

単離方法がめん羊膵島の組織学的構造におよぼす影響

日 高 智

家畜生産科学科肉畜肥育学研究室

1. 目 的

めん羊や牛などの成反芻家畜において、主要なエネルギー供給源は、第一胃発酵産物である低級脂肪酸である。また、反芻家畜では、単胃動物と異なり、膵島B細胞からのインスリン分泌は、第一胃発酵産物である酪酸やプロピオン酸などの低級脂肪酸によって刺激されることが特徴的である。さらに、反芻家畜の膵島B細胞からのインスリン分泌は、交感神経や消化管ホルモンなどによっても調節されており、膵島の内分泌機能を生体内で単純化して解析することは困難である。

これまでに、反芻家畜の膵島の機能を *in vitro* で解析した報告は少なく、Sasakiら¹⁾がめん羊の膵切片からのインスリン分泌におよぼすグルコースと酪酸の影響を、JordanとPhillips²⁾がめん羊の単離膵島からのインスリン分泌におよぼすVFAの影響を報告しているにとどまっている。

Lacyら³⁾は、ベルクロを用いてこれまで困難とされていた牛やブタの膵臓からの膵島の単離方法を報告している。そこで、めん羊の膵内分泌機能の *in vitro* での解析の手始めとして、Lacyらのベルクロ法をめん羊に適用し、動物の月齢および消化に用いたコラゲナーゼ濃度の違いが膵島の単離状況および組織学的構造におよぼす影響を検討し、めん羊に適した膵島単離方法を確立することを目的とした。

2. 方 法

サフォーク種めん羊10カ月齢雌1頭(体重37.4 kg)、22カ月齢雌1頭(体重42.2 kg)、および60カ月齢雌2頭(平均体重73.0 kg)の計4頭を供試した。

動物を放血屠殺後、ただちに膵臓を摘出し、膵臓の尾部および体部に19 Gの注射針を装着した50 mlの注射筒で10%牛胎子血清(FBS)とアプロチニン450 KIU/mlを含む4℃のハンクス氏液200 mlを数カ所から注入し、十分に膨化させた。膨化させた膵臓から漿膜や脂肪組織および血管などの不用組織を取り除き、細切した膵組織をシリコナイズしたベルクロ(マジックテープ)のフックに密着させた。

ベルクロの膵片の着いた面を内側にして50 mlプラスチック遠心管に入れ、コラゲナーゼと10% FBSを含むハンクス氏液20 mlを加えて密栓し、37℃恒温振盪槽に入れ、遠心管の長軸方向に振盪(160回/分)し、コラゲナーゼ消化を行った。消化に用いたコラゲナーゼ濃度は、425、850、および1,700 U/mlとし、それぞれ低、中および高濃度とした。消化時間は、はじめ3分間継続し、消化終了後、消化後のコラゲナーゼ液を他の遠心管に移し、1,000 rpmで1分間、4℃で遠心した。上澄みのコラゲナーゼ液を再びベルクロの入った遠心管に戻し、その後1分または2分ごとの消化を繰り返す。

返した。遠心で得られた沈澱物を10% FBSを含むハンクス氏液で洗浄した後、ただちに2% グルタルアルデヒドで固定し、0.2 M リン酸緩衝液中で保存した。これらをパスツールピペットでシリコナイズした6穴ホールスライドガラス上に移し、各消化時間当たりの単離膵島個数を実体顕微鏡下で計数した。

2% グルタルアルデヒドで固定した全サンプルをアガーで固化した後、常法に従って5 μ m のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、顕微鏡下で観察した。

3. 結果と考察

単離された膵島は、実体顕微鏡下で灰白色、卵円形であった。

消化時間の経過に伴うめん羊膵臓からの単離膵島数の変化を表1に示した。表1に示すように、若い動物ほど単離膵島数が多い結果となった。膵臓1gあたり、消化時間1分間あたりの単離膵島数を10カ月齢(No. 1羊)と22カ月齢(No. 2羊)とで比較するとコラゲナーゼ高濃度消化ではそれぞれ前者が10.4個、後者が6.7個であり、中濃度消化では22カ月齢が3.9個であったのに対して、60カ月齢(No. 3, 4羊)ではそれぞれ2.2個および2.4個と少なかった。

表1. 消化時間の経過に伴うめん羊膵臓からの単離膵島数の変化

羊 No.	月 齢	コラゲ ナーゼ 濃 度 (U/ml)	消 化 時 間 (分)			計	単離膵島数*
			0~5	6~11	12~17		
1	10	425	45	178	288	511	5.4
		1,700	193	335	539	1,067	10.4
2	22	850	22	143	193	358	3.9
		1,700	109	221	312	642	6.7
3	60	850	47	78	58	183	2.2
4	60	850	63	66	51	180	2.4

*: 膵臓1gあたり、消化時間1分間あたりの単離膵島数

月齢が高くなるに従い、単離膵島数が減少したことは、膵島の腺実質あたりの膵島数の減少も一因と考えられるが、月齢に伴って小葉間結合組織が発達するため、コラゲナーゼによる結合組織の消化が不十分で、このことが高月齢のめん羊での膵島の単離を困難にしているものと推定された。

また、消化液中のコラゲナーゼ濃度が高いほど単離膵島数が多い結果となった。No. 1羊の高濃度消化と低濃度消化での膵臓1gあたりの単離膵島数を比較すると、前者は176個であり、後者は91個であった。また、No. 2羊の高濃度消化(計114個)と中濃度消化(計66個)との間においても差がみられた。

これらの成績から、めん羊の膵島は動物の月齢が同じであればコラゲナーゼ濃度が高いほど単離されやすいことが明らかとなった。

しかし、コラゲナーゼは、単離膵島の機能に障害を与えることが知られていることから、次に単

離された膵島と消化過程の膵臓組織を組織学的に観察し、検討した。

コラゲナーゼを低濃度で消化を行うと、外分泌組織の崩壊はほとんどなく、小葉間結合組織の消化も緩やかに進んでいた。膵島は、その組織構造をよく保っていた。

中濃度での消化では、外分泌組織は低濃度で消化したものよりは、周囲を囲む結合組織の消化が進んでおり、軽度な組織の崩壊があった。膵島を囲む結合組織は外分泌細胞を囲む結合組織と同様な消化状態であった。膵島の組織構造は、その周辺に位置する細胞がわずかに崩壊していた。

高濃度での消化では、外分泌組織および膵島とも組織の崩壊が著しく、膵島周辺部の細胞が脱落していた。

これらのことから、ベルクロ法における消化液中のコラゲナーゼ濃度の違いは、膵島の組織学的構造に大きな影響をおよぼすことが推察された。

本研究の結果から、めん羊膵島の単離には、低月齢の動物を供試して、比較的膵島に対する障害の少ないコラゲナーゼ濃度 425~850 U/ml での消化が適していると考えられた。

今後さらに、めん羊の単離膵島に適した培養液の検討を行い、*in vitro* 実験系の確立が必要であろう。

4. 文 献

- 1) Sasaki, Y., T. E. C. Weewks and J. B. Bruce, (1977). *J. Endocr.*, 72, 415-416.
- 2) Jordan, H. N. and R. W. Phillips, (1978). *Am. J. Physiol.*, 234, E162-167.
- 3) Lacy, P. E., E. T. Lacy, E. H. Finke and Y. Yasunami, (1982), *Diabetes*, 31, Suppl. 4, 109-111.