

ウシ角膜特異蛋白質によるマウス角膜変性症

小西裕美子, 川端 昌子

徳島大学医学部眼科学教室

要 約

ウシ角膜に含まれる角膜特異蛋白質 (CSP) を抗原として, BALB/c マウスを感作すると, 感作3日後に角膜中央部において上皮細胞への抗体沈着と細胞膨化変性が認められる。この抗体沈着による変化を, 6カ月間細隙灯顕微鏡を用いて観察し, 角膜中央部上皮下に顆粒状沈着物が認められた。組織学的に検討した結果, 角膜上皮基底層に沿って, 顆粒状の沈着物が散在し, 沈着物に接する上皮細胞は萎縮し扁平化していた。沈着物はPAS染色で陽性を示し, 各種レクチンとの酵素抗体法でConA, WGA, RCAに結合性を示すことより, 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と考えられる。抗CSP抗体による酵素抗体法では, 沈着物に接する部位の角膜上皮細胞において染色性が低下しており, 角膜上皮でのCSP産生の低下が考えられる。また角膜上皮同部位でのConA陽性細胞が著明に減弱しており, 何らかの糖代謝異常が生じたことが示唆された。(日眼会誌 95:462-467, 1991)

キーワード: ウシ角膜特異蛋白質, マウス角膜変性, 角膜上皮下沈着物, PAS染色, レクチン染色

Mouse Corneal Degeneration by Bovine Cornea-Specific Protein

Yumiko Konishi and Masako Kawabata

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tokushima University

Abstract

In a previous study, IgG deposits and changes were found in the corneal epithelial cells of BALB/c mice immunized by cornea-specific protein (CSP) contained in the bovine cornea. We observed the corneal changes in mice by immunoreaction to CSP for 6 months with slit-lamp microscopy, and found granular opacity under the central corneal epithelium. Histologically this opacity was composed of scattered deposits in the corneal substantia beneath the basal layer of the epithelium. The corneal epithelium in contact with the deposits became atrophied and flattened. The deposits were stained with PAS staining, and with ConA, WGA and RCA by the lectin enzyme histochemical method. Therefore, these results indicate that these deposits possess N-acetyl-D-glucosamine as a sugar residue. In the degenerated corneal epithelium, peroxidase-staining by the anti-CSP antibody enzyme histochemical method weakened and ConA-positive cells were obviously decreased. This suggests that the production of CSP decreased in the same lesion and that disorder of sugar metabolism developed at the corneal epithelium. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95:462-467, 1991)

Key words: Bovine cornea-specific protein, Mouse corneal degeneration, Deposits under corneal epithelium, PAS staining, Lectin enzyme histochemical method

別刷請求先: 770 徳島市蔵本町2-50 徳島大学医学部眼科学教室 小西裕美子
(平成2年7月27日受付, 平成2年10月4日改訂受理)

Reprint requests to: Yumiko Konishi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tokushima University

2-50 Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

(Received July 27, 1990 and accepted in revised form October 4, 1990)

I 緒 言

ウシ角膜に多量に含まれる分子量54,000の可溶性蛋白質は、角膜に組織特異性を持ち、哺乳類に共通した抗原性を示す角膜固有のペプチド群 (Cornea-Specific Protein; 以下 CSP と略する) である¹⁾²⁾。この角膜特異蛋白質を用いて BALB/c マウスを感作すると、3日後には角膜中央部において上皮への抗体沈着と上皮細胞の膨化変性が、抗マウス IgG 抗体ペルオキシダーゼ染色により認められた。さらに MRL マウスを感作すると、角膜中央部の上皮の欠損や水泡形成、虹彩炎、眼球突出が認められた³⁾。

今回、我々は BALB/c マウスの角膜上皮に対する抗体沈着によって生じる角膜変化を長期間観察し、角膜中央部上皮下に顆粒状沈着物を認めた。この角膜変性症に対して、PAS 染色その他酵素抗体法などの病理組織学的な検討を行い、興味ある知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. CSP の抽出と部分精製

ウシ角膜全層を細片化したのち、トリス緩衝液を加えて超音波破碎を行った。これを超遠心にかけて、可溶性画分である上清を得た。さらにゲル濾過および陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて CSP を部分精製した⁴⁾。

2. 対象

対象は8週齢、メスの BALB/c マウス12匹を用いた。感作は1回のみで、上記方法で部分精製した CSP 50 μ g を同量のフロイント完全アジュバントと乳化後、腹腔内に注射した。感作後6カ月間細隙灯顕微鏡で観察し、摘出した眼球を10%中性ホルマリン固定後、通常のパラフィン標本作製した。厚さ5 μ の薄切切片を作製し、下記の方法と酵素抗体法で染色を行い光学顕微鏡で観察した。

糖質の染色法として PAS 染色 (Lillie の変法)、ムコ物質の染色法としてアルシアン青・PAS 重染色およびトリジン青染色 (Peers の変法)、アミロイドの染色法であるコンゴ赤染色 (Puchtler の方法) を行った⁵⁾。

3. 各種レクチンによる酵素抗体法

作製したパラフィン切片を、キシレンで脱パラフィン後、100, 99, 95, 90, 80, 70%の段階アルコールを経て、リン酸緩衝液(以下 PBS と略する)で洗浄した。0.3%過酸化水素水/メタノールに30分浸漬し、内因性

ペルオキシダーゼをブロッキングした。次に、0.1%ウシ血清アルブミン/PBS と反応させ、非特異的なレクチンの吸着を阻止した。PBS で洗浄したのち、ビオチン化したレクチン10 μ g/ml を4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させた。用いたレクチンはビオチン化レクチンキット I (Vector)に含まれるハリエニシダ (UEA-I)、ピーナッツ (PNA)、タチナタマメ (ConA)、コチギノイ (WGA)、ダイズマメ (SBA)、ヒマ (RCA)、ドリコスマメ (DBA) の7種類のレクチンである。PBS で洗浄後、アビジン・ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 複合体を、1時間作用させた。これを PBS で洗浄し、0.5mg/ml ジアミノベンチジン (DAB)/0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.3/0.15%過酸化水素水を基質として HRP 反応を行い発色させた⁶⁾⁷⁾。水洗後、ヘマトキシリンで核染色を行い、キシレンで透徹、マリノールで封入し、光学顕微鏡で観察した。

4. 抗 CSP 抗体および抗マウス IgG 抗体による酵素抗体法

抗 CSP 抗体⁸⁾による酵素抗体法は、まず薄切切片をキシレンで脱パラフィン後、アルコール系列で親水化し、PBS で洗浄した。0.3%過酸化水素水/20%メタノールで内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。PBS を通した後、0.1%ウシ血清アルブミンを反応させ非特異的な抗体沈着を阻止した。これに、ラット抗 CSP ポリクローナル抗体 F(ab')₂ を第1抗体として結合させた。PBS で洗浄後、ビオチン化家兎抗ラット IgG 抗体を第2抗体として結合させ、さらにアビジン・ビオチン化 HRP を反応させた。PBS で洗浄し、DAB を基質として、HRP 反応を行った。次に、水洗し、メチルグリーンで核染色を行った後、透徹・封入し光学顕微鏡で観察した。

また抗マウス IgG 抗体による酵素抗体法は、同様に内因性ペルオキシダーゼのブロッキングと抗体の非特異的な沈着阻止を行ったのち、ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体を結合させた。PBS で洗浄し、さらにアビジン・ビオチン化 HRP と反応させた。これに DAB を基質として HRP 反応を行い、沈着した IgG を検出した。

III 結 果

感作後2カ月頃より角膜中央部に淡い顆粒状の沈着物が認められ、次第に増強し周辺部へと拡大したが、輪部には達しなかった。しかし、結膜や強膜の充血や虹彩の血管拡張などの炎症所見は認められなかった。また、MRL マウスにみられたような角膜上皮の欠損

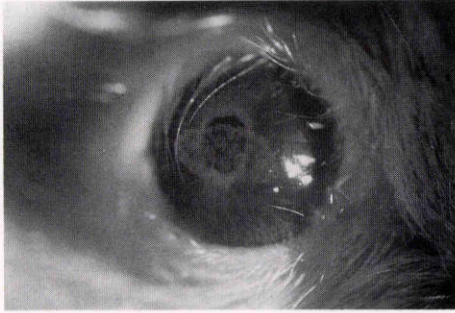


図1 CSP 50 μ gを腹腔内注射6ヵ月後のBALB/cマウス前眼部。角膜中央部に淡い斑状混濁とその周囲に輪状に顆粒状混濁が認められる。

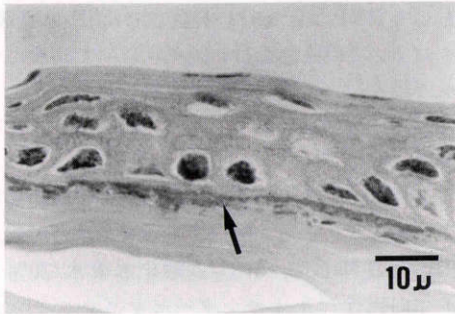


図2 感作BALB/cマウス角膜中央部(アルシアン青・PAS重染色, $\times 820$)。角膜上皮基底層に沿って実質線維中に矢印で示す顆粒状の沈着物が認められる。また沈着物に接する角膜上皮基底細胞は扁平化している。

や角膜潰瘍の形成, 眼球突出は認められなかった³⁾。

感作6ヵ月後には, 12匹24眼すべてに図1の細隙灯顕微鏡写真に示すように, 角膜中央部に, 顆粒状の沈着物が互いに癒合した斑状の角膜混濁と, その周囲を取り囲むような微細な円形の顆粒状の沈着物の集積が認められた。中央部の斑状混濁に似た融合性の上皮下混濁は一部の正常なBALB/cマウスでも認められるが, その範囲は小さく加齢と共に縮小傾向を示した。また周囲の顆粒状混濁は, 感作マウスのみ認められた。

図2は, 角膜中央部の混濁が認められた部分のアルシアン青・PAS染色である。角膜上皮下に, 顆粒状の紫色の沈着物が認められる。沈着物に接する部分の角膜上皮細胞は, 基底層の細胞が扁平化し萎縮していた。また角膜輪部では, 結膜下組織に青く染まる肥満細胞を数個認めたが正常範囲内であった。PAS染色(図3)

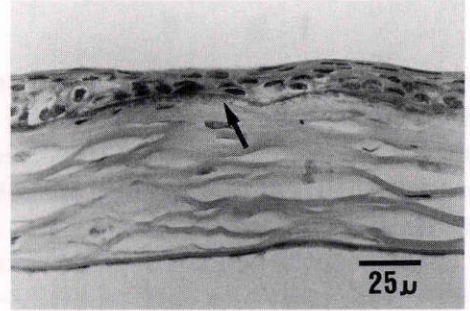


図3 感作BALB/cマウス角膜中央部(PAS染色, $\times 330$)。角膜上皮下の沈着物はPAS反応により赤く強染された。

表1 角膜部位別の各種レクチン染色性

	Con A	WGA	RCA	PNA	SBA	UEA	DBA
上皮細胞層	#	#	+	±	+	-	-
実質 matrix	±	-	-	-	±	-	-
実質細胞	#	#	#	-	-	-	-
デスマ膜	+	-	-	-	±	-	-
内皮細胞層	#	#	+	-	+	-	-
沈着物	+	#	+	±	-	-	-

-: 陰性, ±: 偽陽性, +: 軽度陽性, #: 中等度陽性,

#: 強陽性を示す。

では, 角膜上皮下の沈着物は赤色に染色された。しかし, トルイジン青染色では, pH 7.0でわずかに沈着物の周囲が赤紫色に染まるのみで, pH 4.5および2.5では全く染色されなかった。これらのPAS, トルイジン青に対する染色性より, 角膜上皮下の沈着物は糖質あるいは中性ムコ多糖を含むと考えられた。またコンゴ赤染色では, 角膜実質と上皮下沈着物は全く染色されず, 角膜中央部の上皮細胞の細胞質が部分的に染色されたのみであった。

ビオチン化レクチンを用いた酵素抗体法の染色結果を表1に示す。角膜上皮下の沈着物は, ConA, WGA, RCAに対し, 強い染色性を示した。PNAに対してわずかに陽性となった。しかし, SBA, DBA, UEAでは, 染色されなかった。これらのことより, 上皮下に認められる沈着物は, 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と考えられた⁷⁾。

またConAによるペルオキシダーゼ染色では, 図4に示す上皮下沈着物のない角膜周辺部の角膜上皮基底層の大部分の細胞は, 細胞質が均一に染色された。しかし, 図5の沈着物に接する上皮では, 明らかにConA陽性細胞が減少していた。

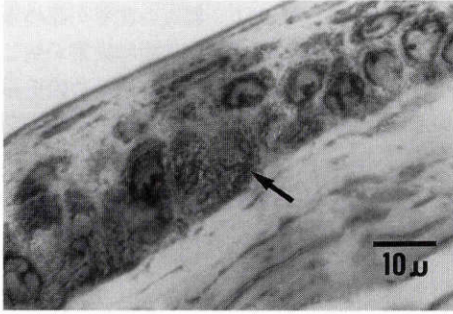


図4 感作 BALB/c マウス角膜周辺部 (ConA によるペルオキシダーゼ染色, $\times 820$). 角膜変性の認められない周辺部では大部分の角膜上皮基底層の細胞は矢印で示すように細胞質全体が茶褐色の陽性像を示した。

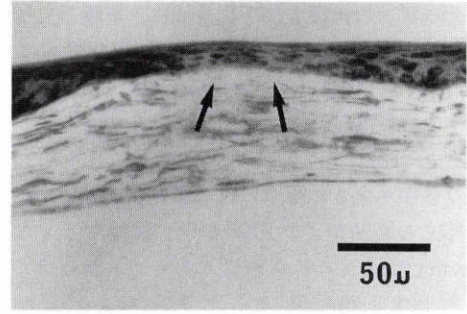


図7 感作 BALB/c マウス角膜中央部 (抗 CSP 抗体による酵素抗体法, $\times 240$). 角膜実質ケラトサイトおよび内皮細胞は正常角膜と同様の染色像を示すが, 変性部角膜上皮細胞は染色性が減弱しており, 核膜周囲のみが染色されている。また矢印で示す沈着物は CSP 抗体に全く反応しなかった。

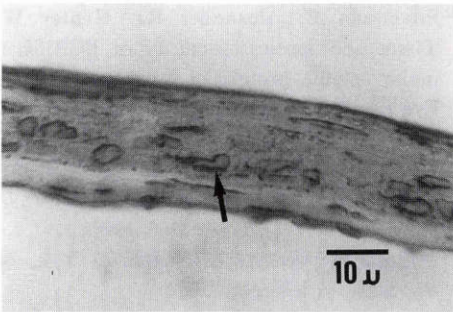


図5 感作 BALB/c マウス角膜中央部 (ConA によるペルオキシダーゼ染色, $\times 820$). 角膜変性の認められる中央部では角膜上皮基底層の細胞は核膜周囲がわずかに染まるのみで, 未変性部分に認められた陽性細胞は著減していた。

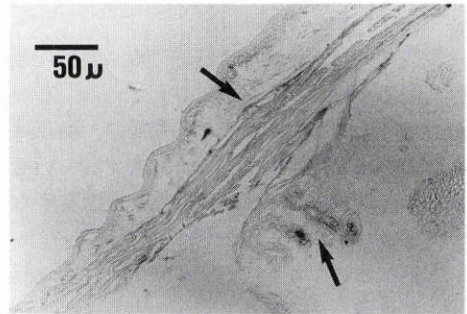


図8 感作 BALB/c マウス角膜輪部 (抗マウス IgG 抗体による酵素抗体法, $\times 160$). 矢印で示す毛様体突起および輪部結膜下組織に免疫グロブリンの沈着を示す褐色の染色像を認める。

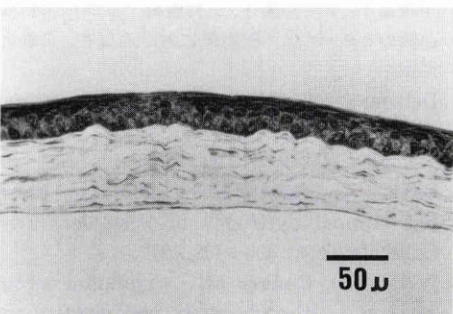


図6 正常 BALB/c マウス角膜中央部 (抗 CSP 抗体による酵素抗体法, $\times 160$). 角膜上皮, 実質ケラトサイト, 内皮細胞共に陽性を示している。特に上皮細胞は細胞質が強染され, 核および細胞膜が抜けたように見える。

次に CSP に対するラットポリクローナル抗体による酵素抗体法では, 図6の正常マウスでは, 角膜上皮は細胞質が茶褐色に染色されるが⁸⁾, 図7の感作マウスでは, 沈着物に接する上皮細胞での染色性が減弱していた。また, 角膜上皮下の沈着物は染色されなかった。

最後にウマ抗マウス IgG 抗体による酵素抗体法の染色では, 図8に示すように, 輪部の結膜下組織と毛様体に IgG の沈着が認められたが, 角膜中央部では, 角膜組織への抗体沈着は認められず, 角膜上皮下の沈着物も染色されなかった。

IV 考 按

CSP を抗原として感作した BALB/c マウスに認め

られた顆粒状の角膜上皮下沈着物は、角膜上皮への抗体沈着物により生じた二次的な非特異的变化であるか、あるいは抗原抗体反応による角膜上皮または実質の変性や機能異常による特異的な変化であるかは不明である。

この感作マウスに認められる顆粒状沈着物は、その沈着部位と範囲およびPAS染色で陽性を示すなど、SchnyderのクリスタリンジストロフィーのタイプCと酷似している⁹⁾。しかしクリスタリンジストロフィーは上皮下の角膜実質中にコレステロールの針状結晶が沈着したものであり¹⁰⁾¹¹⁾、感作マウスの微細な円形の沈着物とは異なっている。またクリスタリンジストロフィーでは、全身の脂質代謝異常による高脂血症を伴うことが多く、角膜における代謝異常による脂質の蓄積が原因と考えられている。しかしCSPは角膜に組織特異性を持ち、CSP感作で角膜変性以外の異常は認められていない。

次に免疫グロブリン産生骨髄腫でも、同様の顆粒状沈着物が認められることが報告されている。しかし、骨髄腫患者への角膜への沈着の初期像は、輪部付近の角膜実質のびまん性混濁であると報告されている¹²⁾。組織学的には、角膜および結膜に結晶を含有する形質細胞が浸潤することにより起こると考えられており¹³⁾、酵素抗体法により、免疫グロブリン(κ 鎖)が角膜実質中に沈着していることが証明されている¹²⁾¹⁴⁾。今回、コンゴ赤染色および抗マウスIgG抗体による酵素抗体法により、感作マウスの沈着物が血中抗体価の上昇に伴う単なる抗体沈着やアミロイド変性とは異なっていることが判明した。

今回データは示さないが、酵素免疫測定法でCSPに対する血清抗体価は、1回の感作で3カ月間の長期に渡って持続することが確認されている。さらに角膜輪部周囲の結膜下組織と毛様体にIgGの沈着が認められたことより、CSPに対する特異的な免疫反応が、角膜輪部に存在すると考えられている角膜上皮基幹細胞に影響していることが推察された。そして抗CSP抗体による酵素抗体法で、角膜中央部の上皮の染色性が減弱している原因として、免疫反応による影響を受けた角膜上皮基幹細胞が増殖し、角膜中央部に達するにつれ、次第にCSP産生の低下あるいは異常を生じたと考えられる。また角膜各部位でのレクチン染色性は、Panjwaniらや原田らの報告した家兎角膜での成績とほぼ一致していた¹⁵⁾¹⁶⁾が、ConA染色において変性部位における角膜上皮のConA陽性細胞が著明に減弱

していること、また上皮下に糖質の沈着が認められることにより、この部での角膜糖代謝に異常が生じたと考えられる。これらのことより、CSPが角膜組織において何らかの糖代謝に関与していることが示唆される。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と論文原稿の御校閲をいただいた徳島大学眼科学教室三村康男教授に深謝いたします。

なお、本研究は平成元年度文部省科学研究費補助金(課題番号01480417)の補助を受けた。付記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) Alexander RJ, Silverman B, Henley WL: Isolation and characterization of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res* 32: 205-216, 1981.
- 2) Silverman B, Alexander RJ, Henley WL: Tissue and species specificity of BCP 54, the major soluble protein of bovine cornea. *Exp Eye Res* 33: 19-29, 1981.
- 3) 小西裕美子, 真鍋佳永, 石丸裕見, 他: 角膜特異蛋白の抗原性の研究. *眼紀* 40: 2708-2713, 1989.
- 4) 小西裕美子: 牛角膜特異蛋白質の分離とその特性. *日眼会誌* 94: 1148-1156, 1990.
- 5) 渡辺恒彦 編: 病理組織標本作製技術. 下巻, 染色法, 東京, 医歯薬出版, 1982.
- 6) Hsu SH, Raine H: Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. *J Hist Cytochem* 30: 157-161, 1982.
- 7) Kivela T, Tarkkanen A: A lectin cytochemical study of glycoconjugates in the human retina. *Cell Tissue Res* 249: 277-288, 1987.
- 8) 川端昌子, 小西裕美子, 三村康男: ウシ角膜特異蛋白質のヒト・マウス眼組織における局在. *日眼会誌印刷中*.
- 9) Delleman JW, Winkelman JE: Degeneration of corneal crystalline hereditaria. *Ophthalmologica* 155: 409-426, 1968.
- 10) Garner A, Tripathi RC: Hereditary crystalline stromal dystrophy of Schnyder. *Brit J Ophthalmol* 56: 400-408, 1972.
- 11) Weller RO, Rodger FC: Crystalline stromal dystrophy: Histochemistry and ultrastructure of the cornea. *Brit J Ophthalmol* 64: 46-52, 1980.
- 12) 脇田まり子, 金井 淳, 中島 章, 他: 多発性骨髄腫に合併した角膜クリスタリン様沈着. *日眼会誌* 93: 665-675, 1989.
- 13) Pinkerton RMH, Robertson DM: Corneal

- and conjunctival changes in dysproteinemia. Invest Ophthalmol 8: 357—364, 1969.
- 14) **Klintworth GK, Bredehoeft SJ, Reed JW:** Analysis of corneal crystalline deposits in multiple myeloma. Am J Ophthalmol 86: 303—313, 1978.
- 15) **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.
- 16) **原田敬志, 久田廣次, 矢ヶ崎悌司, 他:** ヒト・ブタ・家兎眼角膜におけるレクチンの結合性. 日眼会誌 92: 133—138, 1988.
-