

消化管組織における構造変化の評価（第2報） 消化管粘膜における増殖細胞数の測定

大場君枝，山中なつみ，小川宣子

家政学部家政学科管理栄養士専攻

（2004年9月22日受理）

Evaluation of Structural Changes in Gastrointestinal Tracts (Part) Measurement of the Number of Proliferation Cells in Mucosa in Gastrointestinal Tracts

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

OHBA Kimie, YAMANAKA Natsumi and OGAWA Noriko

(Received September 22 , 2004)

I . 緒 言

食物繊維の摂取によって消化管の形態が変化することが知られており，この形態的变化が消化吸收機能に影響すると考えられている¹⁾。前報²⁾では，食物繊維の摂取に伴う消化管組織の形態変化のメカニズムや，消化吸收機能に与える影響を明らかにすることを目的として，消化管組織の構造変化をより簡便に，精度良く評価する方法について検討した。その結果，組織標本のデジタル顕微鏡写真の画像処理によって，消化管組織を構成する粘膜，粘膜下層，筋層の構成比を，正確にかつ簡便に測定する方法を確立することができた。

さらに，食物繊維のモデル物質としてガラスビーズを大腸内に注入し，大腸内容物のカサを増加させたラットについて，確立した測定方法を用いて，大腸組織の粘膜，粘膜下層，筋層の構成比を測定した。その結果，盲腸，近位結腸，遠位結腸のいずれにおいても粘膜の構成比が高くなることを明らかにした²⁾。

粘膜の構成比が高くなる要因として，細胞

の増殖が高まっていることが考えられる。そこで本研究では，消化管組織における構造変化をさらに詳細に評価する方法として，粘膜における増殖細胞数の測定を試みた。

増殖細胞を観察する方法として，パラフィン包埋した組織切片をPCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) 染色する方法を用いた。PCNAは，細胞周期における細胞成長期後期からDNA合成期初期にかけて細胞核に出現する抗原である。PCNAを免疫染色により検出し，陽性細胞数を測定することにより増殖細胞数の割合を求め，粘膜における細胞増殖を客観的に評価することを目的とした。

II . 方 法

1 . 試 料

前報²⁾の動物実験において，小腸に形成した瘻孔より直径2.5mmのガラスビーズを1日2回2個ずつ注入し，大腸内容物のカサを増加させたラット（実験区5匹）と，ビーズを注入しないラット（対照区5匹）の盲腸，近位結腸，遠位結腸を用いて作成したパラフィ

ン包埋切片を観察試料とした。

2. PCNA 染色

1) 染色原理

細胞周期における細胞成長期後期からDNA合成期初期にかけて細胞核に出現するPCNAに対し、一次抗体としてビオチン標識抗PCNA抗体を反応させ、さらに二次抗体としてストレプトアビジン・ペルオキシダーゼを反応させる。ビオチンとアビジンは親和性が強く、この親和性に基づいて一次抗体と二次抗体が結合する。二次抗体に結合させたペルオキシダーゼの発色基質としてDAB(3,3'-Diaminobenzidine)溶液を反応させると、PCNAを含む細胞核が赤褐色に染色され、増殖細胞を検出することができる。

2) 試薬

染色には、PCNA染色キット(ザイメット社)を使用した。

3) 方法

脱パラフィン

プレパラートをキシレンに5分間(×2回)浸漬してパラフィンを除去した後、100%、95%、70%エタノールに各々5分間浸漬してキシレンを取り除き、さらに蒸留水で5分間洗浄した。

内因性ペルオキシダーゼの失活

3%過酸化水素水/メタノール溶液に10分間浸漬し内因性ペルオキシダーゼを失活させた。その後、リン酸緩衝液(Phosphate-Buffered Saline: PBS)に2分間(×3回)浸漬し、洗浄した。

非特異的反応の阻止

一次抗体の非特異的反応を防ぐため、組織切片にブロッキング液(染色キット試薬1)を滴下し、室温で10分間放置した。その後、スライドガラスを傾けブロッキング液を取り除いた。

抗体反応

組織切片に一次抗体であるビオチン標識抗PCNA抗体(染色キット試薬2)を滴下し、室温で60分間反応させた後、PBSに2分間(×2回)浸漬し、洗浄した。

次に二次抗体のストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ(染色キット試薬3)を組織切片に滴下し、室温で10分間反応させた後、PBSと同様に洗浄した。

DAB発色

蒸留水1mlに緩衝液(染色キット試薬4A)、3,3'-Diaminobenzidine(DAB:染色キット試薬4B)、0.6% Hydrogen Peroxide(染色キット試薬4C)各1滴を混合して調製したDAB溶液を組織切片に滴下し、10分間放置し、PCNAを含む細胞核を染色した。その後、蒸留水で1分間(×2回)洗浄した。

核の対比染色

ヘマトキシリン(染色キット試薬5)を組織切片に滴下し、室温で30秒放置して陰性細胞の核を染色した。流水で約1時間洗浄した後、組織切片をPBSに浸漬し、ヘマトキシリンが中性のPBSによって赤色から青色に変化して定着したのを確認し、蒸留水で1分間(×2回)洗浄した。

脱水・透徹・封入

プレパラートを無水エタノールに3分間(×3回)浸漬して脱水し、キシレンに3分間(×3回)浸漬して透徹した後、ヒストマウント(染色キット試薬6)を用いて封入した。

3. 光学顕微鏡による観察

染色後の組織切片を光学顕微鏡(オリンパス工業株)BH2を用いて接眼レンズ10倍、対物レンズ40倍(総合倍率400倍)で観察した。

赤褐色に染色されたPCNAを含む陽性細胞

胞が存在する陰窩を探し，陰窩の片側断面における陽性細胞と陰性細胞をカウントした。

4．増殖細胞数の割合の算出

陰窩の片側断面における陽性細胞数と陰性細胞数の合計を全細胞数とし，全細胞数に占める陽性細胞数の割合を算出した。

Ⅲ．結果及び考察

PCNA 染色後の近位結腸における粘膜の顕微鏡写真を図1に示した。

PCNA 染色された陽性細胞は赤褐色に，ヘマトキシリン染色された陰性細胞は青色に鮮明に染色された。陽性細胞と陰性細胞は容易に判別することができ，さらに正確にカウントすることができた。

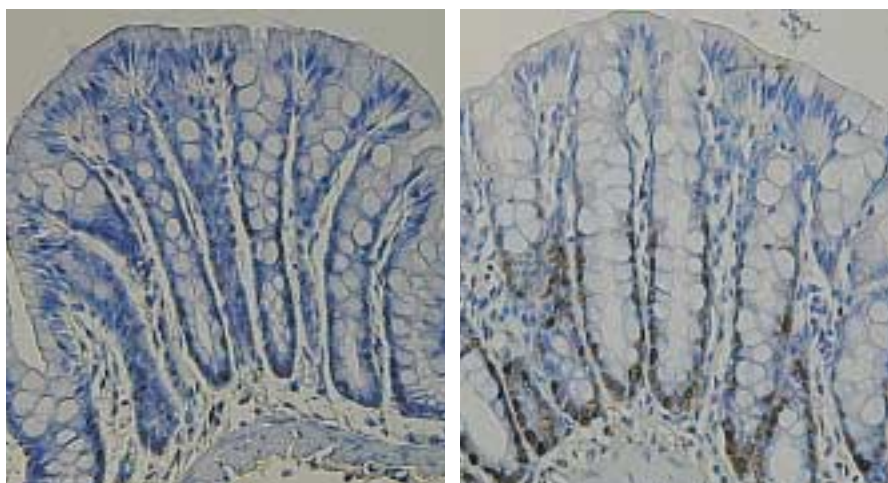
胃や小腸と同様，大腸の粘膜における上皮細胞は，陰窩の基底部分で増殖し，増殖した細胞が管腔側へと移動し，管腔内へ脱落することが知られている³⁾。PCNA 染色された陽性細胞は，管腔側に比べて陰窩の基底部分に多い部分に多く観察された。これより，PCNA 染色によって増殖細胞が特異的に染色され，粘膜における細胞増殖を正確に観察できている

と考えられた。

また，近位結腸では対照区よりも大腸にビーズを注入した実験区に多くの陽性細胞が観察された。そこで，対照区と実験区における細胞増殖を客観的に比較するため，増殖細胞の割合を算出し，その結果を図2に示した。

盲腸においては粘膜の増殖細胞数の割合は実験区も対照区もほぼ一定であるという傾向がみられた。しかし，近位結腸と遠位結腸においては，実験区の方が対照区よりも粘膜における増殖細胞数の割合が高い傾向がみられた。特に近位結腸の粘膜では対照区が23.5%，実験区36.1%であり，5%以下の危険率で有意差が認められた。これより，ビーズ注入による大腸内容物のカサの増加は近位結腸，遠位結腸の粘膜における細胞増殖に影響を与えていることが示された。

前報²⁾において，ビーズを注入して大腸内容物のカサを増加させたラットにおいて，盲腸，近位結腸，遠位結腸のいずれにおいても粘膜の構成比が高くなる傾向が認められたが，盲腸に比べて近位結腸と遠位結腸の方が顕著な影響が認められた。よって，前報における粘膜の構成比と，本研究における粘膜の



対照区

実験区

図1 PCNA 染色後の近位結腸における粘膜の顕微鏡写真（×400）

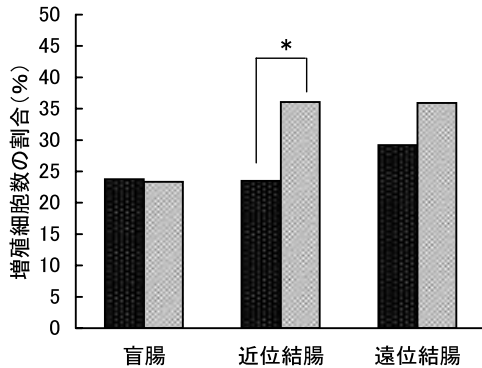


図2 消化管粘膜における増殖細胞数の割合

■ 対照区 □ 実験区

値は1区5匹の平均値を示した。

* : 5%以下の危険率で対照区と実験区の間有意差があることを示す。

増殖細胞数の割合の結果には相関が認められ、内容物のカサの増加に伴い近位結腸と遠位結腸の粘膜の構成比が高まった要因として、細胞の増殖が促進されたことが推察され

た。

以上の結果より、本研究で用いたPCNA染色による増殖細胞数の測定は、消化管組織における構造変化の評価方法として有用であり、粘膜における細胞増殖を客観的に評価できるものであるといえる。

IV. 参考文献

- 1) 奥恒行：「食物繊維」印南敏，桐山修編，83-95 (1990)
- 2) 大場君枝，稲垣明子，山中なつみ，小川宣子：消化管組織における構造変化の評価 岐阜女子大学紀要 33：99-105 (2003)
- 3) P. R. Wheatler, H. G. Burkitt and V. G. Daniels：「機能を中心とした図説組織学」山田英智，石川春律，廣澤一成 訳，222-224 (1988)