

論文審査の結果の要旨

氏名：福井 廣 祐

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名： 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）

審査委員：（主 査） 教授 五味 浩 司
 （副 査） 教授 杉 谷 博 士
 教授 渋 谷 久

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。機能的に皮膚は、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、多様な役割を果たしている。また、一部の皮膚では、形態的あるいは機能的特殊化が認められており、特に、ヒトを除く哺乳類皮膚のエックリン腺は、その特定部位にのみ存在し、変形腺として分類される。ブタにおいてエックリン腺は、吻鼻平面腺および手根腺として当該皮膚に分布するが、これらの腺における分子・細胞レベルでの解析はなされておらず、その機能的役割については十分に解明されていない。

近年、分泌生理の細胞生物学的な解析により、分泌性タンパク質を構成するポリペプチドは、粗面小胞体に付着したリボソームで合成された後、分泌小胞を介してゴルジ装置へ送られる過程において、小胞体槽およびゴルジ装置内で糖鎖付加（グリコシレーション）が起こることが明らかにされている。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するN型糖鎖とセリンまたはスレオニン残基に結合するO型糖鎖とに大別されるが、複数の糖質が糖鎖の構成に関わるとともに、各糖鎖は特異性の高い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するとともに、細胞表面における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。

このような学術的背景を踏まえ、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について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。本研究論文は、吻鼻平面腺の光顕および電顕解析からなる第1および第2章と、手根腺の光顕および電顕解析からなる第3および第4章によって構成される。

第1章 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

光顕レベルの解析として、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を行った。吻鼻平面腺の腺上皮は、暗調細胞と明調細胞から構成され、暗調細胞は増感シアル酸検出法により陽性反応を示し、ケン化処理を施すことでその反応性が增強することが明らかとなった。また、レクチン染色法による解析では、WGA および SSA 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い陽性反応を示したことから、暗調細胞には O-アセチル化されたシアル酸が多く含まれ、

Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc 構造は一部の細胞にのみ局在していることが判明した。免疫組織化学的染色では、一部の暗調細胞において抗菌物質としてリゾチーム、IgA、ラクトフェリンおよび β -ディフェンシン 2 の発現が認められ、さらに分泌顆粒の輸送関連タンパク質である Rab3D の発現が認められた。以上の結果から、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示唆された。

第2章 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

電顕微細構造レベルで、吻鼻平面腺の腺上皮に存在す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を行った。暗調細胞は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 型に分類され、中性糖検出反応による分泌顆粒の性状解析において、I 型暗調細胞では弱から中等度の陽性反応を、II 型暗調細胞では強陽性反応を示した。電顕レクチン法では、WGA および SSA は I 型および II 型両方の暗調細胞の分泌顆粒、ゴルジ装置にそれらの局在が観察されたが、MAM では、II 型暗調細胞にのみ陽性反応が認められた。リゾチームおよび β -ディフェンシン 2 に対する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に陽性反応が認められたが、I 型暗調細胞ではほとんど認められなかった。以上の結果から、暗調細胞は微細形態的に I 型と II 型に分類することができ、さらに II 型暗調細胞は、Sia α 2-6Gal/GalNAc および Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc 構造を有するシアル酸とリゾチームおよび β -ディフェンシンといった抗菌物質を産生・分泌することを電顕細胞化学的に明らかにした。

第3章 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

ブタの手根腺は、皮膚エックリン腺として吻鼻平面腺と並び特有な構造を示す。手根腺は、縄張りの主張や性臭に関与するニオイ物質の分泌によって種内のコミュニケーション機能に関わるとされているが、本腺分泌物の性状やその機能の詳細については不明な点が多い。そこで、本腺において光顕レベルの解析として、シアル酸と抗菌物質の組織化学的研究を行った。手根腺の腺上皮は、暗調細胞と明調細胞から構成されており、暗調細胞は増感シアル酸検出法により陽性反応を示した。同法にケン化処理を施した場合、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が局在することが確認された。レクチン染色法によって、暗調細胞には Sia α 2-6Gal/GalNAc 構造が含まれており、また一部の細胞では Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc 構造も局在することが明らかとなった。また、免疫組織化学的解析により、一部の暗調細胞において抗菌物質としてリゾチーム、IgA、ラクトフェリンおよび β -ディフェンシン 2 が、分泌顆粒の輸送系タンパク質として Rab3D の発現が認められた。以上の結果から、手根腺上皮の暗調細胞には多様なシアル酸や各種抗菌物質が局在しており、本腺が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ことが示唆された。

第4章 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

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を電顕レベルで行った。手根腺上皮の一般形態観察ならびに中性糖検出反応による解析から、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 型とに分類された。一方、明調細胞では分泌顆粒は見られず、細胞質には、よく発達した滑面小胞体、多数のミトコンドリアおよび豊富なグリコーゲン粒子が観察された。電顕レクチン法による解析では、SSA は I 型と II 型の両暗調細胞の分泌顆粒やゴルジ装置に、MAM

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局在が認められた。免疫電顕法によるβ-ディフェンシン 2の細胞内局在の解析では、Ⅱ型暗調細胞の分泌顆粒に陽性反応が観察された。以上の結果から、手根腺上皮を構成する暗調細胞はⅠ型とⅡ型とに区別され、Ⅱ型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、さらに多数のミトコンドリアとグリコーゲンの貯留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。

このように本論文は、ブタ皮膚のエッ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、電顕細胞化学的解析によって初めて明らかにされたものであり、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知見は、ブタ皮膚のエッ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。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成28年 1月22日