The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	培養ウサギ水晶体上皮細胞のクリスタリン生成能について
Author(s)	宇仁, 明彦
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37385
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

【124】

氏名・（本籍）	宇仁明彦（うにあきひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9478 号
学位授与の日付	平成3年2月4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	**培養ウサギ水晶体上皮細胞のクリスタリン生成能について**
論文審査委員	（主査）教授 真鍋 禮三 （副査）教授 宮井 潔　教授 藤田 尚男

論文内容の要旨

【目　的】

水晶体構造タンパク質であるクリスタリンはその分子量からα，β，γの3成分よりなり，水晶体上皮細胞の分化や老化に伴って，その構成が変動することが知られてきた。水晶体に関する研究は，主として動物個体を用いるか，摘出水晶体が用いられている。今回，実験成績の均一化を図るためにウサギ水晶体上皮細胞の株化を樹立し，ならびにウサギクリスタリン各分画に対するモノクローナル抗体を作成し，培養水晶体上皮細胞のクリスタリンの生成能について検討した。

【方法ならびに成績】

I　ウサギ水晶体上皮株細胞の樹立：ウサギ水晶体上皮細胞を水晶体前嚢ごと剥離し，細切した後，15％FCSを含むDMEMで培養した。培養細胞は0.02％EDTA液で分散し1／4量を継代培養した。細胞は15代目まで指数関数的に増殖したが，それ以後の約2ケ月間は増殖を停止した。その後再び増殖を開始し，200代以上経過後も増殖を続けた。そこで，株細胞が樹立されたものと判断し，TOTL-86と名付けた。TOTL-86の形態は，confluentな状態では初代細胞と同様の敷石状であり，増殖時は紡錘状であった。doubling timeは約40時間であり，コロニー形成率は約6％であった。

II　ウサギクリスタリンに対するモノクローナル抗体の作成：ウサギ水晶体の可溶性分画をゲル濾過し，α-，β-，γ-クリスタリンを精製した。これらをBALB／cマウスに免疫し，その脾細胞とマウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコール法で融合させた後，選択培地で培養し，融合細胞のコロニーを得た。得られた融合細胞の抗クリスタリン抗体産生をELISA法でスクリーニングし，各クリスタリン分画に対する抗体を産生する3種のコロニーを得，2回クローニングを行い，細胞株を樹立した。ウエス

ターンブロッティング法により，各融合細胞は，α－クリスタリン分画の分子量約20kDのポリペプチドと反応するモノクローナル抗体（MC－1），β－クリスタリン分画の分子量約30kDのポリペプチドと反応するモノクローナル抗体（MC－2），およびγ－クリスタリン分画の分子量約19kDのポリペプチドと反応するモノクローナル抗体（MC－3）をそれぞれ産生していることを確認した。

Ⅲ　水晶体上皮培養細胞のクリスタリン生成能の確認：スライドガラス上に冷エタノールで固定したウサギ水晶体上皮の初代培養細胞と長期継代培養細胞であるTOTL－86を，各モノクローナル抗体とFITC標識抗マウスIgG抗体を使って間接蛍光抗体法を行い，クリスタリンの生合成について調べた。初代培養細胞では，MC－1は上皮細胞の細胞質と lentoid bodyにおいて反応を示した。MC－2は細胞質と lentoid bodyで反応した。MC－3は上皮細胞では反応は認めず，lentoid bodyでのみ反応した。TOTL－86では，MC－1は上皮細胞の細胞核周囲付近にのみ反応を示し，細胞質では反応しなかった。MC－2は，細胞質で反応したが，MC－3は全く反応を示さなかった。

【総　括】

今回作成した3種類のモノクローナル抗体は，ウエスターンブロッティング法によってウサギα－，β－，γ－クリスタリンと特異的に反応すること，および今回樹立した長期継代水晶体上皮細胞であるTOTL－86はこれらのモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によって200代継代後もいまだクリスタン合成能を有する細胞であることが確認された。ウサギ水晶体上皮細胞の初代培養細胞の間接蛍光抗体法の結果，lentoid bodyではα－，β－，γ－クリスタリンすべてを認めるが，水晶体上皮細胞ではγ－クリスタリンが欠如していることが明らかとなった。lentoid bodyには，細胞小器官がなく均一な細胞質のみであることから，水晶体上皮細胞が分化してできる水晶体線維細胞に相当するものと考えられており，γ－クリスタリンが，lentoid bodyにのみ存在するということは，γ－クリスタリンが水晶体上皮細胞の分化を示す1つのマーカーとなり得ることを示唆している。また長期継代細胞においてもα－クリスタリンとβ－クリスタリンの生成を認めたが，継代の過程で，α－クリスタリンの生合成能が変化していることが明らかになった。　本研究により，培養水晶体上皮細胞の継代によるクリスタリンの変動を確認することが可能となり，さらに今後水晶体上皮細胞の分化および老化に関する研究発展に寄与するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

水晶体構造タンパク質であるクリスタリンは，水晶体上皮細胞の分化や老化に伴って，その構成が変動することが知られている。近年水晶体に関する研究は，実験成績の均一化を図るために，培養株細胞を用いた実験が重要視されてきているが，クリスタリン生成能を有する水晶体上皮細胞株の報告は少ない。

今回，ウサギ水晶体上皮細胞の株化に成功し，ならびにウサギクリスタリン各分画に対するモノクローナル抗体を作成し，これを使った蛍光抗体法で，株細胞（TOTL－86）におけるクリスタリン生成能について検討した。

細胞融合法により，ウサギのα－，β－およびγ－クリスタリンに対するモノクローナル抗体をそれぞれ作成した。また樹立したウサギ水晶体上皮細胞株（TOTL－86）は200代以上継代でき，蛍光抗体法の結果，長期継代後もα－クリスタリンとβ－クリスタリンの生成能を有する細胞であることが確認できた。

また継代の過程で，α－クリスタリンの生合成能が変化していることも明らかになった。

以上の研究は，継代の過程での培養水晶体上皮細胞のクリスタリン生成能の変化を確認でき，また樹立した水晶体上皮細胞株および抗ウサギクリスタリンモノクローナル抗体は，今後の水晶体上皮細胞の分化および老化に関する研究に有用であり，学位授与に値するものである。