

氏名（本籍）	EMMANUEL T. BALTAZAR（フィリピン共和国）		
学位の種類	博士（獣医学）		
学位記番号	獣医博甲第84号		
学位授与年月日	平成13年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	Immunohistochemical Study of Galanin in the Ruminant Pancreas		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	山田 純 三
	副査	帯広畜産大学 教授	松井 高 峯
	副査	岩手大学 教授	谷口 和 之
	副査	東京農工大学 教授	神田 尚 俊
	副査	岐阜大学 教授	鈴木 義 孝

論文の内容の要旨

反芻類の膵臓は、反芻類特有の消化生理や代謝系と関連して、単胃動物のものとは異なる特有の制御機構を持っている可能性がある。膵臓の外分泌および内分泌の機能調節機構としては神経系と内分泌系がある。神経ペプチドであるガラニンは29個のアミノ酸からなり、中枢および末梢の神経系そして一部の内分泌細胞にも存在することが各種動物で明らかにされつつある。ガラニンの機能は、多くの場合に抑制的作用が報告されているが、膵臓では外分泌のみならず、インスリン分泌調整にも関与しているようである。しかし、ガラニンの研究報告は、実験動物を中心としたものであり、草食家畜では不明である。そこで本研究では、機能的特徴ばかりではなく、単胃動物には見られない大膵島が周生期に出現する構造的特徴も持つ反芻類膵臓におけるガラニン含有神経と内分泌細胞の出現、分布ならびにそれらの個体発生学的消長について免疫組織化学的に検索した。

ウシ、ヒツジ、ヤギの胎子、幼子、成体の膵臓をホルマリン固定後に、凍結切片を作製して、抗ガラニン抗体とアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法を用いて免疫組織化学的に染色した。ガラニン様免疫反応性(Gal-IR)を示す神経組織や内分泌細胞の出現時期、分布、消長を光学顕微鏡で個体発生学的に観察した。また、Gal-IR 内分泌細胞の消長については、画像解析法によりその細胞面積を大膵島面積に対する面積比を指標を用いて検索した。さらに、インスリンのための免疫蛍光染色を併用して大膵島の内分泌細胞でのガラニンとインスリンの共存を検索した。

その結果、反芻類家畜膵臓での Gal-IR 組織の特徴的所見として以下のものが得られた：

1) ウシでは神経細胞と神経線維並びに大膵島の内分泌細胞が Gal-IR を示したが、ヒツ

ジとヤギでは神経細胞と神経線維のみが Gal-IR を示した。

2) Gal-IR 神経線維の出現頻度はウシで最も多く、ヤギで中等度、ヒツジで最も少なかった。しかし、ウシ、ヒツジ、ヤギともに神経組織の分布様式には大差はなかった。Gal-IR 神経線維は腺房間、導管周囲、血管周囲で豊富に認められ、膵島内および周囲では少数であった。

3) ウシでは妊娠初期胎子で既に Gal-IR 神経線維が認められたが、ヒツジとヤギで神経線維が最初に認められたのは妊娠後期胎子であった。Gal-IR 神経線維は胎子から幼子にかけて増加したが、生後のウシでは3ヶ月から、ヒツジとヤギでは1週間から減少した。

4) 膵臓内神経節中には Gal-IR 陽性および陰性神経細胞が認められ、その両者の周りに Gal-IR 神経線維が少数認められた。神経節内 Gal-IR 神経細胞の割合はウシでは妊娠後期胎子と成体で約 89 %、子牛で約 73 %であった。

5) ウシの大膵島では Gal-IR 内分泌細胞が認められたが、ランゲルハンス島では認められなかった。ヒツジとヤギでは両膵島に Gal-IR 内分泌細胞は認められなかった。ウシの Gal-IR 内分泌細胞は極少数ながらも 3.2 ヶ月胎子で最初に認められた。大膵島面積に対する Gal-IR 細胞面積の割合は胎子 (4.1 ヶ月で 0.8 %) から新生子にかけて徐々に増加して生後 5 日 (9.2 %) でピークに達し、生後 7 日 (6.7 %) 以降急激に減少し、生後 3 ヶ月では低頻度 (0.13 %), 6 ヶ月から一年では極めて稀となった。それ以降の成体では大膵島そのものが観察されなかった。

6) インスリンとガラニンの二重染色の結果、ウシの大膵島における Gal-IR 内分泌細胞にはインスリン免疫反応性が常に共存していた。

以上の結果から反芻類の膵臓における Gal-IR 神経組織と内分泌細胞の意義について以下のように考察した：

i) Gal-IR 神経組織と内分泌細胞はウシでもっとも豊富に観察されたので大型反芻類ではヒツジやヤギなどの小型反芻類よりも膵臓制御機構におけるガラニンの重要度が高い可能性がある。

ii) 膵臓内で Gal-IR 神経細胞体が観察されたので、膵臓内の神経線維はそれらに由来する内在性のものを含んでいるであろう。

iii) ウシの大膵島の内分泌細胞はガラニンを内分泌・旁分泌・自己分泌している可能性があり、それによって大膵島のインスリン分泌を調整しているのかもしれない。

iv) ガラニンは反芻類膵臓で神経伝達物質または神経調節物質として重要な役割を果たしているであろう。本研究で明らかにされた Gal-IR 構造物のさまざまな特徴はヒツジとヤギでは類似性が多く、ウシだけが異なっていることが多かったので、ガラニンによる膵臓制御機構は大型反芻類と小型反芻類とで異なっている可能性がある。Gal-IR がウシの大膵島内分泌細胞で認められ、ヒツジとヤギでは認められなかったことは象徴的である。

v) Gal-IR がランゲルハンス島内分泌細胞には認められず、大膵島の内分泌細胞だけで認められ、しかも特定の時期だけに豊富に認められたことは、ガラニンの内分泌作用ばかりでなく大膵島そのものの役割を考える上で重要である。

審 査 結 果 の 要 旨

反芻類の膵臓は、反芻類特有の消化生理や代謝系と関連して、単胃動物のものとは異なる制御機構を持っている可能性がある。膵臓の外・内分泌の機能調節機構は神経系と内分泌系がある。神経ペプチドであるガラニン²⁹は29個のアミノ酸からなり、中枢および末梢神経系に存在する。ガラニンの機能は多くの場合に抑制的作用が報告されているが、膵臓では外分泌のみならず、インスリン分泌調整にも関与しているようである。しかし、ガラニンの研究報告は、実験動物が主であり、草食家畜ではない。そこで本研究では、大膵島が周生期に発達する構造的特徴を持つ反芻類膵臓におけるガラニン含有神経と内分泌細胞の出現、分布および個体発生について免疫組織化学的に検索した。

ウシ、ヒツジ、ヤギの胎子から成体の膵臓をホルマリン固定後、凍結切片を作製して、ABC法を用いて免疫組織化学的にガラニン様免疫反応性 (Gal-IR) を示す神経組織や内分泌細胞を個体発生学的に検索した。また、Gal-IR 内分泌細胞の消長については、画像解析法によりその細胞面積の大膵島面積対比を用い検索した。さらに、インスリンのための免疫蛍光染色を併用して大膵島の内分泌細胞でのガラニンとインスリンの共存も検索した。主な成績は以下のごとくである：

- 1) ウシでは神経細胞と神経線維並びに大膵島の内分泌細胞が Gal-IR を示したが、ヒツジとヤギでは神経細胞と神経線維のみが Gal-IR を示した。
- 2) Gal-IR 神経線維の出現頻度はウシで最も多く、ヤギで中等度、ヒツジで最も少なかった。Gal-IR 神経線維は外分泌部で豊富に認められ、内分泌部では少数であった。
- 3) ウシでは妊娠初期胎子で既に Gal-IR 神経線維が認められたが、ヒツジとヤギで神経線維が最初に認められたのは妊娠後期胎子であった。Gal-IR 神経線維は周産期に増加したが、ウシでは生後3ヶ月から、ヒツジとヤギでは1週間から減少した。
- 4) 膵臓内神経節中には Gal-IR 神経細胞が認められ、神経節内での割合はウシでは80%前後であった。
- 5) ウシの大膵島では Gal-IR 内分泌細胞が認められたが、ランゲルハンス島では認められなかった。ヒツジとヤギでは両膵島に Gal-IR 内分泌細胞は認められなかった。ウシの Gal-IR 内分泌細胞は3.2ヶ月胎子で最初に認められた。大膵島の単位面積に対する Gal-IR 細胞面積の割合は胎子(4.1ヶ月で0.8%)から新生子にかけて徐々に増加して生後5日で最高(9.2%)に達し、生後7日(6.7%)以降急激に減少し、生後3ヶ月では低頻度(0.13%)、6ヶ月から一年では痕跡的となり、それ以降の成体では大膵島が観察されなかった。
- 6) インスリンとガラニンの二重染色の結果、ウシの大膵島の Gal-IR 内分泌細胞にはインスリン免疫反応性が常に共存していた。

以上の結果から反芻類膵臓における Gal-IR 神経組織と内分泌細胞の意義について以下のように考察した：

- i) Gal-IR 神経組織と内分泌細胞はウシで最も豊富に観察されたので、ウシではヒツジやヤギなどよりも膵臓制御機構におけるガラニンの重要度が高い可能性がある。
- ii) 膵臓内で Gal-IR 神経細胞体が観察されたので、膵臓内の神経線維はそれらに由来する内在性のものを含んでいるであろう。
- iii) ウシの大膵島の内分泌細胞はガラニンを内分泌・旁分泌・自己分泌し、大膵島のイ

ンスリン分泌を調整しているかもしれない。

iv) ガラニンは反芻類膵臓で神経伝達物質または神経調節物質として役割を果たしているであろう。本研究で明らかにされた Gal-IR 組織の様々な特徴はヒツジとヤギでは類似性が多く、ウシだけが異なっていたので、ガラニンによる膵臓制御機構は大型反芻類と小型反芻類とで異なっている可能性がある。

v) Gal-IR がランゲルハンス島内分泌細胞には認められず、大膵島内分泌細胞だけで認められ、しかも周産期に豊富に認められたことは、ガラニンの内分泌作用ばかりでなく大膵島の役割を考える上で重要である。

以上について、審査委員全員一致で、本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として価値ある論文と認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Baltazar, E. T., Kitamura, N., Hondo, E., Narreto, E. C. and Yamada, J. Galanin-like immunoreactive endocrine cells in bovine pancreas. *Journal of Anatomy*, 196, 285-291, 2000

既発表学術論文

1. Baltazar E. T., Kitamura, N., Hondo, E., Yamada, J., Maala, C. P. and Simborio, L. T. Immunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the Philippine carabao (*Bubalus bubalis*). *Anatomia Histologia Embryologia*, 27, 407-411, 1998
2. Kitamura, N., Mori, Y., Hondo, E., Baltazar, E. T., and Yamada, J. An immunohistochemical survey of catecholamine-synthesizing enzyme-immunoreactive nerves and endocrine cells in the bovine pancreas. *Anatomia Histologia Embryologia*, 28, 81-84, 1999
3. Myojin, T., Kitamura, N., Hondo, E., Baltazar, E. T., Pearson, G. T. and Yamada, J. Immunohistochemical localization of neuropeptides in bovine pancreas. *Anatomia Histologia Embryologia*, 29, 167-172, 2000
4. Budipitojo, T., Matsuzaki, S., Cruzana, M. B. C., Baltazar, E. T., Hondo, E., Sunaryo, S., Kitamura, N. and Yamada, J. Immunolocalization of gastrin-releasing peptide in the bovine uterus and placenta. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63, 11-15, 2001