



# Electron microscopic and immunohistochemical examinations of pancreatic beta cell destruction by cytotoxic T lymphocytes in NOD mice

早川, みち子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-02-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1248

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001248>

※ 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)	草 川 み ち 子 (兵 庫 県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1048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	平成元年2月22日
学位論文題目	ELECTRON MICROSCOPIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATIONS OF PANCREATIC BETA CELL DESTRUCTION BY CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN NOD MICE (NODマウスにおける細胞障害性Tリンパ球による膵B細胞破壊の電子顕微鏡および免疫組織学的研究)
審査委員	主査 教授 馬 場 茂 明 教授 溝 口 史 郎 教授 伊 東 宏

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〈緒 言〉

I型糖尿病の発生機序として細胞性免疫の関与が考えられている。NODマウスはこの疾患の動物モデルとして有用である。このマウスでは雌に5週齢よりL3T4陽性 helper T リンパ球を主とする膵島の単核細胞浸潤を認め、15ないし20週齢に顕性糖尿病を発症する。抗L3T4抗体により膵島炎および糖尿病の発症を予防したという報告や、膵島炎の移入にはL3T4陽性細胞のみではなくLyt2陽性細胞傷害性Tリンパ球が必要であるという報告もあり、どのような免疫担当細胞が膵B細胞破壊を引き起こすかはいまだ不明である。

我々は、NODマウス膵より浸潤細胞を分離培養し、これら膵島炎由来の単核細胞がin vitroに膵B細胞を破壊することを見いだした。この過程を電子顕微鏡下に観察し、またこれら単核球の細胞表面マーカーを染色し、いかなる免疫担当細胞であるか確定した。

#### 〈方 法〉

20週齢の雌性NODマウス膵より、コラゲナーゼ処理にて膵島を分離し、interleukin-2 (IL-2) 10U/mlを加えた培養液にて1週間培養した。この間に膵島は完全に破壊された。この培養系からマウスリンパ球分離液にて単核細胞のみを分離した。生後6-8週齢の雄性NODマウスより新たに分離した膵島を、上記の分離培養した単核細胞とIL-2 1U/ml加培養液中にて6時間培養した。対照にはC3H/Heマウスの膵島を用いた。さらに、マウスのIL-2依存性リンパ球クロー

ンである CTLL-2 細胞を NOD マウスの脾臓由来の単核細胞の対照とした。

標本は、4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて2時間固定、1%四酸化オスミウム液にて1時間後固定し、段階的エタノール脱水を経て、アラルダイトMに包埋した。準超薄切片をトルイジンブルーにて染色し光学顕微鏡下で観察した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛を用いて二重染色し、日本電子100SX電子顕微鏡にて80KVの条件下にて観察した。

単核細胞の免疫組織染色は一次抗体として抗Lyt2、抗L3T4および抗asialo GM1(抗NK細胞表面抗原)抗体を用い、間接法によりペルオキシターゼ染色を行った。

#### 〈成績〉

光学顕微鏡による観察では分離した6-8週齢の雄性NODマウス脾臓にはリンパ球浸潤は認められなかった。脾臓由来の単核細胞との培養では、30分後にはこれらの単核細胞が脾臓の表面に接触しているのが認められたが、脾臓は正常構造を保っていた。90分の培養では脾臓の一部より破壊が始まり、単核細胞はさらに脾臓内部に侵入し、周辺に破壊された脾臓細胞が認められた。3時間後では、脾臓は破壊され正常構造を完全に失っていた。

NODマウスの脾臓とCTLL-2細胞、およびC3H/Heマウスの脾臓とNODマウス由来の単核細胞との培養では、6時間後においても脾臓には変化は認められなかった。

電子顕微鏡による観察では、この単核細胞は核/細胞質(N/C)比が低く、核は切れ込みを有しクロマチンに富み、この切れ込み側の細胞質にはミトコンドリアおよびゴルジ装置の細胞内小器官が豊富に存在した。

培養30分後、脾臓B細胞に接触している単核球が認められ、B細胞と接触している側の細胞質に中心小体が出現し、これにより微小管が放射線状に走り、ミトコンドリアおよびゴルジ装置の細胞内小器官はB細胞の側に集められ、核は対側に偏在していた。さらに90分後、細胞融解をおこしたB細胞が観察された。単核細胞はこのB細胞を囲むように偽足を突出しているか、あるいは偽足はB細胞内に深く挿入されていたが、B細胞を貪食している所見は認められなかった。

脾臓A細胞およびD細胞は脾臓の外側に位置しているが、単核細胞がこれらの細胞と接触している所見は得られず、単核細胞はB細胞にのみ接触し、細胞融解をひきおこした。3時間後ではほとんどが変性細胞で占められていた。

免疫組織化学的にはNOD脾臓由来のこれらの単核細胞はLyt2陽性細胞であったが、抗L3T4抗体および抗asialo GM1抗体によっては染色されなかった。

#### 〈考察〉

IL-2を用いて増殖させたNODマウスの脾臓に由来する単核細胞は、B細胞に選択的に接触し破壊すること、そしてその破壊は標的細胞の細胞融解による事が示された。

また、単核細胞には細胞傷害性Tリンパ球の特徴的な電顕所見が認められた。つまり、この細

胞においてはN/C比が低く細胞内小器官に富み、標的細胞に接触後これら細胞内小器官を標的細胞側に偏移させる。しかる後、分泌顆粒を放出し標的細胞の細胞融解を生じさせると考えられる。また、細胞表面マーカーはLyt2陽性であった。以上より、NODマウスの膵島炎には膵B細胞に選択性を有する細胞傷害性Tリンパ球が存在していると考えられた。

膵島炎の浸潤細胞は殆どがL3T4陽性のhelperTリンパ球であり、これらと本研究で示した細胞傷害性Tリンパ球との相互の影響は不明であるが、L3T4陽性細胞はリンホカインを分泌し、細胞傷害性Tリンパ球を活性化させることが知られている。さらに、NODマウスの膵島の免疫電顕にて、生体内においてもLyt2陽性細胞が膵島内部でB細胞に密に接触しているとの報告もあり、本研究の結果を支持する。

本研究にてNODマウスの膵島炎の最終段階である膵B細胞破壊は、細胞傷害性Tリンパ球による特異的かつ直接的な傷害である可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

我が国で開発された nonobese diabetic mouce (NOD) はヒトI型糖尿病モデル動物として世界的に注目されている。とくに、発症前から血中に膵ラ島細胞抗体 (ICA) あるいは膵ラ島細胞膜抗体 (ICSA) が証明され、膵ラ島炎をおこした後、ラ島Beta細胞を特異的に破壊し、生後12-20週で糖尿病を発症することが知られ、自己免疫性疾患の一つとして本NODマウスが使用され研究されている。

近年、本研究者の属する研究グループではNODマウスの膵ラ島炎をおこす単核浸潤細胞の同定、膵Beta細胞の破壊機構について新しい知見を発見したが、本研究者はこの膵島炎より分離培養した単核球について光顕学的並びに電子顕微鏡学的に検索し、形態学的に膵Beta細胞破壊の実態を示すことを目的として本研究を行った。

#### 結果と評価

対象としたマウスは6-8週齢の雄NODとC3H/Heマウスで、夫々から膵ラ島を分離しtarget cellsとした。一方、effector cellとしての単核細胞は20週齢雌NODマウスの膵ラ島から分離した単核球を用いた。

実験結果：NODマウスから分離したラ島をインターロイキン2と共に7日間培養した後、増殖した単核球を遊離し、更に6-8週齢の若齢マウスから分離した膵ラ島と共に培養し、そのラ島破壊の所見を観察した。培養後30分で単核細胞は膵ラ島Beta細胞に集簇附着し、60分後にはNODマウスの膵ラ島は完全破壊されることを見出した。対照としたC3H/HeマウスあるいはInterleukin-2のみの培養では何ら変化を認めなかった。

そこで、電子顕微鏡的に詳細に分析したところ、先ず初期反応として、遊離単核球に変化がみられ、核対細胞質の比は減少し、Beta細胞面に接してよく発達したGolgi complexes並びにミト

コンドリアがマイクロチュブルスと共に放射状に配列してくることを認め、細胞が活性化されていることを示した。

30分後には膵Beta-cellに対して偽足を伸し、Beta-cellをとらえる像がみられた。さらにBeta-cell内のRERの拡大、ミトコンドリアの膨化が多くみられ、insulin顆粒が著明に減少してゆく像がみられた。これらが決してBeta-cellを喰食している像はみられなかった。即ち、このcellはcytotoxic T-cellの可能性が示唆された。3時間後には全く正常なラ島Beta-cellは認められず空胞化し、又pyknotic nucleusがみられるようになった。そこで更にこの単核球を電顕的免疫組織化学的に分析したところ、この破壊effector cell membraneは抗Lyt2抗体のみに染色され、抗L3T4や抗asialo GM1抗体には全く反応しなかった。すなわち、浸襲単核球はLyt2 cytotoxic/suppressor T cellであることが形態学的に証明された。

以上の研究は、NODマウス膵ラ島Beta細胞を特異的に破壊する機構を形態学的に証明し、しかもそのeffector cellがLyt2 cytotoxic/suppressor T cellであることを明らかにしたもので、糖尿病のI型病因論に対し、新しい知見を加えた業績であると評価できる。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。