

氏 名（本籍） やま 山 もと 本 たけし 毅

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2896 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 8 年 9 月 11 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 25 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 ラット肝内胆管上皮細胞の vesicular transport
とセクレチンのエンドサイトーシスに及ぼす影響

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 豊 田 隆 謙 教 授 大 槻 昌 夫

教 授 松 野 正 紀

論文内容要旨

【目 的】

細胞内の vesicular transport は種々の物質移送に関与するが、肝内胆管上皮細胞 (IBDEC) においては十分な検討がなされていない。また、近年 IBDEC の基底側にセクレチンのリセプターが存在することが報告されたが、セクレチンがエンドサイトーシスにどのような影響を与えるかは不明である。本研究では、液性のエンドサイトーシスのマーカーとして Horseradish peroxidase (HRP) を用いて、

- (1) IBDEC に取り込まれた HRP を電子顕微鏡 (電顕) で経時的に観察し、その動態を明らかにする。
- (2) IBDEC の基底側と管腔側からのエンドサイトーシス能を、定量的に比較検討する。
- (3) セクレチンの投与により、IBDEC の基底側でのエンドサイトーシスがどのような影響を受けるかを検討する。

ことを目的とした。

(1) IBDEC 内での HRP の経時的動態の検討

【方法】 HRP (20mg/ml) を、ウィスター系雄性ラットの総胆管および門脈から注入した。総胆管からの注入は総胆管にチューブを挿入し、ペリスターポンプで 2ml/h の速度で 10 分間持続注入した。同時に注入時の胆管内圧上昇を防ぐ目的で、肝表面を約 3 mm カットし、胆管を開放系にした。門脈からは、注射器で同量の HRP を注入した。注入 3, 5, 10, 30 分後に門脈から肝を灌流固定し、取り出し細切し、再固定後、ピブラトームで 50 μ m の切片とし、ジアミノベンチジンで HRP を発色した。その切片を実態顕微鏡で観察しながら、HRP の漏れ出しのない門脈域をトリミングした。一部の切片はライソゾーム同定のために、酸性フォスファターゼ (AcP) との 2 重染色を行った後、型どおり脱水、包埋し、超薄切片を作成し、電子染色をせずに電顕で観察、写真撮影を行った。

【結果】 総胆管 (管腔側) から取り込まれた HRP は、3 分後には管腔側の細胞膜直下の小 vesicle に認められ、5 分後には endosome に認められた。また、側方の基底側の細胞膜近くの vesicle と、tight junction に異常のない細胞の細胞間隙にも認められたことから、transcellular transport により、HRP が細胞間隙に排泄されたものと考えられた (transcytosis)。10 分後には管状の vesicle や multivesicular body に認められ、30 分後には AcP 陽性のライソゾームに到達した。

門脈（基底側）に注入すると、3分後には細胞間隙はHRPで満たされ、基底側の細胞膜からHRPが取り込まれている像が観察された。5分後には球形やU字型のendosomeに認められ、10分後には脂肪を封入した小器官に認められ、30分後でも同器官にとどまっていたが、この器官はAcP染色陰性であった。また実験を通じてtranscytosisは確認できなかった。

(2) 管腔側と基底側でのエンドサイトーシス能の比較

【方法】 前述の方法でHRPを総胆管あるいは門脈から10分間持続注入し、同様に固定し、HRPを発色させ、トリミングし、型どおりに標本を作成し、電子染色をせずに電顕で観察、写真撮影を行い、HRP陽性vesicle数を算出した。一方、同様に作成した標本の一部を電子染色を行って写真撮影を行い、IBDECの管腔側と基底側の細胞膜をトレースし、それをスキャナーでコンピューターに取り込んで、画像解析ソフトを用いて細胞膜の長さを計測した。管腔側、基底側の細胞膜の長さの2乗をそれぞれの細胞膜の面積とし、単位面積あたりのHRP陽性vesicle数として算出した。

【結果】 管腔側から取り込まれたHRP陽性vesicle数は 1.60 ± 1.81 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)であり、基底側からは 0.17 ± 0.25 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)で、管腔側が有意に ($P < 0.01$) 多かった。

(3) エンドサイトーシスに及ぼすセクレチンの作用

【方法】 基礎実験で、ラットの尾静脈からセクレチン ($2 \mu\text{g}/0.5\text{ml}$) を投与すると、20分後には有意に胆汁流量が増加することが確認された。そこで、同量のセクレチンを尾静脈から投与し、20分後に門脈からHRP ($20\text{mg}/0.5\text{ml}$) を投与し、その10分後に肝を固定し、前期(2)と同様の方法で単位面積あたりのHRP陽性vesicle数を算出した。セクレチンの代わりに生食 0.5ml を投与したものを対照とし、同様に算出した。

【結果】 セクレチン投与群では 0.70 ± 0.46 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)で、非投与群では 0.37 ± 0.48 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)であり、投与群で有意に ($P < 0.01$) 増加していた。胆管を細胆管と小葉間胆管に分けて検討すると、細胆管では投与群で 0.80 ± 0.50 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)、非投与群で 0.38 ± 0.42 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)、小葉間胆管では投与群で 0.72 ± 0.49 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)、非投与群では 0.38 ± 0.50 個/ $100 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD)であり、いずれの部位でも投与群で有意に (細胆管; $P < 0.01$, 小葉間胆管; $P < 0.05$) 増加していたが、部位による差はなかった。

【結 論】

以上から、IBDECはエンドサイトーシスを主に管腔側より行っているが、セクレチンなどのホルモンにより基底側のエンドサイトーシスが影響を受けていると考えられた。

審査結果の要旨

肝内胆管細胞の研究は近年始まったばかりである。胆管細胞のエンドサイトーシスは形態学的に horseradish peroxidase (HRP) を総胆管に注入することによって検討されてきたが、胆管系は盲端を形成するため注入による内圧の上昇が問題になる。著者は、肝表面を切除し、胆道系を解放にすることによりこの問題を解決した。これにより、HRP の胆管細胞内の移送系が従来報告より正確になり、HRP の取り込みの定量形態学が可能となった。

以上の研究背景の下で、*in situ* の胆管細胞の高分子物質の移送を HRP の電子顕微鏡的組織化学を用いて検討している。方法論は古典的に確立された方法であり、問題はない。電子顕微鏡写真も良質である。

実験のデザインとして、10 分間 HRP 持続投与後の細胞質内 HRP 陽性小器官数を数えている。エンドサイトーシスを受けた HRP は 10 分後には移送系に関する全ての小器官に到達していることが確認されており（本論文と他の論文）、定量形態学的に問題はない。注意しなければならないのは、生化学的なエンドサイトーシスされた量ではなく、細胞学的なエンドサイトーシス活性（エンドサイトーシスに関与する小器官の数）を定量していることである。従って、管腔側と基底側からのエンドサイトーシス活性の比率と、セクレチンによって、基底側からのエンドサイトーシス活性がどの程度変化したかを見ていることになる。エンドサイトーシスに関する小器官それぞれ（*endocytotic vesicles*, *endosomes*, *multivesicular bodies*, *lysosomes*）の大きさは形態学上おおよそ一定している。従って、それぞれの小器官の数は小器官の細胞質に占める *volume density* に相関するかも知れない。その意味で、小器官の数の変化は細胞学的意義を持つ。

結果は有意差検定が行われており、結果から得られた結論は信頼性がある。管腔側と基底側のエンドサイトーシス活性の比と単離胆管細胞で得られた比とを比較すると、僅かな差異を認める。これは筆者がセクレチンの考察で述べているように、*in vitro* と *in vivo* の差、すなはち細胞自体の差でなく、細胞の環境の差と考えるのが妥当と思われる。本研究では灌流液に血清成分は含まれていない。従って、ホルモンなどの観点からは、*in vitro* に近い実験系である。しかし、単離胆管細胞との違いは、細胞外基質の存在などいくつか存在する。細胞外基質が胆管細胞機能に及ぼす影響は今後の研究に待たねばならない。

目的、結果、考察いずれも科学論文としては妥当であり、論文もよく書けている。以上より、本論文は学位論文として十分に値すると考える。