

氏 名	増 田 秀 雄 ます だ ひで お
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 194 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	The Golgi Apparatus in Cultivated Cells (培養細胞のゴルジ装置)
論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川 衛 教 授 中 村 健 児 教 授 加 藤 幹 太

論 文 内 容 の 要 旨

ゴルジ装置は細胞器官のうちでもっとも解明の遅れているもので、その形態・機能もまだ十分には判明していない。その最大の原因は、この細胞器官がきわめて不安定な構造で、生きている細胞ではその存在が確認できなかったためである。長期にわたって生細胞を観察し続けるために、しばしば培養細胞が使用されてきたが、培養細胞ではゴルジ装置は外植片の外部に存在する細胞だけに、わずかにオスミウム鍍金法によって、その存在が確かめられたにすぎない。したがって、培養細胞ではその存在を疑う学者すらある。このような時点においては、まず培養細胞でその存在と構造を明白にすることが、ゴルジ装置の形態的变化、機能ならびに種々の環境条件に対する反応性を研究するための先決問題となる。申請者の論文はこの問題に取り組み、古来固定細胞に応用されている鍍銀法による検出法に加え、近年開発されたチアミンピロフォスファターゼ (TPPase) 活性や酸性フォスファターゼ (APase) 活性を利用する方法を用い、これらの結果の対比から、その存在と形態とを明らかにしたものである。

培養細胞を位相差顕微鏡で観察すると、ゴルジ域は一般に核の1側にあつて、Phase-Gray として認められ、詳細にみると内部に Phase-White の液胞と Phase-Gray の繊維状構造 (以下 PGF と略称する) が区別される。しかし、ニワトリ胚の心臓からえられる繊維芽細胞では、PGF は認めにくい。そこでまず液胞の方に着目して鍍銀法を施している。この方法は、一般の組織細胞では容易にゴルジ装置を検出するが、培養細胞ではその検出が不可能に近いとみなされていた。このことからわかるように、この方法を実施するに当たっては、条件に極めて高度の厳密性を要求するものである。申請者は多年にわたる試行から改良を重ね、培養細胞での検出に成功したが、銀は一部の液胞だけを鍍銀し、逆に液胞のないところにも沈着する結果を得、液胞はゴルジ装置の不可欠な構成要素ではないとの結論に達した。

次に、Phase-Gray 域の今一つの構成要素である PGF に重点を移した。ところが、繊維芽細胞では、その由来する器官が何であろうと、問題とする PGF は、一般に核の1側に密集し、輝いて見える脂肪粒や Phase-Black のミトコンドリアと混在していて、その所在と形態の確認が極めてむずかしい。そのた

めに、PGF が比較的良好に広範囲に広がり、かつミトコンドリアの少ない細胞として、ニワトリ胚の脳膜細胞を選び、これを透析膜でおおって培養し、脂肪粒の形成を妨げることに成功した。この方法によると PGF は明瞭な輪郭をもち、細胞内に割合によく分散して見られるので、同一細胞を固定し、鍍銀法を施した像と重ね合わせ、精密に両者を比較検討することができる。鍍銀法を施してみると、銀粒子は PGF を取りかこむように現われ、内部に中空部を残す。これは一見かつてゴルジ装置が管状構造を示すといわれていたことを実証するかのようであるが、実はゴルジ装置の本体は銀粒子をとらない中空部である。銀粒子の沈着が進むと、個々の構造の形態は不規則となり、長く鍍銀すると近接する構造と結合して、網目状を呈するようになる。かつてゴルジ装置は網目状構造であるといわれたものの中には、このような人工的網目状構造がふくまれているであろうと指摘している。

TPPase の活性は一般細胞では電顕像でいうゴルジ複合体の lamellae の両側に局在することが確かめられている。培養細胞では銀粒子と同じように、PGF を被うように反応生成物（硫化鉛）が沈着してくる。したがって、PGF はゴルジ複合体の lamellae と同じであると結論している。この反応生成物は時間とともに成長し、ついには Phase-Gray 構造をつつんで管状構造になる。この像は鍍銀法によって検出されたものと全く同じである。ただ強いて相違を求めるなら、酵素活性によって示される像の方が少し繊細である。このように、鍍銀法、TPPase 活性検出法によって検出される像は、PGF と全く一致した所在と形態を示すことを確かめた。

次に、酸性フォスファターゼ(APase)活性を調べた。PGF にこれを検出することはできたが、TPPase ほど明瞭なものではなかった。ともあれ、この酵素も組織細胞では、lamellae に存在することが電顕的に調べられているので、位相差顕微鏡でみる PGF がゴルジ装置の本体であるとみることに對し、一つの証拠を提供したといえる。

参考論文は、4 編とも培養細胞のゴルジ装置の微細構造の観察記録である。

論文審査の結果の要旨

培養条件下にある生細胞でゴルジ装置を観察することは従来至難の業であると考えられていた。その理由はゴルジ装置が培養条件に対して極めて不安定な構造で、その存在が確認できなかったためと、一般に培養系に組み込まれる繊維芽細胞では、その存在域にミトコンドリアや脂肪粒があって、観察を妨げるためである。申請者は始めはニワトリ胚の心臓由来の繊維芽細胞を使用していたが、このためにゴルジ装置が比較的広範囲にわたって分布し、かつミトコンドリアの混在することの少ないニワトリ胚の脳膜細胞を用いることにした。その上、後には培養片を透析膜で被うという方法をとったので、脂肪粒の形成を防ぎ、この細胞器官の存在とその形態・大きさなどをはっきり位相差顕微鏡で確認することに成功している。すなわち、1) ニワトリ胚の培養細胞には常にゴルジ域が存在し、内部に Phase-White の液泡と Phase-Gray の繊維状構造 (PGF) が散在している。この PGF の離散、集合の状態は、細胞の種類・大きさ・形に支配されるが、一部の学者がいうように培養条件下では消失するとか脂肪粒の形成とともに消失するという事はない。次に、生きた状態の細胞でこの PGF を写真にとり、すぐあとで固定し、ゴルジ装置を固定細胞で検出するところの鍍銀法を施し、あるいは電子顕微鏡的観察でゴルジ lamellae に特

異的に存在することが証明されているチアミンピロフォスファターゼや酸性フォスファターゼ活性を検出する方法を用いて、銀粒子または硫化鉛粒子の沈着像を得、これと PGF 像とを重ね合わせることで、PGF こそは正しくゴルジ装置に間違いなく存在していることを証明している。また、これら粒子の沈着の模様を時間を追って観察し、ゴルジ装置がかつて網目状構造であるとか、管状構造であると報告されたことの違いを指摘している。

このように生きた細胞のゴルジ装置を位相差顕微鏡下に捕え、しかもその細胞を長期間健全な状態で培養し続けることを可能にしたことは、PGF の生体内での機能、（恐らくは分泌・排出）を研究する道を開拓したものとして高く評価される。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。