OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	酵素抗体法による人絨毛性gonadotropin（HCG）の局在部位に関する研究
Author(s)	浜中，信明
Citation	大阪大学，1971，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30332
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	浜中信明
学位の種類	医学博士
学位記番号	第2319号
学位授与の日付	昭和46年3月26日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**酵素抗体法による人絨毛性 gonadotropin (HCG) の局在部位に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 足高善雄 (副査) 教授 伴忠康　教授 岡野錦弥

論文内容の要旨

〔目　的〕

人絨毛性 gonadotropin (HCG) が絨毛組織に由来することに異論はないが、ＨＣＧ産生細胞ならびにその分泌機構については方法論的な困難を伴うため未だ推論の域を出ない現況である。著者は正常妊娠各時期における絨毛上皮細胞の微細構造を観察するとともに、酵素抗体法を応用して絨毛上皮細胞でのＨＣＧ局在部位を光学ならびに電子顕微鏡を用い観察し、ＨＣＧ産生細胞の同定およびその分泌形態を知る目的で本研究を行なった。

〔方法ならびに成績〕

Ⅰ　実験方法

実験材料として人工妊娠中絶手術および正常分娩又は帝王切開分娩術により得た正常妊娠初期、中期および末期胎盤絨毛組織を用いた。

1．peroxidase (ＰＯＤ) による標識抗体の調製

市販ＨＣＧ (primogonyl) を家兎に免疫し抗ＨＣＧ血清をえ、小児尿蛋白および正常男子血清による吸収抗ＨＣＧ血清を使用した。その γ-g 1 分画に p, p′-difluoro・m, m′-dinitrodiphenyl sulfone を介して horseradish ＰＯＤ type Ⅱ (Sigma) を Nakane (1967) の方法に準じて標識し、結合されなかったＰＯＤを⅓飽和硫安塩析法で分離精製した。間接法に用いる標識抗体は市販家兎 γ-g 1 でモルモットを免疫し同様の操作によりモルモット抗家兎 γ-g 1 のＰＯＤ標識抗体を調整した。

2．ＰＯＤ標識抗体法による組織抗原 (ＨＣＧ) の検出法

光学顕微鏡的観察方法：4％ formaldehyde または2％ formaldehyde +0.5% glutaraldehyde と0.2M cacodylate buffer (pH7.2) で2時間固定した絨毛組織のパラフィン切片を作成し、直接法はＰＯＤ標識家兎抗ＨＣＧ γ-g 1 を、間接法はまず家兎抗ＨＣＧ血清を作用させた後ＰＯＤ

接法はＰＯＤ標識家兎ＨＣＧ γ-g１を、間接法はまず家兎抗ＨＣＧ血清を作用させた後ＰＯＤ標識モルモット抗家兎γ-g１抗体をそれぞれ30分、脱パラフィン組織上で反応させ、Graham & Karnovsky (1966) の benzidine 法でＰＯＤ染色を行ない観察した。

電子顕微鏡的観察方法：光顕におけるのと同様の方法で前固定した絨毛組織の凍結切片を使用し、直接法により24～48時間ＰＯＤ標識家兎抗ＨＣＧ γ-g１と反応させ、３％ glutaraldehyde で後固定し Karnovsky 法でＰＯＤ染色を行なった。更に２％ OSO_4 固定のうえ型の如く epoxy 包埋後の超薄切片について電子染色を施さず電顕観察した。なお対照として、正常妊娠各時期の絨毛上皮細胞の微細構造を観察するとともに、(1) Karnovsky 試薬単独、(2) 抗原ＨＣＧによる被吸収ＰＯＤ標識抗体の反応 (inhibition test) (3) 抗ＨＣＧ家兎血清を作用した後、ＰＯＤ標識抗体の反応をみる方法 (直接法 blocking test) 等により比較検討して本反応の特異性を確認した。

Ⅱ　実験成績

１．ＰＯＤ標識抗体の検討

passive hemagglutination：ＰＯＤ標識前後の抗体価の変化をタンニン酸処理ＨＣＧおよび家兎γ-g１感作羊血球凝集反応で比較測定した。家兎抗ＨＣＧ抗体の場合はＰＯＤ標識後１：1,600疑陽性、１：800陽性となり約10倍の抗体価減弱を示し、モルモット抗家兎γ-g１抗体では４倍の減弱で１：8,000陽性を確認した。

immunoelectrophoresis：直接法に用いたＰＯＤ標識家兎抗ＨＣＧ抗体は市販ＨＣＧ製剤との間に特異な沈降線を生じ、その沈降線は Karnovsky 法で強い benzidine brown に着色した。間接法に用いたＰＯＤ標識抗体では正常家兎γ-g１と家兎抗ＨＣＧ γ-g１との間に IgGの強い沈降線を画き、またその沈降線の高いＰＯＤ活性の存在を同様の方法で証明した。

２．絨毛上皮細胞の微細構造

Langhans (L) 細胞と syncytiotrophoblast (S) 細胞の細胞質構造にみる著しい相違点は小胞体の形態とその分布状態にある。Ｓ細胞質内小器官はＬ細胞に比較して極めて豊富であり、粗面小胞体の発達が著しく Golgi Complex も良く発達し分泌顆粒様物質を包含することが多い。また細胞質内に種々の大きさの中等度電子密度を有する限界膜をもった顆粒が認められる。一方Ｌ細胞では小胞体膜系が極めて貧弱であり ribosome も殆んど遊離型である。すなわちＳ細胞は機能型、Ｌ細胞は増殖型の細胞としての形態的特徴を示していることを知った。

３．ＰＯＤ標識抗体法による観察所見

光学顕微鏡的観察所見：妊娠初期絨毛上皮のＳ細胞層にＨＣＧの存在を示す強い benzidine brown の着色を認めた。しかし妊娠中期以後では着色の程度は減弱し、しかも絨毛上皮Ｓ細胞層の部分的な着色をみるにすぎない。Ｌ細胞には全時期を通じ有意義な反応産生物を認めなかった。

電子顕微鏡的観察所見：組織抗原 (ＨＣＧ) と結合したＰＯＤ標識抗ＨＣＧ抗体は benzidine, H_2O_2 系で electron dense な反応産生物を生ずる。この顆粒はＳ細胞質の主として粗面小胞体膜上に沈着し、また vesicle 状の滑面小胞体膜および内腔、Golgi 膜の一部や細胞遊離縁近くに存在する径１～1.5μ の限界膜を有する顆粒の内容にも反応産生物を観察することができた。しか

し今回の実験条件ではL細胞にHCG局在を確認できるような所見は観察されなかった。

〔総　括〕

1．HCG産生細胞の同定ならびにその分泌形態を知る目的で、POD標識抗体法による光顕および電顕的観察を行なうとともに絨毛上皮細胞の微細構造について観察した。

2．微細構造上、S細胞質には粗面小胞体が豊富に発達し、さらにGolgi装置や種々の大きさの分泌顆粒様構造が多数存在することなど機能的によく分化した細胞の形態を示すが、L細胞はこれらの構造に乏しく機能的に分化度の低いことを類推せしめる。

3．POD標識抗体法による光顕的観察では、抗原HCGの存在部位を示すbenzidine brown 着色部位はS細胞層に集中し認められる。電顕的には、反応産生物は電子密度の高いpolygonalな粒子としてS細胞の粗面小胞体膜表面、Golgi膜の一部、滑面小胞体内腔およびS細胞自由表面近くにみられる径1～1.5μの分泌顆粒様構造内に観察された。L細胞については有意義な反応産生物を認めることはできなかった。

論文の審査結果の要旨

絨毛組織でのHCG産生細胞同定の問題はなお未解決である。本研究ではHCGの分泌形態を知る目的で絨毛上皮細胞に酵素(peroxidase)標識抗体法を応用し、光顕および電顕的観察を行ない新しい知見を得ている。

すなわち、微細構造上syncytium細胞は粗面小胞体がよく発達し、Golgi装置や種々の大きさの中等度電子密度を有する分泌顆粒様構造が多数存在するなど機能的によく分化した細胞形態を示すが、Langhans細胞はこれらの構造に乏しく未分化な細胞に共通する細胞質構造を呈する。さらにperoxidase標識抗体法による観察結果はHCG局在を証明する反応産生物はsyncytium細胞層に集中して認められ、その微細局在はsyncytiumの粗面小胞体膜表面、Golgi膜の一部、滑面小胞体内腔および自由表面近くに存在するapical vacuole内に観察され、Langhans細胞には全時期を通じ反応産生物が観察されなかったことからHCGの分泌は主としてsyncytium細胞で行なわれているとしている。このようにHCGの微細局在を電子顕微鏡レベルで観察した報告はなく、したがって本研究は学位論文として価値あるものと認める。