

網膜視細胞間基質に対するモノクローナル抗体の作製 (図4)

富 宿 紀 夫 (鹿児島大学医学部眼科学教室)

Monoclonal Antibodies against Interphotoreceptor Matrix

Norio Fushuku

Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

要 約

網膜視細胞間基質 (interphotoreceptor matrix, IPM) は、網膜視細胞機能に重要な役割を果たしている事が知られてきている。本研究では、IPMの詳細な解析の手がかりとするために、IPMを抗原としたモノクローナル抗体の作製を試みた。ウシ網膜IPMを抗原として、2種類のモノクローナル抗体(IPMA-17, IPMA-2)が得られたが、このうちIPMA-17は免疫組織学的に視細胞杆体の内節と強く反応し、免疫電気泳動上、9万5千の分子量の物質を認識した。IPMA-2は錐体、杆体の両者に反応した。(日眼 92:670—675, 1988)

キーワード：網膜視細胞間基質，モノクローナル抗体，視細胞層，杆体内節

Abstract

Interphotoreceptor matrix (IPM) has been assumed to be involved in the functional organization of retinal photoreceptors. We attempted to establish monoclonal antibodies against IPM in order to elucidate the function of IPM, and as a result succeeded in establishing two monoclonal antibodies (IPMA-17, IPMA-2). IPMA-17 reacted with rod inner segment, and recognized a 95,000 molecular weight substance of bovine IPM, and IPMA-2 reacted with both rods and cones. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:670—675, 1988)

Key words: Interphotoreceptor matrix, Monoclonal antibody, Photoreceptor cell, Rod inner segment

I 緒 言

網膜視細胞間基質 (interphotoreceptor matrix, IPM と省略) は、網膜視細胞と色素上皮との接着、色素上皮による貪食作用、レチノール運搬、視細胞の形態保持など種々の役割を果たしていると考えられ、重要な研究対象となっている^{1)~4)}。レクチン組織化学を用いた方法^{5)~8)}や酵素処理を応用して組織染色性の違いをみる方法⁹⁾¹⁰⁾で IPM の成分や構造の多様性が検討されてきたが、IPM は均一な物質ではなく、組織学的に異なる部位の IPM は成分や構造が異なる事が予想される。そこで、IPM の微細構造の解析や構成成分

の単離へと進むためには、IPM を抗原としたモノクローナル抗体の作製が重要であると考え、今回の実験をおこなった。

II 実験方法

1. IPM の調整

新鮮なウシ眼球を赤道部に沿って2分割、硝子体を除去し眼球後半部を得た。網膜血管を軽く圧迫して血液をできるだけ除き、神経網膜をおだやかに色素上皮から剥離した。得られた網膜片の視細胞層の面を、Dulbecco リン酸緩衝液の中で軽くすすぎ、得られた水溶液を8,000回転で10分間遠心し、不溶性不純物を除い

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 富宿 紀夫 (昭和62年11月19日受付)

Reprint requests to: Norio Fushuku, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kagoshima Univ. Faculty of Med.

1208-1 Usuki-cho, Kagoshima 890, Japan

(Accepted November 19, 1987)

た上清を抗原として用いた。以上の操作は4℃でおこなった。20個の眼球から蛋白量90mg(Lowry 法¹¹⁾による定量)が得られた。

2. 免疫

6週齢の雄マウス(Balb/c, 日本クレア)を用いた。2週間おきに合計4回の免疫を行った。1回目から3回目まではマウス背部皮下に、最終回は腹腔内に、それぞれIPM蛋白量180 μ gを注射した。1回目は完全フロインド・アジュバントを、それ以後は不完全フロインド・アジュバントを抗原とそれぞれ等量混合し、懸濁液として注射した。

3. 細胞融合と選択

標準的方法を用いておこなった¹²⁾。すなわち、最終免疫後3日目に脾臓を摘出、脾細胞と骨髓腫細胞(NS-1)を5:1の割合で混合、1,500回転で5分間遠心し細胞塊を得た。これにポリエチレングリコール4,000(和光純薬)を加え、攪拌・振盪し細胞融合を行った。ハイブリドーマを96穴マイクロテストプレート(Falcon 3072)にまき込み、培養器中(37℃, 10%炭酸ガス)で15%FCS-RPMI 1640培地を用いて培養した。スクリーニングは、抗原としたIPM 400ng/wellずつをコートしたアッセイプレート(Falcon 2184)を用いたELISA法、およびグルタルアルデヒド固定したサル網膜を直接染色する方法を併用して行った。これにより抗体価陽性wellを選び、限界希釈法でクローニングした。このようにして得られた2種類のクローンを便宜的に、interphotoreceptor matrix antibody-17, 2(IPMA-17, IPMA-2)と名付け、その培養上清を実験に使用した。

4. 免疫組織化学

ニホンザル(*Macaca fuscata*)の眼球を摘出し3%グルタルアルデヒドで固定した。網膜のパラフィン切片を作り、型のごとく脱パラし、3%過酸化水素水に5分間浸して内因性ペルオキシダーゼ活性を阻した。抗体を4℃, 16時間反応させ、次ぎにビオチン化IgGおよびアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体をそれぞれ室温で1時間反応させた。各反応後に組織をPBSで充分に洗浄してジアミノベンチジンで発色させた。これらの組織染色はVector社のABCキットを用いて行い、光学顕微鏡により観察した。なお、コントロールとして、一次抗体の代わりにNS-1培養上清を用い、それ以外の染色操作は全く同様に行った試料を観察した。

5. 免疫電気泳動

IPM 1.2ml(蛋白量1.8mg/ml)をエタノール沈澱し、SDS可溶化緩衝液(2.3%SDS, 10% glycerol, 5%2-mercaptoethanol, 6.25mM Tris-HCl, pH 6.8) 1.0mlを加え、室温で一晩静置、可溶化した。サンプルを5分間、100℃で加熱しゲルに載せた。10%アクリルアミド分離スラブゲルと5%アクリルアミドスタッキングゲルを用い、Laemmliの方法に準じて泳動した¹³⁾。すなわち、15mAで30分、30mAで1時間通電し、ゲルの一部はそのままクーマジーブルーで蛋白染色、残りはニトロセルロース膜にトランスファーさせた¹⁴⁾。ニトロセルロース膜を0.05%Tween 20, 0.9% NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.5)で処理したのち、一次抗体としてモノクローナル抗体を、二次抗体として100倍希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGをそれぞれ60分ずつ反応させた。発色基質には4-クロロ-1-ナフトール(和光純薬)を使用した。

6. モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラス決定

抗原をコートしたアッセイプレート(Falcon 2184)を使用した。Zymed社のモノクローナル抗体EIAキットを用いてクラスの決定を行った。

III 結 果

1. 免疫組織化学

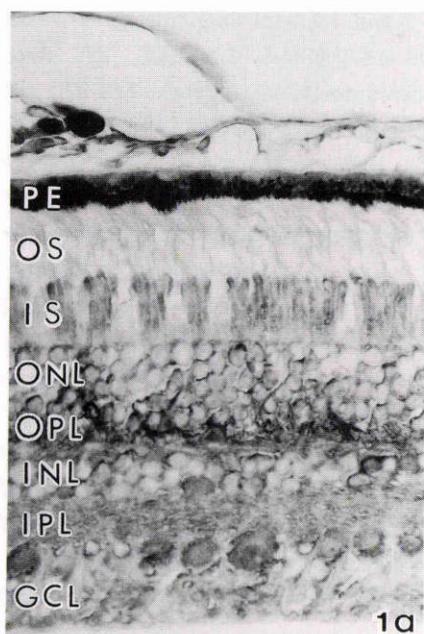
1) IPMA-17 (図 1a, 1b)

視細胞層: 杆体内節の先端近くが濃く染まり、錐体内節では基部がうっすらと染まるが内節上半は染色されていない。外節は両者とも染まっていない。ただし、色素上皮近くでは、線維状に密に見え内節寄りの下半分では空腔状に淡く見える。また、色素上皮は細胞質が濃く染まっている。

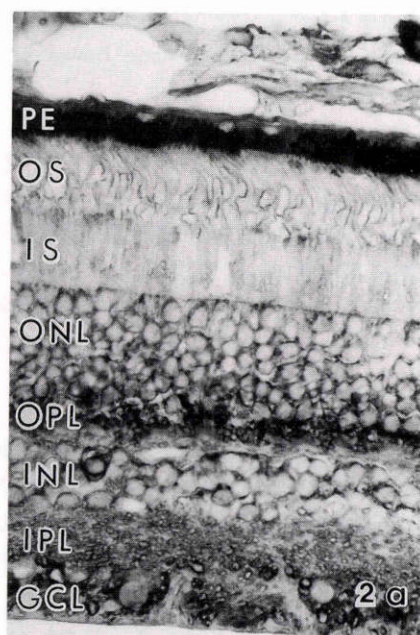
外顆粒層: 外境界膜が点状に連なって染まっており特に杆体の部分で濃く染まっている。顆粒層では細胞の周囲(膜もしくは間質)が染まり、細胞質もうすく染まっている。また、杆体細胞の細胞質に相当する部分が濃く染まっている。

外網状層: 網膜各層の中で、一番強く染まっている。外顆粒層寄りに濃く染まった部分が点在しているが、錐体根足と杆体小球では異なる染色性を示している。前者は偏平で大きく均一に染まり、後者は顆粒状で不均一に濃く染まっている。

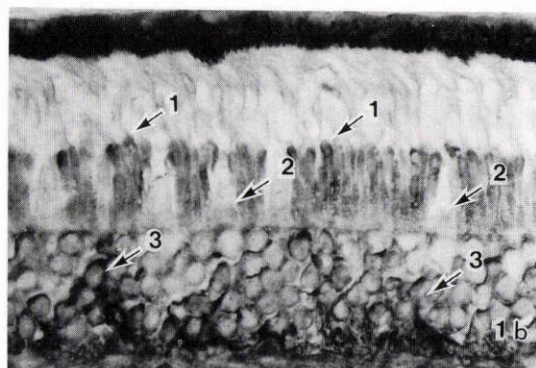
内顆粒層: 外顆粒層と同じような染色像を呈している。内層の所々に濃く染まった細胞があり、その細胞質が染まっている。



a. IPMA-17を4℃, 16時間反応後, ビオチン化IgGを室温で1時間, アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体を室温で1時間反応させ, ジアミノペンチジンで発色した. 視細胞層において外節部分は带状に白くぬけて染色されていないが, 内節部分は濃く染まっている.

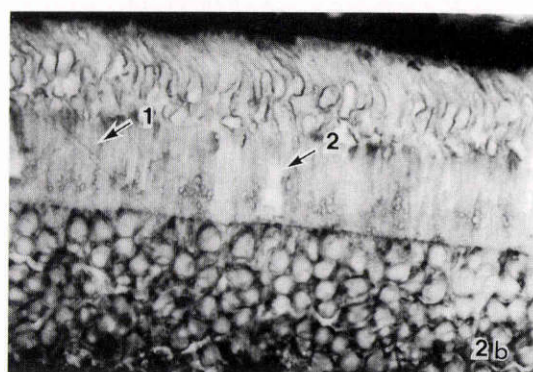


a. IPMA-2を用い図1と同様の操作で染色した. 視細胞層は, 外節, 内節ともほぼ均一に染色されている.



b. 強拡大で見ると, 杆体内節の先端近くが濃く染まり(矢印①), 錐体内節は基部がうっすらと染まる(矢印②). それ以外は染まっていない. 外顆粒層では, 杆体細胞の細胞質に相当する部分が濃く染まっている(矢印③).

図1 3%グルタルアルデヒド固定サル網膜 (a: 100倍, b: 200倍), PE: 色素上皮層, OS: 外節, IS: 内節, ONL: 外顆粒層, OPL: 外網状層, INL: 内顆粒層, IPL: 内網状層, GCL: 神経節細胞層



b. 強拡大で見ると, 杆体内節は内部が染まり(矢印①), 錐体内節は先端近くが淡く染まっている(矢印②). 外顆粒層では細胞質が染まっているが, IPMA-17と異なり杆体細胞と錐体細胞の染色性に差はない.

図2 3%グルタルアルデヒド固定サル網膜 (a: 100倍, b: 200倍)

内網状層: 外網状層ほどではないが染色されている. 線状に染まって見えるので膜もしくは間質が染まっていると考えられる.

神経節細胞層: かなり濃く染まっている. 細胞質が染まり, 核もある程度は染まっている.

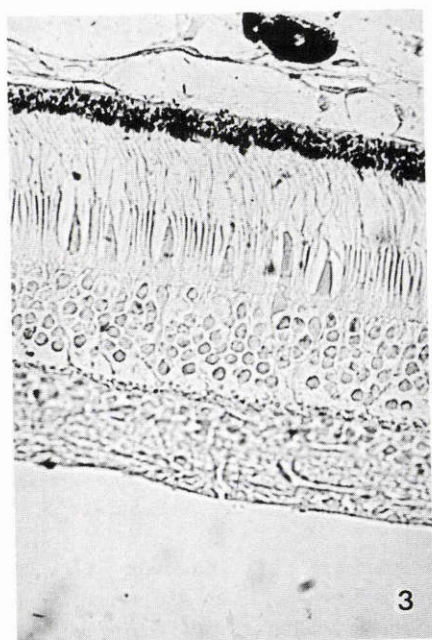


図3 3%グルタルアルデヒド固定サル網膜 (100倍)。コントロールとして一次抗体の代わりにNS-1培養上清を反応させた。色素上皮が濃く見えるが、その他の網膜は全く染まっていない。

神経線維層：淡いが染まっている。内網状層と同じ程度の染まり具合である。

その他：脈絡膜では色素細胞が濃く染まっている。

2) IPMA-2 (図 2a, 2b)

視細胞層：杆体内節は内部が染まり錐体内節は透明なキャップをかぶせたように見える。外節は全体に濃く染まっているが、杆体外節内部は染まっていない。

外顆粒層：外境界膜は強く染まっている。細胞質が染まっており核は染まっていない。

外網状層：外顆粒層側の線維が染まっている。杆体小球もしくは錐体根足と考えられる。

内顆粒層、内網状層：び漫性に染色されている。

神経節細胞層：細胞質も核も染まっている。核が淡くそまつなものもある。

3) コントロール (図 3)

色素上皮が黒色にみえるだけで網膜は、全層にわたって染まっていない。

2. 免疫電気泳動 (図 4)

A, B レーンはクーマジーブルーによる蛋白染色を示す。A レーンは、標準とした分子量マーカーである。B レーンは、抗原とした IPM の泳動像で、分子量15万

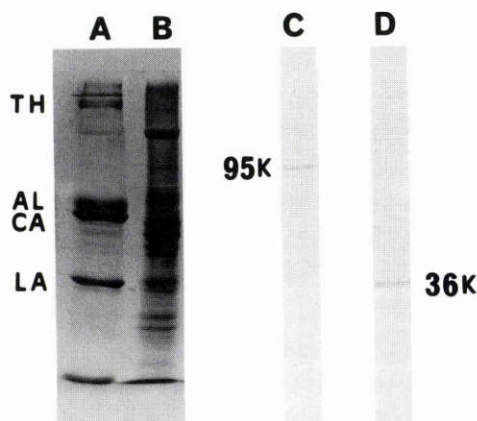


図4 ウシ網膜 IPM の免疫電気泳動。A レーン：標準とした分子量マーカー、チログロブリン (TH) 33万ダルトン、アルブミン (AL) 6 万 7 千、カタラーゼ (CA) 6 万、乳酸脱水素酵素 (LA) 3 万 6 千。B レーン：ウシ網膜 IPM のクーマジーブルー染色。分子量15万から3万付近まで多くのバンドをみとめる。C レーン：ウエスタンブロッティング。ウシ網膜 IPM を泳動後、ゲルからニトロセルロース膜に移し、IPMA-17を反応させた。分子量9万5千の位置にシングルバンドを形成している。D レーン：ウエスタンブロッティング。IPMA-2を用いてC レーンと同様の操作を行った。分子量3万6千の位置にシングルバンドを形成している。

から3万付近まで多くのバンドを含んでいた。C, D レーンは、実験方法に記載した如く、ニトロセルロース膜にウエスタンブロッティングによりトランスファーした IPM の抗体反応像である。C レーンは IPMA-17, D レーンは IPMA-2を反応させた結果で、IPMA-17は分子量9万5千、IPMA-2は3万6千の物質と反応し、シングルバンドとして検出された。

3. 免疫グロブリンのクラス決定

抗体はいずれも IgM に属していた。

IV 考 按

まず使用した抗原について述べたい。抗原としたウシ網膜すじ液は、クーマジーブルー染色の電気泳動像で、分子量15万から3万付近まで多くのバンドを含んでおり、そのパターンは Uehara ら⁶⁾, Adler ら¹⁵⁾の報告とほぼ一致していた。このことから、今回の実験に用いた抗原は、彼らの言う IPM と同様の蛋白成分を含み、得られたモノクローナル抗体は IPM に対するものであると考えてよいであろう。

上記の抗原を用いて得られたモノクローナル抗体のうち、IPMA-17は杆体内節の先端近くと強く反応しており、錐体とは内節基部がうすく染まるのみでほとんど反応しなかったことが注目される。IPMが杆体、錐体の周囲でそれぞれ異なる成分、構造を持つであろう事は、レクチン組織化学によるいくつかの実験^{5)~7)16)17)}から示唆されている。すなわち、PNAレクチンが錐体周囲のIPMと特異的に反応し、WGAレクチンが杆体周囲のIPMと特異的に反応する事が示されている。さらに、Sameshimaらにより初めて電子顕微鏡的にそれが確認された⁸⁾。また、錐体周囲のIPMが鞘状の特殊な構造を持っているという報告⁷⁾も併せて考えると、視細胞の種類により、その周囲のIPMが異なる特性を持つ事が強く示唆されIPMA-17の染色性の特徴はこのことと矛盾しない。

外顆粒層で杆体細胞の細胞質に相当する部分が濃く染まり、外網状層では錐体根足と杆体小球が異なる染色性を示した。これは杆体内節と同様の抗原決定基が顆粒層、網状層の特に杆体と関係の深い場所に存在している事を示唆する。換言すれば、一つの視細胞とそれに対応する情報伝達路の細胞が同一もしくは類似した抗原物質を保持していることを意味する。このような共通抗原物質の役割、意義については不明であるが、視細胞層では杆体内節に特異的に存在し、顆粒層、網状層では特異性が弱く杆体に連なる細胞以外にも広がっていると考ええると、視細胞層から外顆粒層、外網状層へとこの抗原物質が視覚情報伝達路に沿って（もしくは視覚に関係する神経細胞の軸索流に乗って）中枢の方へ移動している事を示唆する所見と考えられる。これは、網膜下腔に注入したレクチンが軸索流に乗って中枢側へ移動するという所見¹⁸⁾とも合致する結果である。

一方、IPMA-2は電気泳動上IPMA-17よりも小さな分子量の物質を認識する抗体であり、組織との結合特異性が弱かったが、各組織に共通する抗原物質、たとえば血液成分などに対する抗体である可能性も強い。

IPMは、網膜視細胞と色素上皮との間に存在し、視細胞と色素上皮との接着、色素上皮による視細胞外節の貪食、レチノールの運搬、視細胞の形態保持などに関与し、近年とみにその重要性がクローズアップされている^{1)~4)}。IPMの成分についてイオン交換クロマトグラフィーとアフィニティークロマトグラフィーによる分析結果¹⁹⁾がある。これはIPM全体を対象としたもので、IPM内部の成分の局在は表していない。今回得

られたモノクローナル抗体IPMA-17は、その染色性の特徴から、IPMが視細胞の種類や部位に依存した成分、構造を持つという報告^{5)~10)}をさらに支持するものである。また、IPMの産生、分解を含めた動態に視細胞から中枢へ続く情報伝達路を介した流れ（軸索流）が大きな役割を果たしている可能性を示しているものといえるであろう。

稿を終わるにあたり、御指導いただきました鹿児島大学医学部眼科学教室、大庭紀雄教授、上原文行講師、鮫島宗文講師、ならびに第二生化学教室、村松 喬教授、村松寿子助手に感謝いたします。

本論文の要旨は第91回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) Sidman RL: Histochemical studies on photoreceptor cells. *Ann NY Acad Sci* 74: 182—195, 1958.
- 2) Zimmerman LE, Eastham AB: Acid mucopolysaccharide in the retinal pigment epithelium and visual cell layer of the developing mouse eye. *Am J Ophthalmol* 47: 488—499, 1959.
- 3) Feeney L: Synthesis of interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol* 122: 739—751, 1973.
- 4) Feeney L: The interphotoreceptor space. II. Histochemistry of the matrix. *Dev Biol* 32: 115—128, 1973.
- 5) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, et al: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. *Exp Eye Res* 36: 113—123, 1983.
- 6) Uehara F, Muramatsu T, Ozawa M, et al: Purification of antibody against peanut agglutinin-receptors of bovine interphotoreceptor matrix. *Jpn J Ophthalmol* 30: 56—62, 1986.
- 7) Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC: Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 129—135, 1986.
- 8) Sameshima M, Uehara F, Ohba N: Specialization of the interphotoreceptor matrices around cone and rod photoreceptor cells in the monkey retina, as revealed by lectin cytochemistry. *Exp Eye Res* 45: 845—863, 1987.
- 9) LaVail MM, Pinto LH, Yasumura D: The interphotoreceptor matrix in rats with inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 658—668, 1981.
- 10) Porrelo K, Yasumura D, LaVail MM: The interphotoreceptor matrix in RCS rats: Histochemical analysis and correlation with the rate

- of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 43: 413—429, 1986.
- 11) **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 12) **Kohler G, Milstein C**: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495—497, 1975.
- 13) **Laemmli UK**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—685, 1970.
- 14) **Towbin H, Staehelin T, Gordon J**: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350—4354, 1979.
- 15) **Adler AJ, Severin KM**: Proteins of the bovine interphotoreceptor matrix: Tissues of origin. *Exp Eye Res* 32: 755—769, 1981.
- 16) **Hicks D, Molday RS**: Localization of lectin receptors on bovine photoreceptor cells using dextran-gold markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1002—1013, 1985.
- 17) **Blanks JC, Johnson LV**: Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells, a species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 546—557, 1984.
- 18) 内匠勝秀, 上原文行, 大庭紀雄他: 網膜下腔レクチン注入により引き起こされる網膜変化(第III報), あたらしい眼科 4: 1465—1467, 1987.
- 19) **Adler AJ, Klucznik KM**: Proteins and glycoproteins of the bovine interphotoreceptor matrix: Composition and fractionation. *Exp Eye Res* 34: 423—434, 1982.
- (第91回日眼総会原著)
-