組織培養法によるモルモット気管粘膜の 修復過程における細胞間結合の電顕的観察

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：夜陣紘治教授）

浜 井 行 夫

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON INTERCELLULAR CONNECTIVE STRUCTURES
DURING HEALING OF THE TRACHEAL MUCOUS EPITHELIA OF GUINEA PIGS
—BY MEANS OF TISSUE CULTURE—

YUKIO HAMAI, M.D

Department of Otorhinolaryngology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

Healing processes of the tracheal epithelia after minor mechanical injury in vitro were morphologically investigated by electron microscopy. Actin filaments in the epithelia, at the injured site, were observed by phalloidin.

The results are as follows.

- 1) The injured area was covered with one layer of epithelium within 48 hours and there were no mitotic figures.
- 2) The epithelial cells at the healing site were squamous and well developed.
- 3) Actin-filaments could be observed with well developed interdigitation.

In conclusion these findings suggest that areas of minor injury heal by sliding of cells surrounding the injured area. The development of interdigitation is considered to play an important role in this process. It seems that actin observed at the site of interdigitation development plays some role in this healing process.

Key words: 気管粘膜, 修復過程, 組織培養, phalloidin, Actin

A97—1504—71010

I 緒 言

気管粘膜は外界に通ずる器官であるため常に傷害因子にさらされている。そのため上皮に生じた傷害に対する修復機構が発達していることが推測される。一般的に気管粘膜上皮細胞は、他の臓器に比べ細胞回転速度が遅いが、傷害に際してはその速度は増加し、短時間で修復を完了するといわれている¹⁾²⁾。

気管粘膜の再生・修復過程に関しては、in vivo で広範囲に気管粘膜を機械的に搔爬した報告³⁾⁴⁾がある。それらの報告によると障害後2～3日目をピークとして基底細胞の増殖・分裂が生じ、約1週間で移動上皮による創面の被覆が完了するとされている。一方、実際

には、ごく小範囲の傷害も起こりうるが、この場合の粘膜修復機序に関しては報告がない。これは、in vivo において微小な気管粘膜に傷害を明視下に与えることが方法論的に極めて難しいためと考えられる。今回、摘出気管に100 μ m幅の傷害を与え、先に確立した組織培養法⁵⁾⁶⁾を用いて、その修復過程の、細胞の形態的变化とそれに伴う細胞骨格とくにアクチンフィラメントについてこれを安定化するファロイジン⁷⁾⁸⁾を用いて検討したので報告する。

II 実験方法

1. 組織培養法

動物はハートレイ系モルモット (体重 400g) 30匹を用いた。ペントバルビタール麻酔下で失血死させた後、摘出した気管を 1/3 周径×3 気管輪幅に細切した。その後 Phosphate Buffer Saline (PBS) 内で内膜中央部を 100 μ m 幅のカミソリにて傷害を与え、以下の培地で 37°C, CO₂5%, O₂95% インキューベーター下で培養した。培地は Dulbecco's Modified Essential Medium (D-MEM) と Ham-F-12 等量混合液にハイドロコチゾン 0.1 μ m/ml, ウシインスリン 1 μ m/ml, トランスフェリン 5 μ g/ml, Epidermal Growth Factor (EGF) 20ng/ml, Fetal Bovine Saline (FBS) 1%, ペニシリン 200units/ml, ストレプトマイシン 200 μ g/ml, アンホテリシン B 2.5 μ g/ml, ホスホマイシン 100 μ g/ml を添加した。粘膜傷害を与えた気管片をマルチウエル内に敷いたコラーゲンゲル (I 型コラーゲン <koken 製 CELLGENI-PC>: HEPES-buffer: 10 倍濃度培地=8:1:1) 上に載せて、培養液を加えて培養した。

2. 小範囲傷害気管粘膜の観察

細胞間結合を観察するために透過型電子顕微鏡 (TEM) 用の試料に Luft⁹⁾¹⁰⁾ によるルテニウムレッド染色を行った。上皮に傷害を与えた気管片を 0.05% ルテニウムレッドを含む 1.2% グルタルアルデヒド (0.03% カコジル酸バッファー pH=7.3) で 1 時間固定し、次いで同バッファーによる 0.05% ルテニウムレッド加 1.7% オスミウム酸にて 3 時間固定後上昇エタノール系列で脱水し、エポン包埋を行った。これより超薄切片を作製し、まず、光学顕微鏡 (光顕) により傷害部周辺の観察を行い、その後、未染色で TEM (JEM 100CX II) にて観察した。さらに、細胞内構造を観察するために、一部の試料は酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を行った。

3. 傷害部周辺細胞骨格の観察

傷害部修復過程の細胞の形態的变化に伴う細胞骨格とくにアクチンフィラメントの観察には F-アクチンに特異的に結合し安定化させるファロイジン⁷⁾⁸⁾を用いた。ファロイジンは蛍光色素 Fluorescein Iso-thiocyanate (FITC) でラベルされたものを用いた。48 時間培養した摘出気管を 0.5% Triton-X-100 で 10 分処理し、50% グリセリンリン酸バッファー (50mM KCl, 5mM MgCl₂, and 6mM sodium phosphate buffer, pH7.2) 15 時間、25% グリセリンリン酸バッファー 1 時間、10 μ m ファロイジンを含む 5% グリセリンリン酸バッファーに 1 時間浸漬させた¹¹⁾ 後、1/4

カルノフスキー液にて固定した。その後、一部の試料は、リン酸バッファーで洗浄、アルコール系列で脱水、JB-4 樹脂に包埋し、LKB ミクロトームで 4 μ m 厚の薄片を作製し落射蛍光装置 EDF2, 顕微鏡 OPTIPHOT2 にて観察した。また、TEM 観察には光顕と同様にファロイジン処理した後、1/4 カルノフスキー液で固定した試料をカコジル酸バッファー 1 時間、1% オスミウムで 3 時間固定、10% サッカロースで洗浄後、1% 酢酸ウランにてブロック染色、アルコール上昇系列で脱水しエポン包埋し、超薄切片を作製した。

III 結 果

細胞内骨格に対する観察最適期選定のための予備検討の結果、傷害 24 時間後では傷害部は上皮はなお欠損していた。48 時間後になって、傷害部は一層の上皮で被覆されており、その部には脱落しつつある細胞がみられた。また、傷害部周辺の細胞を観察すると、正常部に比べ細胞配列は不規則となり個々の細胞の丈は低くなっていた。また、傷害部周辺の細胞の核には mitosis は認められなかった (図 1)。このことより、今回の観察では傷害後 48 時間について検討した。

TEM による観察では、傷害部を被覆した上皮の上に脱落しつつある細胞がみられ (図 2)、その細胞間を観察すると、被覆上皮細胞からは多くのひだ状の突起が出ており、一方、脱落細胞側は比較的平坦で、細胞間結合の破綻した像を呈していた (図 3)。

ルテニウムレッド染色では、傷害部周辺の細胞は扁平不規則な形態をしており、細胞間には著しく発達した interdigitation が観察された (図 4)。細胞頂部の接着複合体およびデスモゾームは正常であった (図 5)。

一方、非傷害部では細胞配列は整然とした多列上皮形態を保っていると同時に細胞間結合は、傷害部ほど発達しておらず、interdigitation は、正常粘膜と同様であった (図 6)。細胞頂部と接着複合体および細胞側面のデスモゾームも保たれていた (図 7)。

ファロイジンを用いたアクチンフィラメントの観察では、蛍光顕微鏡像において、FITC でラベルしたファロイジンが、非傷害部の線毛細胞表面近傍で、小腸上皮でみられるアクチンフィラメントを含む terminal web 様のベルト状構造物に集積し蛍光していた (図 8, 9)。

傷害部での蛍光顕微鏡による観察では明確なアクチンフィラメントの局在は認められなかったが、TEM による観察では、傷害部周辺の変形した細胞の細胞間

では、発達した interdigitation の細胞膜に tonofilament (径90~100 Å) の付着がみられるとともに、裏打ち構造としてファロイジンにより可視化された径30 Åのアクチンフィラメントの存在が確認された(図10, 11, 12)。

非傷害部を観察すると、細胞頂部において蛍光顕微鏡でみられたアクチンフィラメントが集積したベルト状の構造物に対応した部には、ファロイジンを用いない通常の TEM 標本作製法ではアクチンフィラメントは認められなかったが(図7)、ファロイジンにより前処置をした標本ではアクチンフィラメントの集積が明瞭であった(図13)。また、隣接細胞間には傷害部のような interdigitation の発達はなく、細胞膜の裏打ち構造としてのアクチンフィラメントはわずかであった(図14)。

IV 考 察

気管粘膜の傷害には、外界よりの物理的、化学的刺激による小範囲の傷害が常に発生している。in vivo においてはこのような小範囲の傷害の実験的観察は方法的に再現が困難である。広い範囲の傷害時の気管粘膜修復過程についての報告は in vivo で、Keenan³⁾、服部、弓削ら⁴⁾の報告がある。それによれば、まず傷害部近傍の細胞の増殖がおこり、移動上皮として傷害部を被覆することがわかっており同様の所見を私は in

vitro で得ることができた⁵⁾。今回その組織培養法を応用し、気管片に小範囲の傷害を与え、その修復過程を観察した。今回の観察の結果、傷害部は24時間後ではなお傷害部は欠損したままであったが、48時間ですでに単層上皮で被覆されていた。修復部およびその周辺の細胞は扁平で、広い範囲の傷害に際しての修復⁵⁾と異なり、傷害部を周辺の細胞が短時間で移動し被覆する修復機序が推測された。

Jinguji¹¹⁾ はマウスの胃粘膜において、アルコール注入による胃粘膜傷害30分後に、脱落欠損部を両側の隣接する残存粘膜先端が架橋し合い、早期に表面上修復した後、粘膜下の空隙が結合組織で充填されると述べている。この修復機序は細胞増殖が存在しない修復過程である。小範囲の傷害では、上皮細胞は増殖せず、直接周囲の上皮細胞が連結移動することにより、短期間に被覆されることが他の臓器の粘膜修復過程においても報告されている¹²⁾。今回の観察においては、胃粘膜でみられるような架橋や粘膜下の空隙は認められなかったが、傷害部の粘膜は培養48時間後にすでに、基底膜上一層の扁平化した細胞群で被覆されており、また mitosis を示す細胞核はみられず増殖を示す所見は認められなかった。このことは気管粘膜においても、小範囲の傷害を受けた場合、細胞の増殖を伴わない傷害部周辺の細胞の移動によって修復されることを示すものである。

傷害部周辺の細胞間では、ルテニウムレッド染色により、interdigitationの発達が明瞭に観察された。ルテニウムレッドは細胞表面の糖衣を特異的に染色し、特に酸性複合糖質と静電的に結合し細胞間隙に侵入する。一般的に正常の細胞膜や上皮間の細胞頂部の tight junctionは通過しないとされており¹³⁾、細胞間への侵入は、細胞間接着の開離を示すものである。しかし、この部の tight junctionはルテニウムレッドで染まっておらず、細胞間結合は保たれていることを示していた。すなわち、傷害部を被覆するために移動する細胞は扁平化するが、その非傷害部の細胞間結合は保たれているとともに、interdigitationはさらに発達することが示された。細胞間結合が破綻していないにもかかわらず、細胞間にルテニウムレッドが侵入したことは、侵入経路が基底側よりのものであったと考えられた。すなわち、傷害部の修復は、両方向より移動する残存上皮細胞の接合により完了するが、48時間後では傷害部を被覆した細胞接合部での結合はなお完成しておらず、その部よりルテニウムレッドが侵入し、基底部を通り傷害部周辺の細胞間に達したものと考えられた。

一方、傷害部より離れるにしたがって細胞は本来の円柱状を呈しており、interdigitationは正常組織のそれと同様であった。interdigitationは、側面細胞膜の有効面積を広げる役割を果たすといわれている¹⁴⁾が、今回、傷害部周辺の扁平な細胞の細胞間でのみ著しい発達がみられたことは、傷害部を被覆するための細胞の移動と interdigitationの発達に深い関係があることを示唆していると考えられた。

細胞移動に際しては、普通、修復部先端の細胞は扁平状に変形し移動し、その際の、細胞の変形には細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントの重合が活発になることが、報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。細胞の移動は細胞質全体に分布したアクチンフィラメントの方向性をもった重合によりなされるが、移動するための細胞の変形は細胞膜の変形によってなされるわけであり、その変形にもアクチンフィラメントが関与していると考えられる。今回観察された interdigitationの発達にも、アクチンの関与が強く示唆されるものである。

このようなアクチンの関与を検討する目的でファロイジン¹⁰⁾を用いて検索したところ、非傷害部の細胞表面の近傍に小腸の terminal web¹⁷⁾に類似したベルト状の構造物が認められ、アクチンフィラメントの集積がみられた。

傷害部周辺では発達した interdigitationの膜の裏

打ちとして30 Å径のアクチンフィラメントの集積がみられた。それに対して非傷害部の細胞間では interdigitationは観察されず、しかもアクチンフィラメントによる細胞膜の裏打ちはみられなかった。このことは、傷害部周辺の、特に細胞隣接面の細胞膜では、interdigitationの形成にアクチンフィラメントが必要であることを示唆するものと考えられる。さらに、アクチンフィラメントは interdigitationの細胞膜の裏打ちをしており、変形した細胞を保持しているものと考えられた。

服部、弓削ら¹⁸⁾¹⁹⁾は広い範囲の傷害において傷害部周辺の細胞の細胞間隙は拡張しデスモゾームが少なく、上皮細胞は弱い接着状態で移動し傷害部を修復すると述べている。

これに対して今回の小範囲の傷害における観察では、デスモゾームは保たれ、かつ細胞間は密着し、interdigitationの発達がみられる対照的な像を呈していた。これは細胞増殖を伴わない細胞移動による修復初期過程の特徴であると考えられた。

V ま と め

モルモット摘出気管における小範囲の傷害の修復過程を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 傷害部は48時間で被覆されており、かつその周辺の細胞核には分裂像はみられなかった。
- 2) 被覆上皮細胞は扁平であり、interdigitationの発達がみられた。
- 3) interdigitationにはファロイジン処理により明瞭なアクチンフィラメントの裏打ちが認められた。

以上のことから、小範囲の傷害は周辺の細胞の移動により修復され、その移動の際にはアクチンが関与する interdigitationの発達が深くかかわっていることが示唆された。

文 献

- 1) Koberg E: Autoradiographische untersuchungen zur Zellneubildungsrate an den Epithelien des oberen Respirations und Verdauungstraktes. Arch Ohr Nas Kehlkopfheilk 180: 616-621, 1962.
- 2) Blenkinscopp WK: Proliferation of respiratory tract epithelium in the rat. Exp Cell Res 46: 144-154, 1967.
- 3) Keenan KP, Coobs JW, McDowell EM: Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. Virchows Arch [Cell Pathol] 41: 193-

214, 1982.

- 4) 服部 康夫, 中村 兼一, 村上 忠也, 渡辺 充, 弓削庫太: 気管粘膜の再生・修復に関する電顕的観察. 日耳鼻 85: 891-902, 1982.
- 5) 浜井行夫: 組織培養法によるモルモット気管粘膜の再生過程に関する研究—BrdU 免疫組織化学的観察—. 日耳鼻 97: 84-89, 1994.
- 6) 竹野幸夫: モルモット中耳粘膜の組織培養—コラーゲンゲル法による中耳腔の部位別増殖能力の差に関する検討—. 日耳鼻 93: 2038-2048, 1990.
- 7) Katoh K, Ichikawa H, Ichikawa H: Electron microscope visualization of actin filament in the early embryo of drosophila melanogaster: The use of phalloidine and tropomyosin. J Electron Microscope 40: 70-75, 1991.
- 8) 黒田正明: ファロイジンとアクチン. 細胞 18: 272-275, 1986.
- 9) 二宮優子: Mendelson 症候群の基礎的研究. 日気食 42: 7-19, 1991.
- 10) Luft JH: Ruthenium red and violet. II, Fine structural localization in animal tissue. Ant Rec 171: 369-419, 1971.
- 11) Jinguji Y: Effect of phalloidin on the epithelial regeneration in the mouse gastric mucosa. J Electron Microsc 41: 144-154, 1967.
- 12) Kuwabara T, Perkins DG, Corgan DG: Sliding of epithelium in experimental corneal wounds. Investigative ophthalmology 1: 4-14, 1976.
- 13) Dierichs R: Ruthenium red as a stain for electron microscopy. Some new aspect of its application and modes of action. Histochemistry 64: 171-187, 1979.
- 14) 藤田尚雄, 藤田恒夫: 標準組織学. 総論 2 版, 医学書院, 1981.
- 15) Alberts B, Bray D, Levis J et al: The cytoskeleton. Molecu Biol Cell: 550-610, 1983.
- 16) Staehelin LA: 特集 新しい細胞像, 膜と細胞 30: 別冊 サイエンス, 日本経済新聞社, 1980.
- 17) Nishikawa S, Kitamura H: Actin filament in the terminal wed of secretory ameloblast of rats: Arch biol 30: 13-21, 1985.
- 18) 山城義昭, 弓削庫太, 服部康夫, 村上享司, 沢井 尚他: 気管粘膜再生に関する実験的研究. 日気食 27: 336-349, 1976.
- 19) 弓削庫太, 永野泰宏, 服部康夫, 村上享司, 沢井 尚: 掻爬気管粘膜の修復に関する電子顕微鏡的観察. 耳展 18 (補 3): 255-267, 1975.

稿を終えるにあたり, ご指導, ご校閲を賜りました恩師 原田康夫学長に深甚なる誠意を表します. また, 絶えずご指導とご助言を頂きました夜陣紘治教授, 平川勝洋講師, 竹野幸夫先生, 春日繁男研究員に深く感謝いたします.

(1994年 3月10日受稿 1994年 6月 9日受理 急載)

別冊請求先 〒734 広島市南区霞1-2-3

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 浜井行夫

付 図 説 明

- 図 1 小範囲傷害気管粘膜 光顕像 48時間培養
傷害部は一層の上皮で被覆されており (矢印), 傷害部周辺の細胞は, 細胞配列が不規則となっていた. また, 細胞の核には mitosis は認められない.
- 図 2 傷害部ルテニウムレッド染色 TEM 像
(bar=10 μ m)
傷害部を被覆した上皮の上に脱落しつつある細胞がみられる (矢頭).
- 図 3 傷害部ルテニウムレッド染色 TEM 拡大像
(bar=3 μ m)
脱落しつつある細胞間では, 被覆上皮細胞からは多くのひだ状の突起が出ているが, 脱落細胞側は比較的平坦である.
- 図 4 傷害部ルテニウムレッド染色 TEM 像
(bar=5 μ m)
傷害部周辺の細胞は扁平不規則な形態を呈し, 細胞間は著しく発達した interdigitation が観察される.
- 図 5 傷害部ルテニウムレッド—ウラン—クエン酸鉛染色 TEM 像 (bar=3 μ m)
細胞頂部には接着結合体 (矢印), デスモゾーム (矢頭) が認められる.
- 図 6 非傷害部ルテニウムレッド染色 TEM 像
(bar=3 μ m)
非傷害部では, 細胞配列は整然とした多列上皮形態を保っており, 細胞間結合は正常粘膜と同様である.
- 図 7 非傷害部ルテニウムレッド—ウラン—クエン酸鉛染色 TEM 像 (bar=3 μ m)
細胞頂部の接着接合体 (矢印) およびデスモゾーム (矢頭) が認められる.

図 8 非傷害部 FITC 標識ファロイジン蛍光顕微鏡像

FITC でラベルしたファロイジンが線毛細胞表面近傍で、アクチンを含む terminal web 様のベルト状構造物に集積している (矢印)。

図 9 図 8 トルイジンブルー染色像

図 8 でファロイジンが蛍光を発していた部 (矢印) は線毛細胞頂部と確認できる。

図10 傷害部ファロイジン処理 TEM 像 (bar=5 μ m)

傷害部周辺の変形した細胞の細胞間では、発達した interdigitation の細胞膜に tonofilament (径90~100Å 径) の付着がみられる (矢印)。

図11・12 傷害部 interdigitation 部ファロイジン処理

TEM 拡大像

(図11 bar=0.5 μ m, 図12 bar=0.2 μ m)

interdigitation の細胞膜に tonofilament の付着 (矢印) と裏打ち構造としてのアクチンフィラメントが認められる (矢頭)。

図13・14 非傷害部ファロイジン処理 TEM 像

(図13 bar=3 μ m, 図14 bar=1 μ m)

非傷害部において、細胞表面近傍でベルト状に集積したアクチンフィラメントが認められる (矢印)。interdigitation の発達はなく、細胞膜裏打ち構造としてのアクチンフィラメントはわずかである (矢頭)。