群馬大学医学部, 解剖学教室 (伊東教授).
Dept. of Anat. (Head: Prof. T. ITO), School of Med., Gunma Univ., Maebashi.

イシガメの Langerhans 島の実験細胞学的研究.

Experimental Cytological Observations on the Islets of LANGERHANS in the Tortoise (*Clemmys japonica*).

狩 野 和 夫 Kazuo KANO.

(Received November 12, 1962.)

糖尿病の際, 膵臓の L 島 (Langerhans 島) に見られる変化の 1 つに B 細胞の水疱変性がある. この変化は下垂体性糖尿病や動物に於ける実験的糖尿病の場合にも認められる. カメに於いては Cardeza (1957 a, b) が Alloxan 投与, ブドウ糖長期注射 (30 日間), 及び膵臓部分切除の初期等の場合に B 細胞の脱顆粒と水疱変性が起こるのを見ている. 狩野 (1961) は 1 年を通じて成熟イシガメの L 島の季節的变化を観察し, 冬眠期 (12—2 月) の主として B 細胞にはグリコゲン浸潤に基づく所謂水疱変性があることを発見し, いままで糖尿病に特有的に現われる病的変化と考えられてきた水疱変性が, 正常動物にも出現することを明らかにした.

私は冬眠期のイシガメに現われるこの変化を実験的に起こし, あるいは抑制することが出来るか否かを知るために, ブドウ糖並びにインシュリン投与実験及び冬眠から覚醒させ飼料を投与する実験等を行なった.

I. 研究材料と方法.

成熟イシガメ (*Clemmys japonica*, 平均体重 1,200 g, 推定年齢はほぼ 40 年) を毎回 2—4 頭使用し, 次の 4 種類の実験を行なった. 1. ブドウ糖大量投与実験: 水疱変性がない季節 (9, 10 月) のカメに毎日大量のブドウ糖 12 g/kg (kg は 1 キログラム体重) を 20 日間, 腹腔内注射を行なった. 2. インシュリン少量投与実験: 水疱変性のある冬眠期 (1, 2 月) のカメに毎日インシュリン 0.3 単位/kg とブドウ糖 0.2—0.3 g/kg を 33 日間, 腹腔内注射した. 3. インシュリン大量投与実験: 同じく冬眠期のカメに毎日インシュリン 2.4 単位/kg を 21 日間, 腹腔内へ注射した. 4. 冬眠から覚醒させ飼料投与実験: 水疱変性のある 1 月カメを 25°C の孵卵器に入れて冬眠から覚醒させ, 20 日間魚肉を与えて飼育した. カメは元気に飼料をとった.

それぞれ断頭屠殺後速かに開腹し, 膵臓を取り出して可及的速かに固定液に投入した. 固定には Levi 氏液と Zenker-Formol を使用し, 総べて脱水後キシロールを経てパラフィンに包埋し, 3—4 μ の連続切片とした. 染色にはヘマトキシリン (Hansen)-エオジン, 鉄ヘマトキシリン (Heidenhain), Azan 染色等を使用し, グ

リコゲンの検出には過沃度酸-Schiff 反応 (PAS 法) をおこない、唾液消化試験を併用した。

II. 所 見.

既に狩野 (1961) が記載したように、イシガメの膵臓の小葉構造は不明瞭である。外分泌性終末部の形は多様であって、終末部は複雑に迂曲して走る長い円柱状の索を形成するように思われる。終末部の間には極めて少量の結合組織があり、そこに導管と血管とがある。島は終末部の周辺部で、血管に面して固有膜と外分泌腺細胞との間に出現し、隣接する終末部の対向面に同時に出現する傾向が強い (図 1)。広い血管腔

Fig. 1. A low power photomicrograph of a tortoise pancreas, showing the distribution of islets (arrows) among the exocrine parts. Fat droplets are seen in the clear islet cells as dark dots. LEVI's fixative, azan stain. $\times 150$

Fig. 2. A photomicrograph of islets, in which canaliculi (arrows) are found between the islet cells, these canaliculi may serve as excretory ducts of exocrine parts. Beta cells (clear) are found more in number than alpha cells (α). LEVI's fixative, azan stain. $\times 1,400$

内へ突出することがある。一般に少数の島細胞よりなり毛細血管の侵入はなく、外分泌細胞との間には結合織性の境界膜はない。島細胞の間には時に狭小な細管が見られる(図2)。これ等は恐らく終末部外分泌腺細胞から排出された外分泌液を導管に送る細管で、これ等の島細胞の出現位置が終末部の末端或は終末部と導管との間を占める頸(neck)或は介在部(Schaltstück)に相当することを示している。伊東、渡と山本(1960)が蛇のL島の研究で述べたように、L島は内分泌機能と同時に外分泌部

Fig. 3. A photomicrograph of pancreatic islets from an October tortoise received 12 g of glucose/kg/day for 20 days. Hydropic beta cells are vacuolated and contain many large and small fat droplets. An alpha cell (α) have considerable number of granules. LEVI's fixative, azan stain. $\times 1,400$

Fig. 4. A photomicrograph showing the presence of a great deal of glycogen (dark) in islet cells and in centroacinar cells (arrows). The pancreas from an October tortoise received 12 g of glucose/kg/day for 20 days. ZENKER-formol, PAS-hematoxylin (HANSEN). $\times 1,400$

の導管の作用も持つことがあることを支持する所見である。島は主として Azan 染色によって赤染する小顆粒を有するA細胞と橙黄染する小顆粒を持つB細胞とからなり、その他青染するD細胞が認められる。A細胞は屢々単独島細胞として外分泌細胞の中に混在することがある。

a) ブドウ糖大量投与実験.

B細胞の顆粒は減少し、細胞質には多数の大小空胞が出現して明るく、細胞は腫大し、所謂水泡変性 hydropic degeneration の状態を呈する。A細胞の顆粒はかなり多く、空胞化は殆どない。B細胞には大小の脂肪滴が多量に出現して

いる。脂肪滴のオスミウム酸による黒化は強く、黒化の弱い冬眠しつつあるカメの場合とは異なる(図3)。PAS法によって島細胞には大量のグリコゲンが認められ(図4)、腺房中心細胞(図4)、導管上皮にも多い(図5)。これらは対照の冬眠ガメ(図6)と一致する所見である。

b) インシュリン少量投与実験

冬眠期のカメに少量のインシュリンとブドウ糖を注射したが、B細胞の水疱変性は強く、B細胞の空胞化は高度である

Fig. 5. A photomicrograph of a small excretory duct containing a great deal of glycogen in the epithelium. The pancreas from an October tortoise received 12 g of glucose/kg/day for 20 days. ZENKER-formol, PAS-hematoxylin. $\times 1,400$

Fig. 6. A photomicrograph of hydropic beta cells in islets from a normal hibernating December tortoise. In hydropic beta cells appear many small vacuoles which represent the glycogen accumulation. Fat droplets are also seen. LEVY's fixative, azan stain. $\times 1,400$

(図7)。しかしB顆粒の比較的多く保たれているものがある。A細胞の顆粒は相当多く、空胞化は殆どない。B細胞には小脂肪滴が若干見られ、その黒化度は弱い。島細胞、腺房中心細胞、及び導管のグリコゲンは非常に多い(図8)。

Fig. 7. A photomicrograph of pancreatic islets from a January tortoise received 0.3 unit of insulin and 0.2—0.3 g of glucose/kg/day for 33 days. High degree of vacuolisation is observed in beta cells which indicate remaining of high hydropic degeneration in islet cells. LEVI's fixative, azan stain. $\times 1,400$

Fig. 8. A photomicrograph of a pancreatic islet from the same animal as in Fig. 7, showing large glycogen content (dark) of islets cells and of a centroacinar cell (arrow). ZENKER-formol, PAS-hematoxylin. $\times 1,400$

c) インシュリン大量投与実験.

B細胞には尙空胞化が認められるが、インシュリン少量投与例より減少して、水泡変性はやや抑制され(図9)、小ないし中等大の脂肪滴が中等量存在する。A細胞の空胞化は軽度であって、かなり多くの顆粒がある(図9)。島細胞、腺房中心細胞、及び導管のグリコゲンは相当多い(図10)。

d) 冬眠から覚醒させ飼料投与実験.

B細胞の顆粒は一般にかなり充満し、細胞質の空胞化はなく、水泡変性像は見当たらない(図11)。A顆粒は一般に中等量である(図11)。B細胞には小脂肪滴が可なり認められるが、その量は不定である。またB細胞には中—小のコロイド滴が群をなして認められるものもある。島細胞のグリコゲンは殆ど認められず、

Fig. 9. A photomicrograph of hydropic degenerated beta cells in islets from a February tortoise received 2.4 unit of insulin/kg/day for 21 days. The vacuolisation (hydropic degeneration) of beta cells have been somewhat diminished. The alpha cells (α) have a considerable amount of alpha granules. LEV's fixative, azan stain. $\times 1,400$

Fig. 10. A photomicrograph of a pancreatic islet from the same animal as in Fig. 9, showing large glycogen content (dark) of islet cells and of a centroacinar cell (arrow). ZENKER-formol, PAS-hematoxylin. $\times 1,400$

Fig. 11. A photomicrograph of pancreatic islets from a January tortoise which has been kept in an incubator at 25°C to awake from the hibernation and given some fish meat for 20 days. Hydropic degeneration (vacuolisation) has vanished completely from beta cells, which contain considerable amounts of granules. In alpha cells (α) moderate amounts of granules are found. Also small fat droplets are seen mainly in beta cells. LEVI's fixative, azan stain. $\times 1,400$

冬眠期の鳥に特長的なグリコゲン浸潤像は全く消失する(図12). しかし腺房中心細胞には尚少量のグリコゲンが、また導管上皮細胞には可成りのグリコゲンが認められる。

III. 考 察.

L島B細胞のグリコゲン浸潤(水泡変性)の原因とその意義については、まだ不明な点が多い。

L島細胞の水泡変性については1901年 Weichselbaum と Strangl が糖尿病昏睡死亡例の睪臓に於いて、はじめて記載し、インシュリン不足を原因と考えた。ついで Allen (1913) は睪部分切除によって糖尿をおこした犬の島細胞と導管に同様な変化を認め、更に猫に過剰のブドウ糖を投与した場合にもこの変化が認められるが、その原因を除く時、或は外よりインシュリンを補給する場合には変化像が再

Fig. 12. A photomicrograph of a pancreatic islet from the same animal as in Fig. 11. Glycogen is not demonstrated in islet cells. ZENKER-formol, PAS-hematoxylin. $\times 1,400$

び正常像に復することより、この変化は糖尿病の原因ではなく、何らかの原因によって過血糖を来たし、或いはインシュリンの不足を来たしたため、L島のインシュリン過剰分泌を強制され、B細胞が過労に陥った像であると考えた(Williamson と Lacy 1961). Duff と Toreson (1951) は Alloxan 糖尿病家兎にインシュリンを投与することによって島細胞の水泡化を予防し、また水泡変性を消失させることができると記し、これは持続性の高血糖が存在する場合にも起こるのであり、従ってグリコゲン浸潤の原因としては高血糖よりも低インシュリン血 (hypoinsulinemia) の方がより重要な役割を演ずると述べた. Lazarus と Volk (1958) は人の糖尿病及び実験的糖尿病で今までB細胞の水泡変性と称せられていた変化は変性と云うよりもむしろ高血糖の結果として起こったグリコゲンの細胞内蓄積(グリコゲン浸潤)であって、同時に現われる脾導管上皮、腎上皮、心臓等のグリコゲン蓄積と共に widespread increased glycogen 又は glycogen infiltration であるとの説を唱えた. Kim, Runge, Wells と Lazarow (1960) は高度の糖尿病を有するラットからとり出した胎児と新生児のB細胞にはグリコゲン浸潤と脱顆粒が著しいのを見て、B細胞の水泡変性は糖尿病に特有のものではなく、B細胞の過度の機能昂進のあるときに現われると述べている. Williamson と Lacy (1961) はネコにブドウ糖を反復腹腔内注射をしたところ、36時間にして島細胞にグリコゲン浸潤が出現したことから、グリコゲン浸潤は細胞の変性というよりも寧ろ高血糖のもとにB細胞が受ける刺激によって2次的に起こったものであるという仮説を支持した. 狩野(1961)はイシガメの島を1年に亘って観察し、特に秋期にはB細胞の脱顆粒があり、冬眠期にも脱顆粒が認められると同時にB細胞に強いグリコゲン浸潤があつて、そのために島細胞は所謂水泡変性の像を示すという成績を得た. この変化は高血糖とB細胞の機能昂進にともなうインシュリン量の増加が、グリコゲンの形成を全身的に昂進せしめ、島細胞もその例外ではなく、グリコゲンの沈着がおこるために招来されたものであり、冬眠期やその前後の寒冷期におこるのはカメのような変温動物では低温状態に於いて細胞の代謝機能の低下により浸潤したグリコゲンの処理が円滑に行なわれないためであろうと述べている.

島細胞に水泡変性のない時期、即ち9月、10月のイシガメに大量のブドウ糖を注射したところ冬眠期の場合のように島細胞のみならず、脾臓の導管上皮、腺房中心細胞等にグリコゲン沈着がおこることが明らかとなったが、これは Lazarus と Volk (1958) 及び Kim, Runge, Wells と Lazarow (1960) 等が説える如く、変性というよりもむしろ高血糖のためB細胞の機能昂進がおこり、インシュリンの増加は全身的にグリコゲンの蓄積をきたし、島細胞にもこの部分現象としてグリコゲンの沈着がおこったことを意味するように思われる.

水泡変性のある季節、即ち1月、2月のカメにインシュリンを投与しても水泡変性は消失しない. このことはグリコゲン浸潤の原因としては高血糖よりも低インシュリン血の方がより重要な役割を演ずると述べた Duff と Toreson (1951) 等

の説と矛盾する。カメのような変温動物に於いて冬眠期やその前後の寒冷期における島細胞の水泡変性は低インシュリン状態のみによっておこったものではないことを示している。低温状態では細胞の代謝機能の低下がおこり、いかにインシュリンを投与しても、グリコゲンの処理が円滑に行なわれないのではないかとの疑問があり、低温が問題となる。

次の実験に於いて冬眠カメを保温覚醒させ給食することによって水泡変性の完全な消失が見られたことから、低温が島細胞の水泡変性即ちグリコゲン浸潤の招来に重要な役割を果すことが証明された。冬眠期の前、気温の低下により、低温がおこり、何等かの原因によって過血糖がおこって B 細胞の機能昂進がおこり、血中のインシュリンが増加するか、或は他の原因によって B 細胞の機能昂進がおこって、インシュリンの増加がおこり、そのために全身的に組織のグリコゲンが増加し、部分現象として島細胞にもグリコゲンの沈着が生ずる。これは又 1 種の冬眠期に於ける貯蔵栄養物質の増加としても考えられる。冬眠期の低温状態は細胞機能の低下を伴うので、このグリコゲン沈着を維持し、インシュリン投与も効果を現わさないのではないかと考えられる。併し低温のみによって島細胞の水泡変性を招来することが出来るか否かは今後の研究で決定されるであろう。

IV. 総 括.

冬眠期 (12—2 月) の成熟イシガメの島細胞とくに B 細胞に現われるグリコゲン浸潤に基づくいわゆる水泡変性を実験的に起こし、あるいは抑制することが出来るか否かを知るために実験を行なった。

1. 島細胞に水泡変性がない、9 月及び 10 月カメに毎日ブドウ糖 12g/kg を 20 日間、腹腔内注射を行なうと、B 細胞の顆粒は減少し、所謂水泡変性の状態を呈する。A 細胞の顆粒はかなり多く、水泡変性は殆どない。島細胞に多量のグリコゲンが証明され水泡変性はグリコゲン浸潤によることが確かめられた。グリコゲンは脾臓の導管上皮と腺房中心細胞にも多量に現われる。これらは対照の冬眠期と一致する所見である。この島細胞の水泡変性は高血糖による B 細胞の機能昂進、高インシュリン血によっておこる諸組織のグリコゲン増加の部分現象と見なされる。

2. 島細胞に水泡変性のある 1, 2 月カメに毎日少量 (0.3u/kg) のインシュリンとブドウ糖 (0.3—0.2g/kg) を 33 日間投与しても島細胞の水泡変性は軽減されない。

3. 同じく冬眠期のカメに毎日インシュリンのみ大量 (2.4u/kg) に 21 日間投与すれば水泡変性をやや軽減させるが、消失させることは出来ない。これはカメのような変温動物に於いては冬眠期におこる島細胞の水泡変性が単なる低インシュリン血によっておこるものでないことを示すが、また低温による細胞機能低下により、インシュリンの効果が現われないことも考えられる。

3. 水泡変性のある冬眠カメ(1月)を 25°C に保温し、冬眠から覚醒させ20日間魚肉で飼育すると、B細胞の顆粒は一般にかなり充満し、水泡変性は消失する。A細胞の顆粒は一般に中等量、島細胞にはグリコゲンは殆ど証明されない。この成績は水泡変性を消失させるには大量のインシュリン投与よりも、低下している細胞機能を体温をたかめることにより促進することの方が効果的であることを意味する。これによって冬眠期のカメの島細胞の水泡変性の招来には気温低下による低体温が重要な役割を演ずることが考えられる。即ち冬眠期前の寒冷期に低温状態がおこり、何等かの原因によって過血糖、B細胞の機能昂進が招来され、組織のグリコゲンは増加し、島細胞にもグリコゲン沈着がおこり、冬眠期の低温による細胞機能の低下によって、グリコゲン沈着は維持されると考えられる。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜った伊東教授に深く感謝致します。

Author's Abstract.

As has been reported in the author's previous paper (KANO 1961), apparent hydropic degeneration based upon glycogen infiltration appears in beta cells of the pancreatic islets of the tortoise (*Clemmys japonica*) during hibernation (from December to February). In order to know whether it is possible or not to bring about the hydropic degeneration in pancreatic beta cells by certain experimental procedures, the following experiments were carried out. Experiment 1. Tortoises (*Clemmys japonica*) having no hydropic beta cells in islets (in September and October) were given intraperitoneal injections of 12 g of glucose per kg of body weight daily for 20 days. Experiment 2. Hibernating tortoises having hydropic beta cells in islets (in January and February) were given intraperitoneal injections of 0.3 unit of insulin and 0.2—0.3 g of glucose per kg of body weight daily for 33 days. Experiment 3. Hibernating tortoises having hydropic beta cells in islets were given intraperitoneal injections of 2.4 unit of insulin per kg of body weight daily for 21 days. Experiment 4. Hibernating tortoises having hydropic beta cells in islets (in January) were kept in an incubator at 25°C to awake from the hibernation and fed ad libitum on some fish meat for 30 days.

Tissues from pancreas were fixed in LEVI's solution and in ZENKER formol. Paraffin sections were cut 4μ thick and stained with hematoxylin eosin or HEIDENHAIN's azan. Glycogen was demonstrated by the periodic acid-SCHIFF method (PAS) and identified by saliva-digestion test.

Experiment 1. By the prolonged intraperitoneal administrations of glucose there appeared degranulation and hydropic degeneration in beta cells of islets, alpha cells showed, however, almost no signs of hydropic change, packed by fairly large amount of alpha granules. By PAS-method much glycogen was demonstrated in islets cells, proving that the hydropic degeneration is nothing other than the glycogen infiltration of the islet cells. Besides in the islet cells the glycogen was observed abundantly in duct epithelium and centroacinous cells of the exocrine pancreatic tissue. These findings well correspond to the results of observation on control specimens taken from the hibernating animals. The hydropic degeneration of the beta cells found in

this experiment may be regarded as a partial phenomenon of the widespread increase of glycogen in tissue cells caused by the hyperfunction of the beta cells and hyperinsulinemia which had been resulted by the glucose administration.

Experiment 2. The prolonged intraperitoneal administration of small doses of insulin and glucose to the hibernating tortoises was not able to diminish or to take away the hydropic change from beta cells.

Experiment 3. In the hibernating tortoises received large doses of insulin, the hydropic degeneration of beta cells was somewhat diminished, but never disappeared. This fact may suggest that in the cold-blooded animal like the tortoise the hydropic degeneration of islet cells found in the hibernation season should not be brought about merely by the hypoinsulinemia. It must be, however, taken into consideration that in the cold climate the hypofunction of tissue cells induced by low temperature of animals may probably inhibit the effect of insulin.

Experiment 4. The beta cells were found generally packed by considerable amounts of granules and without any signs of hydropic degeneration. Alpha granules were seen in moderate amount in general. Glycogen disappeared almost completely from islet cells. This finding may indicate that accelerating suppressed function of cells during the hibernation by means of keeping the animals warm is more effective to vanish the hydropic degeneration than the administration of large doses of insulin. The low temperature of animals induced by cold climate may presumably play an important roll in producing the so-called hydropic degeneration in islet cells during hibernation.

文 献

- Cardeza, A. F.**: Histologia de los islotes de Langerhans en la tortuga diabética por pancreatomectomia parcial. *Rev. Soc. argent. biol.* 33 (1957a). P. 67-73. — Histologia de los islotes de Langerhans en la tortuga diabética por aloxano y por acción de la glucosa. *Rev. Soc. argent. biol.* 33 (1957b). P. 74-79. — **Duff, G. L.** and **W. E. Toreson**: Prevention and reversal despite hyperglycemia of glycogen infiltration ('hydropic degeneration') in the pancreas in alloxan diabetes in the rabbit. *Endocrin.* 48 (1951). P. 298-312. — **伊東俊夫, 渡 仲三, 山本輝道**: 蛇の膵臓の Langerhans 氏島の研究. *日組録*, 20 (1960) 頁 311-338. — **狩野和夫**: イシガメの Langerhans 氏島の組織学的, 細胞学的並びに電子顕微鏡的研究. *日組録*, 22 (1961). 頁 123-180. — **Kim, J. N., W. Runge, L. J. Wells** and **A. Lazarow**: Pancreatic islets and blood sugars in prenatal and postnatal offspring from diabetic rats: beta granulation and glycogen infiltration. *Anat. Rec.* 138 (1960). P. 239-259. — **Lazarus, S. S.** and **B. W. Volk**: Functional and morphologic studies on the effect of orinase on the pancreas. *Endocrinol.* 62 (1958). P. 292-307. — **Weichselbaum, A. u. E. Stangel**: Zur Kenntniss der feineren Veränderungen des Pankreas bei Diabetes mellitus. *Wien. Klin. Wschr.* 14 (1901). P. 968-972. — **Williamson, J. R.** and **P. E. Lacy**: Electron microscopy of glycogen infiltration in islets of cat. *Archives of Pathology* 72 (1961). P. 637-647.