

氏名（本籍）	坂 口 康 道（岐阜県）
学 位 の 種 類	博 士（医学）
学位授与番号	乙 第 9 4 2 号
学位授与日付	平成 7 年 2 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	慢性関節リウマチ滑膜表層細胞におけるWGAレクチンを用いた電顕細胞化学
審 査 委 員	（主査）教授 松 永 隆 信 （副査）教授 正 村 静 子 教授 森 秀 樹

論 文 内 容 の 要 旨

小麦胚芽レクチン（WGA）はN-acetyl-D-glucosamine（GlcNAc）およびN-acetyl neuraminic acid（NANA）と特異的に結合する植物性レクチンである。NANAの誘導体であるシアル酸は生体内に広く分布しており、血清中のシアル酸は主として $\alpha 1$ および $\alpha 2$ グロブリン領域の糖蛋白の構成成分として存在し、急性炎症や組織壊死を伴う疾患において、その病態の変化を反映して変動することが知られている。また関節軟骨や関節液中のムコ多糖の大部分を占めるヒアルロン酸はGlcNAcとglucuronic acidが交互に結合した直鎖構造を示す高分子多糖であり、滑膜表層細胞や線維芽細胞において合成される。

これまでに数種類のFITC標識レクチンが滑膜表層細胞に結合することが光顕上証明されているが、滑膜における電顕細胞化学的研究は少ない。そこで、本研究において慢性関節リウマチ（RA）滑膜でのHRP（horse radish peroxidase）法およびレクチンコロイド金法による電顕的観察を行い、滑膜表層細胞の細胞小器官におけるWGAレクチンの結合部位を明らかにした。

対象と方法

RA患者あるいは外傷患者（正常：normal control）の滑膜組織を用いた。WGAレクチンの結合の検討には、WGA-HRP, colloidal gold標識レクチン液および結合阻害実験にはGlcNAcを用いた。

I 光学顕微鏡的観察

採取した滑膜を4%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液にて固定後、パラフィン包埋とし、厚さ4 μ mの切片を作成した。本切片にWGA-HRP溶液（25 μ g/ml）を1時間反応させ光顕下に観察した。

II 電子顕微鏡的観察

0.5cm²の大きさに細切した滑膜をただちに0.1%グルタルアルデヒド加4%ホルムアルデヒド溶液（8%ショ糖加リン酸緩衝液、PH7.2）で4℃、2時間固定し、エタノール系列で脱水、Lowicryl K4Mで包埋した。紫外線重合は3日間行い、ブロックを作製した。

滑膜表層部の超薄切片にcolloidal gold標識WGAレクチン液（15 μ g/ml）を1時間反応させ電顕下に観察した。

III レクチン結合阻害試験

標識WGAと特異単糖（0.2M-GlcNAc）を30分混合した後、IおよびIIと同じ操作を行い、結合の消失あるいは減弱について観察した。

結 果

I 光顕所見

HRP標識WGAはRA滑膜表層細胞の全体、特に細胞表面に陽性反応を示したが、表層下結合織も一部染色された。ControlのWGA反応性はRA滑膜よりも結合は低下した。

II 電顕所見

RAとcontrolの滑膜における細胞内小器官への金粒子の結合部位は同様であった。細胞の種類別での結合はマ

クロファージ型細胞（M型細胞）において金粒子は細胞突起，ライソゾーム，ゴルジ装置に有意に局在していた。また，線維芽細胞型細胞（F型細胞）では金粒子の結合は微小飲胞を含む細胞表面とゴルジ装置に観察され，ライソゾームへの結合はM型細胞の場合に比し低下していた。また表層細胞に加えて細胞外基質の一部にも金粒子の結合が見られた。

Ⅲ阻害試験

光顕的にはRAおよびcontrol共にWGAレクチンの結合の消失あるいは減弱を認めたが，RA滑膜はcontrolに比較し結合阻害度は低下していた。

電顕的にはWGA結合は全体に低下したが，光顕の結果と同じくcontrolに比べRA滑膜の細胞突起やライソゾームへの結合はかなり残存していた。またゴルジ装置には微かに金粒子の結合が残存した。

考 察

本研究によって滑膜表層細胞のゴルジ装置，ライソゾーム，細胞突起へのWGA結合を電顕的に証明した。すなわち滑膜以外の組織観察の報告にあるように，申請者も細胞内でのWGA結合はGlcNAcとNANAを含む複合糖質が上記の小器官に存在することを見出した。またヒアルロン酸合成を示したラジオオートグラフィおよびコロイド鉄法における電顕的研究によって決定されたヒアルロン酸の局在は，本研究におけるWGA結合部位と同じであった。さらにGlcNAcとNANAがゴルジ装置で複合糖鎖に付加されることより，WGAレクチンがヒアルロン酸糖鎖に結合することが示唆された。またcolloidal gold labeled WGAがF型細胞のみでなく，M型細胞の複合糖鎖合成器官であるゴルジ装置にも結合するという結果は，ヒアルロン酸の合成は両タイプの滑膜表層細胞で行われていることを示唆した。

阻害試験でRA滑膜がcontrolに比し結合阻害度が低いことからRA滑膜にはNANAが多く存在し，その表層細胞の電顕所見ではNANAが細胞突起，ライソゾーム，ゴルジ装置の一部に存在することを証明した。以上RA滑膜表層細胞におけるNANAの局在を明らかにしたが，これらの知見はRAの病因解明に手がかりを与えようとする。

論文審査の結果の要旨

申請者坂口康道は，正常ならびに慢性関節リウマチ滑膜表層細胞におけるWGAレクチン特異結合糖鎖の局在を電顕的に観察した。N-acetyl-neuraminic acidは細胞突起，ライソゾーム，ゴルジ装置の一部に局在することを証明し，ヒアルロン酸が線維芽細胞型細胞のみでなくマクロファージ型細胞においても合成されることを示唆する所見を見出した。この知見はリウマチ学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

〔主論文公表誌〕

慢性関節リウマチ滑膜表層細胞におけるWGAレクチンを用いた電顕細胞化学

岐阜大医紀 42 (2) : 249～255, 1994