

氏名(本籍)	コ マツ スグル 小松 克(愛知県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第78号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	ラット胎子膵島細胞の分化に関する研究 一特に母体副腎皮質ホルモンによる影響一
論文審査委員	(主査) 江口 保暢 (副査) 二宮 博義 有嶋 和義 山本 雅子

論文内容の要旨

ラット胎子膵臓において、免疫組織化学的にはA細胞が最も早く胎齢11日に出現し、B細胞は胎齢14日およびD細胞は胎齢17日に出現するという(Fujii, '79)。Yoshinari & Daikoku ('82)によるとA細胞は胎齢11日、B細胞は胎齢12日、そしてD細胞は胎齢15日に出現する。これらの実験において、膵島ホルモン含有細胞の出現時期に若干の違いはあるが、ラットの膵島内分泌細胞はA細胞、B細胞、D細胞の順に出現するようである。このように膵島細胞は胎生のかなり早い時期から出現し発育するようであるが、この膵島細胞の分化を調節する因子は本質的には分かっていない。McEvoy & Hegre ('76)によると、種々のステロイドホルモンのうち、副腎ステロイドを培養液に添加して胎齢20日のラット膵臓を器官培養し、培養液へ分泌されるアミラーゼおよびインシュリンを測定した。この実験において、副腎ステロイドは培養膵臓のアミラーゼ分泌を刺激し、逆にインシュリン分泌を抑制した。さらに副腎ステロイドであるコルチコステロンは、培養液に加える濃度によってはインシュリン分泌を促進するという(McEvoy et al., '76)。インシュリン分泌を促進するコルチコステロン濃度は、胎齢18日の膵島のA細胞からのグルカゴン分泌を抑制(McEvoy, '80)し、そして胎齢22日の膵島のD細胞からのソマトスタチン分泌を促進している(McEvoy et al., '81)。このように副腎皮質ホルモンは胎生期の膵島あるいは膵島細胞の発達に促進的か抑制的か、いずれかの方向で影響を及ぼすものと考えられる。そこで本研究は、ラットにおける膵島細胞の分化を明確にするとともに、それに対する母体副腎皮質ホルモンの役割を明らかにすることを目的とし、次のような実験を行った。

1) 第一章においては、膵島細胞の分化を光学顕微鏡および電子顕微鏡的に観察するとともに、特に最近の高感度免疫組織化学的方法によって検討した。ラット胎子において膵島原基は胎齢11日から12日の間に前腸から膨出して形成されるので、妊娠11~21日に母体を剖検し、光学顕微鏡的観察としては、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色、あるいは各膵島ホルモンに対する抗血清(抗インシュリン血清、抗グルカゴン血清、抗ソマトスタチン血清)を用いて、感度の高いAvidin-biotinylated peroxidase complex法で免疫染色を行った。電子顕微鏡的観察としては常法にしたがい超薄切片を作成し観察した。

胎齢12日では膵島原基と思われる構造が確認され、胎齢13日になると膵島原基が膵臓外分泌部と明らかに区別された。膵島原基の数は胎齢15日まではあまり増えなかったが、胎齢16日以降、外分泌部の分泌管上皮

から多数の新しい膵島原基が出芽し始め、膵島原基の数は劇的に増加し、大きさも増した。胎齢20日になると一部の膵島は成体の膵島と同様の形態を示すようになった。

免疫組織化学的に胎子膵臓を観察すると、A細胞が最も早く、胎齢11日に検出された。そして胎齢12日になるとB細胞およびD細胞が出現した。胎齢13~16日の間、膵島細胞の大部分はA細胞であった。胎齢14日以降、外分泌部の分泌管の数は増え、それに伴い分泌管上皮細胞からB細胞が新生され、B細胞の数は激増した。胎齢18日になると膵島細胞のうち、B細胞が最も多くなり、膵島内の局在性はB細胞が膵島の中心を占めるようになった。そしてA細胞およびD細胞が膵島の周辺に位置していた。

電子顕微鏡的観察により胎齢13日では各膵島細胞の同定は困難であったが、胎齢14日になると、同定できる膵島細胞の数は少ないが、B細胞とA細胞の同定ができた。胎齢が進むにつれ、各膵島細胞は顆粒の数が増え、胎齢21日になると、成体の膵島で見られるような特徴的な形態を示すようになった。

2) 第二章においては、本研究の主目的として、膵島細胞の初期分化に対する母体の副腎皮質ホルモンの役割を検討するため、妊娠6日に母体の副腎を除去し、胎齢12~16日の胎子膵島の発達を免疫組織化学的に観察した。胎子の連続切片は第一章と同様の抗血清を用いて免疫染色し、各膵島細胞の体積を計測あるいは細胞数をカウントした。

母体の副腎を除去すると胎齢12~15日の胎子膵島インシュリン陽性細胞の総体積は減少した。この減少は副腎を除去した母体へコルチコステロンを連日投与することにより阻止された。グルカゴン陽性細胞に対しては、母体の副腎除去は胎齢14日のみ、胎子膵島グルカゴン陽性細胞に対しては、母体の副腎除去は胎齢14日のみ、胎子膵島グルカゴン陽性細胞の総体積を増加させた。ソマトスタチン陽性細胞総数は母体の副腎除去による影響を受けなかった。これらの所見は、妊娠初期の母体の副腎除去は、胎子膵島インシュリン陽性細胞の初期分化を抑制し、その主な要因は母体由来の副腎皮質ホルモンの欠損であることを示唆している。また母体の副腎除去はインシュリン陽性細胞に対する影響とは異なり、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の分化には関与しないと思われる。

3) 第三章においては、母体副腎皮質ホルモン欠如の下での胎子膵臓におけるグルココルチコイドレセプターの局在について観察した。妊娠15日に剖検し、胎子膵臓を取り出した。胎子膵臓からタンパクを抽出し遠心後、上清を採取した。上清を7.5%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した後、ニトロセルロース膜上に転写した。転写したニトロセルロース膜上のタンパク質を同定するため、抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いてイムノプロットを行った。その結果、胎齢15日の胎子膵臓は、微量ではあるが約97kDaのグルココルチコイドレセプターを持っていることが明らかとなったので、引き続き胎子膵臓がいつから、膵臓のどの部位にグルココルチコイドレセプターを持っているのかを免疫組織化学的に検討した。胎齢12~14日の胎子膵臓を4%パラホルムアルデハイドで固定し、抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いて免疫染色した。その結果、ラット胎子膵臓は、胎齢12日にすでにグルココルチコイドレセプターを持っていた。グルココルチコイドレセプターは主に膵島細胞の核内に存在した。次いで胎子膵臓のグルココルチコイドレセプター量は母体の副腎除去の影響を受けるかどうかを調べるため、胎齢15日の胎子膵臓ならびに母体の膵臓を用いてウエスタンブロット法および免疫染色を行った。妊娠6日目に副腎を除去した母体の膵臓のグルココルチコイドレセプター量は、コントロール群に比べて減少していた。この減少はコルチコステロンを投与することにより阻止された。しかし胎齢15日の胎子膵臓グルココルチコイドレセプター量はコントロール群と差は

見られなかった。これらの所見から、ラット胎子膵臓は胎齢12日にすでにグルココルチコイドに対するレセプターを有していることが証明されたので、胎子膵臓の発達には母体由来のグルココルチコイドが関与している可能性が示唆された。

これらのことから以下の結論が得られた。1) ラット胎子膵臓において、免疫組織化学的にA細胞が胎齢11日に、B細胞およびD細胞が胎齢12日に初めて出現した。2) 母体の副腎皮質ホルモンは、胎子膵島インシュリン陽性細胞の初期分化を維持し、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の分化には関与しない。3) ラット胎子膵臓は胎齢12日にグルココルチコイドレセプターを持っており、胎子膵臓の発達には母体由来のグルココルチコイドが関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

哺乳類における膵臓の分化は原始十二指腸から起こる。その初めは膵管である。膵島はその膵分泌管上皮から分化する。膵島を構成する内分泌上皮細胞は、グルカゴン産生細胞 (A細胞)、インシュリン産生細胞 (B細胞)、ソマトスタチン産生細胞 (D細胞) である。ラットにおいて、これら膵島内分泌細胞の出現順序は、これまでまちまちの報告があったが、近代の高感度免疫組織化学的手法を用いた報告 (Yoshinari & Daikoku, '82) によれば、A細胞は胎齢11日、B細胞は胎齢12日、D細胞は胎齢15日とされている。

膵島内分泌細胞の分化発達を調節している因子は現在まではっきりしていないが、McEvoyらが1976年以来、胎齢20日頃のラット胎子膵臓の器官培養実験において、培養液に副腎皮質ステロイドホルモン (この場合、コルチコステロン) を加えることによって、培養液中へのインシュリンの放出量が増えたり、減ったりすることが示された。それは培養液に加えるコルチコステロンの濃度によるもので、多量ではインシュリン放出を抑制するのである。インシュリン放出を促進する濃度では、グルカゴンの放出が抑制され、ソマトスタチンの放出が促進されるとしている。

本論文は、副腎皮質ホルモンが膵島細胞の機能に影響しているという *in vitro* での先人の研究結果を踏まえて *in vivo* で母体からの皮質ホルモンが影響しているかどうかを調べることを主目的としたもので、本論文での *in vivo* での実験は過去の研究には全く見られないユニークなものである。その作業仮説は、「母体副腎皮質ホルモンは膵島細胞の分化に影響を及ぼす」ということであるから、膵臓におけるグルココルチコイド・レセプターの変化についても、併せて研究を進めている。

本論文は三つの章からなっている。第一章では、膵島細胞の分化を光学顕微鏡および電顕的に観察し、さらに最近の高感度免疫組織化学的手法を用いて検討している。これは、過去の研究結果を確認することのほか、次章以下の研究の基礎として必要なことである。第二章では、膵島細胞の分化に対する母体副腎皮質ホルモンの影響を調べるために、妊娠6日に母体の副腎を除去し、胎齢12~16日の胎子膵島を免疫組織化学的に観察している。ラットの副腎皮質ホルモンの主体はコルチコステロンであるとされており、Cohen (1973) によれば、胎子副腎からのコルチコステロンの分泌は胎齢17日とされているので (それより若い胎齢では当時の検出能力では確認できていないから、15,16日齢で検知不能の量で分泌していないとはいえないが)、観察した範囲内では一応、胎子体内の皮質ホルモン量は、母体副腎欠損下では、ほとんどないと考えている。第三章では、胎子膵臓におけるグルココルチコイド・レセプターの局在について検討している。

第一章では、膵臓原基は胎齢11日と12日の間に前腸から膨張して形成されることを確認した。膵臓原基は

胎齡12日に膵臓分泌管（外分泌部）から出芽するのが確認され、胎齡13日になると膵臓原基は周囲外分泌部から明らかに区別されるようになる。胎齡16日以降、分泌管上皮から多数の新しい膵臓原基が出芽して、膵臓の数が劇的に増加した。抗インシュリン血清、抗グルカゴン血清、抗ソマトスタチン血清を用いて、Avidin-biotinylated peroxidase complex法で免疫組織化学的に観察すると、A細胞がもっとも早く胎齡11日に検出された。A、B細胞の出現時期は文献に報告されたのと同様であるが、D細胞の出現時期は文献による15日より3日も早い12日であったということは、用いた方法が以前より高感度になっていることを示す。最初、膵島細胞の大部分はA細胞からなるが、その後B細胞の数が増え、膵島の数が激増するとともに、膵島内のB細胞も激増して、A細胞を島の周辺に移動させる。D細胞は最初から少なく、島の周辺に分布する。胎齡18日では、B細胞がもっとも多く島の中心部を占め、A細胞とD細胞が島の周辺部に位置するようになる。電顕によれば、胎齡13日では膵島細胞の保有する顆粒の形態からは細胞を分類するのは困難であったが、胎齡14日ではA細胞とB細胞を同定できるという。

第二章では、本論文の主体をなす母体副腎除去の胎子膵島細胞分化に及ぼす影響を免疫組織化学的に調べている。膵島細胞の総体積を組織計測学的に算定している。調べた胎齡12～15日の範囲内で、母体の副腎を除去すると、インシュリン陽性のB細胞総体積は対照に比べて減少していた。副腎除去母体に、コルチコステロンを連日注射しておいた場合には、B細胞の総体積は対照と同様となった。グルカゴン陽性のA細胞総体積にはあまり変化はないが、胎齡14日においてのみ総体積が増加していたが、コルチコステロンを補うことによって、この増加は阻止された。これを解釈するのは非常に難しいが、著者は、インシュリンの分泌量が減少したため拮抗的にグルカゴンの生産が促進されたのではないかと、15日以降はB細胞の爆発的増加によるホルモンバランスの急激な変化で、A細胞の変化が数的に表現されなかったのではないかと、推測している。ソマトスタチン陽性のD細胞については、母体副腎除去の影響は反映されなかったとしている。また、コルチコステロンの投与でも変化はなかった。この章では、母体副腎の欠損下で、B細胞の初期分化が遅滞することが示されたわけである。

第三章では、このようにラット胎子膵島細胞、特にB細胞が副腎皮質ホルモンに感受性があることが示されたから、胎子膵島にグルココルチコイドのレセプターが局在することが考えられるので、膵臓全体からタンパクを抽出したのち、抗グルココルチコイド・レセプター抗体を用いて、ウェスタンブロット法によりレセプターの存在を調べた。胎齡15日の膵臓を用いた。副腎除去した母体の膵臓ではレセプター量は対照より少なく、これはコルチコステロンの投与により阻止されていた。胎子では同様に膵臓にレセプターが存在していることが確認されたが、母体副腎除去でも量的変化は認められなかった。胎子膵臓がグルココルチコイド・レセプターを有することが明らかとなったので、抗グルココルチコイド・レセプター・ポリクローナル抗体を用いて、胎齡12～15日の胎子の膵臓のレセプターを免疫組織化学的に観察した。その結果、レセプターは胎齡12日の膵島原基の細胞核内にすでに認められた。母体副腎除去の影響は組織化学的には認められなかった。

以上をまとめると、ラット胎子の膵島の発達において、1) A細胞は胎齡11日に、B細胞およびD細胞は胎齡12日に出現すること、2) 母体副腎皮質ホルモンは胎子膵島B細胞の初期分化を維持し、A細胞およびD細胞の分化には関与しないこと、3) 胎子膵臓は胎齡12日にしてすでにグルココルチコイド・レセプターを保有していること、などが示された。

本論文は、生体内 (in vivo) における母体由来副腎皮質ホルモンが胎子膵島細胞、とくにインシュリン産生細胞の分化発達に関与していることを初めて明らかにし、さらには早期の膵島にはすでにグルコルチコイド・レセプターが存在することも併せて明らかにしたもので、発生学および胎子内分泌学に貢献するところ大であり、ひいては獣医学上意義ある業績として、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。