




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・(論)	第331号	氏名	吉村 彰
審査委員会委員	主査氏名	小野 克重	
	副査氏名	藤倉 義久	
	副査氏名	穴井 博文	

論文題目

Immuno-histochemistry and three-dimensional architecture of the intermediate filaments in Purkinje cells in mammalian hearts
(哺乳動物心臓のプルキンエ細胞における中間径フィラメントの免疫組織化学的検索と三次元構築)

論文掲載雑誌名

Medical Molecular Morphology

論文要旨




哺乳動物心臓のプルキンエ細胞は、種により形態的に大きな多様性があり、3つのグループに分類されている。第一グループは、作業心筋細胞に比べてかなり大きなプルキンエ細胞を持つ有蹄類で、第二のグループは、作業心筋よりやや大きい細胞を持つヒト、サル、イヌなどのグループ、第三グループは、逆に小さい細胞を持つ齧歯類である。第一グループのウシ心臓において、大きくかつ筋原線維が少ないプルキンエ細胞中に無数の中間径フィラメントを持つことがすでに示されており、その細胞骨格としての役割が推定されている。本研究は複数の哺乳動物のプルキンエ細胞に中間径フィラメントがどのように分布しているかを免疫組織化学的に検索した。さらに、ヒツジとヒトの心臓プルキンエ細胞を走査電子顕微鏡で観察することにより、中間径フィラメントの三次元構築を明らかにした。材料として、各種哺乳動物、グループ1(ヒツジ)、グループ2(ヒト、サル、イヌ)、グループ3(マウス)の心臓を用いた。心室からプルキンエ細胞を含む心内膜部位を切り出して、パラフィン切片を作製した。デスミン抗体を用いた IgG gold・silver 法で免疫染色し、光学顕微鏡で観察した。また、同じデスミン抗体を使って、ヒツジのプルキンエ細胞を免疫組織化学的手法で透過電子顕微鏡検索した。さらに、プルキンエ細胞の三次元構築を明らかにするために、ヒツジとヒト心臓の標本を走査電子顕微鏡で観察した。観察に先立ち、ヒツジ心室の仮腱索内を走るプルキンエ細胞の細胞内基質とグリコーゲン果粒を除去するために、凍結切断後試料をサポニン溶液で処理した。一方、ヒトでは心臓組織を水酸化ナトリウム溶液で処理した。今回検索した第一グループから第三グループまでのすべての哺乳動物で、プルキンエ細胞はデスミン抗体に対して陽性反応を示す銀粒子は、10nmの径を持つ中間径フィラメント上に見られた。さらに、ヒツジとヒトのプルキンエ細胞の走査電子顕微鏡観察では、いずれも中間径フィラメントは、繊細な網目構造をしており、核周囲に多く見られ、ミトコンドリアや筋原線維とも複雑に絡み合っていた。また、その密度はヒツジの細胞においてより密であり、ヒツジでは細胞質全体に分布していたのに対し、ヒトでは主に核の周りや筋原線維の間分布していた。有蹄類のプルキンエ細胞は、作業心筋細胞よりかなり大きく、豊富なグリコーゲン、辺縁に局在する筋原線維によって容易に同定出来る。しかしながら、ヒトやマウスのプルキンエ細胞は、作業心筋細胞に近似しているが、豊富な中間径フィラメントを有していることが大きな違いであった。密な網目の中間径フィラメントは、核、筋原線維、ミトコンドリアを包圍し、プルキンエ細胞の構造上・機能上の安定性を維持するために必要な構造であることが示唆された。哺乳動物のプルキンエ細胞は、いずれの種においても豊富な中間径フィラメントを持っていった。デスミン抗体を用いた免疫組織化学法は、プルキンエ細胞の同定に有効であった。豊富な中間径フィラメントは、細胞骨格として機能し、プルキンエ細胞にとって欠かすことが出来ない重要な構造である。

本研究は、細胞内グリコーゲン果粒を化学的に除去することで中間径フィラメントの分布を容易に評価する実験法を駆使し、心臓プルキンエ細胞の発現形態を観察したものであり、研究手法に新規性があり、その結果はプルキンエ細胞の形態上の特徴を新たに明らかにした。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判断した。

~~最終試験~~

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・論	第331号	氏名	吉村 彰
審査委員会委員	主査氏名	小野 克重	
	副査氏名	藤倉 義久	
	副査氏名	穴井 博文	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い各審査委員から研究の目的、結果、考察について次の質疑を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 本研究の実験計画書について具体的に説明せよ。 2 本研究では心臓プルキンエ細胞内のグリコーゲン果粒に言及しているが、その結果は実験に供した実動の生活状態や栄養状態を考慮したものであるかどうか言及せよ。 3 実験に供したヒト、ヒツジ、サル、イヌ等の動物種の中でなぜマウスだけが電子顕微鏡的解析が含まれていないのか説明せよ。 4 心臓組織の摘出から固定や包埋までの時間経過を説明せよ。 5 電子顕微鏡写真用の標本を作製するための方法がヒツジとヒトで異なるのはなぜか説明せよ。 6 同じ動物種では異なる年齢による所見の違いが認められたかどうか言及せよ。 7 心筋内から組織標本を採取する際にプルキンエ線維の走行部位はどの程度容易に同定できるのか答えよ。 8 HE染色標本は何枚ほど作製して目標の像を得たのか答えよ。 9 プルキンエ細胞の形態学的相違は動物の成長に依存するかどうか説明せよ。 10 動物種と心臓プルキンエ線維のギャップ結合の大きさの関連について言及せよ。 11 肉柱内になぜプルキンエ線維が密集して存在する必要があるのか説明せよ。 12 本研究内容の新規性はどこにあるのか説明せよ。 13 ラットの電子顕微鏡写真用の標本は凍結切断後にサポニン溶液で処理したのか否かを詳しく説明せよ。 14 ラット心筋を採取後にある一定時間をおいて NaOH 処理すれば組織破壊を免れて適切な標本製作に成功したのではないのかという点に関して考察せよ。 15 電子顕微鏡像での中間径フィラメントの構造や細胞内小器官との接合関係から中間径フィラメントが細胞骨格としての役割以外の機能を示唆する所見があるのか考察せよ。 16 動物の種としての個体が大きいほど心臓プルキンエ細胞径が大きく、さらにプルキンエ線維の伝導度が大きいという考察の根拠を述べよ。 <p>これらの質疑に対し、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 吉 村 彰

論 文 題 目

Immuno-histochemistry and three-dimensional architecture of the intermediate filaments in Purkinje cells in mammalian hearts

(哺乳動物心臓のプルキンエ細胞における中間径フィラメントの免疫組織化学的検索と三次元構築)

要 旨

【緒言】

哺乳動物心臓のプルキンエ細胞は、種により形態的に大きな多様性があり、3つのグループに分類されている。第一グループは、作業心筋細胞に比べてかなり大きなプルキンエ細胞を持つ有蹄類で、第二のグループは、作業心筋よりやや大きい細胞を持つヒト、サル、イヌなどのグループ、第三グループは、逆に小さい細胞を持つ齧歯類である。第一グループのウシ心臓において、大きくかつ筋原線維が少ないプルキンエ細胞中に無数の中間径フィラメントを持つことがすでに示されており、その細胞骨格としての役割が推定されている。今回、我々は、複数の哺乳動物のプルキンエ細胞に中間径フィラメントがどのように分布しているかを免疫組織化学的に検索する。さらに、ヒツジとヒトの心臓プルキンエ細胞を走査電子顕微鏡で観察することにより、中間径フィラメントの三次元構築を明らかにする。

【材料と方法】

材料として、各種哺乳動物、グループ1 (ヒツジ)、グループ2 (ヒト、サル、イヌ)、グループ3 (マ

ウス)の心臓を用いた。心室からプルキンエ細胞を含む心内膜部位を切り出して、パラフィン切片を作製した。デスミン抗体を用いた IgG gold・silver 法で免疫染色し、光学顕微鏡で観察した。また、同じデスミン抗体を使って、ヒツジのプルキンエ細胞を免疫組織化学手技で透過電子顕微鏡検索した。さらに、プルキンエ細胞の三次元構築を明らかにするために、ヒツジとヒト心臓の標本を走査電子顕微鏡で観察した。観察に先立ち、ヒツジ心室の仮腱索内を走るプルキンエ細胞の細胞内基質とグリコーゲン果粒を除去するために、凍結割断後試料をサポニン溶液で処理した。一方、ヒトでは心臓組織を水酸化ナトリウム溶液で処理した。

【結果】

今回検索した第一グループから第三グループまでのすべての哺乳動物で、プルキンエ細胞はデスミン抗体に対して作業心筋よりも強く染まった。透過電子顕微鏡観察では、デスミン抗体に対して陽性反応を示す銀粒子は、10 nmの径を持つ中間径フィラメント上に見られた。さらに、ヒツジとヒトのプルキンエ細胞の走査電子顕微鏡観察では、いずれも中間径フィラメントは、繊細な網目構造をしており、核周囲に多く見られ、ミトコンドリアや筋原線維とも複雑に絡み合っていた。また、その密度はヒツジの細胞においてより密であり、ヒツジでは細胞質全体に分布していたのに対し、ヒトでは主に核の周りと筋原線維の間に分布していた。

【考察】

有蹄類のプルキンエ細胞は、作業心筋細胞よりもかなり大きく、豊富なグリコーゲン、辺縁に局在する筋原線維によって容易に同定出来る。しかしながら、ヒトやマウスのプルキンエ細胞は、作業心筋細胞に近似しているが、豊富な中間径フィラメントを有していることが大きな違いであった。密な網目の中間径フィラメントは、核、筋原線維、ミトコンドリアを包囲し、プルキンエ細胞の構造上・機能上の安定性を維持するために必要な構造であることが示唆される。

【結語】

哺乳動物のプルキンエ細胞は、いずれの種においても豊富な中間径フィラメントを持っていた。デスミン抗体を用いた免疫組織化学法は、プルキンエ細胞の同定に有効であった。豊富な中間径フィラメントは、細胞骨格として機能し、プルキンエ細胞にとって欠かすことが出来ない重要な構造である。