

各種角膜ディストロフィーに対するレクチン組織化学の応用

原田 敬志*, 水野 計彦**, 小嶋 一晃***, 星野 洸****

*名古屋大学医学部分院眼科, **名古屋大学医学部眼科学教室

福井医科大学眼科学教室, *名古屋大学医学部第2解剖学教室

要 約

中間体としてビオチン化レクチンを使用するアビジンビオチンワサビペルオキシダーゼ複合体を用い、2例の顆粒状角膜ディストロフィー、4例の格子状角膜ディストロフィー、各1例の膠様滴状ディストロフィーおよび Reis-Bücklers 輪状角膜ディストロフィーについて、角膜移植の際に得られた組織片を組織化学的に検索した。顆粒状ディストロフィーでは、沈着物は、WGA に2例で陽性、1例で Con A に陽性となった。格子状ディストロフィーでは、沈着物は3例で WGA に陽性、1例で Con A に陽性となった。膠様滴状変性の沈着物は WGA に陽性で、Reis-Bücklers ディストロフィーでは、陽性所見はみられなかった。したがって、顆粒状あるいは格子状ディストロフィーの沈着物は、N-アセチル-D-グルコサミンを糖残基として有する。さらに、 α -D-マンノースあるいは α -D-グルコースを有する可能性も高い。(日眼会誌 94:300-306, 1990)

キーワード：レクチン、角膜ディストロフィー、沈着物

Application of Lectin Histochemistry to Various Types of Corneal Dystrophy

Takashi Harada*, Kazuhiko Mizuno**, Kazuteru Kojima***
and Takeshi Hoshino****

*Service of Ophthalmology, Nagoya University Branch Hospital

**Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine

***Department of Ophthalmology, Fukui Medical School

****Department of Anatomy, Nagoya University School of Medicine

Abstract

We described the staining pattern of deposits in 4 cases of the staining method employing corneal dystrophy by avidin-biotin peroxydase complex employing biotinized lectins as intermediate products. The specimens consisted of 8 keratoplasty specimens obtained from 2 cases of granular dystrophy and 4 cases of lattice dystrophy and one case each of primary droplet dystrophy and Reis-Bücklers dystrophy. In two cases with granular dystrophy, deposits stained positively with WGA and with Con A in one case. The deposits found in lattice dystrophy were stained with WGA in 3 cases and with Con A in one case. The deposits noted in primary gelatinous droplet dystrophy were stained with WGA and those in Reis-Bücklers dystrophy were not stained with any lectin.

The staining patterns suggested that the deposits found in granular and lattice dystrophy possess N-acetyl-D-glucosamine as a sugar residue. They may possess alpha-D-mannose and/or alpha-D-glucose. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 300-306, 1990)

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
(平成元年6月12日受付, 平成元年9月26日改訂受理)

Reprint requests to: Takashi Harada, M.D. Dept. of Ophthalmol., Nagoya Univ. School of Med.
65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466, Japan

(Received June 12, 1989 and accepted in revised form September 26, 1989)

Key words: Lectin, Corneal dystrophy, Deposits.

I 緒 言

角膜ディストロフィーのうち、顆粒状角膜ディストロフィーにみられる沈着物は、非コラーゲン性蛋白でティロシン、トリプトファン、アルギニンを含むとされる¹⁾²⁾。また、格子状ディストロフィーのI型は、その沈着物がアミロイドの細線維からなるといわれる³⁾。膠様滴状ディストロフィーでも、ポーマン膜の前後に塊状のアミロイド沈着がみられる⁴⁾。Reis-Bücklersらの輪状ディストロフィーでは、上皮下に顆粒状の沈着物がみられ⁵⁾、アミロイド細線維との関係が示唆されている⁶⁾が、詳細は不明である⁴⁾。

近年、発生・分化・免疫・がん化などの生命現象を解明するために、細胞表面特異性を規定するものとして、細胞膜複合糖質の検索に、糖結合蛋白質であるレクチンを応用した研究がさかんに行なわれるようになった。Su-Ming-Hsuら⁷⁾は、ビオチン化レクチンを中間体とし、アビジン・ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex)を加えたABCシステムの高感受性や低いバックグラウンドを報告した。著者らも、この方法を応用し、家兎や豚、人角膜上皮および実質における糖複合体の存在様式を検索して、この方法の有効性を確認した⁸⁾。

今回は、角膜移植の際得られた、上記4種角膜ディストロフィーの角膜片に、ビオチン化レクチン8種類を作用させ、沈着物や角膜実質の態度を観察した。

II 材料と方法

角膜移植術の際に得られた、顆粒状角膜ディストロフィー2例、格子状角膜ディストロフィー4例、Reis-Bücklers角膜ディストロフィー1例、膠様滴状ディストロフィー1例の角膜をレクチンによる組織化学の試料として用いた。それぞれの試料は、HE染色やPAS染色、コンゴレッド染色、マッソン・トリクローム染色、ならびに電顕的検索を行ない、病理学的診断を確定した。

採取した角膜片は、ただちにバッファーホルマリンに固定し、通常のパラフィン標本を作製した。キシレンで脱パラフィンを行ない、100%、90%、75%の段階アルコールを経て、燐酸緩衝液(PBS)で洗った。3%過酸化水素水に10分浸漬し、牛血清アルブミン

(Sigma) 30mgを120mlPBSに溶解したものに反応させた。PBSに通したのち、10 μ g/mlのレクチンに40分ないし1時間浸漬した。レクチンとしては、ハリエニンダレクチン(UEA-I)、ピーナッツレクチン(PNA)、ダイズマメレクチン(SBA)、ヒマレクチンI(RCA-I)、ナタマメレクチン(Con A)、レンズマメレクチン(LCA)、小麦胚レクチン(WGA)、ドリコスマメレクチン(DBA)の8種類を選択し、しかもビオチンで標識化されているものを使用した。PBSで洗滌後、アビジン・ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体を、その場で調整し30分間作用させた。これをPBSで洗い、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。

一部には、メチルグリーン液で染色を実施した。

対照としては、レクチンを加える前に、それぞれのレクチンに特異的な阻害糖を15分間、0.2Mだけ作用させた。

III 結 果

顆粒状角膜ディストロフィーでは、上皮下に認められる沈着物がWGAに明瞭な染色を示した(図1)。また、2例中1例では、上皮下に存在する沈着物がCon Aに陽性となった他、matrix全体がやはりCon Aにより染色された(図2)。膠様滴状ディストロフィーでは、上皮および実質内の沈着物が、WGAに染色を示した(図3)。症例5の格子状角膜ディストロフィーでは、



図1 顆粒状角膜ディストロフィー。症例1。上皮下の沈着物がWGAに染色を示す。×350。

実質内にみられる沈着物がWGAに対し点状の明瞭な染色性を示した(図4)。さらに、PNAに対しては、matrix全体が弱く反応を示した(図5)。症例6の同角膜デストロフィーでは、沈着物はWGAに染性がみられたが、Con Aには染色されなかった。そして、

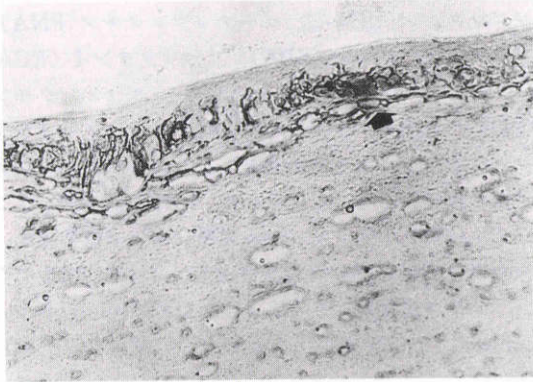


図2 顆粒状角膜デストロフィー。症例2。上皮下の沈着物はCon Aに染まり、実質全体もCon Aに陽性となった。×350。

matrix全体がCon Aに陽性となった(図6)。症例7の格子状角膜デストロフィーでは、沈着物がややWGAおよびCon Aに反応した(図7)。最後の格子

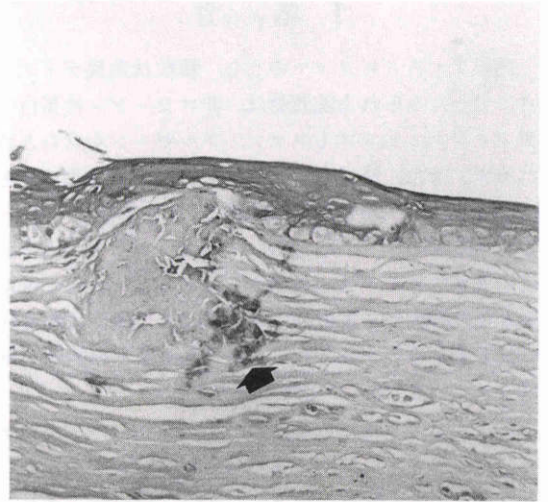


図3 膠様滴状デストロフィー。症例3。上皮下の無構造な沈着物の辺縁がWGAに染色性を示す。×350。



図4 格子状角膜デストロフィー。症例5。実質深層の沈着物の内部に、WGAに対し明瞭な染色性を示す。×350。

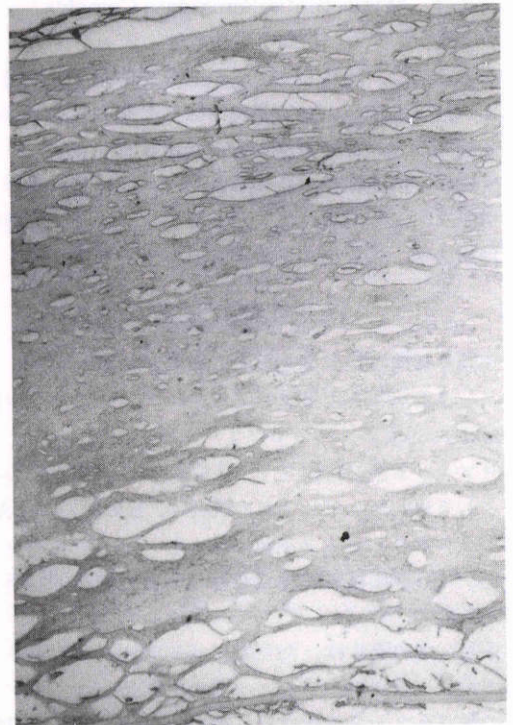


図5 格子状角膜デストロフィー。症例7。PNAに対しては、角膜実質全体が陽性となった。×350。



図6 格子状角膜ディストロフィー，症例6．Con Aによる染色では，沈着物は染まらないが，実質全体が陽性となった．×350．

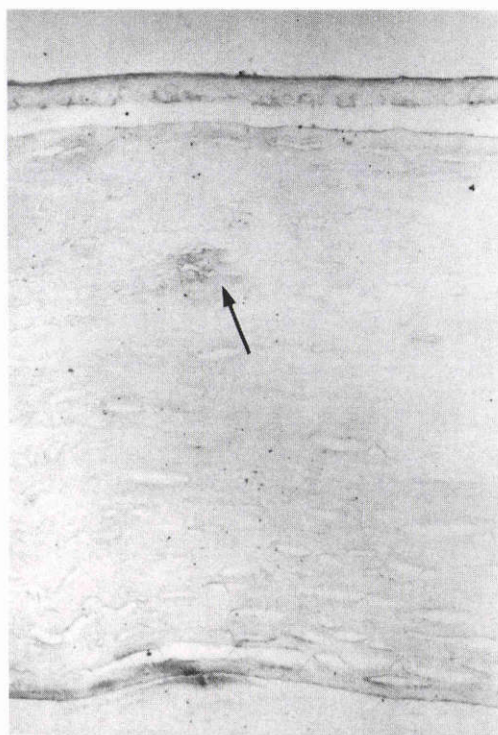


図7 格子状角膜ディストロフィー，症例7．沈着物は，ややWGAに染色性を示した．×350．

状角膜ディストロフィーの症例8では，WGAのみ染色性を示した．

Reis-Bücklers 角膜輪状ディストロフィーでは，上皮下の沈着物は，WGAにもCon Aにも染まらなかった．

なお，各角膜ディストロフィーにおいて見い出された沈着物の，7種類のレクチンに対する染色態度を表1に一括して掲げた．

IV 考 按

今回の実験で用いた，緒言で述べたABCシステムは，従来から用いられているPAP法よりはるかに高感度であることが，近年の研究により，明らかにされた．ビオチン化レクチンを利用するABCシステムによって，糖脂質蓄積症⁹⁾や涙液分泌減少症¹⁰⁾における結膜生検に応用することを試み，満足のいく結果を得

表1 沈着物の各種レクチンに対する染色性

症例番号	診 断	RCA-1	WGA	UEA	DBA	SBA	Con A	PNA
1	顆粒状ディストロフィー	-	+	-	-	-	±	-
2	顆粒状ディストロフィー	-	+	-	-	-	+	-
3	膠様摘ディストロフィー	±	+	-	-	-	-	-
4	Reis-Bücklers	-	-	-	-	-	-	-
5	格子状ディストロフィー	-	+	-	-	-	-	-
6	格子状ディストロフィー	±	+	-	-	-	+	-
7	格子状ディストロフィー	-	±	-	-	-	±	-
8	格子状ディストロフィー	-	+	-	-	-	-	-



図8 格子状角膜ディストロフィー(症例5). 沈着物も実質組織も Con A に全く染色性を示さない. $\times 350$.

ている.

レクチンには、すでに500以上の種類が見い出されている。組織化学のうえからいえば、反応する特異的な糖残基が共通している複数のレクチンを使用すれば、対応する糖残基を推測する場合に確実性が増す。この意味から、D-マンノースあるいはD-グルコースに親和性を示す LCA と Con A, 2-アセタミド-2-デオキシ-D-ガラクトースに親和性を示す BBA と SBA, そして D-ガラクトースに親和性を示す PNA と RCA, とが今回の実験に用いられていることは、それぞれのレクチンに該当する糖残基の存在を類推するのに好都合と考えられる。

レクチン染色でもっとも困難な問題を提示するのは、対照染色である。生じた染色が該当するレクチンによるものであり、その他の反応物によって惹起されるものでないことが確認されなければならない。このような裏付けを与えるため、今回の実験では、レクチンを加える前に、それぞれのレクチンに特異な阻害糖 (inhibiting sugar) を、0.2M, 15分間作用させた。そして、これにより全く反応の生じないことを確認した。したがって、今回の実験で得られた染色反応は、いずれもレクチンによることが明らかとなった。

顆粒状角膜ディストロフィーの2例は、HE染色、マッソントリクローム染色、および電顕的には特色ある桿状体の存在により、診断が確定したものである。2例に共通して上皮下に認められる沈着物は、WGA に対し明瞭な染色性を示した。Con A に対しては、1例で染色がみられ、さらに実質の matrix 全体が Con

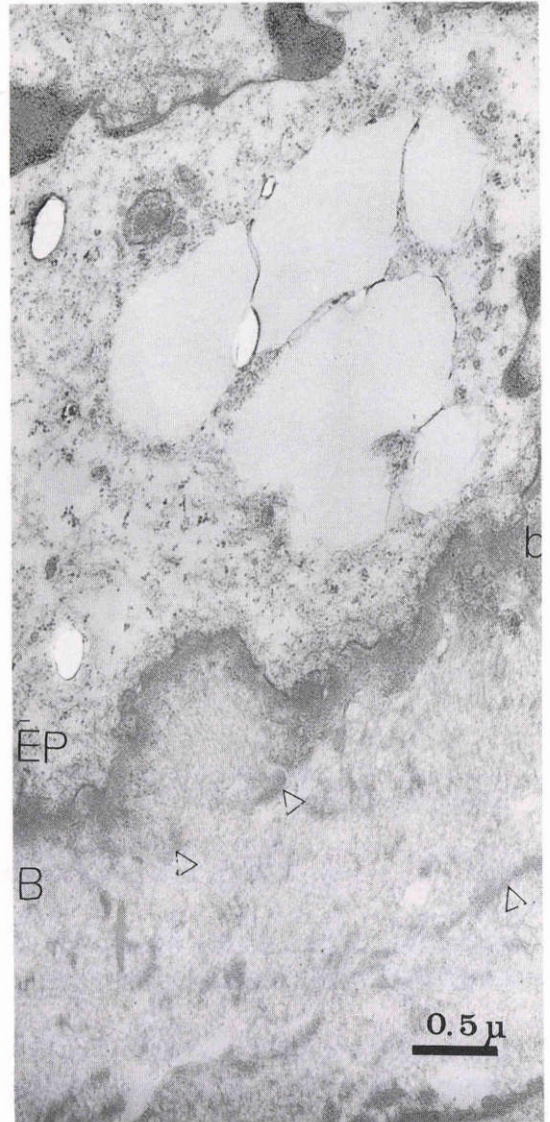


図9 Reis-Bücklers角膜ディストロフィー(症例4)の電顕所見。上皮細胞(EP)内に空胞を認める。基底膜(b)は正常。ボウマン膜(B)には、多数の異常沈着物(△印)をみる。 $\times 12,000$.

A に陽性となった。Panjwani ら¹¹⁾は、自験例と同様の方法でレクチン染色を実施し、WGA および RCA 陽性例を7例中各々2例と1例とに見出したが、Con A は陰性の結果となった。一方、自験例では、Con A は、WGA ほど首尾一貫した染色態度はとっていない。さらにまた、自験例では、RCA-I は陰性の結果となり、またこのレクチンと同様 D-ガラクトースに特異性を

示すPNAによっても、なお陰性となった結果から、沈着物には、RCA-Iに対するレセプターはないと考えられる。したがって、顆粒状角膜ディストロフィーにみられる沈着物は、現在のところ、N-アセチル-D-グルコサミンを糖残基としている可能性が高い。

Panjwaniら¹²⁾は、沈着物がコンゴ赤で染色される8例の格子状ディストロフィーについて、Con A, WGA, RCA-I, PNA, SBA, でレクチンレセプターを検出した。それによると、沈着物は、Con A, WGA, RCA-I, に陽性に染まったが、PNAおよびSBAには、いずれも陰性となった。一方、自験例では、WGAは3例で陽性となったが、Con Aに対しては、わずかに陽性も含めて陽性が2例、残る2例では陰性となった。RCA-Iは、わずかに1例でやや陽性を示したにとどまった。さらに、PNAとSBAについては、Panjwaniら¹²⁾と同様に、全く染色性がみられなかった。したがって、格子状ディストロフィーについては、沈着物に、WGAに対するレクチンレセプターが存在することは十分考えられるが、Con Aに対するレセプターに関しては、さらに、検討の余地があるといえる。沈着物は、WGAに特異的に反応するN-アセチル-D-グルコサミンを糖残基として有すると考えられる。

膠様滴状ディストロフィーでは、組織学的に、上皮下組織と実質表層とに、アミロイドの染性を示す不定形の好エオジン性物質がみられる¹³⁾¹⁴⁾。このような、膠様滴状ディストロフィーにおける沈着物に対し、レクチンによる組織化学的研究を実施した報告は、著者らの知る限り、まだないようである。沈着物は、WGAには陽性で、RCA-Iにはわずかに陽性を示す結果が得られた。本症と同様の、アミロイドから成る沈着物が角膜実質のほぼ全層にわたり散在する格子状ディストロフィーと比較すると、両者に共通してWGAは沈着物を陽性に染色するが、Con Aは、本症では陰性であるのに対し、格子状ディストロフィーでは、半数で陽性となっていた。RCA-Iは、本症ではわずかに陽性であり、格子状ディストロフィーでは、1/4の症例でわずかに陽性となった。他のレクチンに対しては、両者とも染色性を示さなかった。

免疫組織学的手法を用いてアミロイド沈着物の検索を施行した研究¹⁵⁾によれば、本症のアミロイドはAPたん白であるのに対し、格子状ディストロフィーの際認められるアミロイドには、AA蛋白も加わっているという。しかし、このAA蛋白も検出し得なかったとする報告もあり¹⁶⁾、アミロイド沈着物の詳細について

はなお今後の検討が必要であろう。今回レクチンレセプターを検索する実験の結果から、同じ様にアミロイドとして一括されている本症および格子状ディストロフィーの沈着物を区別する見解は見い出されなかった。さらに症例を増し、特にCon Aに対する染色性が常に陰性かどうか注意を払うべきであろう。

Reis-Bücklers輪状ディストロフィーでは、基底膜の欠損の他、まだ正常に保存されたボーマン膜内部には、コラーゲン線維の配列の乱れがみられている¹⁷⁾。さらに、実質表層にも、フィラメントあるいは顆粒状構造を有する好酸性沈着物が認められる¹⁸⁾¹⁹⁾。組織化学的には、塩基性フクシンとメチレン青、マッソントリクロームに明瞭な染色性を示すという¹⁸⁾。今回のレクチン反応性を検出する実験では、RCA-IやWGA, Con Aを含めすべてのレクチンに対し陰性の結果となった。したがって、本症に認められる沈着物はアミロイドを表現するという示唆がある⁶⁾が、レクチン染色の上からは、格子状ディストロフィーで認められるアミロイド沈着物と性格を異にするものと考えられる。症例をさらに集積し、染色態度の判定を続ける必要がある。

レクチン染色にあたって、今回の実験では以前のパラフィンに包埋した試料を使用したため、試料の酵素活性は幾らか失なわれている点を考慮すべきであろう。しかし、今回の実験で、各々のレクチンに対する染色の、定性的に結果は十分得られたと思われる。今後は、得られた試料から凍結切片を作製したうえでレクチン染色を行なうことが望ましい。

御校閲を賜った名古屋大学医学部眼科学教室主任栗屋忍教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Garner A: Histochemistry of corneal granular dystrophy. Br J Ophthalmol 53: 799—811, 1969.
- 2) Reim M, Stolze H, Goerd J: Erbliche Erkrankungen des Hornhautparenchyms, In: Ophthalmologische Genetik, Hammerstein W, Lisch W. (ed), A Enke, Stuttgart, 99—108, 1985.
- 3) Klintworth GK: Lattice dystrophy, an inherited variety of amyloidosis restricted to cornea. Am J Pathol 50: 371—378, 1967.
- 4) Dhermy P: Amylose oculaire. J Fr Ophtalmol 10: 91—103, 1987.
- 5) Babel J, Leuenberger P: Dystrophie cornéenne de Reis-Bücklers. Arch Opht (Paris) 33: 49—62, 1973.

- 6) **Pouliquen Y, Giraud JP, Savoldelli M**: Reis Bücklers' dystrophy. *Albrecht v. Graefes Arch Klin Ophthalmol* 208: 25-32, 1978.
- 7) **Hsu SM, Raine L**: Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 30: 157-160, 1982.
- 8) 原田敬志, 矢ヶ崎悌司, 若松幸三, 他: レクチンによる各種動物角膜の染色パターン. *日眼会誌* 92: 133-138, 1988.
- 9) 原田敬志, 久田廣次, 田辺詔子, 他: 糖脂質蓄積症のレクチンによる組織化学. *眼紀* 39: 1673-1679, 1988.
- 10) 原田敬志, 市川一夫, 星野 洸: 涙液分泌減少症におけるレクチン染色. 第92回日本眼科学会総会で口演, 京都, 1988.
- 11) **Panjwani N, Rodrigues M, Alroy JZ**: Alterations in macular corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1211-1216, 1986.
- 12) **Panjwani N, Rodrigues M, Free K**: Lectin receptors of amyloidosis in corneas with lattice dystrophy. *Arch Ophthalmol* 105: 688-691, 1987.
- 13) **Spencer WH**: Cornea, degenerations and dystrophies. In *Ophthalmologic Pathology*, Spencer, WH (ed), WB Saunders, Philadelphia, 229-297, 1985.
- 14) **Pouliquen Y, Dhermy P, Pouliquen M, et al**: Dystrophie gélatineuse en goutte de la cornée. *J Fr Ophtalmol* 4: 349-358, 1981.
- 15) **Mondino BJ, Sundar CV, Slinner M**: Protein AA and lattice corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 89: 377-380, 1980.
- 16) **Gorevic PD, Rodrigues MM, Krachmer JH**: Lack of evidence for protein AA reactivity in amyloid deposits of lattice corneal dystrophy and amyloid corneal degeneration. *Am J Ophthalmol* 98: 216-224, 1984.
- 17) **Thiel HJ**: Dystrophien des Hornhautepithels und der Bowmanschen Membran, In: *Ophthalmologische Genetik*, Hammerstein W, Lisch W, (ed), Enke, Stuttgart, 80-93, 1985.
- 18) **Orzalesi N, Grignolo FM, Bertagno R**: Risultati e possibilità della biopsia con esame ultrastrutturale nella patologia corneale. *Boll ocul* 62: 15-36, 1982.
- 19) **Goder GJ**: Grundriß der Ophthalmopathologie. In: *Der Augenarzt*, Verhagen, K (ed), VEB Georg Thieme, Leipzig, 93-734, 1985.