サポニン灌流法による前庭感覚上皮細胞の細胞骨格構造の観察

工田 昌矢¹⁾・宮脇 浩紀²⁾・原田 康夫³⁾Cytoskeletal Organization of the Vestibular Sensory Epithelia
Revealed by Using Saponin Perfusion Method

Masaya Takumida

(WFAC Hiroshima General Hospital)

Hironori Miyawaki

(Hiroshima University)

Yasuo Harada

(Hiroshima University)

The cytoskeletal organization of the guinea pig vestibular sensory epithelial cells was investigated using the saponin perfusion method under a scanning electron microscope. The skeletal framework of a cell is composed of thin (actin or intermediate filaments) and thick filaments (microtubules). The membrane bound organelles such as the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, secretory granules, desmosomes etc. were also well demonstrated. This facilitates investigation of three-dimensional structures of cytoskeletons as well as their complex interactions with various membranes bound organelles. Therefore, this technique may provides further information about distribution, topographic relationships and the functional role of cytoskeletons.

Key words: cytoskeleton, vestibule, scanning electron microscopy, inner ear, guinea pig

緒 言

前庭感覚上皮の細胞内構造の三次元的観察はこれまで主として走査電顕を用いて成されており、感覚細胞あるいは支持細胞の内部のミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置といった膜性の小器官の構造については明瞭に描出されている¹⁾。一方、近年、細胞内の線維状構造、すなわち細胞骨格に対する関心が内耳でも大きくなってきており、その構造や機能についても種々

の研究が成されている^{2)~9)}。細胞骨格は細胞を構造的に支持する細胞質要素として細胞あるいは細胞内構造の形態、機能に強く関わっている。これら細胞骨格を主として構成する要素としては微小管、中間径フィラメント、アクチンフィラメントの3種の線維性構造があり、加えてそれらを連結する多くの構造がある。これらのフィラメントは細胞内で複雑なネットワークを形成しており細胞の機能に強く関与している。前

1) 広島県厚生農業協同組合連合会広島総合病院耳鼻咽喉科

2) 広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室

3) 広島大学

庭感覚上皮細胞の形態と機能に関してはこれまで電顕、或いは組織化学的手法を用いて様々な研究が行われているがその細胞骨格構造、とりわけその三次元的配列については不明な点が数多く残されている。そこで、今回、我々はサポニン灌流法を用いて前庭感覚上皮細胞細胞骨格の三次元構造を走査電顕により観察したので報告する。

研究方法

実験にはプライエル反射正常の成熟、有色モルモット(体重 250~300 g)を使用した。動物はネブタールにて深麻酔後0.1%サポニンを含む PHEM 緩衝液(pH 7.0)¹⁰⁾にて心腔内より灌流の後、直ちに側頭骨を摘出し、末梢前庭器を摘出した。試料は0.1%サポニンを含む0.5%グルタルアルデヒド、0.5%パラホルムアルデヒドの等量混液(PHEM 緩衝液, pH 7.0)にて15分間固定した。ついで、25% dimethyl sulfoxide (DMSO)にて30分間、50% DMSOにて1時間置換後、液体窒素中で凍結切断を行い0.5%オスミウム酸(0.1 M リン酸緩衝, pH 7.0)にて後固定、0.5%タンニン酸、0.5%オスミウム酸にて導電染色後、エタノール系列にて脱水、t-butyl alcohol 凍結乾燥を行い、白金にて20 Aの厚さでスパッタコーティングを施し走査電顕用試料とした^{11)~14)}。尚、試料の観察には Hitachi S800 形走査電顕を加速電圧 25 kv で使用した。

結 果

サポニン灌流法を使用して末梢前庭器の試料作製を行った結果、細胞内の膜性構造物に加えて種々の線維状構造物の観察が可能であった。

弱拡大では透過電顕像と同様に感覚細胞、支持細胞およびそれらの附属器官が明瞭に観察された(図1)。微細構造の保存状態はサポニン処理の効果によって異なり、効果の高い細胞とそうでない細胞とがモザイク状に混在していた。サポニン処理の効果の高い細胞で認められた細胞内の線維状構造はその径と分布状態より太径フィラメントと細径フィラメントの2種類に分

類された。太径フィラメントの直径は25~30 mm(真の直径+白金コーティング)で、一般にまっすぐで、分枝や吻合をせず、しばしば幾本ものフィラメントが束になって走行していた。細径フィラメントは直径10~20 nm(白金コーティングを含む)でしばしば他のフィラメントと分枝、吻合し、非常に複雑な網状構造を呈していた。これらのフィラメントのほとんど、とりわけ細径フィラメントは顆粒様物質で修飾され直径10~40 nmになっていた。それゆえ各々のフィラメントの直径の計測は顆粒様物質の認められない場所で行った(図2, 3)。

サポニン処理の効果の高い上皮細胞では細胞内構造の大部分はサポニン処理のため消失していた。核周囲部では多数の細径フィラメントが認められ、核外膜と小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官とを結び付けており、加えて、これらのフィラメントはしばしば細胞膜と直接連絡していた(図2)。サポニン処理の効果の弱い他の細胞では核、ミトコンドリア、細胞膜、細胞内フィラメントのみならず分泌顆粒や粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアなどの細

図1 弱拡大では透過電顕像と同様に感覚細胞(HC)、支持細胞(S)およびそれらの附属器官が明瞭に観察される。

胞内小器官もよく保存されていた(図3)。

感覚細胞ではその蓋板は細径フィラメントの特徴的な網状構造により構成され蓋板下部に存在する太径フィラメントと連続していた。太径フィラメントは細胞頂部でミトコンドリアと密接な関係を有し細胞体の長軸方向に平行に配列していた。これらのミトコンドリアはしばしば細径フィラメントの網目の中にもぐり込んでおり、またミトコンドリア外膜に直接付着するフィラメントも観察された(図4)。

支持細胞の内部には分泌顆粒と考えられる数多くの顆粒様構造が観察されその中には透過電顕で認められるものと同様な小線維状の構造が認められた。これらの分泌顆粒は、細胞の長軸方向に走る太径フィラメントと密接な関係を有していた。さらに分泌顆粒どうしが互いに細径フィラメントにより連結されている像や分泌顆粒と小胞体、ミトコンドリア、核などの細胞内の膜性の小器官とが細径フィラメントにより結

図3 ゴルジ装置(G)の周囲では細径フィラメント、太径フィラメントが明瞭に観察されその周囲にクラスリンに被覆された典型的な蜂巣状構造をもつコーティッドベジクルが付着しているのを認める(矢頭)。ゴルジ装置周囲のフィラメントはゴルジ装置の末端あるいは側方で付着しており、両者が密接に関係している。

図2 核周囲部には多数の細径フィラメント(IF)が認められ、核外膜と小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官とを結び付けており、加えて、これらのフィラメントはしばしば細胞膜と直接連絡している。N：核

図4 感覚細胞ではその蓋板(C)は細径フィラメントの特徴的な網状構造により構成され蓋板下部に存在する太径フィラメントと連続している(矢頭)。太径フィラメントは細胞頂部でミトコンドリア(M)と密接な関係を有し細胞体の長軸方向に平行に配列している。

び付けられている像も観察された(図5). ゴルジ装置の周囲では細径フィラメント, 太径フィラメントが明瞭に観察されその周囲にクラスリンに被覆された典型的な蜂巢状構造をもつコーティッドベジクルが付着しているのを認めた. ゴルジ装置周囲のフィラメントはゴルジ装置の末端あるいは側方で付着しており, 両者が密接に関係している所見も認められた(図3).

これらに加えて今回, 細胞間接着構造の観察も可能であった. 支持細胞上部の網状帯の部分には細径フィラメントの特徴的配列により構成されており, 蓋板下部の細径フィラメントと連続している所見, あるいはデスモゾームと考えられる部分に細径フィラメントが密接に関与している像が認められた(図6).

考 察

医学生物学の分野で走査電顕は主として細胞や組織の三次元構造を観察するために用いられてきた. 細胞や組織の表面構造は通常の試料作製法により容易に観察可能であるが, その内部構造については切断や割断をせずに観察することは不可能である. 細胞や組織の内部構造の観察のために, 従来, 様々な試料作製法が用いられてきたが, 近年, 化学的浸軟法と凍結割断法を組み合わせた方法(A-O-D-O法)がTanakaら¹⁵⁾によって開発され細胞内部構造の観察に応用されている. この方法は内耳の細胞内構造の観察にも応用され細胞内の膜性小器官の立体構造についての詳細な検討が成されているが, 細胞骨格を中心とした細胞内の様々な線維状構造については明らかになっていない¹⁾. 一般に

図5 支持細胞の内部には数多くの顆粒様構造(S)が観察されその中には小線維状の構造が認められる. これらの分泌顆粒は, 細胞の長軸方向に走る太径フィラメント(Mt)と密接な関係を有しており, 分泌顆粒同士が互いに細径フィラメントにより連結されている像や分泌顆粒と小胞体, ミトコンドリア, 核などの細胞内の膜性の小器官とが細径フィラメントにより結び付けられている像も観察される.

図6 支持細胞上部の網状帯(R)の部分には細径フィラメント径の特徴的配列により構成されており, 蓋板下部の細径フィラメントと連続している所見, あるいはデスモゾームと考えられる部分に細径フィラメントが密接に関与している像が認められる(矢頭).

細胞骨格と称される細胞内線維状構造については内耳でも透過電顕を利用して急速凍結，ディープエッチング法により観察されているが⁶⁾⁷⁾，その結果は満足するものではなく前庭感覚上皮の内部構造，とりわけ細胞骨格とその他の種々の膜性の小器官との関連については未だ不明な点が多く残されている．この点を解決するために今回我々はすでに他の組織で試みられており，細胞内の線維状構造のみならず膜性構造をも描出することが可能であるサポニン灌流法¹¹⁾と凍結割断法とを組み合わせ内耳の試料作製を行い走査電顕にて観察したところ良好な結果を得ることができた．

今回の方法で試料作製を行った結果，前庭感覚上皮の細胞骨格フィラメントは走査電顕により明瞭に観察可能となった．微細なフィラメントにより構成される複雑な網目状構造は Wolszewick ら¹⁶⁾により提唱された微細柱格子 (microtrabecular lattice) に一致していた．乾燥試料は白金で約 2 nm の厚さのコーティングを施されているため，走査電顕により観察された細径，太径フィラメントの真の直径は細径フィラメントで 5~15 nm，太径フィラメントで 20~30 nm であった．細胞骨格を主として構成する微小管は直径が約 25 nm で分岐，吻合をせずほぼまっすぐに走行し，アクチンフィラメントの直径は 7 nm，中間径フィラメントの直径は 10 nm であることが知られている．このことから今回，走査電顕で観察された太径フィラメントは微小管と考えられた．一方，アクチンは前庭感覚上皮，特に前庭感覚細胞の蓋板や前庭支持細胞の網状帯に分布すること^{4)~7)}や，種々のタイプの中間径フィラメントが既に末梢前庭器に存在することが証明されている²⁾³⁾ ことより，今回認められた細径フィラメントはアクチンフィラメントと中間径フィラメントの両者を含んでいると考えられた．

細胞骨格フィラメントの周りを取り囲んでいる顆粒様物質の大部分は細胞内の種々の可溶性蛋白と考えられる．Triton X-100 やサポニンな

どは細胞膜を溶出(前者)あるいは膜に穴をあけ(後者)細胞質内の可溶性蛋白質を洗いだし顆粒様物質の量を減少させる．このような化学的膜処理は走査電顕での観察や急速凍結，ディープエッチング法¹⁷⁾¹⁸⁾に非常に有用となる．加えて化学的膜処理により可溶性蛋白質を取り除くことにより細胞骨格フィラメントのコントラストを引き上げる効果もある．このような処理がなんらかのアーチファクトを引き起こす可能性も否定できないが，今回の得られた結果がこれまでの同様の試料で異なる試料作製法により得られた結果と一致していることより膜性構造との位置関係は保たれているものと考えられる^{2)~9)}．結果的にサポニン灌流法により前庭感覚上皮の細胞骨格が走査電顕を利用して観察可能となり，この方法は細胞骨格の位置関係や分布，機能に対するより詳細な情報を与えてくれるものと考えられた．

参考文献

- 1) Harada Y, Tagashira N, Takumida M, et al : Three-dimensional structures of the vestibular sensory epithelia. *Acta Otolaryngol* (Stockh) **99** : 411~418, 1985.
- 2) Thornell L-E, Anniko M and Virtanen I : Cytoskeletal organization of the human inner ear. I. Expression of intermediate filaments in vestibular organs. *Acta Otolaryngol* (Stockh) Suppl **435** : 5~27, 1987.
- 3) Bauwens LJJM : Intermediate filament proteins in the human audio-vestibular organ. An immunohistochemical study. Thesis, Utrecht, 1991.
- 4) Flock Å and Cheung H : Actin filaments in sensory hairs of the inner ear receptor cells. *J Cell Biol* **75** : 339~343, 1977.
- 5) Flock Å, Cheung H, Flock B, et al : Three sets of actin filaments in sensory cells of the inner ear; identification and functional orientation determined by gel electrophoresis, immunofluorescence, and electron microscopy. *J Neurocytol* **10** : 133~147, 1981.
- 6) Arima T, Uemura T and Yamamoto T : Three-

- dimensional visualization of the inner ear hair cell of the guinea pig; a rapid-freeze, deep-etch study of filamentous and membranous organelles. *Hear Res* **25** : 61~68, 1987.
- 7) Hirokawa N and Tilney LG : Interactions between actin filaments and between actin filaments and membranes in quick-frozen; deeply-etched hair cells of the chick ear. *J Cell Biol* **95** : 249~261, 1982.
 - 8) Favre D and Sans A : Organization and density of microtubules in the vestibular sensory cells in the cat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **96** : 15~20, 1983.
 - 9) Kikuchi T, Takasaka T, Tonosaki A, et al : Microtubule subunits of guinea pig vestibular epithelial cells. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* **481** : 107~111, 1991.
 - 10) Schliwa M and Van Blerkom J : Structural interaction of cytoskeletal components. *J Cell Biol* **90** : 222~235, 1981.
 - 11) Fukudome H and Tanaka K : Saponin perfusion method for observing intracellular structures by SEM. *Biomedical SEM* **19** : 66~71, 1990.
 - 12) Senda T, Ban T and Fujita H : Scanning electron microscopy of cytoplasmic filaments in rat anterior pituitally cells. *Arch Histolcytol* **52** : 371~378, 1988.
 - 13) Sasaki J, Watanabe S, Nomura T, et al : A perfusion method using low concentration of glutaraldehyde and saponin solution for the observation of the cytoskeleton of epithelial cells. *J Electron Microsc* **37** : 38~44, 1988.
 - 14) Okanoué TM, Ohta S, Fushiki OOu, et al : Scanning electron microscopy of the liver cell cytoskeleton. *Hepatology* **5** : 1~6, 1985.
 - 15) Tanaka K and Naguro T : High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by new specimen preparation method. *Biomedical Res Suppl* **2** : 63~70, 1981.
 - 16) Wolosewick JJ and Porter KR : Stereo high voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line, WI-38. *Amer J Anat* **147** : 303~324, 1976.
 - 17) Hirokawa N and Heuser JE : Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestina; epithelial cells. *J Cell Biol* **91** : 399~409, 1981.
 - 18) Hirokawa N : Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J Cell Biol* **94** : 129~142, 1982.

(別刷請求先 : 工田昌矢
〒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)