

綜 説

細胞骨格と細胞外基質

檜本 敦彦¹⁾ 大野 伸一²⁾ 伊藤 信夫¹⁾
重松 秀一¹⁾

1) 信州大学医学部第1病理学教室

2) 信州大学医学部第1解剖学教室

Cytoskeleton and Extracellular Matrix

Atsuhiko NARAMOTO¹⁾, Shinichi OHNO²⁾

Nobuo ITOH¹⁾ and Hidekazu SHIGEMATSU¹⁾

1) *Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine*

2) *Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine*

Key words: cytoskeleton, extracellular matrix, quick-freezing and deep-etching method, actin filament

細胞骨格, 細胞外基質, 急速凍結・ディープエッチング法, アクチンフィラメント

I 緒 言

細胞骨格 (cytoskeleton) とは細胞の形態を維持し、細胞内部の核や各種小器官の分布や配列を決定する線維性構造物のことをいい¹⁾、文字通り「細胞の骨格」と考えられている。すなわち、線維性細胞骨格が核・小器官・細胞膜などに結合することにより、細胞の極性を決定するとともに、細胞外基質や接着装置 (junctional complex) により、周囲の細胞や細胞外基質の中での位置を決定している。細胞骨格はおもにアクチンフィラメント、中間径フィラメント、微小管の3種類よりなるが、これらは細胞内では常に形成と分解との間で動的平衡状態を保っている。さらに細胞骨格は構築上の意義に加えて、細胞の運動、分裂や物質の取り込み、輸送、分泌などの機能を持ち併せている点が重要である²⁾。

細胞骨格の研究は近年急速に進歩しているが、そのアプローチにはいくつかの方法がある³⁾。なかでも生化学的方法や分子遺伝学的解析が行われているが、本稿では形態学的方法について述べてみたい。第1には

各種細胞骨格の局在について電顕的に微細構造を観察し、さらに蛍光抗体法や免疫電顕法を用いてそれらの成分を同定していく方法がある。通常の電顕超薄切片像でもある程度の観察は可能であるが、その低電子密度や細い直径のために樹脂包埋剤や細胞内小器官にかくされてしまったり⁴⁾、固定・脱水・包埋の過程における変化 (たとえばアクチンフィラメントが四酸化オスミウムで分解されてしまうこと⁵⁾) のために、正確にその局在を把握するのは難しい。その他の方法として厚い切片を高圧電顕で観察する方法や Triton X-100含有液で膜系や大部分の細胞内小器官を流出させた後、走査型電顕で観察する方法⁶⁾がある。また最近、細胞骨格の検索に有力な手段として登場したのが、急速凍結・ディープエッチング法である⁷⁾⁸⁾。この方法による細胞骨格や細胞外基質の研究は本学でも7年以上にわたり精力的に進められてきた⁸⁾⁻²⁶⁾。その対象の組織・細胞は肝⁹⁾⁻¹⁶⁾、腎糸球体¹⁷⁾⁻²²⁾、尿細管、甲状腺²³⁾、血小板²⁴⁾、骨格筋、神経細胞²⁵⁾、眼球、皮膚、マクロファージ²⁶⁾など多岐にわたっている。

急速凍結・ディープエッチング法を簡単に説明する

と、まずパラホルムアルデヒドで固定し、可溶性蛋白質を除去した細胞や組織を急速凍結する。さらに凍結割断・ディープエッチングという操作を加えて表層10 μm以内の三次元的微細構造を露出させた後、白金と炭素を蒸着してレプリカ膜を作製し、透過型電顕で観察するというものである。この方法の利点は①修飾の少ない生体内微細構造を三次元的に高解像力で観察できること、②線維構造の描出に優れ、線維構造相互の関係や核・細胞内小器官・細胞膜などの膜系との関係を明瞭に観察できるため、細胞骨格や基質の骨格構造の検索に適すること、③レプリカ膜上で組織化学的および免疫組織化学的同定が可能であること、④試料を生体から取り出してからレプリカ膜を作製し電顕下で観察できるまでに要する時間がわずか3～4時間であること（したがって、急速凍結・ディープエッチング法は「迅速電顕試料作製法」とも言える。）、などである。

細胞骨格に対する第2のアプローチとしてそれぞれの骨格構造を選択的に増加ないしは破壊させる薬剤を投与することによって生ずる形態学および機能的変化を解析する方法があげられる。たとえば、微小管はチューブリン (tubulin) という球状分子が重合してできた直径約24nmの細管状構造物である²⁷⁾が、コルヒチンはこの重合を阻害し、一方タキソールは微小管安定化作用を持っている。肝細胞は外分泌機能と内分泌機能の両面を兼ね備えた細胞であるが、コルヒチンを投与することにより、リポ蛋白質やアルブミンの血中分泌量が減少することから、微小管はDisse腔へ的小胞輸送にかかわっていることが推測できる²⁸⁾²⁹⁾。一方、コルヒチンを投与しても胆汁流量は変化しないが、その中に含まれるIgA、インスリン、アルブミンなどの蛋白質やリン脂質は著しく減少することから、微小管はこれらの物質の毛細胆管への分泌に関する機能を有していると言える³⁰⁾。

第3のアプローチとして、病的人体材料や実験モデルなどにおける細胞骨格の変化を検索することにより、病態メカニズムを知るとともに、逆に細胞骨格の生理的な機能が類推できる。

特に本稿では肝細胞における細胞骨格とその病的変化を中心に、著者らのデータと最近の形態学的知見を概説するとともに、腎糸球体基質および上皮細胞内細胞骨格の微細構造についても言及する。

II アクチンフィラメント

肝臓の外分泌機能として胆汁の生成・分泌があげられるが、肝臓からどのようにして胆汁が流出するのか長い間不明であった。肝細胞索中に複雑に走行する毛細胆管は肝細胞間のくぼみにすぎず、筋上皮細胞や腺房中心細胞は存在しない³¹⁾。1973年、Gabbianiが抗アクチン抗体と各種組織の反応性について検索したところ、血小板、リンパ球、肝細胞、尿細管上皮、小腸上皮などの非筋細胞にアクチンが存在することを発見した³²⁾。肝細胞ではアクチンは細胞膜直下に局在し、免疫蛍光抗体法ではpolygonal patternを呈するが、中でも毛細胆管周囲により豊富に存在する³³⁾³⁴⁾。従来の電顕超薄切片像では、毛細胆管周囲の細胞質は細胞内小器官に乏しく、やや電子密度の高い線維状構造物からなり、pericanalicular ectoplasmと呼ばれている³⁵⁾ (Fig.1a)。急速凍結・ディープエッチング法では直径7～10nmのマикроフィラメントが網目状に存在しており、毛細胆管膜に端側結合している¹⁶⁾ (Fig.1b)。このアクチンフィラメントにより、毛細胆管が収縮して胆汁が輸送される³⁶⁾。毛細胆管の収縮にはカルシウムやその受容蛋白質であるカルモジュリン、その他ATPなど多くの因子を必要とする³⁷⁾。しかも隣接する肝細胞間のgap junctionを通じてカルシウムの移動がおり、これにより小葉中心部から末梢部へ毛細胆管の蠕動運動が伝わっていくと言われている³¹⁾。Phillipsら³⁸⁾は2個以上のラット肝細胞が接着し、細胞間に毛細胆管を形成しているdoublet cellを用いて、time-lapse cinemotomographyにより、毛細胆管の収縮運動を直接観察したが、収縮頻度は約5分間に1回であると報告している。この運動はサイトカラシンB (globular actin—Gアクチン—のbarbed endに結合し、filamentous actin—Fアクチン—への重合を抑制するカピの代謝産物) 投与により抑制され、毛細胆管はトーンスを失って拡張してしまう³⁸⁾。一方、*in vivo*でこのサイトカラシンBを投与すると毛細胆管周囲性アクチンフィラメントはその線維形態から顆粒状に変化し、毛細胆管は微絨毛を失って拡張する³⁹⁾。この際、胆汁流量は低下するという³⁹⁾。これらはアクチンフィラメントが毛細胆管収縮のdriving forceであることを示すとともに³¹⁾、肝内胆汁うっ滞の原因として毛細胆管周囲性アクチンフィラメントの障害による毛細胆管の収縮不全が考えられる。最近、リンホカインの一種である催胆汁うっ滞因

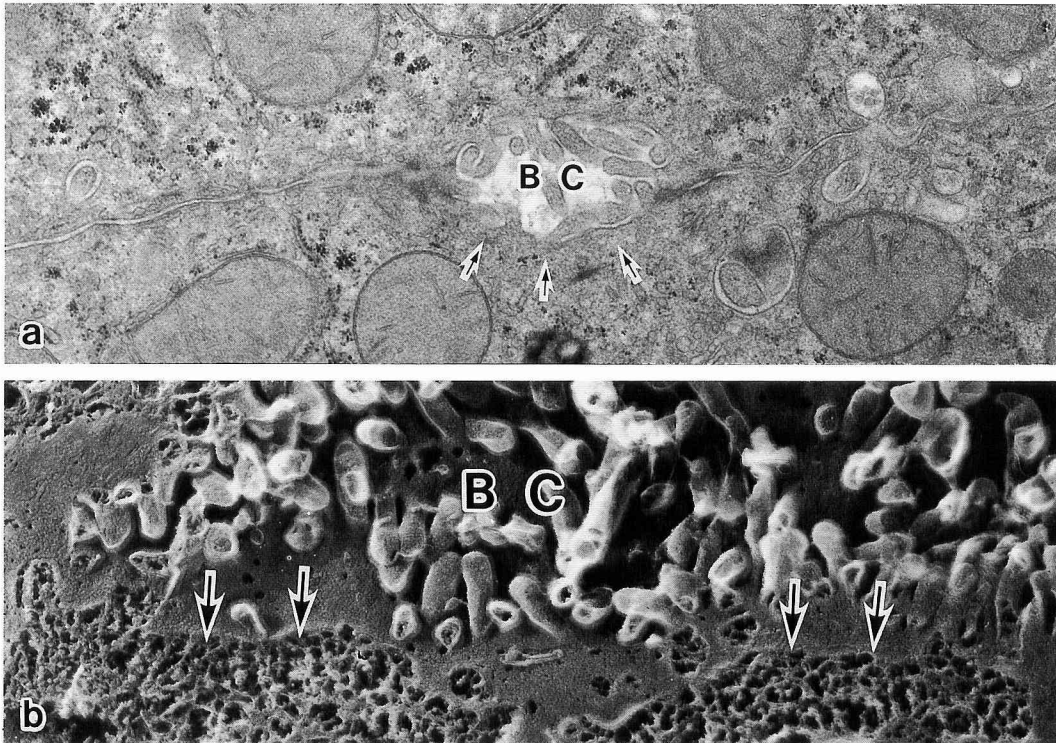


Fig. 1

- Fig. 1 a 正常ラット肝毛細胆管 (BC) の電顕超薄切片像。毛細胆管内には多数の微絨毛が認められる。矢印は pericanalicular ectoplasm を示す。×20,000
 b 正常マウス肝毛細胆管 (BC) の急速凍結・ディーブエッチング像。毛細胆管内には多数の微絨毛が認められる。毛細胆管周囲の細胞質には直径 7~10nm の網目状のマイクロフィラメント (矢印) が認められ、毛細胆管細胞膜に端側結合している。×27,000

- Fig. 2 ファロイジン投与肝における毛細胆管周囲性マイクロフィラメント (MF)
 a 電顕超薄切片像。毛細胆管 (BC) は拡張し、周囲のマイクロフィラメントは著増している。その周囲には束状化した中間径フィラメント (矢印) も認められる。×34,000
 b 電顕レプリカ像。著増した毛細胆管周囲性マイクロフィラメントの配列が高解像力で三次元的に観察される。マイクロフィラメントは吻合・分岐を繰り返しながら複雑な網目状構造を形成している。マイクロフィラメントの一端は毛細胆管細胞膜に端側結合している。×41,000
 c 拡張した毛細胆管の周囲には網目状のマイクロフィラメントが認められ、毛細胆管細胞膜や小胞に端側結合している。矢印は束状の中間径フィラメントを示し、マイクロフィラメントと結合している。×24,000
 d S_1 で修飾されたマイクロフィラメント。マイクロフィラメントの太さは不規則になり、周期性構造も認められる。アクチンフィラメントは小胞 (V) に端側結合している。矢印はアクチンフィラメント間に存在する S_1 で修飾されない細線維 (cross-bridge) を示す。×85,000

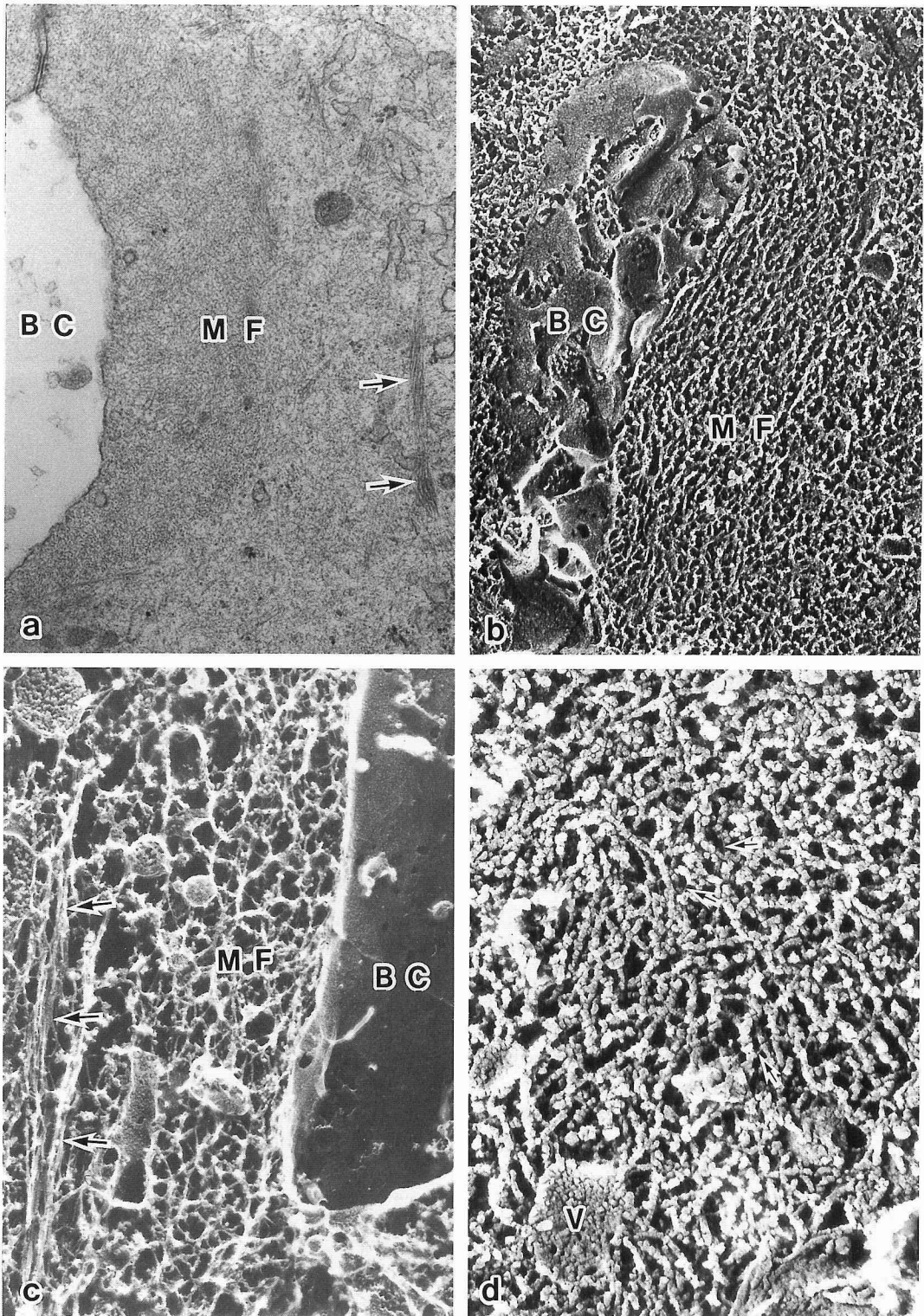


Fig. 2

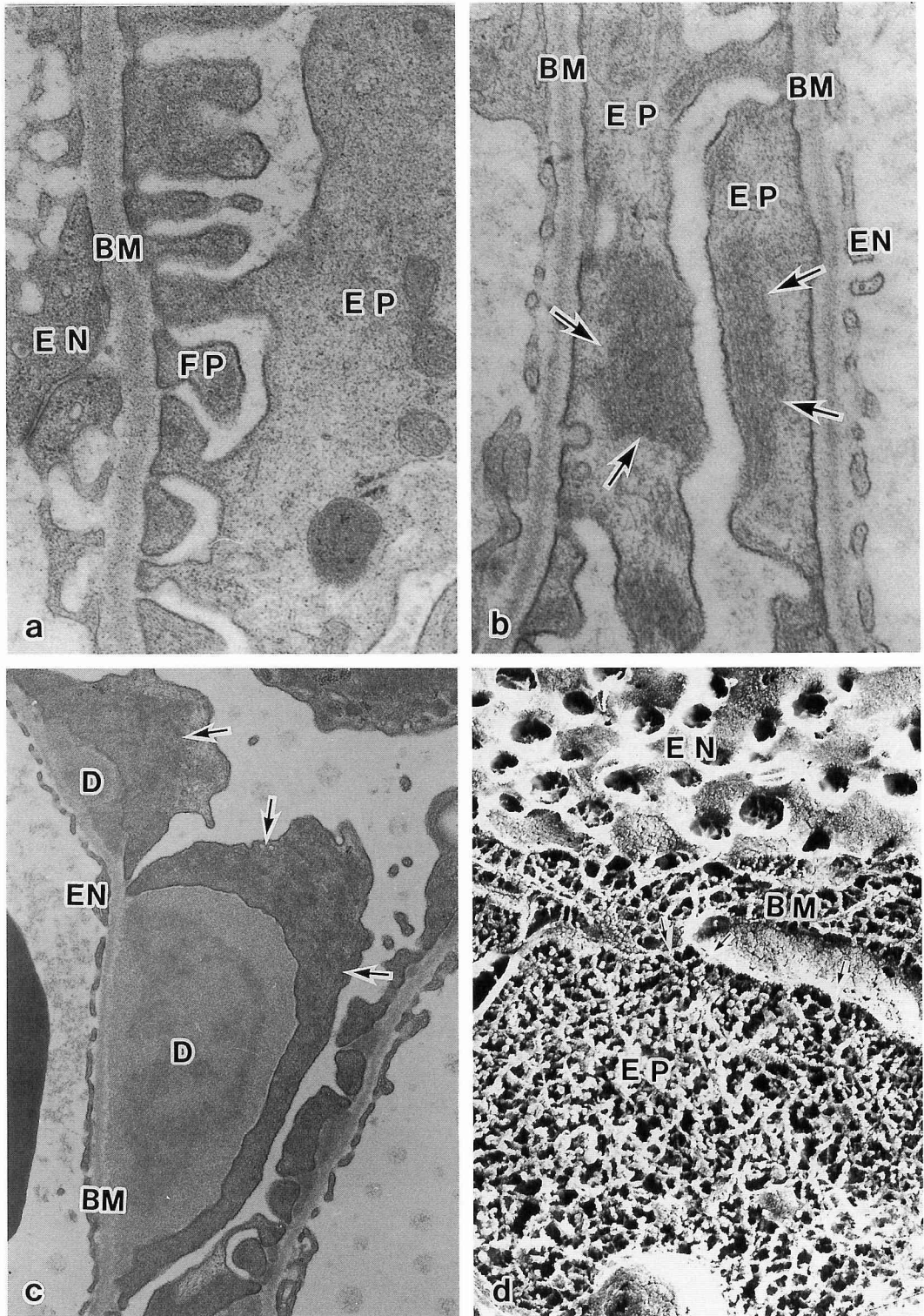


Fig. 3

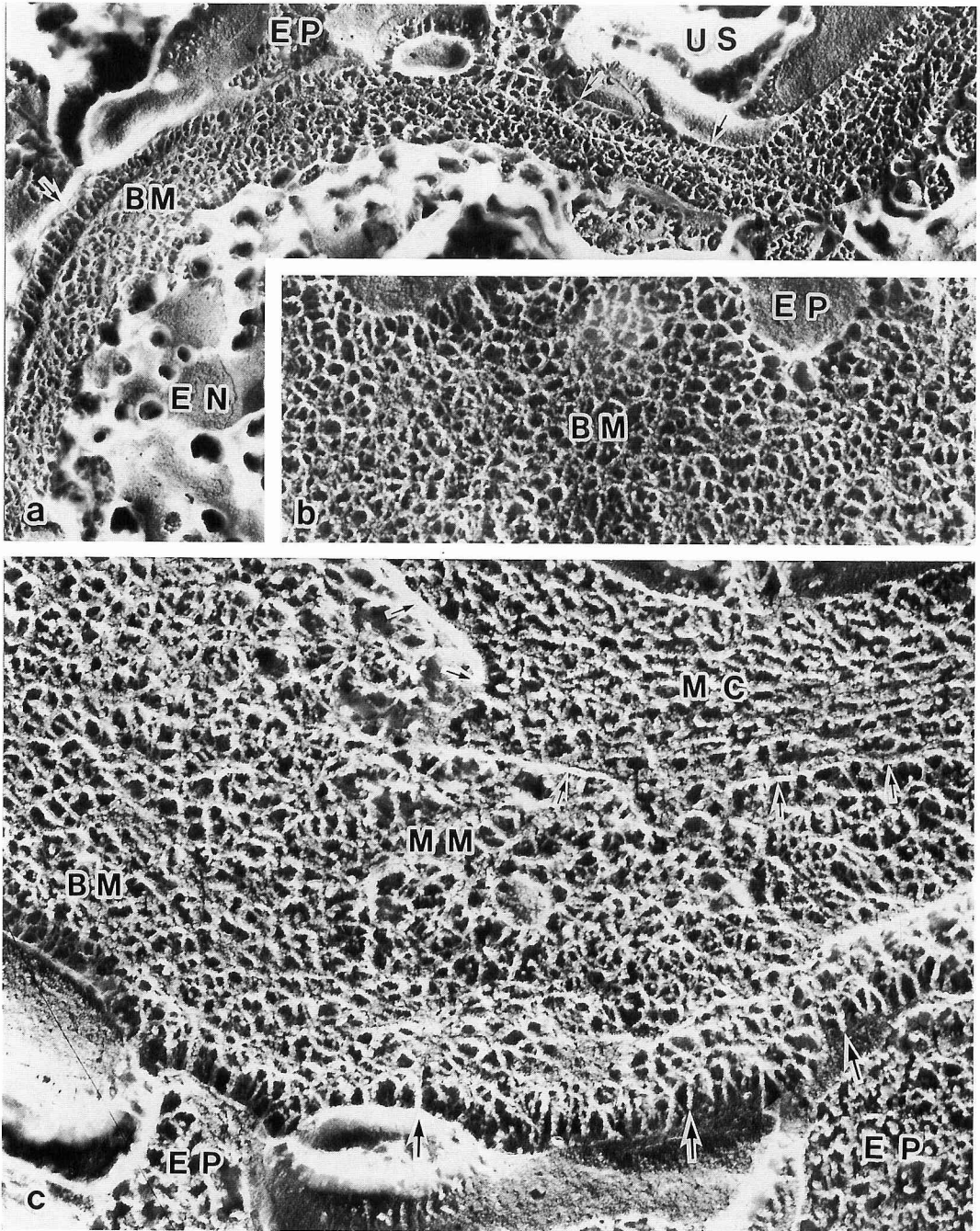


Fig. 4

子 (Cholestatic factor) がサイトカラシン類似のアクチンフィラメント障害性を有することが示唆された³⁹⁾。

一方、ファロイジン (毒きのこである *Amanita phalloides* から抽出した環状ペプチド) はGアクチンからFアクチンへの重合を促進し、逆にFアクチンの脱重合を抑制することにより、毛細胆管周囲性アクチンフィラメントを著増させる¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾²⁰⁾⁴⁰⁾ (Fig. 2a)。急速凍結・ディープエッチング法で観察するとアクチンフィラメントによる三次元的網目構造が明瞭である¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾ (Fig. 2b, 2c)。すなわち、毛細胆管細胞膜に直接に端側結合しているアクチンフィラメントは複雑に吻合・分岐を繰り返しながら、もう一端は外側の束状中間径フィラメントや小胞 (vesicle) に端側結合している。このような網目状フィラメントがFアクチンであることは、ミオシンサブフラグメント (S_1) やヘビーメロミオシン (HMM) で修飾されることにより証明される¹⁴⁾¹⁵⁾ (Fig. 2d)。ファロイジン投与により毛細胆管周囲性アクチンフィラメントが増加しすぎても胆汁うっ滞が生ずるのは興味深い。ファロイジン投与早期では胆汁流量は変わらないが、ICG 排泄量は増加することが報告されており⁴¹⁾、適度のアクチンフィラメントの増加は、胆汁分泌を亢進させると考えられる。しかしながら、ファロイジンを長期間投与すると、

過度に増加したFアクチンのネットワークにより、かえって毛細胆管膜の収縮が妨げられると思われる。すなわち、サイトカラシンB投与による毛細胆管は弛緩性 (paralytic) であり、ファロイジン投与時の毛細胆管は攣性 (spastic) であると言える。このような病的状態の検索から、正常肝細胞内に存在するFアクチンとGアクチンの動的平衡状態 (G-F転換) が、毛細胆管の収縮に重要であることが推察される。

ファロイジン投与により胆汁うっ滞を生ずるもう1つの原因は、著明に肥厚したアクチンフィラメント層が毛細胆管への胆汁分泌の障害になるためと思われる。その形態学的裏付け所見としてアクチンフィラメントのすぐ外側の細胞質に分泌顆粒、小胞、ゴルジ装置、滑面小胞体、微小管などの分泌系小器官が集積してくる点があげられる¹¹⁾¹⁰⁾。胆汁酸の肝細胞内輸送経路の1つとして、滑面小胞体からゴルジ装置、小胞を経て、毛細胆管内へ分泌される小胞輸送系が考えられている⁴²⁾が、毛細胆管周囲の厚いフィラメント層にはばまれて毛細胆管への胆汁分泌ができなくなっていると考えられる。

ヒトの肝内胆汁うっ滞では、ウイルスや薬剤が何らかの機序を介して、毛細胆管周囲性アクチンフィラメントを断裂させることにより胆汁うっ滞をおこすが、一方ではうっ滞した胆汁の排泄を促進させるためにア

Fig. 3 ラット腎糸球体上皮細胞のアクチンフィラメント EP: 上皮細胞, BM: 基底膜, EN: 内皮細胞

- 正常糸球体の電顕超薄切片像。足突起 (FP) 内は比較的高電子密度である。×34,000
- ファロイジン投与糸球体の電顕超薄切片像。矢印は上皮細胞内尿腔側に増加したマイクロフィラメントを示す。×34,000
- 血清病腎炎糸球体の電顕超薄切片像。Hump 様免疫沈着物 (D) を覆うように上皮細胞足突起が扁平化しており、矢印で示すように細胞質に高電子密度の構造物がみられる。×17,000
- 血清病腎炎糸球体の電顕レプリカ像。上皮細胞内には多数の網目状マイクロフィラメントが存在し、 S_1 で修飾されている。このフィラメントは基底膜直下の細胞膜に端側結合 (矢印) している。また、内皮細胞には小孔 (fenestration) が明瞭である。×51,000

Fig. 4 急速凍結・ディープエッチング法による正常ラット腎糸球体基質の三次元的微細構造

EP: 上皮細胞, BM: 基底膜, EN: 内皮細胞, US: 尿腔, MM: メサンギウム基質, MC: メサンギウム細胞

- 末梢係蹄全体像。基底膜は網目状基質よりなり、結合細線維により細胞膜に端側結合 (矢印) している。内皮細胞には小孔 (fenestration) が明瞭に認められる。×29,000
- 基底膜斜断像。基底膜は直径8~15nmの細線維よりなる網目状構造を呈している。EPは上皮細胞の細胞膜を示す。×36,000
- メサンギウム角。メサンギウム基質は基底膜にくらべ、やや疎な網目状構造を呈しており、一端はメサンギウム細胞膜 (小矢印) へ端側結合しており、他端は基底膜中層へ直接移行している。メサンギウム細胞内に細胞骨格が認められる。大きい矢印は基底膜外層の結合細線維を示している。×58,500

クチンフィラメントが反応性に増加するという⁴¹⁾。このことは総胆管を結紮した閉塞性黄疸モデルラットでも確かめられている¹²⁾¹³⁾。このモデルでは毛細胆管周囲性アクチンフィラメントは均一幅をもって増加しているが、これは閉塞機転による毛細胆管内圧上昇に対し毛細胆管の収縮力を高めて胆汁流出を促進すること、および毛細胆管の形態を保持するためと思われる¹²⁾。

以上、アクチンについて述べてきたが、筋細胞で明らかのように収縮機構にはアクチンの他にミオシンの関与が不可欠である。肝細胞内におけるミオシンの局在については長い間不明であったが、近年 Ueno ら⁴³⁾はウサギの肝細胞からミオシンを単離し、肝細胞ミオシンに対する抗体を作製してその局在を明らかにした。それによると、ミオシンの分布はアクチンと同様に肝細胞膜直下に polygonal に染色され、なかでも毛細胆管周囲に豊富に局在するという。また、ファロイジンやサイトカラシン B を投与して蛍光抗体法で観察すると、ミオシンはアクチンと同様な増減分布を示す⁴⁴⁾。すなわち、肝細胞においてはアクチンとミオシンの局在は一致するので、両者の間には何らかの関連性があることが推測されている。以上のように光顕レベルにおけるミオシンの分布は明らかにされたが、超微形態学的局在については依然不明であり、その解明が待たれている。ミオシンが可溶性蛋白質として存在するのか、それとも筋細胞に見られるようにフィラメントとして存在するのかは興味深い問題である。細胞質流動をおこすアクチン系では一方向性に配列したアクチンフィラメント束に沿ってゾル状態のミオシンが反応しながら滑走することにより運動が生ずると言われている⁴⁵⁾。一方、著者らはファロイジン投与ラット肝臓で、増加したアクチンフィラメントを S₁ で染色してみると、大部分のフィラメントは S₁ で修飾されるが、S₁ で修飾されない直径 4~7 nm のフィラメントが存在することを報告した¹⁴⁾¹⁵⁾。これらのフィラメントはアクチンフィラメント間に cross-bridge として局在する。このフィラメントがミオシンであるのか、あるいは α -アクチニンやアクチノゲリンといった架橋蛋白質であるのか現在までのところ不明である。また、Roberts⁴⁶⁾は細いフィラメントの構成蛋白として、spasmin, echinonematins, nematode MSP, tektin, giardin, titin といった物質があることを報告しているが、これらについて、レプリカ膜上で免疫組織化学的に同定していくことが、今後の課題になるとと思われる。

次に腎糸球体上皮細胞の細胞骨格、特にアクチンの

局在とその病的変化について述べてみたい。正常糸球体上皮細胞では、アクチンは細胞膜直下、特に足突起内に豊富に存在する⁴⁷⁾ (Fig. 3a)。一方、中間径フィラメントや微小管は、細胞体や一次突起内に局在する。ファロイジンを投与して上皮細胞の細胞骨格の変化を観察すると、アクチンフィラメントは細胞質内で不規則に凝集することもあるが、主として尿腔側に著増している (Fig. 3b)。また、肝細胞 (培養肝細胞と組織内肝細胞) においても主に apical side すなわち、毛細胆管側にアクチンフィラメントが増加すると言われている。すなわち、ファロイジンは apical side (糸球体上皮細胞であれば尿腔側) で、G アクチンから F アクチンへの転換を促進し、アクチンフィラメントを増加させる性質を有している。しかし、メサングウム細胞や尿細管上皮細胞はファロイジンを投与してもアクチンフィラメントが増加することはない。メサングウム細胞にはその細胞突起も含め、アクチンが認められ、収縮運動を司っている。この収縮により糸球体濾過が調節されるとともに、メサングウム細胞突起中のアクチンフィラメントは、細胞膜をはさんで基底膜を、毛細血管内とメサングウム基質内の静水圧差に抗して保持する機能を有していると言われている⁴⁸⁾。しかし、ファロイジンに対する反応に乏しいことから、これらの細胞は肝細胞や糸球体上皮細胞に比べ、生理的状態におけるアクチンの G \rightleftharpoons F 転換が活発でないことが予想される。逆に糸球体上皮細胞では、通常アクチンの G \rightleftharpoons F 転換が活発であり、ファロイジン投与下では G アクチンが尿腔側細胞膜直下に移動して F アクチンになることが予想される。一方、病的状態下におけるアクチンフィラメントの動態については、ファロイジン投与の場合と比較して対照的である。微小変化群をはじめとするネフローゼ症候群や糸球体腎炎ではしばしば足突起が扁平化しているが、電顕超薄切片像では扁平化した足突起内は高電子密度になっている。ラット血清病腎炎でも基底膜から尿腔側に向かい突出した免疫沈着物を覆うような形で上皮細胞足突起が扁平化しており、その細胞質内は同様に高電子密度である¹⁹⁾ (Fig. 3c)。これを急速凍結・ディーブエッチング法で観察すると、フィラメントによる密な網目状構造よりなっており、これらのフィラメントの大部分は S₁ による修飾を受けていることから、アクチンフィラメントであると同定された¹⁹⁾ (Fig. 3d)。アクチンフィラメントは基底膜直下の細胞膜に端側結合しており (Fig. 3d, 矢印)、細胞膜内蛋白である vinculin,

talín, integrinなどを介して、後述する基底膜外層（外透明層）の結合細線維に連結しているものと思われる。この結合細線維が断裂すると、上皮細胞が剝離することになり、蛋白尿が急増すると言われている⁴⁹⁾。さらに上皮細胞の剝離は局所の糸球体硬化を促進すると言われている⁵⁰⁾。したがって、糸球体腎炎では扁平化した足突起内でのアクチンフィラメントの増加は、結合細線維や細胞膜を補強することにより、上皮細胞の剝離を阻止し、蛋白尿を抑制したり、また硬化を防止する反応性の変化と考えられる¹⁹⁾。このような病的状態下では上皮細胞内の可溶性蛋白質であるGアクチンが基底膜側へ移動し、網目状のアクチン線維網を形成する。すなわち、細胞質内を流動しているGアクチンは病的状態に対し常に適応できるようになっていると考えられる。

III 中間径フィラメント

中間径フィラメントは直径が10nmであることから、10nmフィラメントとも呼ばれ、ケラチン、ビメンチン、デスミン、ニューロフィラメント、グリアフィラメント (glial fibrillary acidic protein) の5種類があげられている。これら5種類のフィラメントはそれぞれ上皮細胞、間葉系細胞、筋細胞、神経細胞、グリア細胞にある程度の特異性を示し、おのおののフィラメントに対する免疫組織化学的応用が腫瘍の病理学的診断に重要な役割りを果たしている。本項では肝細胞内中間径フィラメントとその病的変化について述べてみたい。

肝細胞内中間径フィラメント（構造蛋白質はサイトケラチン）の機能の1つは、肝細胞内の核や小器官の膜系に結合することによりそれらの局在を決定するという、いわば空間統合的な役割りである⁵¹⁾。すなわち、ミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ装置、小胞、中心小体などの間には中間径フィラメントが張りめぐらされており、他端は①細胞膜直下のアクチンフィラメントに結合するもの、②細胞膜に直接結合するもの、③デスモゾームに結合するもの、④以下に述べる pericanalicular sheath に結合するものなどがある。中間径フィラメントの一部はデスモゾームに結合することにより、隣接肝細胞との接合に対する役割りを果たしており、アクチンフィラメントとともに paracellular pathway（類洞から肝細胞相互の間隙を通過して毛細胆管へ至るルート）を調節している可能性がある¹²⁾。近年、Katsumaら⁵²⁾は肝細胞質の辺縁部に沿って per-

icanalicular sheath と呼ばれる中間径フィラメントの集合体が存在することを報告した。この pericanalicular sheath の存在により、肝細胞は polygonal structure を維持できると考えられる。また、pericanalicular sheath には毛細胆管周囲性アクチンフィラメントが端側結合しており、アクチンフィラメントが収縮する際の支点になっていることが予想される¹⁵⁾¹⁶⁾。胆汁うっ滞の際には、増加した毛細胆管周囲性アクチンフィラメントの外側に束状の中間径フィラメントが明瞭に局在する (Fig.2c)。これは pericanalicular sheath が補強された像とも考えられ、胆汁内圧上昇や胆汁うっ滞に対する細胞骨格の適応現象と考えられる¹⁶⁾。

中間径フィラメントに対する特異的な阻害剤はみつかっておらず、ケラチンの代謝機構も不明である。岡上ら⁵³⁾、Ohtaら⁵⁴⁾は heat shock protein の一種であるユビキチン (ubiquitin) が、中間径フィラメントの変性・集合産物とみられる Mallory 小体やその周辺の変性した中間径フィラメントに認められると報告している。Mallory 小体のユビキチン化のみならず、Alzheimer 病の paired helical filament, Parkinson 病の Lewy 小体、Pick 病の Pick 小体など中間径フィラメントからなる細胞内封入体にもユビキチンが関係していると言われており、中間径フィラメントの分解あるいは変性過程にユビキチンが関与している点は興味深い⁵³⁾。

IV 腎糸球体基質の三次元的微細構造

「細胞外基質」は、近年注目されてきた研究分野であり、腎糸球体病変についても基質の変化が重要視されている。糸球体基質の微細構造とその病的変化の詳細については、既報の論文^{17)~22)}および総説⁵⁵⁾を参照されたい。本項では正常ラット糸球体基質の三次元的微細構造について簡単に述べたい。糸球体基質は基底膜とメサンギウム基質よりなるが、急速凍結・ディープエッチング法による研究から、これらの基質には細線維による基本骨格構造が存在し、さらに別の細線維によって上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞などの細胞膜に端側結合していることが明らかにされた^{17)~22)}。

糸球体基底膜中層（従来の緻密層に相当）は、直径8~15nmの細線維が三次元的網目構造を形成している (Fig.4a,4b)。この細線維の基本構造は core にIV型コラーゲンが存在し、その周囲をラミニンが取りま

いている⁵⁶⁾。さらにこれにヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) やエンタクチンなどが加わって1本の細線維を形成していると言われている。このような中層の三次元的網目構造は蛋白質の透過を制御するサイズ選択性閥門 (size selective barrier) として重要な意義をもっている。その pore size は約15nmであり、これは基底膜に対する透過性実験の結果⁵⁷⁾に矛盾しないものである。一方、基底膜外層 (外透明層に相当) および内層 (内透明層に相当) は決して透明ではなく、中層の網目状構造と細胞膜をつなぐ結合細線維 (connecting fibril, perpendicular fibril) が存在する¹⁸⁾¹⁹⁾²¹⁾²²⁾。この結合細線維は以下の2つの重要な機能を持つと考えられる⁵⁵⁾。第1に基底膜中層と細胞膜を結合するという機能であり、上皮細胞の剝離に際しては結合細線維の断裂が前駆的病変になることである¹⁸⁾¹⁹⁾。しかも上皮細胞や内皮細胞の剝離は、蛋白尿の増加や硬化病変の進行を促進する重要な病理学的変化と考えられている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。第2には結合細線維にはヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が豊富に局在し、荷電選択閥門 (charge selective barrier) としての機能を果たしていると考えられている。ポリエチレンイミン (PEI) を灌流して急速凍結・ディープエッチング法で観察したところ、PEI 粒子が結合細線維に付着することが明らかとなった⁵⁹⁾。今後、抗 HSPG 抗体を用いてレプリカ膜上で正確な HSPG の分布を検索することが必要である。

メサンギウム基質は上皮細胞側 (パラメサンギウム) と内皮細胞側に分けられ、両者の接する部分がメ

サンギウム角に相当する。パラメサンギウムは、末梢係蹄より連続的に移行する基底膜 (mesangial GBM) とその内側のメサンギウム基質よりなる。基底膜の三次元的微細構造は末梢の基底膜と同様であるが、内層の構造はなく、直接メサンギウム基質に移行している。メサンギウム基質は直径8~15nmの細線維より構成されており、基底膜中層に比較してかなり疎な網目構造からなっている (Fig. 4c)。その網目の大きさは30~40nm程度であり、これがいわゆるメサンギウム流路に相当すると思われる¹⁸⁾²¹⁾。メサンギウム基質を構成する網目状細線維は一端では基底膜中層の細線維に直接移行し、他端ではメサンギウム細胞の細胞膜に端側結合している。メサンギウム細胞の収縮はこの網目状細線維構造を介して末梢基底膜に伝えられることになり、係蹄の透過性を調節していると考えられる。一方、内皮細胞側のメサンギウム基質はごく少量の疎な網目状構造よりなり、内皮細胞の小孔 (fenestration) を通して、物質が流入しやすくなっている。

以上のような腎糸球体基質の微細構造が、沈着・増殖 (硬化)・破壊といった基質病変に際し、どのような変化を生ずるかについても急速凍結・ディープエッチング法により、しだいに明らかになってきている^{17)~20)}。今後さらに免疫組織化学的同定法やヒト生検材料への応用により、糸球体病変を「細胞外基質の病理」という観点から解明していくことが重要であると思われる。

文 献

- 1) 石川春律: サイトスケルトンの形態. 肝胆膵, 11: 659-666, 1985
- 2) 谷川久一, 権藤和久, 上野隆登, 本告 仁: 肝細胞サイトスケルトン. 形態と機能. 肝胆膵, 11: 675-681, 1985
- 3) 石川春律: 図説細胞骨格. pp. 1-9, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1985
- 4) 岡上 武, 太田正治, 瀧野辰郎: 肝細胞サイトスケルトン. intermediate filament. 肝胆膵, 11: 707-716, 1985
- 5) Maupin-Szamier, P. and Pollard, T. D.: Actin filament destruction by osmium tetroxide. J Cell Biol, 77: 837-852, 1978
- 6) Okanou, T., Ohta, M., Fushiki, S., Ou, O., Kachi, K., Okuno, T., Takino, T. and Frenchi, S. W.: Scanning electron microscopy of the liver cell cytoskeleton. Hepatology, 5: 1-6, 1985
- 7) Heuser, J. and Kirschner, M.: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeleton. J Cell Biol, 86: 212-234, 1980
- 8) Ohno, S.: Immunocytochemical study on the cytoplasmic side of cell membranes infected with vesicular stomatitis virus by quick-freezing and deep-etching replica method. Histochemistry, 82: 565-575, 1985

- 9) Ohno, S. and Fujii, Y.: Three-dimensional and histochemical studies of peroxisomes in cultured hepatocytes by quick-freezing and deep-etching method. *Histochem J*, 22: 143-154, 1990
- 10) Ohno, S. and Fujii, Y.: Three-dimensional studies of the cytoskeleton of cultured hepatocytes: A quick-freezing and deep-etching study. *Virchows Arch [A]*, 418: 61-70, 1991
- 11) 橋本敦彦: 急速凍結・ディープエッチングレプリカ法によるファロイジン投与肝の肝細胞骨格の研究. *肝臓*, 29: 365-376, 1988
- 12) 橋本敦彦, 中野雅行, 伊藤信夫, 中沢 功, 古田 清: 急速凍結・ディープエッチングレプリカ法による閉塞性黄疸肝の肝細胞サイトスケルトンの研究. *肝臓*, 29: 927-937, 1988
- 13) Naramoto, A., Furuta, K. and Ohno, S.: Cytoskeletal organization in the hepatocytes of cholestatic liver models by quick-freezing and deep-etching method. *J Clin Electron Microscopy*, 21: 708-709, 1988
- 14) Naramoto, A., Ohno, S., Takami, H. and Nakazawa, K.: Identification of actin filaments in phalloidin-treated hepatocytes with HMM and SI by quick-freezing and deep-etching method. *J Clin Electron Microscopy*, 22: 730-731, 1989
- 15) Naramoto, A., Ohno, S., Itoh, N., Takami, H., Nakazawa, K. and Shigematsu, H.: Three-dimensional identification of actin filaments in phalloidin-treated rat livers by quick-freezing and deep-etching method. *Virchows Arch [A]*, 417: 15-20, 1990
- 16) Naramoto, A., Ohno, S., Furuta, K., Itoh, N., Nakazawa, K., Nakano, M. and Shigematsu, H.: Ultrastructural studies of hepatocyte cytoskeletons of phalloidin-treated rats by quick-freezing and deep-etching method. *Hepatology*, 13: 222-229, 1991
- 17) Naramoto, A., Ohno, S., Nakazawa, K. and Takami, H.: Three-dimensional identification of laminin in rat glomeruli of Masugi nephritis by quick-freezing and deep-etching method. *J Clin Electron Microscopy*, 23: 1058-1059, 1990
- 18) Naramoto, A., Ohno, S., Itoh, N., Shibata, N., Nakazawa, K., Takami, H., Duan, H., Kasahara, H. and Shigematsu, H.: Ultrastructure of matriceal changes in chronic phase of Masugi nephritis by quick-freezing and deep-etching method. *Virchows Arch [A]*, 418: 51-59, 1991
- 19) Naramoto, A., Ohno, S., Nakazawa, K., Takami, H., Itoh, N. and Shigematsu, H.: Three-dimensional ultrastructure of glomerular injury in serum sickness nephritis by quick-freezing and deep-etching method. *Virchows Arch [A]*, 418: 185-192, 1991
- 20) Naramoto, A., Ohno, S., Itoh, N., Shibata, N. and Shigematsu, H.: Localization of laminin in nephritic glomeruli as revealed by quick-freezing and deep-etching method with immunohistochemistry. Submitted for publication.
- 21) Takami, H., Naramoto, A., Nakazawa, K., Shigematsu, H. and Ohno, S.: Ultrastructure of glomerular mesangial matrix by quick-freeze and deep-etch methods. *Kidney Int*, 38: 1211-1215, 1990
- 22) Takami, H., Naramoto, A., Shigematsu, H. and Ohno, S.: Ultrastructure of glomerular basement membrane by quick-freeze and deep-etch methods. *Kidney Int*, 39: 659-664, 1991
- 23) Ohno, S. and Takasu, N.: Three-dimensional studies of cytoskeletal organizations in cultured thyroid cells by quick-freezing and deep-etching method. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 38: 352-362, 1989
- 24) Ohtake, N.: Attachment of cytoskeletons to cell membranes in human blood platelets as revealed by the quick-freezing and deep-etching replica method. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 95: 84-95, 1986
- 25) 伊沢妙子: 急速凍結・ディープエッチングレプリカ法による培養脊髄神経節細胞の超微形態学的研究. *信州医誌*, 36: 653-676, 1988
- 26) Baba, T., Shiozawa, N., Hotchi, M. and Ohno, S.: Three-dimensional study of the cytoskeleton in macrophages and multinucleate giant cells by quick-freezing and deep-etching method. *Virchows Arch [B]*, 61: 39-47, 1991

- 27) Patzelt, C., Singh, A. and Le Marchand, Y.: Colchicine binding protein of the liver. Its characterization and relation to microtubules. *J Cell Biol*, 66: 609-620, 1974
- 28) Redman, C. M., Banerjee, D. and Howell, K.: Colchicine inhibition of plasma protein release from rat hepatocytes. *J Cell Biol*, 66: 42-59, 1975
- 29) 織田正也, 小松正一, 塚田信廣, 渡辺勲史, 中村正彦, 土屋雅春: 肝細胞とマイクロチューブルス. *肝胆膵*, 11: 717-726, 1985
- 30) 森 道夫, 佐藤昌明: 黄疸の電子顕微鏡的形態学. *病理と臨床*, 5: 777-785, 1987
- 31) 森 道夫: 細胞骨格の機能病理学—肝臓を中心として—. *日本病理学会誌*, 80: 14, 1991
- 32) Gabbiani, G.: Human smooth muscle antibody. *Am J Pathol*, 72: 473-488, 1973
- 33) 西岡幹夫, 相引利行, 寺田総一郎: 抗アクチン抗体. *肝胆膵*, 11: 737-744, 1985
- 34) Namihisa, T., Tamura, K. and Saifuku, K.: Fluorescent staining of microfilaments with heavy meromyosin labeled with N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl) maleimide. *J Histochem Cytochem*, 28: 335-338, 1980
- 35) French, S. W. and Davies, P. L.: Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 68: 765-774, 1975
- 36) Phillips, M. J., Oda, M. and Mak, E.: Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*, 69: 48-53, 1975
- 37) Watanabe, S. and Phillips, M. J.: Ca^{2+} causes active contraction of bile canaliculi: Direct evidence from microinjection studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 6164-6168, 1984
- 38) Phillips, M. J., Oshio, C., and Miyairi, M.: Microfilament dysfunction as a mechanism in intrahepatic cholestasis: Evidence from time lapse cinemicrophotography. *International Association for the Study of the Liver Diseases*. November, 1980, Chicago
- 39) 溝口靖紘, 阪上吉秀, 宮島慶治: 催胆汁うっ滞因子. *臨床消化器内科*, 2: 363-373, 1987
- 40) Gabbiani, G., Montesano, R., Tuchweber, B., Salas, M. and Orci, L.: Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab Invest*, 33: 562-569, 1975
- 41) 黒田博之, 米倉甫明, 宮崎招久, 田島純子, 横井幸男, 浪久利彦: Microfilaments. *肝胆膵*, 11: 695-705, 1985
- 42) Albert, L., Douglas, H. and Richard, H.: The architecture of bile secretion. *Dig Dis Sci*, 25: 609-629, 1980
- 43) Ueno, T., Yasuura, S., Watanabe, S., Hirose, M., Sekine, T. and Namihisa, T.: Immunocytochemical localization of myosin in rabbit liver cell. *J Histochem Cytochem*, 36: 803-806, 1988
- 44) Yasuura, S., Ueno, T., Watanabe, S., Hirose, M. and Namihisa, T.: Immunocytochemical localization of myosin in normal and phalloidin-treated rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 97: 982-989, 1989
- 45) 石川春律: 細胞骨格とその機能. *病理と臨床*, 5: 366-373, 1987
- 46) Roberts, T.: Fine (2—5nm) filaments: New types of cytoskeletal structures. *Cell Motil Cytoskel*, 8: 130-142, 1987
- 47) Vasmant, D., Maurice, M. and Feldmann, G.: Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and the rat. *Anat Rec*, 210: 17-24, 1984
- 48) 坂井建雄: メサンギウム細胞の微細構造と糸球体濾過装置. *腎と透析*, 28: 567-572, 1990
- 49) Kanwar, Y. S. and Rosenzweig, L. G.: Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of the visceral epithelium. *Kidney Int*, 21: 565-574, 1982
- 50) Kanwar, Y. S. and Farquhar, M. G.: Detachment of endothelium and epithelium from the glomerular basement membrane by kidney perfusion with niramidase. *Lab Invest*, 42: 375-384, 1980
- 51) French, S. W., Kondo, I., Irie, T., Ihrig, T. J., Benson, N. and Munn, R.: Morphologic study of intermedi-

- ate filaments in rat hepatocytes. *Hepatology*, 2: 29-38, 1982
- 52) Katsuma, Y., Marceau, N., Ohta, M. and French, S.W.: Cytokeratin intermediate filaments of rat hepatocytes: Different cytoskeletal domains and their three-dimensional structure. *Hepatology*, 8: 559-568, 1988
- 53) 岡上 武, 森本道雄, 太田正治, 太田義治, 岡 正直, 長尾泰孝, 南 祐仁, 香川恵造: Mallory body 形成と肝細胞中間径フィラメントの ubiquitination に関する研究. *肝臓*, 31: 53-58, 1990
- 54) Ohta, M., Marceau, N., Perry, G., Manetto, V., Gambetti, P., Gambetti, L. A., Metuzals, J., Kawahara, H., Cadrin, M. and French, S.W.: Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory bodies of hepatocytes. *Lab Invest*, 59: 848-856, 1988
- 55) 檜本敦彦, 大野伸一, 伊藤信夫, 重松秀一: 急速凍結・ディープエッチング法による腎糸球体基質病変の解析. *腎と透析*, 31: 409-415, 1991
- 56) Leblond, C. P. and Inoue, S.: Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat*, 185: 367-390, 1990
- 57) Batsford, S. R., Rourbach, R. and Vogt, A.: Size restriction in the glomerular capillary wall: Importance of lamina densa. *Kidney Int*, 31: 710-717, 1987
- 58) Yoshimura, A., Ohno, S., Nakano, H., Oniki, K., Inui, K., Ideura, T. and Koshikawa, S.: Three-dimensional ultrastructure of anionic sites of the glomerular basement membrane by a quick-freezing and deep-etching method using a cationic tracer. *Histochemistry*, 96: 1991, 107-113, 1991

(3. 6. 4 受稿)