

学 位 論 文 題 名

ストレプトゾトシン投与マウスにおける
膵ランゲルハンス島の変化

学位論文内容の要旨

I. 目 的

糖尿病の膵内分泌部ランゲルハンス島（ラ島）の変化を理解するために，実験的糖尿病を発生させるストレプトゾトシン（S Z）をマウスに投与し，膵臓を経時的に観察した．とくにインスリン分泌量に関連して，すべてのラ島が観察できるように，一定間隔の膵全体の連続切片を作成し，切片上のすべてのラ島を計測し，ラ島の直径，総数，総体積と内分泌細胞の種類による量的変化を立体組織定量学的に求めた．

II. 材 料 と 方 法

動物は雌性dd-マウス総計75匹を用い，正常対照群（例数=15，正常マウスを生後5，7週齢で屠殺した対照群），S Z投与群（例数=50，生後5週齢で150mg/kgのS Z（ $C_8H_{15}N_3O_7$ ）を1日1回，連続2日間腹腔内注射後3，6，12時間，1，2，3，7，14日で屠殺した群），生理的食塩水投与群（例数=10，生後5週齢で生理的食塩水を同様の手技で注射後14日で屠殺した群）の3群にわけた．マウスを屠殺する際には血糖値を測定した．

各齢期5例ずつのマウスについて，膵全体の連続切片を作成し，切片はヘマトキシリン-エオジン染色，アルデヒド-フクシン染色を行い，光学顕微鏡で観察した．免疫組織化学的染色ではA細胞，B細胞，D細胞を同定した．

組織学的立体定量では，200 μ m間隔の膵臓全体の切片上のすべてのラ島の面積を計算し，その平均値と切片の厚さ，切片間隔をもとにラ島の直径，総体積，総数を求めた．さらに，膵臓の免疫組織化学的染色を行ったマウス1匹当たり20個のラ島を任意に選び，A，B，D細胞の比率から各細胞の総体積を算出した．

III. 結 果

血糖値は，正常では 210 ± 50 mg/dlであったが，S Z投与後3日目まで急速に上昇し，平均約500mg/dlとなった．その後の血糖の上昇はわずかであった．

アルデヒド・フクシン染色でインスリン分泌細胞であるB細胞がラ島の大部分を占めた．S Zを投与すると，12時間後で多くのB細胞の核が濃縮し，くびれたり，分断されていた．1日ではラ島内に多数のマクロファージが出現し，分断したB細

胞の胞体を貪食していたが、3日であまり見られなくなった。14日後では、明らかなB細胞の染色性を示す胞体はほとんどなかった。

免疫組織化学的染色：構成細胞数の少ない小さなラ島をみると、正常で切片上の直径が $30\mu\text{m}$ 以下のラ島は、B細胞のみで構成され、 $30\sim 50\mu\text{m}$ 以下のラ島では、B細胞以外の細胞は少数であった。SZ投与後、切片上で直径 $30\mu\text{m}$ 以下のほとんどのラ島は、A細胞のみで構成されていた。また、腺房細胞間に孤立して散在するA細胞もしばしば観察された。B細胞のみで構成されたラ島はなかった。

隣接切片で免疫組織化学的染色とアルデヒド・フクシン染色を施しB細胞の染色性を観察すると、正常のB細胞はすべて十分な染色性を示したが、SZ投与後14日後のB細胞は様々に染色性が低下していた。

ラ島の直径、総数、総体積は、SZ投与後1日より減少し、3日でそれぞれ正常の86.6%、79.6%、51.9%となり、それ以降は緩徐に減少した。A細胞の総体積はほとんど変化しなかったが、B細胞とD細胞の総体積はそれぞれ3日後で正常の約24%、86%に減少し、14日後では正常の約11%、76%となった。

IV. 考 察

これまでラ島の大きさ、総数、総体積の変化は、すべて、膵の一部の切片におけるラ島の大きさと数を計測し、計算されてきた。この値は膵臓内でラ島が均等に分布する場合には正しいが、実際には、ラ島の分布は膵臓内で不均一であるので、これまでの方法では正しい値を算出することはできない。また、ラ島の大きさも、これまででは一部の切片に出てくるもののみを計測しているのので、立体計量的に正しくは求められていない。さらに、ラ島の数そのものについても切片に出てくる数で全体の数を論じているが、大きさが変化する場合、切片に出現する数のみでは立体としてのラ島の数を正しくは求められない。

ここでは、ラ島の大きさと総数および総体積を求めるため、一定間隔で膵全体の連続切片を作成し、切片上に現れたラ島のすべてを計測した。これによって、分布にかたよりのあるラ島の大きさ、総数、総体積を正確に評価できるようになった。

ラ島の大きさの変化を加味したラ島の総数は、SZ投与により減少し、一週で正常の約3分の2となった。SZ投与後3日でラ島の直径と総数の両者が著明に減少したことは、ラ島のあるものが縮小し、消失することを示唆する。

ラ島の構成細胞については、B細胞はSZ投与後、核が濃縮し、マクロファージに貪食され消失した。このことはB細胞の消失過程がアポトーシスによることを強く示唆する。

ラ島の消失過程をみると、まず、B細胞のみで構成されていることが多い $30\mu\text{m}$ 以下のラ島で、SZ投与後B細胞が消失した。一方、SZ投与後、A細胞のみの小さなラ島と、腺房細胞間に散在性に孤立してA細胞が出現したことは、正常で少数ながらA細胞が存在する直径 $30\sim 50\mu\text{m}$ のラ島のB細胞が消失してA細胞のみになることを推察させる。すなわち、正常で切片上の直径が約 $50\mu\text{m}$ 以下の小型ラ島は、SZ投与により消失する可能性がある。

一方、中型以上のラ島はSZ投与後縮小し、ラ島内のB細胞は様々に染色性が低下した。B細胞の様々な染色性の低下は、B細胞のインスリン顆粒の量が様々に減少したことを示唆する。つまり、SZ投与により、B細胞は数が減少するのみならず、残ったB細胞の内分泌機能が低下することが推察される。

V. 結 語

1. 膵臓全体の一定間隔の連続切片を作成して切片上のすべてのラ島を計測することにより、ラ島の大きさと総数の評価が可能となり、ストレプトゾトシン投与によるランゲルハンス島の縮小と消失をはじめて明らかにした。この手法により、大きさと分布が不均一な粒体組織の直径と総数が評価できるようになった。
2. ストレプトゾトシン投与により、ラ島の一部のB細胞は消失し、残存B細胞のインスリン顆粒は減少した。このことは、糖尿病膵ではB細胞の総数が減少し、残存B細胞の機能が低下していることを示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 阿 部 和 厚
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

ストレプトゾトシン投与マウスにおける 膵ランゲルハンス島の変化

糖尿病は、膵ランゲルハンス島（ラ島）のB細胞から分泌されるインスリンの絶対的な不足に基づいた疾患である。この際、ラ島が縮小、消失していくことが考えられるが、切片からは不明確であり、膵全体で定量化されたことはない。そこで本研究は、ストレプトゾトシン（SZ）で糖尿病モデルを作成し、ラ島の組織学的変化およびその進行を定性ならびに定量的に明らかにすることを目的とした。

動物は5週齢の雌ddマウス総計75匹を用い、正常対照群（例数=15、正常マウスを生後5、7週齢で屠殺した対照群）、SZ投与群（例数=50、生後5週齢で150mg/kgのSZ（ $C_8H_{15}N_3O_7$ ）を1日1回、連続2日間腹腔内注射後、3、6、12時間、1、2、3、7、14日で屠殺した群）、生理的食塩水投与群（例数=10、生後5週齢で生理的食塩水を同様の手技で注射後14日で屠殺した対照群）の3群にわけた。マウスを屠殺する際には血糖値を測定した。各齢期5例ずつのマウスについて、膵全体の200 μ m間隔の連続切片を作成し、切片はヘマトキシリン・エオシン染色、アルデヒド・フクシン染色またはA、B、D細胞を同定する免疫組織化学的染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

組織学的立体定量では膵臓全体の連続切片から、すべてのラ島の面積を計測し、立体解析学を応用した新たな手法により、ラ島の直径、総数、総体積を求めた。さらに、免疫組織化学的染色切片を用いて、A、B、D細胞の総体積を求めた。

その結果、血糖値は、正常では 210 ± 50 mg/dlであったが、SZ投与後3日目まで急速に上昇し、平均500mg/dlとなった。その後の血糖の上昇はわずかであった。

ラ島は大きさと膵臓内での分布が不均一であった。アルデヒド・フクシン染色標本では正常のB細胞は紫色に明瞭に染色され、ラ島の大部分を占めていた。SZを投与すると、12時間後で多くのB細胞の核が濃縮し、胞体の染色性が低下していた。1日後のB細胞は、胞体が分断し、マクロファージに貪食されているものが多く観察された。

免疫組織化学的染色標本では、正常で、切片上直径50 μ m以下のラ島は、B細胞以外の内分泌細胞はごく少数であった。SZ投与後、切片上直径30 μ m以下のラ島は、ほとんどがA細胞であった。

隣接切片でアルデヒド・フクシン染色と免疫組織化学的染色を行い、比較すると、正常のB細胞はすべて十分な染色性を示したが、SZ投与14日後では、B細胞は様々に染色性が低下していた。

定量的変化では、ラ島の直径、総数、総体積は、SZ投与3日後でそれぞれ86.6%、79.6%、51.9%に急速に減少し、その後の減少は緩徐となった。B細胞の総体積は3

日後で正常の24%, 14日後で11%に減少した。A, D細胞の総体積はあまり変化がなかった。

以上の結果から, S Z 投与による糖尿病膵のラ島の量的変化の進行を明らかにできた。本研究の膵全体の切片における計測手法は, 大きさと分布が不均一なラ島の定量に有用であった。

口頭発表において, 浅香正博教授より, ヒトとマウスの膵臓の解剖学的な相違, 実験動物の選択, S Z のB細胞に対する障害機序ならびに障害特異性, 糖尿病マウスの血中インスリン濃度とA細胞の機能亢進の有無, S Z 障害ラ島とインスリン依存性, 非依存性糖尿病のラ島について, 阿部和厚教授より, ヒトの糖尿病の膵ラ島の定性定量的病理所見と内分泌細胞の染色性, S Z 投与マウスのB細胞の大きさの変化, B細胞の染色性の低下の意味, A細胞の変化, ラ島の大きさの分布について, 加藤紘之教授より, B細胞の消失過程, ヒトとS Z 投与マウスにおける糖尿病の相違点, ヒトのラ島定量への臨床応用についての質問があったが, 申請者はおおむね妥当な回答をした。

大きさと分布が不均一なラ島の変化をはじめて定量化し, 形態学的にラ島の機能低下を評価なしえた本研究の意義は大きく, 審査員協議の結果, 本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと判定する。