

ヒトプレアルブミンの毛様体上皮および 網膜における局在について (図2)

稲田 晃 一 郎 (熊本大学医学部眼科学教室)

Localization of Human Prealbumin in Ciliary Epithelium and Retina

Koichiro Inada

Department of Ophthalmology, Kumamoto University Medical School

要 約

Prealbumin (PA) のヒト眼内における存在部位を peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法を用いて光学顕微鏡にて観察した。その結果、使用した4眼ともに、毛様体扁平部および突起部の無色素上皮層に強い染色性を示し、この部位に PA の局在を認めた。また、網膜 (sensory retina) では、神経節細胞が染まり、内顆粒層のうち最も内側の細胞も染まった。さらに、房水中の PA 濃度が比較的高いことを考えると、これが、眼内で局所産生されている可能性が高いことが示唆され、網膜の神経要素になんらかの影響を及ぼしているのではないかと考えられる。(日眼 92:741—745, 1988)

キーワード: プレアルブミン, 毛様体上皮, 網膜神経節細胞, パーオキシ-抗パーオキシダーゼ法

Abstract

Aqueous humor has several serum proteins and the concentration of each of the proteins is very low in normal eyes. The aqueous/serum ratio of prealbumin was reported to be higher than those of other human aqueous proteins in a previous paper. To investigate the possibility of synthesis of prealbumin, human eyes were examined using the peroxidase-antiperoxidase method. The immunohistochemical survey revealed the presence of prealbumin in the non-pigmented layer of the ciliary epithelium and the ganglion cell layer of the retina. Some cells situated on the inner side of the internal nuclear layer of the retina also showed staining. This study demonstrated the possibility of synthesis of prealbumin in human eye by immunohistochemistry. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:741—745, 1988)

Key words: prealbumin, ciliary epithelium, ganglion cell, peroxidase-antiperoxidase method

I 緒 言

ヒト房水中には、血漿蛋白の0.1~0.2%というきわめて微量の蛋白が含まれている¹⁾。前報において、25歳の男性3名から得られた房水中に prealbumin (PA), albumin (Alb), α_1 -acid glycoprotein (α_1 AG) およ

び transferrin (Tf) を証明し、その定量を行い、これら4種の蛋白の房水/血清比を調べると、PA が²⁾、他の蛋白に比べてかなり大きいことがわかった²⁾。髄液においても、房水と同様に、PA の髄液/血清比が高いことが知られており³⁾、近年免疫組織化学および、c-DNA をもちいた hybridization による PA の mRNA の検

別刷請求先: 860 熊本市本荘1-1-1 熊本大学医学部眼科学教室 稲田晃一郎 (昭和63年1月11日受付)

Reprint requests to: Koichiro Inada, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kumamoto Univ. Medical School

1-1-1 Honjō, Kumamoto 860, Japan

(Accepted January 11, 1988)

出などの方法を用いてヒトの脳内の choroid plexus epithelium より PA が局所産生される可能性のあることが報告されている⁴⁾⁵⁾。最近日本、ポルトガル、スウェーデンの家族性アミロイドポリニューロパチーの患者のアミロイド線維蛋白が、PA のアミノ酸構造のうち、PA のモノマーの30番目のバリンがメチオニンに変化したものであり、この変化した PA が血中に存在していることが報告されたことより、PA が注目されてきている^{6)~8)}。眼科領域ではまだ PA の局所産生についての報告はなく、今回眼内における PA の局在を調べるために PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法を用いた免疫組織化学的方法にて研究を行った。

II 実験方法

1. 対象

PA の検出のため剖検で得られた眼球 4 眼を使用した。症例の年齢、性、および死因は、29歳、女性、呼吸不全、89歳、男性、心筋梗塞、91歳、男性、消化管出血、78歳、女性、原因不明、であった。

2. 免疫組織化学

得られた組織は中性ホルマリンにて固定の後、パラフィン包埋を行い、 $3\mu\text{m}$ の厚さに薄切した。切片は、0.2%ネオブレン W (日新 EM, 東京) を塗布したスライドグラスにはりつけた。脱パラフィンを 0.06M リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、PAP 法にて組織染色を行った。PAP 法には、1次抗体として抗ヒト PA 兎抗体 (DAKO, Denmark) を用い、コントロールとして無感作兎血清、抗ヒト retinol binding protein (RBP) 兎抗体、抗ヒト IgG 兎抗体 (DAKO, Denmark) を使用した。上記抗体は使用時に 0.06M PBS にて40または80倍に希釈して使用した。脱パラフィン後洗浄した組織は、3% H_2O_2 溶液と室温にて5分間反応させたのち、正常ブタ血清と20分反応させた。その後、組織は、希釈した1次抗体と約20分間反応させ、洗浄ののち、DAKO PAP KIT System K548を用いて PAP 法による組織染色を行った。最終的に、生じた PAP complex に H_2O_2 と 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) を加え、抗原の存在部位を赤褐色に染めた。核染色はマイヤー-ヘマトキシリンにて行った。

III 結 果

1次抗体に抗 PA 兎抗体を用いて PAP 法を行い、4 眼ともに毛様体扁平部および突起部の無色素上皮層

に強い染色性を示し、この部位に PA の局在をみとめた (Fig. 1A & 1B)。色素上皮層の細胞質も淡い染色性を示す部もあったが、色素顆粒のため詳細ははっきりしなかった。また網膜 (sensory retina) では、4 眼ともに神経節細胞が染色され (Fig. 2A)、内顆粒層のうち特に最も内網状層側の細胞が染まった (Fig. 2B)。ただし、網膜の染色性は毛様体無色素上皮層より弱かった。これらの免疫組織化学的所見には、年齢による差は認められなかった。1 眼 (29歳 女性) において紅彩、毛様体のプラズマ細胞が染まる所見も認められた。

コントロールとして用いた無感作の正常兎血清を用いたものは、まったく染色性を示さなかった (Fig. 1C & 2C)。また、抗 RBP および抗 IgG 抗体を用いた場合も、毛様体上皮や網膜 (sensory retina) は、はっきりとした染色性は示さなかった。抗 PA 抗体、抗 RBP 抗体、および抗 IgG 抗体を用いたいずれの場合も、脈絡膜、毛様体実質、結膜下組織は diffuse に組織が淡く染色され、血清成分の漏出があることが示された。

IV 考 案

房水中の PA に関しては、前報にて房水/血清比が他の蛋白に比べて高いことを示した²⁾。原は昭和30年すでに PA が特発性網膜剝離の網膜下液に存在することを報告し、この蛋白が脳脊髄液、網膜下液に特異なものであると報告した⁹⁾。その後、血清中や、房水中にも PA の存在が認められてきたが、髄液、房水などの細胞外液に PA の濃度が高いことから²⁾³⁾、この蛋白の脳内や眼内における局所産生の可能性が考えられる。実際、髄液に関しては、免疫組織化学的方法によってヒト脳内の choroid plexus epithelium に PA の存在が証明され⁴⁾⁵⁾、またヒト choroid plexus において PA の m-RNA が証明され、PA が choroid plexus から髄液中に局所産生されていることが報告された⁵⁾。また同様に、rat においても in situ hybridization⁵⁾¹⁰⁾ と培養¹¹⁾ によって、PA が choroid plexus にて産生されることが報告されている。そこで、眼内においても PA が局所産生されている可能性が考えられるため、今回 PAP 法にて PA の眼内の存在部位を検出した。

用いた4 眼ともに毛様体扁平部および突起部の無色素上皮に強い染色性を示した。房水の後房内への産生は、主に毛様体の無色素上皮中に存在する transport system が重要であることが報告されており¹²⁾、眼科領域では始めて、この部位に PA の局在が証明されたこ



Fig. 1A

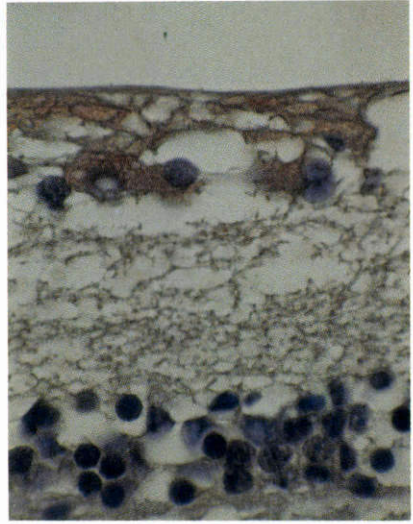


Fig. 2A

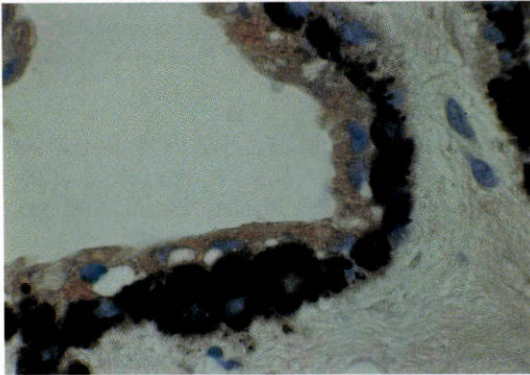


Fig. 1B

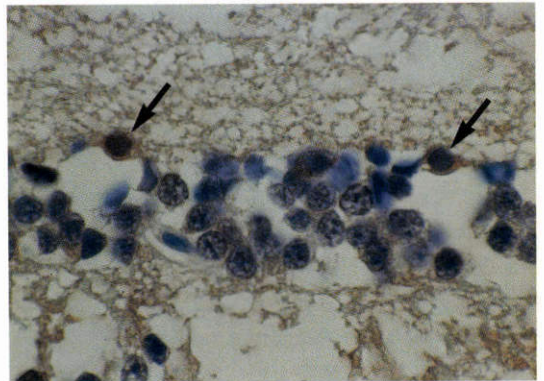


Fig. 2B



Fig. 1C

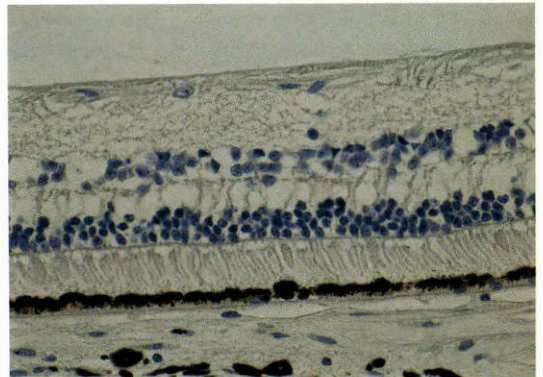


Fig. 2C

とから毛様体無色素上皮における PA の局所産生が強く示唆される。

また、網膜においては4眼ともに神経節細胞が染まり、また内顆粒層の細胞のうち、最も内網状層側の細胞が染まっていた。後者はアマクリン細胞である可能性も考えられるが、詳細はまだはっきりしない。この所見より網膜における PA の特異的付着またはこの部における局所産生の可能性も考えられる。PA は RBP を運ぶ作用がある¹³⁾ことから、今回抗 RBP 兔抗体を用いた PAP 法も行ってみたが、毛様体上皮、網膜 (sensory retina) とともに明瞭には染まらず、この部に存在する PA は RBP と complex を作ってはいないと考えられる。

家族性アミロイドポリニューロパチーにおけるアミロイド線維は、PA のアミノ酸構造のうちただ1つのアミノ酸が変化したものであると報告され^{6)~8)}、このアミロイドが脊髄神経節とここからの peripheral process に存在すると報告されており、髄液から産生される PA が peripheral nervous system に何らかの役割をはたしていると考えられる¹⁴⁾。また、脳内の choroid plexus において PA の局所産生がみられることから、これが central nervous system 内でも、何らかの特異的な機能を持っている可能性がある⁵⁾、眼内においても同様に、PA が網膜の nervous system に影響をおよぼしているのではないかと考えられる。

さらに、4眼中1眼の紅彩、毛様体のプラズマ細胞に PA の存在が認められたが、これは産生か付着かについては現在のところ不明である。

今回の結果は、死体眼を用いた光学的顕微鏡によるものであり、今後、眼摘後の眼球を用いた電子顕微鏡による免疫組織化学、in situ hybridization などを用いた PA の m-RNA の証明などにより、産生部位を明らかにしていく予定である。

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました岡村良一教授に深謝いたします。

Figures

Fig. 1 A: Immunohistochemical demonstration of prealbumin. Reaction products are stained with brownish red color of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC). Localization of prealbumin is seen in non-pigmented ciliary epithelium of pars plana. Sample was obtained from 89-year-old man. Original magnification, $\times 100$

B: Non-pigmented ciliary epithelium of pars plicata shows same staining. 78-year-old woman

Original magnification, $\times 250$

C: Negative control section of ciliary epithelium treated with normal rabbit serum in place of primary antibody to prealbumin. Then, the section was treated with swine anti-rabbit immunoglobulin and rabbit PAP complex. 78-year-old woman Original magnification, $\times 66$

Fig. 2 Immunohistochemistry of prealbumin of retina.

A: Ganglion cells were stained by PAP complex. Sample was obtained from 29-year-old woman. Original magnification, $\times 250$

B: Cells situated inner site of internal nuclear layer also showed staining (arrow). 78-year-old woman Original magnification, $\times 250$

C: Negative control section of retina treated with normal rabbit serum in place of primary antibody to prealbumin. Reaction products are not observed. 78-year-old woman Original magnification, $\times 100$

文 献

- 1) **Stamper RL:** Aqueous humor: Secretion and dynamics. In: Records RE: Physiology of the Human Eye and Visual System. 156—182, Harper & Row, Hagers Town, 1979.
- 2) **Inada K:** Quantitative determination of human aqueous proteins by crossed immunoelectrophoresis. Jpn J Ophthalmol 28: 1—8, 1984.
- 3) **Felgenhauer K:** Protein size and cerebrospinal fluid composition. Klin Wschr 52: 1158—1164, 1974.
- 4) **Aleshire SL, Bradley CA, Richardson LD, et al:** Localization of human prealbumin in choroid plexus epithelium. J Histochem Cytochem 31: 608—612, 1983.
- 5) **Herbert J, Wilcox JN, Kim-Thu C, et al:** Transthyretin: A choroid plexus-specific transport protein in human brain. Neurology 36: 900—911, 1986.
- 6) **Nakazato M, Kangawa K, Minamino N, et al:** Identification of a prealbumin variant in the serum of a Japanese patient with familial amyloidotic polyneuropathy. Biochem Biophys Res Commun 122: 712—718, 1984.
- 7) **Saraiva MJM, Birken S, Costa PP, et al:** Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). J Clin Invest 74: 104—119, 1984.
- 8) **Dwulet FE, Benson MD:** Primary structure of an amyloid prealbumin and its plasma precursor in a hereditary familial polyneuropathy of

- Swedish origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 694—698, 1984.
- 9) 原 敬蔵: 眼内液の沝紙電気泳動法による研究. 第1報. 特発性網膜剝離の網膜下液の蛋白に就て. *日眼* 59: 617—623, 1955.
- 10) Stauder AJ, Dickson PW, Aldred AR, et al: Synthesis of transthyretin (pre-albumin) mRNA in choroid plexus epithelial cells, localized by in situ hybridization in rat brain. *J Histochem Cytochem* 34: 949—952, 1986.
- 11) Dickson PW, Aldred AR, Marley PD, et al: Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver. *J Biol Chem* 261: 3475—3478, 1986.
- 12) Cole DF: Secretion of the aqueous humour. *Exp Eye Res* 25(Suppl): 161—176, 1977.
- 13) Putnum FW: Alpha, beta, gamma, omega—The roster of the plasma proteins, Putnum FW: *The Plasma Proteins* 2nd Edition, 57—131, Academic Press, New York, 1975.
- 14) Costa PP, Figueira AS, Brabo FR, et al: Prealbumin and amyloid in the portuguese type of familial amyloidotic polyneuropathy. In: Glenner GG, Costa PP, DeFreitas F, eds. *Amyloid and Amyloidosis*. 147—152, Excerpta Medica, Amsterdam, 1980.
-