



Title	カルシウムイオノフォアA23187処理を施した下垂体前葉細胞におけるカルシウムの局在と機能に関する細胞化学的検索
Author(s)	栗原, 秀剛
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34656
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

氏名・（本籍）	栗原秀剛
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6811 号
学位授与の日付	昭和 60 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	カルシウムイオノフォア A 23187 処理を施した下垂体前葉細胞におけるカルシウムの局在と機能に関する細胞化学的検索
論文審査委員	(主査) 教授 藤田 尚男 (副査) 教授 橋本 一成 教授 塩谷弥兵衛

論文内容の要旨

（目 的）

近年，腺細胞における分泌現象にカルシウムイオンが関与することが問題になっているが，形態学的な実証に乏しい。カルシウムイオノフォア A 23187 は細胞内のカルシウム濃度を上昇させることが知られている。この抗生物質の存在下で，下垂体前葉細胞の分泌がどのように変化するかを調べ，次に正常および LHRH または A 23187 による刺激下の細胞内カルシウムイオンがどのように分布するかを細胞化学的に検討し，カルシウムイオンの分泌に及ぼす影響を考察した。

（方 法）

1) 体重 200 - 250g 雄 Wistar ラットから下垂体前葉を摘出し，Hanks' BSS 中で結合組織を除去後に細切し，organ culture grid で支持した milipore membrane filter に載せ，Eagle MEM 中で 1 時間培養した。次に，組織を Ca^{2+} -free Krebs' BSS 中で洗った後，0.15 mM A 23187 を含む Krebs' BSS (Ca^{2+} 2.5 mM) 中で 3, 12, 20 分間インキュベートした後，固定した。コントロールとして A 23187 を含まない Krebs' BSS 中で同時間インキュベートした。

2) 上記と同様に摘出したラット下垂体前葉を A 23187 10 μM または LHRH 10 μM を含む HEPES 緩衝液で 5 分間インキュベートした後，90% potassium oxalate と 1.4% ショ糖を含む 2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定した。次に，2% アンチモン酸カリウムを含む 1% OsO_4 溶液で後固定し，型通りに脱水，包埋した。超薄切片の一部は 0.1 M EGTA (pH 8.0) または 0.2 M EDTA (pH 8.0) で 6 時間室温で処理した。また，クエン酸鉛による単染色を施した切片を X 線マイクロアナライザーを用いアンチモン酸カリウムによる沈澱物がカルシウムの局在を示しているか否かを吟味した。

(結果および考察)

1) A 23187 処理によって下垂体前葉のどの種類の細胞においても開口分泌による分泌果粒の放出の亢進が見られた。特に、ACTH 細胞においては、十数個から数十個の果粒の限界膜が融合、連続し、多数の果粒が一気に放出される像が観察された。このような開口分泌は生理的な条件では見られないものであり、これを多果粒性開口分泌 (multigranular exocytosis) と名づけた。また、開口分泌の起こった膜には、しばしば被覆陥凹 (coated pits) が観察された。以上のことから、A 23187 によるカルシウムの influx が下垂体前葉細胞の分泌果粒の放出を直接促進したと思われる。

2) ラット下垂体前葉をアンチモン酸カリウムを含む固定液で固定すると、細胞内に電子密度の高い沈澱物が観察された。このような沈澱物は 0.1 M EGTA で消失した。X線マイクロアナライザーでこの沈澱物を解析した結果、アンチモンとカルシウムの単独のピークからずれており、このものがアンチモンとカルシウムの複合物であることがわかった。

無処理の下垂体前葉におけるアンチモン酸カルシウムの沈澱物は、分泌果粒の限界膜、ミトコンドリアのマトリックス、核内の euchromatin 領域、被覆陥凹及び被覆小胞の中、および細胞膜に存在した。分泌果粒の中には沈澱物がないのが特徴であった。

A 23187 で刺激し、5 分後には開口分泌像がしばしば観察されたが、そのような限界膜の融合、果粒内容の連絡が起こった後には、カルシウムはこの部分の膜には観察されなかった。LHRH で刺激すると、第Ⅱ型の Gonadotroph と思われる細胞に開口分泌像が多く見られたが、この場合にも開口分泌の起こった後の膜には反応が認められなかった。

下垂体前葉細胞において分泌果粒の限界膜にカルシウムが存在すること、そして、時として細胞膜と分泌果粒が接している所にアンチモン酸カルシウムの沈澱が見出されることから、カルシウムが分泌果粒と細胞膜との融合、開口に関与していることが示唆される。また、膜の融合が終了した後、即ち、開口分泌の起こった後にカルシウムが検出されないことは、融合、開口に関与した後にカルシウムが膜から離れることを示している。

(総 括)

1) カルシウムイオノフォア A 23187 処理したラット下垂体前葉細胞において分泌果粒の放出の促進が見られた。特に ACTH 細胞では多果粒性開口分泌の像が観察された。また、開口分泌が起こった膜の一部に、しばしば被覆陥凹が見られた。

2) アンチモン酸カルシウムの沈澱物は、下垂体前葉細胞において、分泌果粒の限界膜、ミトコンドリアのマトリックス、核内の euchromatin 領域、被覆陥凹及び被覆小胞、そして細胞膜に分布するが、A 23187 や LHRH で刺激して、分泌果粒の限界膜の融合、果粒内容の連絡が起こった後には膜におけるアンチモン酸カルシウムの沈澱物は消失した。

3) 以上のことから細胞内カルシウムの分泌に及ぼす影響が形態学的に実証された。

論文の審査結果の要旨

- ① 下垂体前葉細胞においてカルシウムイオノフォアであるA 23187 を培養液に加えると開口分泌がいちじるしく増加するのみならず，多数の分泌果粒の限界膜が融合してチャンネル状をなし，大部分の果粒が一気に放出されることを見出し，多果粒性開口分泌と名づけた。
 - ② 細胞化学的にカルシウムの局在と開口分泌の関係を追求した結果，カルシウムは果粒限界膜，細胞質基質，ミトコンドリア基質，核の正クロマチンに局在し，A 23187を培養液に加えるとミトコンドリア内のカルシウムが細胞質内に出るとともに，細胞外のカルシウムが細胞質内に入り開口分泌を起こさせ，ついで細胞質内のカルシウムがいちじるしく減少することを明らかにした。
- これらの研究はカルシウムと分泌現象が密接な関係にあることを超微形態学的に明らかにしたものであり，医学博士を授ける価値があるものと認める。