

諸種の実験的条件下における マウス小腸粘膜上皮細胞総数の変動

岡山大学医学部第一解剖学教室（指導：尾曾越文亮教授）

国立岡山病院（指導：日下連院長）

専攻生 稲葉 亮 一

〔昭和44年6月27日受稿〕

I. 緒 言

腸管粘膜を被覆する上皮細胞の増殖がきわめて活潑である事はよく知られている。

Leblond と Stevens (1948)¹⁾ のラットにおける腸粘膜上皮細胞の更新 (turnover) に関する研究によると、Lieberkühn 陰窩は上皮細胞が活潑に増殖する部位であつて、そこで増殖した新生上皮細胞は絨毛の先端に向つて移動し、遂には絨毛の先端から腸の管腔内に放出される。そして上皮細胞の新生から管腔内に放出される迄に要する時間 (更新時間, turnover time) はラットの十二指腸では1.57日、回腸では1.35日にすぎないといわれている。吾々の教室で塩田 (1961)²⁾ がラットについて追試した成績も略々同様で、上皮細胞の更新時間は十二指腸や空腸では約2日、回腸では1.7日という値が得られた、この様に腸管粘膜における上皮細胞の増殖が活潑である事から上皮細胞の増殖が何らかの因子によつて抑制されると上皮細胞の総数が減少し、その結果として絨毛の長さが著しく短くなるはずである。実際に餓餓ラットでは上皮細胞の増殖が妨げられる結果、上皮細胞の数が減少する事が知られている (Hooper と Blair, 1958)³⁾。又、X線全身被曝後における所謂 "Intestinal Death" という現象は大量のX線被曝による上皮細胞の分裂阻止効果によつて腸管粘膜上皮細胞の減少が甚だしく、遂には粘膜を全面的に被覆する事が出来なくなり、腸管内細菌の血行内移行による敗血症をひきおこす結果とされている (Bond, 1969)⁴⁾。その他に悪性腫瘍の化学療法によつても腫瘍細胞の増殖のみならず正常細胞のそれも抑制される結果、腸管粘膜上皮細胞の数が著減する事が推定される。しかしながら上記のいずれの場合でも、腸管粘膜上皮細胞がどれだけ減少するかという定量的 (又は準定量的) な研究はほとんどなされていない。

さきに吾々の教室の平田 (1961)⁵⁾ は、マウスとラットについて腸管の小断片を Ranvier の $1/3$ エチルアルコール水にひたして上皮細胞を粘膜から剝離し、均等に分散した上皮細胞の懸濁液を作り、それについて血球計算板を用いて小腸及び大腸全域の上皮細胞の総数の概算を試みた。本研究ではマウスの小腸粘膜全域から平田の方法によつて上皮細胞を分離してその総数を概算し、諸種の実験的条件 (餓餓、X線全身照射及び抗癌物質の投与) における上皮細胞総数の変動を追求した。

II. 実験材料と方法

1) 実験動物：実験には本学マウスコロニーから供給された体重 20g 内外の Db 系マウス (雄) を用いた。

2) 小腸粘膜上皮細胞の分離：マウスを頸動脈切断によつて殺した後開腹し腸管全域を取出す。小腸を切り離してその長さを測つてから生理的食塩水中で腸間膜附着線を切開した後、長さ 2~3cm 宛の断片に切り離して生理的食塩水を入れた密栓可能な容器に移し、軽く振盪して腸内容物を除去する。粘膜面から汚物が無くなると、断片の水分を切つてあらかじめ用意しておいた Ranvier の $1/3$ エチルアルコール水 50ml の中に小腸断片の全部を投入し、密栓して 20~30°C に保ちながら約3時間放置する。その後、あらかじめ 40°C に加温した生理的食塩水 20ml 中に断片を移し、密栓後、強く振盪して上皮細胞を分離せしめる。通常 5~6 回の振盪で生理的食塩水が白く濁るが、懸濁液には多くの上皮細胞塊が混在する。およそ1分間振盪すると、肉眼的には均一な懸濁液が得られるが、少数ながら上皮細胞が腸陰窩を形成したまま出現することがある。振盪を強く3分間行えば、この様な細胞塊の混在しない上皮細胞の懸濁液が得られる。この様な場合には、上皮細胞を分離した後の小腸断片から切片標本を作つ

て見ると、絨毛部は勿論陰窩部の上皮細胞もすべて離脱していた。以上はさきに平田 (1961)⁶⁾ の報告した方法と略々同様である。なお本法によつて分離した上皮細胞の拡散状況や粘膜からの上皮細胞の離脱状況は平田の論文附図 (写真 1~3) に示されているので、ここでは省略する。

3) 上皮細胞数の算定:

上皮細胞懸濁液 20ml の中から正確に 4ml をとり、40°C に加温した生理的食塩水 16ml を加え、よく混和して 5 倍希釈液を作る。この希釈液から 1 滴をとつて血球計算板に注入して位相差顕微鏡下 (倍率×200) で上皮細胞の数を数える。上皮細胞には完全な形のもの以外に破壊された細胞が混在するが、それはきわめて小数で算定値に大きな影響を及ぼす事は無い。又、上皮細胞の他に、円形、手鏡状、又は、ひょうたんの形をした小型細胞で核構造も核網が疎剛で明らかに上皮細胞とは異なるものが出現する。これはリンパ球とみなされるもので、上皮細胞とは区別して数えねばならぬ。なお、本研究では、その様なリンパ球の算定はしなかつた。

4) 餓餓, X線全身照射及び抗癌物質投与の条件:

餓餓マウス群 (20匹) には水は自由に飲ませたが、食物は全然与えなかつた。餓餓の途中、とも喰いを避けるために、アルミニウムの隔壁を用いて、マウスを 1 匹宛分離して観察した。

X線被曝マウス (19匹) における X線全身照射の条件は次の如くである。

東芝深部治療機械装置:

電圧 200KV, 電流 6mA, 濾過板 0.7mmCu+0.5mmAl, 焦点距離 30cm 1 分間線量は 50r でマウスの被曝線量は 600r である。

マウスの LD₅₀/30 日は 500~530r とされているので、これよりも上記の線量はやや多い。抗癌物質としては、抗生物質でもある Mitomycin, アルキル化剤である Endoxan と Thio-TEPA をマウスの腹腔内に投与したが、その投与量は夫々 5mg/kg, 160mg/kg, 15mg/kg で、いずれも LD₅₀/30 日内外の投与量である。

III. 正常マウスにおける小腸粘膜上皮細胞の総数概算

体重 20g 内外 (平均 21.6±4.9g) のマウス 10 例について調べた結果は表 1 に示す通りである。表に

見られる様に小腸の長さは平均 37.4±0.85cm で、個体差は少ないが、小腸粘膜から分離した上皮細胞

表 1 正常マウスにおける小腸粘膜上皮細胞の総数

マウス番号	体重 (g)	小腸の長さ (cm)	小腸粘膜上皮細胞の総数 (×10 ⁶)
1	21.5	32	189
2	20.2	40	132
3	22.5	36	164
4	24.0	35	237
5	20.0	34	21
6	20.0	37	918
7	21.2	40	832
8	20.6	38	036
9	24.2	40	327
10	21.3	36	028
M ± S. E.	21.6 ± 0.49	37.4 ± 0.85	254 ± 23.8

の総数は平均 (25.4±23.8)×10⁶, 最小値は 132×10⁶, 最大値は 363×10⁶ で、かなり著しい個体差を示した。さきに平田 (1961)⁶⁾ が略々同じ体重 (21.5×0.31g) の d. d. 系マウス 14 例について調べた結果は、小腸粘膜上皮細胞総数が平均 (28.5±3.90)×10⁶ で、著者の得た結果と略々同じであるが、著者が調べた Db 系マウスでは個体差が d. d. 系マウスより著しく大きい。これはマウスの系統差とみなされる。

IV. 餓餓マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動

マウスに水のみあてて絶食させると体重は漸減して 5 日間に正常値の約 60% に低下した。小腸粘膜上皮細胞の総数は漸減して正常値の約 1/6 に低下し

表 2 餓餓マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動

経過日数	実験に用いたマウスの数	小腸粘膜上皮細胞総数 (×10 ⁶)			体重減少率 (平均値, %)
		平均値	最小値	最大値	
0*	10	254	132	363	0
1	4	105	84	132	13.5
2	4	131	126	138	29.7
3	4	78	69	84	23.2
4	4	50	45	54	35.6
5	4	42	39	42	43.0

* 対照正常マウス

た(表2, 図1). 緒言で述べた様に腸陰窩は上皮細胞が活潑に増殖する部位であって, そこで増殖した新生上皮細胞は絨毛の先端から腸の管腔内に放出される(Leblond と Stevens, 1948). さきにわれわれの教室の松尾(Matsuo, 1957)⁶⁾は d. d. 系マウスを5日間餓餓せしめると, 腸陰窩における上皮細胞の分裂像の出現頻度が正常値の半分以下に低下する事を観察した. 又, Stevens Hooper と Blair(1957)³⁾は同じく5日間絶食させたラットで腸陰窩における上皮細胞の分裂頻度が20%以上減少する事を報告している. この様な先人の観察と本実験の結果から餓餓によって上皮細胞の増殖が著しく抑制されるために, その新生と古くなつた細胞の放出(絨毛の先端から管腔内への放出)との間の均衡が破れて上皮細胞総数の著減をひきおこすと考えられる.

V. X線全身照射マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動

マウスにX線全身照射(線量600r, 1回照射)を行なうと, 小腸粘膜上皮細胞の総数は急激に減少して照射の翌日には正常値の約1/5となり, 照射後5~7日目にかけておおよそ1/5に低下するが, 9日目から正常値の略々1/5の水準にもどつた(表3, 図1). この様な結果と餓餓の場合とを比較して見ると上皮細胞総数の減少の程度は略々同じでも, X線

表3 X線全身被曝マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動(被曝線量600r, 被曝回数1)

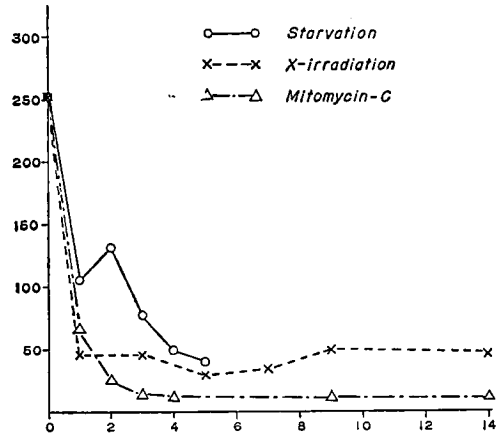
経過 日数	実験に用 いたマウ スの数	小腸粘膜上皮細胞総数 ($\times 10^6$)			体重の 減少率 (平均値, %)
		平均値	最小値	最大値	
0*	10	254	132	363	0
1	3	47	45	51	11.7
3	3	47	42	51	7.3
5	3	31	39	48	3.7
7	3	35	24	42	0
9	3	50	42	63	4.7
14	4	47	42	57	0

* 対照マウス

照射の場合には減少がきわめて急激におこる事が目立つ. これはX線による上皮細胞の増殖抑制が存在する他に, 上皮細胞が破壊される事を示唆する. 事実, 腸陰窩にはしばしば死滅した上皮細胞の核の破片が認められたが絨毛の上皮には崩壊像は認められなかつた. なお, X線全身照射の場合にはマウスの

体重がごく軽度に減少したにすぎず(最高11.7%), 体重の減少率が40%を越える餓餓の場合とはこの点で著しく異なる.

図1. マウス小腸粘膜上皮細胞の餓餓, X線全身照射及びMitomycin-C腹腔内投与による変動. X線全身照射の線量600r, Mitomycin-Cの投与量5mg/kg



VI. 抗癌物質腹腔内投与マウスにおける小腸粘膜細胞総数の変動

本実験では抗癌抗生物質の代表としてMitomycin-Cを, 抗癌アルキル化剤の代表としてEndoxanとThio-TEPAを, マウスの腹腔内に投与して腸粘膜上皮細胞の総数の変動を調べた. 薬剤の投与量はいずれも600rのX線全身照射にほぼ匹敵する量(LD₅₀/30日内外)とした.

1. Mitomycin-Cの腹腔内投与

Mitomycin-C腹腔内投与マウス(投与量5mg/kg, 投与回数1回)における小腸粘膜上皮細胞総数の変

表4 Mitomycin-C腹腔内投与マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動(投与量5mg/kg, 投与回数1)

経過 日数	実験に用 いたマウ スの数	小腸粘膜上皮細胞総数 ($\times 10^6$)			体重の 減少率 (平均値, %)
		平均値	最小値	最大値	
0*	10	254	132	363	0
1	3	67	48	69	0.3
2	4	26	18	33	10.0
3	8	14	9	21	11.4
4	4	12	3	18	10.5
9	3	12	6	18	7.4
14	3	12	9	18	2.7

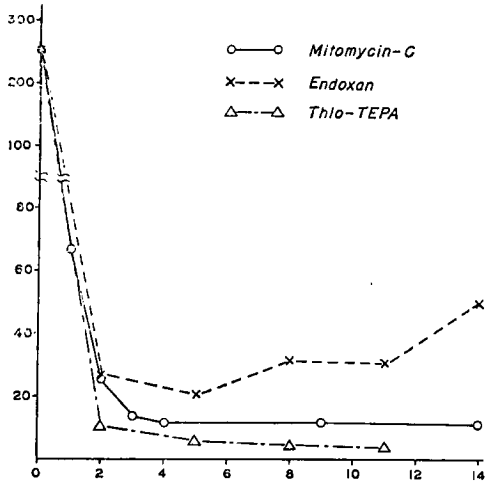
* 対照正常マウス

動は、表4及び図1、2に示す通りである。小腸粘膜上皮細胞は600rのX線全身照射におけると同様に急激に減少して投与後2日目には正常値の $1/10$ 近くに低下し、4日目には約 $1/20$ となり、14日目迄その様な低値に保たれた。ここで注目すべき事は、X線照射の場合に比較すると小腸粘膜上皮細胞総数の減少度が強く、その最小値(12×10^6)はX線照射のそれ(31×10^6)のおよそ $1/3$ に迄低下することである。X線全身照射後小腸粘膜上皮細胞総数が正常値の $1/10$ 以下に減少するような場合には、マウスは死亡するのが普通であるが、Mitomycin-C投与の場合には腸管粘膜上皮細胞の総数が正常値の $1/10$ 以下に減少してもなお生存し得る事は注目に値する。これはX線照射の場合には免疫能の低下と、腸管粘膜の上皮細胞による不完全な被覆とによって腸内細菌の血行内移入による敗血症をひきおこし易いが、Mitomycin-C投与の場合には腸内細菌に対する薬剤の抗菌作用によつて感染が予防され、マウスは死をまぬがれると考えられる。

2. Endoxan の腹腔内投与：

Endoxan (160mg/kg) を1回マウス腹腔内に投与した場合における小腸粘膜上皮細胞総数の変動(表5, 図2)は、Mitomycin-C 腹腔内投与の場合と略

図2. 3種の抗癌物質(Mitomycin-C, Endoxan 及び Thio-TEPA) 腹腔内投与(1回)による小腸粘膜上皮細胞総数の変動の比較。投与量：Mitomycin-C 5mg/kg, Endoxan 160mg/kg Thio-TEPA 15mg/kg



々同様であるが、上皮細胞総数の減少の度がやや弱く、投与後5日目に最低値(21×10^6)を示した。しかしその後軽度に増加し14日目には 50×10^6 の水

表5 Endoxan 腹腔内投与マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動(投与量, 160mg/kg, 投与回数1)

経過日数	実験に用いたマウスの数	小腸粘膜上皮細胞総数 ($\times 10^6$)			体重の減少率 (平均値, %)
		平均値	最小値	最大値	
0*	10	254	132	363	0
2	3	27	24	30	3.6
5	3	21	18	24	4.3
8	3	32	27	36	0
11	3	31	24	48	0
14	3	50	24	63	0.6

* 対照正常マウス

準に回復した。このような結果から Endoxan の上皮細胞に対する作用は Mitomycin-C のそれより著しく弱いといえる。

3. Thio-TEPA の腹腔内投与：

Thio-TEPA (15mg/kg) をマウス腹腔内に投与した場合には小腸粘膜上皮細胞総数が Mitomycin-C の腹腔内投与の場合よりも更に激しく減少し、その最低値は正常値のおよそ $1/80$ となつた(表6, 図2),

表6 Thio-TEPA 腹腔内投与マウスにおける小腸粘膜上皮細胞総数の変動(投与量 15mg/kg, 投与回数1)

経過日数	実験に用いたマウスの数	小腸粘膜上皮細胞総数 ($\times 10^6$)			体重の減少率 (平均値, %)
		平均値	最小値	最大値	
0*	10	254	132	363	0
2	3	11	6	15	0
5	3	6	3	9	0
8	3	5	3	6	8.0
11	3	5	3	5	10.7

* 対照正常マウス

このような場合でもマウスは少数ながら生存しえた事は興味深い。

なお、抗癌物質の腹腔内投与の場合には、体重の減少率はわずかであつた(最高 11.4%)。これはX線全身照射の場合と全く同様である。その他、X線全身照射の場合と同様に小腸陰窩にはしばしば上皮細胞の核崩壊像が認められた。この事は抗癌物質投与の場合にも上皮細胞の分裂抑制効果がある他に増殖性上皮細胞の崩壊がかなり高度におこる事を示す。

Ⅶ. 総括と考按

本実験の結果からマウスの小腸粘膜上皮細胞総数が饑餓の場合には正常値の約 $1/6$ に、X線全身被曝の場合には正常値の $1/8$ 、そして抗癌物質投与の場合には正常値の約 $1/20$ (Thio-TEPA 投与の場合には正常値のおよ $1/80$)迄減少する事がわかった。上述の諸条件下では腸管、とくに小腸における粘膜上皮細胞の増殖が高度に抑制されるために絨毛の高さが低くなる事はよく知られていたが、本実験によつて小腸腸粘膜の上皮細胞総数が上述の実験条件下では予想外に高度に減少する事が始めて明らかにされた。従来饑餓やX線全身照射によつて細胞の population が最も高度に減少する組織は胸腺と考えられて来た。ラットに就いて饑餓による組織のDNA含量の減少率を調べて見ると、それぞれ正常に対して胸腺では約 $1/6$ 、リンパ節ではおよそ $1/2$ 、脾では約 $1/4$ 、骨髄では約 $1/4$ に低下するに対して肝では殆んど減少しない(門田, 1955)⁷⁾。マウスに就いても略々同様の成績が得られている。上に述べた様に、饑餓の場合には小腸粘膜上皮細胞の総数の減少率は正常値のおよ $1/6$ であるから、減少率については胸腺のそれに匹敵する。これは注目に値する知見で内外の刺戟、とくにストレス刺戟に対して小腸粘膜上皮が胸腺と同様に鋭敏に反応する事を示唆する。上述の諸条件のもとで小腸粘膜上皮細胞の総数が著減する主な原因は腸陰窩における上皮細胞の分裂能の抑制であるが、X線全身照射や抗癌物質投与の場合には小腸粘膜の上皮細胞総数がきわめて急激に減少する事や、小腸陰窩にはしばしば上皮細胞の核の崩壊像が認められることから、増殖性上皮細胞の死滅、崩壊がかなり高度におこる事が推定される。X線全身照射の場合と抗癌物質とくに抗癌性抗生物質である Mitomycin-C 投与の場合とを比較すると、前者の場合には腸粘膜上皮細胞総数の最少値が 31×10^6 であつたのに対して、Mitomycin-C 腹腔内投与の場合には最少値が 12×10^6 で前者の値の $1/3$ に近い。この様な著しい差違は抗生物質である Mitomycin-C の腸内細菌に対する抗菌作用に帰すべきものと考えられる。緒言で述べた様にX線全身照射によつて腸管粘膜上皮が高度に減少すると、腸内細菌が血行内に移行してしばしば敗血症をひき起して動物は死亡する。この様な腸内細菌による感染が Mitomycin-C によつて防止されるものと推定される。Thio-TEPA にも Mitomycin-C に匹敵する抗

菌作用がある様に思える。

Ⅷ. 結 語

マウス (Db 系体重 20g 内外雄) の小腸を Ranvier の $1/3$ エチルアルコールに没す事によつて上皮細胞を小腸粘膜から分離して均等に分散した上皮細胞の懸濁液を作り、小腸粘膜全域の上皮細胞総数を概算した。そして、それが諸種の実験的条件(饑餓、X線全身照射及び抗癌物質の腹腔内投与)の下でどの様に変動するかを調べた。主要な実験成績は次の如くである。

1) マウスに水のみを与えて絶食させると、体重は漸減して5日間に正常値の約60%となり、小腸粘膜上皮細胞総数も漸減して5日間に正常値の約 $1/6$ に低下した。饑餓による細胞の population の減少は胸腺において最も著しく、その減少率は正常値の略々 $1/6$ 、骨髄と脾では正常値の約 $1/4$ 、リンパ節では正常値のおよ $1/2$ で、小腸粘膜における上皮細胞総数の饑餓による減少率は胸腺のそれに匹敵する。

2) マウスにX線全身照射(線量600r, 1回照射)を行つた場合には、小腸粘膜の上皮細胞総数は急激に減少して照射の翌日には正常値の約 $1/6$ となり、照射後5~8日にかけて正常値のおよ $1/8$ に低下したが、9日目から軽度ながら回復の傾向が認められた。

3) Mitomycin-C (5mg/kg) をマウスの腹腔内に投与(投与回数1回)すると、小腸粘膜上皮細胞の総数は急激に減少し、投与後2日目には正常値の $1/10$ 近くに低下し、4日目には約 $1/20$ となり、14日目迄その様な低値が保たれた。

4) Endoxan (160mg/kg) をマウスの腹腔内に投与(投与回数1回)した場合には、小腸粘膜の上皮細胞総数が Mitomycin-C 投与の場合と同様に急激に減少したが、その最底値はやや高く(正常値の約 $1/8$)、8~14日目にかけて軽度に増加した。

5) Thio-TEPA (15mg/kg) をマウスの腹腔内に投与(投与回数1回)すると、小腸粘膜上皮細胞の総数が Mitomycin-C 投与の場合より更に激しく減少し、その最底値は正常のおよ $1/80$ となつた。

6) 上述の諸条件のもとで小腸粘膜上皮細胞の総数が著減した主な原因は、小腸陰窩における上皮細胞の分裂能の抑制であるが、X線全身照射や抗癌物質投与の場合には小腸陰窩における増殖性上皮細胞の死滅、崩壊がかなり高度におこる様である。

文 献

- 1) Leblond, C. P. and C. E. Stevens: The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *Anat. Rec.*, 100: 357—377, 1948.
- 2) 塩田一郎: 上皮細胞の増殖に関する研究. I. 消化管粘膜上皮細胞の増殖. *山口医学*, 10: 477—482, 1961.
- 3) Stevens Hooper, C. and M. Blair: The effect of starvation on epithelial renewal in the rat duodenum. *Exp. Cell Res.*, 14: 175—181, 1958.
- 4) Bond, V. P.: The gastrointestinalsyndrome. In: *Comparative Cellular and Species Radiosensitivity* (Bond, V. P. and T. Sugahara, ed.), pp. 235—240, Igaku Shoin Ltd., Tokyo, Japan, 1969.
- 5) 平田陽三: 腸粘膜より分離した上皮細胞ならびに上皮内リンパ球の総数概算. 第1編正常マウスにおける成績. *山口医学*, 10: 523—526, 1961.
- 6) Matsuo, M.: Lymphocytes in the intestinal epithelium of starved and of X-irradiated mice. *Okajimas Fol. anat. jap.*, 30: 331—338, 1957.
- 7) 門田可宗: デソキンペントーズ核酸 (DNA) 定量による白鼠胸腺, 淋巴組織の含有淋巴球総数概算. *日血会誌*, 18: 617—624, 1955.

Variations in the Total Number of Epithelial Cells Isolated from the Mucosa of Small Intestine in Mice under Various Experimental Conditions.

by

Ryoich INABA

Department of Anatomy (First Division),
Okayama University Medical School
(Director: Prof. B. Osogoe)
and Okayama National Hospital
(Director: Dr. M. Kusaka)

In an attempt to study variations in the size of epithelial cell populations in the intestinal mucosa, these cells were isolated from the mucosa of small intestine of male mice (Db strain) weighing around 20g, by the use of Ranvier's $\frac{1}{3}$ ethylalcohol, and the total number of epithelial cells was estimated under various experimental conditions, after counting these cells by the hemocytometer. The chief results obtained are as follows:

1. In the mice fasted for 5 days, the total number of epithelial cells isolated from the mucosa of small intestine was gradually decreased, reaching to a minimum value of about $\frac{1}{6}$ of the normal levels at 5 days.

2. Following total-body x-irradiation in a dose of 600 r, the total number of epithelial cells in the small intestine was reduced abruptly and a minimum value of about $\frac{1}{8}$ of the normal levels was reached within several days.

3. In mice that received a single intraperitoneal injection of either Mitomycin-C, Endoxan, or Thio-TEPA, in a dose of 5 mg/kg, 160 mg/kg, 15 mg/kg, respectively, the size of epithelial cell populations in the small intestine was rapidly diminished in a manner similar to that observed after total-body X-irradiation. However, the rate of reduction in the epithelial cells populations was greater in these cases than in the case of X-irradiation, except for in the case of treatment with Endoxan.

4. The observed reduction in the size of epithelial cell populations of the small intestine is due chiefly to inhibition of mitosis of epithelial cells in the crypts and partly to destruction of proliferating epithelial cells in these areas.