

ウシの肺における神経内分泌細胞の出現時期 および部位と加齢変化

畑 一志*・阿部光雄*・岩佐憲二*・平賀武夫**
竹花一成*・平塚貴浩*

Ontogeny and aging of the neural endocrine cell in the bovine lung

Kazushi HATA, Mitsuo ABE, Kenji IWASA, Takeo HIRAGA
Kazushige TAKEHANA and Takahiro HIRATSUKA

(June, 1995)

緒 論

肺の神経内分泌細胞 (Neural Endocrine Cell) はモノアミンの前駆物質を外部から取り込んでモノアミンに変える能力を有し、形態学的に細胞の基底側にクロム親和性の顆粒を有する細胞で、その含有物質の種類と働きについて研究されてきている^{3,6,7,19,20}。その後この細胞に関する加齢変化や動物種間での含有物質の違いが報告された^{1,2,11,17}。ヒト、実験動物を始めとして多くの哺乳動物の肺には、セロトニン、カルシトニン、コレシストキニン、ソマトスタチン、ボンベシン等の様々な種類の神経伝達物質を含有している細胞が存在し、これらの細胞はその含有物質を神経終末もしくは血管に分泌する事により、肺の発達や生理機能調節を行っていることが明らかにされ、また、喘息および酸素過多等の呼吸器状態における神経内分泌細胞の働き^{10,15}や癌細胞^{4,5,8,13,16}との関連についても研究されている。しかし、これらの研究はヒトや実験動物を中心に行われており、ウシの肺における神経内分泌細胞の含有物質の種類および局在やその加齢変化などについての詳細な研究はいまだ行われていない。

そこで本研究では、ウシの肺の胎子期と生後の組織における神経内分泌細胞の出現時期および部位と成長に伴う加齢変化を免疫組織化学的に明らかにした。

材料と方法

材料は屠畜場より採取した肉眼的に正常と思われるホルスタイン種の胎子 (胎齢 2~8 カ月齢) 7 例、子ウシ (1 カ月齢) 2 例、成ウシ (6 歳) 2 例の計 11 例の左肺を用いた。胎齢は、胎子頭尾長を計測し決定した。

左肺の各葉においてそのほぼ中心部から組織片 (約 10 mm×10 mm×5 mm) を採材し、ブアン氏固定液で 48 時間固定後、常法に従いパラフィンに包埋し、5 μm で連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行った。また免疫組織化学的には 5 種類の抗血清、(セロトニン (Incstar, U. S. A.)), カルシトニン (Incstar, U. S. A.)), コレシストキニン (CCK-8) (Incstar, U. S. A.)), ソマトスタチン (Cambridge Research Biochemicals, U. K.)), ボンベシン (Cambridge Research Biochemicals, U. K.)) を用い ABC 法⁹) により反応を行い、光学顕微鏡にて観察した。

免疫活性細胞の加齢変化を明らかにするために、各個体の細気管支から呼吸細気管支までの横断像それぞれ 15 カ所の上皮細胞数を数え、そこに存在する免疫活性細胞の割合の平均値と標準誤差を算出した。また結合組織中に存在したものに関しては無作為に 15 視野 (一視野は 668 μm×420 μm) を選択し、その中に存在する免疫活性細胞の数の平均値および標準誤差を算出した。

* 獣医学科、獣医解剖学教室

Department of Veterinary Medicine, Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

** 獣医毒性学教室

Veterinary Toxicology

成 績

考 察

1. 胎生期の肺の組織学的所見

胎生初期(胎齢2カ月と3カ月)の肺は単層円柱上皮でおおわれた複合管状腺様の形態を示した。上皮は高く、個々の細胞に形態学的差異は認められなかった(図1)。胎生中期(胎齢5カ月と6カ月)の肺では結合組織内に毛細血管が発達し、管状腺様の管が分岐し始めその末端が球状に変化し肺胞組織が形成され始めた(図2)。胎生後期(胎齢7カ月以降)の肺では生後のものと同様の組織像が認められた。

2. 免疫活性細胞の出現時期および部位と加齢変化について

肺における免疫活性細胞は単独もしくは集団を形成して存在し、上皮内に認められるものと結合組織中に認められるものと2種類が観察された。

セロトニン免疫活性細胞は胎齢5カ月の肺では認められなかったが、胎齢6カ月以降では細気管支から呼吸細気管支の上皮内に存在していた(図3)。その数は6カ月齢の胎子では0.6%しか認められなかったが、胎齢7カ月の時には1.8%と最も多く存在した。しかし、胎齢8カ月では0.5%と減少していた(図4)。

カルシトニン免疫活性細胞は胎齢5カ月の肺では細気管支の上皮にのみ認められた。しかし、胎齢6カ月以降では細気管支から呼吸細気管支の上皮に存在するようになり(図5)その数は胎齢5カ月では僅かに認められる程度であったが、胎齢6カ月では1.8%と急激に増加し、胎齢7カ月では2.2%と最も多く存在していたが、胎齢8カ月では1.4%に減少した(図6)。

コレシストキニン免疫活性細胞は胎齢5カ月の肺では細気管支の上皮内でしか認められなかったが、胎齢6カ月以降では細気管支から呼吸細気管支までの上皮内に多数存在していた(図7)。その数は胎齢5カ月では僅かに認められる程度であったが、胎齢6カ月では3.5%と急激に増加し、胎齢7カ月では1.4%と減少したが胎齢8カ月では5.1%と再び増加した(図8)。

ソマトスタチン免疫活性細胞は細気管支の粘膜固有層内およびその結合組織中のみ存在した(図9)。その数は胎齢3カ月から1視野平均5個出現し、5カ月では1視野平均14個と最も多く出現し、その後減少した(図10)。

ボンベンシン免疫活性細胞はどの時期においても確認する事はできなかった。

また、生後1カ月の子ウシならびに成ウシでは全ての抗血清に対する免疫活性細胞は全く認められなかった。

ウシ胎子の肺にセロトニン免疫活性細胞が存在したことはヒト²⁰⁾、ヒツジ²⁾や実験動物および他の動物種¹⁷⁾の報告と同様であった。セロトニン免疫活性細胞は胎齢中期から出現し始め後期にかけて増加した。胎子期における胎齢に伴う数の変化は、ヒトの肺における報告²¹⁾と類似し後期に増加したが、ヒツジの肺で初期に多く存在するという報告²⁾とは異なっていた。

カルシトニン免疫活性細胞もウシの胎子の肺では胎齢中期から後期にかけて増加したことからヒトの肺²⁰⁾におけるそれと同様の結果であった。しかし、ヒツジ²⁾ではカルシトニン免疫活性細胞は認められず、胎子以外にも認められたウマの報告¹¹⁾とも異なっていた。

コレシストキニン免疫活性細胞はヒト²⁰⁾、サル¹⁷⁾およびヒツジ²⁾の肺でその存在がすでに報告されており、ウシでも胎齢5カ月の細気管支で初めて出現した。胎子期の間、免疫活性細胞の量的変化が報告されているヒツジ²⁾では初期と後期にのみその存在が認められており、これは胎齢中期から後期にかけてその数が増加していたという今回の結果とは異なっていた。

ソマトスタチン抗血清を用いた肺の免疫組織化学的報告は少ないが、ウマ¹¹⁾の肺でソマトスタチン免疫活性細胞が胎子期に存在すると報告されており今回の結果と一致していた。これらの免疫活性細胞はいずれも胎子期の肺でのみ認められたが、生後1カ月齢の子ウシ並びに成ウシではその存在は認められなかった。またウシの肺においてボンベンシン免疫活性細胞を確認することは出来ず、ヒト²⁰⁾、サル¹⁷⁾およびウマ¹¹⁾の報告とは異なっていた。

以上のような免疫活性細胞の種類や出現時期に関する動物種差については数多く報告されている^{2,6,11,17,20)}が、種差によるそれぞれの使用抗体もしくは抗原物質の化学構造の違い、または、これら神経内分泌細胞の含有物質の含有量が少ないことによる免疫活性の低さから、その特異的免疫活性をバックグラウンドから識別できないことなどの要因が報告されている²⁾。また胎子期に認められる免疫活性細胞の出現状態の違いは、妊娠初期では腺様組織、中期では気管支より末端の細管形成、後期では肺胞形成、分娩後の呼吸開始という特徴的な発達のステージとの関係が十分に考えられ、妊娠中期から後期にかけて増加するものは肺胞形成に、妊娠後期に増加するものは分娩後の呼吸開始のための準備期と深く関係する可能性が考えられている^{14,20)}。

また胎子期の肺におけるこれらの物質の働きは依然明

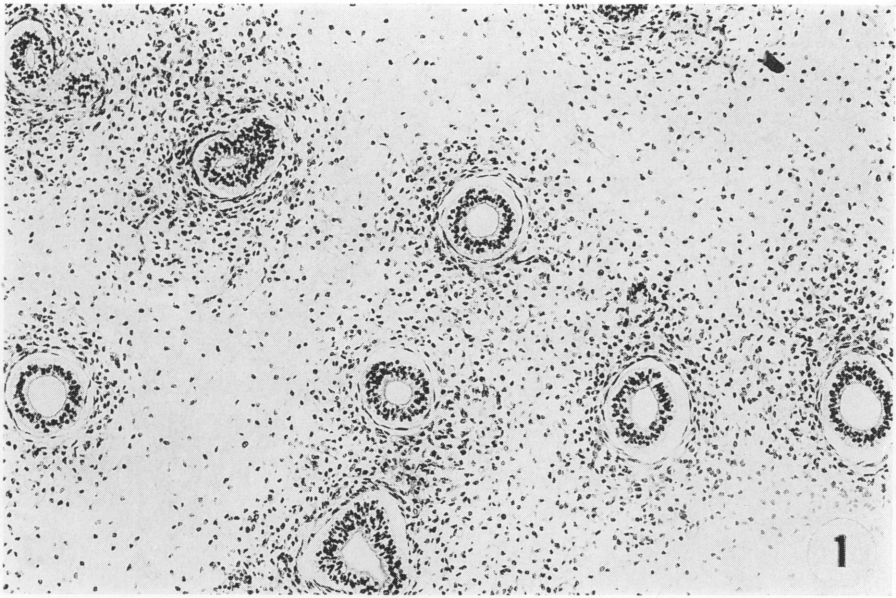


図1 胎齢2カ月の胎子の肺。胎子の肺は円柱上皮でおおわれた複合管状腺様の形態を示した。上皮の丈は高く、個々の細胞の形態学的差異は認められない。結合組織中の細胞も組織学的分化は認められない。
ヘマトキシリン・エオジン染色 ×110

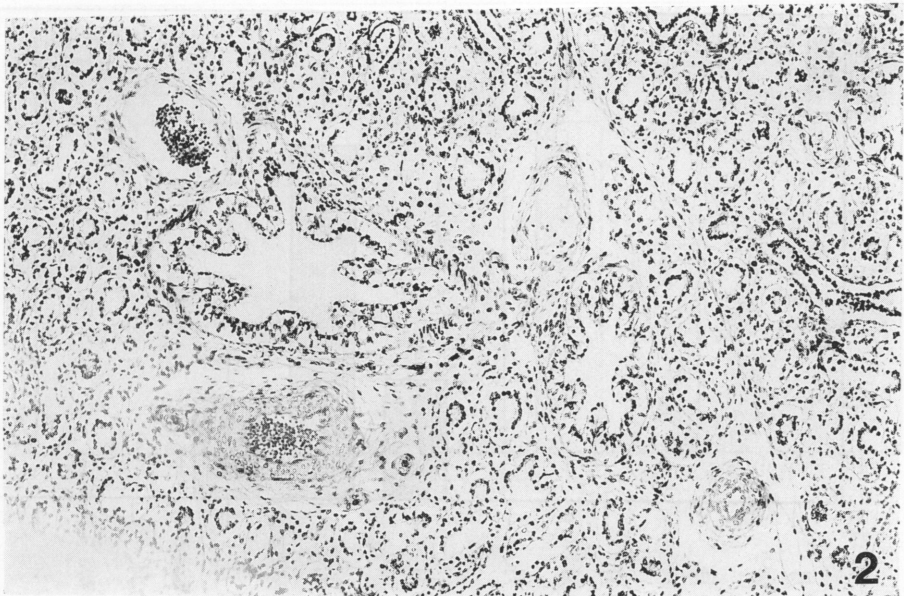


図2 胎齢5カ月の胎子の肺。間葉組織中に毛細血管がよく発達し管状腺様の管が次第に伸びて分岐し始めその末端が球状に拡張した肺胞様組織が認められる。
ヘマトキシリン・エオジン染色 ×110

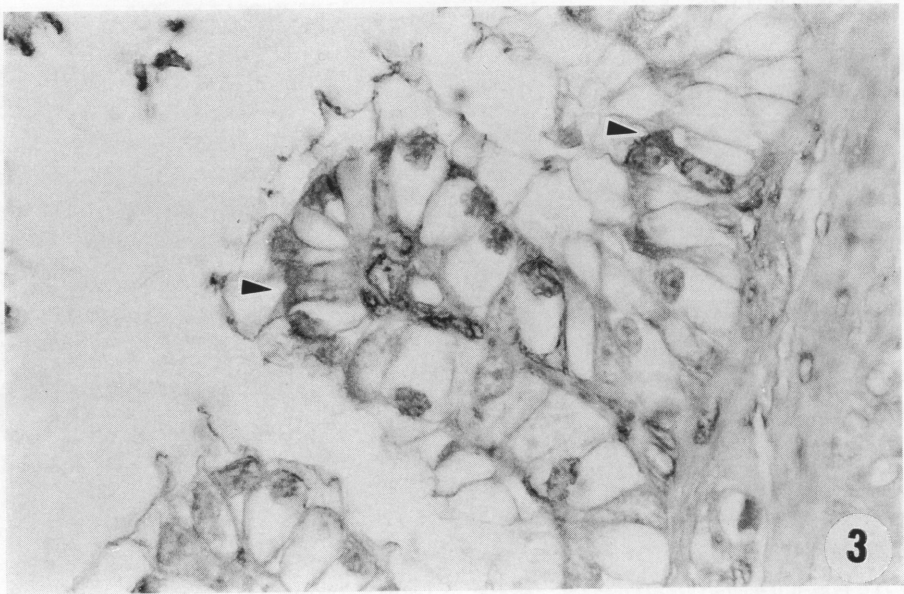


図3 胎齢7カ月のウシの胎子の細気管支を示す。上皮内にセロトニン免疫活性細胞(矢頭)が認められる。ABC法 ×1,100

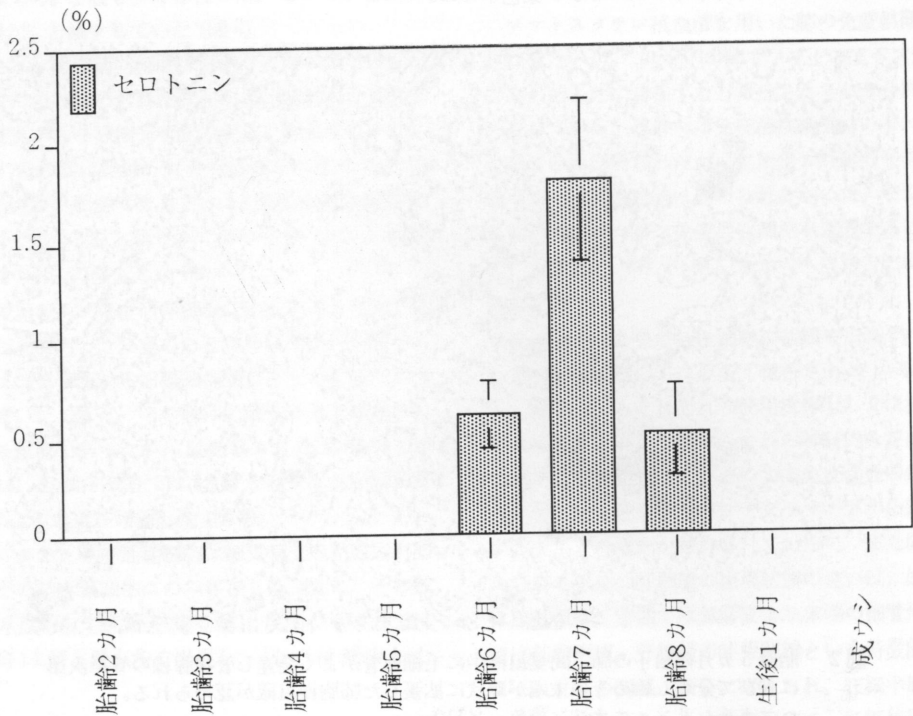


図4 セロトニン免疫活性細胞の出現時期と加齢変化

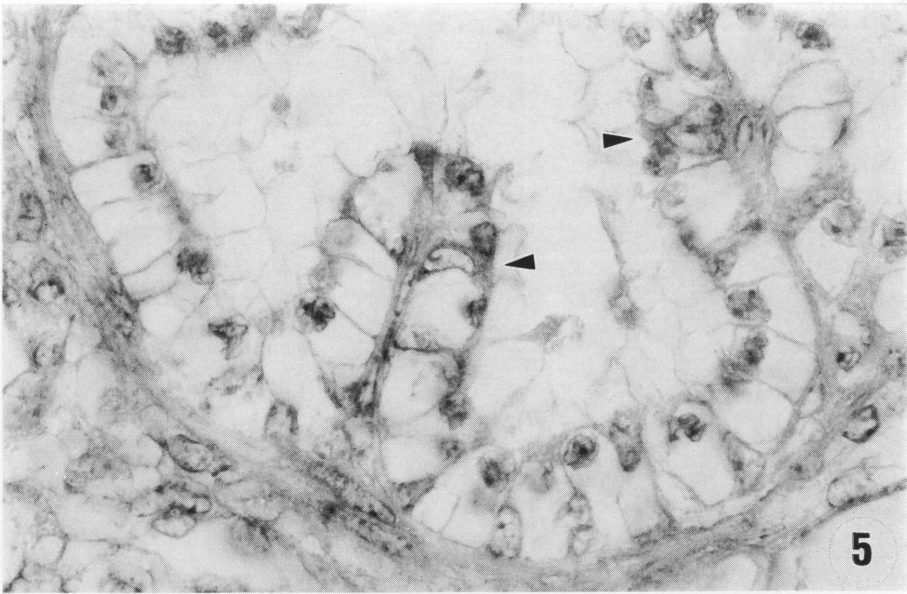


図5 胎齢7カ月のウシの胎子の細気管支を示す。上皮内にカルシトニン免疫活性細胞(矢頭)が認められる。ABC法 ×1,100

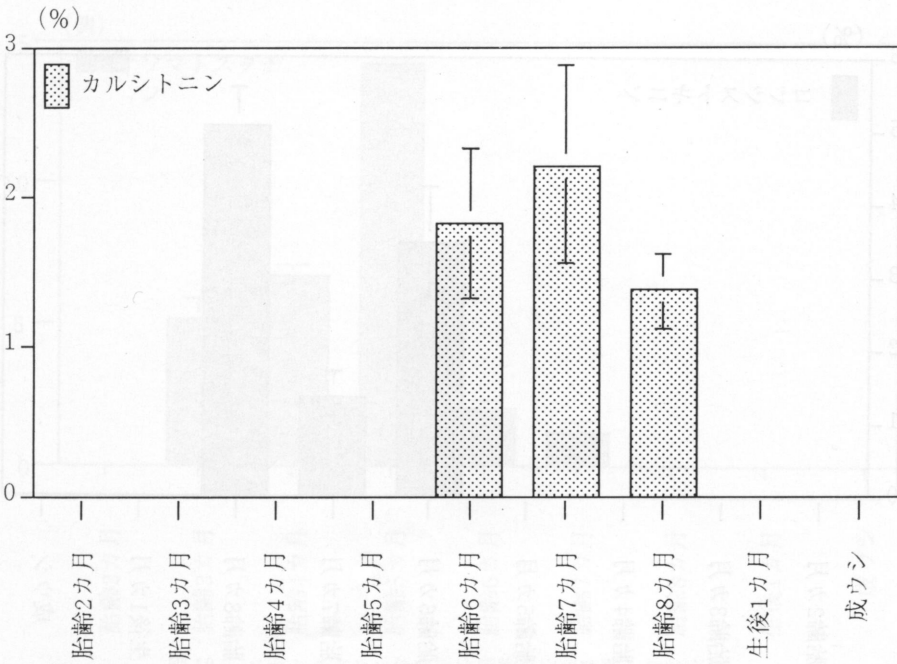


図6 カルシトニン免疫活性細胞の出現時期と加齢変化

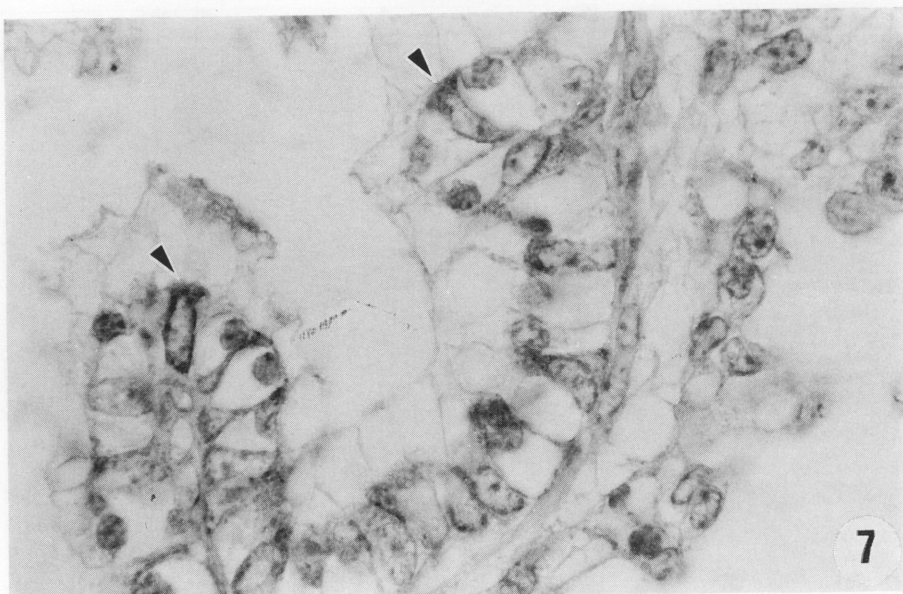


図7 胎齢7カ月のウシの胎子の細気管支を示す。上皮内にコレシストキニン免疫活性細胞(矢頭)が認められる。ABC法 $\times 1,100$

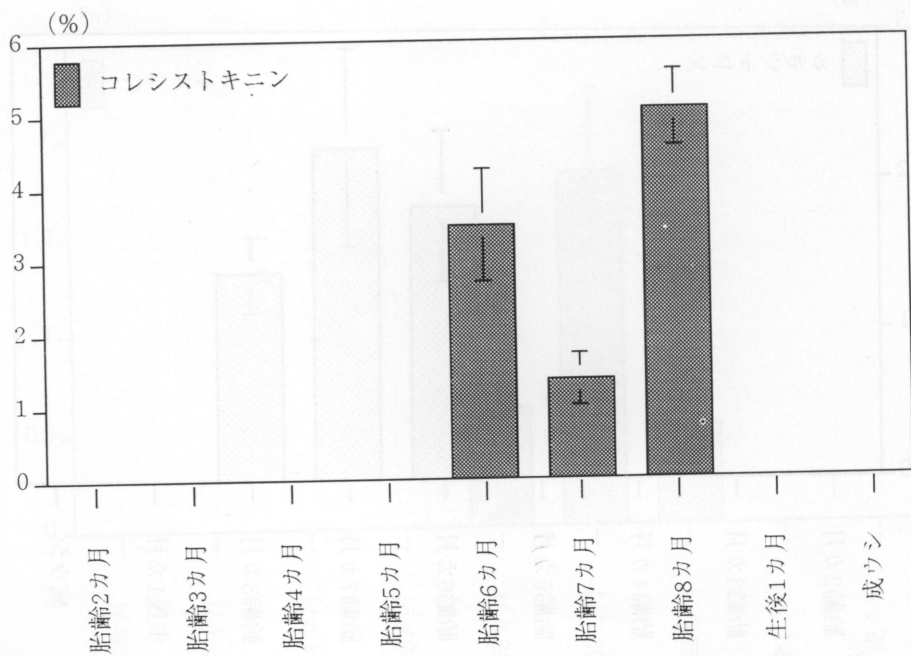


図8 コレシストキニン免疫活性細胞の出現時期と加齢変化

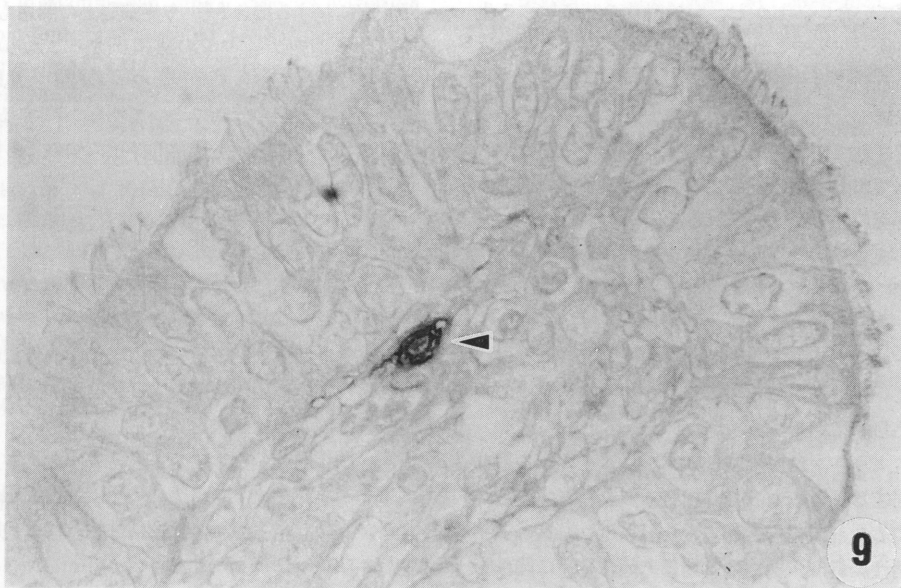


図9 胎齢7カ月のウシの胎子の細気管支を示す。結合組織内にソマトスタチン免疫活性細胞(矢頭)が認められる。ABC法 $\times 1,100$

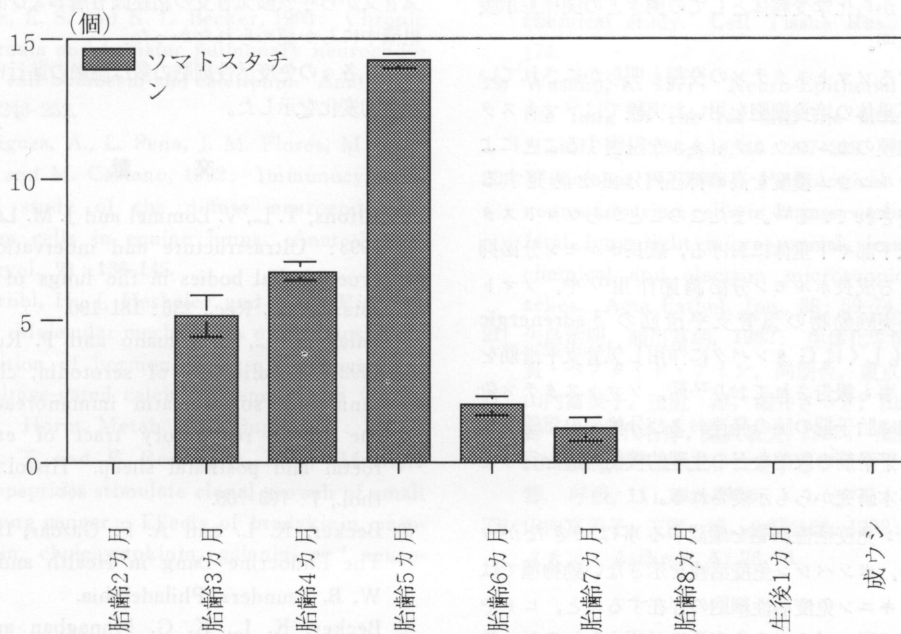


図10 ソマトスタチン免疫活性細胞の出現時期と加齢変化

らかにされていない。しかし、実験動物の肺に対する生理作用の実験^{3,22,23}やこれらの物質の他の臓器に与える作用などから肺に対するセロトニンの作用は血管の収縮や気管支収縮で、肺における換気の調節に関与していることが示唆されている^{3,21}。しかし、胎子期の肺はガス交換を行っておらず、分娩直後の呼吸開始と同時に肺の血管や気管支の拡張が認められることから、セロトニンは胎子期の血管や気管支の平滑筋を収縮させ無気肺の生理機能調節に関与していることも考えられている³。カルシトニンの胎子期の肺に対する作用は明らかでないが、ラットではカルシトニン免疫活性細胞の数が分娩後に減少していたことから出生における呼吸開始過程の調節とも考えられている¹⁴。

コレシストキニンは癌細胞のカルシウムイオンの取り込みを促進することによって、細胞分裂を起こすきっかけを誘発することが報告されており^{8,13}、コレシストキニン免疫活性細胞は、細胞増殖などの肺の発達に関係していることが考えられる。また、頸動脈小体には、神経内分泌細胞と神経終末が複合体を形成した神経上皮小体と同様な形態を示すコレシストキニン免疫活性細胞が存在することから化学受容体としての働きとの関係も示唆されている¹⁰。

肺におけるソマトスタチンの役割も明らかにされていないが、下垂体の培養細胞を用いた実験ではソマトスタチンは細胞膜のカルシウムチャンネルを阻害することにより細胞内カルシウム濃度を高め神経内分泌を誘発することが報告されている¹²。またこのことからソマトスタチンの視床下部や下垂体における、成長ホルモン分泌抑制作用による成長ホルモン分泌調節作用²¹や、ソマトスタチンが実験動物の気管支平滑筋の β -adrenergic function もしくはGタンパクに作用し気管支平滑筋を収縮させる事も報告されており^{22,23}、ソマトスタチン免疫活性細胞は胎子期の肺の発達および分娩前の気管支および血管の平滑筋の収縮などの生理的機能調節を行っていることが本研究からも示唆される。

ボンベシン免疫活性細胞を確認する事はできなかった。しかし、ボンベシン免疫活性を示さない動物種ではコレシストキニン免疫活性細胞の存在すること、ヒトやサルなどでは両ペプチドの免疫活性が認められるが、量的には相反的に存在することからボンベシンとコレシストキニンの二つのペプチドは生理作用に対して相関性を有していることが考えられている¹⁷。

現在神経内分泌細胞の含有物質の胎子期の肺に対する働きは完全に解明されていない。実験動物ではすでに神経内分泌細胞の研究は喘息や酸素過多等の病理的呼吸

器状態における働き^{10,15}や癌細胞との関連も研究されている^{5,8,13,16}が、ウシの肺に関するこれらの研究報告は未だ行われておらず今後、ウシの肺の疾患時における神経内分泌細胞の分布について明らかにすることにより、これらの細胞の生理学的作用についても明らかにするものと期待する。

要 約

ウシ胎子の肺における神経内分泌細胞(セロトニン, カルシトニン, コレシストキニン, ソマトスタチン, ボンベシン免疫活性細胞)を免疫組織化学的方法によって、これらの細胞の出現時期および部位と加齢変化を明らかにし以下のような結果を得た。

- 1) 胎子期のみセロトニン, カルシトニン, コレシストキニン, ソマトスタチンの免疫活性細胞は認められたが、しかしボンベシン免疫活性細胞はどの時期にも認められなかった。
- 2) セロトニン, カルシトニン, コレシストキニンの免疫活性細胞は細気管支から呼吸細気管支までの上皮内のみ認められたが、ソマトスタチン免疫活性細胞は細気管支から呼吸細気管支の粘膜固有層および間質の結合組織中にしか認められなかった。
- 3) 各々の免疫活性細胞の数は胎齢の進行に伴い様々な量的変化を示した。

文 献

- 1) Alfons, T. L., V. Lommel and J. M. Lauweryns, 1993: Ultrastructure and innervation of neuroepithelial bodies in the lungs of newborn cats. *Anat. Rec.*, **236**: 181-190.
- 2) Balaguer, L., J. Romano and P. Ruiz-Pesini, 1992: Localization of serotonin, cholecystokinin and somatostatin immunoreactivity in the lower respiratory tract of embryonic, foetal and postnatal sheep. *Histol. Histopathol.*, **7**: 703-708.
- 3) Becker, K. L. and A. F. Gazdar, 1984: In: *The Endocrine Lung in Health and Disease*, W. B. Saunders, Philadelphia.
- 4) Becker, K. L., K. G. Monaghan and O. L. Silva, 1980: Immunocytochemical localization of calcitonin in Kulchitsky cell of human lung. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **104**: 196-198.
- 5) Bhogal, R., D. M. Smith, P. Purkiss and S. R. Bloom, 1993: Molecular identification of binding sites for calcitonin gene-related peptide (CGRP) and islet amyloid polypeptide

- (IAPP) in mammalian lung: Species variation and binding of truncated CGRP and IAPP. *Endocrinology*, **133**: 2351-2361.
- 6) Ghatei, M. A., M. N. Sheppard, D. J. O'Shaughnessy, T. E. Adrian, G. P. McGregor, J. M. Polak and S. R. Bloom, 1982: Regulatory peptides in the mammalian respiratory tract. *Endocrinology*, **111**: 1248-1254.
 - 7) Hage, E., 1974: Histochemistry and fine structure of endocrine cells in fetal lungs of the rabbit, mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Res.*, **149**: 513-524.
 - 8) Hoosein, M. N., P. A. Kiener, R. C. Curry and M. G. Brattain, 1990: Evidence for autocrine growth stimulation of cultured colon tumor cells by a gastrin/cholecystokinin like peptide. *Exp. Cell Res.*, **186**: 15-21.
 - 9) Hsu, S.-M., L. Raine and H. Fanger, 1981: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580.
 - 10) Nylen, E. S. and K. L. Becker, 1993: Chronic hyperoxia and hamster pulmonary neuroendocrine cell bombesin and calcitonin. *Anat. Rec.*, **236**: 248-252.
 - 11) Rodriguez, A., L. Pena, J. M. Flores, M. Gonzalez and M. Castano, 1992: Immunocytochemical study of the diffuse neuroendocrine system cells in equine lungs. *Anat. Histol. Embryol.*, **21**: 136-145.
 - 12) Scheribbl, H., J. Hesheler and E. O. Riecken, 1993: Molecular mechanisms of somatostatin's inhibition of hormone release: Participation of voltage-gated calcium channels and G-proteins. *Horm. Metab. Res. (Suppl.)*, **27**: 1-4.
 - 13) Sethi, T. and E. Rozengurt, 1991: Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: Effects of bradykinin, vasopressin, cholecystokinin, galanin, and neurotensin. *Cancer Res.*, **51**: 3621-3623.
 - 14) Sissons, M. C. J. and J. R. Gosney, 1985: Pulmonary endocrine cells immunoreactive for calcitonin in the lungs of fetal and neonatal rats. *Thorax*, **40**: 862-865.
 - 15) Stephens, N. L., H. Jiang and A. Halayko, 1993: Role of airway smooth muscle in asthma: Possible relation to the neuroendocrine system. *Anat. Rec.*, **236**: 152-163.
 - 16) Walts, A. E., J. W. Said, I. P. Shintaku and R. V. Lloyd, 1985: Chromogranin as a marker of neuroendocrine cells in cytologic material-An immunocytochemical study. *Am. J. Clin. Pathol.*, **84**: 273-277.
 - 17) Wang, Y. Y. and E. Cutz, 1993: Localization of cholecystokinin-like peptide in neuroendocrine cells of mammalian lungs: A light and electron microscopic immunohistochemical study. *Anat. Rec.*, **236**: 198-205.
 - 18) Wang, Y. Y., D. G. Perrin and E. Cutz, 1993: Localization of cholecystokinin-like and calcitonin-like peptides in infant carotid bodies: A light- and electron-microscopic immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, **272**: 169-174.
 - 19) Wasano, K. 1977: Neuro-Epithelial bodies in the lung of the rat and the mouse. *Arch. Histol. Jpn. (Suppl.)*, **40**: 207-219.
 - 20) Watanabe, H. 1988: Pathological studies of neuroendocrine cells in human embryonic and fetal lung light microscopical, immunohistochemical and electron microscopical approaches. *Acta Pathol. Jpn.*, **38**: 59-74.
 - 21) 矢島治明, 瀬川富朗, 1982: 生体化学情報伝達物質・ペプチド・アミン, 同朋舎, 東京.
 - 22) 山内富美子, 玉置 淳, 堀井さつき, 山脇 功, 磯野一雄, 千代谷厚, 滝沢敬夫, 1992: 気道平滑筋 β -adrenergic function に対するソマトスタチンの影響. *呼吸*, **11**: 332-335.
 - 23) 山内富美子, 玉置 淳, 金野公郎, 1992: ソマトスタチン. *Asthma*, **5**: 76-78.

Summary

Immunohistochemically, we investigated ontogeny and aging of the neural endocrine cell (serotonin, calcitonin, cholecystokinin (CCK), somatostatin and bombesin) of the bovine lung.

The results were as follows:

1. Serotonin-, calcitonin-, CCK- and somatostatin- immunoreactive cells were observed only in the bovine fetus lung. But no bombesin- immunoreactive cells were found in all stages of fetus

and postnatal bovine.

2. Serotonin-, calcitonin- and CCK- immunoreactive cells were found within epithelium from bronchiole to respiratory bronchiole. Somatostatin- immunoreactive cells were found in the connective tissue from bronchiole to respiratory bronchiole.

3. These cells changed in number with fetus aging.