

ヒト・ブタ・家兎各眼角膜におけるレクチンの結合性 (図8, 表1)

原 田 敬 志 (名大分院眼科)
 久 田 廣 次 (名大眼科)
 矢 ヶ 崎 悌 司 (県立多治見病院眼科)
 若 松 幸 三 (蒲郡市民病院眼科)
 伊 藤 由 美 子 (一宮市民病院眼科)

Lectin Binding in Human, Pig and Rabbit Corneas

Takashi Harada¹, Hiroji Hisada², Teiji Yagasaki³Koji Wakamatsu⁴, Yumiko Ito⁵

1: Service of Ophthalmology, Nagoya University Branch Hospital

2: Department of Ophthalmology Nagoya Univ, School of Medicine

3: Service of Ophthalmology, Gifu Prefectural Hospital

4: Service of Ophthalmology, Gamagori Municipal Hospital

5: Service of Ophthalmology, Ichinomiya Municipal Hospital

要 約

レクチンには特定の糖構造と特異的に結合する特徴があるので、今回はビオチン化レクチンとABC法を用い、ヒト・家兎・ブタにおける名眼角膜のレクチン結合パターンを分析した。ヒト・家兎・ブタ角膜上皮に共通してCon AおよびWGAに染性を示したので、N-アセチルグルコサミンおよび α -D-マンノースあるいは α -D-グルコースの鎖を有する糖質が存在する。ヒト角膜上皮には、さらにこれに加えD-ガラクトース、 α -フコース、 β -ガラクトースを残基に持つ糖鎖が存在する。家兎のデスメ膜だけがCon Aに染まったので、ここには α -D-マンノース、あるいは α -D-グルコースを残基に持つ糖鎖が含まれる。(日眼 92:133-138, 1988)

キーワード: 角膜, レクチン, 組織化学, ABC法

Abstract

Lectin histochemical studies were performed to clarify the localisation of glycosyl residues in 3 human, 3 pig and 3 rabbit corneas. Surface cells of human, pig and rabbit corneas, especially epithelial cells, bind specifically with both Con A and WGA, thus indicating the presence of glycosyl residues, such as N-acetyl-D-glucosamine and alpha-D-mannose or alpha-D-glucose. In addition, human corneal epithelial cells were also stained weakly with RCA-I, UEA-I, PNA. They were considered to contain sugar chains with D-galactose, alpha-fucose and beta-galactose residues. Exclusive binding of Descemet membrane of rabbit corneas with Con A signified that the membrane includes oligosaccharides with alpha-D-mannose or alpha-D-glucose residues. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 133-138, 1988)

Key words: Cornea, lectins, histochemistry, ABC method

別刷請求先: 466 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部眼科学教室 原田 敬志 (昭和62年7月30日受付)

Reprint requests to: Takashi Harada, M.D. Dept. of Ophthalmol., Nagoya Univ. School of Med.

65 Tsurumai-cho, showa-ku, Nagoya 466, Japan

(Accepted July 30, 1987)

I 緒 言

レクチンは、細胞を凝集したりあるいは複合糖質を沈降させる糖結合性の蛋白もしくは糖蛋白であり、免疫反応以外の産物である¹⁾。レクチンには特定の糖構造と特異的に結合する特徴があるので、蛍光色素や酵素を用いて可視化すれば、組織化学的マーカーとして各レクチンに対応する糖残基を同定することが可能である²⁾³⁾。

最近 Panjwani et al.⁴⁾ (1986) はヒト・ネコ・家兎の各眼角膜の上皮・実質におけるレクチンの結合パターンを報告した。今回私どもはヒト・家兎・ブタの各眼角膜について、上皮・実質のほかにデスメ膜や内皮細胞層におけるレクチンの結合性をアビジン・ビオチン法⁵⁾により組織化学的に検索し、複合糖質の分布について興味ある知見を得たので報告する。

II 材料と方法

眼球銀行から入手したが、高齢のため角膜移植術に使用することのできなかったヒト眼3眼、および家兎・ブタ各3眼の角膜を10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、5 μ mの切片を作製した。

キシレンおよび100%, 90%, 80%, 70%の各段階アルコールに通し、0.1M・pH 7.4のリン酸緩衝液(PBS)で洗い、内因性のペルオキシダーゼを阻害するため3%過酸化水素水に10分間通す。続いて100 μ g/mlの牛血清アルブミンに10分浸漬したのち、PBSで洗滌し、ビオチンで標識された8種のレクチン10 μ g/mlを30分作用させた。用いたレクチンは、タチナタマメレ

クチン (Con A), ダイズマメレクチン (SBA), コチギノイレクチン (WGA), ドリコスマメレクチン (DBA), レンズマメレクチン (LCA), ハリエニシダレクチン (UEA-I), ピーナッツレクチン (PNA), ヒマレクチン (RCA) である。PBSで洗った後、その場でアビジン・ビオチン複合体 (Vector) を調整し30分間作用させた。さらにPBSで十分洗滌したのち、トリス緩衝液で0.1%としたDAB (diaminobenzidine) と0.02%過酸化水素水との等量混合液で発色させた。0.02%メチルグリーン液で染色してから、段階アルコールで脱水しキシレンで処理した。

対照としては、それぞれのレクチンに特異的な阻害糖を、レクチンを加える前に15分間0.2Mだけ作用させた。またシアル酸の内側にある糖残基を同定するために、PNAには予め250mU/mlのneuraminidaseを加えた。

なお、眼球保存液には、日局ペンジールベニシリンカリウム20万単位・日局硫酸ストレプトマイシン1gの他に、眼球保存液II[®] (EII・II) (科研製薬)を加えたものを使用した。EII・IIには、デキストラン70が3.5g, D-グルコースが78.2mg, そして塩化カリウム, 塩化ナトリウム, 塩化カルシウム, 硫酸マグネシウム, リン酸緩衝液およびフェノールレッドが適宜含まれる。

III 結 果

ヒト・家兎・ブタ各眼角膜に対するレクチンの結合性は表1に示す通りである。ヒトでは、いわゆる membrane staining が Con A つづいて WGA で著しく、RCA-I・PNA・UEA-I でもわずかに観察された。上皮

表1 いずれの種でも上皮は Con A つづいて WGA につよい染色を示す。家兎デスメ膜は Con A に染まる。

種	角 膜	ConA	WGA	RCA-I	LCA	PNA	SBA	UEA-I	DBA
ヒト	上 皮	+++	++	+	-	+	-	+	-
	実質 matrix	-	-	-	-	-	-	-	-
	細胞	+++	++	+	-	-	-	-	-
	デスメ氏膜	-	-	-	-	-	-	-	-
	内皮細胞層	+	+	+	+	+	-	-	+
家兎	上 皮	++	+	-	-	-	+	-	-
	実質 matrix	-	-	-	-	-	-	-	-
	細胞	±	+	-	-	-	-	-	-
	デスメ氏膜	+	-	-	±	-	±	-	-
	内皮細胞層	++	+	-	-	-	+	-	-
ブタ	上 皮	++	+	-	-	-	-	-	-
	実質 matrix	-	-	-	-	-	-	-	-
	細胞	±	±	±	-	-	-	-	-
	デスメ氏膜	-	-	-	-	-	-	-	-
	内皮細胞層	+	+	-	±	-	+	-	-

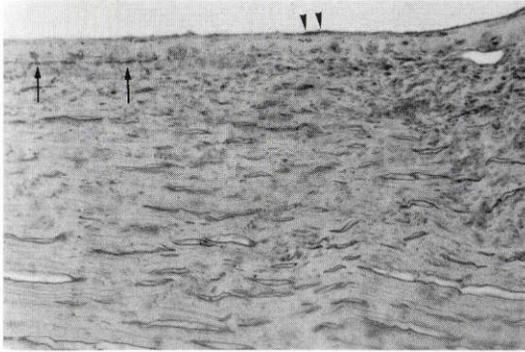


図1 ヒト, Con A. 上皮の表面 (surface coat) (▼) および特に上皮の基底層につよい染性がみられる (↑). 実質細胞表面にも陽性に染まる. ×100.

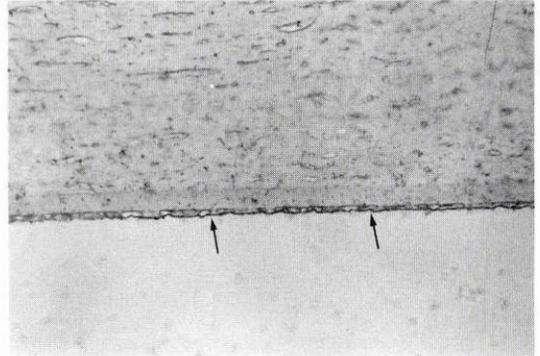


図4 家兎, WGA. 内皮細胞層 (↑) はやや陽性に染まっている. ×100.

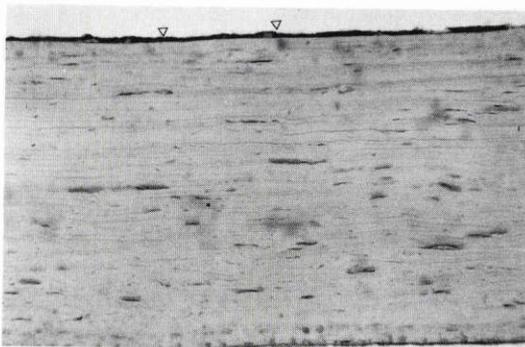


図2 ヒト, Con A. 内皮細胞の核を除き内皮細胞層 (△) は明瞭に染まる. ×40.

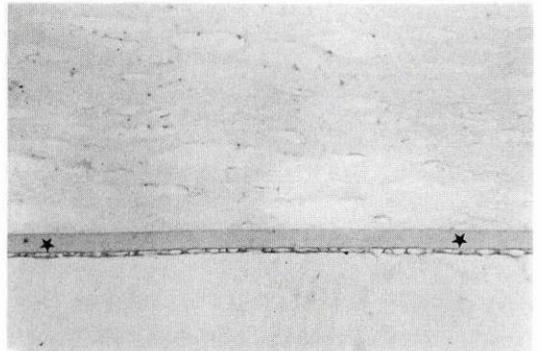


図5 家兎, Con A. 家兎ではデスマ膜 (★) が Con A に染まる. ×100.

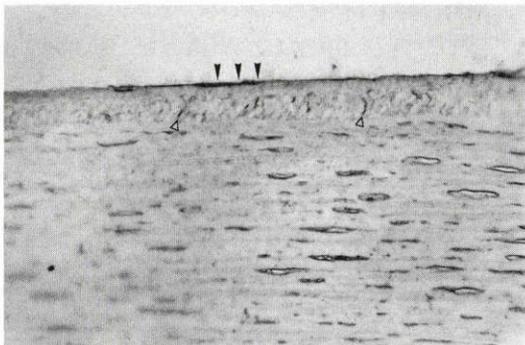


図3 家兎, WGA. Surface coat (▼) および細胞間 (△) によく染まる. ボーマン膜は陰性. 実質細胞は陽性. ×100.

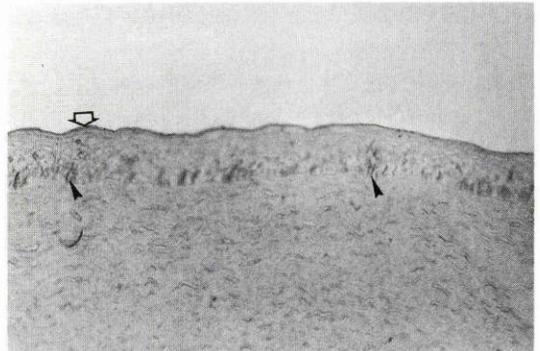


図6 ブタ, Con A. Surface coat (↓) および上皮深層細胞間 (▲) につよい染性が認められる. ×100.

基底細胞層の核周囲には, Con A・WGA につよく反応する所見がみられたが, PNA・UEA-I・RCA-I にはわずかに陽性となるにとどまった. 実質の matrix に

は明瞭な陽性反応を示すものは見いだされなかった. 一方, 角膜実質細胞は Con A とやや程度はうすくなるが WGA とによく染色された. RCA-I もわずかながら染色性を示した. ヒトデスマ膜には陽性反応を呈するレ

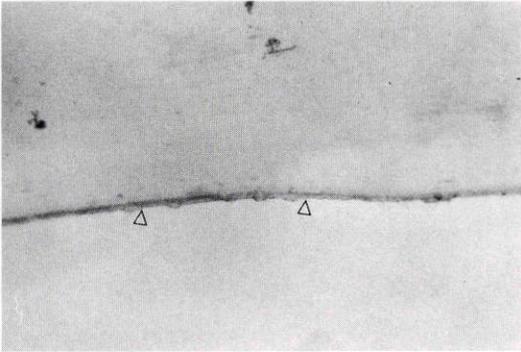


図7 ヒト, LCA. 内皮細胞層(Δ)に染色がみられる. ×100.

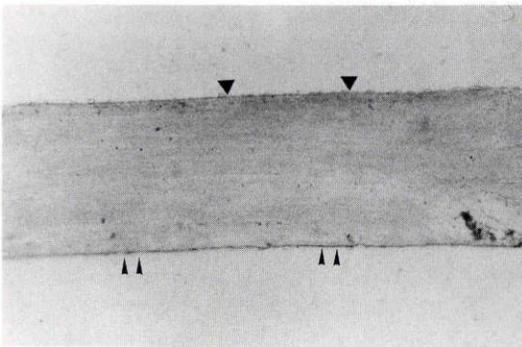


図8 ヒト, PNA. Surface coat (▼)および内皮細胞層(▲)に染色が認められる. ×50.

クチンは見い出されなかった。内皮細胞層には Con A・WGA・RCA-I・LCA・PNA・DBA が陽性となった。

家兎・ブタではヒトに比較し染色性がやや低下していた。家兎上皮は、RCA-I・PNA・UEA-Iにはほとんど反応を示さず、その代り SBA にわずかに陽性となった。やはり Con A つづいて WGA に明瞭な染色が認められている。実質細胞は WGA に陽性反応を示したが、Con A に対しては弱く染色されるにとどまった。家兎デスメ膜は Con A に明瞭に染まったが、LCA・SBA にも微弱ながら陽性反応を示した。内皮細胞は、Con A につづく、WGA と SBA とによわく陽性反応を呈した。

ブタ角膜上皮細胞は家兎の場合と同様 Con A・WGA に染色された。角膜実質細胞は、ほとんど染色されなかった。内皮細胞層は、WGA に染まり、Con A・LCA・SBA にも微弱ながら染色を示した。なお、各々のレクチンに特異な阻害糖を各レクチンに加えたとき

は、発色反応は認められなかった。

IV 考 察

本法は Panjwani et al.⁴⁾ (1986) の記載した方法に、いささかの改変を加えたもので、mouse liver powder の代わりに牛血清アルブミンを用いた。自験例のような方法では、ビオチン化レクチンと ABC stain[®] とを比較的容易に入手でき、染色全体の完成にはほぼ2時間半を要するだけであり、クライオスタットを必要としないので、実施はそれほど困難を伴わない。対比染色のメチルグリーン染色も、場合によってはかえってレクチンの反応性を見にくくすることがあり、施行は省略しうが、上皮・内皮細胞層では核がよく可視化された方が各層の弁別は容易となるので実施した。

Panjwani et al.⁴⁾ (1986) の得た成績と異なるのは、ヒト角膜実質が RCA-I に著明に染まると報告されているのに対し、本実験では RCA-I にわずかしかな染色を示さなかった。

これについては、染色の程度の差ということも考えられる。自験例では、ヒト・家兎・ブタいずれもの動物眼角膜で Con A は WGA より著明な染色を示したのに、Panjwani et al.⁴⁾ (1986) の成績では一般に WGA の方が Con A より明確に染色されている点が目立つ。しかし、Bonvicini et al. (1983) は、ヒト角膜で、上皮・実質の WGA・Con A に対する染色性は同じであることを示している。レクチンに対するマーカーとして金コロイドを使用した電顕的研究によると、Con A は、淡明な細胞質を有し、微小ヒダのない上皮に局限して分布しているのに対し、WGA は微小ヒダのある上皮にも受容体を有しているという⁶⁾。WGA の角膜上皮における分布は散布型といえる。したがって、WGA と Con A の受容体分布については post-embedding による方法でさらに検討をすすめる必要があらう。

上皮全体としてみると、ヒト・家兎・ブタのいずれでも主として Con A や WGA により membrane staining として surface coat が染色されている。この場合、角膜上皮の外側でこれらのレクチンの染色に関与するものとして、涙液の糖蛋白も考えられる。しかし、本実験の染色過程で標本は何度も洗滌されているので、涙液は組織片から脱落していると思われる。上皮の glycocalyx が反応を示したものと考えた。

Panjwani et al. (1986) はデスメ膜・内皮細胞層のレクチンに対する染色性について言及していないので、現在のところこの2層に関する記載はないようで

ある。私どもの結果はこの点できわめて新しい情報を提供していると言える。すなわち、家兎のデスメ膜が Con A に明瞭に染った点である (図5)。Con A は、C-3, C-4 および C-6 の水酸基が未置換の α -D-マンノースあるいは α -D-グルコースに高い特異性を有するので、家兎のデスメ膜にはこの2者を糖残基として持つ糖鎖が存在すると思われる。

ウシでは、デスメ膜にガラクトース・グルコース・マンノースが 6 : 2 : 1 の割合で存在するとされ、またフコース、ヘキソサミン、グルコサミン、ガラクトサミンもわずかながら認められるという¹¹⁾。しかし、デスメ膜の生化学的組成、特に複合糖質について詳細な検討は現在、私たちの知る限りなされておらず、今回の自験例から得られた糖残基の構造からただちにデスメ膜の複合糖質の構造まで帰結するには困難が伴なうと思われる。ヒト・角膜・ブタについての生化学的データが十分に得られていない現時点では、三種のデスメ膜にみられた染色の相違は、種による差に由来すると考えざるを得ない。

続いて内皮細胞の態度であるが、ヒトでは Con A (図2)・WGA・RCA-I・LCA (図7)・PNA (図8)・DBA に陽性となった。家兎の場合は、Con A (図5) につよい反応が、WGA (図4) と SBA とに微弱な反応が現われた。そしてブタでは、やはり WGA に陽性となり、Con A・LCA・SBA にもわずかながら染色が認められた。したがって、3者とも内皮細胞には、WGA に明瞭な特異性を有する N-アセチル-D-グルコサミンを残基とする糖鎖が存在すると思われる。また Con A に特異な結合様式を示す α -D-マンノースあるいは α -D-グルコースも同様に糖鎖の残基として現われている可能性もつよい。Con A に類似してリンパ球幼若化活性があり、細胞膜糖蛋白の単離にもよく用いられる LCA は家兎には反応を示さず、ヒトとブタの内皮細胞にしか染色を呈していない。デスメ膜の染色態度について考按の項で述べたことが言える。すなわち、内皮細胞層の生化学的組成とくに糖蛋白の配列については現在のところ十分なデータがなく、内皮細胞の PNA や SBA, DBA に対する各種動物の間にみられる染色性の相違は、現時点では種による差によるものと考えている。

結果の項で述べたように、ヒト・ブタ・家兎の角膜上皮では共通して Con A 続いて WGA に著明な染色を示したことから、それぞれに特異な、N-アセチルグルコサミンおよび α -D-マンノースあるいは α -D-

グルコース残基を有する糖鎖が3者の角膜上皮に存在すると考えられる。この他さらにヒト角膜の上皮は RCA-I, UEA-I, PNA にわずかながら染まっているので、それぞれに特異な糖構造、すなわち D-ガラクトース、 α -フコース、 β -ガラクトース残基を有する糖鎖がそこに存在していると思われる。ポーマン膜はヒト・ブタ・家兎ともに今回使用したレクチンに対し染色を示すことがなかった。この部位ではムコ多糖を含んでいるとされているが、レクチンに対し反応性のない化学構造をなしていると考えられる。

ブタの角膜実質細胞はほとんどレクチンに対し陽性所見を示さなかったが、ヒト・家兎のそれは Con A および WGA に染まっていたので、やはりここでも N-アセチルグルコサミンおよび α -D-マンノースあるいは α -D-グルコース残基を持つ糖鎖があるものと考えられた。

従来文献の記載によれば、角膜におけるレクチンは、その分化や発生⁸⁾、抗原性⁹⁾、創傷治癒¹⁰⁾に関係するとされる。今回の研究を手がかりとし、場合によっては電顕的レクチン検出法も加えて、さらに角膜におけるオリゴ糖に対する検索を深めていく予定である。

稿を終るにあたり本研究の御指導に多大な援助を惜しまれなかった第二解剖学教室主任星野洗教授に深謝いたします。また御校閲を賜った名大眼科学教室主任栗屋忍教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Uhlenbruck G: Lektine, Toxine und Immunotoxine, Naturwissenschaften 68: 606—612, 1981.
- 2) Hsu SH, Raine H: Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. J Histo Cytochem 30: 157—161, 1982.
- 3) Delbos M, Saidi N, Gipouloux JD: Détection au moyen de lectines fluorescentes de chaînes osidiques spécifiques des cellules germinales primordiales d'amphibiens anoures. Arch Anatom Microscop 71: 90—98, 1982.
- 4) Panjwani N, Moulton P, Alroy J, Baum J: Localization of lectin binding sites in human, cat and rabbit corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1280—1284, 1986.
- 5) Hsu SM, Raine L, Fanger H: A comparative study of the peroxidase antiperoxidase methods and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoas-

- say antibodies. *Amer J Clin Path* 75: 734—738, 1981.
- 6) **Bonvicini F, Versura P, Caruso F, Maltarello MC, Caramazza R, Laschi R**: Lectin receptors on human corneal epithelium, visualization by fluorescence microscopy and electron microscopy. *Cornea* 2: 237—241, 1983.
 - 7) **Schaumburg-Lever G, Alroy J, Ucci A, Lever WF**: Distribution of carbohydrate residues in normal skin. *Arch Dermatol Res* 276: 216—223, 1984.
 - 8) **Robert L, Robert B**: La structure macromoléculaire de la cornée normale. *Arch Ophthalmol (Paris)* 35: 11—22, 1975.
 - 9) **Rebat LJ**: Structural glycoproteins of connective tissue. In: *Connective Tissue Research*, edited by Adam M, Deyl Z, Alan R Liss Inc, New York, 1981, pp73—86.
 - 10) **Gipson IK, Anderson RA**: Effect of lectins on migration of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 341—345, 1980.
 - 11) **Maurice DM, Riley MV**: The cornea. In *Biochemistry of the Eye*, edited by Graymore, C.N., 50, Academic Press, London, 1970.
-