

原 著

成熟ラット腹腔肥満細胞の核における
 ^3H -thymidine のとり込み

村 田 長 芳 百 瀬 由 利 子
吉 田 啓 三 永 田 哲 士

信州大学医学部第一解剖学教室

INCORPORATION OF ^3H -THYMIDINE INTO THE
NUCLEUS OF MAST CELL IN ADULT RAT
PERITONEUM

Fusayoshi MURATA, Yuriko MOMOSE, Keizo YOSHIDA
and Tetsuji NAGATA

Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine,
Matsumoto, Japan

Key words: 肥満細胞 (mast cell)
サイミジン (thymidine)
ラジオオートグラフィー (radioautography)
DNA 合成 (DNA synthesis)
細胞周期 (cell cycle)

Abstract

Mast cells obtained from the intraperitoneal cavities of adult rats were incubated in a medium consisting of Eagle MEM supplemented with 10 % bovine serum and containing 100 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -thymidine for 60 minutes in a CO_2 incubator. After the pellets of the cells were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide, they were embedded in Epon. Thick sections were coated with radioautographic emulsion, Sakura NR-M2, by a dipping method and exposed for 25 days. Then, they were developed and stained with 0.1 % alkaline toluidine blue (pH 9.0). Light microscopically, although most of the mast cells were not labeled (Fig. 1), one mast cell among 294 mast cells incorporated ^3H -thymidine. The labeling index was 0.37 %. In contrast, many labeled cells other than mast cells were found (Fig. 2, 3, 4). Combining with the finding of previous reports and ours (Table 1-2), the problems concerning mitosis and DNA synthesis of mast cell have been discussed from the viewpoint of cell proliferation and cell maturation.

〔 緒 言 〕

生体を構成する細胞をラジオオートグラフィーを用いた細胞動態の面から分類すると、大きく3群に分類することができる。第1のグループは神経細胞、

心筋線維に代表される、生後において全く DNA 合成を行わない細胞群 (stable cell populations) であり、第2のグループは肝臓、腎臓、脾臓の如き実質器官に代表されるわずかに DNA 合成を行なっている細胞群 (growing cell populations) であり、第3の

グループは上皮、リンパ造血組織、辜丸、結合組織等に代表される如く旺盛に DNA 合成を行なう細胞群 (renewing cell populations) である。

肥満細胞は結合組織中に存在する自由遊走細胞の 1 つであるが、DNA 合成の面からこの細胞を検討すると、胎児、新生児の肥満細胞ではある程度の DNA 合成を行なうが^{2,9)}、成熟動物においての DNA 合成はごく稀であるという報告が主体をなしている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。光顕、電顕レベルで有糸分裂像を示した報告はいくつか見られる⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。また顕微分光測光の結果 $4n$ 量の核酸を有する肥満細胞が存在することを見た報告もある¹⁵⁾。しかし、人によっては成熟動物で全然有糸分裂像を見出し得なかったという報告も見られる¹⁶⁾¹⁷⁾。この短報はラジオオートグラフィーを用いての肥満細胞、肥満細胞腫細胞の代謝の研究中、たまたま遭遇した ^3H -thymidine をとりこむ成熟ラット肥満細胞の存在について報告し、あわせて若干の文献的考察を試みるものである。

〔材料および方法〕

体重 180gm の Wistar 系雄成熟ラット腹腔中に PBS (phosphate-buffered saline) を約 15ml 注入。腹壁を 2 分間軽くマッサージし、開腹、腹水を無菌的にとり出し、1,000 rpm、10 分間遠沈し、得られた沈渣を肥満細胞の材料とした。これらの細胞は Eagle MEM に 10% のウシ血清と ^3H -thymidine (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) を含む培養液に浮遊し、炭酸ガスふ卵器で 37°C、5% CO_2 、1 時間培養して標識した。標識終了後、Hanks 液で 2 回洗浄し、0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 緩衝の 2.5% glutaraldehyde¹⁸⁾、1% 四酸化オスミウムで二重固定し、エタノール、アセトンの脱水系列を通し、Epon に包埋した¹⁹⁾。2 μ の厚切切片を LKB ultratome で作成し、スライドガラスに軽く加温してはりつけ、これにさくら NR-M2 乳剤を dipping 法²⁰⁾で適用した。このあと露出は 4°C で 25 日間行ない、SDX-1 現像液で 20°C、5 分間現像、定着、水洗のあと、0.1% トルイジンブルー染色液 (pH 9.0) で 5~10 秒間加温しつつ染色して鏡検した。

〔結 果〕

腹水の沈渣から得られた肥満細胞は、Epon 厚切切片において、アルカリトルイジンブルー染色により美しい metachromasia を示す顆粒を持った大型細胞として容易に確認することができる (図 1~4)。Epon

切片を 5 枚観察して肥満細胞を 294 個見出した。In vitro における ^3H -thymidine 1 時間標識の条件下では、腹腔に存在する上皮性細胞、結合組織性細胞等他種の細胞では ^3H -thymidine のとり込みを示す細胞が多数見られたが (図 2~4)、観察された殆んどすべての肥満細胞には ^3H -thymidine のとり込みは見られなかった (図 1~2)。観察された 294 個の肥満細胞の中でただ 1 つの肥満細胞だけが ^3H -thymidine のとり込みを示していた (図 3)。この細胞は連続切片として 2 枚が観察された。細胞体の最大径は約 14 μm の楕円形を呈し、核は中心に位置し直径 7.5 μm で球形に近く多数の顆粒を有した肥満細胞で、他の肥満細胞に比し、形態的に特に著しく異なった特徴は有していなかった (図 3~4)。銀粒子を計数したところ、この条件下では 18 個であった。

〔考 察〕

以上の結果で得られた ^3H -thymidine の取り込みを示す細胞は、標識した 1 時間の間に S 期に入って DNA 合成を行っていた肥満細胞であると考えられる²¹⁾。その標識率は 0.37% である。現在までに文献として発表されている肥満細胞の有糸分裂、DNA 合成についての報告をまとめて見ると表 1、2 の如くなる。古くから有糸分裂像を示す肥満細胞の存在は報告されており²²⁾²³⁾、特に胎児、新生児において見られやすい傾向にある²²⁾。しかし、化学的発癌剤、たとえば methylcholanthrene のくり返しての皮膚への塗布は数週後に著明な肥満細胞の増加を局所に来すが、それにもかかわらず肥満細胞の有糸分裂像は見られないという報告もされている¹⁶⁾。さらに、強力な分裂抑制剤である colchicine 処理によっても有糸分裂像が腹腔肥満細胞において見られなかったという報告もある¹⁷⁾。しかしまた一方では compound 48/80, histamine その他の処理後、肥満細胞が再生、増殖してくるためには肥満細胞の有糸分裂が必要であるという報告も見られる⁷⁾⁸⁾²⁴⁾。Burton 等は cinematography により肥満細胞が有糸分裂を行っている像を示しているが、彼等の写真は鮮明さの点で問題がある⁹⁾。1960 年代に入ると DNA 合成の形態学的研究に radioautography が用いられるようになって来た。しかし、これらの実験においても標識されている肥満細胞は 0.41%~5.7% とごくわずかで²⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、我々の結果は Walker⁴⁾ の値に最も近い。この低い標識率では実験的条件下での著明な肥満細胞の増加を説明するこ

とはできない。一方 DNA 量に関する顕微分光測光の研究においても 4n に属する肥満細胞の存在が報告されているが、これら細胞は細胞周期の中では G₂ 期に入っているわけであり、それに続く有糸分裂も当然予

想される¹⁵⁾。さらに Combs 等³⁾ のラット胎児肥満細胞についての詳細な研究は、肥満細胞を Stage I~Stage IV までに分類し、Stage I, II に属する肥満細胞は mitotic pool に属し、DNA を合成し、Stage

Table 1 List of literatures on the morphology of mitosis in mast cells

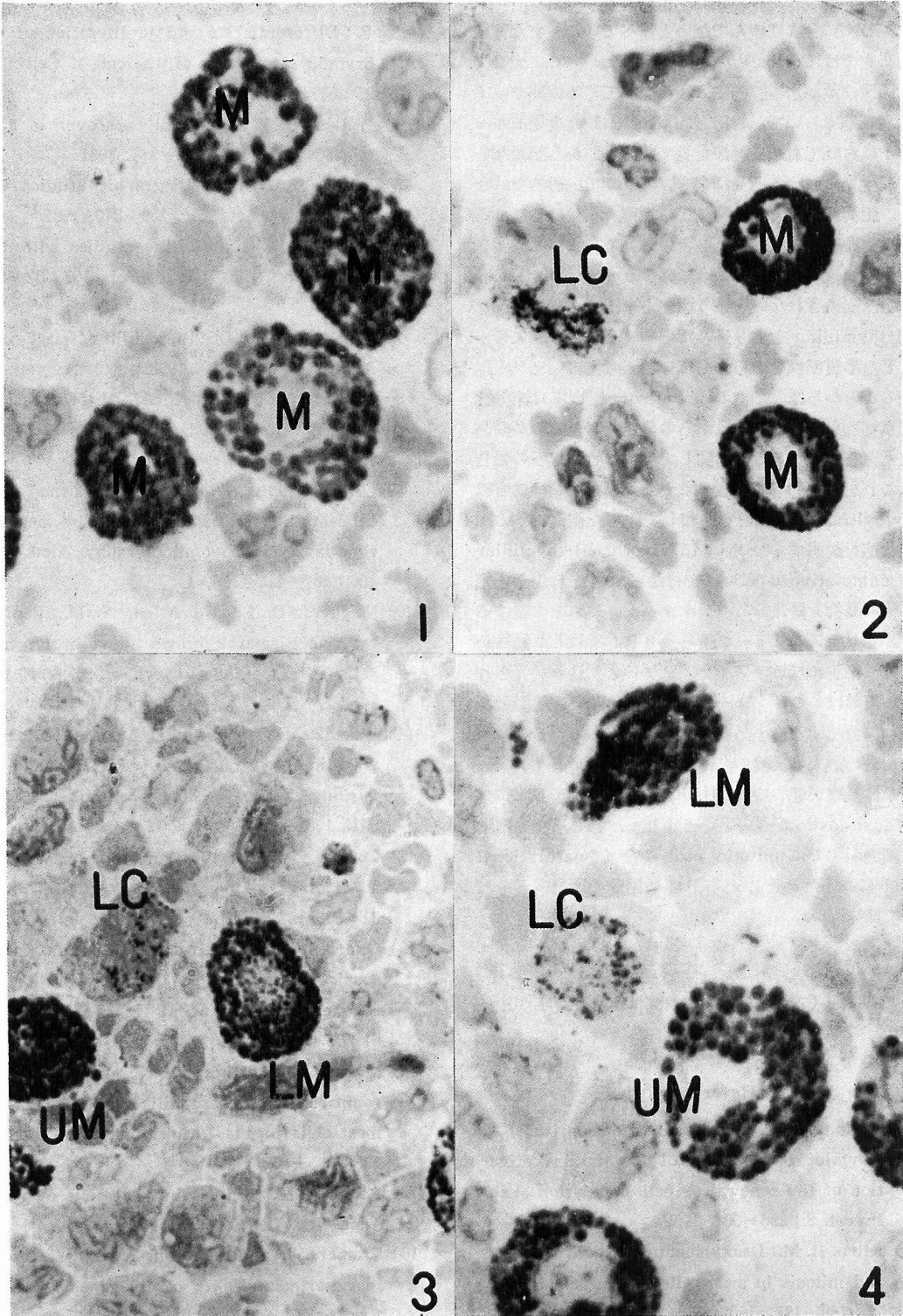
Author	Year	Animal	Age	Microscopy
Nakajima ²²⁾	1928	human, monkey, dog, guinea pig, mouse & rat	young and adult	LM
Michels ²³⁾	1938	—	—	LM
Cramers and Simpson ¹⁶⁾	1944	mouse	adult	LM
Bensley ⁷⁾	1952	—	—	LM
Fawcett ²⁴⁾	1953	rat	adult	LM
Hunt and Hunt ⁸⁾	1957	rat	adult	LM
Burton ⁹⁾	1960	rat	adult	LM
Padawer ¹⁷⁾	1961	rat	young adult	LM
Takeoka et al. ¹¹⁾	1962	rat	adult	LM
Meggers and Allen ¹⁰⁾	1962	rat	30 days	LM
Combs ¹²⁾	1966	rat	embryo	EM
Ohno and Takeoka ¹³⁾	1972	rat	adult	EM
Murata and Spicer ¹⁴⁾	1974	guinea pig	new born	EM

Table 2 List of literatures on histochemistry of DNA content of mast cells

Author	Year	Animal	Age	Method
Walker ⁴⁾	1961	mouse	adult	radioautography
Padawer ⁵⁾	1961	rat	adult	radioautography
Allen ¹⁵⁾	1961	rat	adult	microspectrophotometry
Allen ²⁾	1962	rat	young and adult	microspectrophotometry
Padawer ⁶⁾	1963	rat	adult	radioautography
Combs et al. ³⁾	1965	rat	embryo	radioautography
Enerbäck ²⁵⁾	1976	rat	young and adult	cytofluorometry
Takeoka et al. ²⁶⁾	1976	mouse	adult	radioautography

Explanation of figures

- Fig. 1** Light microscopic radioautogram of four mast cells in the adult rat peritoneal cavity incubated with ³H-thymidine (100 μCi/ml) for 60 minutes in vitro, embedded in Epon and stained with 0.1 % toluidine blue (pH 9.0). No silver grain is observed. ×1900
- Fig. 2** Radioautogram of adult rat peritoneal cells treated as in Fig. 1. Labeled cell (LC) is discernible at the left, while two mast cells (M) remain unlabeled. ×1900
- Fig. 3** Radioautogram of labeled mast cell (LM) seen at the center of the photograph together with another labeled cell (LC) and unlabeled mast cell (UM). ×1600
- Fig. 4** A sequential section from the section shown in Fig. 3. In this plane, silver grains of labeled mast cell (LM) are not detectable. A labeled mast cell (LM), an unlabeled mast cell (UM) and a labeled cell (LC) of Fig. 3 and Fig. 4 correspond with each other. Note that the figures are rotated at 90°. ×1900



Ⅱ, Ⅳに属する肥満細胞は maturational pool に属し, DNA 合成は盛んでないと述べている。また電顕的研究では Combs¹²⁾がラット胎児において, 大野と竹岡¹³⁾は蒸溜水腹腔内注入後再生してくる成熟ラット肥満細胞において, 村田と Spicer¹⁴⁾は新生児モルモットにおいて有糸分裂像を見ている。しかし胎児ないし新生児における所見は特殊なもので一般的ではなく, 肥満細胞の有糸分裂による増殖を裏付けるには既述の標識率では十分でないと思われる。また顕微蛍光測光の最近の研究では加齢に伴う polyploidization は余り観察されないという報告もある²⁵⁾。Walker は ³H-thymidine をとり込んだ細胞は DNA 合成よりもむしろ形質転換をあらわしていると考えている⁴⁾。以上のことから肥満細胞の precursor としては未分化間葉細胞を想定し, これからの分化を考えるのが妥当と考えられる。この点に関して最近の竹岡等²⁶⁾の報告はこれを比較的うまく説明している。彼等は皮膚に methylcholanthrene を塗布して作った肥満細胞の増殖状態を説明するために in vivo で ³H-thymidine の cumulative labeling を行なった。それから一定日後に動物を屠殺し, ラジオオートグラムを作製すると, ラジオアイソトープ投与後3日して殺した動物から肥満細胞にラジオアイソトープのとり込みが見られた。彼等はこのインターバルが未分化間葉細胞が肥満細胞に分化する最小必要時間であるとしている。本実験を含め過去の実験の多くにおいてラジオアイソトープの標識率が低いのは ³H-thymidine から DNA への turn over が遅いというよりも, むしろ多くの肥満細胞がすでに mitotic pool になく maturational pool にあるためと考えられ, 竹岡等の所見²⁶⁾とあわせて興味深い。

本論文の要旨の一部は国際ラジオオートグラフィック会議(スウェーデン, ウプサラ, 1977年5月22日~25日)で発表される。

References

- 1) Leblond, C. P., Messier, B. and Kopriwa, B.: Thymidine-³H as a tool for the investigation of the renewal of cell population. *Lab. Invest.* 8: 296-308. 1959
- 2) Allen, A. M.: Deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in mast cells of rat. *Lab. Invest.* 11: 188-191. 1962
- 3) Combs, J. W., Lagunoff, D. and Benditt, E. P.: Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *J. Cell Biol.* 25: 577-592. 1965
- 4) Walker, B. E.: Mast cell turn-over in adult mice. *Nature* 192: 980-981. 1961
- 5) Padawer, J.: Autoradiographic studies with mast cells. *Anat. Rec.* 139: 343. 1961
- 6) Padawer, J.: Quantitative studies with mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103: 87-138. 1963
- 7) Bensley, S. H.: On the origin of mast cells. *Anat. Rec.* 112: 310. 1952
- 8) Hunt, T. and Hunt, E. A.: Mitotic activity of mast cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 166-169. 1957
- 9) Burton, A. L.: The fate of normal mast cells studied in tissue culture by means of time lapse cinephotomicrography. *Anat. Rec.* 136: 407-412. 1960
- 10) Meggers, D. E. and Allen, A. M.: Feulgen reaction-Bismarck brown: a stain for mast cells in mitosis. *Stain technol.* 37: 221-224. 1962
- 11) Takeoka, O., Angevine, D. M. and Lalich, J. J.: Stimulation of mast cells in rats fed various chemicals. *Am. J. Pathol.* 40: 545-554. 1962
- 12) Combs, J. W.: Maturation of rat mast cells: an electron microscope study. *J. Cell Biol.* 31: 563-575. 1966
- 13) Ohno, S. and Takeoka, O.: Electron microscopic observation on the maturation of regenerating mast cells. *Tr. Soc. Path. Jap.* 61: 75. 1972
- 14) Murata, F. and Spicer, S. S.: Ultrastructural comparison of basophilic leukocytes and mast cells in the guinea pig. *Am. J. Anat.* 139: 335-352. 1974
- 15) Allen, A. M.: Mitosis in mast cells of a rat. *Anat. Rec.* 139: 13-21. 1961
- 16) Cramer, W. and Simpson, W. L.: Mast cells in experimental skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 4: 601-606. 1944

- 17) Padawer, J. : Effect of colchicine related substances on the morphology of peritoneal mast cells. *J. Nat. Cancer* 25 : 731-746. 1960
- 18) Sabatini, D. D, Bensch, K. and Barnett, R. J. : Cytochemistry and electron microscopy : the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17 : 19-58. 1963
- 19) Luft, J. H. : Improvement in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409-414. 1961
- 20) 永田哲士, 柴田 治, 名和橙黄雄 : ラジオオートグラフ多量作製のための簡便法. *解剖学雑誌*, 42 162-166, 1967
- 21) Edward, J. L, Koch, A. L, Youcis, P, Freese, H. L, Laite, M. B. and Donalson, J. T. : Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7 : 273-282. 1960
- 22) Nakajima, Y. : Studien über Gewebsmastzellen. *Tr. Soc. Path. Jap.* 18 : 150-156. 1928
- 23) Michels, N. A : The mast cells. In "handbook of hematology" 1 : pp.232-372, Ed. Downey, H., Hoeber, New York, N. Y, 1938
- 24) Fawcett, D. W. : Experimental studies on the regeneration of mast cells. *Anat. Rec.* 115 : 305. 1953
- 25) Enerbäck, L. : Quantitative studies of 5-hydroxytryptamine, heparin and DNA of mast celles in relation to body growth. *J. Cell Biol.* 70 : 269a. 1976
- 26) Takeoka, O, Ashihara, T. and Tada, N. : ^3H -thymidine labeled mast cells in mice treated with 20-methylcholanthrene : proliferation of precursor cells, their transformation into mast cells and migration of the latter. *Acta path. Jap.* 26 : 693-702. 1976

(52. 4. 8 受稿)