Exocytosis and movement of zymogen granules observed by VEC-DIC microscopy in the pancreatic tissue en bloc

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石原, 行雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1623

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	医博論第　３４６号	学位授与年月日	平成１３年　４月２０日
氏　　名	石　原　行　雄		
論文題目	Exocytosis and movement of zymogen granules observed by VEC-DIC microscopy in the pancreatic tissue en bloc (ビデオ強化式微分干渉顕微鏡による膵組織での外分泌顆粒の開口放出と運動性の解析)		

博士(医学)　石 原 行 雄

論文題目

Exocytosis and movement of zymogen granules observed by VEC-DIC microscopy in the pancreatic tissue en bloc

(ビデオ強化式微分干渉顕微鏡による膵組織での外分泌顆粒の開口放出と運動性の解析)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

膵腺房細胞は、酵素源顆粒の開口放出によって消化酵素を分泌することが、電子顕微鏡による固定標本の観察から知られている。しかしながら、今日まで開口放出の動的過程を生きた細胞で研究することはできなかった。生きた細胞を分泌顆粒がはっきり見える程度の高倍率で、リアルタイム観察することが困難であったからである。開口放出の動的過程において特に問題になっているのは、アゴニストによる開口放出の直前に分泌顆粒が腺管腔側に移動するか否か、分泌顆粒の大きさが変わるか否か、等である。そこで本研究では細胞内の分泌顆粒の運動と開口放出の関係を明らかにするために、生きた細胞での開口放出の直接可視化を試み、顆粒の動態につき解析した。

〔方法〕

生きたモルモットの膵組織を 1 mm^3 程度に切り出し、顕微鏡用のチェンバーに載せた。チェンバーには、酸素飽和した溶液を持続的に灌流した。微分干渉顕微鏡(対物レンズ100倍、挿入レンズ2.5倍)で膵腺房細胞を観察した。顕微鏡画像を CCD カメラで捉えデジタル化し、イメージプロセッサーによりコントラストをリアルタイムに増強した。処理された画像を最終倍率4,000倍-10,000倍でビデオモニター上で観察し、同時にビデオに録画した。画像の解像度は約0.2 μm、位置測定精度は約0.04 μm、時間分解能は33 ms であり、単一の分泌顆粒の動態を十分解析できるレベルであった。

〔結果〕

最終倍率約4,000倍で膵外分泌組織を観察すると、腺房は 8 −10個の腺房細胞から構成されており、その形態からラ氏島細胞と容易に区別でした。腺房細胞内の個々の分泌顆粒ははっきり見え、顆粒の直径は0.5 μm−1.5 μm であった。安静時、分泌顆粒にはわずかに揺らぐ程度の動きが認められた。細胞をアゴニストで刺激すると、腺腔側の多くの分泌顆粒が急激に明るさを変え、消失した。この顆粒の反応は、腺管腔近傍で起こり、必ず顆粒の消失を伴い、安静時にはほとんど起こらず、特定のアゴニスト(ベサネコール、コレシストキニン)によってのみ引き起こされた。ベサネコールによって引き起こされる反応はアトロピンで完全に抑制され、Ca^{2+}チャンネルのブロック、または灌流液中の Ca^{2+}のキレートにより抑制された。また、開口放出の頻度と外液に放出されたアミラーゼの量は強く相関した。これらの理由で観察された顆粒の光学的変化が開口放出を反映するものであると考えられた。この分泌顆粒の変化に要する時間より、開口放出による酵素の放出に要する時間は0.3-0.4 sであることが解った。

腺管腔近傍の顆粒と遠方の顆粒に分け運動速度を測定した。刺激なしでは、運動速度はそれぞれ、0.08 μm/s と0.11 μm/s であった。刺激した時には、開口放出した顆粒(腺管腔近傍)と遠方の顆粒の運動速度はそれぞれ0.06 μm/s、0.11 μm/s であった。運動速度は刺激なしの時と比べ各々有意差は認めなかったが、

刺激したとき、腺管腔近傍の顆粒(開口放出した顆粒)と遠方の顆粒の運動速度の間には有意差($p<0.01$)が認められた。

時折、腺管腔より離れた所に直線的な長距離運動(>1 μm)をする顆粒が認められ、あるものは、核近傍から腺管方向に、あるものはその逆方向に移動した。そのような、長距離運動は腺管腔付近では認められず、長距離運動した顆粒がそのまま開口放出に至ることはなかった。膵組織をコルヒチン処理すると、顆粒の長距離運動は完全に抑制され、小さな揺らぎ運動のみになった。同時に、開口放出遅延相が抑制された。

〔結論〕

生きた膵組織で分泌顆粒の開口放出が、ビデオ強化式顕微鏡によりリアルタイムで可視化できた。それによって分泌顆粒の運動性につき、開口放出したものとしなかったものについて分けて解析できた。顆粒は microtubule 依存性に腺管腔側に集積するが、開口放出する直前には顆粒の移動は完了しており、細胞膜に接着していることが結論された。

論文審査の結果の要旨

膵腺房細胞は、酵素源顆粒の開口放出によって消化酵素を分泌することが知られているが、開口放出の動的過程における細胞内の分泌顆粒の運動と開口放出の関係については明らかになっていない。そこで申請者はこれらの点を明らかにするために、膵腺房細胞での開口放出の直接可視化を試み、顆粒の動態につき解析した。

約 1 mm^3程度のモルモット膵組織切片を作成し、顕微鏡ステージ上のチェンバー中に保持、酵素飽和した溶液を持続的に灌流した。微分干渉顕微鏡(対物レンズ100倍、挿入レンズ2.5倍)に装着した CCD カメラで膵腺房細胞を観察し、イメージプロセッサーにより画像をデジタル化し、リアルタイムでコントラスト増強を行った。処理された画像を最終倍率4,000倍-10,000倍でビデオモニター上で観察し、同時にビデオテープに録画した。画像の解像度は約0.2 μm、位置測定精度は約0.04 μm、時間分解能は33 ms であり、単一の分泌顆粒の動態を十分解析できるレベルであった。

最終倍率約4,000倍で膵外分泌組織を観察すると、腺房は 8 -10個の腺房細胞から構成されており、その形態からラ氏島細胞と容易に区別できた。腺房細胞内の個々の分泌顆粒の直径は0.5 μm-1.5 μmであった。非刺激時、分泌顆粒にはわずかに揺らぐ程度の動きが認められたが、細胞をアゴニストで刺激すると、腺腔側の多くの分泌顆粒が急激に明るさを変えたのち消失した。この顆粒の反応は、腺管腔近傍で起こる、顆粒の消失を伴う、非刺激時にはほとんど起こらない、特定のアゴニスト(ベサネコール、コレシストキニン)によってのみ引き起こされる、といった特徴を有していた。ベサネコールによって引き起こされる反応はアトロピンで完全に抑制され、Ca^{2+}チャンネルのブロック、または灌流液中のCa^{2+}のキレートにより抑制された。また、開口放出の頻度と外液に放出されたアミラーゼの量は強く相関していた。これらのことから、観察された顆粒の光学的変化は開口放出を反映するものであると考えられた。この分泌顆粒の変化に要する時間から、開口放出による酵素の放出に要する時間は0.3-0.4 s であると推定された。

腺管腔近傍の顆粒と遠位の顆粒の運動速度の差を解析した結果、非刺激時の運動速度はそれぞれ、0.08 μm/s と0.11 μm/s であった。刺激時には、開口放出した顆粒(腺管腔近傍)と遠位の顆粒の運動速度はそれ

ぞれ0.06 μm/s、0.11 μm/s で有意差(p<0.01)が認められた。腺管腔より離れた部位では、直線的な長距離運動(>1 μm)を示す顆粒が時折観察されたが、一定の方向性は認められなかった。また、このような長距離運動は腺管腔付近では認められず、長距離運動した顆粒がそのまま開口放出に至ることもなかった。膵組織をコルヒチン処理すると、顆粒の長距離運動は完全に抑制され、小さな揺らぎ運動のみになった。同時に、開口放出の遅延相が抑制された。以上のことから、顆粒は microtubule 依存性に腺管腔側に集積するが、開口放出する直前には顆粒の移動は完了しており、細胞膜に接着していることが考察された。

審査委員会では、今日まで動的過程を観察することができなかった膵組織での分泌顆粒の開口放出を、ビデオ強化式顕微鏡によりリアルタイムで可視化することを可能にし、開口放出に至った顆粒、至らなかった顆粒の運動性を比較解析することで上記の結論を導き出した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

1) 細胞が生きている状態は何を根拠に判定しているのか
2) 自発的な開口放出の頻度はどれくらいか、顆粒の崩壊の可能性を除外できるか
3) アゴニストによる刺激が持続する間、開口放出も持続するのか
4) 多群間の統計的比較には ANOVA を用いるべきではなかったか
5) 高カリウム液刺激で顆粒の開口放出が増加しなかった理由
6) ベサネコール1 mM で刺激すると0.1 mM の場合よりも開口放出は減少したか
7) ブラウン運動はビデオレートでも観察しうる現象なのか
8) ベサネコールで長距離運動が増えたメカニズムは
9) 顆粒の長距離運動はどの様な生理的意味を持つ状態か
10) 標本を作成してからの経過時間により顆粒の運動性に差はでてこないか
11) ビデオ顕微鏡で顆粒の生成過程は観察可能か
12) 顆粒の成熟度と運動との間に何か関係はないか
13) 本実験条件での結果は in vivo での状態と同一と考えられるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、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　福田敦夫
副査　右藤文彦　副査　椙村春彦