜血管のみを単離する方法で、全載(whole-mount)標本としてヘマトキシリン-エオジン染色(H-E染色)やPeriodic acid-Schiff染色(PAS染色)などで染色することができることから、これまでにヒトと様々な動物種の網膜血管観察に利用され多くの知見が得られている¹⁾⁻¹⁰⁾。しかし、光学顕微鏡の分解能に制限される点で、この方法による組織構造解析だけでは限界が多かった。また、最近では蛍光標識トマトレクチンの血管内注入による共焦点レーザー顕微鏡による3次元網膜血管観察も行われてきている¹¹⁾。この方法は血管内皮細胞表面の糖衣にトマトレクチンが結合することを利用しており、共焦点レーザー顕微鏡による網膜血管網の3次構造解析が可能であるが、電子顕微鏡レベルの分解能を望めない点や、蛍光観察であるため標識物質を血管内に投与する必要がある点、さらに深さ方向に制限がある点なども問題である。

一方、走査電子顕微鏡(SEM)は、細胞・組織の3次元微細構造解析にきわめて有用な装置であることから、網膜血管の解析にも期待がもたれる。実際にMurakamiら(1971)による血管鋳型/SEM法¹²⁾を用いて、これまでに種々の動物の網膜血管の3次元構造解析が行われてきた¹³⁾⁻¹⁸⁾。しかし、血管鋳型/SEM法は事前に血管内へ樹脂の注入を行う必要があり、特に網膜血管網への樹脂の十分な注入には技術的な熟練が必要であること、ヒトに対しての応用には倫理的な問題があること、さらに、組織をアルカリによって腐食させ、樹脂を観察することから、血管内皮細胞や周皮細

胞などの血管壁細胞の観察ができないという欠点があった。

そこで、今回われわれは、光学顕微鏡観察に用いられてきたトリプシン消化法をSEM観察に応用し、網膜血管網の3次元構築を観察する方法を検討したので報告する。この方法は平山がヒトの糖尿病網膜症の研究で試みたという報告¹⁹⁾以外に詳しい研究がなされていない。そこで、本研究では種々の眼球に応用し、適切な標本作製法とSEM観察法を確立した。さらに、一部の標本にトマトレクチンを注入し網膜血管の蛍光顕微鏡観察を行い、その同一標本にトリプシン消化法を施すことで、二つの方法による同一部位の観察を可能にした。これにより両者の方法を比較し、本法の特徴と有用性を検討した。

材料と方法

ヒト、ブタ、ラットの眼球を用いた。ヒト眼球は10%ホルマリンとソルミックス[®]で固定された肉眼解剖実習体(献体)から採取し、ブタ眼球は新潟食肉処理センターより、新鮮摘出眼球を購入した。ラット(成獣Wistar系雄)は日本エスエルシーから購入した。それぞれ、眼球摘出後、角膜、虹彩、水晶体を取り除いた後、0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリンにて1日以上浸漬固定した。

1. トリプシン消化法¹⁾

前眼部を切除した眼球を浸漬固定した後、流水で一晩洗浄し、37℃に加熱した3%トリプシン溶液(0.1Mトリス塩酸緩衝, pH7.8)中で定温放置(1~5時間)した後、蒸留水中で硝子体および内境界膜を剥離し、静かに振盪させながら血管以外の網膜組織を分離させ、網膜血管を単離した。

2. 光学顕微鏡観察

トリプシン消化法により単離した網膜血管網をスライドガラスにマウントしH-E染色した後に、緩衝液またはマリノールを用いてカバーガラスで封入し、光学顕微鏡で観察した。

3. 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

トリブシン消化法により単離した網膜血管網をシャーレに浮かべ、2%グルタルアルデヒド溶液 (0.1M リン酸緩衝, pH7.4) に液を交換した後、40℃で1日浸漬固定をおこなった。その後、0.1M リン酸緩衝液に置き換えて数回洗浄し、0.5%タンニン酸 (0.1M リン酸緩衝, pH7.4, 20~60分) と0.1%四酸化オスミウム溶液 (20~60分) で導電染色 (Murakami, 1973の変法) を行い²⁰⁾、さらにエタノール上昇系列 (70%, 80%, 90%, 95%, 100% 3回, 各20分) で脱水を行った。その後、臨界点乾燥法、またはt-ブタノール置換による凍結乾燥法を行い、標本を乾燥し、両面導電テープを貼った試料台に丁寧に載台した。これを白金パラジウムでコーティングした後に走査電子顕微鏡 (S4300SE/N, 日立ハイテクノロジーズ) で観察した。また、一部の標本については、開発中のリアルタイム3D-SEM (S-3700N, 日立ハイテクノロジーズをベースにしたもの、²¹⁾²²⁾を用いて視差のある2枚の画像を同時撮影し、コンピュータによりアナグリフ・ステレオ画像を作製した。

4. トマトレクチン蛍光標識法とトリブシン処理/SEM法の比較観察

エーテル麻酔下にラット尾静脈より0.1μg/0.1mlのFITC トマトレクチン (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA U.S.A) を注入した後、5分間放置し、その後すばやく4%パラホルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝, pH7.4) で5分間灌流固定した¹¹⁾。その後、素早く眼球を摘出し前眼部を切除した後、網膜摘出を行い、網膜色素上皮側を下に硝子体側を上にした状態でスライドグラスにマウントし、封入剤にて封入し蛍光顕微鏡で観察した。観察終了後、この標本を10%ホルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝, pH7.4) でさらに浸漬固定した後に、前述のとおり、トリブシン消化法を施行し、SEM観察標本とした。

結 果

トリブシン消化法はきわめて安定した方法で、

特にブタやラットの眼球をホルマリンで固定した標本では、網膜血管以外の組織がトリブシン処理で溶け去り、血管網の全載標本を効率よく作製することができた。この全載標本にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して光学顕微鏡で

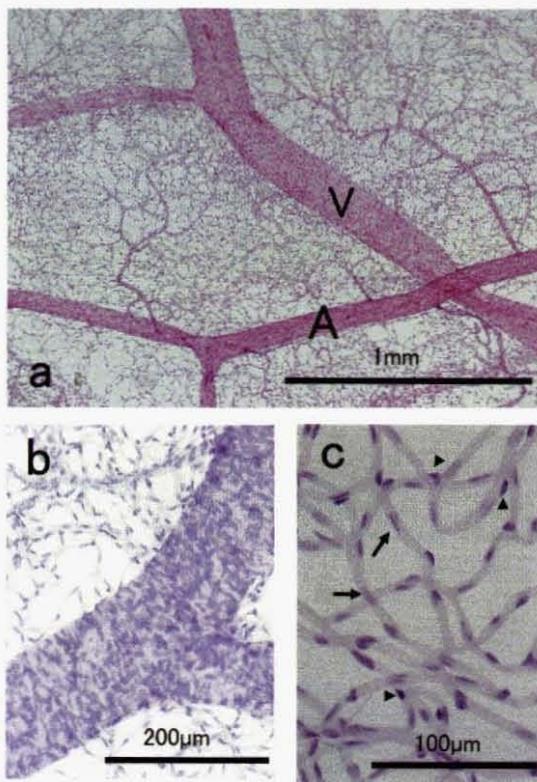


図1 トリブシン消化を施したブタ網膜血管全載標本の光学顕微鏡像 (H-E 染色)。トリブシン処理により網膜組織が消化され血管のみが単離された状態で観察が可能である。

- (a) 低倍像。血管の太さや壁の状態から動脈 (A) と静脈 (B) が区別される。動脈から細動脈が分枝し、さらに数回の分枝を繰り返して、毛細血管となる様子も明瞭に観察される。
- (b) 動脈の高倍像。紡錘状の核の配列から、血管平滑筋が動脈壁を輪状に取り巻く様子が観察される。
- (c) 毛細血管の拡大像。血管内皮細胞の核は毛細血管の内腔に沿った楕円形でヘマトキシリンにやや薄く染まっている (矢印)。一方、血管周皮細胞の核は血管の外壁側に突出し、ヘマトキシリンに濃く染まって見える (矢尻)。

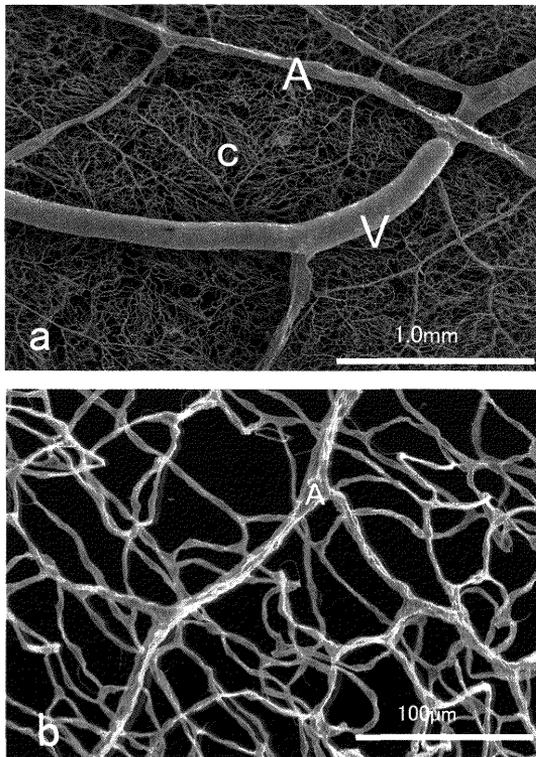


図2 ブタ網膜トリプシン消化標本のステレオ像
トリプシン消化により単離された網膜血管網の全体像が、血管鋳型標本と同程度に観察することができる。またステレオ観察により、網膜血管網の層構造をきわめて明瞭に観察することが可能である。
(a) 低倍像 動脈が数回の枝分かれをした後に、毛細血管へ移行し、その後、静脈系へと続く様子が鮮明に観察される。
(b) 高倍像 細動脈から毛細血管へと分岐し、3層の毛細血管網を構築している様子を三次元的に観察出来る。(A 動脈, c 毛細血管, V 静脈)

観察すると、血管の太さや配列、連続性から、動脈、毛細血管、静脈を比較的容易に区別することができた(図1)。また、ヘマトキシリンで染め出された核の配列様式などから、血管の内皮細胞、周皮細胞、平滑筋細胞の存在を知ることが可能であった(図1a, b)。特に、毛細血管の内皮細胞の核は、ヘマトキシリンに薄く染まり、毛細血管に沿って楕円形であるのに対して、周皮細胞の核は

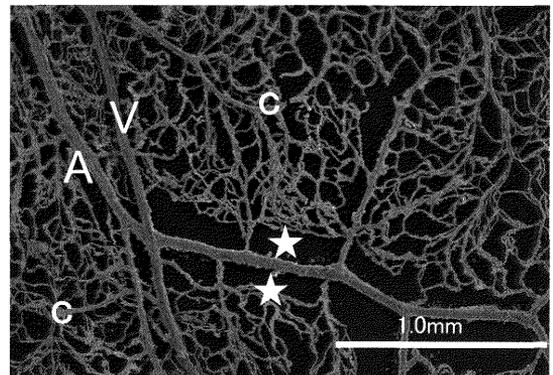


図3 ヒト網膜トリプシン消化標本のステレオSEM像

血管鋳型標本の作製が困難なヒト網膜に対しても、網膜血管の3次元観察が観察可能である。動脈周辺に毛細血管の存在しない領域(capillary free zone)が存在していることにも注意。(A 動脈, V 静脈, c 毛細血管, ★; capillary free zone)

濃く染まり、毛細血管の外壁に突出しているため、両者を区別することができた(図1c)。

次に、トリプシン消化法で単離した網膜血管網をSEMで観察する方法を検討した。単離した血管標本は非常に脆弱であり、乾燥までの処理については細心の注意が必要であった。また、乾燥に臨界点乾燥法とt-ブタノール凍結乾燥法を用いて比較したが、後者の乾燥法のほうが繊細な血管網の形状の維持に効果的であった。これにより、ラット、ブタ、ヒトのいずれでもトリプシン消化後に網膜血管網の3次元SEM観察が可能になった(図2, 図3, 図4)。

さらに、ステレオSEM観察法を用いることで、網膜毛細血管の層構造をより立体的に解析することが可能となった。その結果、ブタの網膜で毛細血管網が3層構造をなし、互いに移行する様子(図2b)や、ヒトの網膜の動脈周囲に毛細血管の欠いた領域があること(図3)などが、3次元的に明瞭に観察することができた。また本法ではしばしば血管内皮細胞や平滑筋細胞、周皮細胞の核がふくらみとして、または陰影として認められた。その結果、動脈の表面には血管平滑筋細胞が動脈

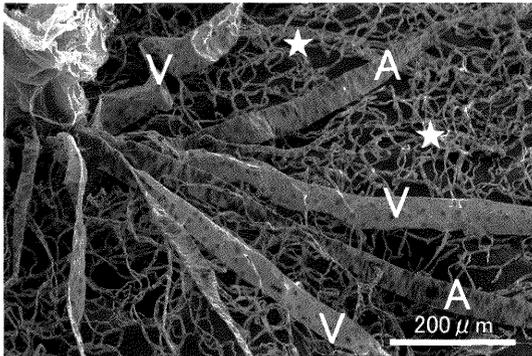


図4 ラット網膜トリプシン消化標本のSEM像
網膜の血管が、視神経乳頭部より末梢側に向かい放射状に伸びている様子が明瞭に観察できる。また、この写真では核が黒い陰影として観察されるため、その配列により動脈と静脈の区別も可能である。すなわち、動脈は平滑筋細胞の楕円状の核が動脈を輪状に取り囲んでいるのに対して、静脈は丸い核が血管外壁に散在している。(A 動脈, c 毛細血管, V 静脈)

を輪状に取り巻く様子が観察され、静脈では血管平滑筋細胞の細胞体と思われる円形の突出を血管外表面に認めた(図4)。一方高倍像では、ヒト、ブタ、ラットのいずれの標本においても血管表面を基底膜成分と思われる膜様の組織が被っており、血管平滑筋細胞や周皮細胞の形状を直接観察することが困難であった(図5a, b)。

次に、トマトレクチン蛍光標識法とトリプシン消化/SEM観察法を比較するために、最初にトマトレクチンを血管内に投与し蛍光観察した後にトリプシン処理を施し、同一部位を観察比較した。これにより、両者の画像で同一血管を同定することが可能なことから、トリプシン消化/SEM法では血管の配列がよく保たれていることが示された。さらにトリプシン消化/SEM法では立体的に血管網の配列を詳しく解析できることを示すことから、血管構築の詳細な解析に本法が有用であることが示された(図6a, b)。

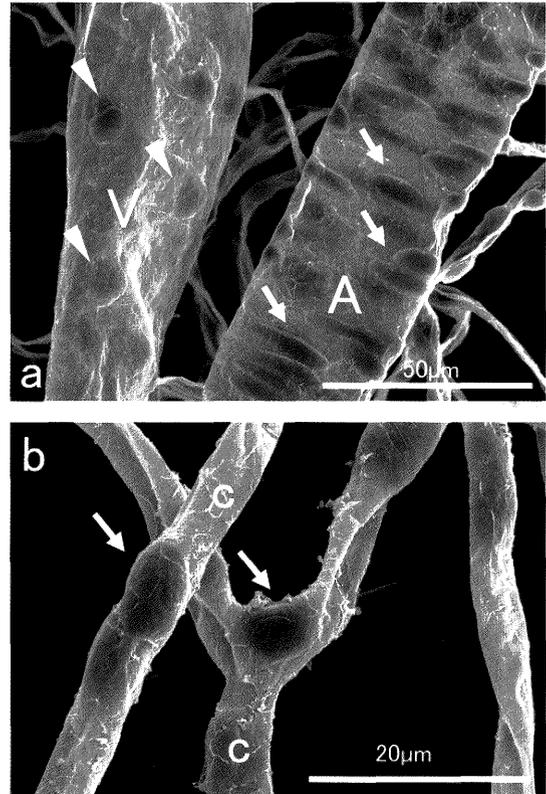


図5 ラット網膜トリプシン消化標本の動脈、毛細血管、静脈の高倍像

- (a) 動脈では輪走する血管平滑筋細胞の配列が認められ、静脈では血管を取り巻く平滑筋細胞の円形の核のふくらみが観察できる。しかし、全体は膜様構造で覆われており、微細構造の観察はできない。(A 動脈, V 静脈, 矢印 動脈の血管平滑筋細胞, 矢尻 静脈の血管平滑筋細胞)
- (b) 毛細管では血管周皮細胞を思わせるふくらみが毛細管の外壁に観察される。しかし、動脈、静脈と同様に膜様成分に覆われ、細胞質突起などの微細構造は直接観察することはできない。(c 毛細管, 矢印 血管周皮細胞)

考 察

トリプシン消化法による網膜血管全載標本の作製法は1960年にKuwabaraら¹⁾によって考案され、光学顕微鏡観察に広く利用されてきた¹⁾⁻¹⁰⁾。本研究では、この方法をSEM観察法に応用する

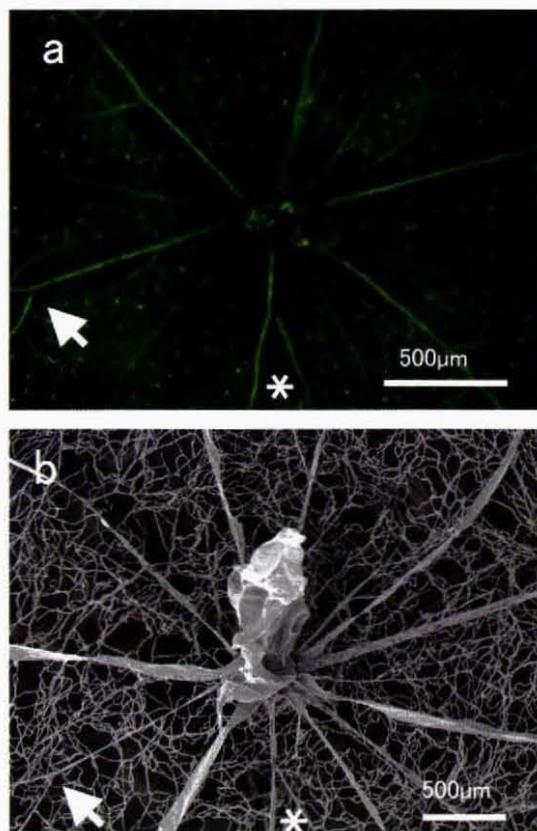


図6 FITC標識トマトレクチンを血管内に注入し蛍光顕微鏡観察(a)した後、同一標本をトリプシン消化/SEM観察(b)したものの

矢印、*はそれぞれ同一部位を示している。両者の対応から、トリプシン消化/SEM観察法の標本で血管が良好に保たれており、光学顕微鏡以上の分解能で観察可能であることがわかる。

ことによって、網膜血管の3次元配列をより詳細に観察する方法を検討した。その結果、ヒトの眼球とブタおよびラットの眼球において、いずれも網膜血管網を単離しSEM観察をすることを可能にした。

これまで網膜血管の3次元構造解析にはMurakamiらの報告した¹²⁾血管鋳型法によるSEM観察が広く行われてきた^{13)–18)}。しかしながら、既に述べたように、血管鋳型法では新鮮標本にあらかじめ半重合樹脂を血管注入する必要が

あり、固定保存標本には適さなかった。また、網膜血管の細動静脈と毛細血管網の全体に樹脂を行き渡らせるにはかなりの熟練を要し、ヒトに対しては新鮮眼球を用いる点で倫理的な問題や手技的な制限があった。一方、今回考案した方法は、摘出済みの眼球や固定後の眼球をしようできることから、多様な動物やヒトの眼球の病理標本などにも応用可能であるという大きな利点がある。さらに血管鋳型標本とほぼ同等に、しかも確実に網膜血管網の3次元観察が可能な点で優れた方法とみなすことができる。さらに本研究では、このトリプシン消化/SEM法を用いた標本をリアルタイム3D-SEMを用いて観察し、ステレオペア像によるアナグリフ観察の有用性を示した。網膜毛細血管の3次元配列の観察にはこの方法が極めて有効である。

また、今回開発したトリプシン消化/SEM法では血管壁を残してその外表面を直接観察できる点が魅力である。すなわち、これまで用いられてきた血管鋳型/SEM法では血管の内腔に樹脂を注入し、その鋳型を観察しているため、内皮細胞の核が血管内腔へ膨隆した部分が樹脂に型押しされることがあっても、血管壁そのものの構造を解析することは困難であった。しかし、トリプシン消化/SEM法では血管壁の細胞はすべて残されるため、血管壁を構成する内皮細胞、周皮細胞や血管平滑筋細胞の情報を得ることも可能である。しかし、今回の方法(トリプシン消化/SEM法)のみでは、血管の外表面が様々な程度の基底膜成分と思われる膜成分に覆われ、血管周皮細胞や血管平滑筋細胞の形態を完全には露出することはできなかった。その点で、現時点では同一標本を光学顕微鏡とSEMで観察をすることで、これらの細胞の分布を解析する方法が現実的である。一方で、これらの細胞の直接観察のためには、トリプシン消化後に何らかの追加処理を施し、基底膜成分を除去する工夫が必要である。血管の平滑筋細胞や周皮細胞の3次元SEM観察には、これまでKOH-コラゲナーゼ法ないしKOH法が広く用いられてきたことから^{23)–27)}、トリプシン消化法とこのKOH-コラゲナーゼ法の組み合わせ法

を現在検討中であるが、これについては改めて報告する予定である。

結 論

本研究では、光学顕微鏡観察法としてこれまで利用されてきたトリプシン消化法による網膜血管単離法をSEMに応用し、網膜血管網の3次元SEM観察を可能にする方法を開発した。このトリプシン消化/SEM法は、従来の光学顕微鏡観察と併用することができ、さらにSEM鋳型標本と同等の3次元構造解析が可能である。また、この標本のステレオ観察は血管網の三次元配列にきわめて有効である。さらにこの方法は鋳型標本の作製が不可能なホルマリン固定を施した病理標本や、鋳型注入ができない眼球の網膜血管網の立体構造解析に広く利用できることから、糖尿病網膜症の血管瘤をはじめとした多様な血管病態の解析に利用が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接のご指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科・牛木辰男教授に厚くお礼申し上げます。また甲賀大補助教を始めた同研究科・顕微解剖学分野の皆様のご協力に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Kuwabara T and Cogan DG: Studies of retinal vascular patterns. I. Normal architecture. Arch Ophthalmol 64: 904 - 911, 1960.
- 2) Kuwabara T, Carroll JM and Cogan DG: Retinal vascular patterns. III. Age, hypertension, absolute glaucoma, injury. Arch Ophthalmol 65: 708 - 716, 1961.
- 3) Kuwabara T and Cogan DG: Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. Arch Ophthalmol 69: 492 - 502, 1963.
- 4) Kuwabara T and Cogan DG: Retinal vascular patterns. VII. Acellular change. Invest Ophthalmol 4: 1049 - 1064, 1965.
- 5) Cogan DG, Toussaint D and Kuwabara T: Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. Arch ophthalmol 66: 366 - 378, 1961.
- 6) Toussaint D, Kuwabara T and Cogan DG: Retinal vascular patterns. II. Human retinal vessels studied in three dimensions. Arch Ophthalmol 65: 575 - 581, 1961.
- 7) Reinecke RD, Kuwabara T, Cogan DG and Weis DR: Retinal vascular patterns. V. Experimental ischemia of the cat eye. Arch Ophthalmol 67: 470 - 475, 1962.
- 8) Mutlu F and Leopold IH: The Structure of human retinal vascular system. Arch Ophthalmol 71: 93 - 101, 1964.
- 9) Mutlu F and Leopold IH: The structure of retinal vascular system of the human fetus eye. Arch Ophthalmol 71: 531 - 536, 1964.
- 10) Mutlu F and Leopold IH: Structure of the retinal vascular system of the dog, monkey, rat, mouse and cow. Am J Ophthalmol 58: 261 - 270, 1964.
- 11) 森川俊一, 江崎太一: トマトレクチンを用いた血管3次元イメージング法. 生体の科学 55: 266 - 272, 2004.
- 12) Murakami T: Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. Arch Histol Jpn 32: 445 - 454, 1971.
- 13) Bhutto IA and Amemiya T: Retinal vascular architecture is maintained in retinal degeneration: corrosion cast and electron microscope study. Eye 15: 531 - 538, 2001.
- 14) Bhutto IA and Amemiya T: Vascular changes in retinas of spontaneously hypertensive rats demonstrated by corrosion casts. Ophthalmic Res 29: 12 - 23, 1997.
- 15) Bhutto IA and Amemiya T: Retinal vascular changes during aging in Wistar Kyoto rats. Application of corrosion cast and scanning electron microscopy. Ophthalmic Res 27: 249 - 261, 1995.
- 16) Bhutto IA and Amemiya T: Corrosion cast demonstration of retinal vasculature of normal Wistar-Kyoto rats. Acta Anat 153: 290 - 300, 1995.
- 17) Pannarale L, Onori P, Ripani M and Gaudio E: Precapillary patterns and perivascular cells in the

- retinal microvasculature. A scanning electron microscope study. *J Anat* 188: 693 - 703, 1996.
- 18) Simoens P, Luc De Schaepdrijver and Lauwers H: Morphologic and clinical study of the retinal circulation in the miniature pig. A: Morphology of the retinal microvasculature. *Exp Eye Res* 54: 965 - 973, 1992.
- 19) 平山 章：走査電顕でみた細小血管瘤. 小坂樹徳編：糖尿病学, 診断と治療社, 東京, pp388 - 399, 1983.
- 20) Murakami T: A revised tannin - osmium method for non - coated scanning electron microscope specimens. *Arch Histol Jpn* 36: 189 - 193, 1974.
- 21) 牛木辰男, 伊東祐博, 伊藤 博, 岩田 太, 甲賀大輔：リアルタイム 3D 走査電子顕微鏡の医学生物学応用. *顕微鏡* 45: 198 - 201, 2010.
- 22) 牛木辰男：走査電子顕微鏡と細胞・組織の 3D イメージング技術の進展. *新潟市医師会報* 475: 1 - 8, 2010.
- 23) Hashizume H, Tango M and Ushiki T: Three - dimensional cytoarchitecture of rat pulmonary venous walls: a light and scanning electron microscopic study. *Anat embryol* 198: 473 - 480, 1998.
- 24) Higuchi K, Hashizume H, Aizawa Y and Ushiki T: Scanning electron microscopic studies of the vascular smooth muscle cells and pericytes in the rat heart. *Arch Histol Cytol* 63: 115 - 126, 2000.
- 25) Takahashi A, Ushiki T, Abe K, Houkin K and Abe H: Scanning electron microscopic studies of the medial smooth muscles in human major intracranial arteries. *Arch Histol cytol* 57: 341 - 350, 1994.
- 26) Takahashi A, Ushiki T, Abe K, Houkin K and Abe H: Cytoarchitecture of periendothelial cells in human cerebral venous vessels as compared with the scalp vein. A scanning electron microscopic study. *Arch Histol Cytol* 57: 331 - 339, 1994.
- 27) Ushiwata I and Ushiki T: Cytoarchitecture of the smooth muscles and pericytes of rat cerebral blood vessels. A scanning electron microscopic study. *J Neurosurg* 73: 82 - 90, 1990.

(平成 24 年 1 月 16 日受付)