

論文の内容の要旨

氏名：福井 廣 祐

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：Histochemical studies on sialic acids and antimicrobial substances in the modified glands of snout and carpal skin in the pig

（ブタ吻鼻ならびに手根皮膚の変形腺におけるシアル酸と抗菌物質に関する組織化学的研究）

哺乳類の皮膚は体表を覆い、外界の種々の刺激から体を保護する最も広く大型の器官であり、毛、皮膚腺など様々な付属器が認められる。また、皮膚は感覚刺激の受容、体温調節、脂肪の貯蔵やビタミンの生成など多様な機能を備え、一部の皮膚では、形態的あるいは機能的特殊化がなされている。ヒトを除く哺乳類皮膚のエクリン腺は、その特定部位にのみ存在し、変形腺として分類される。ブタにおいてこのエクリン腺は、吻鼻平面腺（*Gil. plani rostralis*）および手根腺（*Gil. carpeae*）として当該皮膚に分布するが、これらの腺における機能的役割は未だ十分に解明されていない。

一般に、分泌性タンパク質成分を構成するポリペプチドは粗面小胞体に結合しているリボソームで合成され、小胞体槽に排出された後、分泌小胞を介してゴルジ装置へ送られるが、この過程において、小胞体およびゴルジ装置内でタンパク質の糖鎖付加（グリコシレーション）が起こることが知られている。糖タンパク質に付加される糖鎖は、アスパラギン残基に結合している N 型糖鎖とセリンまたはスレオニン残基に結合している O 型糖鎖とに大別され、複数の糖質が糖鎖の構成に関わるとともに、各糖鎖は特異的なレクチン結合性を有している。特に、糖鎖の外側末端に位置するシアル酸は、その陰性荷電により分子の輸送、タンパク構造の安定化や分泌液への粘性賦与などの機能を有し、また細胞表面において、種々の物質や微生物に対する認識部位としての役割を果たすなど、様々な生理作用が知られている。一方、分泌性タンパク質として細菌、真菌およびウイルスに対する非特異的な免疫機構に関与する抗菌物質は、哺乳類の皮膚において病原微生物に対する感染防御に極めて重要な物質である。

そこで本研究では、ブタの吻鼻平面腺および手根腺におけるシアル酸と抗菌物質の詳細な局在とその性質を、糖質ならびに免疫組織細胞化学的に明らかにし、皮膚機能との関連性について検討した。

1. ブタの吻鼻平面腺におけるシアル酸と抗菌物質の組織化学的研究（光顕）

ブタの皮膚において、感覚器官の一つである吻鼻平面には吻鼻平面腺が存在し、その腺上皮は暗調細胞と明調細胞から構成されている。本腺からの分泌物は皮膚機能に関わるとされているが、その詳しい機能的役割については未だ明らかにされていない。本研究では、ブタ吻鼻平面腺におけるシアル酸や抗菌物質の局在とその性質を、糖質ならびに免疫組織化学的に追究した。増感シアル酸検出法を適用すると、腺上皮の暗調細胞は陽性を示し、ケン化処理を施すと、その反応性は増強した。レクチン法において、WGA および SSA では暗調細胞が中等度から強陽性反応を示したが、MAM は一部の暗調細胞にのみ強く結合した。抗リゾチーム、IgA、ラクトフェリンおよび β -ディフェンシン 2 抗体を用いて免疫組織化学的手技を施したところ、一部の暗調細胞に陽性反応が認められ、抗 Rab3D 抗体においても同様の染色態度が観察された。一方、明調細胞は適用した全ての染色反応において陰性を示した。

以上の結果から、吻鼻平面腺上皮の暗調細胞は O-アセチル化されたシアル酸を多く含み、 $\text{Sia}\alpha 2\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ 構造は一部の暗調細胞にのみ局在していることが示された。また、各種抗菌物質ならびに分泌制御タンパク質も一部の暗調細胞にのみ認められ、Rab3D は、シアル酸や抗菌物質の分泌制御を担っ

ていることが示唆された。本腺から分泌されるこれらの物質は、感覚器官であるブタ吻鼻平面皮膚における防御機能に、深く関わっていることが組織化学的に明らかにされた。

2. ブタの吻鼻平面腺における暗調細胞の分類とシアル酸、リゾチームならびに β -ディフェンシンの細胞化学的研究 (電顕)

上記光顕レベルでの解析により、吻鼻平面腺の腺上皮は一部の暗調細胞において染色態度の異なるタイプが存在することが判明した。また、本腺において、シアル酸や抗菌物質の局在を細胞の微細構造レベルで明らかにした報告は未だ無い。そこで、本研究では、一般形態観察、コロイド金レクチン法および免疫電顕法によってブタの吻鼻平面腺における暗調細胞の分類とシアル酸、リゾチームならびに β -ディフェンシンの詳細な分布を電顕細胞化学的に解析し、染色態度の異なる暗調細胞の性質を明らかにするとともに腺機能との関連性を追究した。暗調細胞は、電顕形態的にやや大型の分泌顆粒を有する I 型と小型の分泌顆粒を有する II 型に分類することができた。中性糖検出反応を適用すると、I 型および II 型暗調細胞では分泌顆粒の染色態度において差異が認められ、I 型暗調細胞の分泌顆粒は弱から中等度の陽性を、II 型暗調細胞の分泌顆粒は強陽性を示した。WGA ならびに SSA レクチンを適用すると、I 型および II 型暗調細胞の分泌顆粒、ゴルジ装置にコロイド金粒子が観察されたが、MAM レクチンでは、II 型暗調細胞にのみ陽性反応が認められた。抗リゾチーム抗体を用いた免疫電顕法では、II 型暗調細胞の分泌顆粒やゴルジ装置が陽性反応を示したが、I 型暗調細胞ではコロイド金粒子をほとんど認めなかった。また、抗 β -ディフェンシン 2 抗体においても同様に、II 型暗調細胞にのみ顕著な陽性反応が観察された。

以上の結果から、ブタの吻鼻平面腺上皮における暗調細胞は微細形態的に I 型と II 型に分類され、さらに II 型暗調細胞は、Sial2-6Gal/GalNAc ならびに Sial2-3Gal β 1-4GlcNAc 構造を有するシアル酸と、リゾチームおよび β -ディフェンシンを産生・分泌することが電顕細胞化学的に初めて明らかにされた。

3. ブタの手根腺におけるシアル酸と抗菌物質の組織化学的研究 (光顕)

ブタの手根皮膚に認められる手根腺は、縄張りの主張や性臭に関与するニオイ物質を分泌し、種内のコミュニケーションなどに関わるとされている。しかしながら、分泌物の性状や腺機能については、未だ十分に解明されていない。本研究では、ブタ手根腺におけるシアル酸ならびに抗菌物質の局在を組織化学的に追究し、皮膚機能との関連性について検討した。暗調細胞と明調細胞から構成される腺上皮に増感シアル酸検出法を適用すると、暗調細胞が陽性反応を示した。ケン化処理を施した同法ではその反応性が顕著に増強したことから、O-アセチル化されたシアル酸の局在が確認された。レクチン法による結合性から、暗調細胞には Sial2-6Gal/GalNAc 構造が含まれており、また一部の暗調細胞では Sial2-3Gal β 1-4GlcNAc 構造も局在することが示された。免疫組織化学的手技を適用したところ各一次抗体に対し、一部の暗調細胞が中等度から強陽性に反応した。

以上の結果から、手根腺には多様なシアル酸や抗菌物質が局在し、暗調細胞におけるこれらの分布には差異が認められた。本腺は、縄張りの主張やコミュニケーション機能のみならず、手根皮膚の保護機能にも関与しているものと考えられる。

4. ブタの手根腺における糖質と β -ディフェンシンの細胞化学的研究 (電顕)

ブタ手根腺において、電顕レベルでの糖質や抗菌物質の詳細な局在については未だ報告されていない。本研究では、本腺におけるシアル酸ならびに β -ディフェンシンの分布を電顕細胞化学的に解析し、腺機能との関連性について検討した。暗調細胞と明調細胞から構成される手根腺上皮について、一般形態観察ならびに中性糖検出反応を行ったところ、暗調細胞は分泌顆粒が中性糖検出反応に弱から中等度の反応を示す I 型と、

強陽性を示すⅡ型に分類された。また、明調細胞の細胞質には、よく発達した滑面小胞体や多数のミトコンドリアに加え、豊富なグリコーゲン粒子が観察された。レクチン法を適用すると、SSA では両暗調細胞の分泌顆粒やゴルジ装置に、MAM では腺細胞の微絨毛とⅡ型暗調細胞の分泌顆粒およびゴルジ装置にコロイド金粒子が観察された。抗β-ディフェンシン 2 抗体を用いた免疫電顕法では、Ⅱ型暗調細胞の分泌顆粒に陽性反応が観察された。

これらの結果は、ブタ手根腺の光顕組織化学的所見と一致しており、Ⅱ型暗調細胞からは、結合様式の異なるシアル酸やβ-ディフェンシンが分泌されていることが明らかとなった。一方、明調細胞の滑面小胞体はグリコーゲンの代謝に、また多数のミトコンドリアと豊富なグリコーゲンは電解質や水の輸送・放出に関与していることが示唆された。

本論文は、ブタ皮膚のエクリン腺である吻鼻平面腺と手根腺において、腺上皮を構成する細胞のサブタイプについて光顕および電顕形態学的にそれらの特徴を記載し、かつ、シアル酸および各種抗菌物質の詳細な局在とその性質について組織細胞化学的に明らかにした。特に、暗調細胞におけるⅠ型およびⅡ型の形態学的差異は、細胞の分泌機能活性あるいは細胞または分泌顆粒の成熟度の違いを反映しうる極めて重要な所見であるといえる。本論文で明らかにされた新発見は、ブタ皮膚のエクリン腺である吻鼻平面腺と手根腺における防御機能的な重要性を形態化学的に初めて証明した点にあり、これはブタのみならず哺乳類における皮膚腺機能の理解に大きく寄与するものと考えられる。