Morphological Changes of Pancreatic B Cells in Ventromedial Hypothalamic (VMH)-lesioned Obese Rats

Yohei MIYAMOTO, Hajime MIYAMOTO, and Eimei SATO

*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto University,
Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606, Japan*

(Received 2 May 1989/Accepted 9 June 1989)

Morphological changes of pancreatic B cells were investigated in ventromedial hypothalamic (VMH)-lesioned obese rats. An increase in body weight, a decrease in body length, and a marked increase in fat-pad were observed in VMH-lesioned obese rats. The volume density of pancreatic islets and that of B cells in VMH-lesioned obese rats were more increased than those in sham-operated control rats. The B cells of VMH-lesioned obese rats often showed a slight reaction for aldehyde fuchsin or anti-pig insulin serum. By the electron microscopy, the degranulated B cells were found to contain well developed Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum. These observations indicate increased activities of synthesis and release of insulin. We concluded that VMH-lesioned obesity was caused by accelerated lipogenesis with hypersecretion of insulin.

視床下部腹内側核破壊肥満ラットにおける 膵島B細胞の形態学的変化

宮本 庸平・宮本 元・佐藤 英明

京都大学農学部畜産学科

視床下部腹内側核 (ventromedial hypothalamus : VMH) 破壊肥満ラットは肥満モデル動物の一つとして有用とされており、過食 [1], 血中インスリン値の上昇 (高インスリン血症) [2, 3], 血中グルカゴン値 [4] および成長ホルモン値 [5] の低下などが認められている。なかでも、高インスリン血症は肥満の成因的意義をもつものと考えられている [3]。インスリンを分泌するのは膵島の大部分を占めるB細胞であり、VMH 破壊肥満ラットにおいても個々の膵島の肥大 [6-9] やB細胞の超微形態学的変化 [9] について報告されているが、膵島B細胞の体積比率や免疫組織化学的特性についてはまだ明らかにされていない。

本実験では VMH 破壊肥満ラットの膵島B細胞について、形態計測の方法、免疫組織化学的方法および電子顕微鏡的方法を用いてより詳細な検討を行なった。

材料および方法

1. VMH 破壊手術: 当研究室で維持している26-7日齢のWistar系雌ラット40匹を用い、手術は安岡[10]や石橋ら[8]の方法に従って行なった。すなわち脳定位固定装置 (高橋商店製) によりラットを保定し、間脳細胞破壊装置 (高橋商店製) により3 mAの電流を5秒間、3回通電し電氣的に左右両側のVMHを破壊した。術後、感染予防のためペニシリン懸濁液を投与した。対照として、同領域に電極針を刺入するのみで電流を流さない疑似手術を施したものを4匹用いた。実験に供したラットは光周期 (13L-11D) および温度 (21-23℃) の調節された飼育室で、ラット・マウス用固型飼料 NMF (オリエンタル酵母工業製) と水道水を自由に摂取させた。食餌摂取の行動観察や体重の測定を毎週2回行ない、肥満の判定には体重と Lee's index ($\sqrt[3]{\text{体重(g)}/\text{身$

長 (cm)) [11] を用いた。

2. 光学顕微鏡的方法：ラットは90日齢で sodium-pentobarbital 麻酔後、体重、体長などを測定したのち、断頭屠殺し直ちに脾臓を摘出した。脾臓はブアン液で固定後、無作為に6個の組織片に分け、パラフィン包埋を行ない、5 μ m の連続切片を作製した。切片にはアルデヒド・フクシン (AF) - マッソン・ゴールドナー (MG) 染色 [12] を行なった。標本は2種類の接眼ミクロメーター (10mm $\times$ 10mm, 1目1mm; 10mm $\times$ 10mm, 1目0.5mm) を用い、当的法 [12, 13] により脾島 (1目1mm の接眼ミクロメーター使用) および脾島B細胞と考えられているAF陽性細胞 (1目0.5mm の接眼ミクロメーター使用) の体積比を計測した。また脳の傷害部位を確認するため、脳を10%中性ホルマリンで固定した後、前頭断切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行なった。傷害部位が両側の腹内側部以外の場合は実験対象から除外した。

3. 免疫組織化学的方法：AF-MG 染色切片と連続する切片を使用し、一次抗体として1/300倍希釈のモルモット抗ブタインスリン血清 (国際試薬) を用い、PAP法 (ヒストセット・ユニバーサルキット, 国際試薬) によって行なった。一次抗体の対照にはモルモット正常血清を用いて、抗体がラット脾臓において特異的に免疫交差反応を示すことを確認した。また免疫組織化学的染色切片においても、抗インスリン陽性細胞すなわち脾島B細胞の体積比を求めた (1目0.5mm の接眼ミクロメーター使用)。

4. 電子顕微鏡的方法：一部の脾臓 (脾臓側脾臓) は2.5%グルタルアルデヒド (0.1M カコジナル酸ナトリウム緩衝液, pH 7.3) で4 $^{\circ}$ C, 2時間固定後、1%四酸化オスミウム (同緩衝液) で4 $^{\circ}$ C, 2時間後固定し、常法に従いエポン包埋を行なった。Sorvall Porter-Blum 型ウルトラミクロトームで超薄切片作製後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (日立H-300型, 75 KV) によって観察を行なった。

成 績

1. VMH 破壊肥満ラットの体重および肥満度：VMH 破壊手術を行なったラット36匹のうち30匹は術後まもなく死亡したり、あるいは対照よりも悪い成長を示すものであった。さらに6匹は術後しばらくして過食し、体重や Lee's index が肥満を示していたが、1匹は脳の前頭断切片の観察から、VMH が片側しか破壊されていないことが判明した。よって本実験では5匹を肥

Table 1. Body weight, body length and Lee's index of VMH-lesioned obese rats

Group	Body weight (g)	Body length (cm)	Lee's index*
VMH-lesioned obesity (5)	385 $\pm$ 15 ^a	32.2 $\pm$ 0.8 ^b	0.390 $\pm$ 0.006 ^a
Sham-operated control (4)	255 $\pm$ 15	38.2 $\pm$ 0.5	0.318 $\pm$ 0.004

Values are means $\pm$ SEM for the numbers of rats indicated in parentheses.

*Lee's index = $\sqrt[3]{\text{Body weight (g)}/\text{Naso-anal length (cm)}}$

^aP < 0.001 ^bP < 0.005

Table 2. Morphometry of the pancreatic islets in VMH-lesioned obese rats

Group	Volume density of the islets in pancreas (%)	No. of islet (/mm ²)	Size of a islet ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)
VMH-lesioned obesity (5)	3.13 $\pm$ 0.56 ^a	1.7 $\pm$ 0.2 ^a	1.86 $\pm$ 0.20 ^a
Sham-operated control (4)	1.05 $\pm$ 0.06	1.0 $\pm$ 0.1	1.10 $\pm$ 0.08

Values are means $\pm$ SEM for the numbers of rats indicated in parentheses ^aP < 0.05

満ラットと判定した。

VMH 破壊肥満ラットでは術後、3, 4日より対照ラットに比べ体重の増加がみられ、しだいにその差が開き、90日齢の肥満ラットでは385 $\pm$ 15g と対照ラットの255 $\pm$ 15g に比べて有意 ($p < 0.001$) に増加した (Table 1)。体長は肥満ラットで32.2 $\pm$ 0.8cm と対照ラットの38.2 $\pm$ 0.5cm に比べて有意 ($p < 0.005$) に短くなっていた (Table 1)。また肥満度を示す Lee's index は、肥満ラットで0.390 $\pm$ 0.006 と対照ラットの0.318 $\pm$ 0.004よりも有意 ($p < 0.001$) に大きくなっていた (Table 1)。さらに肥満ラットは対照ラットに比べて腹腔内、皮下および各種臓器に顕著な脂肪の沈着が認められた。

2. 光学顕微鏡的観察：VMH 破壊肥満ラットでは脾島の著しい肥大やその数の増加が認められ (Fig. 1), 脾島の脾臓において占める割合も3.13 $\pm$ 0.56%と対照ラットの1.05 $\pm$ 0.06%の約3倍となっていた (Table 2)。一般にアルデヒド・フクシンはB細胞の β 顆粒を濃紫色に染めるとされているが、肥満ラットでは対照ラットに比べ細胞質の染色性の低い細胞がかなり認められ、 β 顆粒の減少が推測された (Fig. 1-a, c)。脾島におけ

Table 3. Morphometry of the AF-positive cells in VMH-lesioned obese rats

Group	Volume density of AF-positive cells in islets (%)	Volume density of AF-positive cells in pancreas (%)
VMH-lesioned obesity (5)	89.1 ± 1.6 ^a	2.82 ± 0.55 ^a
Sham-operated control (4)	80.7 ± 1.9	0.85 ± 0.04

Values are mean ± SEM for the numbers of rats indicated in parentheses ^aP < 0.05

る AF 陽性細胞の占める割合は肥満ラットで89.1 ± 1.6%と対照ラットの80.7 ± 1.9%に比べて有意 (p < 0.05) に増加しており、膵臓における AF 陽性細胞の占める割合も2.82 ± 0.55%と対照ラットの0.85 ± 0.04%の3倍以上となっていた (Table 3)。

3. 免疫組織化学的検討: VMH 破壊肥満ラットにおけるB細胞の抗インスリン血清に対する反応性は、対照ラットに比べやや低く (Fig. 1-b, d), AF-MG 染色標本の場合と同様に顆粒の減少が推測された。しかし、その差は AF-MG 染色ほど顕著ではなかった。B細胞の膵島における割合は肥満ラットで90.6 ± 1.8%, 対照ラットで82.2 ± 2.2%と AF 陽性細胞の割合よりも若干多かった (Table 4)。また膵臓における割合も AF 陽性細胞と同様の結果を示した。

4. 電子顕微鏡的観察: 対照ラットのB細胞のβ顆粒は、限界膜に包まれた電子密度の高い芯をもっており、限界膜と芯との間隙は比較的大きかった (Fig. 2)。VMH 破壊肥満ラットのB細胞において、β顆粒は対照ラットに比べて電子密度が高かったが、その大きさは小さく、また数も減少していた (Figs. 4, 5)。さらに細胞によっては電子密度の低い顆粒を多く含むもの (Fig. 3) や、顆粒の芯が欠如した、脱顆粒を示す空胞が存在するもの (Fig. 5) も認められた。肥満ラットのB細胞では不整形を成した核 (Figs. 3, 4) が対照ラット (Fig. 2) よりも多く見られた。このような核において核小体は極めて明瞭なものが多かった (Fig. 4)。ゴルジ体は肥満ラットにおいてよく発達しており、著しく拡大した嚢状構造は末端部が膨大し、その中に電子密度の低い物質が含まれていることもあった (Fig. 4)。また粗面小胞体もよく発達しており著しく肥大していた (Figs. 3, 4)。ミトコンドリアはやや丸く膨化し、クリスタの配列にも乱れが認められ、数が増加していた (Figs. 3, 4)。

Table 4. Morphometry of the B cells containing insulin in VMH-lesioned obese rats

Group	Volume density of B cells in islets (%)	Volume density of B cells in pancreas (%)
VMH-lesioned obesity (5)	90.6 ± 1.8 ^a	2.85 ± 0.52 ^a
Sham-operated control (4)	82.2 ± 2.2	0.86 ± 0.04

Values are means ± SEM for the numbers of rats indicated in parentheses ^aP < 0.05

肥満ラットの膵島の他の細胞は、B細胞で観察されたように顆粒や細胞内小器官の顕著な変化は認められなかった。しかし、膵島周辺部の各細胞において、外分泌の腺房細胞にみられるチモーゲン顆粒と内分泌顆粒の両方をもった細胞が、B細胞だけでなく他の細胞にも対照ラットより多く観察された (Fig. 6)。

考 察

本実験において、VMH 破壊肥満ラットの膵島はその肥大や数の増加が認められ、体積比が増大することが認められた。このような膵島の体積比の増大は、膵島の大部分を占めるB細胞の体積比の増大が原因と考えられる。肥満ラットの膵島周辺部に内分泌顆粒と外分泌顆粒をもった細胞が観察されたが、このような細胞は acinar-islet cell [14], mixed cell あるいは intermediate cell [15, 16] などと表現され、膵島の肥大過程における外分泌細胞の膵島内分泌細胞への転換の可能性を示唆すると報告されている。このことから、肥満ラットでこのような移行細胞が多いことは、外分泌細胞の内分泌細胞の移行が促進されているものと推察される。

肥満ラットの膵島B細胞においてかなり観察された脱顆粒像は、遺伝性肥満の Zukker ラット (fa/fa) [17], 肥満型糖尿病の yellow KK マウス [16], アロクサン給与ラット [18], トルブタミド投与ラット [19], コルチゾン投与ウサギ [20] やピロカルピン投与イヌ [21] などでも認められており、顆粒分泌の亢進の表現像と考えられる。肥満ラットでやや多く見られた不整形の核は、表面積を増加させることで機能的要求に対処していることを示しているものと考えられ、その細胞が非常に活発に機能していると推察される。また、ゴルジ体や粗面小胞体の発達は Zukker ラット [17], sand ラット [22], 糖尿病チャイニーズ・ハムスター [23] やピロカ

ルピン投与イス [21] などにも認められており, β 顆粒の合成や貯蔵が進んでいることを示している。ミトコンドリアの数の増加や変形は, yellow KK マウス [16] や糖尿病ミュータント・マウス (C57 BL/Ks-db/db) [24] と同様に, 細胞機能の亢進に伴う変化の一つと考えられる。

以上の成績から, VMH 破壊肥満ラットの膵島および膵島 B 細胞の体積比の増大や B 細胞の機能亢進は, インスリンの合成および分泌が盛んであることを示しており, VMH 破壊肥満ラットにおける脂肪合成促進の成因而と推測される。ヒトにおける肥満の原因として, 体内の脂肪の蓄積があげられているが, VMH 破壊肥満ラットにおいても体内に多量の脂肪が蓄積されるので, その成因而である高インスリン血症の機序を明らかにするためのモデル動物として重要と思われる。

VMH 破壊による膵島への影響は B 細胞に対してだけでなく, 他の膵島細胞に対しても認められる。Seino et al. [25] の単離膵臓の灌流実験によるインスリンだけでなくソマトスタチンの分泌の増加が認められており, ソマトスタチンを分泌する D 細胞の形態的变化も予想される。また, 膵臓ポリペプチドについてはほとんど検討されていない。今後はさらに, グルカゴン, ソマトスタチン, 膵臓ポリペプチドなどの他の膵臓ホルモンを分泌する A, D および PP [26] 細胞の同定を行ない, B 細胞との相互関係を形態学的に検討し, 肥満との関連性について調べる必要がある。

要 約

視床下部腹内側核 (VMH) 破壊動物は肥満を示すことから, 肥満モデル動物として利用されているが, 今回, 電気破壊により VMH を破壊して作製した肥満ラットの膵島 B 細胞の形態変化について観察した。肥満ラットは対照ラットに比べ体重が重くなるが, 体長は短くなり, 体内に著しい脂肪の蓄積が認められるようになるとともに, 膵島および膵島 B 細胞は体積比も有意に大きくなった。また肥満ラットの B 細胞には, アルデヒド・フクシンに対する染色性や抗インスリンに対する反応性の低下したものが多く見られた。電顕観察によると, B 細胞には β 顆粒の著しい分泌を示す脱顆粒像が見られ, インスリン分泌の増大が推測された。さらにゴルジ体や粗面小胞体の発達などから, 顆粒合成の亢進も推測された。以上の成績から, VMH 破壊による肥満ラットにおいては, 膵臓でのインスリンの合成や分泌が増大するとともに, 脂肪の合成が促進されているものと推察された。

文 献

- [1] Hetherington, A. W. and Ranson, S. W. (1942). The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *Am. J. Physiol.*, **136**, 609-617.
- [2] Hales, C. N. and Kennedy, G. C. (1964). Plasma glucose, non-esterified fatty acid and insulin concentrations in hypothalamic-hyperphagic rats. *Biochem. J.*, **90**, 620-624.
- [3] 井上修二 (1979). 実験肥満モデル, 実験肥満動物の内分泌的異常と成因. ホルモンと臨床, **27**, 601-608.
- [4] Inoue, S., Campfield, L. A., and Bray, G. A. (1977). Comparison of metabolic alternations in hypothalamic and high fat diet-induced obesity. *Am. J. Physiol.*, **233**, R162-R168.
- [5] Frohman, L. A. and Bernardis, L. L. (1968). Growth hormone and insulin levels in weanling rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Endocrinology*, **82**, 1125-1132.
- [6] Kennedy, G. C. and Parker, R. A. (1963). The islets of Langerhans in rats with hypothalamic obesity. *Lancet*, **ii**, 981-982.
- [7] Han, P. W., Yu, Y.-K., and Chow, S. L. (1970). Enlarged pancreatic islets of tube-fed hypophysectomized rats bearing hypothalamic lesions. *Am. J. Physiol.*, **218**, 769-771.
- [8] 石橋武彦・宮本 元・佐藤英明 (1977). 視床下部性の肥満ネズミにおける膵臓ランゲルハンス島の組織学的観察. 医学と生物学, **94**, 93-96.
- [9] 和泉英彦 (1978). 視床下部性肥満ラットの膵ラ氏島の組織学的検討. 日内分泌会誌, **54**, 876-890.
- [10] 安岡 勁 (1966). 視床下部傷害による脳の組織学的研究. 四国医学雑誌, **22**, 231-245.
- [11] Lee, M. O. (1929). Determinations of surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *Am. J. Physiol.*, **89**, 24-33.
- [12] 宮本 元・三笠牧子・石橋武彦 (1989). プタおよびイノブタ膵臓におけるランゲルハンス島と B 細胞の分布. 日畜会報, **60**, 255-259.
- [13] Weibel, E. R., Kistler, G. S., and Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.*, **30**, 23-38.
- [14] Mikami, S. and Mutoh, G. S. (1971). Light- and electron-microscopic studies of the pancreatic islet cells in the chicken under normal and experimental conditions. *Z. Zellforsch.*, **116**, 205-227.
- [15] Pictet, R., Orci, L., Gonet, A. E., Rouiller, C., and Renold, A. E. (1967). Ultrastructural studies of the hyperplastic islets of Langerhans of spiny mice (*Acomys Cahirinus*) before and during the development of hyperglycemia. *Diabetologia*, **3**, 188-211.
- [16] Shino, A. and Iwatsuka, H. (1970). Morphological observations on pancreatic islets of spontaneous diabetic mice, "Yellow KK". *Endocrinol. Jap.*, **17**, 459-476.
- [17] Shino, A., Matsuo, T., Iwatsuka, H., and Suzuki, Z. (1973). Structural changes of pancreatic islets in genetically obese rats. *Diabetologia*, **9**, 413-421.
- [18] 小林 寛・高橋嘉幸・城下 尚 (1964). フロクサン給与と下垂体切除がラット膵臓の LANGERHANS 氏島に及ぼす影響. 日本組織学記録, **25**, 199-216.
- [19] Williamson, J. R., Lacy, P. E., and Grisham, J. W. (1961). Ultrastructural changes in islets of the rat

- produced by tolbutamide. *Diabetes*, **10**, 460-469.
- [20] Volk, B. W. and Lazarus, S. S. (1963). Ultramicroscopic studies of rabbit pancreas during cortisone treatment. *Diabetes*, **12**, 162-173.
- [21] 渡 伸三 (1959). シンポジウムⅡ インスリン分泌の機構と調節. 2. 2, 3の実験条件下における膵島の超微形態学, 特にB細胞の変化について. 日内分泌会誌, **44**, 721-727.
- [22] Like, A. A. and Miki, E. (1967). Diabetic syndrome in sand rats. IV. Morphologic changes in islet tissue. *Diabetologia*, **3**, 143-166.
- [23] Like, A. A., Gerritsen, G. C., Dulin, W. E., and Gaudreau, P. (1974). Studies in the diabetic Chinese hamster: Electron microscopy of pancreatic islets. *Diabetologia*, **10**, 509-520.
- [24] Like, A. A. and Chick, W. L. (1970). Studies in the diabetic mutant mouse: II. Electron microscopy of pancreatic islets. *Diabetologia*, **6**, 216-242.
- [25] Seino, Y., Seino, S., Takemura, J., Tsuda, K., Nishi, S., Ishida, H., Seno, M., Usami, M., Ikeda, M., and Imura, H. (1984). Changes in insulin, somatostatin, and glucagon secretion during the development of obesity in ventromedial hypothalamic-lesioned rats. *Endocrinology*, **114**, 457-461.
- [26] Kaung, H.-L. C. (1985). Electron microscopic immunocytochemical localization of glucagon and pancreatic polypeptide in rat pancreas: Characterization of a population of islet cells containing both peptides. *Anat. Rec.*, **212**, 292-300.

Explanation of Figures

- Fig. 1. Light micrographs of the pancreatic islets of obese rat (a, b) and control rat (c, d). The hypertrophy of the islets and the degranulation showed by the slight reactions of the B cells are observed in obese rat. Aldehyde fuchsin-Masson Goldner staining (a, c) and immunohistochemistry for insulin (b, d) $\times 300$
- Fig. 2. Electron micrograph of the B cell of control rat. Nucleus (N) shows round shape. $\times 4000$
- Fig. 3. Electron micrograph of the B cell of obese rat. Pale granules are numerous. Nucleus (N) shows irregular shape. Mitochondria (arrowheads) swelled and are round-shaped. $\times 4000$
- Fig. 4. Electron micrograph of the B cells of obese rat. Irregular nucleus (N) is often observed. Golgi apparatus (GA) and rough endoplasmic reticulum were well developed. Mitochondria (arrowheads) swelled and are round-shaped. $\times 4000$
- Fig. 5. Electron micrograph of the B cell of obese rat. A size of a granule is mostly a little smaller, and some cores of granules are more electron-dense. Degranulation are remarkable. $\times 16000$
- Fig. 6. Electron micrograph of the islet of obese rat. A number of mixed cells (MC) containing both endocrine and exocrine granules are observed along the periphery of the islet. $\times 2000$