

学位論文題名

Autonomic nerve changes in the mouse pancreas  
after pancreatic duct ligation

(膵管結紮後マウス膵内自律神経の変化)

学位論文内容の要旨

目的

近年、膵外分泌に関わる膵内神経の重要性が注目されてきた。しかし、これまでの膵内神経に関する組織学的研究の多くは薄い切片の観察に基づいており、膵全体における自律神経の三次元分布に関する情報は乏しく十分ではなかった。一方、臨床病理においても、膵外分泌部の消失などを病理学的特徴とする慢性膵炎で、膵内神経線維の直径が増大することや、神経伝達物質の局在の変化が報告されてきた。膵組織に病的変化が生ずると、臓器の形態や機能の維持にとって重要な因子である神経構築も変化している可能性がある。しかしこれまで、病的膵を理解するための膵臓全体における神経の変化の定量的検討は行われていない。マウスにおいて、膵管の閉塞は慢性膵炎にみられるような膵実質の萎縮をもたらすことが知られており、今回の研究ではこのモデルを用い、膵臓全体における神経分布の特徴を正常膵と膵管結紮後萎縮膵で明らかにすることを目的とした。

材料と方法

動物は生後6週齢 dd-マウスを用い、麻酔後、膵の3分葉の一つである脾臓葉の基部で膵管を結紮した。正常対照は生後6週齢の無処置マウスとした。正常対照および膵管結紮7日後、14日後に屠殺し、以下の方法で検討した (各群: n=5)。

1. コリンエステラーゼ組織化学

ペントバルビタール過剰投与により屠殺後、左心室より生理的食塩水を灌流、更にザンボニー液で灌流固定したのち、全膵を摘出し、同固定液で6時間浸漬固定した(4℃)。膵臓は 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4)中に2時間(4℃)浸漬したのち、3分葉に分け、5%と10%ゼラチン(同緩衝液で希釈)に2時間ずつ浸漬した(37℃)。それぞれの標本を10%ゼラチンに包埋し、冷蔵庫内で硬化させた。それぞれの標本はマイクロスライサーで100 $\mu$ m厚の膵臓全体の連続切片とし、コリンエステラーゼ組織化学染色としてカルノフスキー・ルッツ溶液に2時間浸漬した(4℃)。切片を0.1M リン酸緩衝液に数分浸漬後、グリセリンジェリーで封入し、光学顕微鏡で観察した。

正常対照の一部は、血管の走行を明らかにする目的で、生理的食塩水を灌流後、10%青インク-2%ゼラチン水溶液 (pH7.4)を灌流し、ザンボニー液を腹腔内に3ml注入し10分間4℃で放置し腹腔内固定後、膵臓を摘出し、先と同様に包埋、連続切片を作成し染色した。

2. 組織定量

コリンエステラーゼ組織化学染色を行った脾臓葉の全ての連続切片を用い、以下の計測を行った。

1) 総神経節数( $N_A$ )

2) 総神経節細胞数

3) 神経節総体積: 神経節を楕円形と考え、長径( $a$ )と短径( $b$ )を計測し、それぞれの神経節の体積( $V_A$ )は、 $V_A(\text{mm}^3)=4/3\pi \times a \times b^2$ より求めた。

神経節総体積( $V_T$ )は、 $V_T(\text{mm}^3)=\Sigma V_A$ より求めた。

4) 神経節細胞の平均体積

神経節細胞の平均体積( $V_M$ )= $V_T/N_A$

組織定量の結果の統計学的検討は、ANOVA で行い、 $p<0.05$  の場合を有意差ありとした。

### 3. 透過型電子顕微鏡

2.5%グルタルアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液(pH7.4)で、灌流固定を行い、摘出した膵臓を先と同じ方法で、ゼラチン包埋し、100 $\mu\text{m}$  厚の切片を作成し、カルノフスキー・ルッツ溶液に 30 分間浸漬した(4 $^{\circ}\text{C}$ )。この切片を細切し 1%オスミウム酸-0.1M リン酸緩衝液(pH7.4)で後固定し、脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。ウルトトロームで超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡で観察した。切片の一部は、2%酢酸ウランで電子染色後に観察した。

## 結果

### 1. 肉眼的所見

膵管結紮後 7 日、14 日で結紮遠位側の膵脾臓葉は著明に萎縮した。十二指腸葉、胃葉には変化を認めなかった。

### 2. 組織化学的所見

正常では、神経節細胞と神経線維はコリンエステラーゼ組織化学により赤褐色に染色された。神経節細胞の核は染色されなかった。正常膵の神経細胞の多くはランゲルハンス島の周囲に存在した。ランゲルハンス島内部に神経節はなかった。神経線維は数個の神経節の間を連絡していた。膵内の太い神経線維束は動脈に沿って走行し、細動脈表面に細い神経線維を網目状に供給していた。

膵管結紮後 7 日目、神経節の多くは、正常膵と同じように、ランゲルハンス島の表面に存在した。神経線維は複雑に屈曲していた。膵管結紮後 14 日目、神経節の多くは、膵管結紮後 7 日目同様、ランゲルハンス島の近傍に存在していた。神経線維は、屈曲蛇行し密な分布を示した。神経節細胞の外側にコリンエステラーゼ活性を持つ神経節細胞が存在した。

### 3. 定量的所見

正常膵臓葉において、神経節の総数は、 $251\pm 6$  (平均 $\pm$ 標準偏差、以下同じ)であった。膵管結紮後、神経節の総数は変化がなかった。正常において、神経節細胞の数は  $955\pm 36$  であった。膵管結紮後 7 日目、14 日目で神経節細胞の数は正常の約 60%に減少した。神経節の総体積は  $0.0131\pm 0.0030\text{mm}^3$  であった。膵管結紮により、総体積は約 2 分の 1 に減少した。おのおのの神経節細胞の平均体積は、膵管結紮後 14 日で、正常に比較して有意に減少した。

### 4. 透過型電子顕微鏡所見

膵内神経節細胞は胞体内にコリンエステラーゼ活性を持っていた。膵管結紮後も多くの膵内神経節細胞に大きな形態学的変化はなかった。膵管結紮後、胞体内のコリンエステラーゼ活性を認めず、その細胞外にコリンエステラーゼ活性が存在する神経節が存在した。

## 考察

今回行った 100 $\mu\text{m}$  厚の切片を用いたコリンエステラーゼ組織化学の手法は、膵内神経のみを明瞭に描出し、また全膵から得られる情報として神経節を切断面ではなく塊のまま観察でき、これまで行われなかった形態学的な定量的検討に適していると考えられる。

正常膵脾臓葉には、数個から数十個の神経細胞からなる膵内神経節が散在し、これらの神経節は、腹腔神経叢と神経線維により連絡していた。しかし膵臓表面から膵内に直接進入する神経線維は存在しなかった。コリンエステラーゼによる染色では神経組織は一樣であり、染色性の違いによる交感神経と副交感神経の区別はできなかった。膵内神経は動脈壁に沿って走行し、外分泌部には、神経終末は少なかった。一方、ランゲルハンス島の近傍には、常に神経節が存在し、神経線維が多く分布することから、膵内神経による外分泌部の調節は、直接血管に作用する以外に、膵島腺房門脈系を介して行われると考えることができる。

膵管結紮により膵内神経節細胞の数が減少することが明らかとなった。膵内神経細胞の減少は、膵管の閉塞による膵外分泌部の萎縮に伴う二次的な変化と考えられ、膵実質の萎縮スピードに神経線維のリモデリングが対応できていない可能性があった。コリンエステラーゼ組織化学で神経節細胞が染色されず、その外側にコリンエステラーゼ活性を持った神経節の存在は、膵管結紮により神経節細胞のコリンエステラーゼの局在が変化していることを示唆した。

#### 結語

膵管結紮後マウス膵臓において、膵内自律神経の減少が明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 永 敏 彦  
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## Autonomic nerve changes in the mouse pancreas after pancreatic duct ligation

(膵管結紮後マウス膵内自律神経の変化)

近年、膵外分泌に関わる膵内神経の重要性が注目されてきた。しかし、膵全体における自律神経の三次元分布に関する情報は乏しく十分ではなかった。一方、膵組織に病的変化が生ずると、臓器の形態や機能の維持にとって重要な因子である神経構築も変化している可能性がある。しかしこれまで、病的膵を理解するための膵臓全体における神経の変化の定量的検討は行われていない。マウスにおいて、膵管の閉塞は慢性膵炎にみられるような膵実質の萎縮をもたらすことが知られており、今回の研究ではこのモデルを用い、膵管結紮後萎縮膵における神経分布の変化を明らかにすることを目的とした。マウス膵管を結紮し、膵管結紮後7日、14日に屠殺し検討した。正常対照は生後6週齢マウス。1. コリンエステラーゼ組織化学；ザンボニー液で灌流固定したのち、全膵を摘出し、3分葉に分け、ゼラチンに包埋した。標本はマイクロスライサーで100 $\mu$ m厚の膵臓全体の連続切片とし、コリンエステラーゼをカルノフスキー・ルッツ溶液に2時間浸漬(4 $^{\circ}$ C)し、染色した。グリセリンジェリーで封入し、光学顕微鏡で観察した。正常対照の一部は、血管の走行を明らかにする目的で、青インク水溶液を灌流し、ザンボニー液を腹腔内に3ml注入し固定後、膵臓を摘出し、先と同様に処理し観察した。2. 組織定量(各群:n=5)；コリンエステラーゼ組織化学染色を行った膵臓葉の全ての連続切片を用いた。1) 総神経節数、2) 総神経節細胞数( $N_A$ )、3) 神経節総体積：神経節を楕円形と考え、長径( $a$ )と短径( $b$ )を計測し、それぞれの神経節の体積( $V_A$ )は、 $V_A$  ( $\text{mm}^3$ )= $4/3\pi \times a \times b^2$ より求めた。神経節総体積( $V_T$ )は、 $V_T$  ( $\text{mm}^3$ )= $\Sigma V_A$ より求めた。4) 神経節細胞の平均体積；神経節細胞の平均体積( $V_M$ )= $V_T / N_A$ 、組織定量の結果の統計学的検討は、ANOVAで行い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。3. 透過型電子顕微鏡；グルタルアルデヒドで灌流固定を行い、膵臓を摘出した。ゼラチン包埋し、100 $\mu$ m厚の切片を作成し、カルノフスキー・ルッツ溶液で染色(4 $^{\circ}$ C)、細切後オスミウム酸で後固定し、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡で観察した。組織化学染色では、正常マウスにおいて、

神経節細胞と神経線維は赤褐色に染色された。神経節細胞の核は染色されなかった。正常脾の神経細胞の多くはランゲルハンス島の周囲に存在した。神経線維は数個の神経節の間を連絡していた。脾内の太い神経線維束は動脈に沿って走行し、細動脈表面に細い神経線維を網目状に供給していた。膵管結紮後7日目、神経節の多くは、正常脾と同じように、ランゲルハンス島の表面に存在した。神経線維は複雑に屈曲していた。膵管結紮後14日目、神経節の多くは、膵管結紮後7日目同様、ランゲルハンス島の近傍に存在していた。神経線維は、屈曲蛇行し密な分布を示した。またいくつかの神経節はコリンエステラーゼ活性を、神経節細胞の胞体に持たなくなり、神経節細胞の外側に持つようになった。組織定量において、正常脾臓葉の総神経節数は、 $251 \pm 6$ （平均±標準偏差）で、膵管結紮後、神経節の総数は変化がなかった。神経節細胞の数は、結紮後7日目、14日目で正常の約60%に減少した。神経節の総体積は、膵管結紮により約2分の1に減少した。おのおのの神経節細胞の平均体積は、膵管結紮後7日目、14日目で、正常に比較して有意に減少した。透過型電子顕微鏡では、脾内神経節細胞は胞体内にコリンエステラーゼ活性を持っていた。膵管結紮後、胞体内のコリンエステラーゼ活性を認めず、その細胞外にコリンエステラーゼ活性が存在する神経節が存在した。以上の結果より、今回の手法は、脾内神経のみを明瞭に描出し、形態学的な定量的検討に適していると考えられる。正常脾臓葉には、数個から数十個の神経細胞からなる脾内神経節が散在し、これらの神経節は、腹腔神経叢と神経線維により連絡していた。脾内神経は動脈壁に沿って走行した。一方、ランゲルハンス島の近傍には、常に神経節が存在し、神経線維が多く分布することから、脾内神経による外分泌部の調節は、直接血管に作用する以外に、膵島腺房門脈系を介して行われると考えることができる。膵管結紮により脾内神経節細胞の数が減少することが明らかとなった。膵管結紮により脾内自律神経が変性を起こしている可能性が示唆された。口頭発表後、渡辺雅彦教授より、脾内神経節は副交感神経由来か、膵管結紮により腹腔内の神経節に変化は生じるのか、膵管結紮後神経節細胞外にあるコリンエステラーゼはシュワン細胞内に存在するのかなどの質問があった。つづいて、岩永敏彦教授より、脾内神経のaxonはどこに分布するのか、膵管結紮後変化した神経節細胞は外分泌支配のものか、他の実験で今回のようにコリンエステラーゼの分布が変化した例はあるのかなどの質問があった。また、加藤紘之教授より、神経節細胞の障害が脾外分泌部の萎縮による二次的な変化なのか否か、またその原因は何か、ヒト脾臓の膵管結紮との違いは何か、ヒト慢性脾炎の治療に何が還元できるかなどの質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は誠意ある妥当な回答をした。

本研究は、膵管結紮後マウス脾臓において脾内自律神経の減少が明らかとし、脾外分泌部腺房の萎縮する病態における自律神経変化の解明の礎となることが期待される。

審査員一同、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研讃や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。