

学 位 論 文 題 名

マウス膵管結紮後の膵外分泌部の変化

— 定性ならびに定量組織学的検討 —

学位論文内容の要旨

【 目 的 】

膵管の狭窄や閉塞は、急性膵炎あるいは慢性膵炎の進行において、重要な役割を演じると考えられている。また胆石症、膵石症、膵腫瘍では、しばしば膵管閉塞による続発性膵障害が経験され、閉塞性慢性膵炎として、臨床病理学的に独立した分類がなされている。膵管閉塞にともなう膵の形態、機能の変化を明らかにすることは、これらの疾患の成因、病態の理解につながるものと考えられる。これまで、動物を用いた膵管閉塞実験は多く報告されているが、これらの研究での組織学的検索の検討対象は、標本のごく一部のきわめて薄い切片であり、その観察所見の解釈は二次元の情報にもとづいたものである。臓器機能にかかわって変化を追求する場合には、三次元的な理解にもとづいて膵臓全体での変化の過程を明らかにする必要がある。本研究は膵臓全体を対象とした組織学的観察と形態計量学的検討、さらに酵素組織化学的手法によるDNA断片化の検出と透過型電子顕微鏡を用いた超微形態変化の検討から、膵管閉塞による細胞・組織変化の詳細と全体像を明らかにすることを目的とした。

【 材 料 と 方 法 】

実験動物には雌性ddマウスを用いた。マウスの膵臓の分葉中、最大の体積を持つ脾臓葉からの膵管を実体顕微鏡下に結紮し、結紮後1日から16週までの結紮葉における細胞および組織変化を検討した。膵臓全体の光学顕微鏡用連続切片を作成し、膵外分泌部の細胞の高さ、細胞分裂数、核密度を計量組織学的に求め、立体解析学を用いて、膵外分泌部の体積、および外分泌部を構成する細胞の総数の変化を評価した。さらに、ニックエンドラベル法によって、組織切片上で核内DNAの断片化を酵素組織化学的に検出し、透過型電子顕微鏡を用いて細胞の超微形態変化を検討した。

【 結 果 】

膵管結紮後、膵臓の体積は浮腫によって2日まで軽度増加したが、以後7日までに体積は著しく減少した。この期間、外分泌部の体積は正常の10%以下まで減少した。結紮2日までの腺房細胞は膵管内圧の上昇による分泌機能の停滞を示した。腺房腔が開大し、分泌顆粒の増多を認め、粗面小胞体が同心円上に配列した円形の小体が出現した。結紮3日では腺房細胞にアポトーシスを認めた。すなわち、核のDNAの断片化を示す腺房細胞が組織全体に散在性に出現するとともに、透過型電子顕微鏡によって腺房細胞の核のクロマチン凝集像と胞体の分断が観察され、さまざまな細胞残骸を食食したマクロファージが多数出現した。このときを境に腺房細胞の数は急激に減少し、結紮7日までに消失した。一方で、結紮3日で介在部導管細胞、腺房中心細胞に細胞分裂像が出現し、導管系細胞の数は2倍に増加した。結紮7

日では腺房細胞は消失し、小葉は不規則に開大した管腔を持つ導管細胞の集族、すなわち小臍管様構造で占められた。この構造を構成する細胞には多数の細胞分裂像が観察され、ときにDNAの断片化を示す細胞も認められた。導管細胞の数は以後ゆっくりと減少した。

結紮14日以降では小臍管様構造の周囲に幼若な脂肪細胞が出現し、これらの細胞は次第に成熟して、結紮8週では脾臓の体積は正常脾の体積と同様となるまで増加した。このとき小葉内はほとんどが脂肪組織で占められ、残った小臍管様構造と、形態変化を認めなかったランゲルハンス島が小葉の中心部に島状に分布した。中枢側の小葉間導管は高度の拡張を示していたが、末梢の小葉内導管はときに内腔を失い索状に観察された。

【 考 察 】

腺房細胞のアポトーシス発現

臍管閉塞によって、腺房細胞はアポトーシスを発現し脾組織から消失する。この結果、臍外分泌部は萎縮する。組織形態の維持において、アポトーシスは細胞分裂と相補的な役割をになうとされる。すなわち、生体組織を構成する細胞の数は細胞死と細胞増殖のバランスの上で維持される。本研究は、臍管結紮後の腺房細胞の量的変化を明らかにし、消失にむかう腺房細胞の超微形態変化の過程、消失の開始点とその進行をはじめて明確にした。臍管結紮は臍液の排出障害と臍管内停留を引き起こし、この結果、臍管内圧は上昇する。管腔内圧の上昇は、まず腺房細胞の分泌顆粒の放出抑制をもたらす。さらに、この放出抑制は粗面小胞体の機能の不要化による変形と配列不全をもたらすと考える。結紮3日までは、このような細胞小器官の変化を認めるものの、腺房細胞の総数には変化がなかった。結紮3日で腺房細胞にDNAの断片化が出現すると、典型的なアポトーシス像が観察され、腺房細胞の数は急速に減少した。この結果は、DNAの断片化が細胞にとって不可逆的な変化であり、アポトーシスの起点であることを示す。外分泌機能を営む腺房細胞では、分泌機能の阻害とこれにともなう細胞小器官、とくに粗面小胞体の機能停滞の継続が細胞自体の自己処理機構、すなわちアポトーシスの発現に関わると考える。

小臍管様構造の出現と増生、退縮

腺房細胞が消失した小葉は小臍管様構造で占められる。この構造は、ヒト慢性脾炎の特徴所見のひとつとされる拡張小臍管の集族と同様である。また、動物では種々の脾炎実験でも観察され、臍外分泌部荒廃の末期像と考えられている。今回の検討結果は、小臍管様構造が介在部導管細胞と腺房中心細胞の集族であることを示す。発生学的に、導管細胞は腺房細胞の幹細胞であると考えられている。したがって、小臍管様構造は、導管系細胞が増殖能力の高い未分化な幹細胞として、失われた脾組織を再生修復するために細胞増殖活性の亢進を示し、集族したものであるとみなされる。しかし、結果が示すように、臍管閉塞の継続は腺房細胞、導管細胞のいずれにもアポトーシスをもたらす。導管細胞は複製を行うため、細胞の数は複製と消失のバランスを保って維持され、長期間継続して小葉内にとどまって小臍管様構造の形態をとりつづける。

小葉の脂肪組織化

小臍管様構造が退縮するとともに小葉の周辺部には脂肪細胞が観察され、臍管結紮後16週では、小葉は脂肪組織で占められた。これは病理学的に脂肪浸潤あるいは脂肪置換とよばれる組織像と類似する。今回の結果から、脂肪細胞の増生と肥大は、腺房細胞の消失による脾臓の萎縮をおぎなう印象をうける。萎縮脾で小葉内に観察される泡沫状の胞体を持つ細胞は幼若な脂肪細胞とみなされる。結紮4週での脂肪細胞の分布様式は、脂肪細胞が小臍管様構造に近接する場で生じ、次第に成熟して大きさを増していくことを示唆する。この過程は脾小葉の脂肪組織化と呼ぶべき変化である。

【 結 語 】

- 1) 膵管閉塞による膵管内圧の上昇により、腺房細胞は分泌機能の停滞をきたし、ついで、核内DNAの断片化を起こしてアポトーシスが発現し、マクロファージによって処理され、膵組織から除去される。この結果、膵臓は著しく萎縮する。
- 2) 介在部導管細胞と腺房中心細胞は増殖像を示し、萎縮した小葉内で小膵管様構造を形成する。この細胞増殖能の亢進は、小膵管様構造が腺房細胞への分化能をもつ未分化細胞の集団であることを示唆する。
- 3) 結紮後長期では、小膵管様構造は退縮し、小葉内脂肪細胞の増生と肥大によって膵は脂肪組織化する。
- 4) 立体解析学を用いた総細胞量の評価から、細胞の消失と増殖を直接的に立証できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 阿 部 和 厚

学 位 論 文 題 名

マウス膵管結紮後の膵外分泌部の変化

－定性ならびに定量組織学的検討－

膵管の狭窄や閉塞は、膵炎の進行において、重要な役割を演じると考えられている。また、膵管閉塞を原因とする膵の病理学的変化は、閉塞性慢性膵炎として分類される。膵管閉塞にともなう膵の変化を明らかにすることは、これらの疾患の病態の理解につながるものと考えられる。さらに、臓器機能に関わって変化を追求するためには、臓器全体での変化を明らかにする必要がある。本研究は膵臓全体を対象とした組織学的観察と形態計量学的検討、さらに酵素組織化学的手法によるDNA断片化の検出と、透過型電子顕微鏡を用いた超微形態変化の検討から、膵管閉塞による細胞・組織変化の詳細と全体像を明らかにすることを目的とした。

実験動物には雌性ddマウスを用いた。マウスの膵臓の分葉中、最大の体積を持つ脾臓葉からの膵管を結紮し、結紮後1日から16週までの結紮葉における細胞および組織変化を検討した。膵臓全体の連続切片を作成し、膵外分泌部の細胞の高さ、細胞分裂数、核密度を計量組織学的に求め、立体解析学を用いて、膵外分泌部の体積、外分泌部を構成する細胞の総数の変化を評価した。さらに、ニックエンドラベル法によって、組織切片上で核内DNAの断片化を酵素組織化学的に検出し、透過型電子顕微鏡を用いて細胞の超微形態変化を検討した。

膵管結紮後、膵臓の体積は浮腫によって2日まで軽度増加したが、以後7日までに体積は著しく減少した。この期間、外分泌部の体積は正常の10%以下まで減少した。結紮2日までの腺房細胞は膵管内圧の上昇による分泌機能の停滞を示した。腺房腔が開大し、分泌顆粒の増多を認め、粗面小胞体が同心円上に配列した円形の小体が出現した。結紮3日では腺房細胞にアポトーシスを認めた。すなわち、核のDNAの断片化を示す腺房細胞が組織全体に散在性に出現するとともに、透過型電子顕微鏡によって腺房細胞の核のクロマチン凝集像と胞体の分断が観察され、さまざまな細胞残骸を貪食したマクロファージが多数出現した。このときを境に腺房細胞の数は急激に減少し、結紮7日までに消失した。一方で、結紮3日で介在部導管細胞、腺房中心細胞に細胞分裂像が出現し、導管系細胞の数は2倍に増加した。結紮7日では腺房細胞は消失し、小葉は不規則に開大した管腔を持つ導管細胞の集族、すなわち小膵管様構造で占められた。この構造を構成する細胞には多数の細胞分裂像が観察され、とき

にDNAの断片化を示す細胞も認められた。導管細胞の数は以後ゆっくりと減少した。結紮14日以降では小膵管様構造の周囲に幼若な脂肪細胞が出現し、これらの細胞は次第に成熟して、結紮8週では膵臓の体積は正常膵の体積と同様となるまで増加した。このとき小葉内はほとんどが脂肪組織で占められ、残った小膵管様構造と、形態変化を認めなかったランゲルハンス島が小葉の中心部に島状に分布した。中枢側の小葉間導管は高度の拡張を示していたが、末梢の小葉内導管はときに内腔を失い索状に観察された。

以上の結果より、膵管閉塞にともなう膵外分泌部の変化の過程が明らかとなった。膵管閉塞によって、腺房細胞は細胞機能の停滞を示し、次いでアポトーシスを発現し膵組織から消失する。この結果、膵外分泌部は著しく萎縮した。一方、導管細胞は増殖によって、小膵管様構造を形成し、これらの細胞は細胞増殖と細胞死を示し、萎縮した小葉で長く形態を維持した。小葉内の間葉系細胞は脂肪組織への分化増生を示し、膵臓の脂肪組織化をもたらした。

公開発表では、まず、井上芳郎教授から、膵管閉塞による膵腺房細胞のDNA断片化と核の形態学的変化の関係、アポトーシス発現にいたる情報伝達系とマクロファージの関与についての質問があった。高橋利幸講師は臨床における慢性膵炎の病理学的変化の因子として膵管閉塞の関与を質問し、小山富康教授は本実験モデルでの循環障害の関与、閉塞解除を解除した際の間葉系細胞の動態について質問した。さらに、安保義恭医学博士が導管細胞の細胞死の解釈を質問し、寺沢浩一教授は導管の側副路形成の可能性について質問した。阿部和厚教授は細胞小器官の超微形態変化の解釈、アポトーシス発現のトリガーの存在、導管細胞の細胞分裂と細胞死の関係について質問した。加藤紘之教授は生命現象に関するアポトーシスの概念の解釈の提示を求めた。いずれの質問に対しても、申請者はおおむね妥当な回答をした。

詳細な細胞、組織学的観察とともに、臓器全体の細胞の量的変化を明らかにして、膵管閉塞にともなう細胞動態をはじめて明確にした本研究の成果は高く、審査員一同は協議の結果、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。