

研究速報 ラット単離腺房における電顕オートラジオグラフィーを用いた  
プロテアーゼインヒビター (E3123) の動態の解析

大谷 泰一 跡見 裕 黒田 慧 新海 宏  
佐田 尚宏 武藤徹一郎 赤尾 周一\*

はじめに：われわれは、コラゲナーゼ消化法により作成したラット膵単離腺房における電顕オートラジオグラフィーの手法を用い、合成プロテアーゼインヒビターの細胞内動態を解析したので報告する。

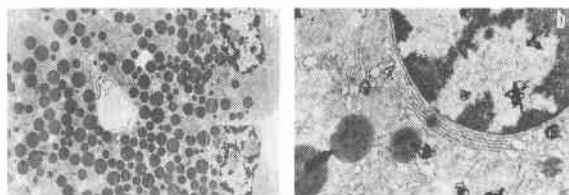
対象と方法：まず Williams ら<sup>1)</sup>の方法に準じ、Wistar 系雄性ラットを用い膵単離腺房を作成した。プレインキューベーション後、単離腺房をトリチウムラベルした<sup>3</sup>H-E3123を含有する Tris Ringer 溶液に浮遊し、セルレインで刺激する。任意の時間で冷却し反応を停止させ、遠沈をおこない pellet を採取。準 Karnovsky 溶液にて室温で12時間固定後、2%OsO<sub>4</sub>溶液にて4℃で2時間固定し、エタノールにて脱水後、遠沈管内でエポキシ樹脂に包埋した。pellet はごくわずかなため、樹脂を遠沈管から取り出し、先端の pellet の部分をのこぎりで切断後、ダイヤモンドナイフで薄切りし、銅グリッドに採取した。uranyl acetate で20分染色後、carbon 蒸着し、ワイヤーループ法にて乳剤を一層に塗布した。4℃で4週間放置後、20℃で3分間現像し、3分間定着した。レイノルズ鉛で20秒間染色し、電子顕微鏡にて grain を観察した。なお E3123は、分子量508.58dalton の合成プロテアーゼインヒビターでグアニジノ基が結合するベンゼン環を、トリチウムでラベルし用いた (50Ci/mmol)。

結果：単離腺房は電顕上形態学的異常を認めなかった (Fig. 1a)。単離腺房をプレインキューベーション後、medium に<sup>3</sup>H-E3123 10<sup>-6</sup>M を添加し、セルレイン 10<sup>-6</sup>M で4分間刺激すると、細胞全体に radioactivity が認められた (Fig. 1b)。

考察：電子顕微鏡の医学における貢献は計り知れないものがあり、とくに Jamieson ら<sup>2)</sup>によっておこなわれた電顕オートラジオグラフィーは、膵スライスモデルを用い、腺房細胞内における膵消化酵素の合成・輸

Fig. 1 a: This figure shows normal acinar morphology prior to incubation. Original magnification ×3,000.

b: Isolated pancreatic acini to which <sup>3</sup>H-E3123 had been administered before 4 min of stimulation with 10<sup>-6</sup>M cerulein. Silver grains of E3123 are evident over the nucleus, Golgi apparatus and zymogen granules. Original magnification ×6,000.



送過程を明らかにしたことで、画期的なことであった。より純粋な in vitro モデルである膵単離腺房における電顕オートラジオグラフィーを用いることで、合成プロテアーゼインヒビターなど細胞外液のエステラーゼにより容易に分解されてしまう物質の経時的動態・細胞内分布を検討することが可能となり、その作用機序・作用部位の解明に道を開くことが期待される。

本文の要旨は第39回日本消化器外科学会総会 (平成4年2月20日, 神戸) にて発表した。

Key word: isolated pancreatic acini

文献: 1) Williams JA, Korc M, Dormaer RL: Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. Am J Physiol 235: 517-524, 1978 2) Jamieson JD, Palade GE: Intracellular transport of secretory proteins of the pancreatic exocrine cell II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. J Cell Biol 34: 597-615, 1967

Analysis of Intracellular Movement of Synthetic Protease Inhibitor (E3123) by Electronmicroscopic Autoradiography of Rat Isolated Pancreatic Acini

Taiichi Otani, Yutaka Atomi, Akira Kuroda, Hiroshi Shinkai, Naohiro Sata, Tetsuichiro Muto and Shuichi Akao\*  
First Department of Surgery, University of Tokyo. Department of Surgery, Koshigaya Hospital of Dokkyo University\* <1993年7月7日受理> 別刷請求先: 大谷泰一 〒113 文京区本郷7-3-1 東京大学医学部第1外科