

Clの濃度が低い結果となった。しかし、各サンプリング法の間で、定量値に大きな差はなかった。いずれの試料においてもサンプリング法によりスペクトルの結合エネルギーの値に違いは認められなかった。これらの結果か

ら、今回検討したサンプリング法により、リン酸カルシウムの化学状態は変化せず、定量性もサンプリング法の違いにより影響されないことが明らかとなった。

19. 共焦点レーザー顕微鏡によるヒト耳下腺培養細胞 (HSY cell) の細胞内カルシウム貯蔵部位のイメージング

○谷村 明彦¹⁾, 東城 庸介¹⁾, 松本 仁人¹⁾,
矢嶋 俊彦²⁾
(歯科薬理学講座¹⁾, 口腔解剖学第一講座²⁾)

様々な細胞機能の調節にカルシウムが関与する事が知られている。受容体刺激などによって生成されるイノシトール 3 リン酸 (IP₃) は、細胞内Ca²⁺貯蔵部位 (Ca²⁺ストア) のCa²⁺チャンネルを開きCa²⁺を細胞質に放出する。細胞内でCa²⁺ストアとして機能するオルガネラは小胞体であると考えられているが、機能的、形態的に異なるタイプのCa²⁺ストアが存在する可能性も指摘されている。本研究ではHSY cellを用いて、オルガネラ内のCa²⁺濃度の変化を解析する事により、Ca²⁺ストアとして機能するオルガネラの形態を解析する方法を確立したので報告する。

カバーガラス上で培養したHSY cellにカルシウム感受性蛍光色素mag-fura-redを取り込ませた後、細胞膜をサポニン (70μg/ml) で穿孔し細胞質中の蛍光色素を除去した。穿孔細胞をIP₃ (10μM) で刺激し、オルガネラ

内のmag-fura-redの蛍光強度の変化を共焦点レーザー顕微鏡 (TCS4D) を用いて解析した。

IP₃は核膜腔と細胞質全体に分布する網状のオルガネラ内に取り込まれたmag-fura-redの蛍光強度を増加させた。Mag-fura-redはCa²⁺濃度の低下により蛍光強度が増加する色素である事から、これらのオルガネラはIP₃によってCa²⁺を放出するCa²⁺ストアであると考えられた。この網状のオルガネラは、非特異的オルガネラ・プローブ (DiOC₆) で染色されたが、MitoTracker-green (ミトコンドリア・プローブ) や、BODIPY-ceramide (ゴルジ体・プローブ) では染色されなかった。また電子顕微鏡による観察から、これが小胞体である事が明らかにされた。これらの結果からHSY cellでは核膜腔と小胞体全体がIP₃感受性Ca²⁺ストアとして機能する事が明らかにされた。

20. 細胞外カルシウム濃度がヒト骨芽細胞のBMPsの遺伝子発現に及ぼす影響

○高橋 香苗, 中出 修, 賀来 亨
(口腔病理学講座)

〈目的〉近年、細胞外カルシウムの上昇はヒト骨芽細胞の増殖を促進させ、その作用機序の一部はIGF-IIのup-regulationを介したものであることが報告されている。しかしながら、他の因子に及ぼす影響については未だ解明されていない。本研究は細胞外カルシウム濃度がヒト骨芽細胞のBMPs (Bone Morphogenetic Proteins) の遺伝子発現に及ぼす影響について調べた。

〈方法〉1. 細胞はヒト下顎骨由来正常骨芽細胞 (HOB-M) を用いた。2. 細胞外カルシウム濃度の上昇 (CaCl₂・0~1.2mM) がHOB-Mの細胞増殖に及ぼす影響を [³H] thymidineの取り込みを指標とした細胞増

殖アッセイにより検索した。3. 同様に細胞外カルシウム濃度がHOB-Mの細胞アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性に及ぼす影響を濃度依存性に調べた。4. 同様に細胞外カルシウム濃度がHOB-MのBMPs (BMP-1~7) のmRNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により、時間依存性 (0.5, 24h) に調べた。

〈結果〉1. 0.1~1.2mMの細胞外のCaの上昇は [³H] thymidineの取り込みを有意に増加させたがALP活性を刺激する効果は認められなかった。2. 細胞外のCaの上昇 (最適濃度0.1~0.4mM) は0.5hおよび24hにおいてBMP-2, -4, -5のmRNAの発現を著しく増加させ