短

報

ヘキサミンを指標とした
マハタ腸管組織における粘液定量法安田 拓,¹ 木原 稔^{2*}

(2011年3月24日受付, 2011年6月8日受理)

¹東海大学大学院理工学研究科環境生物科学専攻,²東海大学生物理工学部海洋生物科学科Quantitative analysis of intestinal tissue
mucus by hexosamine determinationTAKU YASUDA¹ AND MINORU KIHARA^{2*}¹Graduate School of Science and Engineering Course of Environmental and Biological Sciences, Tokai University, Sapporo, Hokkaido 005-8601, ²Department of Marine Biology and Sciences, Tokai University, Sapporo, Hokkaido 005-8601, Japan

キーワード: 腸組織, 粘液, ヘキサミン, マハタ

魚類表皮には角質化した細胞がなく, 体表面は常に環境水と直接接していることから, 絶えず病原体侵入の危険にさらされている。¹⁾ いっぽう消化管も, 食物とともに大量の微生物や抗原が管腔内に侵入することから, 病原菌の侵入の危険が大きい部位である。²⁾ こういった皮膚全体や消化管管腔内を覆う粘液は, 表面部位からの異物の侵入を防ぐ物理的バリアーとして重要な役割を果たしていると考えられており,³⁾ 粘液の分泌促進法を研究することは, 魚病対策上重要な意義があるといえる。

組織内粘液の研究には, 主に組織化学的方法が用いられる。しかし, 組織標本の作製には設備, 技術, 時間を要するという難点が挙げられる。そこで簡便な組織内の粘液の定量方法として, 粘液成分のヘキサミンを指標とした定量方法がヒト胃組織で報告されており,^{4,5)} その妥当性の証明がなされている。しかし, 魚類腸の組織における測定の実用性の検討, 組織標本を用いた測定方法との比較検討は行われていない。そこで本研究では, 簡便な粘液定量方法の確立を目的に, マハタ腸組織内粘液を, ヘキサミンを指標とした分析化学的手法で定量し, この方法の実用性を検討するために, 従来から行われている組織標本を用いた形態定量法(組織化学的手法)による粘液量との相関を確認した。ハタ類やフグ類には, 腸管への粘液胞子虫の寄生が知られており,⁶⁾ 今後はこれら魚種の腸管粘液分泌の研究も重要になるであろうことをふまえ, 今回供試魚にはマハタを用いた。

60 L ガラス製循環ろ過式水槽にマハタ *Epinephelus*

septeimfasciatus (平均体重 53 g) を給餌群と絶食群に 4 尾ずつ分けて収容した。給餌群にのみ, 2 日に 1 度, 配合飼料 (まだい育成用飼料 MZ30, 昭和産業株式会社) を 9:00 に飽食給餌した。水温を 23°C に調節し, 8:00~20:00 の間照明した。以上の条件で 20 日間飼育した後, 麻酔下で開腹して腸を摘出し, 肛門側から約 1 cm の部位の湿重量約 0.1 g の組織を切り取り分析化学的手法による粘液量を測定した。粘液量の測定は, 簡便な粘液定量方法として報告されている Neuhaus の方法⁷⁾ をヒト生検試料の測定に応用した桶谷ら⁸⁾ の方法に従った。すなわち, 生検材料を 4N 塩酸 0.2 mL 中で 100°C, 9 時間加水分解した。4N 水酸化ナトリウム水溶液で中和し, 蒸留水で 5 mL に定量した後, ろ紙 (アドバンテック, No. 5A) で濾過した。濾液 1 mL にアセチルアセトン試薬 (Na_2CO_3 4 g および NaHCO_3 1.05 g を蒸留水 50 mL に溶解し, アセチルアセトン 1.5 mL を加えたもの) 1 mL を加え 100°C, 20 分間加熱した。水冷した後, イソアミルアルコールを 2 mL 加えて攪拌し, 1360 × g, 10 分間遠心分離した。上層のイソアミルアルコール層 1 mL をとり, Ehrlich 試薬 (*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 0.8 g を濃塩酸 3 mL とイソアミルアルコール 27 mL の混液に溶解したもの) 0.5 mL を加えて混和し, 室温で 15 分間放置した後, 530 nm の吸光度を測定した。検量線はグルコサミン水溶液 (0~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を濾液と同様に反応させて作製した。

分析化学的手法に用いた腸の直近部位の組織をカルノア液で 24 時間固定した後, 99.5% エタノールで脱水した。この後常法によりパラフィン包埋し, 4 μm の薄切標本を 1 尾あたり 1 枚作製して Periodic acid-Schiff-Alcian blue (PAS-AB) pH 2.5 により, 粘液染色した。この切片中の粘膜面積あたりの粘液部面積を以下の手法により測定した。まず粘膜面積は木原ら⁹⁾ の形態定量法を用いて測定した。すなわち, 光学顕微鏡で撮影した腸横断切片像 (×40) をコンピュータに取り込み, ランダムに放射状の線を書いたシートを組織切片像に重ね, 腸横断面の中心と考えられる点に, 放射状の線の中心を合わせた。線と腸が重なっている部分 20 か所について, 腸の中心から絨毛先端までの距離 (a), 絨毛基底までの距離 (ab) を測定し, 画像上のスケールバーを基準として実際の長さに変換し, 平均した。a を半径とする管腔部面積 (S_a) と ab を半径とする管腔部 + 粘膜層部面積 (S_{ab}) を計算し, S_{ab} から S_a を差し引いて粘膜層面積を算出した (Fig. 1)。¹⁰⁾ つぎに粘液面積は, 組織切

* Tel : 81-11-571-5111. Fax : 81-11-571-7879. Email : kihara@tspirit.tokai-u.jp

Fig. 1 Schematic drawing of morphometric estimation for mucosal layer area. Distance from approximate center of lumen to villus tip (a) and to basal portion of mucosal layer (ab) were used for the area calculation of circle of radius a (Sa) and circle of radius ab (Sab), respectively. See text for details.

Fig. 2 Cross-section of the gut of grouper by picture-processing. Dark area shows PAS-AB-stained mucus area.

画像を画像処理ソフト Photoshop (Adobe Systems Incorporated, CA) 上で、無作為に選んだ組織切片像中の PAS-AB 濃染色部分が黒く残るよう二階調化する境界の閾値を決めた。この閾値をもとに、すべての組織切片像を二階調化した (Fig. 2)。この画像を画像処理ソフト ImageJ (National Institutes of Health, MD) に転送し、黒く残した部分を粘液面積として測定した。以上の値から粘膜層面積あたりの粘液面積を算出した。

マハタ腸湿重量 1 g あたりのヘキサミン量は、給餌群では 2.04 ± 0.20 mg, 絶食群では 2.26 ± 0.16 mg (いずれも平均値 $\pm$ 標準偏差, $n=4$) であり、一元配置分散分析の結果、両群間に有意な差異はなかった。そこで、給餌群および絶食群のすべての個体データを用い、

Fig. 3 Correlation between the tissue hexosamine content and the proportion of mucus area from the gut of grouper. A significant positive correlation was confirmed by Spearman's correlation analysis ($n=8$, $r=0.857$, $p<0.05$).

腸湿重量 1 g あたりのヘキサミン量と、粘膜層 $1 \mu\text{m}^2$ あたりの粘液面積を Spearman の相関分析により検定した結果、有意に強い正の相関がみられた (Fig. 3)。この結果から、本実験の腸管組織中ヘキサミン量は組織中の粘液量を反映していることが強く示唆された。よって、本方法は簡便な粘液定量方法として利用可能だと考えられた。

魚類の粘液はストレス時にも変化することが知られており、たとえば、過密飼育により生簀内に蓄積する硝酸が、粘液分泌の昂進を引き起こす。³⁾ 石川 (2010) は、ストレスの指標として粘液産生細胞数の測定を行っており、¹¹⁾ ニジマス高過密飼育時には、有意に腸組織内の粘液産生細胞数が増加することが明らかとなっている。これらのことから、本研究の方法を使って腸管組織粘液量を定量することで、ストレスをモニターすることも可能ではないかと考えられる。

本方法は、含まれる粘液の量にもよるが乾燥重量 1 mg 程度の微量試料でも測定ができること、⁸⁾ 組織切片の作製に比べ、短時間に多数のサンプルを処理することができること、養殖現場などでも実施可能なことから、魚類組織内粘液の有用な評価法だと考えられた。今後は、養殖魚のストレス検出法、および皮膚粘液の定量への応用などについても検討をすすめたい。

文 献

- 1) 廣瀬一美, 間野伸宏. 魚類の皮膚生体防御機構. 月刊 海洋/号外 1988; 4: 131.
- 2) 渡辺 翼. 魚類の免疫学. 恒星社厚生閣 2003: 62.
- 3) 小川和夫, 室賀清邦. 改訂・魚病学概論. 恒星社厚生閣 2008: 11-12.

- 4) 加藤卓次, 郡大裕, 鈴木邦夫, 多田利男, 野村元積, 伊藤重二, 佐藤富貴子, 藤木典生. 病院健常者ならびに胃潰瘍患者における胃粘膜内ヘキソサミンの定量. 日本消化器病学会雑誌 1988; **85**: 1051-1059.
- 5) Oketani K, Murakami M, Fujisaki H, Fujisaki H, Wakabayashi T, Hotta K. Effect of geranylgeranylacetone on aspirin-induced changes in gastric glycoproteins. *Jpn J Pharmacol.* 1983; **33**: 593-601.
- 6) 知名真智子. ヤイトハタの粘液胞子虫性やせ病. 養殖 2010; **9**: 94.
- 7) Neuhaus OW, Letzring M. Determination of hexosamines in tissues. *Anal. Chem.* 1957; **29**: 1230-1233.
- 8) 桶谷 清, 村上学, 藤崎秀明, 若林康夫, 鶴井光治, 勝亦重弘, 花城清史, 原田容治, 萩原奉祐. ヘキソサミンを指標とした粘液糖蛋白質の簡易比色定量法—消化管粘膜からの生検試料に関して. 医学のあゆみ 1984; **131**: 745-749.
- 9) Kihara M, Ohba K, Sakata T. Trophic effect of dietary lactosucrose on intestinal tunica muscularis and utilization of this sugar by gut microbes in red seabream *Pagrus major*, a marine carnivorous teleost, under artificial rearing. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995; **112A**: 629-634.
- 10) Kihara M, Sakata T. Fermentation of Dietary Carbohydrates to Short-Chain Fatty Acid by Gut Microbes and its Influence on Intestinal Morphology of a Detritivorous Teleost Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; **118A**: 1201-1207.
- 11) 石川孝典, サケ科魚類へのアスコルビン酸最適投与法確立実験. 栃木県水産試験場研究報告第 53 号 (平成 20 年度) 2010; 52-59.