



Exocytosis in surface mucous cells and chief cells of guinea pig stomach studied by video microscopy

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 花島, 一哲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1043

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 190号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏 名	花 島 一 哲		
論文題目	Exocytosis in surface mucous cells and chief cells of guinea pig stomach studied by video microscopy (ビデオ強化式微分干渉顕微鏡によるモルモット胃表層粘液細胞及び主細胞における開口放出反応の検討)		

博士(医学) 花 島 一 哲

論文題目

Exocytosis in surface mucous cells and chief cells of guinea pig stomach studied by video microscopy

(ビデオ強化式微分干渉顕微鏡によるモルモット胃表層粘液細胞及び主細胞における開口放出反応の検討)

〈はじめに〉従来、消化性潰瘍の発生や治癒機転を探るために、ペプシノーゲン分泌能の検討には酵素活性の測定等、粘液分泌能の検討には粘液成分の定量等による解析がなされてきた。しかし、分泌の最小単位である1個の細胞に注目して、その分泌様式を経時的に検討した報告はない。ビデオ強化式微分干渉顕微鏡(ビデオ顕微鏡)では、組織の固定や染色なしに生きたままの状態で細胞内微細構造や微小反応を4,000ないし10,000倍の高倍率で観察できる。そこで、今回、ビデオ顕微鏡を用いて胃主細胞と表層粘液細胞における開口放出反応を実時間で観察する手法を確立し、分泌様式の違いについて検討した。

〈方法〉ハートレー系雄性モルモット(体重300-500 g)を用い、ペントバルビタール麻酔下に胃を摘出した。胃底腺領域の粘膜固有層を剝離採取後、細片化(2.0×1.0×0.5mm)した。粘液ゲル層を剥がし、2枚のカバーガラスで標本をはさんで固定した。表層粘液細胞を観察する時は胃粘膜表層側を、主細胞を観察する時には腺底部側が対物レンズ側に向くように微分干渉顕微鏡に載せた。2枚のガラスの隙間に36℃に加温し酸素化した標準液を灌流した。ビデオカメラで撮影し画像処理装置でコントラストを増強した顕微鏡像を観察しながら、刺激薬剤を灌流液に添加した。刺激薬剤として1-100 μ Mカルバコール(CCh)、100 μ MプロスタグランジンE₂(PGE₂)、1 μ Mオカダ酸を用いた。主細胞を同定するため、抗ペプシノーゲンII抗体による免疫組織染色を行った。

〈結果〉開口放出反応は細胞内顆粒の光強度の急激な変化として認められ、単位時間あたりの反応回数を数えることで、定量化できた。

主細胞について 免疫染色により同定できた。顆粒の大きさは約1.5 μ mで、管腔側に局在していた。自発性開口放出はほとんど認められなかった。CCh投与後30秒以内に開口放出頻度は著しく増加し、刺激後5分間の細胞1個あたりの頻度は用量依存的に増加した。その後、頻度は低下し脱感作が認められた。主細胞の開口放出の反応様式は、このようなパターンのもののみであった。

表層粘液細胞について 顆粒の大きさは約0.5 μ mであり細胞質全体に密に分布していた。無刺激で開口放出反応が認められた(自発的開口放出)。CChやPGE₂刺激には応答しなかった。自発的開口放出の反応様式は、低頻度で数時間持続する型(Type 1)と、高頻度で2分前後で細胞内顆粒を全て放出しつくす型(Type 2)の2通りだった。通常はType 1、時にType 2の分泌が観察された1 μ Mオカダ酸投与により自発的開口放出反応は停止した。

〈結論・考察〉主細胞における開口放出反応様式は、他臓器の外分泌腺(鼻腺、唾液腺、大腸粘膜腺)に関する従来の報告と同様で、自発的な反応がほとんどみられず、刺激薬剤に対して用量依存性の反応を示した。表層粘液細胞における開口放出反応は、これらとは全く性格が異なり、刺激薬剤に無反応かつ自発的であり、低頻度型と高頻度型の2つに分類できた。オカダ酸投与により表層粘液細胞の自発的開口放出反応が停止したことから、この分泌反応は何らかの蛋白の脱リン酸化により刺激されて生じているものと考えられた。表層粘液細胞の分泌機構の特徴は、細胞外からの薬物刺激に対するレセプターの反応性を失っている点と、細胞内情報伝達系において常に脱リン酸化活性化状態にあることにより、自発的分泌反応が生じると考えられる点である。ビデオ顕微鏡を用いることで、これまで不可能だった

胃主細胞および表層粘液細胞における分泌（開口放出）反応の細胞単位での実時間解析が可能となった。今後はこの方法を用いることで、各種細胞における分泌機序のさらなる解明がなされてゆくものと思われる。

論文審査の結果の要旨

胃潰瘍の発生には攻撃因子としての塩酸、ペプシノーゲン、防御因子としての粘液が知られている。壁細胞からの胃酸分泌機序については既に詳細な研究がなされている。著者は主細胞から分泌されるペプシノーゲンと表層粘液細胞から分泌される粘液について、その分泌様式の基本を明らかにする目的でこの研究を行った。分泌の最小単位である一個の細胞をビデオ強化式微分干渉顕微鏡（ビデオ顕微鏡）を用いて観察し、開口放出反応を、組織の固定や染色なしに生きたままの状態を実時間で観察し、以下の興味ある知見を得た。

【方法】実験材料にはモルモットの胃底腺領域の粘膜を用いている。粘膜剥離の比較的容易なモルモットを用い、粘膜の表層粘液細胞の観察は胃内腔側より、主細胞の観察は剥離面側から行った。なお、主細胞同定のため抗ペプシノーゲンⅡ抗体による免疫組織染色を予備実験として行っている。ビデオ顕微鏡による観察のために特殊な chamber を試作し、標本を2枚のガラスの隙間にはさみ、対物レンズに発熱装置を工夫するなどして36℃に加温し酸素化した標準液を灌流することにより細胞の viability を保つことに成功している。また、灌流液中に刺激薬剤を添加することにより分泌様式を制御している細胞内シグナル伝達系の解明を試みている。刺激薬剤としては1-100 μ M カルバコール (CCh)、100 μ M プロスタグランディン E_2 (PGE_2) を、また阻害剤として1 μ M オカダ酸を用いている。

【結果】ペプシノーゲンの自発性開口放出はみられず、CCh 投与後30秒以内に生じ始める著明な放出反応を用量依存的に認めた。これは他臓器の外分泌腺の分泌様式と同様であった。一方、表層粘液細胞からの粘液分泌は全く性格が異なり、刺激薬剤に無反応かつ自発的であった。特に低頻度型 (type 1) と高頻度型 (type 2) の二つの放出様式が認められ、type 2 は従来 Zalewsky (1979) らが電顕で観察した、apical expulsion を動的に説明し得る所見と考えられる。オカダ酸投与により自発的開口放出反応が停止することから、この分泌反応は何らかの蛋白脱リン酸化が関与するものと著者は結論している。

この研究により得られた粘液分泌、ペプシノーゲン分泌の基礎的研究成果は実時間による動的観察として新しい分野を切り開く価値のある研究である。

審査過程において次の様な質問がなされた。

方法に関して

- 1) 粘液ゲル層の除去について
- 2) ビデオ顕微鏡において無染色で細胞内構造が観察出来る原理について
- 3) 66 msec の高速観察 (ビデオ2コマ分) 時の開口放出数の計測の方法

考察に関して

- 1) 粘液ゲル層の構造とその機能について
- 2) 従来、粘液分泌を亢進させると考えられている PGE_2 が、表層粘液細胞に対して分泌亢進作用を示さないことの説明
- 3) type 1, type 2 は臓器特異的なのか、また生理的な粘液分泌に2種類の細胞が関与しているのか
- 4) Exfoliation は観察できないのか

- 5) オカダ酸と同じような作用をもつ脱リン酸化阻害剤について
- 6) オカダ酸で分泌の抑えられる他のホルモンについて
- 7) 細胞膜と vesicle membrane との fusion の機構と Ω 型の形成機序について
- 8) 胃粘膜微小循環と粘液分泌について
- 9) 粘液物質の合成速度について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も充分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 馬 場 正 三

副査 教授 喜 納 勇 副査 教授 寺 川 進

副査 教授 藤 田 道 也 副査 講師 花 井 洋 行