

## ラット膵島のB細胞顆粒における分泌動態に関する形態学的研究

岡田 陽<sup>1)</sup>・竹花 一成<sup>1)</sup>・額爾敦朝魯<sup>1,2)</sup>  
小林 中<sup>1)</sup>・植田 弘美<sup>1)</sup>・岩佐 憲二<sup>1)</sup>

### Secretary Process Examined Morphologically in B-cell Granules of the Rat Pancreas Islet

Akira OKADA<sup>1)</sup>, Kazushige TAKEHANA<sup>1)</sup>, EERDUNCHAOLU<sup>1,2)</sup>,  
Ataru KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Hiromi UEDA<sup>1)</sup> and Kenji IWASA<sup>1)</sup>  
(June 1999)

#### 緒 論

腺細胞には、分泌顆粒の構成成分であるアミノ酸などを周囲の結合組織の組織液から摂取し、細胞内で合成した分泌顆粒を腺腔から導管へ放出する外分泌細胞と、合成した分泌顆粒を再び周囲の結合組織へ放出する内分泌細胞がある。内分泌腺細胞は標的器官の活動に一定の変化を与える化学物質の総称であるホルモンを産生する。膵内分泌部ではA細胞はグルカゴン、B細胞はインスリン、D細胞はソマトスタチン、PP細胞は膵ポリペプチドホルモンを産生している<sup>2,14-16)</sup>。

ホルモンの形成は、内分泌細胞がその構成成分であるアミノ酸などを毛細血管から摂取することから始まる。B細胞の場合、粗面小胞体とゴルジ装置で分泌顆粒の形成が行われ細胞膜から開口分泌により周囲の結合組織に放出される<sup>1,2,14-16)</sup>。この一連の分泌物の放出過程において、細胞内での輸送機構は重要なものである。この細胞内輸送のメカニズムとして現在もっとも支持されているものは、微小管に沿って分泌顆粒がゴルジ装置から細胞膜直下に運ばれるというもので、神経軸索における膜小器官の輸送に相当する<sup>10)</sup>。ペプチドホルモン分泌細胞においては、細胞膜直下に多数存在する微細線維の層によって分泌顆粒が容易に細胞膜に近づくことが出来ないために分泌調整が行われることが明らかにされている<sup>11)</sup>。

Lacyら<sup>3)</sup>はB細胞内の分泌顆粒(B細胞顆粒)が

微小管によって細胞膜に向かって輸送され、微細線維の層を通過し、エクソサイトーシスによって放出される機構を明らかにした。また、Malaisseら<sup>5)</sup>は微細線維を破壊するサイトカラシンBをB細胞に反応させた場合、分泌は増加したが、微小管を減少させるコルヒチンやビソクリスチンを反応させた場合、分泌が抑制されることを明らかにし、さらに微小管の重合や脱重合、微細線維の架橋の変化による輸送機構の存在を報告した。これらのB細胞顆粒の細胞内輸送調節に関する研究は、細胞膜直下の細胞骨格としての微細線維の層(cell web)に限局して行われてきた。

本研究では、分泌促進剤として細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させ、さらに強力なインスリン分泌作用を持つ塩酸アルギニンを使用し、細胞全体の分泌顆粒の輸送動態を形態学的方法を用いて明らかにした。

#### 材料および方法

材料はWister系ラット(雄、2カ月齢、体重400~500g)20匹を用いた。それらを薬物投与群(2分後、15分後、30分後)と対照群の4群各5匹に分けて用いた。ペントバルビタール(40mg/kg)麻酔下で開腹し、塩酸アルギニン(0.1g/kg)を後大静脈に直接投与し各群の膵臓(膵左葉)を採取した。対照群は薬物投与を行わないものとした。採取した膵臓は直ちに細切し、3%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムによる二重固定を施し、定法に従いQuetol 812に包埋して超薄切片作成後、酢

<sup>1)</sup> 酪農学園大学獣医学部獣医解剖学教室  
Department of Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

<sup>2)</sup> 内蒙古農業大学獣医学部獣医解剖学教室  
Department of Veterinary Anatomy, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, IM 010018, China

酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を行い、透過型電子顕微鏡により観察した。また各群における血中インスリン濃度測定のために同時に採血も行い、測定結果はマイクロソフト・エクセルに入力し、平均と標準偏差を得た。

分泌顆粒の移動と放出に関する形態学的計測方法は Perrier-Barta の方法<sup>9)</sup>に基づき、細胞内分泌顆粒の位置を5つの領域(領域1:顆粒の限界膜が細胞膜と融合している細胞質領域, 領域2:顆粒が細胞膜と融合せず細胞膜から118 nm以内の cell web の内側に位置する細胞質領域, 領域3: cell web の下方590 nmまでの範囲の細胞質領域, 領域4:領域1, 2, 3以外の細胞質領域, 領域5:細胞質全域)に区別した(図1)。各領域における分泌顆粒数は10,000倍に引伸ばした顕微鏡写真を基に、写真の中に完全に含まれるものを用いた(図2)。各領域における単位面積あたりの顆粒数は、細胞質100  $\mu\text{m}^2$ あたりの平均値で示した。また、相対的濃度とは顆粒の細胞内分布の状態を表し、領域5の単位面積あたりの顆粒数に対する各領域の単位面積あたりの顆粒数の割合で示した<sup>9)</sup>。各領域の単位面積あたりの顆粒数および相対的濃度の値はマイクロソフト・エクセルに入力し、t-検定を行った。

## 結 果

### 1. 膵島および各種膵島細胞の形態学的観察

対照群と投与群共に膵島は直径50~100  $\mu\text{m}$ 程度の大きさで多角形を示し、外分泌部から区別されて観察された。A細胞は主に膵島周辺部分、B細胞は主に膵島中央部分、D細胞は膵島の周辺部分にA細胞と混在して分布していたが数は少なく、膵島内でD細胞が観察されない場合もあった。PP細胞は同定することは出来なかった。B細胞の核は球形または不定形で1~2個の核小体と比較的よく発達した粗面小胞体を有していた。ゴルジ装置も発達がよく、しばしば分泌顆粒を形成している像も観察された。B細胞顆粒は限界膜で囲まれ直径300 nm程度の大きさで中電子密度のコアとその周囲に広い間隙を有しており、しばしば開口分泌像も認められた(図3, 4)。

### 2. 塩酸アルギニン投与後のB細胞顆粒の形態と顆粒数の経時的変化

投与2分後ではB細胞顆粒は著しく増数したが大きさには変化はなかった(図5)。各領域の顆粒数は領域1で351.3個, 領域2で253.2個, 領域3で137.3個, 領域4で108.1個, 領域5で138.2個で、

領域2以外では対照群に対して有意差があった( $P < 0.001$ )。投与15分後および30分後ではB細胞顆粒の大きさには変化はなかったが、顆粒数は著しく増加していた。投与15分後の顆粒数は領域1で157.8個, 領域2で293.0個, 領域3で101.4個, 領域4で89.2個, 領域5で109.8個であった。投与30分後の顆粒数は領域1で106.9個, 領域2で278.9個, 領域3で90.4個, 領域4で59.2個, 領域5で81.8個であった。対照群の顆粒数は領域1で87.9個, 領域2で254.6個, 領域3で88.4個, 領域4で53.9個, 領域5で73.0個であった(図6)。

各領域の相対的濃度は投与2分後において領域1では2.5, 領域2では1.8, 領域3では1.0, 領域4では0.8で領域1の濃度は有意に増加し, 領域2の濃度は有意に減少した( $P < 0.001$ )。投与15分後では領域1は1.4, 領域2は2.7, 領域3は0.9, 領域4は0.8となり, 領域1の濃度は有意に増加し, 領域2の濃度は有意に減少した( $P < 0.001$ )。投与30分後での相対的濃度はほぼ対照群と等しく, 領域1は1.3, 領域2は3.4, 領域3は1.1, 領域4は0.7であった。対照群での相対的濃度は領域1では1.2, 領域2で3.5, 領域3で1.2, 領域4で0.7であった(図7)。

### 3. 血中インスリン濃度の経時的変化について

血中インスリン濃度は、投与2分後で $49.3 \pm 8.5 \mu\text{U/ml}$ , 15分後で $19.5 \pm 1.7 \mu\text{U/ml}$ , 30分後で $13.6 \pm 2.4 \mu\text{U/ml}$ , 対照群で $12.48 \pm 3.4 \mu\text{U/ml}$ であった。投与2分後に血中インスリン濃度は有意に増加し、以後徐々に減少し30分後で対照群とほぼ等しくなった(図8)。

## 考 察

本研究の結果よりラット膵島を構成する細胞の分布は膵島中央部にB細胞, 周辺部にA細胞とD細胞が存在し, B細胞顆粒の形態は従来の報告<sup>13)</sup>と同様であった。Perrier-Barta<sup>9)</sup>は胎子ラットのB細胞顆粒の細胞内動態を形態学的に観察し, 加齢に伴う血中インスリン濃度の増加やB細胞顆粒の細胞内分布, すなわち細胞膜と融合する顆粒の増加による cell web の細胞内輸送調節機構の存在を示唆した。今回の結果から細胞質100  $\mu\text{m}^2$ あたりの顆粒数は領域2以外で血中インスリン濃度に同調した変化がみられた。しかし領域2では薬物投与後全ての時間で変化がなかったことから, この部分に存在する cell web は常に一定量の顆粒を保持する性質を有するものと考えられた。また血中インスリン濃度の変

化に同調した領域1と領域2の変化は相対的濃度に相反することから、領域2から領域1への輸送割合に変化があることが推察された。また領域3と領域4で相対的濃度にどの群でも変化がなかったことから、領域3から領域2、領域4から領域3への輸送割合には変化はないと考えられた。すなわち、今回の実験で分泌量の変化に応じて輸送割合が変化したのは領域2のみであり、顆粒数も領域2のみが全ての時間で変化がなかったことから、領域2つまりcell webの部位が顆粒の輸送調節に最も関係していると推察された。

Cell webの超微形態学的研究において、cell webがB細胞顆粒の限界膜と細胞膜の融合を妨げるように働くこと、cell webの構造を破壊することによりインスリン分泌が増加すること、cell webが細胞の機能の状態に合わせてB細胞顆粒の細胞膜への輸送を調節することが報告されている<sup>5-8)</sup>。またOrciら<sup>9)</sup>は、単離臍島をサイトカラシンBで灌流したところ、インスリン分泌量が増加したとともにcell webが崩壊したことを明らかにした。Vitaleら<sup>12)</sup>は分泌を刺激したときに、微細線維切断蛋白が分布する部位と微細線維層が消失する部位、および開口分泌が起る部位が一致していることを報告した。

したがって、本研究では過去の報告<sup>9)</sup>にあるcell webの崩壊による分泌量の増加やcell webの崩壊箇所での開口分泌に加え、cell webに常に一定数の顆粒が存在しており、そしてその輸送割合に変化があった。このことより、cell webは常に一定数の顆粒を蓄積する性質を有し、通過する顆粒に対して微細線維の網眼の大きさを変えることにより通過しやすさを調節し、細胞膜と融合する顆粒の量を調節しているものと推察した。

## 要 約

臍島B細胞顆粒の細胞内輸送動態を明らかにするために、Wister系ラットにインスリン分泌促進因子である塩酸アルギニンを投与した。投与2分後、15分後、30分後の薬物投与群と対照群におけるB細胞顆粒をPerrier-Bartaの分類に従い5つの領域(領域1:限界膜が細胞膜と融合している顆粒の細胞質領域, 領域2:cell webの内側に位置し細胞膜とは融合しない顆粒の細胞質領域, 領域3:cell webの下方590 nmの範囲にある顆粒の細胞質領域, 領域4:領域1, 2, 3以外の細胞質領域, 領域5:細胞質全域)に分け、各領域での単位面積(/100  $\mu\text{m}^2$ )あたりの顆粒数と相対的濃度を算出した。さらに血中インスリン濃度の変化と単位面積(/100  $\mu\text{m}^2$ )あ

たりの顆粒数と相対的濃度との関係を明らかにした。単位面積(/100  $\mu\text{m}^2$ )あたりの顆粒数は領域2で全ての群に有意な変化がなかった。相対的濃度は領域1と2で相反した変化があり、領域3と4で全ての群において有意な変化はなかった。また、血中インスリン濃度の変化と領域1の単位面積(/100  $\mu\text{m}^2$ )あたりの顆粒数および相対的濃度変化は同調していた。

以上の結果から領域2、すなわちcell webにおいて分泌調節が行われると考えられた。

## 文 献

1. 藤田尚男 1986. 腺の分泌はどのように行われるか. 医学のあゆみ 137: 815-820.
2. 石田 均 1997. インスリンの生合成過程と化学構造. 日本臨牀 55 (増刊号): 79-86.
3. Lacy, P.E., Howell, S.L., Young, D.A. and Fink, C.J. 1968. New hypothesis of insulin secretion. *Nature* 219: 1177.
4. Malaisse, W.J. 1973. Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release. *Diabetologia* 9: 167-173.
5. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.M. and Lacy, P.E. 1971. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes* 20: 257.
6. Orci, L., Gabbay, K.H. and Malaisse, W.J. 1972. Pancreatic beta-cell web: Its possible role in insulin secretion. *Science* 175: 1128-1130.
7. Orci, L., Raavazzola, M., Amherdt, M. and Malaisse-Lagae, F. 1973. The cell boundary. pp 104-118. In: Malaisse, W.J., and Pirart, J (eds). *Proceedings of eighth congress of the international diabetes federation*. *Diabetes, Excerpta Medica*, Amsterdam.
8. Ostlund, R.E. 1977. Contractile proteins and pancreatic beta-cell secretion. *Diabetes* 26: 245-254.
9. Perrier-Barta, H. 1983. A morphometric study of the secretory process in the endocrine pancreas of the foetal rat. *Cell Tissue Res.* 229: 651-671.
10. 千田隆夫 1994. 外分泌機能と細胞骨格. 医学のあゆみ 169: 940-941.

11. Senda, T., Okabe, T., Matsuda, M. and Fujita, H. 1994. Quick-freeze deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res.* 277: 51-60.
12. Vitale, M.L., Rodriguez-Del-Castillo, A., Tchakarov, L. and Trifaro, J.M. 1991. Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J. Cell Biol.* 113: 1057-1067.
13. 渡 伸三 1971. 膵臓ランゲルハンス島の微細構造と機能. *細胞* 3: 12-24.
14. 渡 伸三 1981. 膵内分泌の微細構造. pp. 23-38. *膵の形態と機能* 宇宙堂八木書店, 東京.
15. 渡 伸三, 堀田康明, 馬淵良生 1984. 膵内分泌部の超微形態. *細胞* 16: 10-16.
16. 渡 伸三 1988. 膵のすべて. 膵内・外分泌部の超微形態的变化 とくに病的変化を中心に. *医学のあゆみ* 144: 301-306.

### Summary

To clarify the cytoplasmic transport of B granules in the B cell (B granules) of pancreatic island, we administered arginine hydrochloride, an insulin-releasing factor, in Wister rats and examined the B granules 2, 15 and 30 minutes after administration. Along with the B granules counterparts from controls, the B granules were categorized according to the following five regions (Perrier-Barta): (Region 1) the cytoplasmic regions of granules in which the limiting membranes fuse with the cell membranes; (Region 2) the cytoplasmic region of granules located inside the cell web and not fuse with cell membranes; (Region 3) the cytoplasmic regions of B granules which are located 590 nm below the cell web; (Region 4) the cytoplasmic regions other than those described in Regions 1, 2 and 3; (Region 5) all cytoplasmic regions. The number of B granules per  $100 \mu\text{m}^2$  and the relative concentrations in each of the five regions were calculated to clarify the relationship among insulin concentration in the blood, the number of B granules per unit area ( $100 \mu\text{m}^2$ ) and the relative concentrations. Relative concentration was defined. Only in Region 2 did the number of B granules per unit area show no significant differences according to time span differences. Relative concentration was defined as the distribution of B granules expressed in cells relative to the total population of secretory granules.

With the sole exception of Region 2, in all the other four regions the number of B granules per unit area increased markedly with time. The relative concentration in Region 1 was the reverse of that in Region 2. In regions 3 and 4, no important differences occurred in relation to time. In Region 1, changes occurring in insulin concentration in the blood and change in the number of B granules per  $100 \mu\text{m}^2$  synchronized with the change in relative concentration.

Based on these results, which suggest that the cell web (Region 2) consistently has a certain amount of B granules, we believe that the cell web is responsible for secretory regulation.

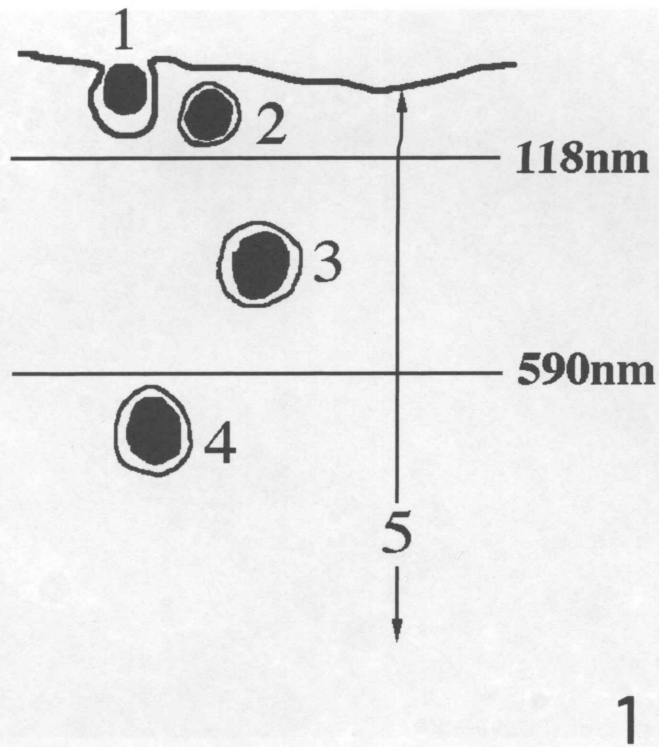


図1 各領域の定義

1：領域1（顆粒の限界膜が細胞膜と融合している細胞質領域）2：領域2（顆粒が細胞膜と融合せず細胞膜から118 nm 以内の cell web の内側に位置する細胞質領域），3：領域3（cell web の下方 590 nm までの範囲の細胞質領域），4：領域4（領域1，2，3 以外の細胞質領域），5：領域5（細胞質全域）

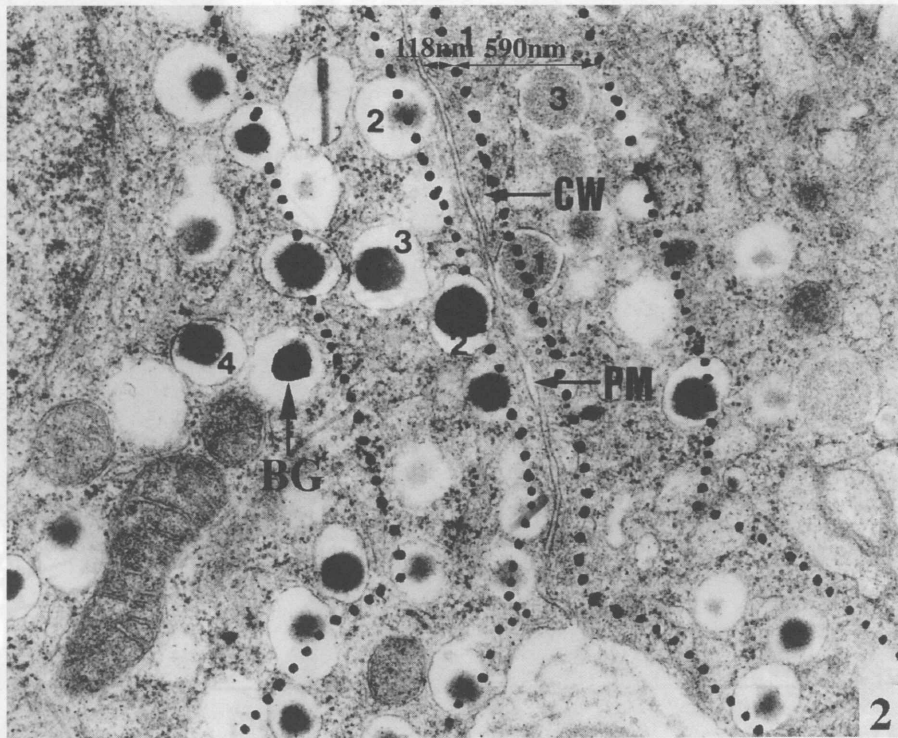


図2 顆粒数計測の実例

1～4は各領域のB細胞顆粒を示す。BG:B細胞顆粒，CW:cell web，PM：細胞膜 ×30,000

1001 図 4 開口分泌像 B細胞顆粒の限界膜と細胞膜が融合し開口分泌されている。×40,000

1002 図 3 B細胞

図 4 開口分泌像

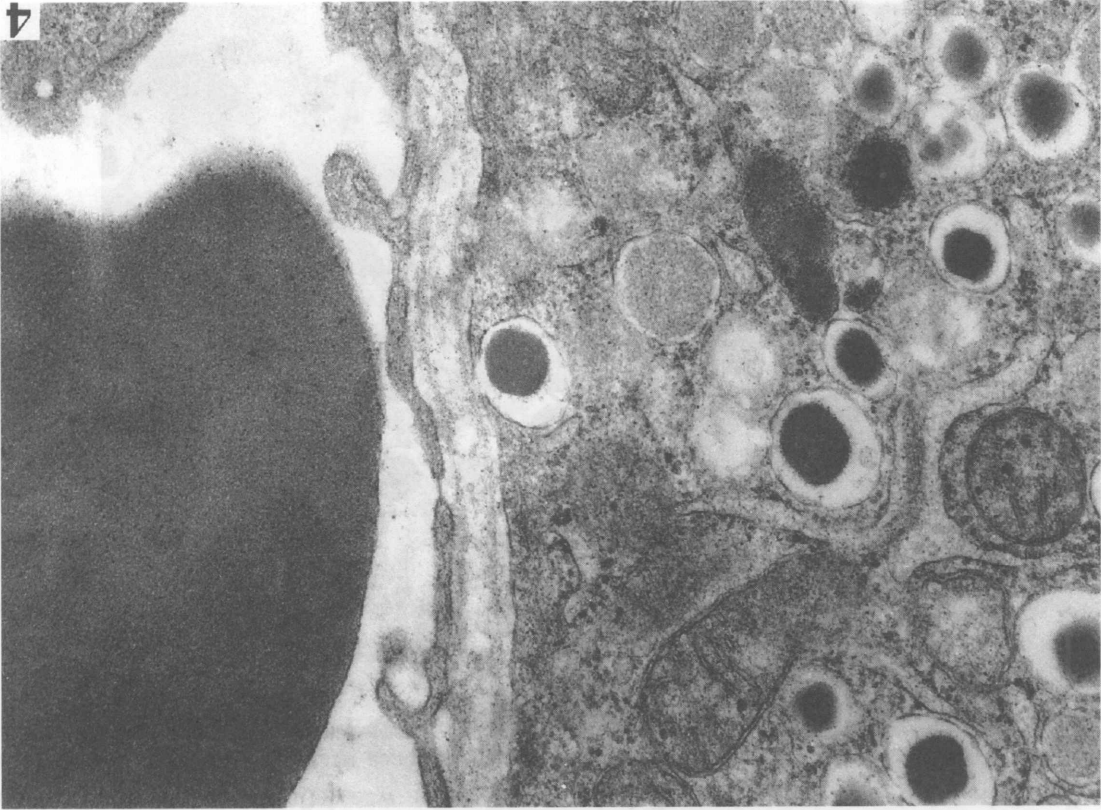
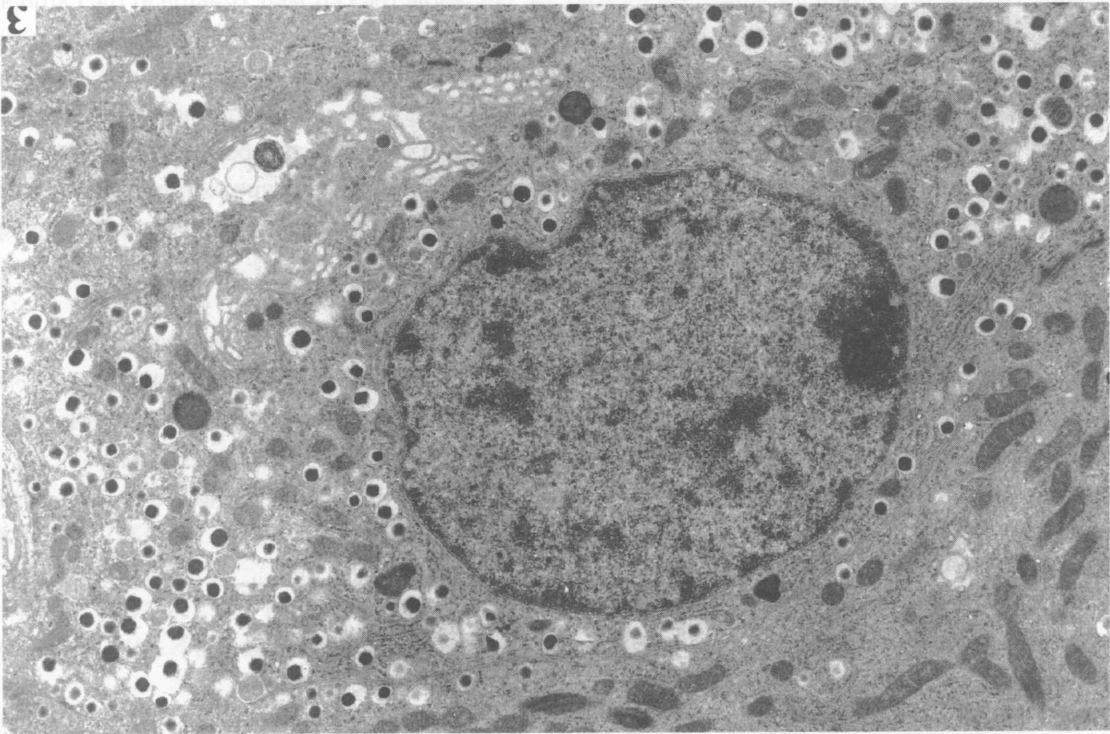


図 3 B細胞  
B細胞顆粒は中電子密度のコアとその周囲に広い間隙を有し限界膜で囲まれ直径約300nmである。×10,000



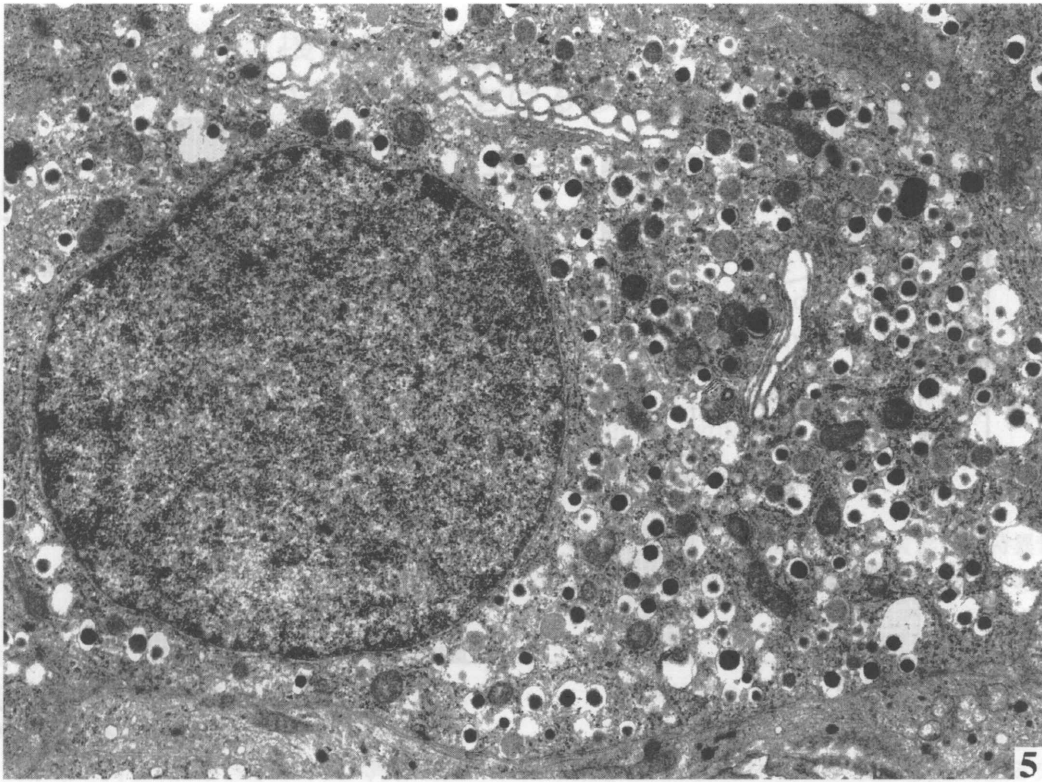


図5 塩酸アルギニン投与2分後のB細胞  
顆粒の大きさには変化はないが、粗面小胞体およびゴルジ装置が発達しB細胞顆粒数も著しく増加している。  
×10,000

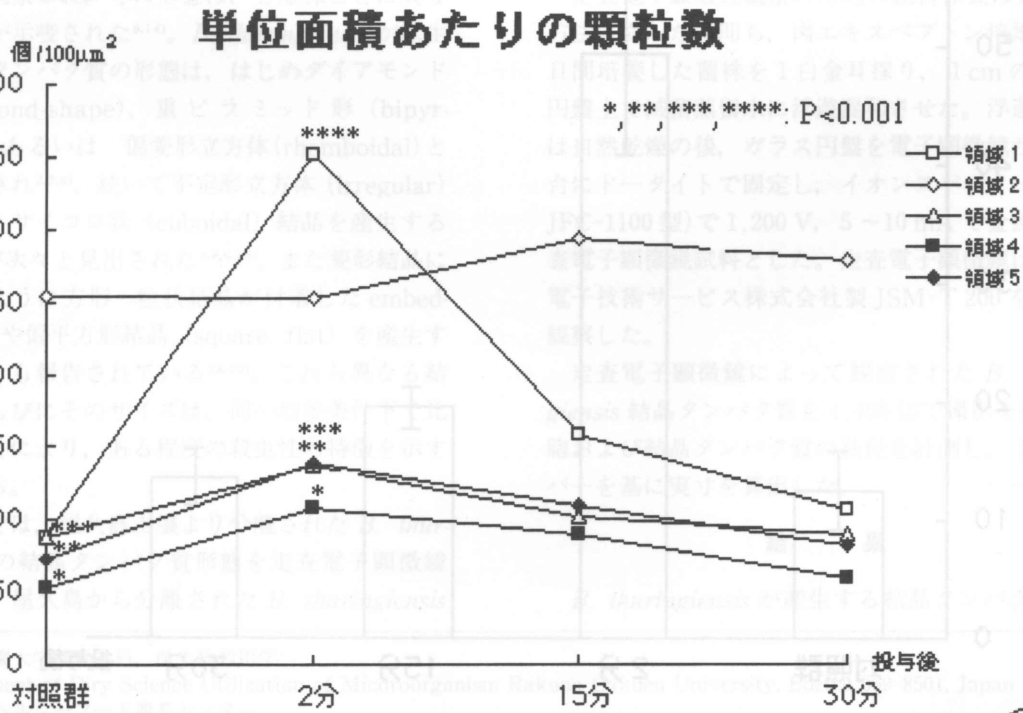


図6 各群各領域の単位面積あたりのB細胞顆粒数

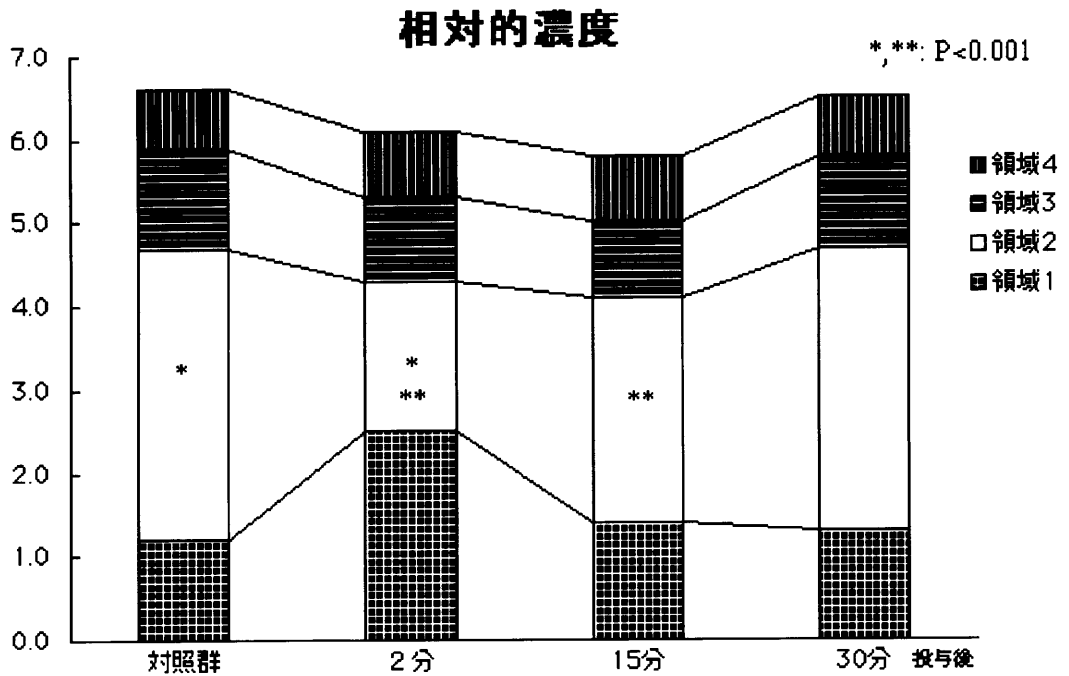


図7 各群各領域の相対的濃度

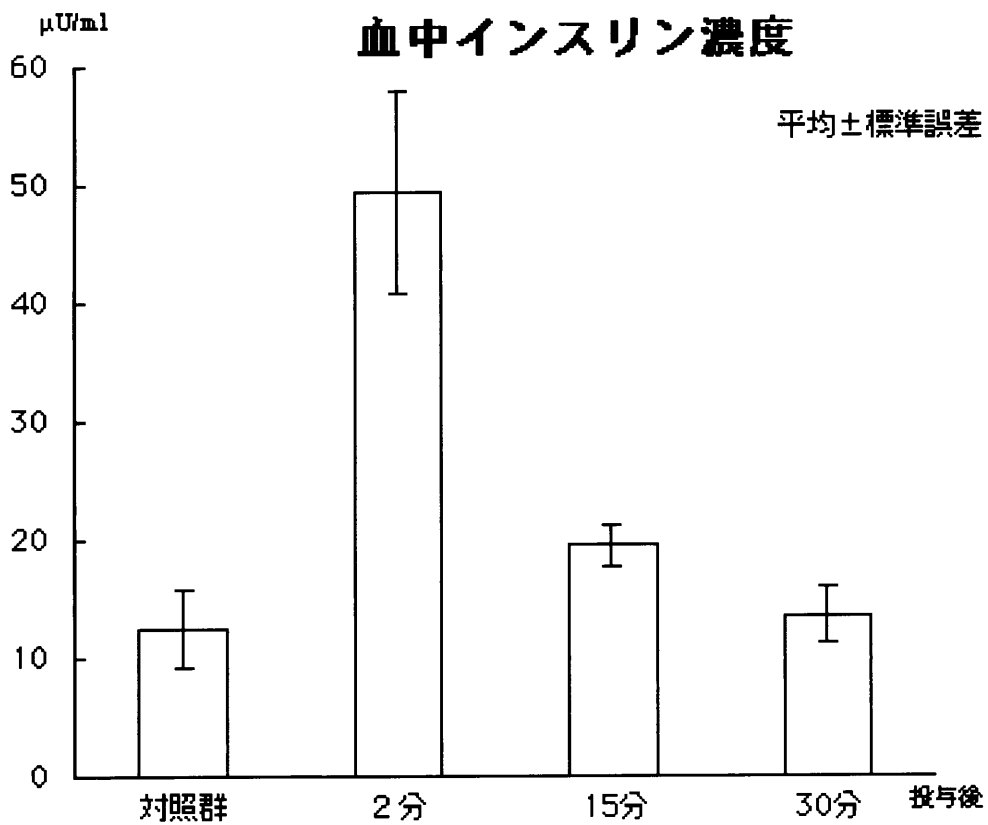


図8 各群の血中インスリン濃度