

ウサギ結膜組織培養におけるビタミン A パルミテートの ムチン産生促進作用

久保 慶和, 有村 秋子, 中安 清夫, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：結膜の杯細胞から分泌されるムチン産生に及ぼすビタミン A パルミテートの影響を、ウサギ結膜組織培養で検討する。

方 法：白色家兎 12 匹から瞼結膜を採取し、血清由来のレチノールを除去するために、ウサギ角膜上皮細胞増殖用に開発された無血清合成培地 RCGM 2 で培養した。培地に含まれるムチンを糖鎖部分の N-アセチルノイラミン酸量を指標として、高速液体クロマトグラフィで定量した。

結 果：培地にビタミン A パルミテートを添加する

ことで、培地に放出されるムチン量が増加した。

結 論：培地へのビタミン A 添加によって増加したムチン産生は、培養開始後に分化した杯細胞が関与する可能性がある。また、ビタミン A 類の薬効評価に RCGM 2 培地が有用であり、高速液体クロマトグラフィで培地中のムチンが容易に定量できる。(日眼会誌 103:580—583, 1999)

キーワード：ムチン, ビタミン A, 杯細胞, 結膜組織培養, N-アセチルノイラミン酸

Effect of Vitamin A Palmitate on the Synthesis of Mucins in Cultured Conjunctiva

Yoshikazu Kubo, Akiko Arimura, Kiyoo Nakayasu and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose : To evaluate the effect of vitamin A palmitate on the synthesis of mucins from goblet cells in cultured rabbit conjunctiva.

Methods : Palpebral conjunctiva was obtained from 12 white rabbits and was cultured in serum-free RCGM 2 which was developed for culture of rabbit corneal epithelial cells. This method eliminated retinol in the serum. High-performance liquid chromatography was used in quantitating N-acetylneuraminic acid contained in the sugar chain as an indicator of mucin content.

Results : Addition of vitamin A palmitate to the cultured medium resulted in significant increase in the amount of N-acetylneuraminic acid in the me-

dium.

Conclusions : The increase in N-acetylneuraminic acid in the cultured medium suggests that the increase of goblet cells in cultured conjunctiva is related to the synthesis of mucins due to vitamin A. RCGM 2 as a culture medium promises to be useful in evaluating the pharmacological activity of vitamin A. High-performance liquid chromatography facilitated quantitation of mucins in the culture medium. (J Jpn Ophthalmol Soc 103:580—583, 1999)

Key words : Mucin, Vitamin A, Goblet cell, Conjunctival tissue culture, N-acetylneuraminic acid

I 緒 言

ビタミン A 類は生物学的に上皮細胞の増殖・分化に関与しており、欠乏により全身的には成長の停止、眼科領

域では夜盲症や眼球乾燥症を生ずるとされている。特に眼表面において、ビタミン A は角結膜上皮の分化制御に関わっており、これに必要なビタミン A は涙液中にレチノールとして存在することが確認されている¹⁾。ビタミ

別刷請求先：113-8431 東京都文京区本郷 3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 中安 清夫
(平成 10 年 11 月 30 日受付, 平成 11 年 4 月 8 日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

(Received November 30, 1998 and accepted in revised form April 8, 1999)

ン A 欠乏によって角結膜に障害が起こると、①角膜上皮の点状表層角膜炎発生、②ムチンを分泌する結膜上皮杯細胞数の低下、③ビトー斑の形成、④角膜実質の溶解などの変化があると報告²⁾されている。ビタミン A の効果に関しては、ビタミン A 欠乏状態の動物あるいは培養ヒト角膜上皮細胞を用いた研究などがなされており、ビタミン A の添加により、角結膜細胞の分化促進作用による表層細胞質内の濾胞の増加や糖蛋白質産生の増加(いずれも杯細胞の増加に起因する)が起こり、それまで消失していた glycocalyx 層の出現などが観察されるようになると報告³⁾⁴⁾されている。また、結膜上皮に局在する杯細胞が産生するムチンは、涙液膜の最下層のムコイド層を形成し、眼表面の保護や創傷治癒において重要な役割を果たしている^{5)~9)}。

これまで、ビタミン A 類のムチン産生に及ぼす効果の定量的な評価には、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色、アルシアンブルー染色あるいはモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により染色された杯細胞の単位面積当たりの数などを基準とした組織化学的手法が多用されてきた^{10)~13)}。これらの方法はいずれも客観的な評価が難しく、また、薬物投与とそのものの難しさと個体差、他の実験因子の影響などがあり、汎用性にも問題があった。さらに、結膜の部位によって杯細胞の密度が大きく異なることから¹⁴⁾、定量法として客観性に劣る欠点があった。

ムチンは直鎖状のコア蛋白とそれに多数結合する糖鎖から成り、糖鎖部分の末端にはシアル酸の一種である N-アセチルノイラミン酸が含まれる¹⁵⁾。一方、N-アセチルノイラミン酸は、気道、消化管などの粘膜や血液あるいは組織中などの糖蛋白に広く存在し、種々の機能に関与していることから臨床検査の分野において分析法が検討されてきた¹⁶⁾¹⁷⁾。特に、高速液体クロマトグラフィを用いる測定法として、糖蛋白の酸加水分解により遊離した N-アセチルノイラミン酸を蛍光試薬 DMB と反応させて検出する方法が Hara¹⁸⁾により報告されている。

本報では、結膜組織培養液中に分泌されるムチンの糖鎖部分に含まれる N-アセチルノイラミン酸量を指標としてムチンを定量し、杯細胞から分泌されるムチンに対するビタミン A パルミテートの影響について検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料

実験には、体重約 2.5 kg の白色家兎 12 匹を用いた。過剰量のチオペンタールナトリウムで致死させた後、眼瞼部の毛を剃り、眼瞼結膜を摘出した。摘出した結膜はリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、ペニシリン-ストレプトマイシンを加えたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, GIBCO BRL) に 15 分間静置した後、5×5 mm の結膜片として培養に供した。

2. 培養

ウサギ角膜上皮増殖用培地 (RCGM 2, クラボウ), DMEM およびポジティブコントロールとして 2 v/v% ウシ胎児血清添加 DMEM をそれぞれ基礎培地に用いた。これらをそれぞれの基礎培地に千寿製薬から供与されたビタミン A パルミテート水性点眼剤 (1,000 IU/ml) を最終濃度 20 IU/ml になるように添加した。

培養には、24 穴組織培養用マルチプレートを用い、各ウェルに上皮側が上面を向くように結膜片を入れて培地 1 ml を加え、37℃、5% CO₂ の条件で培養を行った。培地は 2 日毎に回収し、3,000rpm、10 分間遠心して上清を -80℃ で保存した。

3. ムチンの定量

保存した培地を解凍し、5 μl を褐色ねじ口サンプル管にとり、0.025 mol/l 硫酸 200 μl を加えて密閉し、80℃ で 1 時間加熱し、N-アセチルノイラミン酸を遊離させた。冷却後、7 mM 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) 溶液 200 μl を加え、60℃、2.5 時間加熱して N-アセチルノイラミン酸を蛍光誘導体化して試料とした。ムチン量は構成糖鎖中の N-アセチルノイラミン酸量として表した。

ムチン由来の N-アセチルノイラミン酸の分離検出には、高速液体クロマトグラフィを用いた。カラムは加圧カラム分離システム (RCM 8×10, ウォーターズ) を用い、カートリッジカラムには Radial-Pak 8 C 18 (φ 8×100 mm, 粒径 5 μm, ウォーターズ) を使用した。試料 50 μl をメタノール/アセトニトリル/水 (25/4/91) により、1.2 ml/min の流速で溶出した。検出には蛍光検出器 (FLD-6 A, 島津製作所) を用いた。

各測定値については t 検定を行い検討した。

III 結果

N-アセチルノイラミン酸量 0.05~0.2 nmol/ml における検量線は、図 1 に示すとおりほぼ原点を通る直線であった。

ポジティブコントロールとして用いた血清添加

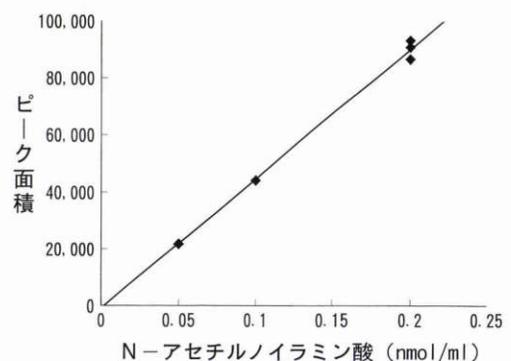


図 1 N-アセチルノイラミン酸検量線。

直線回帰式: $y = 45692x - 1277$ 相関係数: $r = 0.998$

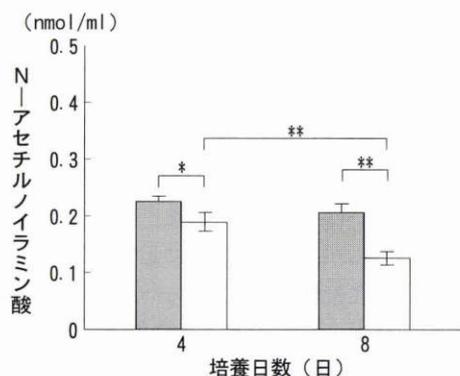


図2 2% ウシ胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地(血清添加 DMEM)培養系におけるムチン量(n=4).

■: ビタミン A パルミテート添加 □: ビタミン A パルミテート無添加 *: p<0.05 **: p<0.01

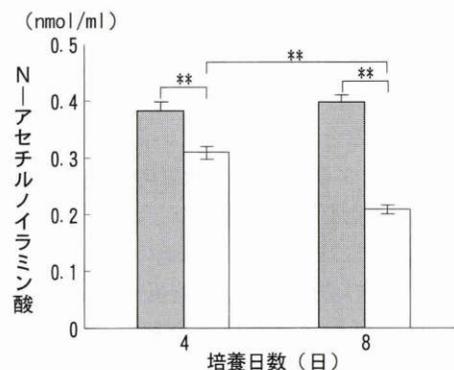


図4 ウサギ角膜上皮増殖用培地(RCGM 2)培養系におけるムチン量(n=4).

■: ビタミン A パルミテート添加 □: ビタミン A パルミテート無添加 **: p<0.01

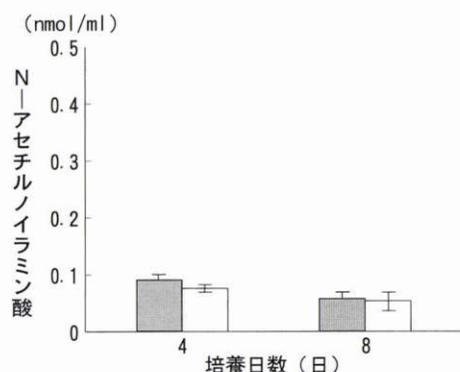


図3 無血清ダルベッコ変法イーグル培地(無血清 DMEM)培養系におけるムチン量(n=4).

■: ビタミン A パルミテート添加 □: ビタミン A パルミテート無添加

DMEM の場合, 培養 4, 8 日目のいずれの場合も, ビタミン A パルミテート添加群は無添加群に比べ N-アセチルノイラミン酸量が有意に高かった. また, ビタミン A パルミテート添加群では, 培養日数の延長に伴う N-アセチルノイラミン酸量低下も小さかった(図 2). DMEM のみ の場合では, 血清添加系に比べ N-アセチルノイラミン酸量は約 1/2 にとどまった. また, 培養 4, 8 日目のいずれの場合も ビタミン A パルミテート添加, 無添加の間で有意差はなかった(図 3).

一方, RCGM 2 の場合, 血清添加 DMEM に比べ, N-アセチルノイラミン酸量は約 2 倍高い値を示した. ビタミン A パルミテート添加群は, 4, 8 日目とも ビタミン A パルミテート無添加群に比べて N-アセチルノイラミン酸量は有意に高く, 培養期間延長による低下はなかった. これに対して, ビタミン A パルミテート無添加群は 4 日目と 8 日目で N-アセチルノイラミン酸量は有意に低下した(図 4).

IV 考 按

ムチンなどの糖蛋白の測定法として, 糖蛋白の酸加水分解により遊離した N-アセチルノイラミン酸を蛍光試薬と反応させて高速液体クロマトグラフィーで測定する方法が報告¹⁸⁾されている. 今回, 本法を応用して, N-アセチルノイラミン酸量 0.05~0.2 nmol/ml において測定を行った結果, 濃度とピーク面積の間により直線性があり, 培養液中のムチンを定量的に検出することが可能となった.

結膜組織培養において, ビタミン A パルミテートは N-アセチルノイラミン酸量を有意に増加させ, 培養液中に放出されるムチン量を増加させることが推測された. 杯細胞は基底細胞から分化して 3~6 日後にムチンを分泌するとの報告¹⁹⁾があり, したがって, 培養 8 日目の上清中には, 培養開始後に分化した杯細胞から分泌されたムチンがあると考えられる. ビタミン A パルミテート添加群, 無添加群のムチン産生量の差が 4 日目より 8 日目の方が大きいことから, ビタミン A パルミテートにより杯細胞への分化が誘導されたか, あるいは成熟時に産生されるムチン量が増加した可能性が高いと考えられる. 杯細胞の分化および成熟の制御におけるビタミン A 類の役割については, さらに検討していく必要がある.

培養実験においてビタミン A 類の薬効評価を行う場合にしばしば問題になるのは, 添加したビタミン A 類以外に培地中に存在するビタミン A 類, 特に血清由来のレチノールである. このため今回の検討では, ウサギ角膜上皮細胞増殖用に開発された無血清合成培地であり, ビタミン A 類を全く含まないことが確認されている RCGM 2 を培地として用いた. 比較のため, 無血清 DMEM および 2% ウシ胎児血清を添加した DMEM による試験を実施した. その結果, 無血清 DMEM の場合には, ビタミン A パルミテート添加, 無添加ともに N-アセチルノイラミン酸量が血清添加 DMEM に比べ僅かであった. これは, 無血清 DMEM では, 細胞の分化・増殖に必要な各種

因子を欠くためと考えられる。したがって、血清由来のレチノールを除くための実験方法としては問題があると思われる。

一方、RCGM 2 では、N-アセチルノイラミン酸量はビタミン A パルミテート添加、無添加のいずれの場合でも血清添加 DMEM の約 2 倍の値を示した。これは、RCGM 2 中には、増殖因子としてインスリン、上皮成長因子 (mEGF)、ハイドロコーチゾン、ウシ脳下垂体抽出液 (BPE-R) が添加されており、ビタミン A パルミテートとともに細胞分化を促すためと考えられる。さらに、RCGM 2 には活性酸素除去能力を持つ亜セレン酸が含まれることから、細胞へのダメージが少なく、増殖因子との相乗的な作用によりムチン産生量が高い値を示したものと思われる。したがって、ビタミン A 類によるムチン産生への効果を評価する上で、培地由来のビタミン A 類を含有しない RCGM 2 が有用であることが明らかとなった。また、培養中のビタミン A の活性は、界面活性剤で可溶化したビタミン A の残存率が 30℃、2 日後で 90% 以上との報告²⁰⁾があり、今回の 2 日毎に培地を交換する試験系において問題ないと考えられる。今後、分泌されたムチン量と培養組織片に含まれる杯細胞数の相関性の把握が必要と考えられる。

稿を終えるに当たり、製剤を提供していただいた千寿製薬(株)に謝意を表します。

文 献

- 1) **Ubels JL, MacRae SM**: Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits. *Curr Eye Res* 3: 815—822, 1984.
- 2) **渡辺 潔**: ビタミン A 欠乏症と角膜. あたらしい眼科 6: 1627—1633, 1989.
- 3) **Kiorpes TC, Kin YCL, Wolf G**: Stimulation of the synthesis of specific glycoproteins in corneal epithelium by vitamin A. *Exp Eye Res* 28: 23—25, 1979.
- 4) **Hassell JR, Newsome DA, Luca LMD**: Increased biosynthesis of specific glycoconjugates in rat corneal epithelium following treatment with vitamin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 642—647, 1980.
- 5) **Wolff E**: The mucocutaneous junction of the lid-margin and the distribution of the tear fluid. *Trans Am Ophthalmol Soc* 66: 291—308, 1946.
- 6) **北野周作**: Ocular surface—その生理と病態—. 日眼会誌 91: 1—26, 1987.
- 7) **Record RE**: The tear film. In: Duane TD, et al (Eds): *Biomedical Foundations of Ophthalmology*. Vol 2. Chap. 3. Harper and Row, Philadelphia, 1985.
- 8) **Haeringen NJV**: Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol* 26: 84—96, 1981.
- 9) **雨宮次生**: 眼科とビタミン. *臨床と研究* 73: 2267—2270, 1996.
- 10) **Ohashi Y, Watanabe H, Kinoshita S, Hosotani H, Umemoto M, Manabe R**: Vitamin A eyedrops for superior limbic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 105: 523—527, 1988.
- 11) **Tseng SCG, Maumenee AE, Stark WJ, Maumenee IH, Jensen AD, Green WR, et al**: Topical retinoid treatment for various dry-eye disorders. *Ophthalmology* 92: 717—727, 1985.
- 12) **Ubels JL, Edelhauser HF, Foley KM, Liao JC, Gresset P**: The efficacy of retinoic acid ointment for treatment of xerophthalmia and corneal epithelial wounds. *Curr Eye Res* 4: 1049—1057, 1985.
- 13) **Ubels JL, Edelhauser HF, Austin KH**: Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids. *Am J Ophthalmol* 95: 353—358, 1983.
- 14) **岸下 仁, 中安清夫**: 正常家兎眼における結膜ゴブレット細胞の分布および自己結膜移植後のゴブレット細胞の挙動について. *日眼会誌* 100: 433—442, 1996.
- 15) **稲富 勉**: ムコイド層の最新知見. あたらしい眼科 14: 1637—1645, 1997.
- 16) **鶴見 隆一**: シアル酸. *臨床病理* 20: 103—110, 1974.
- 17) **森下芳孝, 中根清司, 高阪 彰**: 血清シアル酸定量と臨床的意義. *臨床病理* 24: 411—414, 1976.
- 18) **Hara S**: Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Annal Biochem* 164: 138—145, 1987.
- 19) **深川和己**: 結膜上皮. 坪田一男(編): *Ocular surface の診断と治療*. メディカル葦出版, 東京, 38—45, 1993.
- 20) **林 信一, 西井嘉子**: 可溶化系におけるビタミン A の安定性について. *ビタミン* 43: 269—273, 1971.