

ラーゲンの型分布について報告する。

方法：(1) 走査電顕像；freeze fracture 法，(2) コラーゲンの型の種類と局在性；(a) 抗原；I, III 型，仔牛皮膚，IV 型，牛糸球体基底膜，V 型，ヒト胎盤。(b) 抗体作製法；上記抗原を家兎に感作，一次抗体を作製。二次抗体 (fluorescien isothio cyanate 標識抗家兎 IgG・山羊 IgG)。(c) 間接免疫蛍光染色法；6 μ m 凍結切片を一次抗体，二次抗体と室温にて一定時間 incubate 後，蛍光顕微鏡により観察，写真撮影。

成績：(1) 正常卵巢各期，PCO 各白膜の組織構築の主体はコラーゲン線維である(走査電顕像)。(2) 間接免疫蛍光染色法によるコラーゲンの型分布；(a) 正常卵巢各期，PCO 各白膜には共に間質コラーゲンである I 型，III 型が全体に均等に分布する。IV 型(基底膜コラーゲン)は白膜表層，閉鎖卵胞壁，毛細血管壁に局在し，V 型は I, III 型に類似した分布を示す。(b) 卵胞期，排卵期，黄体期各白膜の型分布に差異はない。(c) 正常卵巢各期，PCO 各白膜の型分布に著明な差異はない。

独創点：間接免疫蛍光抗体法よりみた白膜構築コラーゲンの型は，卵胞期，排卵期，黄体期，白膜の病的に肥厚した PCO で定性的には変わらず，その局在性も不変である。この知見は排卵期の白膜非薄化現象の解明に不可欠な情報である。また今回の成績から正常卵巢各期，PCO 各白膜を構築するコラーゲンの合成と分解，すなわち代謝は，同一過程で進行し，PCO ではコラーゲン代謝の制御機構の異常に起因して白膜の肥厚が惹起される機序が示唆される。

質問 (京都大) 岡村 均

排卵期といわれた卵巢の内分泌状態や卵胞自体の発育状態を検討した結果を御教示下さい。排卵期という言葉の意味を詳しく具体的にどの時期かお教え下さいという意味です。

回答 (東邦大) 金子 慶賛

① BBT にて卵胞期，排卵期，黄体期を確認，ホルモン測定，卵胞 size の測定は行なっていない。

② 通常の光顕によるコラーゲンの検討は行なっていない。

420. ラット胎仔における glutathione peroxidase の免疫組織化学的局在とその由来について

(聖マリアンナ医大)

大塚 博光，山中 昭二，佐賀 正彦

雨宮 章，浜田 宏

(東海大・病理学)

和泉 伸一，小松 遵至，渡辺 慶一

目的：血中の過酸化脂質は，妊娠経過とともに増加するが，glutathione peroxidase (GSH-PO) は過酸化脂質による細胞障害を防御，修復するもつとも有効な酵素のひとつとして知られている。ラット胎仔における抗過酸化脂質作用に，卵黄嚢に局在する GSH-PO が重要な役割を果している可能性を第35回総会にて報告したが，今回はその由来について検索を進めた。

方法：妊娠10日，12日，14日の Wistar 系妊娠ラットの尾静脈より，horseradish peroxidase (HRP) を静注し，それぞれ，2分後，6時間後に卵黄嚢を取り出し glutaraldehyde 固定した。染色の後，光顕と電顕により観察した。一方，無処置の妊娠ラットは，periodate-lysine-paraformaldehyde 固定し，Nakane の酵素抗体法により，GSH-PO の局在を光顕と電顕により観察した。

結果：(1) HRP 静注後の，光顕写真では，GSH-PO の局在と同様に，円柱上の卵黄嚢細胞の核上部に大顆粒状，もしくは，びまん性に HRP の局在が確認された。なお，光顕上では，2分後と6時間後との局在の差異ははつきりしなかつた。(2) HRP 静注後，2分での電顕写真で，Microvillous surface から，apical tubulo vesicular system に HRP が取りこまれている像が確認でき，さらに一部の storage vacuole にも局在が認められた。(3) HRP 静注後6時間での写真では，yolk sac cavity にはすでに HRP は消失しており，apical tubulo vesicular system と storage vacuole には，局在が認められた。(4) GSH-PO の局在が認められた Perinuclear space や rough ER には，HRP は局在しなかつた。

まとめ：以上の結果により，GSH-PO は核周囲や粗面小胞体に存在するような分泌型蛋白以外に，微絨毛から連続している卵黄嚢独特な迷路構造やドーナツ型の構造で，母体側の GSH-PO が endocytosis によって取りこまれている可能性が示唆された。起源を別に同種の蛋白が同じ細胞に混在することは，非常に興味ある事実である。

回答 (聖マリアンナ医大) 大塚 博光

座長加藤先生のこれからの研究の方向は？との質問に対して

1) glutathione peroxidase の人での抗体が，精製をされれば人胎盤での局在を確認していきたい。

2) rat 卵黄嚢細胞から卵黄嚢静脈への glutathione peroxidase の移行がまだはつきりと確認できており

ませんので、この点を何らかの方法で確認していきたいと考えている。

421. ヒト妊娠黄体のステロイド生合成に関する free cholesterol 局在分布と 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) 活性の検討

(広島大)

日浦 昌道, 野河 孝充, 藤原 篤

目的: ヒト妊娠黄体において, ステロイド必須合成素材である free cholesterol から pregnenolone を経て progesterone への一連のステロイド生合成過程は初期妊娠維持に極めて重要な役割を演じている。今回, ヒト初期妊娠黄体のステロイド生合成過程を機能形態的に追求するため, digitonin reaction による free cholesterol の細胞内局在分布と, pregnenolone から progesterone への反応触媒酵素である 3β -HSD 活性の両者を細胞化学的に検討した。

方法: 15例のヒト妊娠黄体 (5~10週) を電顕的に観察し, 一部を 0.2% digitonin を含む固定液で反応させた digitonin cholesterol complex の細胞内局在分布と, フェリシアン化銅法を応用して 3β -HSD 活性局在を検索した。

成績: (1) 妊娠黄体細胞(卵胞膜, 顆粒膜黄体細胞)は豊富な脂肪滴, 管状クリスタを有するミトコンドリア(暗調の内顆粒とやや不透明で amorphous の二種が存在)および滑面小胞体の特徴的で, これらは互いに隣接している。(2) free cholesterol の局在を示す digitonin cholesterol complex は細胞膜, 核膜, ゴルジ装置, 脂肪滴, ミトコンドリア, 粗面および滑面小胞体, ライソゾーム, 細胞質に認められ, そのうちとくに, ミトコンドリアと滑面小胞体に顕著であった。(3) 3β -HSD 活性はミトコンドリアのクリスタ, 内膜と滑面小胞体膜に認められた。

独創点: ヒト初期妊娠黄体において, (1) 脂肪滴に貯蔵された esterified cholesterol は free cholesterol として, 直接ミトコンドリアに, あるいは滑面小胞体を経て, ミトコンドリアに移行し次いで, (2) ミトコンドリアの滑面小胞体の 3β -HSD 活性により, 一連のステロイド生合成過程が促進されることを機能形態的に明らかにした。

質問 (京都大) 岡村 均

3β -HSD 酵素反応系の詳細について御教示下さい。

1) electron capturing agent としての ferricyanide 溶液の濃度と非特異的反応の発現の可能性について。

2) 3β -HSD の specific inhibitor を使つて特異性を

検討しておられますか?

cholesterol-digitonin complex は LDL lysosome の系路から考えて, lysosome にも当然みられるはずですが, 先生のデータは?

先生のお仕事から lipid からの release と LDL-lysosome からの直接的供給と, どちらか妊娠黄体でステロイド合成のための cholesterol の主供給路と考えられますか?

回答 (広島大) 日浦 昌道

1) ferricyanide の濃度としては 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM で検討しましたが, 経験的には 1.5mM が至適濃度で 2.0mM では非特異的な発現頻度が多くなるようです。

2) 今回, specific inhibitor は使用しておりませんが, electron transfer として 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM PMS を使用しての 3β -HSD 活性の特異性を検討した結果, これも 1.5mM が至適濃度で 2.0mM では overstaining の傾向があります。

cholesterol-digitonin complex は lysosome にも存在しておりますし, ステロイド生合成に関して, 先生の言われる LDL-lysosome 系の直接供給以外に lipid droplet に貯蔵された esterified cholesterol から free cholesterol への転換経路も重要と考えております。細胞環境によつても違いますが, どちらがステロイド生合成主要経路から判別困難と思います。

422. respiratory chain 阻害剤 (rotenone) の排卵におよぼす効果

(京都大) 越田 光伸, 竹中 章
岡村 均, 森 崇英

目的: 排卵期顆粒膜細胞におけるエネルギー産生系の役割を検討するため NADA dehydrogenase の特異的阻害剤である rotenone をラットおよび家兎に投与し排卵におよぼす影響を検討した。

方法: 24日齢の幼若雌性ラットに PMS 10iu を投与し, 48時間後に hCG 5 iu および rotenone 0~0.5mg/kg を同時投与し, 20時間後に排卵数を算出した。また成熟雌性家兎に rotenone を投与し, 投与後 3, 6, 9, 12, 15, 18時間目に卵巣を摘出し, 新鮮凍結切片を作製し, steroids 合成酵素の一つである 3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) および酸素消費を良く反映すると考えられる cytochrome oxydase (CYO) の各活性につき酵素組織化学的検討を加えた。一部卵巣は連続切片とし光顕的観察を行った。

成績: rotenone は用量反応的にラットの平均排卵