

原 著

マウスの膵臓腺房細胞内の類晶体の
起原とその微細構造

昭和42年10月31日 受付

信州大学医学部第一解剖学教室

(主任: 尾持昌次教授)

柴 田 治

The Origin and the Fine Structure of the Crystalloids
in the Pancreatic Acinar Cells of the Mice

Osamu SHIBATA

First Department of Anatomy, Shinshu University

(Director: Prof. Sh. Omochi)

細胞内封入体としての結晶, あるいは類晶体は種々の組織において報告されており, これらの存在の場は細胞小器官のほとんどと関係している。このような結晶はその微細構造に関してはかなり詳細に研究されているとはいえ, これらの起原あるいは成因を知るための系統的な研究はほとんどなされておらず, したがって, 現在のところでは起原あるいは成因に関しては推量の域を出ることが出来ない。

最近, Hamilton 等^①はサンショウウオの一種の肝臓で, 季節的に消長する細胞内結晶を見出した。彼等は電顕像のうえから, また文献的にこの結晶が蛋白質と脂質の結合体よりなることを示唆し, これの細胞生理学的な意義として, 食物の乏しい時期のための栄養分貯蔵の1つの方法であろうと考えている。

生体にとって有益なもの, 老廃物的なものまたは病的なもの等細胞内封入体に関して考えられるこのような種々の可能性のうちから, 封入体の起原あるいはこれの構成要素を知ることによって, 一層妥当な可能性を導くことが出来ると思われる。このような観点から, 膵臓腺房細胞内に見出された類晶体を含む封入体について, 種々の実験的処置をして観察した。ここには, これによってえられた結果を報告する。

材料と方法

実験にはDD系マウスを用いた。通常は20~25gのものをを用いたが, 封入体の存在と発育段階との関係を調べる際には, 生後1日, 2日, 3日, それ以後は体重5, 10, 15, 20, 25, 30g等の各発育段階のものをを用いた。ここに用いたマウスはすべて健全であって, 何等の実験的処置も加えず, 食餌, 水も自由に与えて

あったものである。

マウスは断頭によって殺し, 膵臓組織はペロナル緩衝液でpH7.2に緩衝した1%オスミウム酸で1時間固定した。この場合, 必要に応じて磷酸緩衝液でpH7.2に緩衝した6%グルタルアルデヒドによっても固定した。固定した組織はアルコール系列で脱水した後に, スチレン樹脂に包埋, 切片とし, 切片は酢酸ウラニールと硝酸鉛で2重染色後, 日立11A型電子顕微鏡で観察した。また, 必要に応じてトルイジン・ブルー, PAS反応等によって染色し, これを光顕的にまた電顕的に観察した。

封入体がどのような物質から構成されているかを知るために, 次のような実験を行なった。まず, 脂質が含まれることの可能性を調べるために, 6%のグルタルアルデヒドにて固定した組織をアルコール系列を経て脱水し, 純アルコールによる脱水操作の完了後, 組織片中の脱脂肪の目的でエーテル中に15分間浸した。その後は再びアルコール系列を下降させて水に戻してから, 1%オスミウム酸による後固定を1時間行なった。その後は常法によって再び脱水して樹脂包埋をした。また, 封入体が脂質あるいは蛋白質をもつことの可能性を栄養的に調べるために, マウスの常用食としていた固型食から蛋白質あるいは脂質のみを完全に除いた食餌をつくり, これで6日間飼育した後に電顕用試料をつくった。

結 果

すでに報告した^②ごとき糸状構造物, 類晶体あるいは両者よりなる封入体 (Fig. 2, 3, 7) は, 初めに用いた体重20~25gのマウスすべての膵臓においてみら

れ、このような細胞内封入体の存在は膵臓腺房細胞に恒常的であった。

これら封入体のうち、糸状構造物には2種類の断面像がみられた。その1つは線維状構造物が多数集まって房状塊をなしており (Fig. 3, 6)、他は不整形の網目構造をなした場合であった (Fig. 5)。房状塊の場合もその一部には網目構造にみえる部分があり、また網目構造の場合もその周辺部では糸状にみえた。房状塊の場合に、管状構造の縦断面を思わせるような平行に走っている線維状構造 (間隔ほぼ 120\AA) がいく組かみられた (Fig. 4)。このように異った像も同一構造物の切断方向の違いによるものと思われる、このような封入体は立体的には多分、横断面が不整の管状構造物 (直径ほぼ 120\AA) の集まりであろうと思われた。したがって、先に糸状とみた構造は管状構造物の縦断像をあらわすものと考えられる。

このような管状構造物よりなる封入体は時にその内部に粗面小胞体をもつことがあったが、多くの場合その小胞体内には電子密度の大きな無構造の物質がみられた (Fig. 5)。これは多分、封入体中に隔離された粗面小胞体によってつくられた蛋白性物質であって、他に移動出来ないためそこに貯溜、濃縮したものと思われる。時には類似の電子密度をもち、膜に包まれない無構造物が類晶体の間にみられることがあったが、これもまた小胞体内貯溜物に由来すると思われる。

多くの場合、管状構造よりなる封入体中には、これらの構造とは明らかに異なって、電子密度の大なる層と小なる層とが交互に規則正しく配列して、外形の不定な結晶構造物がみられた (Fig. 6, 9)。この類晶体はこのような層状構造以外に、直交あるいは斜交した格子構造 (Fig. 7)、あるいは六角形の網目構造 (Fig. 8, 11) を示していた。このような結晶構造の電子密度の大なる層 (30\AA) を精査すると、これらは電子密度の均一な層ではなく、 $30\sim 40\text{\AA}$ の間隔でさらに電子密度の大なる顆粒を含んでいることがわかった。このような電子密度の大なる層と交互に並んだ電子密度の小なる層もまた構造は均一でなく、電子密度小なる層を横切って、電子密度の大きな両側の層を連ねるやや電子密度の大なる部分 (巾ほぼ 10\AA) が $30\sim 40\text{\AA}$ 間隔でみられた。したがって、その構造は梯子状といえる (Fig. 9, 10)。

管状構造物がこのような類晶体を伴っている場合、ほとんどの類晶体は管状構造物によってつまれていた。そして、この類晶体の微細構造が層状の場合には、その周辺部で電子密度の大なる層と管状構造物の縦断像を示すと思われる構造物とが連絡している像

がみられることがあった (Fig. 9)。類晶体が格子構造の場合には、これを包む管状構造は網目としてあらわれ、時には類晶体との境界部で1つの網眼の半分は管状構造を構成する構造物よりなり、残りの半分は電子密度の大きな類晶体構造よりつくられていることもあった (Fig. 11)。このように、形態的に管状構造から類晶体への移行を暗示するような像が多数みられたが、管状構造の外周部は細胞質中へ放散して消え、管状構造物の由来を直接示すような像はみられなかった。

このような封入体の存在と発育との関係を知るために、種々の発育段階のマウスで観察したところ、封入体は生後1日と2日のマウスでみられなかった以外は、すべての発育段階においてこれを認めることが出来た。したがって、封入体のみられたもつとも若いものは生後3日であった。この封入体が細胞中に見出される頻度は発育程度が増す程大になったが、15日以上では体重による差はほとんどなく、切片上で1細胞につき1個位の割合いでみられた。なお、これらの類晶体の構造は発育の若いものでは粗な感じがする。したがって、若い動物では管状構造物の電子密度は老令のものに較べると小さく、結晶構造も不明瞭であった (Fig. 14, 15)。

管状構造物と類晶体を構成する要素、また封入体の細胞生理学的な意義を知るために、封入体の有機色素による染色態と栄養的な処置による影響を調べた。すなわち、樹脂包埋した組織から厚めの切片をつくり、これをスライドガラスに貼ってからトルイジン・ブルーで染めて光顕的に観察し、また電顕的にはメッシュに貼った電顕用切片を同じ色素で染めて観察したが、この場合には電子染色はしなかった。この結果、光顕的には、電顕的に封入体がみられるはずの細胞の中央部から基底部へかけて、時々青色の微小な顆粒がみられたが、それがこの封入体であることは確認できなかった。しかし、電顕的には、トルイジン・ブルー染色をしたものは染色しなかったものに較べて明らかに封入体の電子密度は増加している (Fig. 12, 13) から、光顕下での結果とともに、これら封入体がトルイジン・ブルーで染められたことは確かである。

多糖類を検索するために、樹脂包埋した組織切片でPAS反応を行ない、光顕と電顕で観察した。封入体以外の部分では従来から知られている部位に相当して反応があり、電顕的には電子密度の増大としてその反応はあらわれた。しかし、封入体では電子密度の増加はなく、したがって反応は全く認められなかった。

脂肪染色は樹脂包埋した切片では不可能であるの

で、グルタルアルデヒド固定した組織片でエーテルによって脱脂をし、消極的に脂肪の存在を証明することとした。脱脂すると、粗面小胞体の膜は消失するかまたは存在が不明瞭となり、細胞構成要素からの脱脂の効果は明らかに認められた。このような像において、管状構造物と類晶体はともに電子密度が低下したが、特に類晶体の電子密度の小さな層での低下は著しく、したがって相対的に、電子密度の大なる層とその層の顆粒状の超微構造物の存在が明瞭になり、管状構造は無構造といえる程度に不明瞭となった (Fig. 16)。

脂質を欠く食餌によって飼育した動物では、管状構造物の電子密度は低く、微細構造も不明瞭となった。しかし、類晶体ではエーテルによる脱脂処理の場合と異なって、類晶体全体の電子密度が低くなった (Fig. 18)。蛋白質を欠く食餌による飼育では、類晶体の電子密度の低下は殊に著しく、管状構造物のそれより低くなった。すなわち、無処置のマウスにおけるこれらのものの電子密度との関係とは全く逆になった (Fig. 17)。

このような封入体および類晶体の生成と、これらの生理的意義について物質代謝の面から手掛かりをうるために、酸フォスファターゼとアルカリ・フォスファターゼの封入体内の局在を調べたが、これらの活性は検出されなかった。

考 察

細胞内の結晶についてはすでに数多くの例が報告されており、膵臓においてもランゲルハンス島の細胞でこれの存在が報告されている^{③④}。しかし、腺房細胞では筆者の知る限りではまだ報告に接しない。

すでに前報^②にも記したように、膵臓腺房細胞に見出されたこれら類晶体は切片上の像において形態的にかなりの多様性を示した。他の組織において報告されているいくつかの結晶のうち、ヒトの精巣の間細胞にみられたいわゆる Reinke の結晶^{⑤⑥⑦⑧⑨}、最近 Hamilton 等^⑩によってサンショウウオの肝臓細胞中に見出された季節的に消長する結晶等は、形態的には膵臓腺房細胞中のものによく似ている。しかし、結晶構造の大きさはいずれもここに報告したものより大である。Hadek 等^⑪がウサギの発生初期の囊胞期で見出した結晶は、これらの点において膵臓腺房細胞中のものによく似ている。しかし、彼等の結晶では時にその周囲に膜を有することがあるという。

細胞内の結晶の生成に関して、他の構造物との関係を暗示した報告はいくつかある^{⑥⑦⑧⑨}。例えば、Hadek 等^⑪は結晶の近くにわずかの糸状構造物の存

在を認めたが、両者の関係を直接示しうるような結果はえていない。Yamada^⑦は Reinke の結晶を観察し、その時細胞内に見られた管状構造物の束が結晶の形成に何等かの関係があるのではないかと考えた。ここに報告した封入体では、1) 管状構造物と類晶体の電子密度の大なる層とが連続している、2) 種々の大きさの類晶体が管状構造物に包まれている、そして、3) 類晶体のみが存在する、といった種々の像が見られたことは、膵臓腺房細胞中の類晶体が管状構造物の内に生じ、周囲の管状構造物を素材として生長してゆくことを示すものであろう。この場合、管状構造物と類晶体の電子密度の大なる層とが連続しているにかかわらず、両構造物の電子密度がかなり異なることから、分子配列の粗な前者が密な配列に変わって後者をつくったのであろう。このことはまた、管状構造物と類晶体の電子密度の大なる部分には直径略々 30Å の顆粒状物が並んでいるが、これらの間隔が前者より後者で小であることから推察しうる。類晶体の断面が多角の格子状の場合、類晶体の周辺部に接した管状構造物は不整形の網目状をなし、この網目が類晶体の最外側の結晶格子の一部をなしていることもあったという事実もまた、類晶体が管状構造物からつくられることを示していると思われる。

以上のごとき形態的諸特徴から、類晶体は立体的には中空の六角柱の集合体で、それを包む構造物は断面が不整形の管の房状集合体であり、類晶体の近くでは結晶単位の六角柱と同一方向に配列していると考えられる。しかし、このような管状構造物の起原を示すような具体的な結果はまだえられていない。幼若マウスでは成熟マウスに比べて、封入体を見出す頻度が少なく、また見出されたものでも電子密度は低かった。このような事実は管状構造物が粗面小胞体の生産物に由来することを思わせるが、確かなことは不明である。Bruni 等^⑨も結晶の起原を粗面小胞体の生産物に求めている。

結晶の構成要素については、古くは Reinke^⑤がヒトの精巣の間細胞で詳細に調べ、種々の試薬に対する反応、酵素による消化実験の結果からこれが蛋白性のものであると結論している。膵臓腺房細胞中の結晶についてここで得られた結果では、これが蛋白質と脂質より成ることを示し、PAS 反応の結果から多糖類は含まれていない。蛋白質欠乏マウスでは類晶体の電子密度が殊に低下して、管状構造物に対する相対的な密度は完全食のものと全く逆となり、脂肪欠乏マウスでは管状構造物の構造が殊に不明瞭となった。エーテル処理をした組織片における電子密度の変化ととも

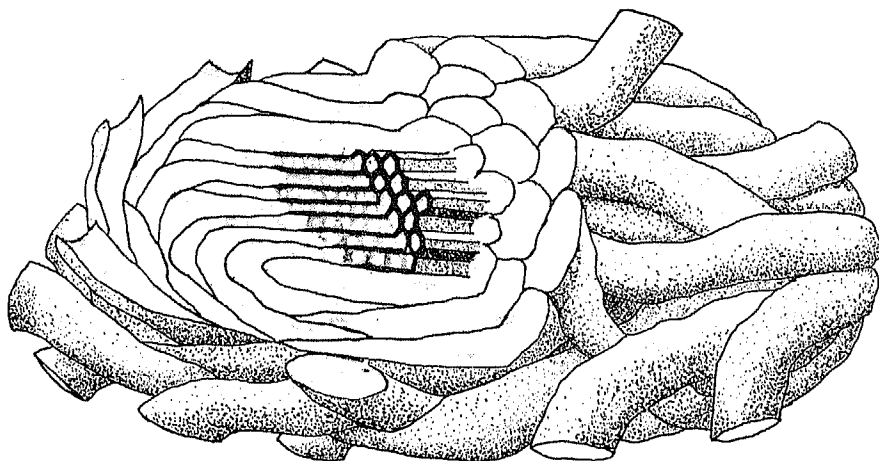


Fig. 1. A schema of an inclusion body in the pancreatic acinar cells of the mouse. The crystalloid composing of a bundle of hexagonal tubules is wrapped in many tender tubules, and the former tubules are continuous to the latters. These tubular membranes are mainly made up of the globular molecules of protein, and these interiors are filled with an amorphous substance and a globular substance, probably protein and lipid.

に、蛋白質、脂質が管状構造と類晶体の両方に含まれるとはいえ、類晶体の電子密度の大なる部分は主として蛋白質よりなり、電子密度の小なる部分は主として脂質よりなっていたものと思われる。これらの蛋白質層の中にみられた電子密度の大なる顆粒は蛋白質分子と思われ、電子密度の小なる層が梯子状にみえたのは、結晶の六角柱の内部をみたした球状の脂質分子の間を非晶性の蛋白質がうめていたことによると考えられる。ここに考察したとき管状構造物と類晶体の関係を Fig. 1 に示した。

一般に、細胞内の結晶はその起原および成分が不明であるのみならず、意義についてもまたほとんど不明である。ただ限られた例においてこれらが年令と関係があるらしく思われているにすぎない。Hamilton 等^①の報告したサンショウウオの肝臓細胞内の結晶が季節的に消長することから、彼等は結晶の意義を食物の少ない季節に対する栄養分の貯蔵と考えている。ここでみられた結晶はすでに受乳期からみられたから、これの出現が食餌の量や質によるとは考えられないし、また用いたマウスは少なくとも外見上は全く健全であったので、病的なものとも思われない。この観察試料は主として冬期につくったとはいえ、マウスの飼育は室温 20°C の保温室にて行っており、Hamilton 等^①の実験のような季節的、殊に温度変化が原因になっていたとも思われない。これらの事実から、このよ

うな封入体はマウスの膵臓腺房細胞中に恒常的に存在するものであり、また栄養的にかなり著しい影響をうけることから、腺細胞としての機能的な面も無視出来ないとはいえ、現在のところでは栄養分貯蔵の 1 つの型と考えるのが穏当であろう。

要 約

膵臓腺房細胞内の封入体は生後 3 日以後のマウスすべてにおいてみられた。この封入体は粗面小胞体の間にあって 2 つの要素より成っていた。すなわち、糸状構造物が多数集まって束になったように見える不定形の構造物と、この構造物に伴われた層状、あるいは格子状に見える類晶体（電子密度の大なる層は 30Å、小なる層は 60Å）とであった。糸状構造物の種々の断面像から、糸状構造とみたのは実は横断面が不整形の管状構造物が房状に集まった物と思われた。これら 2 つの構造物はそれらの接触部で互いに連続しており、管状構造物から類晶体がつくられるものと思われる。

エーテルによって脱脂肪をした組織、また蛋白質欠乏食あるいは脂肪欠乏食を与えたマウスの組織中の封入体の電顕像から、封入体は蛋白質と脂質から構成され则认为られる。PAS 反応によつては多糖類は検出されなかった。

封入体の種々の電顕像から、管状構造物は蛋白質分

子と脂質分子の粗に並んだ膜によってつくられた管の集合体であり、これら構造物の分子配列が密になったものが類晶体であると思われる。したがって、類晶体もまた管の集まりであるが、その断面は六角形をなし、内部は脂質分子によってみたまされているものと思われる。

この封入体はマウスの栄養条件によって消長するところから、蛋白質、脂質の貯蔵の意義をもつものと思われる。

最後に、御指導と御校閲の労を執られた尾持昌次教授ならびに永田哲士助教授、有益な御教示をいただいた群大内分泌研究所黒住一昌教授および渡仲三助教授に深く謝意を表します。

文 献

- ①Hamilton, D. W., Fawcett, D. W. and Christensen, A. K.: The liver of the slender salamander *Batrachoseps attenuatus*. 1. The structure of its crystalline inclusions, *Zeit. Zellforsch.*, **70**: 347-363, 1966
- ②Shibata, O.: Crystalloids in the pancreatic acinar cells of the mice, *Exptl. Cell Res.*, **47**: 655-657, 1967
- ③狩野和夫: イングマの Langerhans 氏島の組織学的, 細胞学的並びに電子顕微鏡的研究, *日録組*, **22**: 123-180, 1961
- ④Watari, N. and Herman, L.: Correlative light and electron microscopy of bat islets of Langerhans in hibernating and non-hibernating states, *Amer. Zoologist*, **5**: 240, 1965
- ⑤Reinke, F.: Beiträge zur Histologie des Menschen, *Arch. Micr. Anat.*, **47**: 34-44, 1896
- ⑥Fawcett, D. W. and Burgos, M. H.: Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue, *Amer. J. Anat.*, **107**: 245-269, 1960
- ⑦Yamada, E.: Some observation on the fine structure of the interstitial cell in the human testis as revealed by electron microscopy, *Gunma Symposia on Endocrinol.*, **2**: 1-17, 1965
- ⑧Hadek, R. and Swift, H.: A crystalloid inclusion in the rabbit blastocyst, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**: 836-841, 1960
- ⑨Bruni, C. and Porter, K. R.: The fine structure of the parenchymal cell of the normal rat liver. 1. General observation, *Amer. J. Pathol.*, **46**: 691-755, 1965
- ⑩Christensen, A. K. and Fawcett, D. W.: The normal fine structure of opossum testicular

interstitial cells, *J. Cell Biol.*, **9**: 653-670, 1961

ABSTRACT

In the pancreatic acinar cells of healthy mice over three-days-old, the cellular inclusion bodies which had never been known were found. These inclusion bodies were located among the rough surfaced endoplasmic reticulum from the middle to the basal part of the cells and were composed generally of two different structures but sometimes of only one structure. One of the two structures was a tufted or a network mass which was consisted of filamentous materials and the other was the crystalloid showing a lamella or a lattice or a hexagonal pattern (electron dense layer, 30 Å; electron opaque layer, 60 Å). In one of the inclusion bodies composed of both the structures, some of the filaments wrapping the crystalloid were found to be continuous to the electron dense layers in the crystalloid. This fact may suggest that the crystalloid was transformed from the filamentous material by growing more compact in a molecular configuration. Since the extraction of lipid from the pancreatic tissue with ether and the feeding of the animals with a protein-free or lipid-free diet lowered the electron density of the inclusion bodies, it is suggested that these bodies are composed of both protein and lipid. The protein and the lipid seem to construct mainly the electron dense layers and the electron opaque layers in the crystalloid, respectively.

In the three dimensional structure, the structure showing a filamentous or a network pattern may represent a section of bundle of many tender tubules which has been formed by the membranes composed of protein and lipid molecules. The crystalloid may be formed by a bundle of hexagonal tubules like a honey comb. The membrane and the interior of the tubules may be regularly constructed with the globular molecules of protein and lipid, respectively.

As the electron density of such inclusion bodies decreases susceptibly under an insufficient

nutritional condition, it seems that the inclusion bodies have a functional meaning to the storage of protein and lipid in the pancreatic acinar cells.

EXPLANATION OF PLATES

Most photographs were taken from the pancreas of the mice weighing about 25g.

E: rough surfaced endoplasmic reticulum, M: mitochondria, I: inclusion body, T: tubular structure as an inclusion body, C: crystalloid as an inclusion body, Z: zymogen granule.

EXPLANATION OF FIGURES

Plate 1

Fig. 2. The middle part of the pancreatic acinar cell. A cellular inclusion body is found at the middle of the upper part in the photograph. $\times 21000$.

Fig. 3. An inclusion body forming a tuft like mass. $\times 42000$.

Plate 2

Fig. 4. A part of an inclusion body trimmed to show a tubular structure. Parallel lines corresponding to a longitudinal sections of the tubules are seen every where. $\times 365000$.

Fig. 5. A cross section of a inclusion body composing of a tubular bundle. The body includes a small rough surfaced endoplasmic reticulum enclosing an amorphous substance which may probably be proteinous secretion. $\times 66000$.

Fig. 6. An inclusion body composing of a tubular structure and a small crystalloid which show a lamellar pattern in the inner structure. The tubular structure is sectioned longitudinally. $\times 72000$.

Plate 3

Fig. 7. A crystalloid showing a lattice pattern in the inner structure. No tubular structure are found around the crystalloid. $\times 114000$.

Fig. 8. A large crystalloid showing a hexagonal pattern in the inner structure. A surrounding tubular structure shows a network

pattern in the contact area to the crystalloid. $\times 90000$.

Plate 4

Fig. 9. A part of a crystalloid showing a lamellar pattern. Electron dense layers in the crystalloid are continuous to the membrane element of tubular structures. $\times 150000$.

Fig. 10. A part of the figure as shown in Fig. 9. Electron dense layers in both the crystalloid and the tubular structure are formed with the arrangement of electron dense granules which are probably protein molecules, but in an interval between the granules the crystalloid is compact and the tubular structure is rough. As a substance of a medium electron density occupies the space between the electron dense layers in the crystalloid, a pair of the electron dense layers show scaraliform. $\times 291000$.

Fig. 11. A part of a crystalloid showing a hexagonal pattern. Some meshes of the network which interposes between the crystalloid and tubular structure are partly formed by the membrane of the tubule and by the crystal substance. $\times 169000$.

Plate 5

Fig. 12. A crystalloid in the section without any staining. $\times 78900$.

Fig. 13. A crystalloid in the section stained with toluidine blue but without an electron staining. Compare with the crystalloid in Fig. 12. The electron density of the crystalloid increases than that in Fig. 12. $\times 81000$.

Plate 6

Fig. 14. A tubular structure found in a younger mouse weighing 5g. The inclusion body is not clear in the structure for its lower electron density. $\times 73000$

Fig. 15. A crystalloid found in the same mouse as in Fig. 14. Its fine structure is not clear for its lower density. $\times 133000$.

Fig. 16. A crystalloid in the pancreatic tissue from which the lipid was extracted with ether. The electron density of the crys-

taloid lowers especially in its electron opaque layers. The membrane element of rough surfaced endoplasmic reticulum disappears. $\times 11600$.

Plate 7

Fig. 17. An inclusion body in the mouse fed on protein-free diet. The electron density of the body lowers, especially in the crystalloid in the body. $\times 68900$.

Fig. 18. An inclusion body in the mouse fed on

lipid-free diet. The electron density of the body lowers and its structure appears indistinct. $\times 105000$.

(追加) この論文の印刷中に Bannasch, P. (J. Ultrastructure Res., 15 : 528-542, 1966) がマウスの膵臓腺房細胞で管状構造物の房状塊について報告していることを知った。それによると, このような封入体はミトコンドリアあるいはゴルジ装置と関係があるという。しかし, 類晶体の存在はみていない。

Plate 1

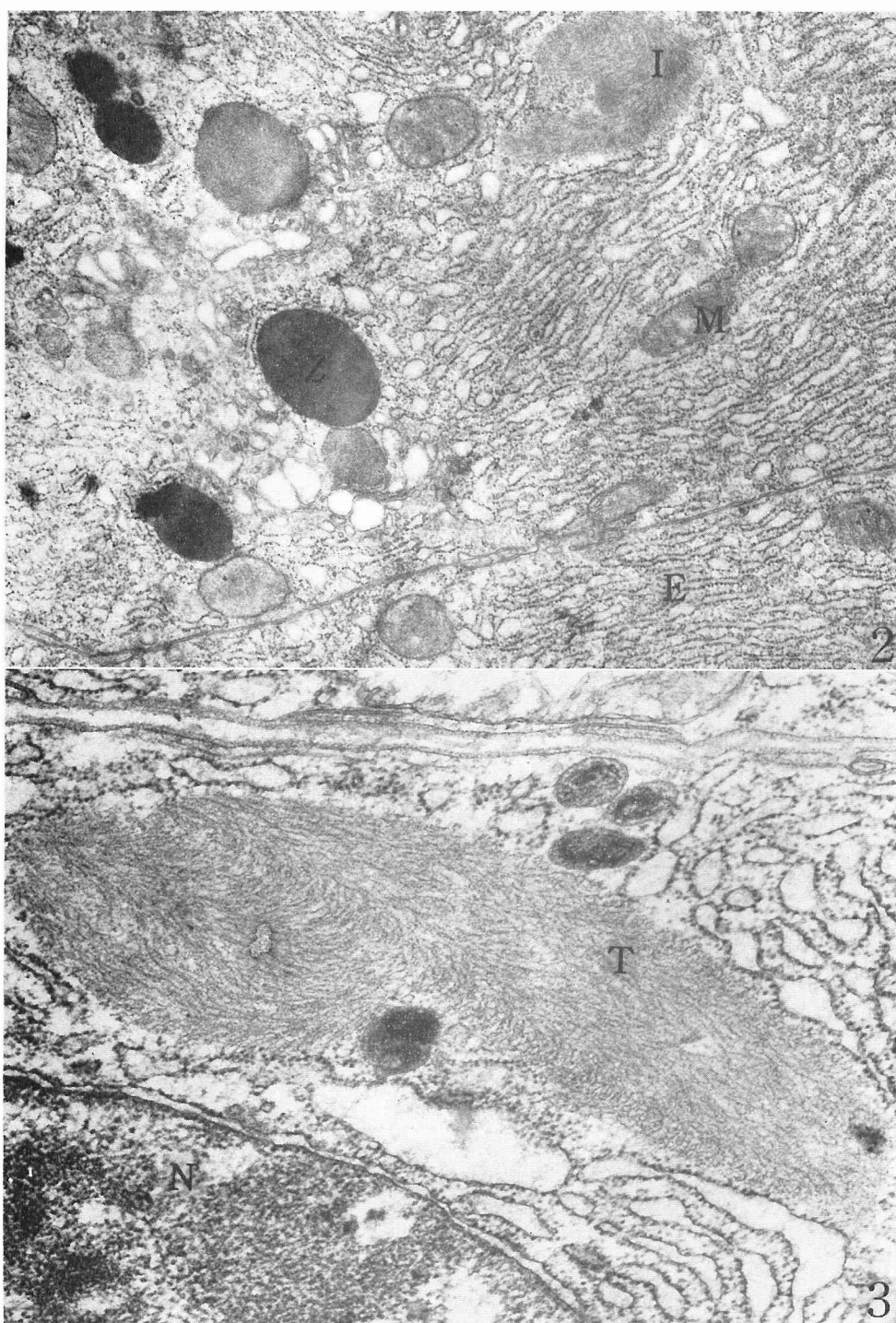


Plate 2

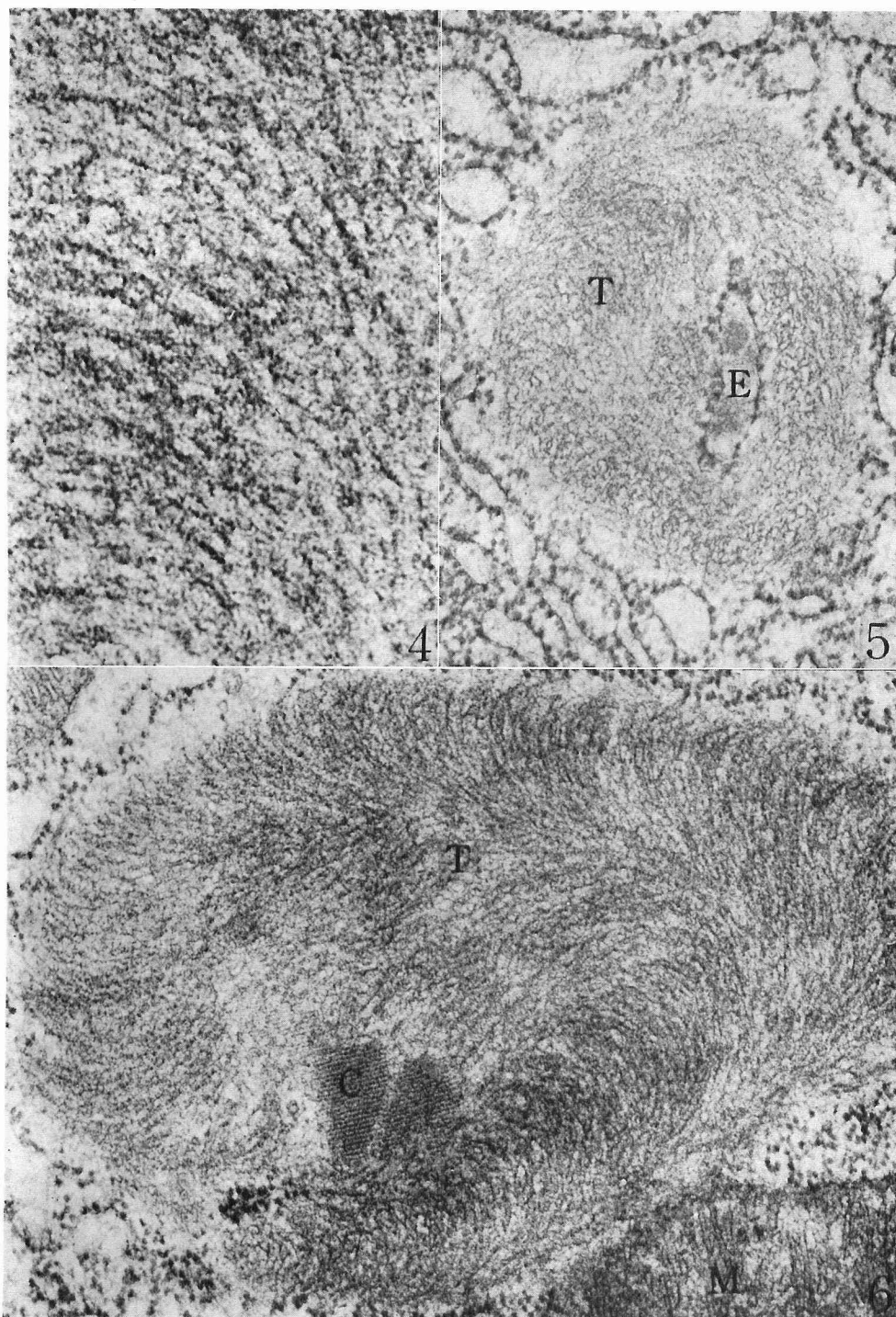


Plate 3

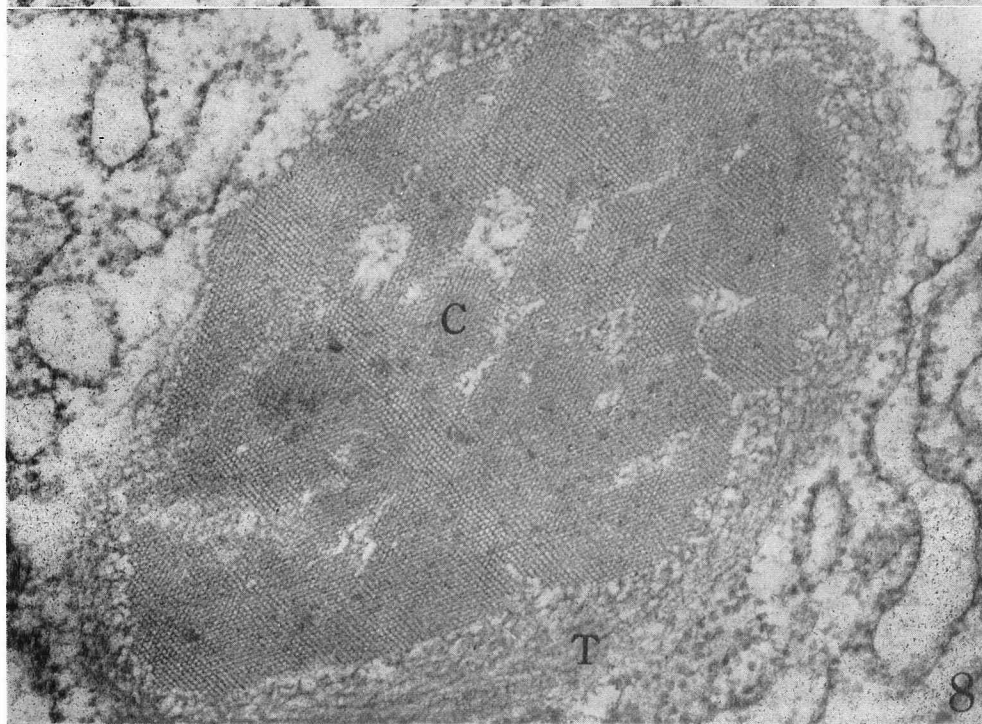
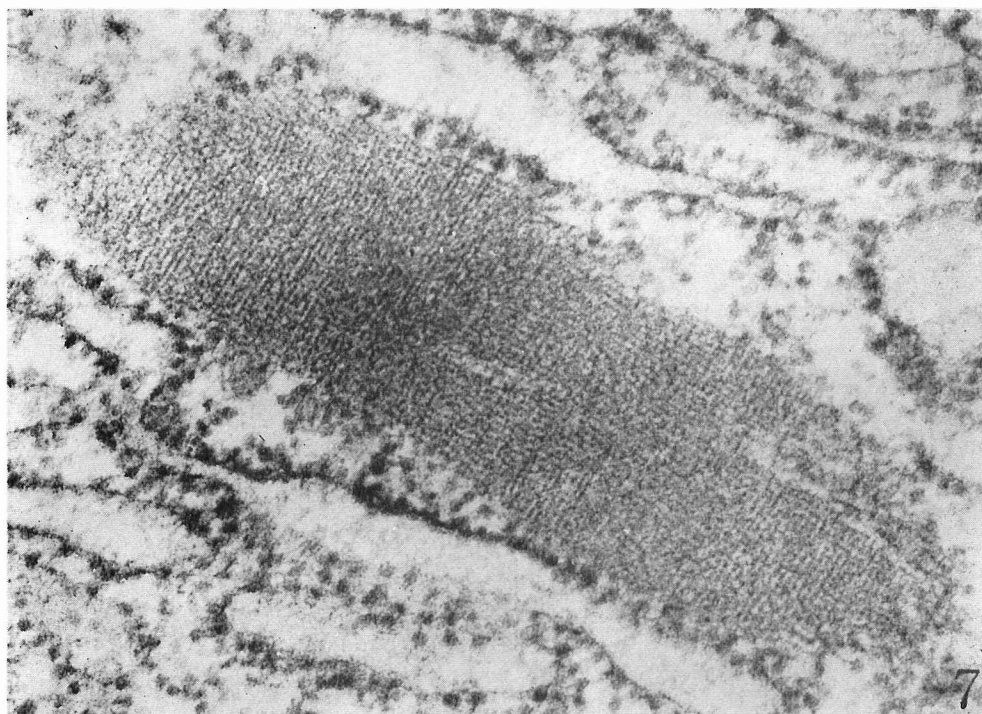


Plate 4

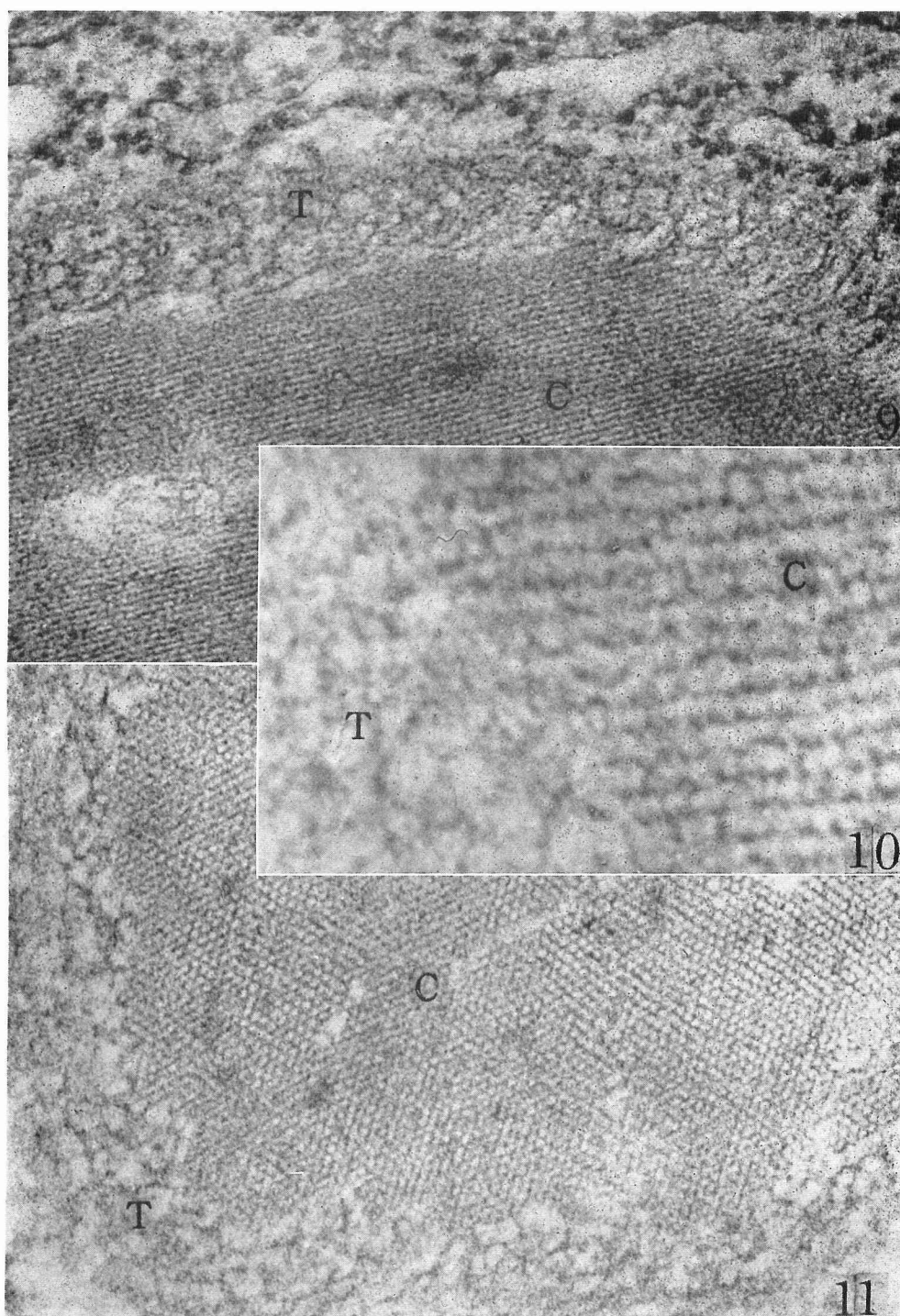


Plate 5

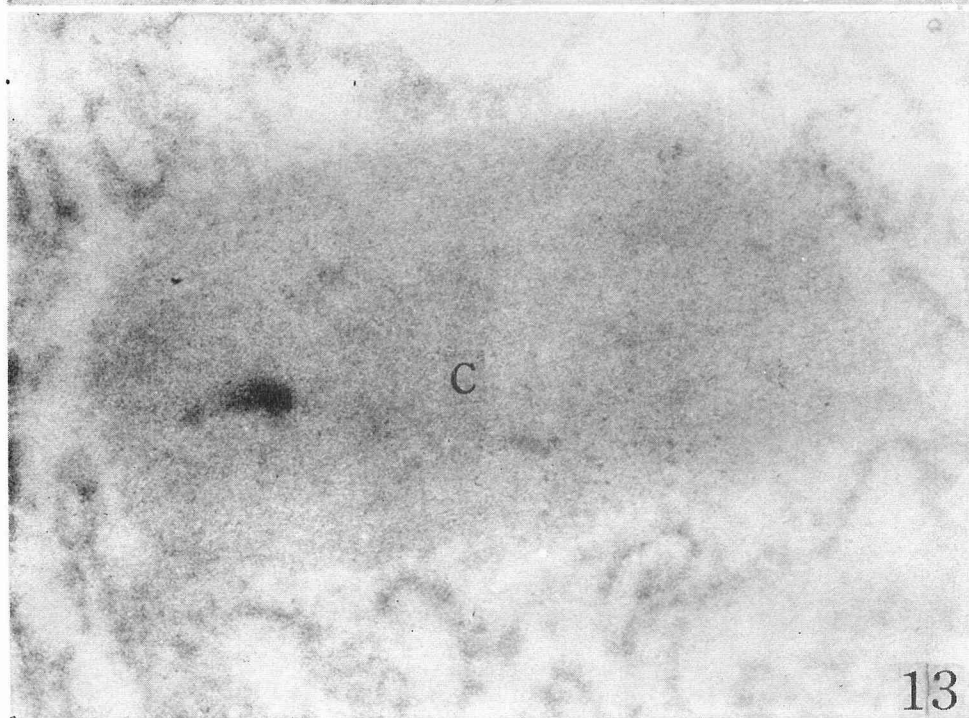
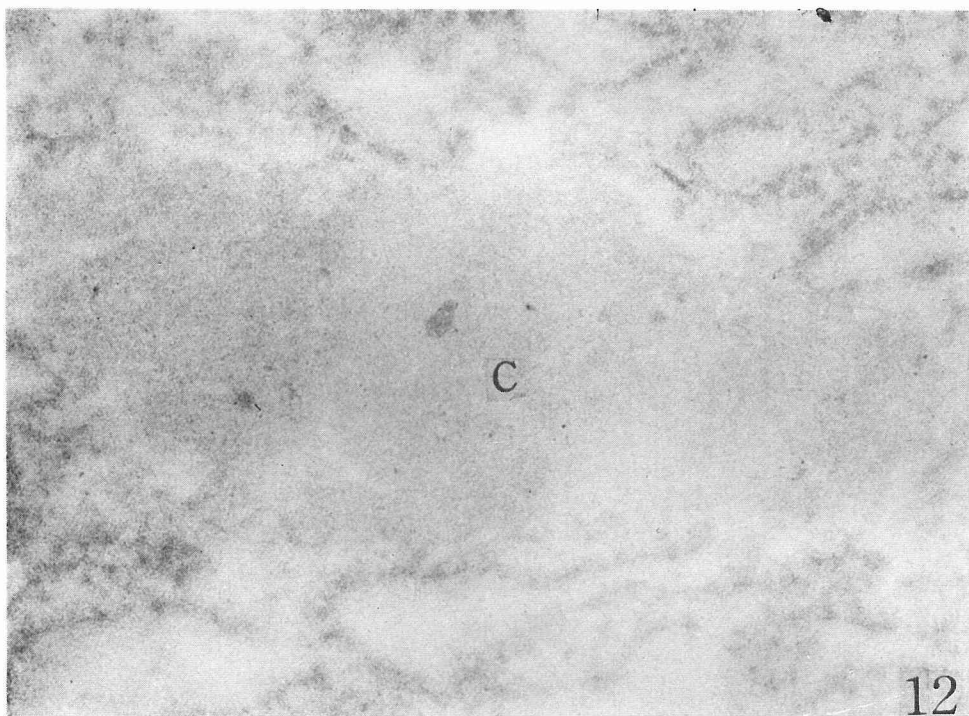


Plate 6

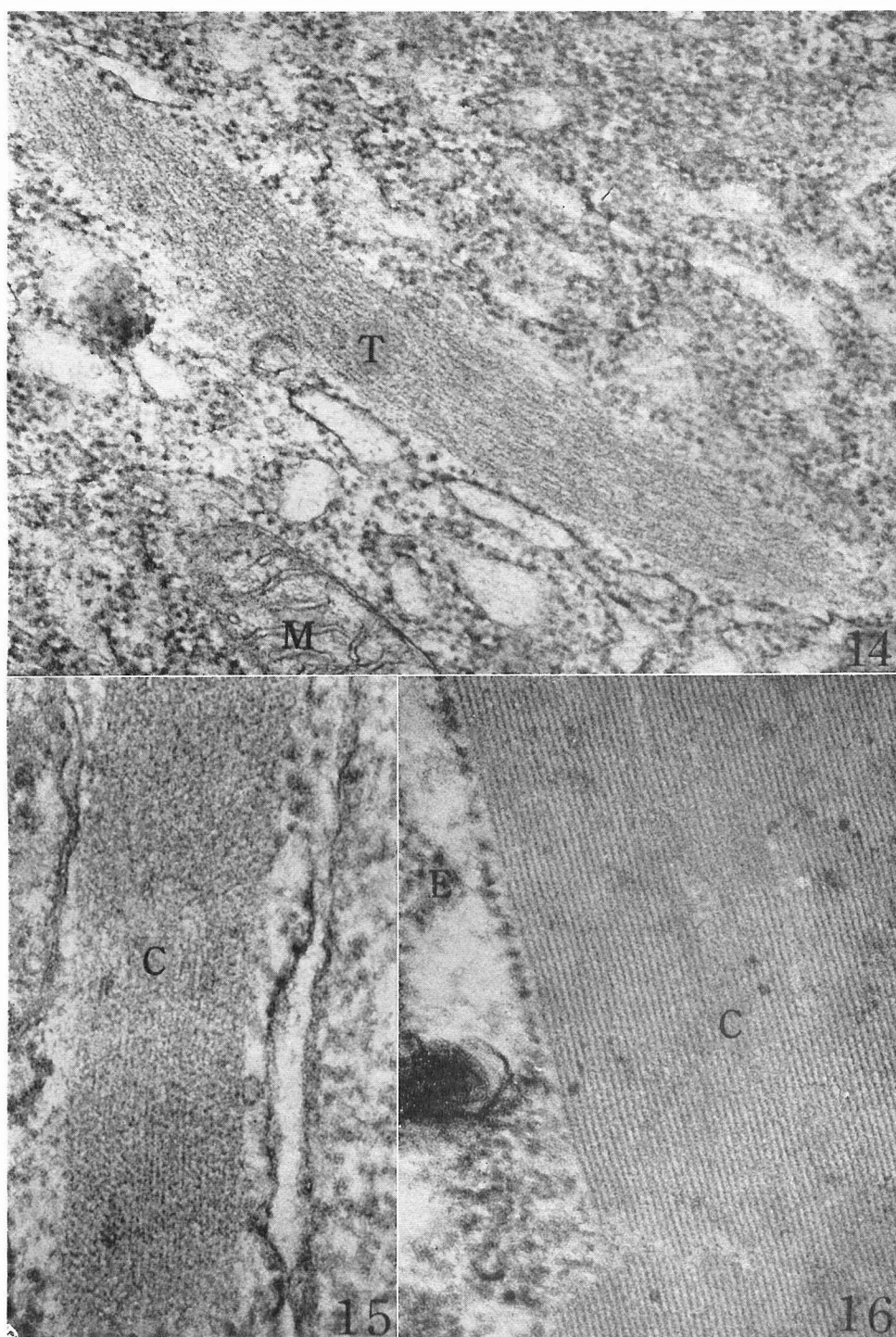


Plate 7

