

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 正道 隆介
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第771号
学位授与の日付 平成29年9月20日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Three-dimensional reconstruction of root cells and interdental cells in the rat inner ear by serial section scanning electron microscopy.
(薄連続切片走査型電子顕微鏡法によるラット内耳の根細胞および歯間細胞の立体再構築)

論文審査委員 主査 教授 日比野 浩
副査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 堀井 新

博士論文の要旨

背景:

内耳の蝸牛は外リンパ液をいれる前庭階と鼓室階、内リンパ液をいれる蝸牛管からなる。このうち内リンパ液は高カリウムイオン環境を作り、コルチ器における音刺激の電気信号変換に必須である。すなわち音刺激によりカリウムイオンが有毛細胞内に流入し、これにより脱分極が起こると細胞が興奮する。一方で、有毛細胞に流入したカリウムイオンは、蝸牛管の外の細胞外 (外リンパ液の環境) に一度流出するが、何らかの経路により内リンパ液に還元されることで、内リンパ液の高カリウムイオン環境が維持されると考えられている。また、これまでの免疫組織化学と透過型電子顕微鏡 (TEM) による蝸牛のギャップ結合の分布から、カリウムイオンの還元経路として、“上皮細胞系ギャップ結合システム”と“結合組織型ギャップ結合システム”が提唱されてきている。特に、ラセン靭帯の根細胞やラセン板縁の歯間細胞は、上皮細胞系ギャップ結合システムの両端として、カリウムイオン還元に必要な役割をもつと考えられるが、これらの細胞の立体配列に関する研究はほとんど行われていない。そこで申請者らは連続切片を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、その立体再構築を行うことで、根細胞および歯間細胞の立体構造を明らかにした。

方法:

動物に雄 Wistar ラット (8-10 週齢) を用い、深麻酔下にパラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド混合液で灌流固定後、側頭骨を摘出、同固定液で浸漬固定した。試料はエチレンジアミン四酢酸溶液に浸漬しマイクロウェーブ処理を用いて脱灰、還元オスミウムで後固定、エタノール上昇系列で脱水し、エポン 812 に包埋した。包埋試料から厚さ 0.5 μ m の準超薄連続切片を作成、スライドガラスに載せトルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡で観察し、その後、切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛で導電染色し、白金パラジウムでコーティングした後に、SEM (反射電子像) で観察した。また、120 枚の連続反射電子 SEM 像を用いてコンピューター上で立体再構築像を作成した。また、超薄切片の通常の TEM 観察も行った。

結果:

準超薄切片の光学顕微鏡像および反射電子 SEM 像の観察では、外ラセン溝細胞がラセン靱帯内に伸び出して、根細胞を形成していることが分かった。一方、内ラセン溝細胞は一部で歯間細胞と接し、蓋膜直下に並ぶ歯間細胞の細胞索とつながっていた。根細胞の立体再構築像では、外ラセン溝細胞と根細胞は互いに連結して樹木の根のように分枝する細胞集塊を形成し、ラセン靱帯の下部領域に広がっていることが明らかになった。また、歯間細胞の立体再構築像では、内ラセン溝細胞と歯間細胞が繋がり合い、ラセン板縁を縦断する細胞ネットワークを形成することが明らかになった。さらに超薄切片の TEM 像観察から、根細胞同士が複雑な細胞嵌合をもち、ところどころでギャップ結合を認めること、歯間細胞も同様な複雑な細胞嵌合をもち、ギャップ結合を認めることが示された。

考察：

根細胞が樹木根のように広がるラセン靱帯下部領域には Na^+ 、 K^+ -ATPase や Na^+ - K^+ - Cl^- -共輸送体を有する II 型線維細胞が分布することが知られている。本研究で示された根細胞塊の形状とギャップ結合の存在は、この細胞から II 型線維細胞へカリウムイオン輸送する際に適した形態をとっていることを示しており、根細胞集塊表面の広い面積が効率的なカリウムイオン還元に関与することを示唆するものである。一方、内ラセン溝細胞と歯間細胞が作る細胞ネットワークにおいても、その形状とギャップ結合の存在が、歯間細胞が上皮細胞系ギャップ結合システムの末端でカリウムイオン還元経路として作用する可能性を示すものと思われた。

結論：

本研究では、内リンパ液の高カリウムイオン環境維持のための上皮細胞系ギャップ結合システムの一部である根細胞および歯間細胞の立体細胞配列を示した。根細胞はラセン靱帯下部領域において樹木根のような形の細胞集塊を形成し、歯間細胞は内ラセン溝細胞とともにラセン板縁を縦断する細胞ネットワークを形成していた。いずれの細胞集団においてもギャップ結合が発達していることから、根細胞および歯間細胞は蝸牛上皮細胞系ギャップ結合システムの末端部分としてカリウムイオン還元に関与していることが示唆された。

審査結果の要旨

内耳の蝸牛を満たす内リンパ液は、高カリウムイオン濃度を示す。この特殊な環境は、感覚細胞である有毛細胞の興奮性に重要である。高カリウムイオンは、“上皮細胞系ギャップ結合システム”と“結合組織型ギャップ結合システム”を介したカリウムイオン循環により維持されていると提唱されている。ラセン靱帯の根細胞やラセン板縁の歯間細胞は、上皮細胞系ギャップ結合システムの両端として、イオン輸送に関わるとされているが、これらの細胞の立体配列は十分に明らかにされていない。そこで申請者らは、蝸牛の連続切片を走査型電子顕微鏡で観察し、取得した画像の立体再構築を行った。その結果、両細胞は、それぞれ、隣接する細胞と樹木の根のように複雑に絡み合っていることが判明した。また、超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察すると、根細胞間にギャップ結合が認められた。根細胞間も同様であった。両細胞が接する細胞には、カリウムイオン輸送体が分布する。ギャップ結合がイオン運搬に関わることも踏まえると、根細胞・歯間細胞は、カリウムイオン循環に関与していると想定された。複雑な形態は、面積を広くしてイオン運搬を効率化していると考えられた。

蝸牛機能が立脚するイオン恒常性維持機構は、未だ十分に理解されていない。本研究は、その一端を明らかにした点で、学位論文としての価値があると判定した。