抗 BrdU 抗体を用いたマウス嗅上皮のターンオーバーに関する免疫組織化学的研究

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：梅田良三教授）

木村 恭之，上出 文博，古川 侃

三輪 高喜，作本 真，梅田 良三

EVALUATION OF TURNOVER OF OLFACTORY EPITHELIUM IN MICE BY USING ANTI-BRDU MONOCLONAL ANTIBODY

YASUYUKI KIMURA, M.D., MICHIMIRO KAMIDE, M.D., MITSURU FURUKAWA, M.D.
TAKAKI MIWA, M.D., MAKOTO SAKUMOTO, M.D. and RYOUZO UMEDA, M.D.

Department of Otolaryngology, Kanazawa University, Kanazawa

Among nerve cells of vertebrates, the olfactory elements are uncommon in their capacity to turnover and to be replaced after injury. An autoradiographical and morphological observation has shown that degenerated olfactory nerve cells are reconstituted by a new population of neurons which originate from basal cells. However, an autoradiographic method requires a special isotope institute and it takes a long time for the final specimen to observe. Recently, a rapid technique without the radioisotope has been alternatively developed in which a thymidine analogue, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), is incorporated into replicating DNA and subsequently localized using a specific monoclonal antibody. In the present study, cell dynamics of olfactory mucosa in mice were investigated by means of immunohistological technique.

The results were as follows.

1. The labelled elements were concentrated at the basal layer of the epithelium, which were observed 5hrs after the first injection of BrdU.
2. At 15 days after administration of BrdU, the labelled elements were located in the midlayer of the epithelium, where can be recognized as the compartment of nerve cells.
3. After 30 days, the labelled cells disappeared from the epithelium. It indicates that the period of turnover in the olfactory epithelium of mice is within 30 days.
4. Fifteen days after axotomy of the olfactory nerves, two stained patterns which were numerous or sparsely labelled regions were observed. The former is considered that immature neurons predominantly exist, and the latter is the area which mature neurons abundantly locate.

It is considered that this immunohistological approach is useful for the observation of the turnover of the olfactory epithelium.

Key words: 抗 BrdU 抗体, マウス, 嗅上皮, ターンオーバー
免疫組織化学

A93-0165-33510

はじめに
哺乳類の神経細胞のなかで嗅上皮は常にターンオーバー

をしている点で特異的な存在である。嗅上皮は基底細胞, 嗅細胞, 支持細胞からなり, 基底細胞が分化

して嗅細胞になると言われており、この分化に伴い分裂した細胞は基底層から中間層へと移動するとされている。

嗅上皮のターンオーバーに関する研究はいままでラジオアイソトープ (RI) を用いてなされてきたが、専用の RI センターが必要なこと、核種に $[^3\text{H}]$ チミジンを用いた場合は乳剤での露出に数週間を要することから、手軽にできる実験とは言い難い。

最近、増殖中の細胞に取り込ませたプロモデオキシウリジン (以下 BrdU と略す) を抗 BrdU モノクローナル抗体で免疫組織化学的に検出して細胞増殖を確認するための方法が開発されている。この方法は RI を用いず、操作が約 2 時間で完了する利点を持っている¹⁾。

我々はこの方法を用いてマウスの嗅上皮のターンオーバーについて光学顕微鏡を用いて観察したところ興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

嗅覚正常と思われる ddY-conventional マウス (体重 30-40gr) を用いた。

免疫組織化学的解析には Amersham 社製の細胞増殖検出キットを用いた。その原理については図 1 に示した。まず標識試薬は BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) とフルオロデオキシウリジン (5-fluoro-2'-deoxyuridine) の混合液で、チミジン類似構造を持つ BrdU は DNA 合成期 (S 期) にある細胞に取り込まれ DNA を標識するわけだが、フルオロデオキシウリジンはチミジン酸合成阻害剤であるので内在性チミジンによる競合を抑制して BrdU の取り込みを促進させる働きがある²⁾。次に DNA を標識している BrdU に特異的な抗 BrdU モノクローナル抗体液 (ヌクレアーゼを含む) を結合させ、さらにペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig 抗体を結合させる。ここにコバルト、ニッケルの金属塩で増感された 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (以下 DAB と略す) を反応させると BrdU の取り込まれている部分が青黒色に視覚化されるというものである。

標識試薬を 1 匹あたり 1ml、1 時間の間隔をおいて 4 回に分け腹腔内注射した。最初の注射から 5 時間後にネンブタール麻酔下に左心室からヘパリン加食塩水で灌流の後、ブアン固定液で灌流固定し、断頭の上でブアン液中に浸漬固定した。固定開始後 1 時間して鼻骨正中縫合線に針をいれ縫合を解離させ、鼻中隔粘膜

を明視下におきこれを可及的に大きく採取し、採取した鼻中隔粘膜をさらに 4 時間固定した。アルコール系列で脱水の上、パラフィン包埋し、 5μ の薄切片を作製した。キシレンにて脱パラフィンして免疫組織化学用標本とした。嗅覚正常と考えられるマウスにおいては標本は 5 時間後、15 日後、30 日後に断頭した 3 種類を作製した。各群とも 3 匹ずつを用いた。また BrdU で標識せずに同時期に断頭したマウスを 3 匹ずつコントロールとした。

またこれとは別に標識試薬を同量注射の上、嗅糸を切断し嗅覚障害をおこさせて 15 日後に断頭したマウスも 3 匹、同様に標本作製した。実際の嗅糸の切断方法については三輪の論文³⁾ に詳述してある。

BrdU 注入後 5 時間の標本はヘマトキシリン 1 分間の核染色を行ったが、白黒写真撮影のコントラストの

図 1 細胞増殖検出の原理

関係上、BrdU 注入後15日と嗅糸切断後15日の標本は核染色を行わなかった。また、BrdU を注射せずに上記の手順を行ったものと BrdU で標識したが抗 BrdU モノクローナル抗体で反応させるかわりに PBS で反応させたものの両者をコントロールとした。

結 果

1. BrdU 注入後5時間(図2)

黒色に発色する部分が基底膜に沿って所々にみられる(図2)。基底膜との位置関係から試薬は基底細胞に取り込まれているものと考えられる。基底層に取り込まれた核の形をみると楕円形もあれば円形もみられたが基底膜とはなんらかの接合を持っている位置であった。嗅細胞層への取り込みはみられなかった。呼吸上皮部への取り込みは少なかった。BrdU を注射しなかったもの、抗 BrdU 抗体を作用させなかったものは嗅上皮のどの部位も染まらなかった。

図2 BrdU 注入後5時間のマウス嗅上皮。基底層に発色部分がみられる。(×400)

図3 BrdU 注入後15日のマウス嗅上皮。発色部分は中間層に移動している。近傍にペアのごとくみられる部分も観察される。

2. BrdU 注入後15日(図3)

黒色に発色する部分は上皮の中央部分にみられる。一部基底層に発色する部分がみられる。15日間で基底層に取り込まれた BrdU が上皮中央まで immigration (移動) しているのが観察された。取り込みの頻度としては BrdU 注入後5時間と比較して減少している印象を受けた。

3. BrdU 注入後30日

嗅上皮の最外層の支持細胞層と思われる部分に全視野で1カ所だけ取り込みがみられたのみであった。

4. 嗅糸切断後15日

嗅上皮内の細胞密度も多く上皮の厚さはかなり回復しているものと考えられた。濃い黒色に発色する部分は基底層およびその直上2~3層にわたって主にみられた(図4)。発色は薄くなるが取り込みのみられる細

図4 嗅糸切断後15日のマウス嗅上皮。基底層から2-3層にかけて発色部分がみられる。(×400)

図5 嗅糸切断後15日のマウス嗅上皮。BrdU のさかんな取り込みのみられる動的領域(active zone) (→) とほとんど取り込みのみられない静的領域(quiescent zone) がみられる。(×100)

胞は支持細胞層のすぐ直下まで観察された。取り込みの頻度としては正常マウスの何倍もの頻度であった。

嗅上皮全体をみるとさかんに取り込みのみられる部分とほとんど取り込みのみられない部分にかなりきれいに分かれていた (図5)。

考 察

哺乳類の神経細胞の中で嗅上皮はターンオーバーをしたり、障害に対して修復する能力がある点で特異的な存在である。嗅上皮は基底細胞、嗅細胞、支持細胞からなり、基底細胞が分化して嗅細胞になるといわれており、この分化に伴って分裂した細胞は基底層から中間層へ移動するとされている。

嗅上皮のターンオーバーに関する研究は今まで RI を用いてされてきた。しかし RI を使用するためには専用の RI センターが必要であり [^3H] チミジンをういた場合には乳剤での露出に数週間を要することから手軽にできる実験とはいえない、Graziadei ら⁴⁾ の [^3H]

チミジンをういたオートラジオグラフィーによる研究ではマウス嗅上皮の基底層がまず標識され、標識部分の表面への移動の間にニューロンとして分化するまでに9日かかり、これらのニューロンは成熟細胞として約25日間上皮内に留まるとしている。Moulton ら⁵⁾ もマウスを用いたオートラジオグラフィーによる研究で嗅上皮全体がターンオーバーする能力を持っており、その周期は約30日であるとしている。一方、Hinds ら⁶⁾ はマウス嗅上皮に [^3H] チミジンをラベルすると1~3カ月間はラベルされた細胞は減少するが4カ月以降はプラトーとなり12カ月間はコンスタントに残る。鼻炎による破壊が嗅上皮に起こらなければターンオーバーしている嗅細胞は嗅球でシナプスを作らなければ消失するが、シナプスを作れば長く生き残るとして約30日のターンオーバー説に否定的見解を示している。われわれの結果では15日後には標識細胞の多くは中間層にみられた。一方、数は少ないが基底層に標識される部分もみられ細胞の移動は一樣でない。しかし30日

図6 嗅上皮における動的領域と静的領域
A—静的領域 (quiescent zone), B—動的領域 (active zone), bc—基底細胞 (basal cell), gbc—球状基底細胞 (globose basal cell), sc—支持細胞 (supporting cell), n—神経細胞 (neuron), dn—神経細胞変性 (neuron degeneration) (Graziadei⁴⁾ から引用)

後にはほとんど染色された細胞はなく約30日のターンオーバー説を支持する結果が得られた。抗 BrdU 抗体を用いて腫瘍の標識率を検討した報告は最近増加しているが、BrdU を投与してからかなり時間を経過した後には組織を採取して観察した報告はほとんどない。Harms ら⁷⁾ はラットのリンパ節、胸腺、舌等を対象に BrdU 注入2時間後、1日後、6日後に組織を採取して観察しているが舌では6日後でも舌粘膜上皮の中間層に染色された核がみられるとしている。我々の結果では BrdU 投与15日後では単独で染色される細胞もみられたが、基底層での細胞分裂後、immigration するために標識細胞の近傍にペアのごとくに2つ固まって染色される場合が多かった。しかし、取り込みのみられた細胞はかなり減少しており、その染色性も薄くなっていた。それでは BrdU 投与30日後においてはほとんど染色されないのは嗅細胞がターンオーバーし終わったためでなく、染色性が低下するためではないだろうかという疑問が生じる。残念ながらこの疑問を完全に否定しきれない材料を持たないが、30日後に染色されたのは支持細胞層の高さの細胞である点やコントロールではこの部分に染色される細胞がみられなかったことから、やはり嗅細胞のターンオーバーが30日以内のためだろうと考えられた。

細胞の移動が様でないことに関してはどのような理由があるのだろうか。Graziadei ら⁴⁾ は嗅上皮には盛んに細胞分裂を行っている「active zone」(以下、動的領域と訳す)と細胞分裂はほとんど行っていない「quiescent zone」(以下、静的領域と訳す)がみられる。静的領域は成熟ニューロンの集合した形である円柱ユニットが優位に形成され、上皮の基底部分がまばらで固有の基底細胞がほとんどである。それに対して動的領域は成熟ニューロンが少なく円柱の形成ははっきりせず、未成熟の基底細胞や球状の基底細胞が集まって細胞の集団を上皮の底部につくる。(Graziadei の文献⁴⁾ から模式図を図6に引用した。)これらの領域は規則正しい分布をするのではなくまた境界もきれいに分かれる訳ではないと述べている。われわれの結果からも嗅糸切断後15日では非常に取り込みの多い部分とほとんど取り込まれていない部分がみられ、取り込みの多い部分では基底層から数層にわたっての細胞集団が染色された。BrdU を注入して嗅糸を切断した時に動的領域だった部分はまだ嗅球とシナプス結合をしていない幼弱なニューロンが多いので嗅糸切断の影響をあまり受けず、その後シナプス結合をしたニューロンは

2週間の間に成熟し静的領域を形成する。嗅糸切断時に静的領域だった部分(正確には動的領域に移行しかかっている部分)は嗅糸切断の影響をまともに受けて退行変性を起こしニューロンの多くは死滅するが、2週間の間に基底層からさかんに細胞分裂が起こり動的領域を形成しているものと考えられた。嗅糸切断といった処置をしないで BrdU 注入後15日目まで標識された細胞の移動が一樣でなかったことも上記の考え方で説明ができる。

ターンオーバーを調節し動的領域と静的領域のバランスをとるメカニズムについてはほとんどわかっていないが、Graziadei ら⁴⁾ は成熟ニューロンは基底層からの細胞の分化を阻害する物質を出し、老化して変性途中のニューロンは分化を誘発する物質を出しているのではないかと推察しているが、今後の免疫組織化学や細胞生化学の発展がこのメカニズムを解明していくものと期待される。

結 語

嗅上皮は常にターンオーバーしている点で特異的であるが、従来オートラジオグラフィーでしかとえられなかったターンオーバーを特殊な設備なしで短時間のうちに観察できる抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学的方法で検討し次の結果を得た。

1. BrdU 注入5時間後では取り込みは嗅上皮の基底層に基底膜に接してみられた。支持細胞や呼吸上皮にはほとんど取り込みがなかった。
2. BrdU 注入15日後では取り込まれた細胞の多くは中間層にみられたが、基底層付近にみられる細胞もあり、その移動はさまざまだった。
3. 嗅糸切断後15日では細胞分裂の頻度が多くさかんな取り込みのみられる「動的領域」とほとんど取り込みのない「静的領域」がみられた。

文 献

- 1) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982.
- 2) Ellwart J, Dormer P: Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with a monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/Hoechst quenching effect. *Cytometry* 6: 513-520,

1985.

- 3) 三輪高喜：マウス嗅糸切断後の行動学的ならびに組織学的変化に関する研究。十全医会誌 98：391-414, 1989.
- 4) Graziadei PPC, Graziadei GAM：Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of olfactory sensory neurons. J Neurocytol 8：1-18, 1979.
- 5) Moulton DG：Dynamics of cell populations in the olfactory epithelium. Ann New York Acad Sci 237：52-61, 1974.
- 6) Hinds JW, Hinds PL, Mcnelly NA：An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium：Evidence for longlived receptors. Anat Rec 210：375-383, 1984.
- 7) Harms G, van Goor H, Koudstaal J et al：Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromodeoxyuridine in frozen and plastic embedded sections. Histochemistry 85：139-143, 1986.

(1989年7月27日受稿 1989年10月30日受理)

別刷請求先 〒920 金沢市宝町13-1

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 木村恭之