

学 位 論 文 題 名

培養細胞の免疫電顕的観察のための新しい樹脂包埋法

－ 光学顕微鏡像と透過電子顕微鏡像の対比 －

学位論文内容の要旨

我々の研究グループでは、ここ数年にわたってヒト歯根膜線維芽細胞（PDLF）における細胞間接着装置に関する免疫組織化学的検索を行っている。この過程で我々は、PDLF が、一般には上皮細胞のみに存在し、特殊な細胞を除いて間葉系細胞には存在しないとされている desmosome を構成する蛋白を発現することを明らかにした。このことは、PDLF に desmosome が存在する可能性を強く示唆している。そこで我々は、培養ヒト PDLF を用いて、細胞間における desmosome 様構造の存在と、同部位における desmosome 構成蛋白の発現を免疫電顕的に検索することにした。ところが、これまでの免疫電顕的検索は組織標本に限られており、培養細胞での検索はほとんど行われていないこと、その大きな理由の 1 つは、培養細胞を対象とした免疫電顕のための樹脂包埋法が確立されていないことにあることが分かった。そこで本研究では、まず培養細胞を用いた免疫電顕的観察のための新しい樹脂包埋法の開発を試みた。

免疫電顕には pre-embedding 法、post-embedding 法、凍結超薄切片法があるが、信頼性や簡便性の点から post-embedding 法が最も一般的に行われている。この post-embedding 法による免疫電顕法では、抗原性の保持と親水性に優れたアクリル系樹脂（一般的には LR White 樹脂）に包埋し、低温で紫外線重合するのであるが、この樹脂を単層培養した培養細胞の包埋にそのまま用いるのは難しい。それは、① culture dish と LR White 樹脂が重合過程で化学反応を起こし重合後に分離できなくなる、② LR White 樹脂を重合する際に酸素が存在すると重合不全を起こす、という問題点を有しているためである。

そこで本研究では、①の問題を解決するために、culture dish の上に組織培養用プラスチックシート、あるいは滅菌カバーガラスを置き、その上で細胞を培養した。また、②の問題を解決するために、以下に述べる 2 つの樹脂包埋法を開発した。

1) ゼラチンカプセル倒立法

ガラス容器に LR White 樹脂を入れ、この容器の底に培養細胞の付着したプラスチックシートあるいはカバーガラスを細胞付着面が上になるように沈める。次に、固定前にあらかじめ目印を付けた目的とする細胞の存在する部位の上に LR White 樹脂を満たしたゼラチンカプセルを倒立させ、これを静かに引き上げると、プラスチックシートあるいはカバーガラス上に LR White 樹脂で満たされた（空気の全く入っていない）ゼラチンカプセルが倒立した状態を保つことができる。

2) Ostron II を用いたサンドウィッチ法

通常よりやや柔らかい状態に練った Ostron II を、注入器を使ってカバーガラスの周囲に 3-4mm の高さに盛り上げる。こうしてできた筒の上に培養細胞の載ったプラスチックシートあるいはカバーガラスを裏返してかぶせ、Ostron II との間にすき間が出来ないように軽く押しつけて蓋をする。その後、あらかじめ開けておいた穴から LR White 樹脂を流し込み、穴を塞いで空気を遮断する。また、この方法の変法として、あらかじめ Ostron II で 3-4mm の高さの筒を作って重合させた後、筒の上下両面を磨いて平らにしたものを用意しておくという方法もある。この Ostron II を用いた方法は、ゼラチンカプセルに比べてやや簡便さに欠けるが、大きな資料の包埋も可能であるという利点を有する。

なお、本研究で用いた培養細胞は、第 3 継代のヒト歯根膜線維芽細胞であり、通法に従って DMEM 培地を用いて、30-50 % confluent に達するまで 5 % CO₂ 環境下で培養した。次いで、位相差顕微鏡下で目的とする細胞の存在する部位に目印を付け、同部位の光顕写真を撮影し、通法に従って固定、脱水した試料を上記の包埋法を用いて樹脂に包埋し、低温で紫外線重合した。

本研究で開発した樹脂包埋法を用いることにより、重合不全を起こすことなく LR White 樹脂を重合させることができた。また、culture dish と重合した LR White 樹脂との分離に関する問題も、プラスチックシートあるいはカバーガラス上で細胞を培養することにより解決された。プラスチックシートの場合には、シートの端をピンセットなどでつまんで静かに引っ張れば、容易に分離できた。但し、カバーガラスの場合には、そのまま液体窒素に触れさせるとクラックが入るので、液体窒素を満たした小さな発泡スチロール容器の上にプラスチック板を置き、液体窒素で冷却されたプラスチック板にカバーガラスを押しつけるという間接冷却法を採用する必要があった。

このようにして得られた LR White 樹脂包埋ブロックを、ウルトラミクロトームで超薄切（通常より厚いゴールドがかった切片）し、通法に従って免疫染色を施した。一次抗体として desmosome 構成蛋白である desmoglein, desmocollin I, desmocollin III, plakoglobin, desmoplakin のそれぞれに対する抗体を、二次抗体として Immunogold conjugate IgG (H+M) :15 nm を用いた。また、免疫染色後、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施し、日立 H-800 透過電子顕微鏡で加速電圧 75kV にて観察・撮影を行った。

樹脂包埋前に位相差顕微鏡で撮影した光顕写真を参考にしながら、透過電顕像を低倍率（200 倍）で観察することにより、培養段階で決めておいた観察対象の細胞を容易に判別することが可能であった。また、観察倍率を上げる（20,000-40,000 倍）ことにより、desmosome 構成蛋白である desmoglein, desmocollin I, desmocollin III, plakoglobin, desmoplakin のそれぞれの抗体に反応した金粒子が、培養ヒト歯根膜線維芽細胞の細胞膜近傍と分泌顆粒中に観察された。

以上のことから、培養ヒト歯根膜線維芽細胞は、desmosome を構成するすべての蛋白、すなわち細胞膜を貫通する蛋白である desmoglein と desmocollin, 細胞質側構成蛋白である plakoglobin と desmoplakin を発現することが明らかとなった。この結果は、歯根膜線維芽細胞における desmosome の存在を強く示唆している。しかしながら本研究では desmosome 構造そのものを観察することはできなかった。これは、培養細胞のような in vitro の環境では、in vivo のような外力が加わらないことから、蛋白産生能は発揮されるものの、接着装置そのものの形成には至らないためではないかと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 赤 池 忠

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

培養細胞の免疫電顕的観察のための新しい樹脂包埋法

－光学顕微鏡像と透過電子顕微鏡像の対比－

審査は、赤池、脇田および吉田の各審査担当者が個別に、学位申請者に対して提出論文の内容ならびにそれに関連する学科目について口頭試問により行った。はじめに学位申請者が本研究を構想した経緯、本研究に関連する歴史的背景、本研究の目的・材料と方法・結果・考察、および今後の研究の展望などを説明した後、提出論文の内容ならびにそれに関連する事項について試問した。

細胞間接着装置の1つである desmosome は、一般には上皮細胞のみに存在し、特殊な細胞を除いて間葉系細胞には存在しないとされている。ところが、学位申請者を含む研究グループは、最近、ヒト歯根膜線維芽細胞 (PDLF) における desmosome 構成蛋白の発現を免疫組織化学的検索により明らかにした。そこで学位申請者は、培養ヒト PDLF における desmosome 構成蛋白の局在を明らかにすることを目的として、免疫電顕による検索を行うことにした。

ところが、これまでの免疫電顕的検索は組織標本に限られており、培養細胞ではほとんど行われていない。その大きな理由の1つは、培養細胞を対象とした免疫電顕のための樹脂包埋法が確立されていないことにある。そこで学位申請者は、まず培養細胞を用いた免疫電顕的観察のための新しい樹脂包埋法の開発を試みた。

免疫電顕法では、信頼性や簡便性の点から post-embedding 法が最も一般的に行われているが、この方法で一般に用いられる LR White 樹脂は、抗原性の保持と親水性に優れ、低温での紫外線重合が可能であるなど多くの長所を持つものの、酸素の存在下での重合不全や、重合過程での culture dish との化学反応などの問題点を有している。そこで学位申請者は、培養細胞を LR White 樹脂に包埋するための方法として、「ゼラチンカプセル倒立法」と「Ostron II を用いたサンドウィッチ法」の2つの包埋法を新たに開発した。なお、後者は前者に比べるとやや簡便さに欠けるが、大きな資料の包埋

も可能であるという利点を有している。

学位申請者が開発した樹脂包埋法を用いると、樹脂と酸素が完全に遮断されるため、重合不全を起こすことなく LR White 樹脂を重合させることが可能となる。また、細胞をプラスチックシートあるいはカバーガラス上で培養することにより、重合後に LR White 樹脂と culture dish が分離できなくなる問題も解決される。但し、カバーガラスの分離に際しては、液体窒素で冷却されたプラスチック板にカバーガラスを押しつけるという間接冷却法を採用する必要がある。なお、本法は、樹脂包埋前にあらかじめ位相差顕微鏡下で目的とする細胞の存在する部位に目印を付け、同部位の光学顕微鏡写真を撮影しておけば、樹脂包埋・超薄切後の透過電子顕微鏡写真と容易に対比することができるという利点を有している。

以上の結果、培養細胞のための樹脂包埋法が確立されたので、続いて学位申請者は、通法に従って培養した第3継代のヒト PDLF における desmosome 構成蛋白の発現を免疫電顕的に検索した。その結果、培養ヒト PDLF は desmosome を構成するすべての蛋白、すなわち細胞膜を貫通する蛋白である desmoglein と desmocollin、細胞質側の構成蛋白である plakoglobin と desmoplakin を細胞膜近傍と分泌顆粒中に発現することを明らかにした。この所見は、PDLF における desmosome の存在を強く示唆している。しかし、本研究では desmosome 構造そのものを確認できなかったため、この点についてはさらなる検討を行う必要がある。

以上の学位申請者の説明に対し、1. 包埋樹脂の比較、2. 新しい樹脂包埋法を開発した際の問題点とその解決手段、3. 本研究で開発した樹脂包埋法の利点と欠点、4. 本包埋法の応用に関する将来展望、5. 免疫電顕法の比較、6. 細胞間接着装置の構造と機能、7. 他の組織学的研究法、などに関する口頭試問が行われたが、いずれの質問に対しても明快な回答が得られたことから、学位申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、顕微解剖学全般に亘って広い学識を有していると認められた。また審査担当者からは、本研究で開発した培養細胞の免疫電顕的観察のための新しい樹脂包埋法は、今後の免疫電顕的研究に大きく寄与するであろうことが高く評価され、細胞間接着装置に関する研究の将来展望に関しても、本研究を元にして今後ますます発展してゆく可能性が高いと認められた。

以上のことから、主査ならびに副査は、学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認めた。