

ラット卵巣に対する Human Chorionic Gonadotropin 集積動態の光学顕微鏡並びに電子顕微鏡 radioautography による観察

川崎医科大学 産婦人科学教室
(主任: 小川重男教授)

河 本 義 之
(昭和59年9月4日受付)

Studies on Human Chorionic Gonadotropin Accumulation to Rat's Ovary by Light-and Electron-microscopic Radioautographies

Yoshiyuki Komoto

Department of Obstetrics and Gynecology
Kawasaki Medical School

(Accepted on September 4, 1984)

Human Chorionic Gonadotropin (hCG) の卵巣集積動態の詳細を形態学的に検討する目的で Sprague Dowly 系 (S. D. 系) 正常成熟雌ラットと疑妊娠状態とした同ラット ^{125}I 標識 hCG (^{125}I -hCG) を投与し, その卵巣各組織細胞成分における hCG 分布を光学顕微鏡, 並びに電子顕微鏡 radioautography にて観察を行い, 以下の結果を得た.

1. ラット尾静脈より ^{125}I -hCG を投与し, 一定時間後に卵巣を摘出し, 摘出卵巣の ^{125}I 放射活性を測定, 卵巣湿重量 mg あたりの ^{125}I -hCG 集積状態 (CPM/mg tissue weight) を検討してみると, 性周期 estrus 1 期の正常卵巣, 疑妊娠ラット卵巣いずれにおいても, ^{125}I -hCG 投与後2時間から6時間にかけて ^{125}I 放射活性高値が見られた.

2. ラット尾静脈より ^{125}I -hCG を投与後摘出した卵巣の光学顕微鏡 radioautography によれば ^{125}I -hCG の存在を示す銀粒子は非妊娠成熟ラット性周期 estrus 1 期の卵巣二次卵胞の莢膜細胞, 間質の一部に多く見られ, 疑妊娠ラット卵巣では黄体に多量, 間質に少量見られた. ^{125}I -hCG 投与後2時間から6時間の各時点で上述の細胞に多く銀粒子が見られ, 12時間後に銀粒子はほとんど消失した.

3. ラット尾静脈より ^{125}I -hCG を投与後摘出した卵巣の電子顕微鏡 radioautography を作製, 観察, ^{125}I -hCG の存在を示す銀粒子が細胞内小器官のいずれに所属するかの判定は Salpeter らの判定法に従い, 細胞内小器官の面積測定は点計数面積計測法によって行い, 銀粒子の分布状態を検討した. 非妊娠成熟ラット性周期 estrus 1 の卵巣二次卵胞では ^{125}I -hCG 投与後2時間と6時間の時点で莢膜細胞細胞膜に, 又, 疑妊娠ラット卵巣では黄体細胞細胞膜, 微絨毛に有意に銀粒子が認められた. 前者の顆粒膜細胞にも銀粒子は認められたが, back ground silver grains と有意な差は認められなかった. 細胞膜, 微絨毛以外の細胞内小器官にも銀粒子は認められたが, 有意に認められると判定されたものはなかった. 又, 両時点での各細胞小器官における銀粒子の増減も見られなかった.

4. hCG の細胞内 internalization については、現在これを肯定する報告もあるが、本検索では各細胞内小器官に銀粒子の存在を思わせる所見はあるものの、統計学的に有意な存在の確証は乏しく、今後の課題と考えられた。

For the purpose of clarifying the dynamics of hCG accumulation to the ovary morphologically, ^{125}I -hCG was administered to Sprague-Dowly normal mature and pseudopregnant rat's tail vein and the detailed distribution of ^{125}I -hCG in cells and intracellular organelles were investigated by light and electron-microscopic radioautographies and the results described flow were obtained.

1. Radioactivity in the ovaries after injection of ^{125}I -hCG showed the higher values during 2hrs. and 6hrs. in both of normal rats in the estrus 1 and pseudopregnant rats.

2. The silver grains by light microscopic radioautography were observed prominently in theca cells and stromal cells of the ovary in normal rat and prominently in luteal cells, in small number in stromal cells in pseudopregnant rat. The localization of silver grains continued in the same finding during 2hrs. and 6hrs. and the silver grains were observed a little 12hrs. after the injection.

3. The silver grains by electron microscopic radioautography, in which the evaluation of the organelles silver grains were localized was carried out with the method by Salpeter et al. and the planimetry of cells and organelles was performed by the point counting planimetry method, were observed prominently only in plasma membrane of theca cells of secondary follicle in normal rat and in luteal cells and microvilli in pseudopregnant rat during 2hrs. and 6hrs. after the injection. The silver grains in granulosa cells in normal rat showed no significant difference from back ground silver grains. The silver grains in other organelles than plasma membrane and microvilli of both rats markedly less observed comparing the one in the latter.

4. As to the internalization of hCG into intracellular organelles reported by other authors, the evidence of internalization was not obtained by present investigation using statistic analysis of the grains, although the grains existed in the organelles, and further studies for it seemed necessary.

Key Words ① Human chorionic gonadotropin ② Ovary
③ Light and electron microscopic radioautographies

はじめに

Rajaniemi ら (1972)¹⁾ は ^{125}I 標識 luteinizing hormone (^{125}I -LH) が光学顕微鏡 radioautography により、妊娠ラットの黄体、非妊娠ラットの莢膜細胞に取り込まれる事を観察、 ^{125}I -LH を取り込んだラット黄体をショ糖密度

勾配遠心法により分画し、fraction number 7~13 に ^{125}I 放射活性が高い事を認め、この分画を電子顕微鏡で観察し、この部分が細胞膜からなる事を確認、LH が細胞膜に結合部位を持つ事を報告した。又、Ashitaka ら (1974)²⁾ は ^3H 標識 human chorionic gonadotropin (^3H -hCG) を疑妊娠 Parlow rat³⁾ に投与し、

光学顕微鏡 radioautography により ^3H -hCG が黄体細胞細胞膜周囲に存在する事を述べている。この後ゴナドトロピン結合部位について多くの研究が報告されており、教室中山 (1982)⁴⁾ も hCG の性腺集積性の動態につき詳細に報告している。今回、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡 radioautography によりその卵巣内集積部位の形態学的検討を行ったので報告する。

研 究 方 法

1) hCG の標識化

ヒト尿より抽出された hCG (帝国臓器, Lot No. 46 H-2-H, 生物活性 10337 IU/mg) 5 μg を dimethyl sulfoxide にて chloramin T の作用をコントロールした, DMSO-chloramin T 法⁵⁾⁶⁾ により ^{125}I を 1 mCi 加え, 標識を行った。次にヒト血清 albumin 50 mg で前処理した sephadex G50 の column gel chromatography により ^{125}I -hCG の溶出ピークを採取使用した。この方法により得られた ^{125}I -hCG の specific activity は $58.52 \pm 13.89 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (mean \pm S.D.), 抗 hCG 抗体過剰 (1:1000 倍希釈) による抗原抗体結合率は $72.575 \pm 2.987 \%$ であった。

2) 使用動物、及び検索方法

S. D. 系非妊娠成熟雌ラット (8~11 週齢), 小山, 中尾らの分類⁷⁾ による性周期 estrus 1 期と判定したものに上述の ^{125}I -hCG を尾静脈より注入し, 注入後 30 分, 2 時間, 6 時間, 12 時間の各時点にエーテル麻酔下にて急速脱血, 屠殺し, 卵巣を採取, 生理食塩水で洗浄後湿重量を測定, ^{125}I 放射活性を well type γ -scintillation counter (Packard 5320) にて測定した。その後, 摘出卵巣の光学顕微鏡及び, 電子顕微鏡 radioautography 用の標本を作製した。又, 同じ S. D. 系未熟ラット (5 週齢) に対し, pregnant mare's serum gonadotropin (帝国臓器, SEROTOROPIN®) 50 IU を皮下注射し, 56 時間後 hCG (持田製薬, HCG モチダ) 25 IU を皮下注射し, 疑妊娠ラット⁸⁾ を作製した。そして hCG を皮下注射後 6 日目にこれらラットに対し前記非妊娠成熟雌ラット

同様に ^{125}I -hCG を尾静脈より注入し, 各時間に屠殺, 卵巣を摘出, 湿重量, ^{125}I 放射活性を測定後に光学顕微鏡, 電子顕微鏡 radioautography 用標本を作製した。

尚, 非妊娠, 疑妊娠ラットに対し, ^{125}I -hCG に加えて非標識の hCG (帝国臓器, Lot No. 46 H-2-H) 5 μg を尾静脈より注入し, 投与後 6 時間の時点で卵巣を摘出, 電子顕微鏡 radioautography 用標本を作製, ^{125}I -hCG のみ投与した例に比べ銀粒子が減じている事よりこの銀粒子が ^{125}I -hCG 存在部位を示す事を確認した。

3) 光学顕微鏡 radioautography 用標本の作製⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾

摘出卵巣を中性緩衝ホルマリンにて 6 時間~24 時間固定後, 水洗, 70%~90% エタノールにて脱水, ベンゼンで脱アルコール後, パラフィン包埋を行い, Jung 型 microtome にて 5~10 μm に薄切, 切片を載物ガラス上に載せ, キシレンにて脱パラフィンの後, radioautography 用乳剤 NR-M₂ (小西六, 1.5 倍希釈, 45°C) を dipping 法にて被覆し, 冷暗所で 2~3 週間露出, コニドール X (小西六, 20°C, 4 分) で現像, 1% 酢酸にて停止後, コニフィックス (小西六, 20°C) にて定着, Hematoxylin-Eosin 染色を行い, 脱水, パルサム封入し観察を行った。暗室操作中の安全光の条件はレントゲン用暗室ガラスに 10W の電球, 距離 1 m とした。dipping 法により得られる乳剤の厚さは 3~5 μm である。尚, 固定から包埋までの標本作製過程において ^{125}I 放射活性を測定し, その減衰を検討した。

4) 電子顕微鏡 radioautography 用標本の作製⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾

摘出卵巣を細切後, 2% glutaraldehyde-リン酸緩衝液 (pH. 7.2~7.6) で 6 時間前固定, リン酸緩衝液にて洗浄の後, 1% Osmium 酸-リン酸緩衝液にて 2 時間後固定を行い, リン酸緩衝液で再び洗浄, 70%~100% エタノールで脱水, エポキシ樹脂 Epon 812 (TAAB) にて包埋を行い, ガラスナイフを ultramicrotome (Porter-Blum, MT-1) にとりつけ, 60~150 nm

の薄切切片を得た。各切片をグリッド上に載せた後、酢酸ウランにて電子染色を行い、radioautography 用乳剤 NR-H₂ (小西六, 15倍希釈, 45°C) を touch 法にて被覆、標本上に銀粒子が単層、一様に並んでいる事は乳剤被覆乾燥直後電子顕微鏡にて観察、確認した。5週間冷暗所にて露出の後、コニドール X (20°C, 3.5分)にて現像、1%酢酸にて停止、コニフィックス (20°C)にて定着、脱ゼラチンを兼ねてクエン酸鉛にて染色、水洗後に電子顕微鏡 (日立, HS-9)にて観察、写真撮影を行った。暗室操作中の条件は光学顕微鏡 radioautography 作製時と同様とした。又、前固定から Epon 812 包埋までの各過程における ¹²⁵I 放射活性を測定し、その減衰を検討した。

5) 電子顕微鏡 radioautography 標本の所見判定法⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

非妊娠成熟ラット、疑妊娠ラット共に尾静脈より ¹²⁵I-hCG 投与後2時間と6時間の時点で卵巣を摘出、電子顕微鏡 radioautography 標本作製し所見の判定を行った。

前述の方法で作製した標本を電子顕微鏡下に直接倍率3000倍~7000倍で写真撮影し、ネガフィルムをさらに20000倍まで拡大焼付し、銀粒子の各細胞内小器官への所属判定、各細胞内小器官の面積測定を行った。

Salpeter ら(1969)⁽¹⁷⁾が銀粒子の中心より半径1500Åの範囲内に50%の確率でその線源が存在する事を (half distance), 又 Caro(1962)⁽¹⁸⁾が半径2250Åの範囲内に95%の確率でその線源が存在すると述べているのに従い、透明プラスチック板上に半径4.5mmの円を描き、その中心を銀粒子の中心に重ね、この円に含まれる細胞内小器官を線源存在部位とした。円内に細胞内小器官が二つあれば銀粒子1/2ずつをその所属部位と判定した。

各細胞内小器官の面積測定は点計数面積計測法によった。すなわち、20000倍に拡大した写真上に1cm等間隔に線を引いた透明プラスチック板製の方眼 (一方眼格子は0.25μm²) を重ね、方眼中心に水性サインペンで点を打ち、点が細胞内小器官に入れば方眼一ヶ分の面

積とし、外に出れば切り捨て、近似的に面積を求めた。

この様にして求めた一細胞あたりに各細胞内小器官が占める面積割合と、実際に count された一細胞あたりの銀粒子数から、一細胞内の各細胞内小器官に集まるべき銀粒子の期待値 (g exp) を求め、これと実際に各細胞内小器官に所属すると判定された銀粒子数 (g) とを平均値の差の検定を行い、比較検討した。尚、面積を測定した各細胞内小器官は plasma membrane (PM), microvilli (Mv), micro-pinocytotic vesicle (Mic), lysosome (Ly), mitochondria (M), Golgi complex (G), endoplasmic reticulum (ER), lipid (Li), nucleus (N), cytoplasm (C) とした。

さらに ¹²⁵I-hCG 投与後2時間、6時間の各時点において各細胞内小器官単位面積あたりの銀粒子数 (g/s./μm²) を算出し、両時点の間に銀粒子の増減があるかどうかを同じく平均値の差の検定を行い検討した。

CPM (×10³/mg tissue weight)

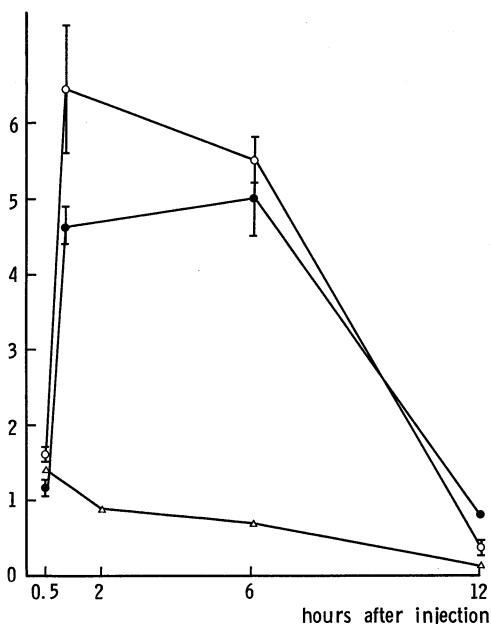


Fig. 1. Time course of accumulation of ¹²⁵I labelled hCG normal ovary (○—○), pseudopregnant ovary (●—●), blood level (△—△).

以上の操作を一標本あたり 10 枚の写真につき、計 50 枚に対して行った。

結 果

1) ^{125}I -hCG の経時的な卵巢集積動態

非妊娠時、疑妊娠時共に卵巢湿重量 mg あたりの ^{125}I 放射活性は ^{125}I -hCG 投与後 2 時間から 6 時間の間 4000 CPM/mg tissue weight 以上の高値を持続した。そして 12 時間後には 1000 CPM/mg tissue weight 以下へ低下した (Fig. 1)。

2) 光学顕微鏡 radioautography 標本所見

(1) 光学顕微鏡 radioautography 標本作製の各過程中最も ^{125}I 放射活性の低下が認められたのは固定後の水洗の段階であったが、最終的にパラフィン包埋時 ^{125}I 放射活性の、新鮮標本採取時 ^{125}I 放射活性に対する比は 95.83 ±

1.04 % (n=6) が維持されていた。

(2) ^{125}I -hCG 投与後 30 分、2 時間、6 時間、12 時間の各時点において卵巢を摘出、標本作製、観察を行ったが、非妊娠成熟ラット estrus 1 期の卵巢において銀粒子は、投与後 2 時間、6 時間の時点で、二次 卵胞莢膜細胞 (theca cell)、間質 (stroma) に多く見られた。12 時間後の摘出卵巢では銀粒子が著明に減じており、 ^{125}I 放射活性の変化 (Fig. 1) と同様の減衰動態が認められた (Fig. 2)。

疑妊娠ラット卵巢においては ^{125}I -hCG 投与後 2 時間、6 時間の各時点に黄体細胞 (luteal cell) に銀粒子が多く見られ、間質にも少量認められた。そして 12 時間後の摘出卵巢では銀粒子が減少しているのが認められた (Fig. 3)。これも ^{125}I 放射活性の変化 (Fig. 1) と同様の減衰動態が認められた。

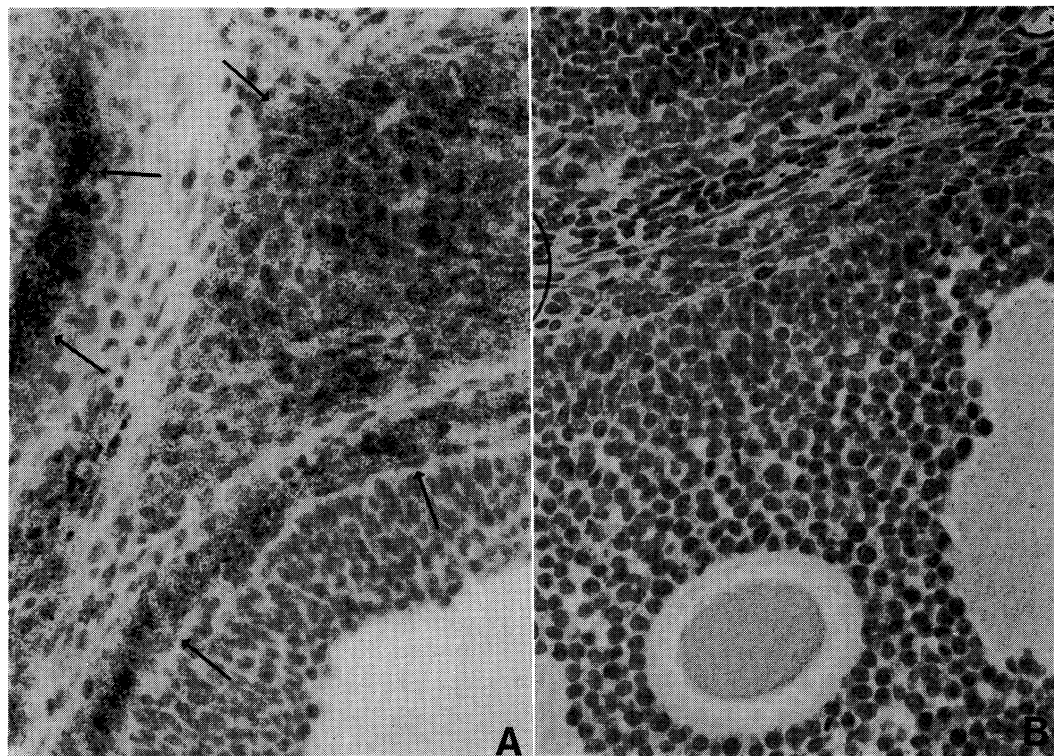


Fig. 2. A light microscopic radioautography showed theca cell and stromal cell with prominent silver grains. [normal Rat ovary]

A: 2 hours after ^{125}I -hCG injection

B: 12 hours after ^{125}I -hCG injection

(×200 H. E. staining)

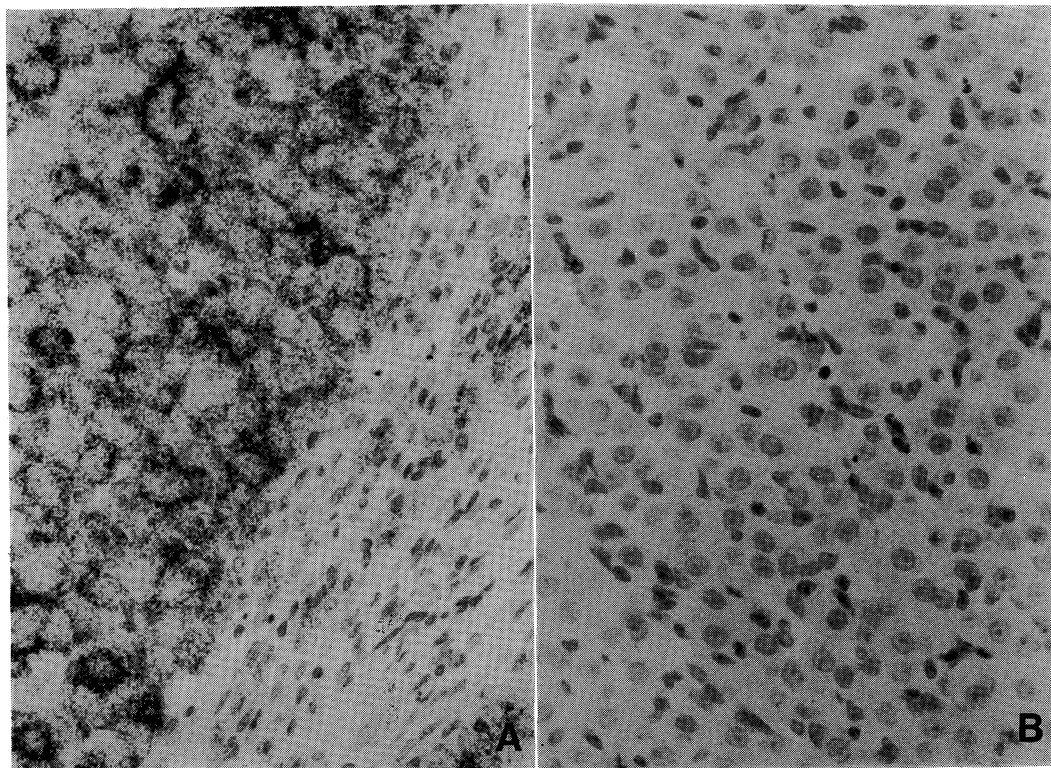


Fig. 3. A light microscopic radioautography showed luteal cell with prominent silver grains. [pseudopregnant Rat ovary]

A: 2 hours after ^{125}I -hCG injection B: 12 hours after ^{125}I -hCG injection
($\times 200$ H.E. staining)

Table 1. Distribution of observed and expected grains among the different subcellular organelles of a theca cell 2 and 6 hours after injection of ^{125}I labelled hCG. (mean \pm SD) [normal Rat ovary]

	2h n=50			6h n=50			6h n=50	
	g	g exp	g/s ($/\mu\text{m}^2$)	g	g exp	g/s ($/\mu\text{m}^2$)	g	g/s ($/\mu\text{m}^2$)
PM	18.9 \pm 1.5951	3.5121 \pm 0.4932	2.3705 \pm 0.3791	18.2 \pm 1.229	3.3481 \pm 0.3460	2.2529 \pm 0.1694	6.7 \pm 1.5670	0.8282 \pm 0.1595
Mic	0	0.1633 \pm 0.0774	0	0	0.1646 \pm 0.0702	0	0	0
Ly	0	0.1177 \pm 0.0245	0	0	0.1349 \pm 0.0531	0	0	0
M	0.1 \pm 0.2108	1.1549 \pm 0.1317	0.0382 \pm 0.0806	0.1 \pm 0.2108	1.11 \pm 0.1407	0.0212 \pm 0.0531	0.05 \pm 0.1581	0.02 \pm 0.0632
G	0	0.1925 \pm 0.0776	0	0	0.156 \pm 0.0778	0	0	0
ER	0	0.1724 \pm 0.0732	0	0	0.2264 \pm 0.0652	0	0	0
Li	0	0.2399 \pm 0.0754	0	0	0.2595 \pm 0.0621	0	0	0
N	0.05 \pm 0.1581	7.3849 \pm 0.7960	0.003 \pm 0.0095	0.1 \pm 0.2108	7.0644 \pm 0.4793	0.006 \pm 0.0126	0	0
C	0.25 \pm 0.3536	6.3671 \pm 0.7663	0.0167 \pm 0.0233	0.1 \pm 0.2108	6.033 \pm 0.4499	0.0067 \pm 0.0141	0.05 \pm 0.1581	0.0036 \pm 0.0114
Total	19.3 \pm 1.7670		0.4345 \pm 0.0460	18.5 \pm 1.2472		0.4132 \pm 0.0271	6.8 \pm 1.6865	0.1593 \pm 0.0367
injection	^{125}I -hCG (60.5 \pm 0.71 μCi)			^{125}I -hCG (60.0 \pm 0 μCi)			^{125}I -hCG (57.0 \pm 1.41 μCi) + hCG 5 μg	
CPM	5289.53 \pm 802.36 CPM/mg tissue			5535.53 \pm 362.34 CPM/mg tissue			2396.65 \pm 82.61 CPM/mg tissue	

background silver grains: 0.0063 \pm 0.0041 $/\mu\text{m}^2$

back ground silver grainsは0~4/HPFであった。しかしながら光学顕微鏡 radioautography 標本においては銀粒子を count し、その所在を統計的に処理する事は困難であった。

3) 電子顕微鏡 radioautography 標本所見

(1) 前固定から包埋までの電子顕微鏡 radioautography 標本作製の各過程中、最も ^{125}I 放射活性が低下したのは前固定後の洗浄の時であったが、包埋時の ^{125}I 放射活性は新鮮卵巣摘出時のその 85.88 \pm 2.35% (n=6) であった。

(2) 非妊娠成熟ラット性周期 estrus 1期の卵巣二次卵胞の莢膜細胞における銀粒子の各細胞内小器官への分布、 ^{125}I -hCG 投与量、包埋時の ^{125}I 放射活性を **Table 1** に示した。すなわち、 ^{125}I -hCG 投与後2時間、6時間の各時点において一細胞内の各細胞内小器官に観察された銀粒子数 (g) が期待値 (g exp) よりも有意に見られると判定された部位は plasma membrane (PM) のみであった (危険度 $\alpha=0.01$)。又、各細胞内小器官において ^{125}I -hCG 投与後2時間、6時間の両時点の間で単位面積あたりの銀粒子数 (g/s) が有意に増減を示したものはなかった ($\alpha=0.01$)。この場合 ^{125}I -hCG 投与量に有意な差は認められていない ($\alpha=0.01$)。

尚、 ^{125}I -hCG に加えて非標識 hCG 5 μg を投与すると銀粒子は **Table 1** の如く減少しており、銀粒子の存在部位が ^{125}I -hCG の存在部位である事が確認された。

次に、 ^{125}I -hCG 投与後6時間の時点での同卵巣二次卵胞顆粒膜細胞への銀粒子の分布状態を **Table 2** に示した。一顆粒膜細胞全体の単位面積あたりの銀粒子数は $0.0095 \pm 0.0161/\mu\text{m}^2$ にすぎず、これは back ground silver grains $0.0063 \pm 0.0041/\mu\text{m}^2$ と有意な差は認められなかった ($\alpha=0.01$)。又、一莢膜細胞あたりの銀粒子数 $0.4132 \pm 0.0271/\mu\text{m}^2$ の2%程度にすぎなかった。

莢膜細胞 (Th) は膨化、大型化した mitochondria (M), lipid (Li) に富んでおり細胞膜周囲に多くの糸くず状銀粒子を持っていた

Table 2. Distribution of observed grains among the different subcellular organelles of a granulosa cell 6 hours after injection of ^{125}I labelled hCG (mean \pm SD). [normal Rat ovary]

	g	g/s ($/\mu\text{m}^2$)
PM	0.3 \pm 0.4830	0.0296 \pm 0.0477
Mic	0	0
Ly	0	0
M	0	0
G	0	0
ER	0	0
Li	0	0
N	0.1 \pm 0.3162	0.004 \pm 0.0126
C	0.05 \pm 0.1581	0.005 \pm 0.0158
Total	0.45 \pm 0.7619	0.0095 \pm 0.0161

background silver grains: $0.0063 \pm 0.0041/\mu\text{m}^2$
n=50

が、顆粒膜細胞 (Gr) は莢膜細胞の様に mitochondria は膨化せず、lipid も見られなかった (**Fig. 4**)。

疑妊娠ラット卵巣黄体細胞の各細胞内小器官への銀粒子の分布状態、 ^{125}I -hCG 投与量、包埋時 ^{125}I 放射活性を **Table 3** に示した。前述の莢膜細胞同様 ^{125}I -hCG 投与後2時間、6時間の各時点において観察銀粒子数 (g) が期待値 (g exp) により有意に増加していると判定されたのは plasma membrane (PM), microvilli (Mv) のみであった ($\alpha=0.01$)。又、各細胞内小器官において ^{125}I -hCG 投与後2時間、6時間の両時点の間に単位面積あたりの銀粒子数 (g/s) が有意に増減を示したものはなかった ($\alpha=0.01$)。

そして、 ^{125}I -hCG に加えて非標識の hCG 5 μg を投与した黄体細胞において銀粒子は減少しており、銀粒子の存在部位が ^{125}I -hCG の存在部位である事が確認された。back ground silver grains は $0.0096 \pm 0.0058/\mu\text{m}^2$ であった。

黄体細胞細胞膜表面は microvilli (Mv) に富み、mitochondria (M) は数が多く、膨化していた。そして、microvilli, plasma membrane 表面には多く糸くず状銀粒子が認められた (**Fig. 5, 6**)。

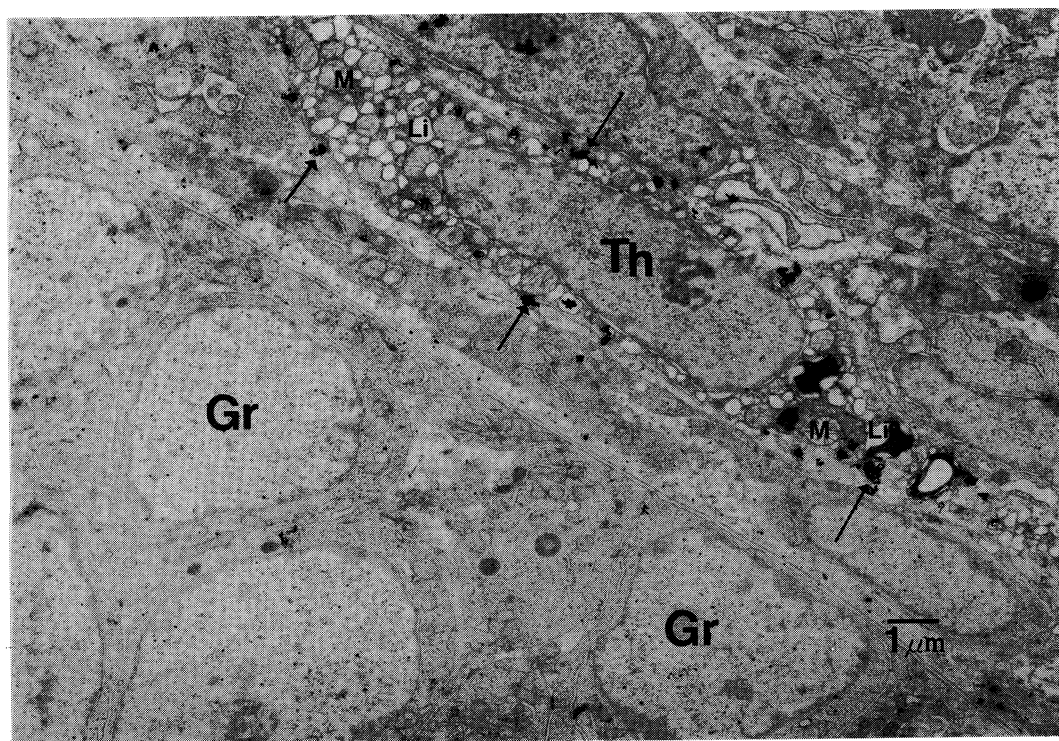


Fig. 4. Theca cell (Th) had many grains (arrows) on the plasma membrane, while granulosa cell (Gr) had only 3~4 grains on this photograph. ($\times 8400$, Uranyl & Lead staining) [normal Rat ovary]

Table 3. Distribution of observed and expected grains among the different subcellular organelles of a luteal cell 2 and 6 hours after injection of 125 I labelled hCG. (mean \pm SD) [pseudopregnant Rat ovary]

	2h n=50			6h n=50			6h n=50	
	g	g exp	g/s ($/ \mu m^2$)	g	g exp	g/s ($/ \mu m^2$)	g	g/s ($/ \mu m^2$)
PM&Mv	38.7 \pm 3.4007	4.6905 \pm 0.8437	3.1806 \pm 0.5487	35.2 \pm 2.6583	3.8771 \pm 0.7487	3.5206 \pm 0.6950	16.1 \pm 3.2813	1.7385 \pm 0.4283
Mic	0.1 \pm 0.3162	0.7816 \pm 0.3482	0.0364 \pm 0.1151	0.2 \pm 0.4216	1.1692 \pm 0.3045	0.0666 \pm 0.1404	0	0
Ly	0.05 \pm 0.1581	0.3074 \pm 0.1212	0.0667 \pm 0.2109	0	0.341 \pm 0.1209	0	0	0
M	0.8 \pm 0.4216	7.528 \pm 0.9427	0.0404 \pm 0.0226	0.7 \pm 0.4830	6.9885 \pm 1.1289	0.0391 \pm 0.0283	0.2 \pm 0.4216	0.0096 \pm 0.0202
C	0	0.6374 \pm 0.3290	0	0	0.7781 \pm 0.2785	0	0	0
ER	0.1 \pm 0.3162	1.1907 \pm 0.4833	0.0444 \pm 0.1404	0.1 \pm 0.3162	1.3371 \pm 0.4043	0.0267 \pm 0.0844	0	0
Li	0.1 \pm 0.3162	1.4245 \pm 0.3119	0.0222 \pm 0.0702	0.2 \pm 0.4216	1.3835 \pm 0.3063	0.065 \pm 0.1415	0	0
N	0.2 \pm 0.6325	10.6359 \pm 1.5593	0.0057 \pm 0.0018	0.1 \pm 0.3162	8.3612 \pm 1.0922	0.0059 \pm 0.0186	0.1 \pm 0.3162	0.0041 \pm 0.013
C	1.0 \pm 0.8165	13.9934 \pm 2.5698	0.027 \pm 0.0238	1.0 \pm 0.8165	13.2634 \pm 1.2376	0.0278 \pm 0.0247	0.2 \pm 0.4216	0.0044 \pm 0.0109
Total	41.05 \pm 3.3867		0.3752 \pm 0.0375	37.5 \pm 2.7988		0.3836 \pm 0.0739	16.6 \pm 3.1693	0.1861 \pm 0.0399
injection	125 I-hCG (44.5 \pm 2.1213 μ Ci)			125 I-hCG (46.0 \pm 2.8284 μ Ci)			125 I-hCG (44.5 \pm 3.553 μ Ci) + hCG 5 μ g	
CPM	3924.13 \pm 312.13 CPM/mg tissue			4159.1 \pm 202.73 CPM/mg tissue			2600.93 \pm 126.23 CPM/mg tissue	

background silver grains: 0.0096 \pm 0.0058 $/ \mu m^2$

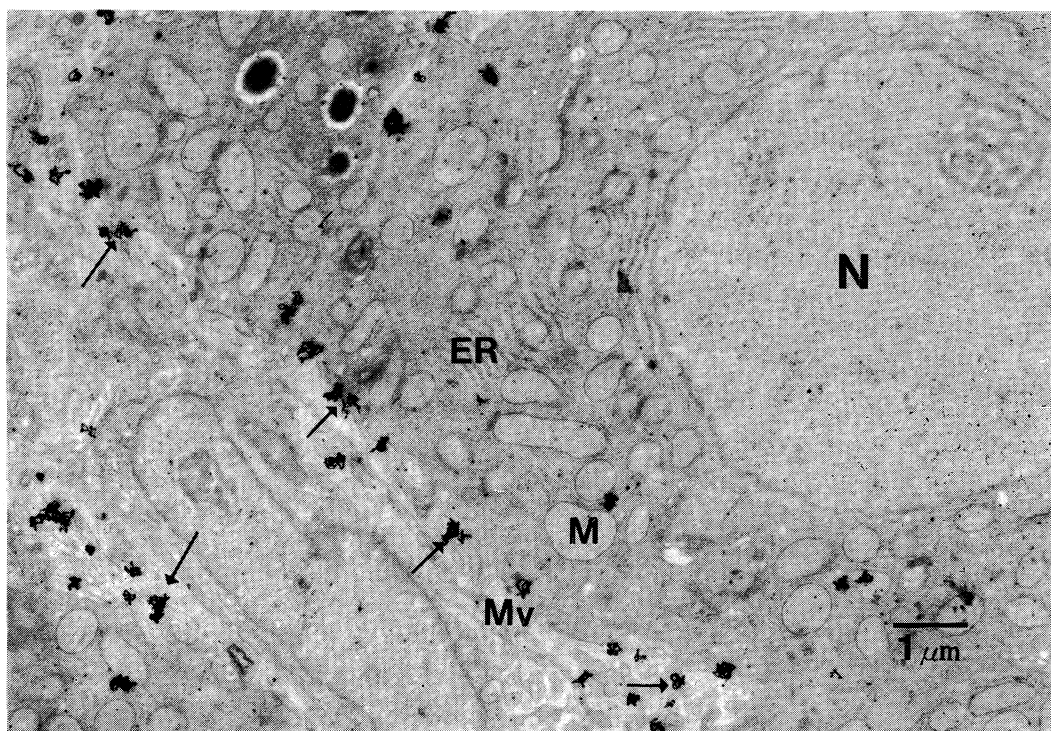


Fig. 5. Grains (arrows) were most prominent over the plasma membrane & the microvilli of the luteal cell. ($\times 12500$, Uranyl & Lead staining) [pseudopregnant Rat ovary]

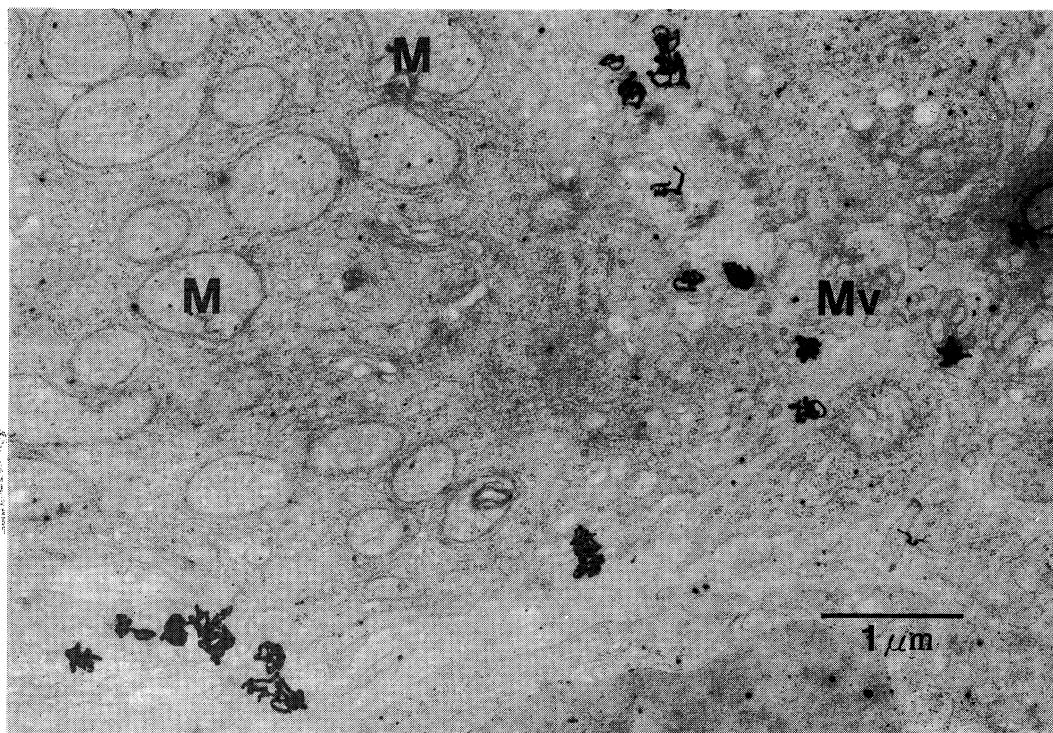


Fig. 6. An electron radioautography showed many villous projection of the surface plasma membrane, where most grains were present. ($\times 22500$ Uranyl & Lead staining) [pseudopregnant Rat ovary]

考 察

hCG のラット各臓器内集積については現在まで多くの報告が見られており、いずれも卵巣に多く集積する事が報告されている²⁾¹⁹⁾²⁰⁾。又、卵巣における ^{125}I -hCG の経時的な放射活性の変化も教室中山 (1982) の報告⁴⁾ があり、本検索においても ^{125}I -hCG 投与後2時間から6時間の間 ^{125}I 放射活性高値が見られた。

光学顕微鏡 radioautography による hCG のラット卵巣結合部についての諸家の報告¹⁾²⁾²¹⁾ はいずれも、hCG の存在を示す銀粒子は非妊娠成熟ラット卵巣の莢膜細胞、間質に、又、疑妊娠ラット卵巣の黄体細胞に多く存在する事を報告している。本検索においても、 ^{125}I 放射活性の時間的推移と同様に ^{125}I -hCG 投与後2時間、6時間の時点において上述の細胞に多く見られ、12時間後の時点では銀粒子は減じていた。

光学顕微鏡 radioautography はその切片の厚さが5~10 μm となり、内に含まれる放射性同位元素の量は多く、又、塗布する乳剤の厚さも3~5 μm となりその内に何層もの銀粒子を含んでいる。これに対して電子顕微鏡 radioautography は切片の厚さが60~150 nm、被覆する乳剤の厚さも70~100 nm で、銀粒子が単層に並んだ超薄層乳剤膜を電子顕微鏡用切片上にかける事が可能である⁹⁾¹⁴⁾。この様に両者の分解能には大きな差が見られ、厳密な銀粒子の存在部位の判定には電子顕微鏡 radioautography による観察が不可欠のものと思われた。本検索においても光学顕微鏡 radioautography において厳密に銀粒子の所属部位を判定、count し、それを統計的に処理する事は困難であった。

電子顕微鏡 radioautography による観察においては非妊娠成熟ラット卵巣二次卵胞の莢膜細胞、顆粒膜細胞を検索したが、現在まで莢膜細胞に対する hCG の結合部位を電子顕微鏡 radioautography により検索した報告は見られていない。本検索の所見では、 ^{125}I -hCG 投与後2時間、6時間の両時点において細胞膜に

のみ有意に銀粒子が認められ、又、両時点間での銀粒子の増減はいずれの細胞内小器官においても認められなかった。仲野 (1983)²²⁾ は LH、hCG は莢膜細胞と結合、steroidogenesis (ステロイド産生) に関与していると推察されると述べているが、本検索において銀粒子が多く細胞膜に存在した莢膜細胞に mitochondria の膨化等ステロイド産生細胞に特徴的な所見が見られた事は興味深い。

Kammerman ら (1972)²³⁾、Channing ら (1973)²⁴⁾ はブタ顆粒膜細胞に hCG が結合する事を報告し、特に一部が黄体化したと思われる卵胞の顆粒膜細胞に hCG の結合が多く見られると述べ、又、仲野ら (1983)²⁵⁾ は光学顕微鏡 radioautography によってブタ顆粒膜細胞の follicle stimulating hormone (FSH)、LH の結合部位について調べ、FSH は直径の小さい卵胞の顆粒膜細胞に多く結合し、これに対して LH は直径の小さい卵胞の顆粒膜細胞には見られず、直径の大きい卵胞の顆粒膜細胞に多く結合している事を述べ、FSH は folliculogenesis (卵胞発育) に、LH は成熟卵胞において黄体化した顆粒膜細胞と結合し、steroidogenesis に関与していると推測されるとしている。本検索において観察した非妊娠成熟ラット estrus 1期の卵巣二次卵胞顆粒膜細胞においては ^{125}I -hCG の存在を示す銀粒子は back ground silver grains 程度にしか認められなかった。これらの顆粒膜細胞は膨化大型化した mitochondria の出現、脂肪顆粒の出現、smooth surfaced endoplasmic reticulum の発達よりなる黄体化、ステロイド産生の所見も見られていなかった。卵胞の大きさは電子顕微鏡の視野範囲が狭いために卵胞全体の所見は得られなかったが、これら顆粒膜細胞の存在する卵胞は直径が小さく、成熟黄体化していないために顆粒膜細胞に銀粒子が多く見られなかったものと推測された。

疑妊娠ラット卵巣黄体細胞の hCG 結合部位を電子顕微鏡 radioautography により観察した報告²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾ は一致して細胞膜、微絨毛が結合部位である事を述べている。本検索におい

ても電子顕微鏡 radioautography による観察では ^{125}I -hCG 投与後2時間, 6時間いずれの時点においても黄体細胞細胞膜, 微絨毛のみが有意に銀粒子が存在する部位と判定された。

また, Conn ら (1970)³⁰⁾ は疑妊娠ラットに ^{125}I -hCG を投与, 電子顕微鏡 radioautography により投与後7時間の時点において多く細胞内へ銀粒子の internalization を認めると報告し, Han ら (1974)²⁶⁾ も疑妊娠ラットに ^{125}I -hCG を投与, 投与後1時間の時点で銀粒子の15%が細胞膜より $1\mu\text{m}$ 内の vesicle 中に見られ, 細胞内への取り込みを想定出来るとしている。又, Chen ら (1977)²⁹⁾ は羊に ^{125}I -hCG を投与, 黄体細胞を電子顕微鏡 radioautography により観察し, lysosome への銀粒子の取り込みが見られるとしている。これに対して, Anderson ら (1979)²⁷⁾ や, Markkanen ら (1980)²⁸⁾ は ^{125}I -hCG を疑妊娠ラットに投与電子顕微鏡 radioautography により黄体細胞を観察, 各細胞内小器官への銀粒子の分布を統計的に処理し, 黄体細胞細胞膜, 微絨毛のみが有意に銀粒子が存在する部位であると述べ, 又, 経時的に細胞内での銀粒子の増減が無い事を観察しており, 特に Markkanen らは internalization 自体はあっても少ないのではないかと述べ, 前述の見解との相違は実験動物の

差や, 疑妊娠状態が異なった stage にある事によるものではないかと述べている。本検索においても銀粒子の統計的な処理により有意に銀粒子が存在すると判定された部位は, 黄体細胞細胞膜と微絨毛のみであり, 又, ^{125}I -hCG 投与後2時間, 6時間の両時点においていずれの細胞内小器官においても銀粒子の有意な増減が見られない事は internalization の存在に対して否定的な見解と考えられた。このような見解の相違は先の Markkanen らの意見に加え, internalization や lysosome への取り込みを述べた報告に half distance の概念を導入した統計的処理を行っていないものが見られる事によるものと思われる。いずれにせよ hCG の結合部位が細胞膜である事は確認されたが, internalization の確実な確認は今後の検索に待たれるものと考えられた。

稿を終えるにあたり, 御懇切な御指導, 御校閲を賜りました川崎医科大学産婦人科学教室小川重男教授に深謝いたします。又, 終始貴重な御助言, 御助力を戴きました同教室中山雅人講師, 本学第Ⅱ解剖学教室大倉卓治教授, 本学組織・電子顕微鏡センター上平賢三主任技術員, 同須田泰司技術員を始め, 組織・電子顕微鏡センター, 並びに RI センター各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Rajaniemi, H. and Venha-Perttula, T.: Specific Receptor for LH in the Ovary. Evidence by Autoradiography and Tissue Fraction. *Endocrinology* 90: 1—9, 1972
- 2) Ashitaka, Y. and Koide, S. S.: In *Gonadotropin and Gonadal Function*, ed. by Moudgal, N. R. New York. Academic Press 1974, pp. 474—484
- 3) Parlow, A. F.: In *Human pituitary Gonadotropins*, ed. by Albert, A. Springfield, Thomas. 1961, pp. 300—310
- 4) 中山雅人: 性腺に対する Human Chorionic Gonadotropin 集積性の動態に関する研究. *川崎医学会誌* 8: 168—178, 1982
- 5) 奥村 一, 須藤忠満, 藤沢宗駿, 沢井政信, 早川 秀: HCG の免疫化学的測定法. *ホルモンと臨床* 26: 301—308, 1978
- 6) Stagg, B. H., Temperley, J. M., Rockman, H. and Morley, J. S.: Iodination and biological activity of gastrin. *Nature* 228: 58—59, 1970
- 7) 藤井儔子, 小山良修: 動物実験手技. 改訂第6版. 東京, 協同医書出版社 1975, pp. 159—169
- 8) さくらオートラジオグラフ用感光材料使用説明書, 小西六写真工業株式会社開発研究所

- 9) 水平敏知, 小西圭介, 平田 明, 進藤英世, 津屋 旭, 重松昭世, 内田和子, 二重作豊: オートラジオグラフィ—肉眼から電顕まで—。東京, 医歯薬出版。1979
- 10) 金城康人: 光学顕微鏡(ミクロ)によるオートラジオグラフィ—。細胞 11: 357—364, 1979
- 11) 串田 弘: 超薄切片法。東京, 文光堂。1971
- 12) 松本 明, 東 昇: 電子顕微鏡の研究の実際—生物学, 医学を中心として—。東京, 近代出版。1979
- 13) 水平敏知: 医学生物学用電子顕微鏡学。東京, 文光堂。1969, pp. 177—213
- 14) 永田哲士: 電子顕微鏡ラジオオートグラフィ—。電子顕微鏡 14: 36—46, 1979
- 15) 永田哲士: 顕微鏡の形態計測の原理と手技。細胞 8: 284—303, 1976
- 16) Salpeter, M. M., McHenry, F. A. and Salpeter, E. E.: Resolution in electron microscope autoradiography IV. Application to Analysis of Autoradiographs. J. Cell Biol. 76: 127—145, 1978
- 17) Salpeter M. M., Backmann, L. and Salpeter, E. E.: Resolution in electron microscope radioautography. J. Cell Biol. 41: 1—20, 1969
- 18) Caro, L. G.: High resolution autoradiography II. The problem of resolution. J. Cell Biol. 15: 189—199, 1962
- 19) Kazato, S. and Hershchysyn, M. M.: Tissue distribution of human chorionic gonadotropin. Am. J. Obstet. Gynecol. 106: 1229—1234, 1970
- 20) Rajaniemi, H. J., Hirshfield, A. N. and Midgley, A. R. Jr.: Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. I. Localization of LH binding sites by fractionation of subcellular organelles. Endocrinology 95: 579—588, 1974
- 21) 小林彌仁, 正田常雄, 三井 盤, 松尾 健, 都竹 理, 谷沢 修: Radioautography による ^{125}I -HCG のラット臓器内分布に関する研究。日産婦会誌 22: 405—406, 1970
- 22) 仲野良介: 臨床検査 MOOK No. 15. レセプタ。東京, 金原出版1983, pp. 35—44
- 23) Kammerman, S., Canfoeld, R. E., Kolena, J. and Channing, C. P.: The Binding of Iodinated HCG to Porcine Granulosa Cells. Endocrinology 91: 65—74, 1972
- 24) Channing, C. P. and Kammerman, S.: Characteristics of Gonadotropin Receptors of Porcine Granulosa Cells during Follicle Maturation. Endocrinology 92: 531—540, 1973
- 25) Nakano, R., Sasaki, K., Shima, K. and Kitayama, S.: Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptors on Porcine Granulosa Cells during Follicular Maturation. An Autoradiographic Study. Exper. Clin. Endocrinol. 81: 17—23, 1983
- 26) Han, S. S., Rajaniemi, H. J., Cho, M. I., Hirshfield, A. N. and Midgley, A. R.: Gonadotropin Receptors in Rat Ovarian Tissue. II. Subcellular Localization of LH Binding Sites by Electron Microscopic Radioautography. Endocrinology 95: 589—598, 1974
- 27) Anderson, W., Kang, Y-H., Perotty, M. E., Bramley, T. A. and Ryan, R. J.: Interactions of Gonadotropins with Corps Luteum Membranes. III. Electron Microscopic Localization of [^{125}I]-HCG Binding to sensitive and Desensitized Ovaries Seven Days after PMSG-HCG. Biol. Reprod. 20: 362—376, 1979
- 28) Markkanen, S. O. and Rajaniemi, H. J.: Role of Internalization and Degradation in the Removal of Receptor-Bound Human Chorionic Gonadotropin in Rat Luteal Cells in vivo, Endocrinology 107: 1153—1161, 1980
- 29) Chen, T. T., Abel, J. H. Jr., McClellan, M. C., Sawyer, H. R., Diekman, M. A. and Niswender, G. D.: Localization of gonadotropin hormones in lysosomes of ovine luteal cells. Cytobiologie 14: 412—420, 1977
- 30) Conn, P. M., Conti, M., Harwood, J. P., Dufau, M. L. and Catt, K. J.: Internalization of gonadotropin receptor complex in ovarian luteal cells. Nature 274: 598—600, 1978