

氏名(本籍) いし 川 もと 春

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 第 2103 号

学位授与年月日 平 成 元 年 2 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

最終学歴 昭 和 57 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 ラット卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起および卵子の
microvilliにおけるprolactinの超微形態学的局在

(主 査)
論文審査委員 教授 矢 嶋 聰 教授 山 本 敏 行
教授 京 極 方 久

論文内容要旨

【研究の目的】

哺乳動物の卵子の発育・成熟過程において、顆粒膜細胞の占める役割はきわめて重要である。卵丘顆粒膜細胞と卵子の結合様式の一つとして、卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起が知られている。この突起は透明帯を貫いて卵子と接触を保ち、透明帯で隔てられている二種類の異なる系列の細胞間を結び、細胞間の相互作用を仲介する機能をはたしている。

一方、顆粒膜細胞および卵子の細胞質内には、PRL (prolactin) の存在が証明されており、両細胞はPRLの標的細胞の一種と考えられている。本研究の目的は卵丘顆粒膜細胞および卵子におけるPRLの局在を、特に卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起および卵子のmicrovilliを中心に明らかにすることにある。また、下垂体前葉で生産されるPRLが、卵胞液中からどのような経路をたどって卵子細胞質内に輸送されるかについても考察を加えた。

【実験方法】

実験にはWistar系成熟雌ラットを使用し、PMSを10IU皮下注射し、40時間後にhCGを10IU皮下注射した。ラットを二群にわけ、PMS投与後24時間後、あるいはhCG投与後5時間後に麻酔下に屠殺し、卵胞を分離・固定した。検体は、通常の透過型電子顕微鏡観察用にはEponで、電顕組織化学的観察用にはLowicryl K4Mでそれぞれ包埋した。免疫染色は抗PRL抗体を用い、Rothらの方法に従い、Protein A-colloidal gold法により行なった。Positive controlにはラット下垂体前葉を用い、control testsには1) 緩衝液、2) 非免疫正常家兎血清、3) 抗体に十分量のhuman PRLを加えたもの、の三種類の溶液で抗体を置換したものを使用した。観察には、HITACHI H-600透過型電子顕微鏡を加速電圧75kVで使用した。

【実験結果】

通常のEpon包埋した標本で観察すると、PMS投与後24時間後に卵丘顆粒膜細胞からの細胞質突起および卵子のmicrovilliが多数放出されており、hCG投与後5時間後には両者はほとんど消失していた。したがって、以後の免疫組織化学的観察には前者を用いることにした。また、positive controlとして用いた下垂体前葉では、PRL産生細胞内の多数の分泌顆粒に一致して金粒子の沈着が認められた。またcontrol testsではいずれの系列にも有意な金粒子は認められず、この免疫組織化学的染色法の正当性が証明された。卵胞液中の卵丘顆粒膜細胞の細胞膜表面に金粒子が認められ、PRLの同細胞におけるbinding sideの存在を示唆させた。また、透明

帯内の卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起および卵子のmicrovilli上には、金粒子の沈着が認められ、同部位のPRLの局在が証明された。また、突起には卵子細胞膜との間にgap junctionを形成している像も観察され、その接合部の近傍に金粒子が認められた。

【考 察】

卵子を取り囲む透明帯は、分子量1,600程度の物質は自由に通過させるが、それ以上の分子量のものは通過させないと考えられている。したがって、分子量22,000以上のPRLは、何らかの特殊な輸送経路を経て卵胞液から透明帯を通過して卵子に輸送されていると考えられる。

一般に卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起と卵子の結合様式の一つに、gap junctionによるものが知られており、PRLの輸送に関与していることが示唆された。

今回の実験では、卵丘顆粒膜細胞の細胞膜表面・透明帯内の卵丘顆粒膜細胞細胞質突起・卵子のmicrovilliにPRLの局在が証明された。したがって、卵胞液中のPRLはまず卵丘顆粒膜細胞の細胞膜表面に結合して細胞内に取り込まれ、次いで細胞質突起を通過して、透明帯を隔てた卵子に輸送されていることが示唆された。

【結 論】

1. 透過型電子顕微鏡によるprotein A-colloidal goldを用いた免疫組織化学的手法により、ラットにおける卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起および卵子のmicrovilli上にPRLの局在を証明した。
2. ラットにおいて、卵子へのPRLの輸送には、卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起および卵子のmicrovilliが関与していることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

哺乳動物の卵子の発育・過程において顆粒膜細胞の占める働きは極めて重要である。卵丘顆粒膜細胞と卵子の結合様式には、様々な形態が知られているが、中でも卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起は、透明帯を貫いて卵子と接触を保ち、透明帯で隔てられている二種類の異なる系列の細胞間を結合し、細胞間の相互作用を仲介する重要な機能を果たしている。

従来報告では、この細胞質突起は様々な物質を卵丘顆粒膜細胞から卵子へと輸送している事が示唆されていたが、特定の物質の局在を同定した報告はまだない。

一方、顆粒膜細胞および卵子の細胞質内には、prolactin (PRL)・PRL receptorの存在が証明されており、両細胞はPRLの標的細胞の一種と考えられている。しかし透明帯が自由に透過させる分子の分子量は1600程度と考えられており、PRLの分子量が少なくとも22,000以上であることを考慮すると、何らかのPRL輸送機構の存在があるものと考えられる。

本研究は、この様な観点に立って、卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起および卵子のmicrovilliを中心に、超微形態学的にPRLの局在を、protein A-金コロイド法を用いて証明し、PRLの輸送経路に考察を加えたものである。

著者は、ラットを用いてpregnant mare serum gonadotropin (PMS) およびhuman chorionic gonadotropin (hCG) にて過排卵処理を行ない、顆粒膜細胞の細胞質突起と卵子のmicrovilliの観察に適当な時期を通常用いられる透過型電子顕微鏡を使用して検討した。PMS投与5時間後の標本では、両構造は多数認められるものの、PMS投与40時間後にhCG投与しさらに5時間後に得られた標本では両者はほとんど消失していることから、前条件下にてPRLの局在を検討した。電顕組織化学的観察用には、Lowicryl K 4 Mに包埋した標本を用い抗PRL抗体を使用してRothらの方法に従い、protein A-コロイド法により行なった。

免疫染色後の標本では、透明帯中の卵丘顆粒膜細胞の細胞質突起内に金粒子の沈着が認められ、PRLの局在を証明した。また、卵胞液中の卵丘顆粒膜細胞の細胞膜表面にもPRLのbinding siteを示唆する金粒子の沈着が認められ、卵胞液中のPRLはまず同細胞内に取り込まれ、細胞質突起を経由して卵子に輸送されていることが示唆された。さらに、この突起は卵子の細胞質膜との間にgap junctionを形成しておりその接合部の近傍にPRLが認められ、輸送経路の一つと考えられた。また、卵子表面のmicrovilli内にもPRLの局在が証明され、PRLの取り込みにmicrovilliも関与していることが示唆された。

以上、本研究では、従来物質輸送に関与していると示唆されていた顆粒膜細胞細胞質突起上のPRLの局在を証明することによって、間接的にこの仮説を証明すると共に、PRLの輸送形態を示唆する重要な知見をもたらしており、学位論文に十分値するものと判断される。