

管腔側および漿膜側の物質が大腸粘膜の機能に与える影響を 評価するための大腸粘膜器官培養法

稲垣明子，山中なつみ，小川宣子

家政学部家政学科管理栄養士専攻

(2002年9月12日受理)

Development of an Organ Culture System of Colonic Mucosa to Evaluate Influences of Luminal and Serosal Components

Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Home Economics,
Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu City, Japan (〒501 - 2592)

INAGAKI Akiko, YAMANAKA Natsumi and OGAWA Noriko

(Received September 12, 2002)

緒言

大腸粘膜には水やナトリウム，カルシウムを吸収する機能や¹⁾，体を外界（消化管内容物）から防御する障壁としての機能がある²⁾。大腸粘膜の働きは，大腸粘膜を構成する上皮細胞の数によって支配され，細胞数の減少による粘膜の防御機能の低下に伴い，粘膜から体内へ細菌が進入したり，水の吸収などの機能が低下する可能性がある。

大腸の管腔内に存在する物質として酢酸や酪酸には大腸上皮細胞の増殖³⁾⁴⁾や水やナトリウムの吸収を促進する作用があり⁵⁾⁷⁾，血液中のホルモンには上皮細胞に対して増殖促進作用⁸⁾⁹⁾や水の吸収に影響を与えることが分かっている。このように大腸粘膜の上皮細胞数や機能は大腸の管腔内（管の内部）と漿膜側（血液中）に存在する物質によって制御されているので，この制御機構を解明するためには管腔側と漿膜側を異なる環境に設定した実験条件で，両側からの作用をそれぞれに解明することが必要となる。

さらに大腸管腔内の有機酸の生理作用は酸の種類や濃度によって異なることが分かっているため，消化管内に存在する生体物質の作用を物質の種類や濃度について系統的に調べることが生理作用を明らかにする上で重要である。これらのことを考慮した系統的な解析には多くの実験区の設定が必要であり，一度に多数の培養ができる装置が要求される。

また，大腸における刺激物質の作用は個体によって異なるので，複数個体の組織を使って実験を行う場合には，ある物質に対する反応性の違いが作用物質によるものなのか個体の違いによるものなのか判断できなくなる可能性があるため，1回の実験に使う組織は同一個体から採取したのものを使うことが望まれる。

これまでも，大腸粘膜の管腔側と漿膜側を別々の溶液で還流できる Ussing Chamber を使った実験が行われてきた⁸⁾。しかし，装置自体が非常に高価である点や，実験に使用していたラットやモルモットは体が小さく1個体から粘膜組織を2～3片しか得ることが

できないので実験区の数が増えるという問題を含んでいた。

そこで、本実験では生体における大腸の管腔側と漿膜側の環境の違いを再現し、さらに同一個体から採取した組織を使って一度に多数の培養ができる培養装置を開発して、この装置が生理学的な実験に使用可能なものかを、培養した大腸粘膜の上皮細胞増殖活性の測定と組織構造の観察によって調べ、さらに管腔側あるいは漿膜側の刺激物質に対する反応性を調べることで検証することを目的とした。

方法

1. 大腸粘膜の管腔側と漿膜側とを異なる環境で培養できる培養装置の開発

大腸粘膜の管腔側と漿膜側とを異なる環境にして、一度に多数の組織を培養することができる実験装置について検討した。

(1) 培養装置

1.5 mL 容マイクロテストチューブとプラスチックシャーレを加工して培養装置を作製した(図1)。1.5 mL 容マイクロテストチューブの先端を切り口の内径が約4.5 mmになるように切り取った。切り口の外側に約1 mm幅に切ったシリコンチューブ(内径5 mm, 外径7 mm)をシリコン製充填剤で接着した。また、プラスチック製のシャーレ(直径6 cm)のフタに直径1 cmの穴を2個開けたものを用意した。

(2) 動物

ブタの大腸組織を用いた。ブタは体重が約110 kg(生後約6ヶ月)で、実験動物として一般的に使われるラット(体重約300 g)と比較すると300倍以上の大きさである。しかも、ブタは発達した大腸を持っているので、1個体から得られる組織が大きく、一度に50個以上の粘膜シートを調製することができる。

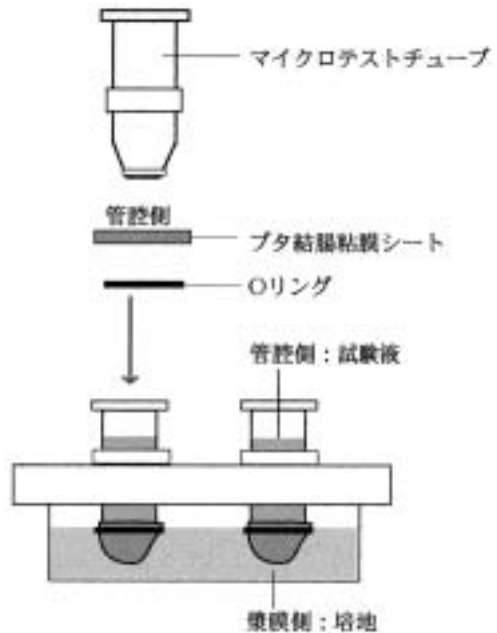


図1 管腔側と漿膜側とを異なる環境で培養できる培養装置

また、食性や消化器の神経支配がヒトと似ているため実験データをヒトに当てはめやすいという利点もある。

このような理由から、ブタから採取した大腸組織を培養装置に使用することとした。

(3) 大腸粘膜シートの調製

大腸最遠位部から採取した管状の組織を反腸間膜側から切り開き、PBS 溶液(KCl 0.2, K_2HPO_4 0.2, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.896, NaCl 8 g/L, pH7.4, 4℃)で組織を洗浄した。大腸組織から筋層と粘膜下層とを取り除いたものを約1 cm角に切り、これを粘膜シートとした。

(4) 培養

調製した粘膜シートを(1)で作製した培養装置に、管腔側が培養チューブの内側に漿膜側が外側になるようにシリコン製のOリング(内径6.5 mm, 外径8.0 mm)を使って固定してから、チューブの中に試験溶液を1 mL

入れた。粘膜シートを取り付けた培養チューブを、培地を10mL入れたシャーレに、ふたに開けた穴から差し込んで取り付けた。1シャーレあたり2個の培養チューブを取り付けた。シャーレをプラスチック製の密閉容器に入れて、密閉容器内をO₂:CO₂=95%:5%混合ガスで満してからフタを閉めて37℃で1時間に60回の振盪培養を行った。なお、高濃度の酸素中での培養条件は、体から取り出した組織では血流による酸素運搬が行われないため、組織外部から組織内部へ酸素を供給する必要があるためである。

2. 開発した培養装置の有効性の検討

(1) 開発した培養装置を使用しての培養

開発した培養装置で大腸粘膜を培養し、上皮細胞の増殖活性の測定と組織構造の確認を行った。

1) 実験配置

培養時間(培養24時間, 48時間)を要因とする実験を繰り返し4回行った。

2) 培養条件

管腔側にPBS溶液を、漿膜側には10%新生仔牛血清添加RPMI1640培地(抗生物質添加:ペニシリン50 IU/mL, ストレプトマイシン50 µg/mL)を入れて培養した。

3) 測定項目

培養21~24時間と培養45~48時間の大腸粘膜の陰窩細胞生産速度の測定と、培養24時間と培養48時間の組織構造の観察を行った。

a) 陰窩細胞生産速度

陰窩細胞生産速度とは腸上皮細胞の増殖ゾーンである陰窩で単位時間あたりに何個の上皮細胞が生産されるのかを表す指標である¹⁰⁾。実験で使用した硫酸ピンクリスチンには紡錘糸の形成を阻害して細胞分裂を分裂中期で止める作用がある。硫酸ピンクリスチンを作用させると陰窩中の分裂中期で停止した

細胞数が経時的に増加する。この増加速度を陰窩細胞生産速度といい、本研究における大腸粘膜上皮細胞の増殖活性の指標とした。

培養21~24時間の陰窩細胞生産速度測定用の組織の採取は、まず培養21時間にシャーレから組織を1片採取して酢酸エタノール(酢酸:エタノール=1:3)で固定した。この組織を硫酸ピンクリスチン処理前の組織とした。次に硫酸ピンクリスチンを培地中の濃度が1µg/mLになるように添加した後、残りの組織を再び培養して培養24時間に組織を採取した。これを硫酸ピンクリスチン処理後の組織とした。同様の方法で培養45~48時間の陰窩細胞生産速度測定用の組織を採取した。

採取した組織をフォイルゲン反応¹¹⁾によってDNA染色した。染色した組織から陰窩を単離して陰窩の押しつぶし標本を作成し、標本を光学顕微鏡で観察して硫酸ピンクリスチン処理前後の分裂中期細胞数を数えた。それから以下の式に陰窩20個の分裂中期細胞数の合計を当てはめて陰窩細胞生産速度を計算した。本研究では1標本あたり20個の陰窩の分裂中期細胞数を数えた。

陰窩細胞生産速度(細胞/陰窩/時間)

$$= (\text{硫酸ピンクリスチン処理後分裂中期細胞} - \text{硫酸ピンクリスチン処理前分裂中期細胞}) \div \text{陰窩数} \div \text{硫酸ピンクリスチンの作用時間}$$

b) 組織構造の観察

培養24時間と培養48時間で採取した組織をパラフィンで包埋した後4µmの横断切片を作成した。切片をヘマトキシリン・エオジンで染色してから顕微鏡で観察し、培養後の粘膜の組織構造を確認した。なお、比較対照として、培養前の粘膜(培養0時間)の組織構造の確認も行った。

(2) 漿膜側の物質に対する反応性の検証

漿膜側の物質に対する反応性を、漿膜側に血清を添加して培養した時の陰窩細胞生産速

度を測定することで検証した。

1) 実験配置

漿膜側の血清濃度(0, 1, 5, 10, 20%)を要因とする1元配置の実験を4回行った。

2) 培養条件

管腔側にPBS溶液を1mL, 漿膜側には各種濃度血清を含むRPMI1640培地(抗生物質添加: ペニシリン50 IU/mL, ストレプトマイシン50 µg/mL)を入れて培養した。

3) 陰窩細胞生産速度の測定

培養21~24時間の陰窩細胞生産速度を2

(1) 3) a)の方法で測定した。

(3) 管腔側の物質に対する反応性の検証

管腔側の物質に対する反応性を, 各種有機酸を管腔側から作用させた時の大腸粘膜からの水の吸収を測定して検証した。

1) 実験配置

酸の種類(酢酸, 乳酸, こはく酸, 対照: 有機酸なし)と培養時間(培養0~2, 2~4, 4~6時間)とを要因とする実験を繰り返し4回行った。

2) 培養条件

培養装置の管腔側に, 10mMの酢酸, 乳酸, こはく酸の有機酸またはNaCl(対照)を含む試験溶液(表1)を入れて培養した。漿膜側にはF12培地(抗生物質添加: ペニシリン50 IU/mL, ストレプトマイシン50 µg/mL, ゲンタマイシン50 µg/mL)を入れた。

3) 水の吸収速度の測定

培養0時間にあらかじめ比重を測定しておいた試験溶液(表1)1mLを管腔側に入れて培養し, 培養2時間に管腔側の試験溶液を全て採取した。これを培養0~2時間の水の吸収速度の測定に用いた。溶液を採取した培養チューブの管腔側に培養0時間に入れたものと同じ試験溶液を1mL入れて再び培養した。この操作を培養6時間まで繰り返して, 培養0~2, 2~4, 4~6時間の水の吸収

速度を測定した。

水の吸収速度は入れた溶液の重量と回収した溶液の重量の差を以下の式に当てはめて求めた。組織面積は培養チューブの組織が接する開口部直径から求めた。

$$\text{水の吸収速度}_{r(h)-n+\alpha(h)} \text{ (mg/cm}^2\text{/h)} \\ = (\text{溶液重量}_{n+\alpha(h)} - \text{溶液重量}_{r(h)}) / \text{組織面積} / 2$$

ただし, $r(h)$ は管腔側に試験溶液を入れた時刻, $n+\alpha(h)$ は溶液を採取した時刻を表す。

算出した吸収速度が正の値の時は水の吸収を, 負の値の時には水の分泌を表わしている。

表1 実験3で使用した試験溶液組成

溶質	有機酸			
	対照(NaCl)	酢酸	乳酸	こはく酸
酢酸	0	10	0	0
乳酸	0	0	10	0
こはく酸	0	0	0	10
Na ⁺	135	135	135	135
K ⁺	8	8	8	8
Mg ²⁺	2.5	2.5	2.5	2.5
Ca ²⁺	2.5	2.5	2.5	2.5
Cl ⁻	135	144	144	143
HPO ₄ ²⁻	2	2	2	2
H ₂ PO ₄	4	4	4	4
マンニトール	1	1	1	2

試験溶液のpHは7.0に調整した。

結果と考察

1. 開発した培養装置を使用時の培養

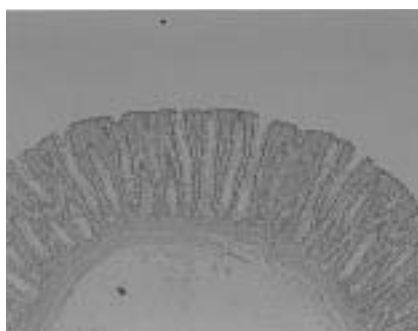
開発した培養装置を使って48時間培養することができた。

培養21~24時間の陰窩細胞生産速度は1.9

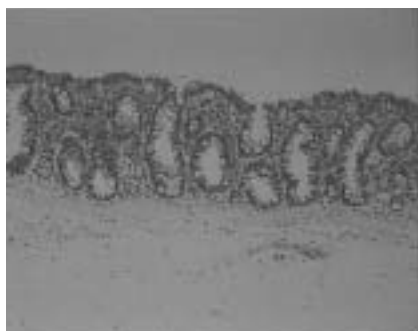
表2 ブタ大腸粘膜の陰窩細胞生産速度

培養時間 (時間)	陰窩細胞生産速度 (細胞/陰窩/時間)
21~24	1.9 ± 0.6
45~48	0.1 ± 0.2
t-検定 p値	<0.01

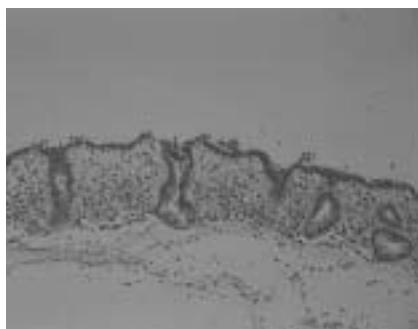
・値は平均値 ± 標準偏差で表わした (n = 4)。



a. 培養0時間



b. 培養24時間



c. 培養48時間

図2 開発した培養装置を使って管腔側と漿膜側とを異なる環境で培養したときのブタ大腸粘膜の組織構造 (HE染色, ×100)

(細胞/陰窩/時間)であった(表2)。培養45~48時間では0.1(細胞/陰窩/時間)と、細胞生産がほとんど認められなかった。

本実験の培養21~24時間の陰窩細胞生産速度が1.9(細胞/陰窩/時間)であったことは、これまでの研究におけるブタ大腸粘膜片の培養21~24時間の陰窩細胞生産速度が0.02~1.1(細胞/陰窩/時間)²⁾であったことと比較すると1.7倍以上の高い値であり、開発した培養装置が既存の方法よりも細胞の増殖活性を高く保ったまま培養できる装置であることが分かった。

培養した大腸粘膜の組織構造は、培養時間の経過に伴って表面上皮細胞の脱落や陰窩の消失、陰窩の深さの減少、陰窩底部の拡張がみられるようになったが、培養48時間を通して組織構造を保っていた(図2)。

以上のことから、開発した培養装置は大腸粘膜を上皮細胞の増殖能と組織構造を保ったまま1~2日間培養ができる装置であるといえる。

2. 漿膜側の物質に対する反応性の検証

漿膜側に10または20%血清を添加すると陰窩細胞生産速度が速くなった(表3)。血清

表3 漿膜側の血清がブタ大腸粘膜の陰窩細胞生産速度に与える影響

血清 (%)	陰窩細胞生産速度 (細胞/陰窩/時間)
0	1.4 ^a
1	1.5 ^a
5	1.9 ^{ab}
10	2.1 ^b
20	1.8 ^b

・値は平均値で表わした (n = 4)。
 ・異符号間は Tukey の多重比較で p < 0.05 で有意差があることを示す。

0%の陰窩細胞生産速度は1.4(細胞/陰窩/時間), 血清20%では2.1(細胞/陰窩/時間)となり, 血清の添加によって陰窩細胞生産速度が約1.5倍速くなった。

血清中の増殖因子には細胞の増殖促進作用があり¹³⁾, ラットの静脈から血清中の増殖因子であるIGF-1を投与すると, 消化管上皮細胞の増殖が盛んになる¹⁴⁾。この結果は管腔側と漿膜側とを異なる環境で培養した大腸粘膜の漿膜側へ添加した血清の作用と同じあり, 開発した培養装置が漿膜側の物質に対する大腸粘膜の反応性を調べるために有効な装置であることが確認できた。

3. 管腔側の物質に対する反応性の検証

培養時間の経過に伴って水の吸収速度は遅くなり, 培養4時間以降の水の吸収速度は培養4時間までと比べて有意に遅くなった(表4)。こはく酸添加区以外の実験区では, 培養4時間までは測定値が正の値(吸収)であったが, 培養4時間以降には負の値(分泌)へ移行した。対照区では培養0~2時間の吸収速度が4.8(mg/cm²/h)であったが, 2~4時間では-2.5(mg/cm²/h)となった。こはく酸添加区では他の有機酸添加区と異なり, 培養開始時から測定値が負の値(分泌)であった。

こはく酸添加区における水の吸収速度は他の有機酸添加区と比べて有意に遅かった。培養0~2時間の水の吸収速度は, こはく酸添加区では-5.4(mg/cm²/h)であったのに対して, 他の実験区では2.1~4.8(mg/cm²/h)であった。この結果は, 管腔内に存在するこはく酸が大腸で水の分泌を促す働きがある可能性を示唆するものである。

こはく酸は潰瘍性大腸炎の患者¹⁵⁾やある種のオリゴ糖を摂取した時に大腸内にみられる酸である¹⁶⁾。本実験における管腔側のこはく酸が水の分泌を促すという結果は, 大腸の選

流実験でこはく酸により水の分泌促進作用が見られたという報告と²¹⁾一致していることから, 開発した培養装置が管腔側の物質の作用を調べるために有効な装置であるといえる。

開発した培養装置は大腸の管腔側と漿膜側を異なる環境に設定して培養できることが特徴であり, 上皮細胞の増殖活性と組織構造を保った状態で培養が可能なるものであった。また, 培養装置の管腔側と漿膜側のそれぞれから刺激物質を作用させた時の反応が生体の結果と似ていたので, 開発した培養装置が管腔側や漿膜側からの生理活性物質の影響を調べる研究に有効な装置であることも検証できた。

今後はこの装置を使って, 食品の摂取が消化管に与える影響について, 消化された食品成分の管腔側からの作用と, 食品の摂取によっておこる血中成分の変化との相互作用など, 生体で起りうるような現実的な条件を培養系内で再現して詳細に解明することができると考える。

この研究の一部は石巻専修大学理工学部坂田研究室, 平成14年度ダノン学術研究助成金および平成13年度公益信託家政学助成金のご援助のもとに行われたものであることをここに付記し, 深く感謝いたします。

. 参考文献

- 1) Cummings, JH. et al.: Gut, 28(10), p 1221, 1987
- 2) Hungate RE. et al.: Science, 130, p 1192, 1959
- 3) Livesey G. and Elia M.: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids, Cambridge University Press, p427, 1995
- 4) Rombeau JL. et al Physiological clinical aspects of short-chain fatty acids, Cambridge

表 4 管腔側の有機酸が大腸粘膜からの水の吸収に与える影響

酸	培養時間 (時間)		
	0 ~ 2	2 ~ 4	4 ~ 6
	水の吸収速度 (mg/cm ² /h) ²⁾		
対照 (NaCl)	4.8	3.0	-2.5
酢酸	3.7	4.3	-2.1
乳酸	2.1	1.9	-4.7
こはく酸	-5.4	-9.7	-5.5
プールされた標準偏差	5.4		
分散分析の要因	p 値	多重比較の結果	
酸	< 0.001	酢酸 > 対照 > 乳酸 > こはく酸 ³⁾	
時間	< 0.01	2 > 4 > 6 ³⁾	
酸 × 時間	N.S. ⁴⁾		

1) 値は平均値で表わした (n = 4)。

2) 値は管腔側の溶液の量で、正の数字は正味の吸収を負の数字は正味の分泌を表わす。

3) Tukey の多重比較で p < 0.05 のとき有意差ありとした。

4) N.S.: 有意差なし

- University Press, p401, 1995
- 5) Sakata T.: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids, p289, Cambridge University Press, 1995
- 6) Jones M. K. et al.: Frontiers in Bioscience, 4, p303, 1999
- 7) von Engelhardt W, et al.: Veterinary Quarterly 20, Supply 3, 52, 1998
- 8) von Engelhardt W.: Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids, p 149, 1995
- 9) 武藤康敏: 消化吸収, 第一出版, p 197, 2002
- 10) Wheeler E. et al.: Gut, 40(1), p57, 1967
- 11) 佐野豊: 組織学研究法, 南山堂, p 251, 1985
- 12) Sakata T. et al.: Deutsche Tierztliche Wochenschrift, 102, p163, 1995
- 13) 日本組織培養学会: 成長因子 Part 2, 朝倉書店, p74, 1989
- 14) Wright NA.: Cell Proliferation in the Gastrointestinal Tract, p 3, 1980
- 15) Hoshi S. et al.: Journal of Nutrition, 124 (1), p52, 1995
- 16) Umetsaki Y. et al.: Pflugers Archi European Journal of Physiology, 379(1), p43, 1979