

(13)

氏名(生年月日) 原 君 代
ハラ キミ ヌ

本 籍
 学位の種類 医学博士
 学位授与番号 乙第28号
 学位授与の日付 昭和40年7月2日
 学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当(博士の学位論文提出者)
 学位論文題目 マウス腔のタンパク質および脂質の組織化学的研究
 論文審査委員 (主査)教授 川上 博
 (副査)教授 飯沼 守夫, 教授 加藤 金吉

論 文 内 容 の 要 旨

成熟したラット, マウスの腔上皮は性周期に伴い著明な変化をあらわすことは既に知られているが, 腔上皮の性周期に伴うアミノ酸の変化に関する組織化学的研究はみられないのでこれに関する研究を行ない, また腔上皮の性周期に伴う脂質の変化について研究した。

実験方法

dd 系マウスを一定の条件下で飼育し, 正常な性周期を認めた 100匹を用いて研究した。

腔上皮タンパク質の検出法

アルカリテトラゾリウム反応 (Pearse) とテトラゾニウム結合反応 (Danielli) を行なった。

アルカリテトラゾリウム反応は原法と異なる主な点は, 原法ではブルーテトラゾリウム10mgを使用しているが, 著者はニトロブルーテトラゾリウム5mgを使用し, 浸漬時間を原法の60~90分を45分とした。

この染色法では多くのアミノ酸が反応に関与して赤褐色に染まるが, 2, 4-ジニトロフルオロベンゼン処理, 過ギ酸処理, 塩化ベンゾイル処理など, 封鎖あるいは除去処理を行ない, 特定のアミノ酸反応を存続させ, あるいは除去したのちにテトラゾニウム結合反応を行ない, 処理前のものと比較した。

脂質の染色法

クリオスタット切片を製作し, -20°C で保存し, これらの切片を10%ホルマリン液で室温で1時間固定し, あるいは固定することなく染色した。染色液はズダンIVのエチルアルコール飽和溶液を用い, 室温で染色し, また zaponechtviolett をエチルアルコールに 0.5% にとか

し, 使用直前にこの溶液をツイン40の2%水溶液で200倍にうすめ, 37°C にあたためて30分間ないし24時間切片を染めた。さらに一度十分乾燥させたクリオスタット切片を固定することなく, 直に24時間 37°C に保った生理的食塩水中に浸漬してから上記の染色を行なった。

成績

本研究の材料として用いたマウスの腔上皮ではアルカリテトラゾリウム反応陽性物質の大部分はシステイン, またはシステインを有する物質と思われるが, 腔上皮の角化層に本反応が強い。ことにテトラゾリウム塩として原法とことなりニトロブルーテトラゾリウムを使用すると極めてよい結果を得た。

発情期において腔上皮はもつとも強い反応を示したが, これはSH基を有するタンパクの豊富な存在を示している。

また本反応の強弱によつて角化層の細胞の分化の仕方がはつきり認められた。発情間期においてある程度被蓋層の細胞が分化してきたから, その直下の細胞にアルカリテトラゾリウム反応が次第に強くなってくる。つまりSH基を有するタンパク質が次第に集積してくる。被蓋層の細胞には本反応は弱いから発情間期において被蓋層と角化層との分化が本反応で明らかに区別できる。

被蓋層の細胞で粘液が十分産生されていないものでは中等度の反応があるが, これは還元性のある糖が関与しているものかも知れない。性周期を通じて核小体にはかなり強い反応がみられるが, リボ核酸についている糖の還元性によると思われる。

テトラゾニウム結合反応で組織中に含まれるタンパク質を染色し、またその中に含まれるアミノ酸を特異的に封鎖あるいは除去してからテトラゾリウム結合反応を行なつてアミノ酸の組織における局在性を組織化学的にみると、被蓋層は発情前期に完成され、粘液多糖類を多量に含有する細胞よりなり、発情期にはがれるのであるが、粘液が十分につくられていない発情中期においては多糖類のかわりにタンパクが存在し、その中にはリジン、システイン、ヒスチジンが含まれているように思われ、粘液化が進むにつれてタンパクの含有量は次第にへる。

角化層は発情中期に幼若な被蓋層が出来かけた頃から分化しはじめるようである。この頃から過ギ酸処理後もテトラゾニウム結合反応陽性物質が認められ、またこの物質は塩化ベンゾイルおよび2, 4-ジニトロフルオロベンゼン処理により反応性を失い、アルカリテトラゾリウム反応陽性であることから考えて、SH基を有する化合物の存在を思わせる。

発情期と角化が進むにつれてテトラゾニウム結合反応の陽性度が高くなる。

すなわち角化層にはシステインを含むタンパクがかなり存在するが、過ギ酸処理によりテトラゾニウム結合反応がかなり弱くなることから考えてシステイン以外のアミノ酸も角化層にはかなり含まれていることが判つた。

発情期以後膈上皮の大部分ははがれるが、基底層の細胞には凡ての性周期に同じような種類のアミノ酸を含んでおり、上皮が分化しはじめると場所により特定のアミノ酸の含有量が異なるようである。

テトラゾニウム結合反応において核の染色性は色々の封鎖あるいは除去処理を行なつてもほとんど変化はない。これは主として核酸による染色であろう。かくしてアルカリテトラゾリウム反応にらみ合せて、存在の可能性あるものを(+)、本研究における組織化学的手技では認め得なかつたものを(-)として表示すると、つぎのようである。

	被蓋層	角化層	中間層	基底層
チロジン	+	+	+	+
トリプトファン	-	+	+	+

ヒスチジン	+	+	-	-
リジン	+	+	+	+
システイン	-	+	+	+
アルギニン	-	+	+	+
脂質				

クリオスタット切片をホルマリン固定し、中性脂肪を染めるズダンIVで染色しても性周期のいかなる時期においても上皮には染色性を認めなかつた。つまり遊離の中性脂肪は存在しなかつた。クリオスタット切片にしてスライドグラスに固着せしめ、一度乾燥し、固定をしないで、37°Cの生理的食塩水に24時間入れて自己消化をさせてから10%ホルマリンで固定し、脂質の染色を行なつたが相変わらずズダンIVは全く陰性であつた。すなわち細胞の自己消化によつて脂質の遊離をこころみても陰性であつた。

しかしクリオスタット切片を自己消化させてから類脂質を染めるzaponechtviolettで処理すると強く染まる部分があつた。ことに十分角化した層に局限して強い染色性を示した。被蓋層の十分粘液を有する細胞はほとんど染らず、中間層、基底層と下にいくほど染色性は弱くなつた。

発情中期より発情前期に近づくとき被蓋層の細胞が分化しはじめるが、その幼若被蓋層の細胞の下に、他の部分よりも濃くzaponechtviolettに染まる部分がある。以上の事実から角化と類脂質との間には密接な関係があり、角化細胞中には単純な形でなく、おそらくタンパクと結合した形の類脂質がかなり多く存在することが明らかになつた。

要するにマウスの膈上皮は性周期によつて構成細胞要素が異なるが、そこに存在するタンパクの組成にもかなり差があることが判つた。

また性周期の各時期に遊離の中性脂肪や類脂質は認めなかつたが、新しい方法で他の物質と結合している類脂質を証明し、これが特に角化層に多量に存在することを明らかにした。

以上性周期に伴う膈上皮のタンパク、脂質の変化をはじめて明らかにした研究である。

論文審査の要旨

マウス膈のタンパクおよび脂質の組織化学的研究。今まで研究されていないマウス膈上皮の性周期に伴う特定のアミノ酸、および脂質の変化を組織化学的に研究した。著者は今までのアルカリテトラゾリウム

反応を改良してニトロブルーテトラゾリウム反応を行ない、アミノ酸を染色し、これに封鎖処理や除去処理を行なつて特定のアミノ酸反応を存続あるいは除去したのちにテトラゾニウム結合反応を行なつて処理前のものと比較して特定のアミノ酸が性周期に応じ、如何に変化するかを組織化学的にみた。

dd 系マウス脛上皮の構成細胞要素の性周期に伴う変化に従つて、タンパクの組成も周期的に変化することを被蓋層、角化層、中間層、基底層におけるチロジン、トリプトファン、ヒスチジン、リジン、システイン、アルギニンなどの有無や増減によつて証明した。それと同時に角化層の分化の仕方を明瞭にすることができた。

脂質についてはクリオスタット切片のズダンⅣ染色を行ない全性周期を通じて遊離の中性脂肪や類脂質は証明しなかつたが、クリオスタット切片を自己消化させたものを zaponechtviolett で染めることによつて他の物質、おそらくタンパクと結合した類脂質が発情前期の幼若被蓋層下の角化層に局限して現われることを証明し、角化と類脂質との間には密接な関係があることを認めた。

要するに本論文は脛上皮の特定のアミノ酸、タンパク結合類脂質を組織化学的に研究し、性周期に伴うこれらの変化を認め、同時に角化層の分化の仕方を明らかにし、角化と類脂質との密接な関係を証明したもので、この方面の研究に新領域を開拓した貴重な論文である。

主論文公表誌

マウス脛のタンパク質および脂質の組織化学的研究。
東京女子医科大学雑誌 第35巻第1号17頁～37頁
(昭和40年1月25日)

産婦人科治療 7 (2) 147～155 (昭和38年)

- 4) 未熟児分娩の原因とその予防対策。
産婦人科の実際 12 (9) 633～643 (昭和38年)
- 5) 未熟児の周産期死亡の原因とその対策。
産婦人科の実際 13 (2) 108～119 (昭和39年)
- 6) 先天性骨形成不全症 (Osteogenesis imperfecta congenita) の1例について。
東女医大誌 34 (1・2) 58～61 (昭和39年)
- 7) 周産期死亡児55例の剖検所見。
東女医大誌 34 (10) 551～557 (昭和39年)

参考論文公表誌

- 1) 大頻産婦 (Grand multipara) の妊娠、分娩の危険性について。
産婦人科の実際 12 (2) 83～90 (昭和38年2月)
- 2) 頸管妊娠について。
産婦人科の世界 15 (5) 563～568 (昭和38年)
- 3) 予定日超過の問題。