モルモット嗅上皮分裂細胞と基底細胞の観察

— 免疫組織化学二重染色法による —

中村 英生・山岸 益夫・中野 雄一

The Observations of Dividing Cells and Basal Cells in the Olfactory Epithelium

—Using Immunohistochemical Double Staining Method—

Hideo Nakamura, Masuo Yamagishi and Yuichi Nakano

(Niigata University)

The immunohistochemical multiple staining method is used to recognize multiple antigens on the same section. In our observations of mitotic cells in the normal olfactory epithelium of guinea pigs and basal cells arranged on the basement membrane, we used the immunohistochemical double staining with anti-BrdU and anti-Cytokeratin (CK) antibodies. Numerous mitotic cells reactive with anti-BrdU antibodies were arranged above the basal cells, but most of these cells, did not react with the anti-CK antibodies. This shows that they differ from basal cells.

These cells appear to be blastema cells, interstitial cells, resting cells, and the globose cells described by Graziadei et al.

The above findings are inconsistent with the hypothesis that basal cells are the precursor cells of olfactory cells.

Key words: basal cell, dividing cell, double staining, immunohistochemistry

はじめに

動物の嗅上皮では、正常状態においても嗅細胞は turn over を行い、一定のサイクルで変性、再生を繰り返すことが知られている¹⁾。かつこの turn over は基底細胞がその母細胞であると推定されている^{2)~5)}。

しかし、今までわれわれが行った bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを応用した免疫組織化学的検索では、基底細胞層の一層上の部位に分裂細胞が多く認められ、基底細胞とは位

置的に異なることが推定されていた⁶⁾⁷⁾。そこで今回はこの点をさらに明確にするために、抗 BrdU 抗体および抗 cytokeratin (CK) 抗体を用いた免疫組織化学二重染色法を行い、両者の違いを明らかにすることを試みた。

材料および方法

実験動物としては約 400 g の成熟モルモットを用いた。嗅上皮内の分裂細胞を検索するために BrdU (40 mg/kg) を生食 1.5 ml に溶解して腹腔内に投与し、1 時間後に sodium pentobar-

bital (ネンブタール®, 3.0 mg/kg) 麻酔下で断頭し, 篩板直前の鼻中隔より嗅上皮を採取した. 標本は70%エタノール固定後パラフィン包埋し, 4 μ m の薄切切片とした.

免疫組織化学的手法(図1)としてはストレプトアビジン-ビオチン法(ICN Immuno Biologicals 社製イムノマークユニバーサルキット)を用いた. 標本を脱パラ, アルコール系列脱水後, 0.3%過酸化水素水添加メタノールで15分間処理し, 内因性ペルオキシダーゼ反応および非特異的反応を抑制した. その後DNA 2重鎖を単鎖状態にするために2N-HClに1時間浸漬し, さらにリン酸緩衝液(PBS)にて充分に中和した. 次に二重染色法の第一段階としてBrdUに対する免疫組織化学染色を施行した. 一次抗体としてマウス抗 BrdU 抗体(Becton-Dickinson 社製, 1:100)を室温で一晩反応させ, さらにビオチン化マウス第二抗体で1時間処理後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを付加, 1時間反応させた. その後ジアミノベンチジン(DAB)にて茶褐色に発色させた. 第二段階としてはcytokeratin (CK) に対する免

疫組織化学染色を施行した. 一次抗体としてウサギ抗 CK 抗体(DAKO 社製, 1:1,000)を室温で一晩反応させ, さらにビオチン化ウサギ第二抗体で1時間処理後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを付加, 1時間反応させた. その後4-クロロ-1-ナフトール(4CN)にて暗青色に発色させた.

抗原抗体反応の特異性をチェックするため, 陰性コントロールとしては一次抗体の代わりに非免疫正常マウスおよびウサギ血清を用いて同様の過程を行い, 非特異的反応が起こらないことを確認した. また陽性コントロールとしてはBrdU (40 mg/kg) 腹腔内投与1時間後のネコ舌扁平上皮癌標本を用いて抗 BrdU 抗体で反応がみられることを確認した.

結 果

同一切片上で嗅上皮内には抗 BrdU 抗体に反応する細胞(茶褐色)と抗 CK 抗体に反応する細胞(暗青色)の2種類がみられた(図2). これを強拡大で観察すると BrdU 取り込み細胞は基底細胞より一層上皮表面側に位置し, BrdUはこの細胞に取り込まれていた. またこの細胞の細胞質は抗 CK 抗体には反応していなかった. 一方, 抗 CK 抗体には基底膜に接している基底細胞の胞体のみが反応を示し, その細胞核は抗 BrdU 抗体に対しては反応を示さなかった(図3).

しかし多くの標本を観察するとごく稀に抗 BrdU 抗体と抗 CK 抗体の両方に反応する細胞が認められた(図4).

考 察

従来から嗅細胞の母細胞は基底細胞であると考えられ, ここで分裂が始まるものとされてきた^{2)~5)}. これに対してわれわれは BrdU および cytokeratin (CK) を使った免疫組織化学的研究から, 実際に分裂が盛んに起こっている細胞は基底細胞より一層上にあることを報告した⁶⁾⁷⁾. しかし今までの観察では抗 BrdU 抗体と抗 CK 抗体をそれぞれ別の切片に反応させていたため, 同一切片上でこの2種類の細胞が明らか

図1 免疫組織化学二重染色法のフローチャート

図2 嗅上皮の抗BrdU抗体および抗CK抗体に対する反応

抗BrdU抗体に反応する細胞は茶褐色に発色し(→), 抗CK抗体に反応する細胞は暗青色に発色している. ×150

図3 強拡大像

抗BrdU抗体に反応する分裂細胞(→)と抗CK抗体に細胞質が反応する基底細胞(▲)は明らかに異なる細胞であることが分かる. ×300

図4 抗BrdU抗体と抗CK抗体の両者に反応する細胞(↑). ×300

に異なるものであることを証明することは難しかった. そこで今回は, 抗BrdU抗体に反応する分裂細胞が基底細胞とは異なることを確認するために, 抗BrdU抗体と抗CK抗体による同一切片上での免疫組織化学二重染色法を試みた. 今まで同一切片上の複数の抗原を認識するために一般的に行われている方法としては, 免疫組織化学多重染色法がある. これらの方法では通常2種あるいは3種の異なった抗体および発色剤を用いるが, 実際には各々の色調の識別が困難な場合も多い. しかし, 今回のわれわれの実験では, 抗BrdU抗体では細胞核がDABにより褐色調に, また抗CK抗体では細胞質が4CNにより青色調に反応する. すなわち染色部位が核, 細胞質と異なること, および色調が異なることで各々の細胞の識別が可能になった. よって本方法は, 嗅上皮内の分裂細胞と基底細胞とを同一切片上で免疫組織化学的に観察する方法として有用なものと考えられた.

さらに今回の実験では, 抗BrdU抗体に反応する細胞は, そのほとんどが基底膜に接する基底細胞とは位置が異なっており, 胞体内にはCKは含まれないという従来のわれわれの観察結果が確認された. すなわち嗅細胞の母細胞となる分裂細胞は基底細胞ではなく, それより一層上皮表面側に存在するというのである. 以前よりこの部位には幼若型の細胞が存在することが報告されており, それぞれ *interstitial cell*⁸⁾, *blastema cell*⁹⁾, *resting cell*¹⁰⁾, あるいは *globose basal cell*⁵⁾ などと呼ばれていた. Graziadeiらはautoradiographyを用いた実験から, 基底細胞には2つのタイプ, すなわち基底膜上の基底細胞(*basal cell proper*)とその直上に存在する *globose basal cell*とがあり, *basal cell proper*が嗅細胞に分化する際の移行体として存在するのが後者の *globose basal cell*であると結論づけた⁵⁾. しかし基底細胞が母細胞であるとするならばBrdU注入後早期においてBrdUは基底細胞(*basal cell proper*)そのものに取り込まれるべきである. 今回のわれわれの

実験では, 抗 BrdU 抗体と反応する細胞は基底部に数多く存在するがそのほとんどが胞体内に CK を保有せず, 基底膜上の基底細胞とは異なるものと思われた. このことから最初に分裂を開始するのはむしろ Graziadei らのいう globose basal cell と考えられた.

今回の実験ではごく少数ではあるが, 抗 BrdU 抗体と抗 CK 抗体の両方に反応する細胞も認められた. しかし, これは基底細胞自身も turn over するからには当然のことと思われた.

参考文献

- 1) Clark WE and Warnick RTT : The pattern of olfactory innervation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 9 : 101~111, 1946.
- 2) Graziadei GAM and Graziadei PPC : Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II ; degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. J Neurocytol 8 : 197~213, 1979.
- 3) Graziadei PPC and Metcalf JF : Autoradiographic and ultrastructural observation on the frog's olfactory mucosa. Z Zellforsch 116 : 305~318, 1971.
- 4) Graziadei PPC and Okano M : Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory epithelium of pigeon following transection of the first cranial nerve. Acta Anat 104 : 220~236, 1979.
- 5) Graziadei PPC and Graziadei GAM : Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I ; morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. J Neurocytol 8 : 1~18, 1979.
- 6) 中村英生, 山岸益夫, 中野雄一, 他 : 抗 BrdU を用いた嗅上皮分裂細胞の免疫組織化学的観察. 日鼻誌 27 : 1 ; 263, 1988.
- 7) Yamagishi M, Nakamura H, Nakano Y, et al : Olfactory receptor cells ; immunocytochemistry for nervous system specific proteins and re-evaluation of their precursor cells. Arch Histol Cytol 52 Suppl : 375~381, 1989.
- 8) Yamamoto M : An electron microscopic study of the olfactory mucosa in the bat and rabbit. Arch Histol Jap 38 : 359~412, 1976.
- 9) Andres KH : Differenzierung und Regeneration von Sinneszellen in der Regio olfactoria. Naturwiss 17 : 500, 1965.
- 10) Nagahara Y : Experimentelle Studien über die histologischen Veränderungen des Geruchsorgans nach der Olfactoriusdurchschneidung —Beiträge Zur Kenntnis des freieren Baus des Geruchsorgans—. Jpn J Med Sci V Pathol 5 : 165~199, 1940.

(原稿受付: 平成 3 年 6 月 24 日
原稿採択: 平成 3 年 8 月 9 日
別刷請求先: 中村英生
〒951 新潟市旭町通一番町754
新潟大学医学部耳鼻咽喉科学教室)