

氏名(本籍)	三浦浩史(熊本県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	甲第75号
学位授与の番号	学位規則第3号第2項該当
学位論文の要件	胎生期ならびに離乳前後のウシ耳下腺の発達に関する機能形態学的研究
論文審査委員	(主査) 鹿野 胖 (副査) 浅利 昌男 有 嶋 和 義 藤 谷 英 男 阿 部 又 信

論文内容の要旨

反芻家畜の消化器官は他の動物と比較すると、食餌性の影響によると考えられる特殊な構造をしており、分画胃から更に進化したと見られる複合胃(反芻胃)を持つことは周知の通りである。反芻胃のほぼ8割の容積を持つ第一胃は主に微生物による線維質の連続的かつ盛んな発酵が行われているため、唾液腺分泌物である唾液が第一胃消化作用に果たす役割は当然ながら非常に大きなものとなる。本研究は、主要な唾液腺の一つである耳下腺に着目して、この形態学的成熟と機能的成熟について複数の手法を用いて総合的に検討したものである。

まず、耳下腺の発達に伴う形態学的特徴を調べる目的で、胎生期間中のいかなる時期に未分化上皮細胞が腺上皮細胞(以下腺上皮と称す)と導管系上皮細胞(以下導管上皮と称す)に分化し始め、どのような特徴を示すようになるかを研究した。これらについては主に組織細胞学的方法による光学および走査型、透過型電子顕微鏡を、さらにレクチン組織化学的方法を用いて検討した。次に、耳下腺の発達に伴う機能的成熟を調べる目的で、炭酸脱水酵素(以下CAと称す)の発現する時期について、CAアイソザイムを用いて免疫組織化学的に検討した。

1. 耳下腺の形態学的変化

胎生前期(推定胎齢3ヶ月頃)の上皮細胞は形態学的には未だ未分化な所見を呈しており、腺上皮に先立ち徐々に筋上皮細胞が確認された。またその後、腺上皮や導管上皮への分化の開始が認められた。胎生中期の後半頃(推定胎齢6ヶ月から7ヶ月にかけて)から上皮系細胞の急速な発達が観察され腺上皮には中性粘液多糖類と思われる分泌顆粒が多数認められた。さらに、出生直後になると腺上皮の分泌顆粒が徐々に消失し始め、離乳期を挟んでその前後の頃にはその顆粒は殆ど認められなくなっていた。また、導管上皮では線条導管が初めて哺乳期の時期に確認され、導管上皮の形態学的な完成が認められた。すなわち、耳下腺上皮細胞の形態学的成熟は出生時までと、それに続く離乳期までの時期に起きることが認められた。これ以降、耳下腺上皮細胞は量的発達を続けるが、成牛の耳下腺と基本構造は同一のものであった。

2. ウシ耳下腺における複合糖質のレクチン結合能の変化

耳下腺の腺上皮および導管上皮の形態学的分化を探るために複合糖質のレクチン結合能の変化を検索し、細胞膜結合糖鎖の面から耳下腺の形態学的分化を調べた。

本研究で用いた7種類のレクチンのうちDBA (GalNAcを認識する) およびRCA-I (lactoseを認識する) に顕著な反応の変化が認められた。そのうち、RCA-Iは胎生中期に初めて反応が陽性となり、DBAでは出生後に初めて導管上皮において反応が認められた。これらの現象はCA-IおよびDBAの認識する複合糖質が細胞の成熟の変化に何らかの関係を持つものと考えられ、これらの変化の後、実験で用いたすべてのレクチンの結合が一定となったことは腺上皮と導管上皮が新たな成熟過程に入ったことを示唆した。

3. CAアイソザイム (CA-I、CA-IIおよびCA-III) の組織内への発現とその組織局在

耳下腺の発達に伴う細胞の機能的成熟を探るために耳下腺の機能に重要な作用を持つCAアイソザイム (CA-I、CA-IIおよびCA-III) を指標として、それぞれの発現時期とその局在を調べた。

CA-IおよびCA-IIは胎生前期においてすでに間葉系組織に散在する未分化上皮系細胞に認められた。しかし同時期にはまだCA-IIIの局在は認められなかった。その後、胎生中期までにCA-IIIの局在は導管上皮に限局して見られるようになった。3種のアイソザイムの局在は時期を経て、次第に増強された。しかし出生直後からCA-IIIは導管上皮からCA-IIは腺上皮から徐々に消失し始め、離乳前の個体では、CA-IIは腺上皮にのみ、CA-Iは導管上皮にのみ陽性反応が限局していた。このことは現象は胎生期の早期の耳下腺上皮細胞ですでにCAが合成され、出生後の時期には、ほぼこの合成はそれぞれのCAアイソザイムが対応する細胞において完成され、機能的発現の準備が充分なされているものと考えられた。

4. 分泌型CAアイソザイム (CA-VI) の精製と組織内への出現とその組織局在

本研究ではウシの分泌型CAアイソザイム (CA-VI) を初めて精製し、その出現時期と局在を調べた。

CA-VIの精製は、まず、ウシの唾液を採取し、サルファミドをリガンドとしたアフィニティゲルに吸着させ、NaIとKCNで溶出した。さらに陰イオン交換クロマトグラフィーを行い溶出した分画の酵素活性を測定した。活性をもつ分画をSDS-PAGEで泳動した後、その単一バンドを切り出しウサギに免疫した。一ヶ月後に全採血し抗血清を得た。精製した酵素は分子量35,000のサブユニットが6個集まった分子量210,000の分泌型の酵素であった。

耳下腺におけるCA-VIの組織局在は、胎生前期においてすでに上皮系のすべての細胞において陽性であった。CA-VIは出生直後の導管上皮から徐々に消失して、その後は腺上皮にのみ陽性反応を示すようになっていた。観察した全期間を通して高活性型アイソザイムのCA-IIと分泌型アイソザイムのCA-VIは発現と消失の時期、さらに局在する細胞の種類が非常に類似していた。CA-VIが他のCAアイソザイムと異なる点は糖鎖をもつ分泌型酵素であることであり、その機能は口腔内や胃内の液体環境を整えていると考えられる。それに対して、CA-IIIは腺上皮の細胞質に局在する細胞質性のアイソザイムであり、唾液の合成などを行う細胞のpHを調節していると考えられる。しかしながら、このような相違点があるにしても、CA-VIはCA-IやCA-IIIと比較して、CA-IIとその組織局在が非常に良く似た様相を呈していた。このようなことから、耳下腺における唾液の生合成に両者のアイソザイムが同様に重要な働きをもつものと推察した。導管上皮で働くCAと腺上皮で働くCAとは作用機序が異なるものとする。すなわちCA-IIとCA-VIは異なる分子構造をもつCAでありながら、唾液の生成と分泌後の唾液のpH調節を連続的に共同してコントロールしていると考えられる。

まとめ

ウシ耳下腺は発育に伴う形態学的な成熟の過程において3つのステージがあることが示された。

第一のステージは未分化上皮細胞が腺上皮と導管上皮に完全に分かれる胎生中期までの時期である。この時期に筋上皮細胞の出現と同時に腺上皮でのPAS反応陽性の分泌顆粒の形成、CA各アイソザイムの発現などが認められた。

第二のステージは胎内の環境を離れ、体外環境にさらされる出生の時期である。この時期には、分泌顆粒は存在するが、PAS反応は陰性となり、かつCAの主要なアイソザイム（CA-IIおよびCA-VI）がこの時期の腺上皮に発現した。またレクチンとの反応では胎生期に陰性であったDBAが導管上皮において陽性に転換したことが確認された。これらCAアイソザイムの局在の変化やレクチン結合能の変化は導管上皮の機能的な成熟を示しているものと考えられる。

第三のステージは液状飼料すなわち“ミルク”を食物とする哺乳期から固形飼料に転換する離乳前後の時期である。この時期では腺上皮の分泌顆粒は急激に減少しており、分泌顆粒をもつ細胞自体の数も明らかな減少が認められた。導管上皮においては、この時期に初めて基底線条をもつ線条導管が確認された。さらに、レクチンとの反応性は一定となっており、CAの局在と同様に成牛での分布と同様であった。完全に離乳が終わった生後5ヶ月頃になると、腺上皮および導管上皮は殆ど成牛と同様の形態を示していた。ウシでは離乳前後に液体のミルクから線維性の飼料へと食餌の内容が変わることにより、これらの現象は第一胃の粘膜の発達を引き起こされることが明らかである、この時期からウシにおいては第四胃内での化学的消化から第一胃内微生物発酵を主体とした消化へと移行するものと考えられた。第一胃内では微生物の線維成分の発酵によって作られた酸は胃の内容液を著しく酸性に傾けるため、胃内液性環境を調節する唾液を分泌する唾液腺への重要性が高まると考えられる。

今回の研究では、耳下腺もこれらの時期に合わせるように3段階の発達段階を経て組織の形態学的成熟を迎えていることが明らかになった。これらウシの耳下腺の発達に伴う機能形態学的変化は発達段階の生活環境に対応したものと考えられる。すなわち、胎生期間におけるこれらの諸現象は準備期間としてこれからの出生後における消化機構に対応したものであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

反芻家畜では第一胃を中心として主に微生物による線維質の連続的かつ盛んな発酵が行われており、当然ながら唾液腺分泌物、すなわち唾液の第一胃消化作用に果たす役割が非常に大きいことは申す迄もない。本研究は、主要な唾液腺の1つである耳下腺に着目して、今までには断片的な知見のみで累積的な報告が見られないウシ耳下腺の形態学的発達について観察し、耳下腺が胎生前期から離乳前後までに、どのように分化、発達をとげ生後の形態学的成熟を迎えるかについて複数の形態学的手法を用いて総合的に検討したものである。

本研究を実施するにあたり次の2つの研究目的を挙げて検討している。そのひとつは耳下腺の発達に伴う形態学的変化を把握することで、胎生期間中にどの時期に未分化上皮細胞が腺上皮細胞と導管系上皮細胞に分化し始め、どのような形態学的特徴の変遷を示すかについて観察し究明するとしている。なお、これらについては主に組織細胞学的方法により光学および走査型、透過型電子顕微鏡を、またレクチン組織化学的方法を用い検討している。もうひとつの目的は耳下腺の分化、発達に伴う機能的成熟期を究明するとしている。

すなわち、耳下腺本来の働きが確立する時期がいつであるのかを推測することである。これらについては主に炭酸脱水酵素（以下CAと称す）を指標にした免疫組織化学的方法によって検討した。以上のことがらを念頭に置き、本論文はウシ耳下腺の分化に伴う機能形態学的変化を一定期間連続して考察を行ったものである。

本論文はこれらの主題を展開させるために4つの章から構成する。まず始めに、顕微解剖学的観察を通して耳下腺の胎生初期から離乳前後の形態分化の変遷を観察し、耳下腺終末部および導管系上皮細胞の特徴を究明したとしている。この観察の結果、胎生前期（推定胎齢3ヶ月頃）の上皮細胞は形態学的には未だ未分化な所見を示しており、腺上皮細胞に先立ち徐々に筋上皮細胞が出現した。その後、未分化上皮細胞は腺上皮細胞や導管系上皮細胞への分化の進展が認められた。胎生中期の後半頃（推定胎齢6から7ヶ月）から細胞の急速な発達を観察され腺上皮細胞には中性粘液多糖類と思われる分泌顆粒が多数認められた。さらに、出生直後になると腺上皮細胞の分泌顆粒が徐々に消失し始め、離乳期を挟んでその前後の時期にはその顆粒はほとんど認められなかったとしている。また、導管系上皮では線条導管が初めて離乳直前の哺乳期に至って確認され、導管系上皮の形態学的な完成を確認している。次に耳下腺の発達に伴う腺終末部と導管系上皮細胞の複合糖質へのレクチン結合能の変化を探り、細胞内糖鎖の面から耳下腺の形態分化を究明したとしている。この観察の結果、本研究で用いたレクチン7種類のうち2種類のレクチンDBA（GalNAcを認識する）およびRCA-I（lactoseを認識する）に顕著な反応の変化が認められた。そのうち、RCA-IIは胎生中期に初めて反応が陽性となり、DBAでは出生後に初めて導管上皮細胞に反応が見られたのに対し、離乳期の個体や成体においてもその結合の変化は認められなかったとしている。

続いて、耳下腺の発達に伴う細胞の機能的成熟行程を検索するためにCAアイソザイム（CA-I、CA-IIおよびCA-III）を用いて、それぞれの出現時期とその分布を究明したとしている。この観察の結果、CAのうち細胞形質型アイソザイム（CA-I、CA-IIおよびCA-III）は胎生前期ですでにCA-IおよびCA-IIが未分化上皮系細胞に見られたが、同時期には未だCA-IIIは反応が認められなかった。その後、胎生中期になる時期までにCA-IIIの反応が導管系上皮に限局して見られるようになり、その後3つのアイソザイムの反応は次第に増強されて出生に至った。しかし出生直後からCA-IIは導管系上皮細胞から徐々に消失し始め、離乳前の個体では、完全に消失し認められなかったとしている。

さらに、耳下腺の機能的成熟行程を探るために、現在までに知られている唯一の分泌型CAアイソザイムであるCA-VIを用いて、その出現時期およびその分布を観察した結果、組織内への出現とその組織局在は胎生前期においてすでに上皮系細胞のすべてに陽性であり、それは細胞形質型アイソザイムのCA-IIと同様であった。これは出生時より導管系上皮細胞から徐々に消失して、その後は腺上皮細胞にのみ陽性反応を示すようになっていた。

これらの諸現象の事実により、次のような結論を得たとしている。

- ① ウシ耳下腺上皮細胞の成熟の過程において出生時までとそれに引き続き離乳期までのわずかな時期において明瞭な形態学的変化が認められた。その後は成体の耳下腺と基本構造において同一になることが明らかになった。
- ② GalNAcを認識するDBAおよびlactoseを認識するRCA-IIに結合する糖鎖の出現が耳下腺上皮細胞の代謝の変化に何らかの関係を持つものと考えられ、これらの変化の後、結合が安定したことは腺終末部上皮細胞と導管系上皮細胞が新たに成熟行程に入ったことを示す指標と考えられる。

③ 耳下腺上皮細胞では胎生期の早期からCAが合成され、出生時にはほぼこれらは、それぞれのアイソザイムに対応する細胞において完成され、機能的発現の準備が充分なされていると考えられた。

④ 実験全期間を通して高活性型アイソザイムのCA-IIとCA-VIは同じような動態を示したことから、この2つのアイソザイムは共働していることが示唆された。

以上、これらの観察の結果、ウシ耳下腺はその発達において、三つの大きなステージを経て形態学的、機能的に成熟することが明らかとなった。その第一は胎生中期の未分化上皮細胞が腺房上皮細胞と導管系上皮細胞に完全に分かれる時期であり、第二の時期は特に腺房上皮細胞において顆粒形成を認める胎生後半から出生までの時期である。さらに、第三の時期は導管が完成し、腺房上皮細胞から顆粒が消失する離乳の時期である。

本研究はこのようにウシ耳下腺が胎生期から離乳前後まで發育して行く段階で形態学的にどのように分化し、発達して行くかを明らかにし、また機能的な成熟期間を明らかにした。このように、形態学的発達のみならず、機能的な成熟時期を経時的、客観的に各々の時期を特定し得たことは、組織発生学上の新知見を得たことと高く評価され、本研究は獣医学術上において大変有意義であり、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものと判定した。