

# ラット遠位結腸における、セロトニンを含有する 腸クロム親和細胞の形態

坂本宏史<sup>1)</sup>、藏本博史<sup>2)</sup>、門脇真<sup>3)</sup>

## Serotonin-containing enterochromaffin cells with long processes in rat distal colon

Hiroshi Sakamoto<sup>1)</sup>, Hirofumi Kuramoto<sup>2)</sup> and Makoto Kadowaki<sup>3)</sup>

### 抄 録

免疫組織化学法と電子顕微鏡観察によってラット遠位結腸の特徴的な形態を持つセロトニン含有する腸クロム親和細胞 (EC 細胞) について調べた。セロトニンに対する特異抗体によって免疫組織化学反応を示す EC 細胞が、結腸の陰窩を構成する細胞の一部に観察された。EC 細胞の多くは紡錘形を呈し、2本の細胞質性の長い突起を、陰窩側壁に添って、上方すなわち結腸の管腔側と、下方 (陰窩の底部、結腸壁の平滑筋層側) に伸ばしていた。多くの場合、上方の突起の先端は、陰窩側壁を外側から貫き陰窩内腔に接触していた。またときおり EC 細胞の突起は、神経細胞の軸索突起のような、膨みが数珠状に連なる外観を呈した。電子顕微鏡では、EC 細胞の細胞体や突起の中に、細長い特徴的な顆粒が観察された。また EC 細胞体およびその突起は、別の陰窩の壁細胞 (吸収上皮細胞や、杯細胞) としばしば接触しており、その際は EC 細胞内に、接触する相手の壁細胞に向かって、顆粒の集合が見られた。したがって EC 細胞は、細胞体や長い突起から、セロトニンを傍分泌の様式で、周囲の壁細胞に作用させ、壁細胞から腸管内腔への、電解質や、粘液、水の分泌を促していると考えられる。ラット遠位結腸では、セロトニンに誘発される、結腸壁からの電解質や粘液などの分泌は、EC 細胞の持つ長い突起の関与が重要であることが示唆された。

キーワード：EC 細胞  
セロトニン  
免疫組織化学  
結腸  
ラット

Short running title：ラット遠位結腸におけるセロトニン含有 EC 細胞

1) 健康科学大学理学療法学科 2) 京都工芸繊維大学応用生物学講座

3) 富山大学和漢医薬学総合研究所消化管病態生理学部門

1) Department of Physical Therapy, Health Science University, Yamanashi, Japan; 2) Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto; and 3) Division of Gastrointestinal Pathophysiology, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama

## 1. はじめに

消化管内のセロトニンは、哺乳類の消化管全体に認められる生体アミンであり、ほとんどは腸クロム親和細胞 (EC 細胞) に由来する<sup>10,16)</sup>。通常、腸管において、セロトニンは、電解質・粘液の分泌や、消化管運動に、メディエーターとして重要な役割を果たしている<sup>3,5,11,25)</sup>。またヒトにおける、カルチノイド症候群、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群などの疾病時や、動物疾病モデルにおいて、結腸 EC 細胞内でのセロトニン含有量に変化が生じ、その結果、下痢が引き起こされると考えられている<sup>4,6,18)</sup>。すなわち、EC 細胞からの異常なセロトニン放出によって、結腸吸収上皮細胞から水分や電解質が多量に分泌されることが、下痢の重要な原因になると考えられる。結腸には、腸管上皮の分泌に関わるセロトニンを含有する EC 細胞が、多数観察されることも報告されている<sup>23)</sup>。

この研究では、薬理的に、セロトニンと腸管上皮細胞からの分泌反応との関係が従来調べられてきたラットの結腸で、形態学的に、セロトニン含有細胞の特徴と、腸上皮細胞との関係を調べた。その結果、多くのセロトニンを含有する EC 細胞が、細胞質性の長い突起を遠位結腸の上皮内に伸ばしていることが分かった。この報告では、セロトニン含有 EC 細胞の分布と長い突起を持つ特異的な形態を、免疫組織化学法と電子顕微鏡を用いて観察し、機能的役割を考察した。

## 2. 材料と方法

オスのウィスターラット (体重210-230 g) を、深麻酔下に心臓から生理的食塩水に続いて、2%パラホルムアルデヒドと飽和 (15%) ピクリン酸を含む溶液で灌流固定した。遠位結腸を切り出し、12-18時間同じ固定溶液中で追加固定した。dimethylsulphoxide (DMSO) で処理した後、リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した。30% sucrose と 0.1%  $\text{NaN}_3$  を含むリン酸緩衝液に 4℃、一晚浸漬後、60-80  $\mu\text{m}$  の厚さの切片にした。

### (1) 免疫組織化学

遠位結腸の切片を 0.3% Triton X-100 (リン酸緩衝生理的食塩水、PBS) で処理した後、非特異的免疫反応抑制のため 10% 正常ロバ血清で 30 分処理し、ヤギ抗セロトニン抗血清 (1:5,000 希釈、Incstar, Stillwater, MN, USA) で 12-18 時間反応させた。PBS で洗浄後、ビオチン化ロバ抗ヤギ抗血清 (1:100 希釈、Jackson ImmunoResearch) で 2 時間反応し、ストレプトアビジン結合西洋ワサビ過酸化酵素 (Histofine SAB-PO kit, Nichirei, Tokyo, Japan) を含む溶液と反応させた。切片は最終的に、0.005%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.05 M TRIS 緩衝液、pH 7.6) を反応させ、免疫反応部位を可視化した。

スライドガラス上に封入した試料は、CCD カメラ (VB 7010、キーエンス) 付き光

学顕微鏡 (BX 50、オリンパス) で観察・撮影した。

免疫染色の特異性のコントロールとして、セロトニン (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of diluted antiserum) で吸収したヤギ抗セロトニン抗血清を、上述の免疫組織化学の際、ヤギ抗セロトニン抗血清の代わりに用いた。

## (2) 電子顕微鏡

電子顕微鏡用試料には、包埋前免疫組織化学法を行った。すなわち、3匹のラットを4%パラホルムアルデヒドと0.05%グルタルアルデヒド (リン酸緩衝溶液 pH 7.4) で灌流固定し、遠位結腸を切り出し、12-24時間同じ固定液中で後固定した。リン酸緩衝液で洗浄後30% sucrose と0.1%  $\text{NaN}_3$  を含むリン酸緩衝溶液に一晩浸漬させた後、クリオスタットで60-80  $\mu\text{m}$  厚の切片にした。ヤギ抗セロトニン抗血清を用いて、上述のように免疫組織化学を行った。ただし、Triton X-100は省略した。DAB 反応により反応部位を可視化した後、1%  $\text{OsO}_4$  (リン酸緩衝溶液 pH 7.4) で処理し、段階的にエタノールで脱水して、樹脂 (EPON 812) に包埋した。電子顕微鏡用超薄切片を LKB 2088-V ultramicrotome を用いて作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色後、電子顕微鏡 (H-7500, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

別の3匹の、ラットの試料は、免疫組織化学を行わず、EC細胞の詳しい形態を電子顕微鏡で観察した。ラットは2%パラホルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒド (リン酸緩衝溶液 pH 7.4) で灌流固定し、遠位結腸を取り出し、カミソリを使って0.5-1.0 mm 厚の切片にし、1%  $\text{OsO}_4$  で後固定後、上述のように処理し電子顕微鏡で観察した。

## 3. 結果および考察

今回の観察によって、ラット遠位結腸のセロトニンを含む EC 細胞は、細胞質性の突起を上皮細胞の中に伸ばすことが分かった。5524個のセロトニンを含有する EC 細胞のうち、80%が突起を持ち、残り20%には突起が見られなかった。突起を持たない EC 細胞の2/3は、陰窩の底部 (下半部) に局在していた (図1 a, b)。突起を持つ EC 細胞は、陰窩における位置、突起の長さについて多様であった。細胞体自体より長い突起を持つ細胞タイプと短い突起を持つ細胞タイプに分類すると、長い突起を持つタイプは、陰窩の底部にも上部 (入り口付近) にも同じぐらいの頻度で現れた (図1 a)。これらの EC 細胞の核は、細胞の基底側 (陰窩の外周側) に存在し、陰窩の上下方向に双極性の長い突起を伸ばす特徴が見られた。二本の突起のうち、下方に延びるものは、陰窩の側壁に沿って陰窩底に向かい、しばしば終末膨大部を作っていた (図1 d)。他の上方に伸びる突起は、陰窩側壁の外側から、中心に向かい、陰窩内腔に接していた (図1 e, f)。あたかも陰窩内腔へ、化学物質を感知するための受容器を伸ばしているように見えた<sup>9)</sup>。長い突起は、合計で130  $\mu\text{m}$  を越える場合もあった。いくつかの例では、複数の膨大部が数珠状に連なって、神経線維と酷似した外観をもつところも観察された

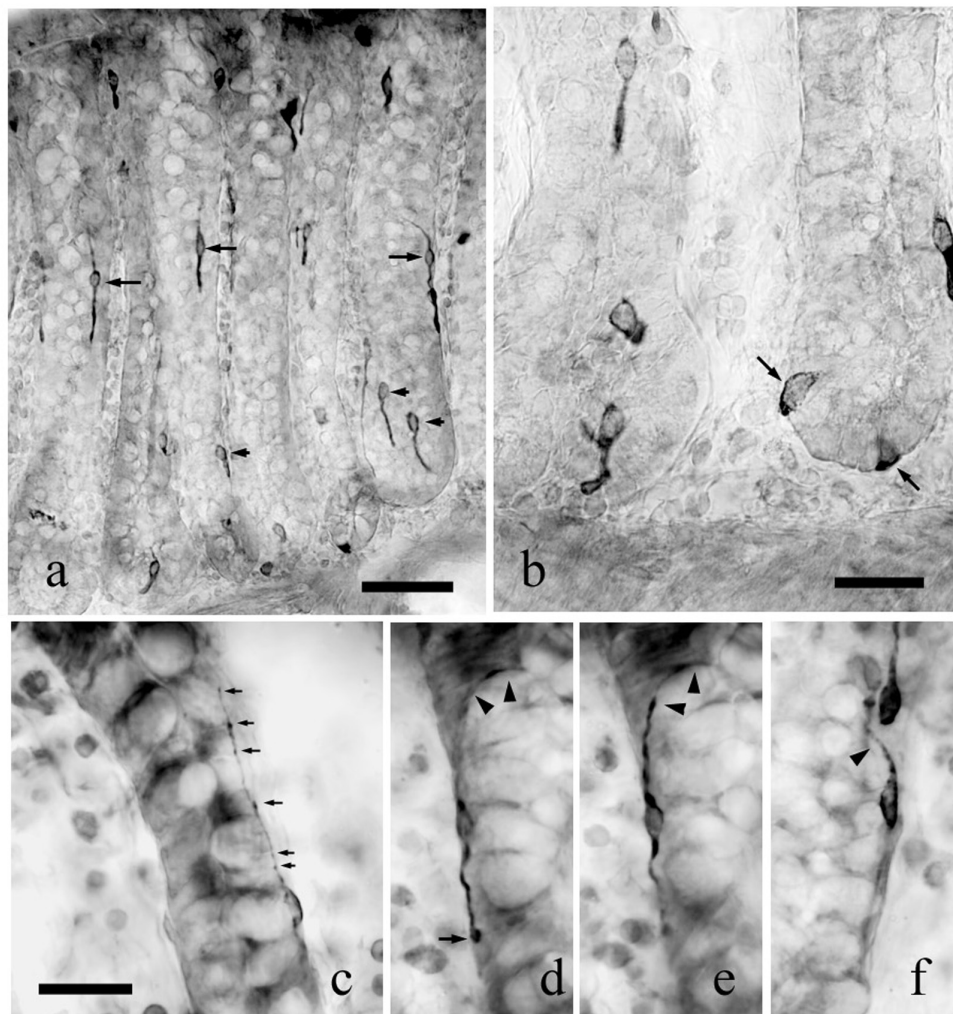


図1 抗セロトニン抗血清を用いて免疫組織化学を行ったラット遠位結腸の切片  
セロトニンの存在部位がDAB-反応で暗く染色されている。a: 多くのセロトニン陽性EC細胞が結腸上皮の中に観察された。EC細胞が持つ細胞質性の突起は多くは双極性であった(長い矢印): 片方は陰窩の側壁に沿って、底に向かって伸び、もう一方は陰窩の上方に向かい、さらに一部は陰窩の内腔方向に向きを変え、陰窩内腔にまで達していた。突起を持つEC細胞の一部は上方の突起を欠いていた(短い矢印)。Bar=100  $\mu$ m。b: 陰窩底部のEC細胞はしばしば突起をもたない(矢印)。Bar=50  $\mu$ m。c: 上方に伸びる突起は神経線維に、しばしば小さな数珠状の膨らみがみられた(矢印)。Bar=50  $\mu$ m。d, e: このEC細胞は上方の突起を陰窩の内腔に送り(鏃)、下方へ向かう突起は終末膨大部を形成している(矢印)。f: 陰窩内腔に向かって突起(鏃)を伸ばす別のEC細胞の例。b~fは同じ拡大率。

(図.1c)。このような特徴から、ラット遠位結腸のEC細胞はパラニューロン<sup>8)</sup>に典型的な特徴を持つことが示唆された。従来、ヒトの胃<sup>2,15)</sup>や、結腸と直腸<sup>23)</sup>で長い突起を持つEC細胞が報告されているが、今回観察されたラットEC細胞の突起は、報告されているデータより、明らかに長かった。突起をもつEC細胞の中には、上方へ向かう突

起を欠くものもあった (図 1 a)。

抗原 (セロトニン) で吸収した特異血清 (抗セロトニン抗血清) を用いたコントロール実験では、遠位結腸に免疫染色性を示す上皮細胞は観察されなかった。

多くの研究があるにもかかわらず、これまでラットの遠位結腸で長い突起をもつ EC 細胞が報告されていない理由の一つとして、今回の研究との、方法の違いによる可能性が考えられる。従来のパラフィン切片や凍結切片<sup>12,19)</sup>は、今回用いた凍結切片より (60 - 80  $\mu\text{m}$  in thickness)、かなり薄く切られていたため、長い突起に遭遇する機会が低かったと考えられる。

ラット遠位結腸におけるセロトニン含有 EC 細胞の機能はいまだ不明である。今回行った電子顕微鏡観察で、EC 細胞の、陰窩側壁に沿って下方に向かう突起は、終始、壁細胞と基底膜の間にはさまれて走行し終末に達するようであり、基底膜を貫いてさらに外部の粘膜固有層に達するところは確認されなかった (図 2 b, c)。突起の中には、従来の報告<sup>13)</sup>の通り、桿状、楕円、球状など多形性の顆粒 (長径 平均 168 nm,  $n=82$ 、図 2 b, c) が観察された。EC 細胞の細胞体と突起は、陰窩壁を構成する吸収上皮細胞や粘液産生細胞 (杯細胞) と基底膜との間で、陰窩壁の細胞に接触するような位置をとっていた。EC 細胞内の顆粒は、ときおり、陰窩壁の細胞側に向かって集積するところが観察された (図 2 c)。この観察結果から、陰窩壁を構成する細胞の一部は、EC 細胞から分泌されるセロトニンによって、傍分泌様式の調節を受けていることが考えられる。この仮説は、セロトニンが、結腸の粘液分泌にかかわること<sup>20)</sup>、ラット結腸吸収上皮細胞上に、電解質輸送に関わるセロトニン受容体が分布すること<sup>14,22)</sup>、ラット結腸陰窩の吸収上皮細胞はセロトニン受容体 (5-HT 2 A) の免疫染色性を強く発現する<sup>7)</sup>などの報告からも指示される。以上をまとめると、腸管内の物理・化学的刺激を受け取った EC 細胞は、細胞体や長い突起からセロトニンを放出し、それを受け取った吸収上皮細胞および杯細胞が電解質や粘液を腸管内に分泌することによって腸管内容物の円滑な移動を可能にしていると考えられる。

EC 細胞の長い突起は、ラット遠位結腸でセロトニンによって引き起こされる水分や電解質の分泌に、関係していると考えられる。しかし、モルモットでは、セロトニンの腸吸収上皮細胞への同様な効果が報告されている<sup>21)</sup>にもかかわらず、セロトニン含有細胞に突起が観察されなかった (unpublished data)。桑原らは<sup>17)</sup>、セロトニンが nitric oxide (NO) - 含有神経細胞に影響を与え、その神経細胞が NO を放出することによってモルモットの遠位結腸から塩素イオンが分泌される可能性を示した。ラットの遠位結腸でも、セロトニンによって誘発される神経細胞を介した塩素イオン分泌が報告されている<sup>1,24)</sup>。この現象には、VIP (vasoactive intestinal polypeptide) または NO と、セロトニン受容体 (5-HT 3 receptor) が関与することが示唆されている。したがって、ラット遠位結腸では、セロトニンに誘発される腸管上皮細胞からの分泌は、EC 細胞から分泌されるセロトニンの直接的な作用と神経細胞を介して行われる間接的作用の両方が関係すると考えられる。ラット遠位結腸において EC 細胞から分泌されるセロトニンの直接

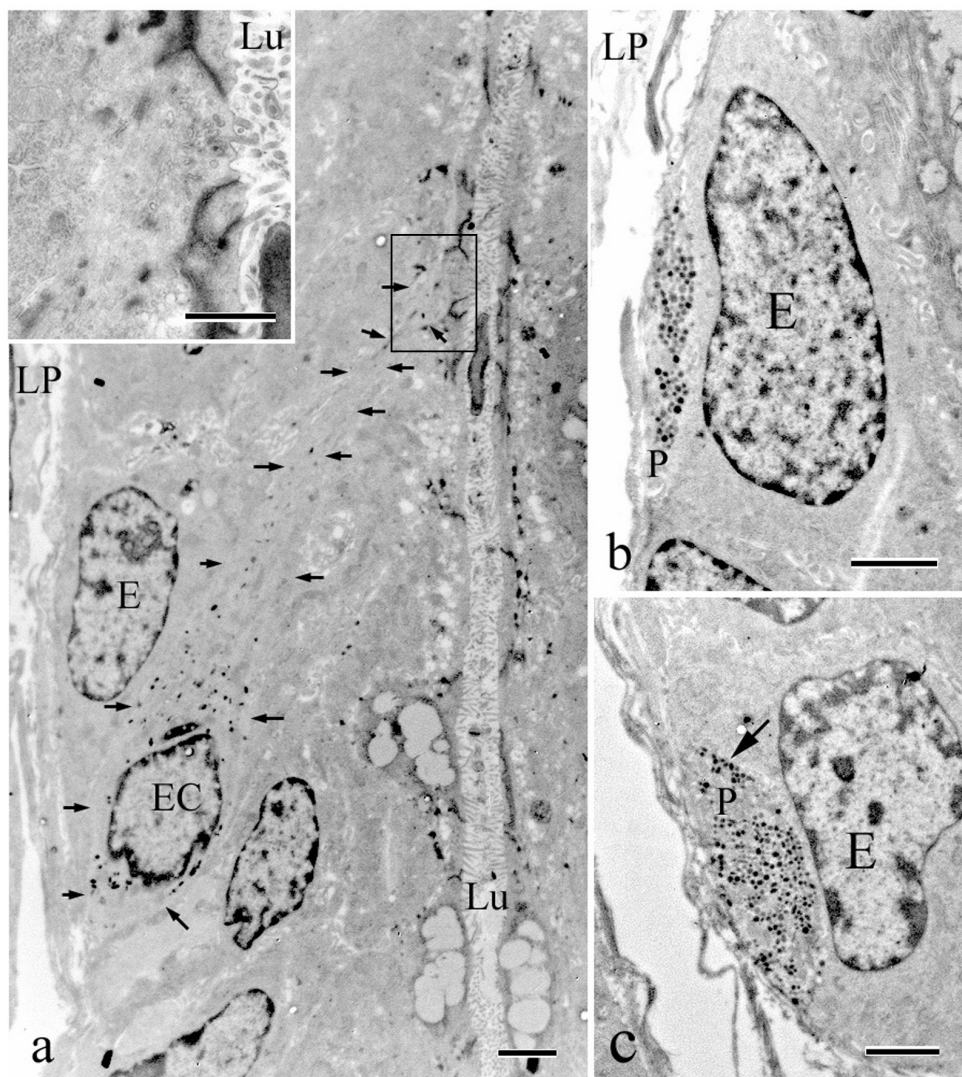


図2 ラット遠位結腸上皮に見られたセロトニン含有 EC 細胞の電子顕微鏡写真  
 a: 長い細胞質性の突起を、陰窩内腔まで延ばし、内腔に一部を突き出している EC 細胞の例。細胞体および突起 (矢印で囲まれる) の細胞質には多くの多形性の顆粒が認められた。突起が陰窩内腔に接触するところ (四角で囲った部分) を拡大し挿入図で示した。Bar = 2  $\mu$ m (挿入図 Bar = 0.5  $\mu$ m)。b: EC 細胞の細胞体および突起は、腸管上皮細胞と基底膜の間に入り込んでいた。Bar = 2  $\mu$ m。c: 多形性の顆粒を多く含む、EC 細胞の細胞質性突起の一部。突起は吸収上皮細胞と基底膜の間に挟まれていた。EC 細胞内の顆粒が上皮細胞側に集積するところを矢印で示した。Bar = 2  $\mu$ m。EC: EC 細胞、E: 吸収上皮細胞、P: EC 細胞の突起、LP: 粘膜固有層

的作用の重要度は、不明であるが、EC 細胞の持つ長い突起がセロトニン分泌に深くかわる可能性は大きいと考えられる。

## 引用文献

- 1) Arcuni JC, Stoner MC, Kellum JM. (2000): Vasoactive intestinal peptide is a neuropeptide mediator of the secretory response to serotonin in rat. *J Surg Res* 91, 118-122.
- 2) Bordi C, D'adda T, Azzoni C, Ferraro G. (2000): Classification of gastric endocrine cells at the light and electron microscopical levels. *Microsc Res Tech* 48, 258-271.
- 3) Bradbury JE, Black JW, Wyllie JH. (1980): Stimulation of mucus output from rat colon in vivo. *Eur J Pharmacol* 68, 417-425.
- 4) Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. (2004): Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 1657-1664.
- 5) Cooke HJ, Reddix RA. (1994): Neural regulation of intestinal electrolyte transport. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, Johnson LR. (eds.), Raven Press, New York, 2083-2132.
- 6) Donowitz M, Binder HJ. (1975): Jejunal fluid and electrolyte secretion in carcinoid syndrome. *Am J Dig Dis* 20, 1115-1122.
- 7) Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, Gershon MD. (2002): 5-HT 2 A receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT 2 A knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G 877-G 893.
- 8) Fujita T. (1976): The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature. In: *Chromaffin, enterochromaffin and related cells*, Coupland RE, Fujita T. (eds.), Elsevier, Amsterdam, 191-208.
- 9) Fujita T, Kobayashi S. (1973): The cells and hormones of the GEP endocrine system. The current of studies. In: *Gastro-entero-pancreatic endocrine system. A cell-biological approach*, Fujita T. (eds.), Igaku Shoin, Tokyo, 1-16.
- 10) Gershon MD. (1999): Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 13, 15-30.
- 11) Gershon MD, Wade PR. (1993): Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 9, 246-253.
- 12) Glisic R, Koko V, Todorovic V, Drndarevic N, Cvijic G. (2006): Serotonin-producing enterochromaffin (EC) cells of gastrointestinal mucosa in dexamethasone-treated rats. *Regul Pept* 136, 30-39.
- 13) Gorgas K, Bock P. (1976): Improved methods for the light microscopic study of enterochromaffin cells. In: *Endocrine gut and pancreas*, Fujita T. (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1-11.
- 14) Imada-Shirakata Y, Kotera T, Ueda S, Okuma M. (1997): Serotonin activates electrolyte transport via 5-HT 2 A receptor in rat colonic crypt cells. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 437-441.
- 15) Inokuchi H, Kawai K, Takeuchi Y, Sano Y. (1984): Immunohistochemical study on the morphology of enterochromaffin cells in the human fundic mucosa. *Cell Tissue Res* 235, 703-705.
- 16) Kim D-Y, Camilleri M. (2000): Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 95, 2698-2709.
- 17) Kuwahara A, Kuramoto H, Kadowaki M. (1998): 5-HT activates nitric oxide-generating neurons to stimulate chloride secretion in guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275, G 829-G 834.

- 18) Miwa J, Echizen H, Matsueda K, Umeda N. (2001): Patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS) may have elevated serotonin concentrations in colonic mucosa as compared with diarrhea-predominant patients and subjects with normal bowel habits. *Digestion* 63, 188-194.
- 19) Oshima S, Fujimura M, Fujimiya M. (1999): Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol* 112, 257-263.
- 20) Plaisancie P, Barcelo A, Moro F, Claustre J, Chayvialle J-A, Cuber J-C. (1998): Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275, G 1073-G 1084.
- 21) Sidhu M, Cooke HJ. (1995): Role for 5-HT and Ach in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269, G 346-G 351.
- 22) Siriwardena A, Kellum JM. (1993): A 5-HT receptor mediates serotonin-induced electrolyte transport in rat left colon. *J Surg Res* 55, 323-329.
- 23) Sjolund K, Sanden G, Hakanson R, Sundler F. (1983): Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemistry study. *Gastroenterology* 85, 1120-1130.
- 24) Stoner MC, Scherr AM, Lee JA, Wolfe LG, Kellum JM. (2000): Nitric oxide is a neurotransmitter in the chloride secretory response to serotonin in rat colon. *Surgery* 128, 240-245.
- 25) Zimmerman T, Binder H. (1984): Induced alteration of colonic electrolyte transport in the rat. *Gastroenterology* 86, 310-317.



## Abstract

The present study was performed to examine the distribution and particular morphology of the serotonin-containing enterochromaffin (EC) cells in the rat distal colon using immunohistochemical and electron microscopic methods. Serotonin-immunohistochemistry revealed that most of the serotonin-immunoreactive EC cells had extended cytoplasmic processes; particularly, the positive EC cells with longer processes were located along the body of the crypt and were characterized by bipolar processes that consisted of one process extending straight down vertically to the basal crypt, with terminal swellings, and the other running up the luminal side, in many cases, with the apical ends reaching the glandular lumen. A few of the EC cells had long processes that resembled neuronal ones with varicosities. Observation by electron microscope showed small pleomorphic granules with rod-like, tortuous, oval or round shapes in the long process-EC cells; the cell bodies and processes of the EC cells directly faced the crypt epithelial cells, including enterocytes and goblet cells at one side, and the basement membrane at the opposite side, and the accumulation of their granules sometimes appeared within the cytoplasm at the side of the epithelial cells. These findings suggest that serotonin is released from the long processes of EC cells and directly acts, in a paracrine fashion, on the crypt epithelial cells to secrete electrolytes, mucus and/or water into the colonic lumen. The presence of such long cytoplasmic processes of the EC cells may contribute to the major part of the serotonin-induced secretory events in the distal colon.

Key Words : EC cell

serotonin

immunohistochemistry

colon

rat