



Cellular differentiation in the embryonic rat pancreas, with special reference to the co-existence of substances immunoreactive to both insulin and glucagon antibodies in the same...

多木, 純子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1988-12-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1223

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001223>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	多 木 純 子 (兵 庫 県)
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博ろ第1023号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和63年12月7日
学 位 論 文 題 目	Cellular differentiation in the embryonic rat pancreas, with special reference to the co-existence of substances immunoreactive to both insulin and glucagon antibodies in the same cells (ラット胎生期・膵内分泌細胞の分化に関する免疫組織化学的 研究 特に、同一細胞におけるインスリン様、グルカゴン様物 質の共存について)
審 査 委 員	主査 教授 馬 場 茂 明 教授 溝 口 史 郎 教授 藤 田 拓 男

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

膵内分泌細胞の個体発生は、多くの研究者により古くからなされてきた。なお現在不明な部分が残されている。従来法においては、通常の染色法や電子顕微鏡の観察による初期の細胞分化の同定が困難であった。1970年代の中頃より、免疫組織化学の改良進歩によって、今まで以上に細胞の同定、発生時期、局在、細胞内小器官の位置等について、詳しい所見が得られるようになった。しかし、これまでの研究では、個々の細胞分化とホルモン分泌顆粒の出現との相関などについては余り触れられていない。

本研究は、酵素抗体法を用いた連続切片による光学顕微鏡の観察と、プロテインA-金コロイド法を用いた二重染色による電子顕微鏡の観察から、in vitroでのインスリン様免疫活性細胞とグルカゴン様免疫活性細胞の分化に関し、より詳細な検討を行ない、細胞分化の一定時期に、同一細胞内に両者の共存することを証明したものである。

実験材料と方法

Wistar系ラットを交配させて、膣膏中に精子を認めた日を妊娠0日とした。光顕用には妊娠11日目から15日目までの胎仔と、16日目から20日目までの膵臓をBouin固定し、脱水後パラフィン包埋した。1 μ mの連続切片を作成し、脱パラフィン後酵素抗体法間接法を用いてインスリンとグルカゴンの免疫染色をした。そして、0.05%過酸化水素加3,3'-diamino benzidine

tetrahydrochloride 液で抗原抗体結合部位を明らかにした。この際、0.3%過酸化水素加100%エタノールで20分間内因性ペルオキシダーゼをブロックした。対照実験として吸収試験を行なった。電顕用には、胎生15日目の胎仔臍を摘出し、4%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドで固定後、洗浄し、0.5%オスミウム固定した。アルコール脱水のあとエポンに包埋した。超薄切片を作成しニッケルメッシュにのせて Bendayan の方法によるプロテイン A-金コロイド法で、同一切片の二重染色を施行した。プロテイン A-金コロイド複合体は、直径6~8nm がインスリン様免疫活性細胞に、直径12~14nm がグルカゴン様免疫活性細胞に用いられた。そして、電子染色を行なったのち電子顕微鏡で観察した。

抗グルカゴン抗体、抗インスリン抗体、ペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG、抗家兎豚 IgG、PAP 複合体を使用した。

結 果

胎生11日目にラット臍原基が腸管より分化しつつあり、いくつかのグルカゴン様免疫活性細胞を認めた。

胎生12日目に臍原基は完全に腸管から分化し細胞群を構成し、一部にグルカゴン様免疫活性細胞を認めた。

胎生13日目に臍内に極くわずか、グルカゴン抗体とインスリン抗体に反応する細胞を認めた。その細胞の形態は、細胞質に富み、大きく、多角型を示した。一部に核分裂も認め、細胞群内にまばらに存在していた。

胎生14日目、15日目、16日目はほとんど同様に、内分泌導管上段の細胞群内にグルカゴン抗体とインスリン抗体に同時に染まる細胞を、散在性に数ヶ認めた。

胎生17日目は、外分泌腺の発達も良く、内分泌細胞群は多数認められた。その内でも、グルカゴン様免疫活性細胞の増加は、さらに著明になりグルカゴン抗体及びインスリン抗体に反応する細胞も比較的多く認められた。

胎生18日目は、内分泌細胞群は成熟したラ島の形態に似て円形からだ円形を示すようになった。グルカゴン様免疫活性細胞は、ラ島周辺に、インスリン様免疫活性細胞は、中心部に局在するようになり、インスリン様免疫活性細胞の数が優勢となった。そして、もはや1個の細胞にインスリン抗体とグルカゴン抗体の共存は認められなかった。

胎生19日目は、さらに成熟期のラ島の形態によく似ており、その内分泌細胞も小さくなり、形も錐錘型を示した。

電顕観察では、胎生15日目の臍内分泌細胞は180 nm から200 nm の電子密度の高い分泌顆粒を有し、そのうち一部の分泌顆粒には、特異的にインスリン様免疫活性と、グルカゴン様免疫活性を同時に示すことが確認された。

考 察

本研究では、ラット膵内分泌細胞のグルカゴン様免疫活性細胞とインスリン様免疫活性細胞はそれぞれ胎生期11日目と13日目に、初めて認められたが、これは今までの報告と一致するものであった。我々はさらに詳しく検討した結果、胎生13日に出現したインスリン様免疫活性細胞はすでに、グルカゴン様物質と共存している細胞であるという事実を初めて明らかにした。そしてそのような細胞は、胎生17日目までみとめられ、それ以後は全く存在しない事実を明らかにした。2種のペプチドを共存する細胞の形態は、核も大きく、細胞質に富み、多角形を示し、内分泌細胞群内で散在性に数ヶ認められた。しかしながら、胎生18日を過ぎるとそのような細胞は全く存在せず、各々の内分泌細胞もインスリン様免疫活性細胞が優勢をしめ、局在もインスリン様免疫活性細胞が中心になり成熟期のラ島に似てきている事実も新たに確認した。

本研究は、免疫組織化学的に光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、ラット胎生期膵インスリン様免疫活性細胞とグルカゴン様免疫活性細胞の分化について詳細に報告した初めての研究である。

1972年 Pictet と Rutter らがラット胎生期膵内分泌細胞の研究で重要な2つの期間がある事を記述している。第1期は胎生11日から13日頃、第2期は胎生15日から19日頃である。彼らの結果も考え合わせて、胎生期13日から17日までとそれ以後において、インスリン様免疫活性物質とグルカゴン様免疫活性物質の共存を制御する細胞内分子レベルでの変化が、示唆される。更に、従来から云われていた“1細胞は1種のペプチドを有する。”という説は、ラット胎生期膵内分泌細胞にはあてはまらないことを示唆する成績であり、内分泌細胞の分化に関して新しい知見をえたものと考ええる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

膵内分泌細胞の個体発生、分化に関する研究は、古くから多くの研究がなされてきたが、現在なお不明な点が多く残されている。しかし、近年の免疫組織化学的手法の改良進歩によって、次第にその詳細が明らかにされつつある。特に膵内分泌細胞中、 β 細胞はインスリンを、 α 細胞はグルカゴンを、 d 細胞はソマトスタチンを分泌することが明らかにされ、夫々は内分泌相関をもって機能することが知られている。しかし、胎生期における細胞分化とこれらホルモン分泌顆粒の出現などについては不明のままであった。

本研究では酵素抗体法を用いた連続切片による光学顕微鏡的観察と、プロテインA-金コロイド法を用いた2重染色による電子顕微鏡の観察から、insulin 様免疫活性細胞とグルカゴン様免疫活性細胞の分化に関して、胎生細胞分化の一定時期に、同一細胞内に両者の共存することを証明したものである。

本研究では、ラット膵内分泌細胞のグルカゴン様免疫活性細胞は胎生11日目に、インスリン様免疫活性細胞は第13日目に初めて認められたが、これは従来の諸報告にみられる結果と一致するものであった。さらに詳しく検討した結果、胎生13日に出現したインスリン様免疫活性細胞は、既にグ

ルカゴン様物質と共存している細胞であることを初めて明らかにした。そしてそのような細胞は、胎生17日目まで認められ、それ以後は全く共存して存在しない事実を明らかにした。2種のペプチドを共存する細胞の形態は、核も大きく、細胞質に富み、多角形を示し、内分泌細胞群内で散在性に数ヶ認められた。しかし、胎生18日を過ぎるとそのような細胞は全く存在せず、各々の内分泌細胞もインスリン様免疫活性細胞が優勢をしめ、局在もラ島の中心になり、成熟期のラ島に似て来ることを確認した。

さらに、胎生期各期における細胞分布と数量の推移と、実測したインスリン、グルカゴン免疫測定活性値の推移は良く一致し、上記の成績を裏付けることが出来た。

以上の研究は、胎生11日から13日頃の第1期と、胎生13日から17日までの第2期において、遺伝子レベルで共存したペプチドホルモン産生条件の細胞内分化過程に変化がおこり、内部環境条件が特異なホルモン産生細胞に変化することを示唆するものと考えられ、成熟期膵ラ島細胞群の特性を示すに至る胎生分化過程を明らかにしたものであり、従来の“1細胞1ホルモン分泌”とする既説はあてはまらないことを示す成績であり、膵内分泌細胞の分化に関して新しい知見をえた貴重な業績であると思われる。よって、本研究者は医学博士の学位をうる資格があると判定された。