

サル角膜・結膜上皮および結膜杯細胞のレクチン結合性の ノイラミニダーゼ処理による変化 (図2, 表1)

上原 文行・鮫島 宗文・鶴木 一彦 (鹿児島大学医学部眼科学教室)
内匠 勝秀・大庭 紀雄

Effects of Neuraminidase on Lectin Binding Sites in the Corneal and Conjunctival Epithelium and Conjunctival Goblet Cells of Monkey Eye

Fumiyuki Uehara, Munefumi Sameshima, Kazuhiko Unoki,
Katsuhide Takumi and Norio Ohba

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

要 約

サル角膜・結膜上皮および結膜杯細胞の3種類のレクチン(ピーナツレクチン:PNA;ヒマメレクチン:RCA-1;コムギハイガレクチン:WGA)結合性のノイラミニダーゼ処理(N処理)による変化について組織化学的に検索した。PNAは一部の杯細胞の表層側あるいは基底側にのみ結合したが、N処理によって角膜・結膜上皮の最表層および角膜上皮表層細胞の辺縁に新たに結合するとともに、内部全体がびまん性に染色される杯細胞が密に観察されるようになった。RCA-1ではN処理の有無にかかわらず角膜・結膜上皮の基底膜および少数の杯細胞が染色された。WGAは角膜・結膜上皮最表層・基底膜、角膜表層細胞辺縁および多数の杯細胞に結合するとともに、N処理によってそれらの結合性が全体的に減弱した。(日眼 92:1354—1358, 1988)

キーワード: 角膜上皮, 結膜上皮, 杯細胞, レクチン, ノイラミニダーゼ

Abstract

Binding of sugar-specific lectins to the monkey eye was investigated with particular reference to the effects of treatment with neuraminidase on the corneal and conjunctival epithelium and conjunctival goblet cells. Neuraminidase-treated or untreated sections were examined with a fluorescence-labeled peanut agglutinin (PNA), Ricinus communis agglutinin-1 (RCA-1) or wheat germ agglutinin (WGA). In the neuraminidase-untreated tissues, the apical or basal part of the goblet cells was sparsely stained with PNA. By treatment of sections with neuraminidase, the surface of the corneal and conjunctival epithelium, the apical layer of the corneal epithelium, and many goblet cells (the whole part) were newly stained with PNA. With or without treatment with neuraminidase, RCA-1 bound sparsely to the basal membrane of the corneal and conjunctival epithelium and to entire goblet cells. The intensity of the WGA binding on the surface and the basal membrane of the corneal and conjunctival epithelium, apical layer of corneal epithelium, and many entire goblet cells was decreased by neuraminidase treatment. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1354—1358, 1988)

Key words: Corneal epithelium, Conjunctival epithelium, Goblet cell, Lectin, Neuraminidase

別刷請求先: 890 鹿児島市宇宿町1208—1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行 (昭和63年4月6日受付)

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kagoshima Univ. Faculty of Med., 1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, Japan

(Accepted for publication April 6, 1988)

I 緒 言

結膜杯細胞由来の粘液複合糖質は、涙液膜の生理学的維持のために重要な役割を果たしている¹⁾。また、角膜および結膜の複合糖質は、上皮細胞をはじめとしてその発生、分化、増殖、創傷治癒過程、さらに種々の角膜、結膜疾患の発症機序に関与している可能性が示唆されている^{2)~5)}。一方、レクチンは特定の糖鎖構造を認識して結合する性質を有し、種々の組織の複合糖質の研究に広く用いられてきており、我々は、正常結膜の杯細胞のレクチン結合性について先に報告した⁶⁾。我々は、種々の眼組織における複合糖質糖鎖末端のシアル酸の生理学的意義に注目した研究を進めているが、今回角膜・結膜上皮および結膜杯細胞の複合糖質についても、シアル酸を中心とした観点から検索なおしてみることにした。すなわち、糖鎖末端のシアル酸を切断する酵素であるノイラミダーゼを作用させて生じる角膜・結膜上皮および結膜杯細胞のレクチン結合性の変化を観察することによって、本組織におけるシアル酸の重要性について考察した。

II 方 法

日本ザル (*Macaca fuscata*) 4 頭から、ケタラール筋注麻酔下に、球結膜を幅広く (5~10mm) 含んで眼球を摘出し、バッファーホルマリソ液 (10%ホルマリソ、4%燐酸緩衝液、pH7.3) 中で24時間固定した。前眼部組織を切り離し、パラフィン包埋、切片 (5 μ m) を作製した。組織切片は、下記のいずれかの方法で処理したあと、蛍光顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

蛍光標識レクチン (E-Y Laboratories, USA) としてピーナツレクチン (PNA)、ヒママメレクチン (RCA-1) およびコムギハイガレクチン (WGA) を用いた。各レクチンとも0.05mg/mlの濃度となるようにPBSに溶解するとともに、コントロールとしてさらにそれぞれ0.2M となるようにハブテン糖 (PNA, RCA-1: D-galactose; WGA: N-acetyl-D-glucosamine) を加えた。

1) 切片を pH5.0 の酢酸-NaOH 緩衝液 0.2ml に 37℃、2 時間浸漬したあと、上記のレクチン溶液あるいはレクチン-ハブテン糖混合液 0.3ml に室温、30 時間浸漬した。

2) 切片をノイラミダーゼ (半井化学, 1U/ml, 酢酸-NaOH 緩衝液, pH5.0) 溶液 0.2ml に 37℃、2 時間浸漬したあと、上記のレクチン溶液あるいはレクチン

-ハブテン糖混合液 0.3ml に室温、30 時間浸漬した。それぞれレクチン溶液浸漬切片とレクチン-ハブテン糖混合液浸漬切片とを比較し、蛍光強度に差が認められた場合、その部位をレクチン反応部位と判定した。

III 結 果

FITC-PNA, RCA-1 および WGA の角膜・結膜上皮、結膜杯細胞に対する染色性のノイラミダーゼ処理による変化について表 1 に示した。これらの染色部位の蛍光は、自家蛍光と明らかに識別しうることと、ハブテン糖の存在下でその強さが減弱することから、特異的に各々のレクチンが反応、結合した部位と判定された。

結膜杯細胞に関して、連続切片の同一区間の部位について比較すると、ノイラミダーゼ未処理の切片では、WGA で最も数が多く密に (8~10/1 視野) 染色されたのに対し、PNA および RCA-1 ではまばらにしか (PNA: 2~6/1 視野; RCA-1: 0~1/1 視野) 染色されなかった (図 1a)。ノイラミダーゼ処理した切片では、WGA および RCA-1 に反応する杯細胞の数は、処理前と比較してほとんど変化しなかった (WGA: 8~10/1 視野、染色の強さはわずかに減弱; RCA-1: 0~1/1 視野) のに対し、PNA に反応する杯細胞の数は明らかに増加 (7~10/1 視野) している像が観察された (図 1b)。さらに PNA による杯細胞の染色像は、ノイラミダーゼ処理の有無によって異なっていた。すなわち、ノイラミダーゼ未処理の場合、

表 1 角膜・結膜上皮、結膜杯細胞のレクチン染色性のノイラミダーゼ処理による変化

レクチン	PNA		RCA-1		WGA	
	無	有	無	有	無	有
角膜上皮	最表層	—	+	—	—	+
	表層細胞	—	+	—	—	+
	基底細胞	—	—	—	—	—
	基底膜	—	—	+	+	±
結膜上皮	最表層	—	+	—	—	+
	杯細胞	+ ^a	+ ^b	+	+	+
	基底膜	—	—	+	+	—

(注) +: 強染; ++: 中等度染; +: 弱染; —: 染まらず
+^a: 結膜上皮表層側あるいは基底側に杯細胞の約 2/3 大以下の大きさの染色像がまばらに観察された。
+^b: a の所見の他に内部全体がびまん性に染色された杯細胞が密に観察された。

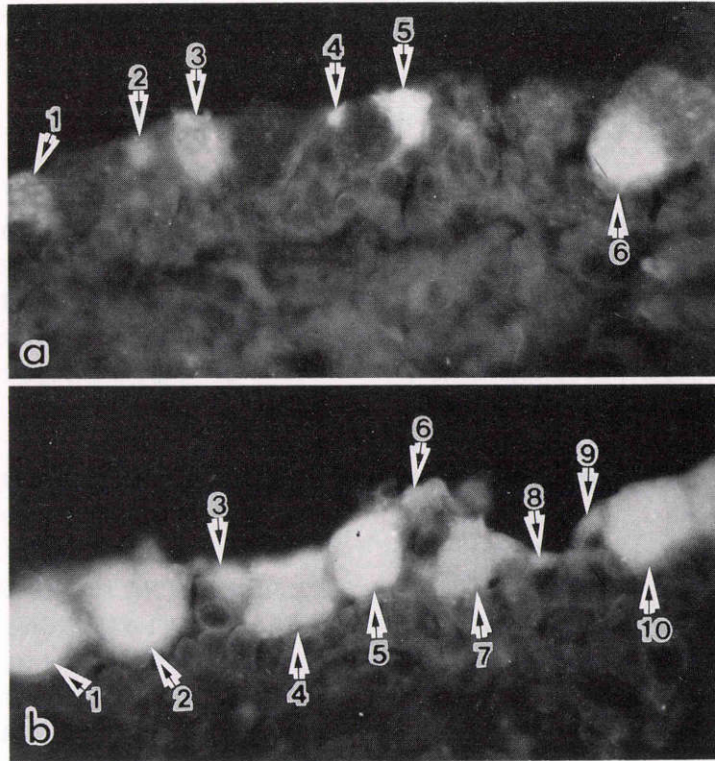


図1 結膜上皮・杯細胞の FITC-PNA 染色像 (×300)

a: ノイラミニダーゼ未処理; B: ノイラミニダーゼ処理後

結膜上皮表層(図1a: 矢印1~5)あるいは基底側(図1a: 矢印6)に杯細胞一個の大きさの2/3大以下の染色像が観察された。ノイラミニダーゼ処理した場合、未処理のものと同様の染色像(図1b: 矢印3, 6)にさらに杯細胞内全体がびまん性に染色された像(図1b: 矢印1, 2, 4, 5, 7, 10)および上皮表面の染色像(図1b: 矢印8, 9他1から10に至る杯細胞の表層にもさらに細長く強い蛍光を認め、水平方向につながった染色像として観察される)が加わった。

一方、角膜上皮に関しては、ノイラミニダーゼ未処理の切片ではその最表面、表層の扁平な細胞の辺縁および基底膜がWGAによって染色された。RCA-1では角膜・結膜上皮の基底膜のあたりが細長く染色された。PNAでは特異的な染色像は観察されなかった(図2a)。ノイラミニダーゼ処理した切片では、新たに角膜上皮の最表面が細長く強く、表層細胞の辺縁が弱くPNAで染色されるようになった(図2b)。WGAによる角膜上皮の染色性は全体的に減弱した。RCA-1では未処理の場合と同様の染色像を示し、とくに変化は認

められなかった。

IV 考 按

角膜上皮と結膜上皮および結膜杯細胞のレクチン結合性は、ノイラミニダーゼ処理によって同様の変化を示した。すなわち、ノイラミニダーゼ処理によってWGAの染色性がわずかに減弱するとともに、PNAの染色性が増大した。WGAはシアル酸およびN-アセチルグルコサミンを⁷⁾、PNAはガラクトース $\beta 1 \rightarrow 3$ N-アセチルガラクトサミン(Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc)を特異的に認識して結合する性質を有する⁸⁾。従って角膜・結膜上皮の表面、角膜上皮表層細胞および結膜杯細胞には、通常シアル酸を糖鎖非還元末端に、その糖鎖内側にGal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAcを有する共通のあるいは類似の複合糖質(ムチン型)が存在していることが推定される。そしてノイラミニダーゼ未処理の状態ではWGAがシアル酸に結合し、ノイラミニダーゼ処理した状態では末端のシアル酸が一部除去されることによって内側のGal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAcが露出され、PNA

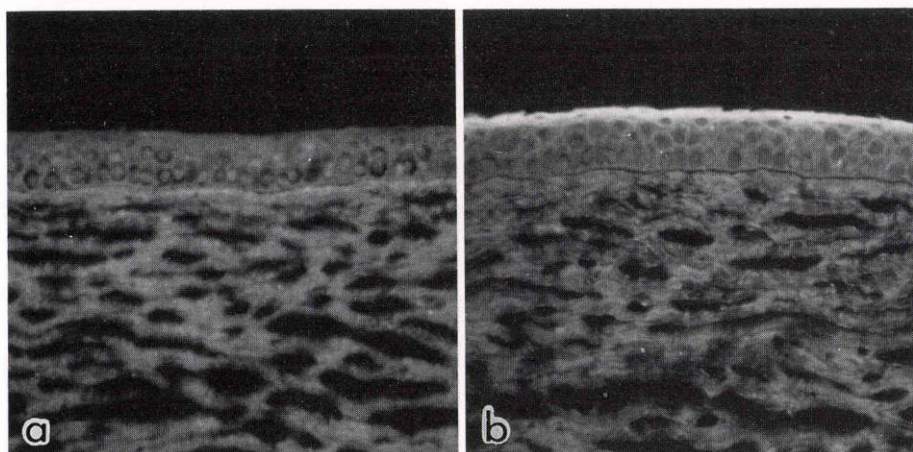


図2 角膜上皮の FITC-PNA 染色像 (×300)

a: ノイラミニダーゼ未処理; b: ノイラミニダーゼ処理後

に反応するようになったものと考えられる。一方、ノイラミダーゼ処理の有無にかかわらず RCA-1 (血清型複合糖質糖鎖に結合⁹⁾) は、角膜・結膜上皮の基底膜に結合したが、角膜・結膜上皮表層への結合はみられなかったことから、角膜・結膜上皮表面に存在する複合糖質は通常ムチン型のもので、これが感染防御その他に重要な役割を果しているものと推定される。

角膜・結膜上皮表層のレクチン結合部位については、細胞膜、微絨毛突起、涙液膜のいずれか、あるいはそれらの複合したものが考えられるが、明確に同定するためには電顕的検索を要する。角膜上皮の基底側細胞にはムチン型の複合糖質が少ないが、表層細胞には多いことが、その WGA およびノイラミニダーゼ処理後の PNA 染色性から示唆された。この点に関しては、二つの可能性が考えられる。すなわち、角膜上皮細胞が基底側から表層側へ移行するにつれて同複合糖質を産生するように分化するか、またはこれらの物質は結膜上皮、とくに杯細胞に由来するムチンであるかであろう。ヒトと家兎では角膜上皮細胞膜に、シアル酸-Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc 糖鎖を有する複合糖質の存在が報告されている¹⁰⁾。また、マウスでは角膜・結膜上皮の表面に糖鎖末端にシアル酸を有するムチンの存在することが報告されている¹¹⁾。本研究で、角膜・結膜上皮の表面に帯状にみられた物質は、このムチンに相当するかもしれない。

ところで赤血球は、未熟なものは膜複合糖質のガラクトース (Gal) 残基が露出しているが、成熟することによってシアル酸が結合し、Gal 残基はマスクされて

しまい、さらに老化することによって糖鎖末端のシアル酸が減少し、再度 Gal 残基が露出することによって、それが網内系細胞に認識されて貪食されるのではないかと考えられている¹²⁾。結膜杯細胞についても同様の仮説を導入するならば、ノイラミニダーゼ未処理の切片で PNA によって染色された結膜上皮基底側の杯細胞は未熟な細胞を、結膜上皮表層側の細胞は老化した細胞の染色像をとらえたものかもしれない。一方、杯細胞の未熟、成熟、老化というとりえ方ではなく、あくまでもノイラミニダーゼ未処理切片で PNA で染色される細胞と、処理した切片で新たに PNA で染色される細胞とは別種 (型) の細胞であるとの考え方も成り立つであろう。すなわち、未処理の切片で PNA によって結膜上皮表層側に染色された細胞は、杯細胞ではなく、非杯細胞型第二ムチン分泌細胞 (II 型細胞: 表層側細胞質に分泌顆粒を豊富に含有する¹³⁾) である可能性もある。用いたレクチンで染色されたのは分泌顆粒なのかどうかという点を含め、電顕的検索を要する課題であろう。

次に、RCA-1 によって染色される結膜杯細胞は、数が少なく、ノイラミニダーゼ処理の有無にかかわらずとくに変化しなかったことは、このレクチンが結合するとされる血清型複合糖質が杯細胞に存在はするが、それを含む杯細胞の数が少ないことを表しているであろう。ムチン型と血清型の複合糖質の両者をともに含有する少数の杯細胞が存在するのか、それぞれ一方だけ含有する二型以上の杯細胞が存在するのかについては、今後超薄連続切片、あるいは同一切片の二重染色

法を用いたレクチン組織化学によって明らかにしていく必要がある。

文 献

- 1) **Van Haeringen NJ**: Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol* 26: 84—96, 1981.
- 2) **Hassell JR, Newsome DA, deLuca LM**: Increased biosynthesis of specific glycoconjugates in rat corneal epithelium following treatment with vitamin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 642—647, 1980.
- 3) **Gipson IK, Anderson RA**: Effect of lectins on migration of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 341—349, 1980.
- 4) **Kawano K, Uehara F, Ohba N**: Lectin-cytochemical study on epithelial mucus glycoprotein of conjunctiva and pterygium. *Exp Eye Res*, in press, 1988.
- 5) 上原文行, 村松 喬, 大庭紀雄他: 翼状片の病態に対する生化学的アプローチ, SDS-ゲル, ^{125}I 標識レクチンを用いた糖タンパクの分析, *臨眼* 37: 1049—1053, 1983.
- 6) **Kawano K, Uehara F, Ohba N, et al**: Application of lectins for detection of goblet cell carbohydrates of the human conjunctiva. *Exp Eye Res* 38: 439—447, 1984.
- 7) **Nagata Y, Burger MM**: Wheat germ agglutinin: Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem* 249: 3116—3122, 1974.
- 8) **Lotan R, Skutelsky E, Danon D, et al**: The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 250: 8518—8523, 1975.
- 9) **Olsness S**: Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean. *Methods in Enzymology* 50: 330—335, 1978.
- 10) **Panjwani N, Moulton P, Alroy J, et al**: Localization of lectin binding sites in human, cat and rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1280—1284, 1986.
- 11) **Wells PA, Hazlett LD**: Complex carbohydrates at the ocular surfaces of the mouse: An ultrastructural and cytochemical analysis. *Exp Eye Res* 39: 19—35, 1984.
- 12) **Aminoff D, Bruegge WFV, Vell WC, et al**: Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1521—1524, 1977.
- 13) **Rohen JW, Stenuhl P**: Specialized cell types and their regional distribution in the conjunctival epithelium of the cynomolgus monkey. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 59—63, 1982.