

ニワトリ腫大動脈の礎質と弾力線維の電子顕微鏡的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4619

ニワトリ胚大動脈の礎質と弾力線維の 電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任：梶川欽一郎教授)

北 田 博 久

(昭和50年8月11日受付)

ニワトリ胚大動脈では細胞間物質、特に礎質と弾力線維の活発な産生が行われているので、これらの細胞間物質の構造と発生を研究するためには好適な組織である。近年、ルテニウムレッド (以下 RR と略す)、その他の電子染色によって様々な結合組織の礎質に含まれる酸性ムコ多糖の電子顕微鏡的研究が行われ^{1)~6)}、ニワトリ胚大動脈についても Kádár ら⁷⁾によって RR 染色所見が報告されている。しかし、礎質の超微構造と化学的成分との対応はまだ十分とはいえない。

弾力線維の超微構造についてはニワトリ胚大動脈⁸⁾、その他の組織^{10)~14)}を用いて多数の研究が報告されている。現在、論争の焦点の一つは弾力線維周囲の microfibril とエラスチンとの関係である。この問題に対して議論が紛糾する理由の一つは、通常の電顕標本では弾力線維は電子密度の甚だ低い等質性物質として認められるため新生初期の微小な弾力線維の同定が困難であるばかりでなく、エラスターゼの消化効果の判定も容易でないことにあると思われる。これまで弾力線維の染色方法として隣タングステン酸や silver tetra-phenylporphine sulfate¹⁵⁾ が用いられているが、最近、水平ら¹⁶⁾によって開発されたタンニン酸固定法は操作が簡単で弾力線維が特異的に染色される点において、従来の染色法に比べて優れている。そこで、著者はこの方法を用いて弾力線維の構造と発生過程とを再検討した。

細胞間物質の研究において重要な点は、超微構造とその化学的性状との対応を明らかにすることである。この問題の解明のために従来、様々な酵素による消化試験が試みられているが、酵素処理の方法に問題があり、その成績は必ずしも一定していない。本研究では酵素処理の条件に吟味を加え、上述の様々な電子染色によって捉えられた構造物の化学的性状の同定を試みた。

本論文においては、ニワトリ胚大動脈を材料とし、まず礎質の RR 染色所見と酸性ムコ多糖の所在との関係について述べ、次にタンニン酸固定標本の所見に基づいて、弾力線維の構造と発生、特に microfibril とエラスチンとの関係について報告する。

実験材料と方法

ニワトリ胚 (孵化 8~21日) の大動脈を 2.5% グルタルアルデヒド (0.1M cacodylate 緩衝液 pH7.4) で 4°C、30分間固定後、2% オスミウム酸 (同緩衝液 pH7.4) で 4°C、60分間固定を行った。酸性ムコ多糖を検出するために RR 染色¹⁷⁾を、また弾力線維の観察のために水平の方法¹⁶⁾によるタンニン酸固定を併用した。試料はエタノール系列で脱水、エポン 812 で包埋し、ガラスナイフを用いて LKB-Ultratome で超薄切片を作成し、ウラニル・鉛の重染色を行った。

酵素消化試験：組織を厚さ 0.5mm 以下に薄切り、2.5% グルタルアルデヒド (0.1M cacodylate 緩衝液 pH7.4) で 4°C、30分間固定、次いで 4°C、12時間同緩衝液で十分に洗浄した後、37°C で酵素処理を行った (表 1)。一部の組織は未固定のまま酵素処理を行った。酵素処理をした試料は同緩衝液で洗浄し、上述と同じ方法で RR 処理またはタンニン酸固定を行った。コントロールとして酵素を含まない緩衝液で incubate した試料を用いた。

切片は日立 HU-11型 (75Kv)、HU-12型 (75Kv)、日本電子 JEM-7A型 (80Kv)、JEM-100B型 (80Kv) 電子顕微鏡で直接倍率 3,000~20,000倍で撮影した。

成 績

I. ニワトリ胚大動脈の一般的構造

ニワトリ胚大動脈の発育に伴う一般的な形態学的変化については従来の報告⁸⁾¹⁰⁾¹⁹⁾とほぼ一致するので簡

Electron microscopic studies on the ground substance and elastic fibers of the chick embryo aorta. Hirohisa Kitada, Department of Pathology (I), (Director : Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

表 1 酵素消化試験の条件

酵 素	緩 衝 液 (pH)	酵素濃度	作用時間 (時間)
Streptomyces hyaluronidase (生化学工業)	0.1M Acetate buffer (pH 5.0)	20 μ /ml	3 ~ 24
Chondroitinase AC (生化学工業)	0.1M Cacodylate buffer (pH 7.5)	1 μ /ml	3 ~ 24
Chondroitinase ABC (生化学工業)	0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	1 μ /ml	3 ~ 24
Elastase (Sigma, Type III)	0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	1mg /ml	3 ~ 6
Trypsin (Sigma, Type I)	0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.8) + 4 mM CaCl ₂	1mg /ml	3 ~ 24
Chymotrypsin (Worthington Chemical Co.)	0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.8) + 4 mM CaCl ₂	1mg /ml	未固定 1 ~ 24
Collagenase (Sigma, Type III)	0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) + 0.2M NaCl + 4 mM CaCl ₂	1mg /ml (500 μ)	未固定 1 ~ 4

単な記載に止める。

孵化 8 日目：大動脈内腔は一層の内皮細胞で被われ、内膜、中膜、外膜は区別されない。内皮細胞の腔表面は RR 陽性物質で被われ、細胞は互いに密着して並び、細胞基底面から原形質の小突起が延長し、基底膜は断片的に存在するにすぎない。原形質にはリボゾームが豊富で、小胞体や糸粒体が同定される (写真 1)。

大動脈壁を構成する細胞は未分化な間葉細胞で、内腔側ではその配列は不規則であるが、深部に行くに従って多少とも層状に配列する傾向を示す。これらの細胞は一般に核小体の明瞭な大型の核を有し、延長した原形質には多数のリボゾームと細管状の粗面小胞体が見とめられる。外膜側では細胞は互いに接触して層状の配列を示し、原形質には粗面小胞体の増加とゴルジ装置の発育が目立ち、処々脂肪滴様の空腔が見とめられる (写真 2)。

細胞間は RR 陽性の粒子とフィラメントから成る網状構造で満たされ、処々少数のコラゲン線維と弾力線維とが散在している。

孵化 13-15 日目：大動脈壁の構成細胞には平滑筋細胞と線維芽細胞への分化が現われる。平滑筋細胞は互いに接触し層状の配列を示す。このような細胞の層は大動脈壁全体で 10 層以上に達する。原形質には小胞体が

減少し、処々に myofilament が出現し、細胞相互の接着面には接合装置がみられ、細胞表面には基底膜が形成される。線維芽細胞は層状に並ぶ平滑筋細胞の間に散在し、粗面小胞体の拡大や時々ライソゾーム様の小胞体が見られ、基底膜を欠く (写真 3)。

細胞間は礎質の網状構造で満たされるが、この時期には線維成分、特に弾力線維の形成が活発となる。小さい弾力線維は平滑筋細胞の表面に多く、太い弾力線維は細胞間に散在性に存在する。弾力線維は一般に外膜側から内膜側に向かって増加するが、内皮細胞下では線維の数は少なく、直径も小さい。内弾力板の形成はまだみとめられない。

コラゲン線維は一般に弾力線維に比べて少ないが、外膜側では線維芽細胞が多く、細胞間には弾力線維とともに多数のコラゲン線維が形成される。

孵化 21 日目：大動脈壁に層状に配列する平滑筋細胞は myofilament の増加と小器官の減少によって平滑筋細胞の特徴が一層明瞭となる。平滑筋細胞の間に存在する線維芽細胞は突起を伸ばした細長い細胞に変る。細胞の増殖と共に細胞間は狭くなり、細胞間には線維成分の増加と礎質の減少がみられる。平滑筋細胞周辺の新生弾力線維は数と大きさを増し、その間にコラゲン線維の線維束が形成される。コラゲン線維は外膜側の線維芽細胞の間に特に多量に形成され、次第

に外膜の固有の構造が作られる(写真4)。

内皮細胞下では細胞の配列は不規則で、細胞表面に弾力線維の新生が増加するが、内弾力板の形成は不完全で、内膜と中膜との境界は不明瞭である。

II. 礎 質

RR 染色標本では礎質は直径 $200\sim 400\text{\AA}$ (平均 300\AA)のRR 陽性の粒子と直径 $50\sim 150\text{\AA}$ (平均 100\AA)のフィラメントから成る網状構造としてみとめられる。フィラメントは一般に粒子に比べてRR 染色性は弱い。しかし、強拡大で観察すると、両者の境界は必ずしも明瞭でなく、フィラメントが粒子に接する部分ではフィラメントの幅とRR 染色性が増加し、次第に粒子に移行しているようにみえる(写真5)。

コラゲン線維の表面にも粒子およびフィラメントが付着し、礎質の網状構造に連続している。しかし、コラゲン線維が線維束を形成した場合には、個々の線維はRR 陽性物質で接着するが網状構造の介在はみられない。弾力線維の表面はRR 弱陽性の絮状物質で包まれ、処々RR 陽性の粒子が付着し礎質の網状構造に連なっている。弾力線維の内部にはRR 陽性物質は証明されない(写真6)。

グルタルアルデヒド-オスミウム酸重固定標本では、礎質は上述の網状構造を示さず、無定形物質とフィラメント状物質の不規則な集積としてみとめられる。また短い棍棒状のフィラメント(直径約 150\AA 以下)も散見される(写真7)。

タンニン酸固定標本では礎質は粗大なフィラメント状物質(直径約 150\AA 以下)がびまん性に凝集した像を呈する。ときどき辺縁が濃染した不整形の粒子状物質(直径 $200\sim 300\text{\AA}$)が混在している(写真8)。

以上のように、礎質は固定剤によって異なった像を呈するが、RR 処理標本ではRR 陽性の粒子とフィラメントの網状構造として比較的一定の像を呈する。そこで孵化15~21日目の大動脈にムコ多糖分解酵素お

よびトリプシンを作用させ、礎質のRR 染色による形態学的変化を検討した(表1)。

ストレプトミセス ヒアルロニダーゼ 作用後のRR 処理標本では、フィラメントはほとんど完全に消失する(写真9)。粒子はなお残存するが、その大きさと数が減少する。弾力線維やコラゲン線維の表面に付着している粒子状物質に対しても同様の結果がえられた。しかし弾力線維表面の絮状物質および線維束を構成するコラゲン線維間のRR 陽性物質は残存する。

コンドロイチナーゼ AC を作用させた場合には、礎質の網状構造はかなり消化される。粒子はほとんど消失し、線維間には粗大な凝集物が僅かに散見されるにすぎない。しかし、弾力線維やコラゲン線維の表面を被覆するRR 陽性物質は抵抗を示す(写真10)。

コンドロイチナーゼ ABC によって礎質の構成成分はほとんど完全に消化され、粒子もフィラメントもほとんど消失する(写真11)。しかし、弾力線維、コラゲン線維の表面のRR 陽性物質は依然として抵抗を示す。

トリプシンを作用させた場合には、粒子は消失、またはほとんど目立たなくなるが、フィラメントは比較的保たれている(写真12)。線維束をつくるコラゲン線維は多少とも疎開するが、その表面の陽性物質は完全に消失しない。

以上の酵素消化試験の対照ではいずれも礎質の網状構造はよく保たれているが、その1例として写真13にヒアルロニダーゼによる酵素消化の対照を示す。

以上の酵素消化試験の成績を総括すると表2に示すとおりである。

III. 弾力線維

1. 弾力線維の発育

孵化13日以降、平滑筋細胞の分化が進行すると共に活発な弾力線維の新生がみとめられる。平滑筋細胞の表面には基底膜が形成され、その中に新生初期の弾力

表2 礎質の酵素消化試験

酵 素	粒子状物質	フィラメント状物質
ヒアルロニダーゼ	+	+
コンドロイチナーゼAC	+	+
コンドロイチナーゼABC	+	+
トリプシン	+	-

+: ほとんど消化, +: 一部消化, -: 抵抗

線維と考えられる微小な線維（直径250~500Å）がみとめられる。RR染色標本では基底膜は陽性を示し、新生弾力線維は無染色のスポットとしてみとめられる（写真14）。タンニン酸固定標本では新生弾力線維は等質性に濃染し、ほとんど常に円形または楕円形の断面を示す（写真15, 16）。

microfibrilも基底膜の中またはその周辺に出現するが、基底膜内の微小弾力線維は必ずしもその周囲にmicrofibrilを伴っていない（写真15, 16）。弾力線維は直径が増加するに従って基底膜を離れ、同時にその表面にmicrofibrilが付着するが、基底膜に面する側ではしばしばmicrofibrilを欠くか、またはその数が少ない（写真17, 18）。

成熟弾力線維の輪郭は不規則な凹凸を示し、その周辺にはmicrofibrilが集在する。microfibrilは弾力線維の表面に平行に走り、横断面では中空状に見える（写真18）。弾力線維の陥凹部の横断面では、microfibrilが弾力線維内部にみとめられることがある。しかし、弾力線維とmicrofibrilは常に明瞭に境され、microfibrilが弾力線維の内部構造に加っていることを示唆する所見は全くみられない。

タンニン酸固定標本では成熟弾力線維は未熟弾力線維より電子密度が低下するが、その辺縁はより濃染する物質でふち取られる（写真15, 18）。成熟弾力線維の内部には処々紐状構造が散在性に現われる。この構造はウラニル・鉛染色では低電子密度の境界不明瞭な断片状物質としてみられるが（写真6）、タンニン酸固定標本では線維の辺縁部と同じく濃染し、その形態において弾力線維の深い陥入部との間に移行があるように見える（写真17, 18）。

2. 酵素消化試験

孵化21日目のニワトリ胚大動脈にエラスターゼ作用後タンニン酸固定を行い、弾力線維の観察を行った。

基底膜内の微小弾力線維は消化されて基底膜にスポット状の欠損部を生ずるが、基底膜は消化されない（写真19）。

成熟弾力線維はエラスターゼによって、まず、無構造部分にひび割れ状の不規則な亀裂が生じ、次第に顆粒状に細分する（写真20, 21）。顆粒の形は不整で大きさは直径約250~600Åと一定していない。消化がすすむに従って顆粒は減少し、遂に弾力線維は完全に消化され、その周辺のmicrofibrilだけが残存する。紐状構造物の大部分は消失する（写真22）。消化された弾力線維内部にはmicrofibrilはみとめられない。

キモトリプシンを作用させると、弾力線維の形態に

はほとんど変化がみられないが、その周辺のmicrofibrilは完全に消失する（写真23）。

コラゲナーゼではコラゲン線維はほとんど消化されるが、弾力線維とmicrofibrilは抵抗を示す（写真24）。

考 察

1. 礎 質

ニワトリ胚大動脈の礎質はKádárら⁶⁾の報告と同じく、RR染色陽性を示す粒子とフィラメントから成る網状構造として観察された。このような構造は、線維成分の形成がまだ著明でない孵化8日目ですでに細胞間を満たしているため、礎質は線維形成に先立って未分化な間葉細胞から産生されることが示唆される。

礎質を構成する酸性ムコ多糖の大部分は蛋白と結合し、蛋白-ムコ多糖複合体をつくり、生体内ではこれらの巨大分子はゲル状物質として細胞間にびまん性に分散しているものと考えられる。このようなゲル状物質は固定剤、その他の標本作成中の操作によって著しい変形を蒙ることは当然であり、本研究においても固定方法によって礎質の超微形態が異なることが示された。RR染色標本における網状構造も、Smith²⁰⁾が指摘するように、礎質に含まれる酸性ムコ多糖および蛋白-ムコ多糖複合体の巨大分子が固定によって凝集した結果であると考えられる。

同様な粒子とフィラメントを含む礎質の構造は、軟骨^{5)20)~23)}、角膜²⁴⁾²⁵⁾、滑液膜²⁶⁾、皮膚²⁷⁾、臍帯²⁸⁾について報告されている。その化学的性状はRR、その他の電子染色、酵素消化、抽出処理などによって検討され、この構造は蛋白-ムコ多糖複合体を表わしているという点では研究者の意見が一致している。しかし、粒子とフィラメントとを構成するムコ多糖の種類については、成績に多少の差がみられる。多くの研究では蛋白-ムコ多糖複合体は主として粒子に含まれるという成績がえられているが、渡辺²⁸⁾はグリコール・メタクリレート包埋標本について酵素処理を行った結果、間質にみられる粒子にはヒアルロン酸が含まれ、コラゲン線維に付着する架状物質にはコンドロイチン硫酸A、Cが含まれていると述べている。フィラメントに関しても、Myersら²⁹⁾は滑液膜コラゲン線維の間に存在するフィラメントはヒアルロニダーゼによって消化されるが、線維に付着する短いフィラメントは消化されないという。これらの差異は、用いた組織に含まれるムコ多糖の差や酵素処理の方法などによるものであろう。既述のように、礎質の網状構造は固定剤によって

ゲル状物質が凝集した結果と考えられるので、凝集物の分布が固定条件によって影響を受けることは考慮しなければならぬであろう。

本研究では RR 染色標本についての酵素消化試験の成績は表 2 に示すように、礎質の網状構造のうち、フィラメントはヒアルロニダーゼによって、また粒子はコンドロイチナーゼ AC および ABC によって、より強く消化されるという結果がえられた。また、トリプシンによって粒子はかなり消化されるが、フィラメントは抵抗を示した。これらの成績から、RR 処理によって礎質の巨大分子は凝集して網状構造をとるが、ヒアルロン酸は主としてフィラメント状に、コンドロイチン硫酸 A および C は粒子状に凝集するものと考えられる。コンドロイチン硫酸 B の所在については本研究の成績では明確ではないが、コンドロイチナーゼ AC で多少とも抵抗を示す棍棒状フィラメントが残存し、コンドロイチナーゼ ABC によって消化されることからコンドロイチン硫酸 B も少量であるが礎質に含まれているものと推定される。

ヒトおよびウシの大動脈の生化学的分析²⁹⁾³⁰⁾によると、大動脈の礎質には主としてヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸 A、C が含まれ、そのほかにコンドロイチン硫酸 B、ヘパラン硫酸が含まれると云われている。本研究でえられた上記の礎質の化学的性状の成績は生化学的データとほぼ一致するとみなしてよいと思われる。

2. 弾力線維

1) 弾力線維の構造

成熟した弾力線維を電顕的に観察すると中央の無構造な成分とその周囲を取りまく microfibril を区別することができるが、microfibril が弾力線維の固有成分か否かについては意見が分かれる。弾力線維の形成過程において、集積した microfibril の中に無構造部分が出現し、弾力線維の成熟とともに microfibril が減少するという所見に基いて、microfibril を弾力線維の前段階的な構造とみなす人が少なくない^{10)~13)}。また Kádár ら⁹⁾、Varadi³¹⁾ は microfibril が弾力線維の無構造部分の内部にも存在するという所見から、microfibril を弾力線維の固有成分とみなしている。さらに河瀬⁹⁾、伊藤³²⁾ はニワトリ胚大動脈の発育過程および銅欠乏とその回復過程において、大動脈のホモジネートを核分画（無構造部分）とミクロゾーム分画（microfibril）に分け、それぞれのアミノ酸組成を調べたところ、その変動が一定の相関を示すことを観察し、microfibril はエラスチンの前駆

物質であると結論している。

一方、Ross と Bornstein³³⁾ は microfibril がエラスターゼやコラゲナーゼに抵抗があり、キモトリプシンで消化されること、及び microfibril のアミノ酸組成はエラスチンのそれとは異なっていることから、microfibril はエラスチンやコラゲンとは別の糖蛋白から構成されるものと推論している。また、Waisman ら³⁰⁾ は銅欠乏動物では動脈エラスチンの架橋が障害されるが、分離された弾力線維の microfibril は正常動物の microfibril と形態学的にも化学的性状においても同一であることから、microfibril はエラスチンと異なった物質であると考えている。

最近、Robert ら¹⁰⁾ および McCullagh ら³⁵⁾ は純化した弾力線維から分離した無構造部分と microfibril について、生化学的分析および免疫化学的反応を行った結果、無構造部分は弾力線維固有のエラスチンから成り、microfibril は糖蛋白でエラスチンとは異なった物質であると結論している。

本研究においては弾力線維の同定のためにタンニン酸固定法が用いられたが、この方法ではエラスチンが特異的に濃染するので微小な弾力線維も容易に同定され、またエラスターゼの効果を確実に判定することができる。この方法によって、弾力線維と microfibril との関係を検討した結果、microfibril はエラスチンとは異なった物質で弾力線維の固有成分ではないという結論に達した。次にその根拠を述べる。

第 1 は、microfibril と弾力線維との発生過程における形態学的相互関係である。新生初期と思われる微小な弾力線維と microfibril とは平滑筋細胞の基底膜の中に出現するが、弾力線維の周囲には必ずしも microfibril が伴われていない。直径を増加した弾力線維は基底膜を離れ、その表面にしばしば microfibril が集在するが、基底膜に面する側では microfibril を欠く場合がある。これらの所見から、弾力線維が形成される場合には microfibril の集積の中に無構造のエラスチンが出現するのではなく、microfibril はエラスチンの凝集のあと、またはほとんど同時にその周囲に集在するものと考えられる。

第 2 は、エラスチンと microfibril との染色性の差異である。ウラニル・鉛染色では弾力線維の無構造部分はほとんど染色されないが、microfibril は染色され、他方、タンニン酸固定標本では microfibril は無構造部分のように濃染しない。このような染色性の差異は無構造部分と microfibril との化学的組成が異なっていることを示唆している。

第3は、酵素に対する態度の相異である。弾力線維の無構造部分はエラストラーゼによって完全に消化されるが、microfibrilは残存する。この所見は無構造部分はエラスチンを含んでいるが、microfibrilはエラスチンと異なった物質から成ることを示している。さらに、消化された弾力線維の内部にmicrofibrilはみとめられないので、microfibrilが弾力線維の内部構造に含まれるという見解³³⁾は支持しがたい。

以上のように、microfibrilはエラスチンと異なる物質で弾力線維の固有成分とはみなされないと結論されるのである。しかし、その正確な化学的組成については本研究の範囲では明らかではない。microfibrilはキモトリプシンで消化され、コラゲナーゼに抵抗があるのでコラゲンとは別個の蛋白であると考えられる。RossとBornstein³²⁾、McCullagh³⁵⁾およびRobertら¹⁴⁾の生化学的データを参照すると、おそらく一種の糖蛋白であろうと推定される。

microfibrilはエラスチンとは別個の蛋白であるとしても、弾力線維の形成に対して密接な関係をもつことは事実である。しかし、その役割についてはまだ明らかではない。Robertら¹⁴⁾は陰性荷電の糖蛋白が陽性荷電のトロポエラスチンにイオン結合し、トロポエラスチンの配列や架橋に対して何らかの作用をもつものと想像している。

弾力線維の無構造部分の微細構造については意見が一致していない。河瀬⁹⁾は過マンガン酸カリ固定標本において、弾力線維は直径約100Åの念珠状細線維の不規則な三次元的網工から成ることを示唆している。一方、Partridge³⁶⁾は分離したエラスチンの生化学的分析と電顕所見からエラスチンは直径40~50Åの球状粒子から成るとし、Gotteら³⁷⁾はエラスチンの中に平行に走る直径30~40Åの細線維をネガティブ染色によって観察している。本研究においては、弾力線維のsubunitに関しては特別な情報はえられなかった。タンニン酸固定標本では、弾力線維はほぼ均一に無構造物質として濃染され、その微細構造を識別することはできない。

2) 弾力線維の形成と成熟

Kádárら⁸⁾³⁸⁾はワトリ胚および病的材料について、動脈のエラスチン前駆物質はまず平滑筋細胞の基底膜の中に直径約70Åの顆粒(elastic granule)として現われ、microfibrilと共に線維状の凝集物(elastic aggregate)を形成し、この凝集物の相互融合によって弾力線維の成熟が進行すると述べている。本研究においてはKadarらのいう"elastic gran-

ule"を同定することはできなかったが、エラスチンの最初の凝集は未分化な平滑筋細胞の基底膜の中でおこることが示された。同様な所見は他の研究者³⁹⁾⁴⁰⁾によっても指摘されている。しかし、エラスチン前駆物質と基底膜成分との生化学的關係は明らかではない。エラストラーゼによって平滑筋細胞基底膜の中にスポット状の消化がみられるので、エラスチンは基底膜の中で限局性に凝集を開始するものと思われる。エラスチンの初期の凝集物はほとんど常に円形または楕円形の断面を示すので立体的にはほぼ球形を呈しているものと推定される。

このような微小な弾力線維が太い弾力線維へ成熟する過程についての詳細はまだ不明であるが、細い弾力線維の相互融合によって行われることが推定されている⁸⁾¹¹⁾。本研究においても成熟弾力線維の輪郭は不整で、しばしば小球状の細線維の融合を推定させる突出部があり、さらに線維相互の接着や線維内部に融合線の遺残と解釈される紐状構造がみられることを総合すると、弾力線維は相互融合によって直径を増加する可能性が大きいものと考えられる。成熟弾力線維はタンニン酸固定標本において染色性の低下がみられた。同様な所見は磷タングステン酸染色標本においても観察されている⁸⁾。このような弾力線維の成熟に伴う染色性の低下の理由については明らかではない。

3) 弾力線維の形成細胞

大動脈の弾力線維が平滑筋細胞によって産生されることは疑いのない事実である¹⁸⁾¹⁹⁾。平滑筋細胞にエラスチン合成能があることはラジオオートグラフィ⁴¹⁾および組織培養⁴²⁾の成績によって支持される。一方、線維芽細胞もまたエラスチンを合成しうることが組織培養によって示されている⁴³⁾。さらに、平滑筋細胞と線維芽細胞は形態学的にも機能的にも近縁の細胞であると考えられ、その中間型の細胞は"myofibroblast"⁴⁴⁾、または"intermediate smooth muscle cell"⁴⁵⁾と呼ばれている。

ニワトリ胚大動脈においては、孵化8日目では未分化間葉細胞が優勢であるが、発育の経過と共に線維芽細胞と平滑筋細胞への分化が観察された。弾力線維は平滑筋細胞への分化を示す細胞の周辺に形成され、平滑筋細胞の分化とともに弾力線維の数が増加する。一方、線維芽細胞の多い外膜側ではコラゲン線維の形成が著明である。これらの所見は、平滑筋細胞は主としてエラスチンの産生に、線維芽細胞はコラゲンの産生にあずかっていることを示唆している。

結 論

ニワトリ胚大動脈の礎質と弾力線維の超微構造と化学的性状との関係を解明する目的で電顕的研究を行った。

ルテニウムレッド染色により礎質はルテニウムレッド陽性の粒子とフィラメントから成る網状構造としてみとめられる。この構造は礎質に分散する巨大分子が固定によって凝集した結果であると解釈され、酵素消化によって、粒子には主として蛋白—ムコ多糖複合体が、フィラメントにはヒアルロン酸が含まれることが示された。

弾力線維周辺の microfibril は、線維形成過程の観察や酵素消化試験の成績からエラスチンとは別個の蛋白で、弾力線維の固有成分とは見なされないと結論された。

謝辞：御指導を賜りました梶川欽一郎教授に心から感謝の意を表します。また、研究遂行に際し御助言、御協力を頂きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方に厚く御礼申し上げます（本研究の一部は文部省科学研究費〔課題番号737010〕の補助を受けた）。

文 献

- 1) Smith, J. W. & Frame, J. : J. Cell Sci., 4, 421 (1964).
- 2) Yardley, J. H. & Brown, G. B. : Lab. Invest., 14, 501 (1965).
- 3) Serafini-Fracassini, A. & Smith, J. W. : Proc. Roy. Soc. B., 165, 440 (1966).
- 4) Rambourg, A. & Leblond, C. P. : J. Cell Biol., 32, 27 (1967).
- 5) Khan, T. A. & Overton, J. : J. Cell Biol., 44, 433 (1970).
- 6) Behnke, O. & Zelander, T. : J. Ultrastruct. Res., 31, 424 (1970).
- 7) Kádár, A., Gardner, D. L. & Bush, V. : J. Path., 108, 275 (1972).
- 8) Kádár, A., Gardner, D. L. & Bush, V. : J. Path., 104, 253 (1971).
- 9) Kawase, O. : Histochemistry and Cytochemistry (ed. Takeuchi, T., Ogawa, K. & Fujita, S.), Japan Soc. Histochem. Cytochem., Kyoto, 129 (1972).
- 10) Ross, R. & Bornstein, P. : Scientific American, 224, 44 (1971).
- 11) Albert, E. N. : Am. J. Path., 69, 89 (1972).
- 12) Bierring, f. & Kobayasi, T. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., 57, 154 (1963).
- 13) Fahrenbach, W. H., Sandberg, L. B. & Cleary, E. G. : Anat. Rec., 155, 563 (1966).
- 14) Robert, B., Szigeti, M., Derouette, J.-C., Robert, L., Bouissou, H. & Fabre, M. T. : Eur. J. Biochem., 21, 507 (1971).
- 15) Albert, E. N. & Fleischer, E. : J. Histochem. Cytochem., 18, 697 (1970).
- 16) Mizuhira, V. & Futaesku, Y. : 29th. Ann. Proc. EMSA. Boston, 494 (1971).
- 17) Luft, J. H. : J. Cell Biol., 23, 54A (1964).
- 18) Karrer, H. E. : J. Ultrastruct. Res., 4, 420 (1960).
- 19) Takagi, K. : Kumamoto Med. J., 22, 1 (1969).
- 20) Smith, J. W. : J. Cell Sci., 6, 843 (1970).
- 21) Matukas, V. J., Panner, B. J. & Orbison, J. L. : J. Cell Biol., 32, 365 (1967).
- 22) Anderson, H. C. & Sajdera, S. W., : J. Cell Biol., 49, 650 (1971).
- 23) Thyberg, J., Lohmander, S. & Friberg, U. : J. Ultrastruct. Res., 45, 407 (1973).
- 24) Myers, D. B., Highton, J. C. & Rayns, D. G. : J. Ultrastruct. Res., 42, 87 (1973).
- 25) Smith, J. W. & Frame, J. : J. Cell Sci., 4, 421 (1969).
- 26) Myers, D. B., Highton, J. C. & Rayns, D. G. : J. Ultrastruct. Res., 28, 203 (1969).
- 27) 堀 功 : 十全医会誌, 83, 379 (1974).
- 28) 渡辺洋望, 鈴木辰幹, 林 令子, 赤津博美, 神田忠光, 白石正二, 大高裕一 : 日病会誌 (抄録), 63, 133 (1974).
- 29) Kaplan, D. & Meyer, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105, 78 (1960).
- 30) Buddecke, E. & Kresse, H. : Angiologica, 6, 89 (1969).
- 31) Varadi, D. P. : J. Invest. Derm., 59, 238 (1972).
- 32) Ito, H. : Kumamoto Med. J., 26, 153 (1973).
- 33) Ross, R. & Bornstein, P. : J. Cell Biol., 40, 366 (1969).
- 34) Waisman, J., Carnes, W. H. & Weissman, N. : Am. J. Path., 54, 107 (1969).
- 35) McCullagh, K. G., Derouette, S. & Robert,

- L. : Exp. Mol. Path., 18, 202 (1973).
- 36) Partridge, S. M. : Fed. Proc., 25, 1023 (1966).
- 37) Gotte, L., Giro, M. G., Volpin, D. & Horne, R. W. : J. Ultrastruct. Res., 46, 23 (1974).
- 38) Kádár, A., Veress, B. & Jellinek, H. : Exp. Mol. Path., 11, 212 (1969).
- 39) Haust, M. D. : Amer. J. Path., 47, 1113 (1965).
- 40) Karrer, H. E. : J. Ultrastruct. Res., 5, 1 (1961).
- 41) Ross, R. & Klebanff, S. J. : J. Cell Biol., 50, 159 (1971).
- 42) Ross, R. : J. Cell Biol., 50, 172 (1971).
- 43) Schwarz, W. : Z. Zellforsch., 63, 636 (1964).
- 44) Moss, N. S. & Benditt, E. P. : Lab. Invest., 22, 166 (1970).
- 45) Scott, R. F., Jones, R., Daoud, A. S., Zumbo, O., Coulston, F. & Thomas, W. A. : Exp. Mol. Path., 7, 34 (1967).

写 真 説 明

写真1. 孵化8日. RR 染色. 腔の表面は RR 陽性物質で被われ, 内皮細胞 (En) の下に未分化間葉細胞 (M) がみられる. 細胞間は礎質で満たされる. $\times 6,000$.

写真2. 孵化8日中膜. RR 染色. 内膜側 (写真上部) から深部に向かって未分化間葉細胞 (M) は層状に配列する. 細胞間は礎質の網状構造が明らかで, 深部では線維成分が多い. $\times 6,000$.

写真3. 孵化15日中膜. myofilament を有する平滑筋細胞 (S) と粗面小胞体の発達した線維芽細胞 (F) がみとめられる. 細胞間には礎質と共に線維成分がかなり多くみとめられる. $\times 12,500$.

写真4. 孵化21日外膜. 線維芽細胞 (F) の間にコラーゲン線維 (Co) の増生が著明. Ef : 弾力線維. S : 平滑筋細胞. $\times 10,500$.

写真5. 孵化8日中膜. RR 染色. RR 陽性の礎質網状構造が豊富で, その中に弾力線維 (Ef) とコラーゲン線維 (Co) が散見される. $\times 18,000$. RR 陽性粒子とフィラメントは不明瞭な境界をもって連なり網状構造をつくる (挿入図, $\times 45,000$).

写真6. 孵化13日中膜. RR 染色. 弾力線維 (Ef) の表面およびコラーゲン線維 (Co) の表面は RR 弱陽性物質で包まれ, 礎質の RR 陽性の網状構造に連っ

ている. 弾力線維内部に紐状物質 (t) がみとめられる. $\times 60,000$.

写真7. 孵化11日中膜. グルタルアルデヒド・オスミウム固定. 礎質は無定形物質とフィラメント状物質の不規則な集積としてみとめられる. Ef : 弾力線維 $\times 60,000$.

写真8. 孵化21日中膜. タンニン酸固定. 礎質は粗大なフィラメント状物質としてみとめられる. Co : コラーゲン線維. $\times 60,000$.

写真9. 孵化14日. ヒアルロニダーゼ6時間作用. RR 染色. 礎質のフィラメントは消失, 粒子の数と直径は減少. Ef : 弾力線維. Co : コラーゲン線維. $\times 45,000$.

写真10. 孵化16日. コンドロイチナーゼ AC 12時間作用. RR 染色. 網状構造は消失し, 粗大凝集物が散在. 弾力線維 (Ef), コラーゲン線維 (Co) を含む R R 陽性物質は消化されない. $\times 45,000$.

写真11. 孵化16日. コンドロイチナーゼ ABC 12時間作用. RR 染色. 粒子もフィラメントも消失. 弾力線維 (Ef), コラーゲン線維 (Co) 表面の RR 陽性物質は抵抗を示す. $\times 45,000$.

写真12. 孵化14日. トリブシン3時間作用. RR 染色. フィラメントは比較的保たれるが粒子は目立たない. コラーゲン線維 (Co) の表面の RR 陽性物質は一部残存. $\times 45,000$.

写真13. 孵化14日. 写真9の対照. RR 染色. 礎質の網状構造はよく保たれている. Ef : 弾力線維. Co : コラーゲン線維. $\times 45,000$.

写真14. 孵化12日中膜. RR 染色. 平滑筋細胞 (S) の基底膜 (B) は RR 陽性を示し, それに接して弾力線維 (Ef) がみとめられる. $\times 45,000$.

写真15. 孵化21日中膜. タンニン酸固定. 平滑筋細胞 (S) の基底膜 (B) の中に新生弾力線維 (E) がみられる. 新生弾力線維は成熟弾力線維 (Ef) に比べて濃染. Mf : 基底膜周辺の microfibril. $\times 36,000$.

写真16. 孵化21日中膜. タンニン酸固定. 平滑筋細胞 (S) の基底膜 (B) に接して新生弾力線維 (Ef) がみられる. 基底膜内に microfibril (Mf) がみられるが, 弾力線維の周囲にはみられない. $\times 48,000$.

写真17. 孵化21日中膜. タンニン酸固定. 平滑筋細胞 (S) の周囲の成熟弾力線維 (Ef). 弾力線維の表面に少数の microfibril (Mf) が付着するが, 平滑筋細胞に接する側では microfibril を欠く. 線維内部に紐状構造物 (t) がみられ, 線維外縁の深い陥入と連っている. $\times 30,000$.

写真18. 孵化21日中膜. タンニン酸固定. 平滑筋細

胞(S)の成熟弾力線維(Ef), microfibril (Mf)は横断面で中空状にみえ, 弾力線維と密着せず, 線維が基底膜(B)に面する側には少ない, 線維内部に様々な電子密度の紐状構造物(t)がみられる. $\times 60,000$.

写真19-22. 孵化21日. エラスターゼ3時間作用. タンニン酸固定.

写真19. 平滑筋細胞(S)の基底膜(B)の中に円形のスポット状の欠損(矢印)がみられる. $\times 50,000$.

写真20. 成熟弾力線維(Ef)にひび割れ状の不規則な亀裂をみとめる. $\times 36,000$.

写真21. 粒子状に細分された弾力線維. $\times 36,000$.

写真22. 弾力線維のタンニン酸で濃染する物質は完全に消化されるが, 周辺の microfibril (Mf)は残存. $\times 12,000$.

写真23. 孵化16日. キモトリプシン24時間作用. タンニン酸固定. 弾力線維(Ef)は残存し, 周辺の microfibril は完全に消失する. コラゲン線維(Co)は残存. $\times 30,000$.

写真24. 孵化16日. コラゲナーゼ4時間作用. タンニン酸固定. 弾力線維(Ef)と microfibril (Mf)はともに消化されない. $\times 30,000$.

Abstract

The chick embryo aorta was studied by electron microscopy, in an attempt to elucidate the ultrastructure and chemical nature of the ground substance and elastic fibers.

The ground substance stained with ruthenium red was found in the form of a network consisting of dense granules and interconnecting filaments. It was suggested that the macromolecules diffusely distributed in the ground substance were precipitated by the fixative as a condensed network. Enzymatic digestion tests indicated that the granules and filaments contained largely sulfated protein-polysaccharides and hyaluronate, respectively.

The observations of elastogenesis and enzymatic digestion led us to the conclusion that the microfibrils associated with elastic fibers consisted of different protein (possibly a glycoprotein) from elastin and thus were not regarded as the integral constituents of elastic fibers.















