研 究

モルモット鼻中隔粘膜下の鼻腺細胞の単離法

石垣 元章・池田 勝久・須納瀬 弘
香取 幸夫・鈴木 雅明・高坂 知節Dissociation of the Submucosal Nasal Gland of the
Nasal Septum in Guinea PigsMotoaki Ishigaki, Katsuhisa Ikeda, Hiroshi Sunose,
Yukio Katori, Masaaki Suzuki and Tomonori Takasaka
(Tohoku University)

A dissociation procedure for acinar cells of the nasal gland in the guinea pig has been developed. Under a whole mount of the nasal septum, the majority of nasal glands was distributed in the infraanterior area of the olfactory region and in the posterior area of the respiratory region. This technique employs meticulous and selective dissection with minimal contamination of epithelial cells and enzymatic treatment with collagenase. The dissociated cells were confirmed to be serous gland acini by negative stain with alcian blue and a relatively high electron density of secretory granules. More than 90% of acini were viable as judged by trypan blue exclusion. Ultrastructural integrity of the cell was well maintained following the dissociation procedure.

Key words: nasal gland, serous gland, dissociation, guinea pig

緒 言

鼻汁は腺組織および杯細胞などの上皮細胞からの分泌と血管からの漏出で構成されており、それらは自律神経によって支配されている。近年、鼻アレルギー状態において、自律神経の不均衡、即ち自律神経受容体の異常が指摘されている。自律神経受容体には、副交感神経受容体と交感神経受容体があり、副交感神経受容体である muscarinic cholinergic receptor は鼻腺と血管に存在し、交感神経受容体の α -adrenergic receptor は主として血管に存在している^{1)~5)}。

鼻汁の90%以上は鼻腺からの分泌であることが知られており、水性鼻汁は鼻腺細胞のレセプターを介した化学・神経伝達物質の直接的作用あるいは末梢神経の異常興奮に引き続く神経反射を介した間接的作用によって起こると考えられている^{6)~8)}。生理学的に、分泌細胞に分泌刺激が加わってから分泌が起こるまでの一連の過程を刺激分泌連関といい⁹⁾、外分泌腺細胞では分泌刺激により分泌顆粒中に濃縮、蓄積されている高分子物質(蛋白質、ムコ蛋白質など)を開口分泌によって腺腔内に放出するほかに、無機

電解質溶液をも分泌することが現在までの研究で判っている。さらには、哺乳動物の腭外分泌腺、唾液腺、涙腺などの外分泌細胞においては、分泌機序の研究がなされているが¹⁰⁾、鼻の分泌能に関する研究は直接採取した鼻汁の化学的分析⁶⁾⁸⁾¹¹⁾¹²⁾、免疫組織化学的分析¹³⁾¹⁴⁾や放射能リガンド¹⁵⁾¹⁶⁾を用いた方法によって行なわれているのがほとんどであり、鼻腺細胞自体の生理学的機能の解析はあまり行なわれていない。鳥類では鼻腺細胞に相当する器官が独立しており、その単離は比較的簡易である¹⁷⁾。一方、哺乳類では鼻腺組織は粘膜下に散在しており、その単離の困難な点が細胞機能の解明を遅らせている原因と考えられる。

そこで今回我々は、鼻汁分泌機序について、細胞および膜レベルでの解析を可能にするために、モルモットの鼻中隔の粘膜下層に存在する鼻腺細胞を単離することを試みた。

方 法

モルモット(体重 200~300 g)を用い、ジエチルエーテルで吸入麻酔後断頭を行ない、鼻中隔を摘出、直ちに鼻中隔粘膜を軟骨より剝離、0.1 M リン酸塩で pH 7.2 に調節した 0.2% オスミウムにて固定および染色、鼻中隔粘膜全体の鼻腺細胞の分布を実体顕微鏡で観察した。また 10% ホルマリンで固定、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) で脱灰、アルコールで脱水後パラフィン包埋、4~5 μ m 切片(前額断)を作製、ヘマトキシリン-エオジン(以下 H-E と略す)または pH 2.5 にてアルシアンブルー(以下 AB と略す)で染色、光学顕微鏡にて観察した。

鼻腺細胞の単離には前述と同様に麻酔、断頭後、鼻中隔粘膜を採取、直ちに保存液に入れた。保存液組成は 0.2% 牛血清アルブミン、139.2 Na⁺、4.69K⁺、2.56Ca²⁺、1.13Mg²⁺、136.1 Cl⁻、4.91ピルビン酸、5.38フマル酸、4.92グルタミン酸、2.8ブドウ糖、5.04-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid (HEPES)/tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) (mM) である。

実体顕微鏡下に鼻中隔粘膜を軟骨膜下で軟骨より剝離、次に剝離した粘膜より軟骨膜を除去し、上皮層を傷つけずに鼻腺細胞を軟骨側から直視下に切除、さらに 0.2~0.5 mm に細切し、単離液に浮遊させ、恒温槽内で 37°C 20~30 分間酵素処理した。単離液組成は標準液より Ca イオンを取り除き、1 mM ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)、0.2% 牛血清、100 units/ml コラゲネース (type IV) を加え作製、シリコン処理したピペット内で 5~10 回通すことにより機械的に鼻腺細胞を分離させ、遠心後 (1,000 rpm, 1 min)、コラゲネースの入っていない単離液に浮遊させ倒立型顕微鏡で観察した。またトリパンブルー (0.5%) を加え、単離した細胞の生存率も観察した。同様の操作で分離した細胞を電顕用に 2.5% グルタルアルデヒドで固定、1% オスミウムで後固定エポン 812 で包埋後、電子顕微鏡にて観察した。

結 果

1) 鼻腺細胞の分布

オスミウム染色によってモルモットの鼻中隔を観察すると、鼻腺細胞は濃褐色に染まり、嗅裂部の下前方で呼吸部後方に多く存在していた(図 1)。鼻前庭部および呼吸部中央部にもわずかに鼻腺細胞の分布を認めた。倍率を上げて呼吸部後方を観察すると、褐色に染まった腺細胞

図 1 鼻中隔のオスミウム染色 (×5)

呼吸部後方で嗅裂部(*)の下前方に鼻腺が集簇している(矢印)。

は胞状に見え、鼻腺の集簇している部位より数本の導管が鼻前庭部に向かって走行している像がみられた(図2)。

2) 光顕的観察

鼻中隔粘膜の呼吸部後方の前額断写真(図3)では、粘膜下層に腺組織を認め、同部位の強拡大像(図4)を観察すると、所々に管腔を認め、各々の細胞は核が類円形で細胞の基底側にあり、細胞質がやや暗くなっており、漿液腺と思われる所見であった。呼吸部後方の前額断でH-E染色(図5a)とAB染色(図5b)を比較すると、H-E染色で認められた粘膜下層の腺組織は、ABでは染色されなかった。単離した細胞を倒立型顕微鏡で観察すると(図6)、腺房はいくつかの腺細胞で形成されており、細胞内には顆粒が認められた。トリパンブルーによる観察では90%以上の細胞が染色されなかった。

3) 電顕的観察

単離した鼻腺細胞を電顕で観察するとその形態はよく保持されており、神経線維および管腔を認め、管腔側には微絨毛が存在し、所々に分泌顆粒が認められた(図7)。さらに倍率を上げると側底膜には所々に指状皺壁構造およびデスモゾームが見られ、上皮系の細胞の特徴を有していた。そして分泌顆粒に注目すると、比較的電子密度が高く、漿液性の分泌細胞と判断でき

た(図8)。

考 察

哺乳動物の鼻腺には粘液腺、漿液腺そして混合腺がある。哺乳類の中でも、種によって腺の占める割合が異なっており、例えば、ヒトの場合は、混合腺が優位で、モルモット、ウサギ、イヌの場合は漿液腺がほとんどであり、ネコの場合は粘液腺がほとんどであると言われてい

図3 鼻中隔粘膜の呼吸部後方の前額断写真(H-E染色 ×10)
粘膜下層に腺組織を認める(矢印)。

図2 鼻中隔のオスミウム染色(×10)
鼻腺の集簇している部位より数本の導管(矢印)が鼻前庭部に向かって走行している。

図4 鼻中隔呼吸部後方の前額断写真の強拡大像(H-E染色 ×200)
所々に管腔(矢印)を認め、細胞質がやや暗く、細胞の核が類円形で基底側に存在する。

る¹⁸⁾. 今回は軟骨から鼻粘膜の剝離を容易にするため鼻中隔粘膜を選んだ. Bojsen-Møller¹⁹⁾ はモルモットにおいて, 呼吸部後方 2/3 の部位に漿液腺の大きな分布を認め, 特に嗅裂部の下方に密集していると述べている. 我々も同様に, 腺組織は鼻前庭部, 鼻背部, 呼吸部後方で嗅裂部の下前方に存在しており, 特に呼吸部後方で嗅裂部の下前方に大きな塊となって存在してい

た. また, それらの腺組織より数本の導管が鼻前庭部に向かって走行していた. 呼吸部後方の腺組織は AB 染色に染まらず, 分泌顆粒の電顕的観察からも漿液腺がほとんどであると判断した. 鼻腺細胞, 特に漿液腺細胞の分布を確認後, 我々は鼻腺細胞の単離を試みた. 粘膜上皮の混在を避けるために, 鼻腺の集簇する部位で, 粘膜下層に存在する細胞を軟骨側より採取した.

図 5 (a) H-E 染色 ($\times 10$) と (b) AB 染色 ($\times 10$) の比較
H-E 染色で認められた粘膜下層の腺組織 (矢印) は AB 染色では認められない.

図 6 単離した鼻腺細胞の光顕像 ($\times 200$)
腺房がいくつかの腺細胞で形成されており, 細胞内には顆粒 (矢印) が認められる.

図 7 単離した鼻腺細胞の電顕像 ($\times 4500$)
神経線維 (NF) および管腔 (L) が認められる.

図8 単離した鼻腺細胞の電顕像(×9000)
細胞内の所々に分泌顆粒(Sg)を認める。
BM : 基底膜
IP : 指状皺壁構造, デスモゾーム(矢印)

倒立型顕微鏡での観察では、数個の細胞が腺房を形成しており、細胞内には分泌顆粒と思われる顆粒が認められ、単離した細胞は鼻腺細胞であることが確認された。単離した細胞の生存性をトリパンプルーを用いて調べた結果、生存細胞は90%以上と高率であり、電顕上も形質膜や細胞内小器官は良好に保持されていた。従って、今回の我々の鼻腺細胞の単離法で種々の実験が十分に行なえるものと判断した。

今回我々は細胞および膜レベルでの鼻汁分泌能の解析を可能にするためにモルモット鼻中隔粘膜の鼻腺細胞の単離を試みた。今後単離した細胞を用い、in vitro で化学および神経伝達物質による細胞内イオン濃度への影響とそれに附随する膜のイオンチャネルと受容体の動態を電気生理学的に解析し、鼻腺の電解質と水の輸送機序を解明していきたいと考えている。さらには単離した鼻腺細胞は鼻アレルギーや慢性副鼻腔炎などの臨床面での薬物療法の評価を細胞レベルで可能にする有効なモデルになるものと考えている。

参考文献

- 1) Anggard A and Denert O : Adrenergic innervation of the nasal mucosa in cat ; a histological and physiological study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **78** : 232~241, 1974.

- 2) 石井哲夫 : 鼻粘膜におけるコリン作動性神経支配. *耳喉* **42** : 255~259, 1970.
- 3) Nomura Y and Matuura T : Distribution and clinical significance of the autonomic nervous system in the human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **73** : 493~501, 1972.
- 4) Vecerina S, Krajina Z, Krmpotic J, et al : Comparative analysis of human nasal mucosa by standard neurohistochemical techniques. *Rhinology* **21** : 73~78, 1983.
- 5) 大前 隆 : 人下鼻甲粘粘膜における自律神経終末の組織化学的研究. *耳展* **27** 補4 : 425~451, 1984.
- 6) Borum P : Nasal methacholine challenge ; a test for the measurement of nasal reactivity. *J Allergy Clin Immunol* **63** : 253~257, 1979.
- 7) Mygind N : Mediators of nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol* **70** : 149~159, 1982.
- 8) Raphael GD, Druce HM, Baraniuk JN, et al : Pathophysiology of rhinitis ; 1. assessment of the sources of protein in methacholine-induced nasal secretions. *Am Rev Respir Dis* **138** : 413~420, 1988.
- 9) 西山明德 : 図説 外分泌腺細胞の生理学. *日本臨床* **44** : 2~3, 1986.
- 10) 西山明德 : 分泌上皮における電解質分泌の細胞内調節機序 — 唾液腺, 涙腺, 腺外分泌腺を中心として —. *病態生理* **9** : 249~252, 1990.
- 11) Konno A, Terada N, Okamoto Y, et al : The role of chemical mediators and mucosal hyper-reactivity in nasal hypersecretion in nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol* **79** : 620~626, 1987.
- 12) Malm L, McCaffrey TV and Kern EB : α -adrenoreceptor-mediated secretion from the anterior nasal glands of the dogs. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **96** : 149~155, 1983.
- 13) Lundberg JM, Anggard A, Emson P, et al : Vasoactive intestinal polypeptide and cholinergic mechanisms in cat nasal mucosa ; studies on choline acetyltransferase and release of vasoactive intestinal polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** : 4255~4259, 1981.
- 14) Uddman R, Luts A and Sundler F : Occur-

- rence and distribution of calcitonin generelated peptide in the mammalian respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res* **241** : 551~555, 1985.
- 15) Van Megen YJB, Klaassen ABM, Rodrigues de Miranda JF, et al : Alteration of muscarinic acetylcholine receptors in the nasal mucosa of allergic patients in comparison with nonallergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* **87** : 521~529, 1991.
- 16) Rodrigues de Miranda JF, Scheres HME, Salden HJM, et al : Muscarinic receptors in rat nasal mucosa are predominantly of the low affinity agonist type. *Eur J Pharmacol* **113** : 441~445, 1985.
- 17) Hootman SR and Ernst SA : Dissociation of avian salt gland ; separation procedures and characterization of dissociated cells. *Am J Physiol* : C184~195, 1980.
- 18) Negus V : The Comparative Anatomy and Physiology of the Nose and Paranasal Sinuses. pp 1~402, E & S Lingstone Ltd, Edinburgh and London, 1958.
- 19) Bojsen-Møller F : Topography of the nasal glands in rats and some other mammals. *Anat Rec* **150** : 11~24, 1964.

(原稿受付：平成 5 年 3 月 30 日
原稿採扱：平成 5 年 6 月 28 日 急載
別刷請求先：石垣元章
〒980 仙台市星陵町1-1
東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室)