気道粘液纖毛系の走査電顕的 X 線微量分析

山本 真平*・大山 勝**・谷口 強*・山田 清治*

A Scanning Electromicroscopic and X-ray Microanalytical
Study of the Respiratory Muco-ciliary System

Shinpei Yamamoto, Tsuyoshi Taniguchi and Seiji Yamada

(Mie University)

Masaru Ohyama

(Kagoshima University)

The tracheal mucosae of the mouse, rat, rabbit and human were studied with a scanning electromicroscope and an X-ray microanalyzer (EDX). Small amounts of calcium were detected on the cilia and ciliated area of the surface cell. Large amounts of sulfur and phosphorus were detected on the mucous layer and the hypersecreting cells. This was confirmed with ruthenium-traced specimens. Occasionally, silica was found on the muco-ciliary system and large amounts of phosphorus were found on the Clara cells of rats.

I 結 言

近年、電子顕微鏡の発達、普及には、めざましいものがある。光学顕微鏡分野において、微細構造と細胞化学あるいは細胞生理学との関連性を追求しようという試みから組織化学が発達してきた。同様に電顕分野においても超微細構造の観察と共に細胞ないしは組織中に含まれる元素を同定し、機能を合せて究明しようとするために最近、医学生物学の分野においても、電顕に X 線微量分析を併用した研究が台頭しつつある^{1)~9)}。今回、気道粘液纖毛系に走査電顕とエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザー (EDX) を応用し、若干の興味ある成績を得たので報告する。

II SEM 像と X 線マイクロアナライザー

図 1 にしめすように、試料に高圧電子ビームを照射すると反射電子線、二次電子線そして X 線などが発生する。この反射電子線及び二次電子線からモニターブラウン管上に投写して、SEM 電顕像が得られる。その X 線からエネルギー、波長等を調べることにより、試料中に含

まれる元素が同定される。これが、それぞれ、エネルギー分散型 X 線マイクロアナライザー (EDX) 及び波長分散型 X 線マイクロアナライザー (WDX) である。EDX は、各元素から発生した特性 X 線を半導体検出器を通すとエネルギーに対応した電荷が発生し、プリアンプで増

*三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 三吉康郎教授)

**鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 大山勝教授)

図1 X線マイクロアナライザー原理図

巾された後、マルチチャンネル波高分析器においてエネルギー選別が行われ、ブラウン管上に各元素の特性スペクトルとして表示できる。またWDXは、各元素から発生した特性X線を分光結晶に通して、目的とするX線のみを選別し、これをアンプにて電気信号に変換し、増巾を行い、波高選別を行って、ブラウン管上又はチャート上に表示する。EDXでは、短時間内

に目的とする試料面に含まれる各元素を同定することが可能なために試料の損傷が比較的少なく、又、その元素の大まかな定量も可能である。一方、WDXは、目的とする元素の詳細な定量が可能ではあるが、分析に非常に時間がかかるため電子被曝量が多い欠点がある。以上のことから我々のごとく生物系の領域においては、EDXが適していると思われる。

Ⅲ 研究方法

1) マウス、ラット、家兎およびヒト気管粘膜上皮を採取し、2.5% グルタルアルデヒド (カコジレート緩衝液 pH7.3%) で4時間固定し、型のごとくアルコール列にて脱水、CPD後、当初は、カーボンを単独蒸着し、まずX線微量分析を行った後、同一試料に対して金によるイオンスパッタリングを追加し、SEM像を撮影することにより、両者の比較対応を試み

た。

2) DS系のマウスに 10^{-3} または 10^{-4} 倍稀釈肺炎桿菌およびHVJウイルスをそれぞれ鼻内接種法にて感染させ72時間後組織を摂取した。また、必要に応じて、約50ppmのルテニウムレッドを2.5% グルタルアルデヒドに混入しルテニウム元素の局在をtraceした。

Ⅳ 研究成績および考按

気管粘膜上皮の繊毛部をX線微量分析するとS、P元素の他にCa元素が検出された。また繊毛細胞をアルコール切断した標本についてX線微量分析を行うと、繊毛叢部には、胞体部に比してCa元素が優位に存在した(図2)。通常、声門下腔では、繊毛細胞は減少し、無繊毛

細胞の占める領域が増加する²⁾(図3)。このように繊毛細胞の少ない部位をX線微量分析するとS、P元素のみで、Ca元素は、ほとんど観察されなかった(図4)。以上の観察成績から、Ca元素は、繊毛細胞、特に繊毛叢と深い関係を有することが、示唆される。事実、Caイオ

図2 纖毛細胞断面のCaについての線分析
($\times 9000$)

図4 声門下腔の元素分析成績

図3 声門下腔 ($\times 4000$)

図5 HVJ ウイルス感染マウスの気管粘膜
($\times 4000$)

ンと纖毛, 特に, その運動機構や形質膜上の糖衣と密接な関係があるとする報告¹⁰⁾にてらして, 甚だ興味深い。

マウスを用いて肺炎杆菌あるいは, HVJ ウイルスを感染させた両群では, 気管粘膜上皮に散在性ではあったが, 纖毛数が著しく減少し, かつその先端がちぢれたり, 短小化した纖毛を有する細胞や微纖毛の膨化した無纖毛細胞が, 円蓋状に突出した像が観察された(図5, 図6, 図7)。このように, 微生物感染後, 分泌機能の亢進状態を思わせる無纖毛細胞を選択的

に, X線分析すると, コントロール群のそれに比して, S元素が異常に多量に検出された(図8)。さらに, われわれの考案によるグルタルアルデヒドとルテニウムレッド混合液を用いた固定試料では, 正常マウスの気管纖毛上皮では, 纖毛打の方向性は十分保たれ, かつその先端部には, 顆粒状の粘液附着像が観察される(図9)。これに対して, HVJ ウイルス感染マウスの気管上皮では, 無纖毛細胞の分泌亢進像とともに, 纖毛細胞の纖毛表層には, 繊維状の網目状構造と微細顆粒を有する粘液層が観察さ

図6 肺炎杆菌感染マウスの気管粘膜 (×3000)

図7 HVJ ウイルス感染マウスの気管粘膜 (×6000)

図8 分泌機能亢進細胞の元素分析成績

図9 正常マウスの気管粘膜上皮 (ルテニウム処理) (×5000)

れた(図10). このような所見は, 恰も粘液層におけるゲル層と繊毛との相互関係をより立体的に表示し得たものとして甚だ興味深い. 加えてこれらの試料のX線微量分析成績では, ルテニウムは勿論, SやP元素が明らかに多く検出され(図11), 気管粘膜上皮の粘液層すなわち分泌物が, 硫酸基を有するムコ多糖体を主成分とすることを強く暗示するものである. ところで, 正常家兎, マウスおよびヒトの気管粘膜上皮のX線微量分析成績で, 時に微量ではあるが, Si元素を検出する例が少なくない(図12). 元

来, 硫酸基を有する多糖体と蛋白が結合するのに Si をブリッジにして巨大な分子構成をもつアミノグリカゴンが形成され, これが, 生体内に存在することが知られているので, この Si は単なるアーチファクトとも断定できず, むしろ生体内に微量ではあるが存在しながら粘液繊毛機能に重要な役割を演じているとの解釈も否定できない. 図13は, 正常ラット終末細気管枝のクララ細胞をしめし, このクララ細胞を選択的にX線微量分析した場合, 図14のごとく, Sの他に, 特に, P元素に著明なピークがみられ

図10 HVJ ウイルス感染マウスの気管粘膜
(ルテニウム処理) (×5000)

図12 正常家兎気管粘膜の元素分析成績

図11 HVJ ウイルス感染マウス気管粘膜の
元素分析成績 (ルテニウム処理)

図13 正常ラット終末細気管枝のクララ細胞
(×9000)

図14 クララ細胞の元素分析成績

る。これまで, surfactant の化学組成については, レシチンより成るリン脂質とする説が支持されているので, 今回, 全く異った新しい手法

により, 改めてその見解の一面を支持し得る有力な証拠を提供し得たものといえよう。

V 結 語

マウス, ラット, 家兎およびヒトの気管粘膜上皮を走査電顕的 X 線微量分析を行った結果,

1. 正常絨毛叢には, 無絨毛域に比して Ca 元素が多く検出された。
2. 粘液層, または, 分泌亢進細胞では, S および P 元素が多くみられた。この所見は, ルテニウムレッド処理によっても裏づけられた。
3. 粘液絨毛系においては, 特に Si 元素を検出する例が少なくなかった。
4. クララ細胞においては, S 元素以外に, 特に P 元素の分布が顕著であった。

稿を終るに臨み, 御校閲を賜った恩師三吉康郎教授に深甚なる謝意を表します。

(本論文の要旨は, 第78回日本耳鼻咽喉科学会総会において講演した。)

文 献

- 1) 大山勝, 他: 気道粘液絨毛系の走査電顕的研究. 医学生物学のための走査電顕シンポジウム記録 5: 47~48, 1976.
- 2) 山本真平: 気管呼吸の気道粘膜表面微細構造におよぼす影響に関する研究. 耳鼻臨床73: 1363~1378, 1980.
- 3) 大山勝, 他: 鼻結石の表面微細構造と元素分析成績. 耳鼻と臨床25: 779~789, 1979.
- 4) 谷口強, 他: 唾石の走査電顕的観察と構成元素分析. 耳鼻と臨床25: 757~764, 1979.
- 5) 大山勝: 超微細構造研究の進歩—走査電顕的観察を中心に—第3回耳鼻咽喉科学講習会テキスト: 39~55, 1977.
- 6) Taniguchi T, et al: Scanning electron microscopic and X-ray microanalytical studies of sialoliths and rhinolith. J Clin Electron Microscopy 10: 725, 1977.
- 7) 原田康夫: 耳石の代謝障害と耳石の呼吸部位について. 医学生物学のための走査電顕シンポジウム記録 5: 61, 1976.
- 8) 牧田登之: ウズラ卵殻の SEM 像と X 線微量分析. 医学生物学のための走査電顕シンポジウム記録 5: 67, 1976.
- 9) 井上一, 他: 軟骨石灰化症の結晶成分の分析. 医学生物学のための走査電顕シンポジウム記録 6: 57, 1977.
- 10) 太田行人, 他: 細胞の構造と機能 1. p. 68, 現代生物科学 3, 岩波書店, 東京, 1975.

(別刷請求先: 山本真平
〒514 津市江戸橋 2-174
三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室)