

氏名・(本籍)	おお さわ とく じ 大 澤 得 二
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 第 1 2 0 1 号
学位授与年月日	平 成 15 年 11 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
研究科, 専攻	昭和49年 3 月 25 日 東京教育大学理学部生物学科動物学専攻卒業
学位論文題目	Basement membranes - electron microscopic studies on their ultrastructure, development and roles in the tissue regeneration. (基底膜—その微細構造, 発生, 組織再生における役割についての 電子顕微鏡的研究)
論文審査委員	(主査) 教 授 井 出 宏 之 教 授 前 田 靖 男, 渡 辺 彊, 加 藤 秀 生

論 文 目 次

抄録

1. 総合序論
2. 基底膜の微細構造
 - 2—1 序論
 - 2—2 材料と方法
 - 2—3 結果
 - 2—4 考察
3. 発生における基底膜の形態変化
 - 3—1 序論
 - 3—2 材料と方法
 - 3—3 結果
 - 3—4 考察
4. 組織再生における基底膜の役割
 - 4—1 序論
 - 4—2 材料と方法
 - 4—3 結果
 - 4—4 考察
5. 総合討論
6. 謝辞
7. 引用文献
8. 図説明

論文内容要旨

1. 総合序論

多細胞動物は複数の細胞と、それらの間の細胞外基質とから成るものであり、その形態学的研究において、細胞外基質に言及しないわけにはいかない。本研究においては細胞外基質の中の特に基底膜に焦点を当て、種々の方法でその構造を研究し、細胞と基底膜、および基底膜と直下のコラーゲン繊維層との関係について新しい考え方を提出する。

基底膜は表皮、粘膜上皮、シュワン細胞、筋細胞などに接している細胞外基質であり、透過電顕的に透明層、緻密層、網状層の三層構造を示す。しかしこの基本構造は通常の透過型電子顕微鏡によるものであり、観察法を変えれば基底膜の形態の別の側面が観察できる期待が持てる。本研究では透過型電子顕微鏡観察には凍結超薄切片法を、走査型電子顕微鏡観察にはジチオトレイトール剥離法を導入し新しい知見を得た。基底膜はまた、発生および変性過程において、その構造の一面を垣間見せる。ニワトリ表皮基底膜およびカエル幼生頭部プラコード領域の基底膜の発生、そしてカエル幼生の変態中の尾部の表皮基底膜の変性を観察し、特徴的な構造をとらえた。基底膜はまた組織再生に大きな役割を果たすが、基底膜と再生細胞との関係には二種あることがわかり、そのちがいを詳細に報告する。

2. 基底膜の微細構造

凍結超薄切片法による基底膜の微細構造

表皮基底膜を凍結超薄切片法により観察したところ、プラスチック包埋切片に比べ厚い緻密層が観察され、真皮のコラーゲン繊維層に密着していた。電子密度が低く通常のプラスチック包埋切片では検出できない物質と構造が基底膜に存在することが明らかとなった。

基底膜と隣接するコラーゲン繊維-神経内膜のコラーゲン繊維の真の電顕像

神経内膜を凍結超薄切片法により観察したところ、コラーゲン繊維束はシュワン細胞の基底膜に密着し、またコラーゲン繊維束間も隙間なく密着していた。通常の透過電顕観察で認められる基底膜の緻密層とコラーゲン繊維束との間の空隙、およびコラーゲン繊維束間の空隙は脱水による人工産物であることが明らかとなった。

ジチオトレイトール剥離法による基底膜の透過型電子顕微鏡的観察

表皮または粘膜上皮をジチオトレイトール処理により真皮あるいは粘膜固有層より剥離したところ、基底膜と細胞との接着は保持され、基底膜とその直下のコラーゲン繊維層との間で分離がおこった。ジチオトレイトール剥離法はこの剥離様式を引き起こす唯一の方法である。アンカリング・ファイブリンはコラーゲン繊維層より引き抜け、その形態を詳細に観察することができた。

ジチオトレイトール剥離法による基底膜の走査型電子顕微鏡的観察

ジチオトレイトール剥離法によって基底膜の結合組織側の走査型電子顕微鏡観察が初めて可能となった。緻密層を構成している細繊維による網状構造とともにアンカリング・ファイブリンを立体的に観察することができた。

反射電子像を用いた免疫走査電顕法により検出された表皮および粘膜上皮基底膜中のVII型コラーゲンの分布

ジチオトレイトール剥離した表皮および粘膜上皮基底膜にコロイダル・ゴールド標識した抗体により免疫染色を施し、走査型電子顕微鏡により二次電子像とともに同視野の反射電子像を撮影した。この二つの像を比較することにより、VII型コラーゲンの分布を示すコロイダル・ゴールドはアンカリング・ファイブリン上に分布していることを立体的に示すことができた。

3. 発生における基底膜の形態変化

ニワトリ表皮基底膜の発生中の形態変化-特に透明層中の顆粒構造に注目して

14日齢以降の胚の表皮基底膜の透明層の中央に顆粒層を発見した。この顆粒は $9 \times 20\text{nm}$ の大きさで透明層を二分する位置に平面的に配列していた。透明層には膜貫通タンパクとラミニン5の結合部位が存在するはずであるが、この顆粒はそのような分子間の結合部位を形態的に反映しているのではないかと考えられた。

カエル幼生頭部の種々のブラコード直下の基底膜の発生とコラーゲン繊維の形成

頭部には種々のブラコードが存在するが、これらは外胚葉由来であっても表皮基底膜とは異なった形態の基底膜と、異なった配列のコラーゲン繊維束に裏打ちされていた。角膜上皮直下の細胞外基質は表皮のそれらとほぼ同様の形態を示し、よく発達した基底膜と規則性のあるコラーゲン繊維の配列が見られたが、眼胞は神経管と同様に未発達な基底膜を持ち、直下のコラーゲン繊維も少なかった。鼻板と耳胞はそれらの中間の性格を示し、基底膜はよく発達していたが直下のコラーゲン繊維は不規則な配列を示した。

カエル幼生の変態中に出現する表皮基底膜透明層の蜂巢状構造

変態中の尾部の表皮基底膜の透明層中に蜂巢状構造および梯子状構造をみとめた。これらの構造物は同一の構造体の別の側面であると思われ、透明層の構造の変形により出現するものと考えられるが、現在まで提案されてきた緻密層の基本構造の分子モデルとはどれとも一致しなかった。

4. 組織再生における基底膜の役割

マウス異系移植による神経再生-特にシュワン細胞基底膜の役割に注目して

二系統のマウス間で末梢神経の交換移植を行なった。移植体中の細胞成分は宿主のマクロファージにより処理されたが、シュワン細胞基底膜が筒状に残った。再生神経突起はこの基底膜の筒を足場にして伸長し再生が進んだが、再生シュワン細胞は古い基底膜と再接合することなく、新たな基底膜を形成した。

凍結処理後の基底膜上でのマウス口唇表皮の再生-半接着斑の再形成と基底膜中のヘパラン・サルフェイト・プロテグリカンの分布

表皮を凍結処理により殺し、その後の再生の過程を観察した。変性細胞は基底膜から剥離し、基底膜との間に水疱を形成した。再生細胞は周囲の健常部及び毛根より供給された。再生細胞は古い基底膜をそのまま利用し、半接着斑を再形成した。ヘパラン・サルフェイト・プロテオグリカンの分布の免疫組織化学的検索により、半接着斑は元の位置に再形成される可能性が高いと思われた。

マウスにおける凍結処理後の粘膜上皮の変性と再生

口腔粘膜を凍結処理により殺し、変性と再生の過程を観察した。変性過程は表皮と同様であった。毛根がないので再生は周囲の健常部からのみ行なわれたが、再生細胞はデスモゾーム結合をしたままの多層の状態基底膜上を移動し、急速に再生を完了させることがわかった。

5. 総合討論

凍結超薄切片法により、プラスチック包埋切片に及ぼす脱水の影響が明らかになった。細胞外基質に出現する空隙は多くの場合人工産物である。透明層に観察された顆粒構造、蜂巢構造は近年提出されている分子間の結合モデルを形態学的に支持するものである可能性が高い。今後、形態学的観察と一致する分子モデルの提出が待たれる。また本研究においてジチオトレイトール剥離法の導入により基底膜の免疫電顕法を含む走査型電顕観察が大きく進歩し、アンカリング・ファイブリルの立体像を初めて観察することに成功した。基底膜は組織再生における足場となるが、再生細胞と基底膜の接合様式には二種あり、組織に

より，単に再生の足場となるだけの場合と，元の位置に接着装置を再形成する場合があることが明らかになった。

このように多細胞動物を細胞外基質の側から考え，基底膜を中心に，その構造，発生，機能を考察した。これらのデータは多細胞動物のボディープランをより深く理解させるものであり，多細胞動物の発生と進化を細胞成分だけではなく，細胞外基質の変化を加えて考察できるようにするものである。

論文審査の結果の要旨

基底膜は多細胞動物の重要な細胞外基質で、電子顕微鏡を用いた形態学的研究が広く行われてきた。しかし多くの研究は透過型電子顕微鏡を使用して行われたもので、試料の処理方法も限られていた。本研究は、走査型顕微鏡観察と、新しい試料処理方法を用いた透過型電子顕微鏡観察によって、基底膜の層構造を明らかにしたものである。

ニワトリ表皮基底膜やカエル幼生頭部ブラコードの基底膜の凍結超薄切片を作成し透過型電子顕微鏡で観察したところ、プラスチック包埋切片に比べ厚い緻密層が観察され、この層は真皮のコラーゲン繊維層に密着して存在していた。つまり電子密度が低く通常のプラスチック包埋切片では検出できない物質と構造が基底膜に存在することが明らかになった。プラスチック包埋切片中の細胞外基質に出現する空隙は多くの場合人工産物と考えられる。

また14日以降のニワトリ胚の表皮基底膜の透明層の中央に顆粒層を発見した。この顆粒は $9 \times 20\text{nm}$ の大きさで透明層を二分する位置にあり、平面的に配列していた。透明層には膜貫通タンパクとラミニン5の結合部位が存在するはずであるが、この顆粒はそのような分子間の結合部位を形態的に反映していると考えられた。

次に表皮や粘膜上皮をジチオトレイトール処理により真皮または粘膜固有層より剥離したところ、基底膜と細胞との接着は保持され、基底膜とその直下のコラーゲン繊維層との間で分離がおこった。ジチオトレイトール剥離法はこの剥離様式を引き起こす唯一の方法で、アンカリング・フィブリルがコラーゲン繊維層より引き抜けた結果、その形態を詳細に観察することができた。基底膜の結合組織側からの走査型電子顕微鏡観察の結果、緻密層を構成している細繊維による網状構造とともにアンカリング・フィブリルを立体的に示すことができた。またコロイダル・ゴールド標識した抗体により免疫染色を施し免疫走査電子顕微鏡観察を行った結果、VII型コラーゲンの分布を示すコロイダル・ゴールドがアンカリング・フィブリル上に分布していることを立体的に示すことができた。

この論文は、著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有する事を示している。従って、大沢得二提出の論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。