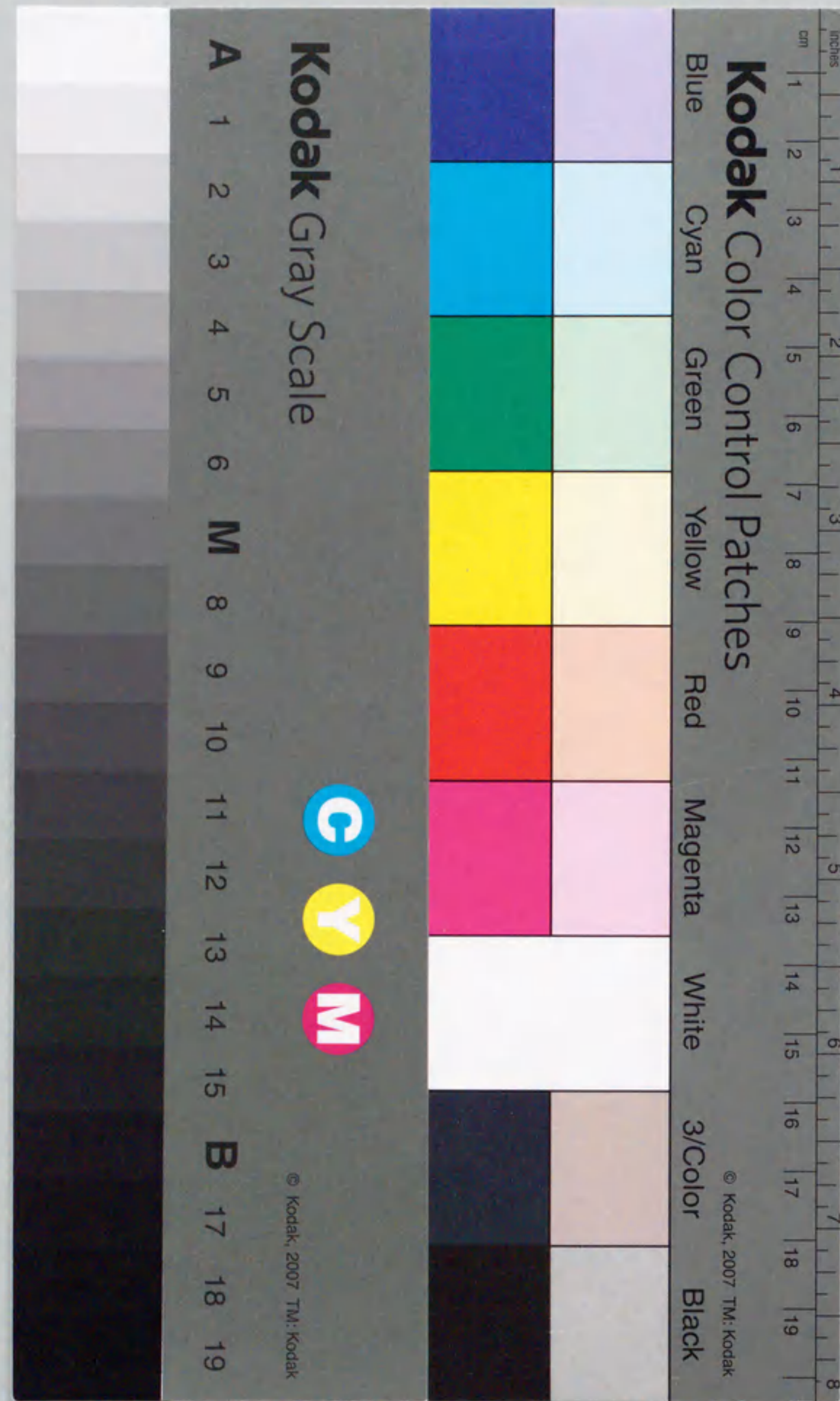


論文目録

岐阜大学

報告番号	乙第942号	氏名	坂口康道
主論文			
		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 平成6年3月発行 岐阜大医紀 42 (2) : 249~255	1冊
参考論文			
1)		高度な転位を呈し治療に難渋したtear drop fracture-dislocationの1例 昭和61年5月発行 高山赤十字病院紀要 第10号 : 149~155	1冊
2)		小児距骨骨折の2例 昭和61年5月発行 高山赤十字病院紀要 第10号 : 65~71	1冊
3)		神経損傷を伴った仙骨骨折の2例 昭和62年5月発行 高山赤十字病院紀要 第11号 : 167~171	1冊
4)		脱臼を伴わない尺骨鉤状突起骨折の2例 昭和62年5月発行 高山赤十字病院紀要 第11号 : 173~176	1冊
5)		舟状骨骨折に対するHerberf scaphoid bone screwの使用経験 昭和63年3月発行 下呂温泉病院年報 15 : 89~96	1冊
6)		シートベルト外傷の5例 平成元年3月発行 下呂温泉病院年報 16 : 50~60	1冊
7)		Miller-Galante TKR後の膝蓋大腿関節障害 特に膝蓋骨外側亜脱臼因子について 平成元年9月発行 岐阜大医紀 37 (5) : 985~994	1冊
8)		振動工具による肘部管症候群の手術成績 平成2年1月発行 中部整災誌 33 (1) : 324~326	1冊
9)		先天性膝関節脱臼の1例 平成2年3月発行 下呂温泉病院年報 17 : 64~68	1冊
10)		Miller/Galante TKRに併用した外側解離術の効果 平成4年3月発行 中部リウマチ 23 (1) : 48~49	1冊
11)		振動工具による肘部管症候群の手術成績 (第2報) 平成4年9月発行 中部整災誌 35 (5) : 1315~1316	1冊



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

坂口康道, 糸数万正, 重村克己*, 松永隆信

岐阜大学医学部整形外科学教室 (主任 松永隆信教授)
*岐阜県立下呂温泉病院 中央臨床検査部

Ultrastructural Cytochemistry Using Wheat Germ Agglutinin
Lectin of Synovial Lining Cells in Rheumatoid Arthritis.

Yasumichi SAKAGUCHI, Mansho ITOKAZU,
Katsumi SHIGEMURA and Takanobu MATSUNAGA

*Department of Orthopaedic Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. T. MATSUNAGA)
Division of Clinical Laboratory, Gifu prefectural Gero Hot Spring Hospital*

Reprinted from
ACTA SCHOLAE MEDICINALIS UNIVERSITATIS IN GIFU
Vol. 42 No. 2 March 1994.

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

坂口康道, 糸数万正, 重村克己*, 松永隆信

岐阜大学医学部整形外科学教室 (主任 松永隆信教授)
*岐阜県立下呂温泉病院 中央臨床検査部

Ultrastructural Cytochemistry Using Wheat Germ Agglutinin
Lectin of Synovial Lining Cells in Rheumatoid Arthritis.

Yasumichi SAKAGUCHI, Mansho ITOKAZU,
Katsumi SHIGEMURA and Takanobu MATSUNAGA

Department of Orthopaedic Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. T. MATSUNAGA)
Division of Clinical Laboratory, Gifu prefectural Gero Hot Spring Hospital

WGA binding sites in synovial lining cells were clarified under light and electron microscopy by means of HRP-conjugated and lectin colloidal gold methods. Synovial lining cells in rheumatoid arthritis (RA) were seen under light microscopy to be more stained than were the normal ones. When the lectin was preincubated with N-acetyl-D-glucosamine, the inhibition was more intense in normal synovial lining cells than in the RA ones. Electron microscopy showed that WGA gold complexes were localized in the cell processes, the lysosomes and the Golgi apparatus of macrophage-type cells, and in the cell surface and the Golgi apparatus of fibroblast-type cells, as well as in the extracellular matrix. Whenever the lectin was preincubated with N-acetyl-D-glucosamine, the cell processes and the lysosomes of synovial lining cells in RA were fairly well labeled. In light of the above findings, it seems that WGA is bound to hyaluronic acid which is produced in synovial lining cells, and that N-acetylneuraminic acid is localized in the cell processes and the lysosomes of synovial lining cells in RA.

Acta Sch Med Univ Gifu 42: 249-255 (1994)

Key words: synovium, lectin, sialic acid, electron microscopy

はじめに

植物性血球凝集素レクチンはある特定の糖鎖を認識し、特異的に結合する蛋白である。この結合は特異結合単糖により複合糖鎖との結合を阻害、あるいは結合の離解をおこす性質を持っている。1888年 Stillmark¹⁾が植物の実 *ricinus communis* (ヒマ) より分離された ricin に赤血球凝集素活性があることを見出したのが最初であり、その後1945年 Boydら²⁾により、これら植物性凝集素グループはラテン語の "legere: 選ぶ, 認識する" の意よりレクチンと総称された。この糖結合蛋白レクチンは細胞表面および細胞内複合糖質の分布や合成経路の解析などに広く利用されている³⁾⁻⁴⁾。小麦胚芽レクチン (Wheat Germ Agglutinin: WGA) は N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) および N-acetylneuraminic 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 α 1 および α 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⁵⁾。一方、生体に広く分布するムコ多糖の構成成分である glycosaminoglycans の keratan sulfate 末端残基 NANA は WGA に対する反応部位であることが生化学的研究により示されている⁶⁾。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 N-acetyl-D-glucosamine (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⁷⁾⁻⁸⁾。

Itokazuら⁹⁾⁻¹⁰⁾ や Borishら¹¹⁾ は数種類の FITC 標識レクチンを用いこれらは滑膜表層細胞に強く結合することを証明している。しかし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) 法による光学顕微鏡的観察およびレクチンコロイド金法 (lectin colloidal gold method) 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

本研究ではRA患者の人工関節置換術あるいは外傷患者(正常: normal control)の視血的手術時に採取した滑膜組織を用いた。滑膜組織へのWGAレクチンの結合の検討には、WGA-HRP, colloidal gold標識WGAレクチン液および結合阻害試験には特異結合単糖(Hapten sugar): GlcNAc(EY Laboratory Co. LTD USA)を用いた。

I. 光学顕微鏡的研究

採取した滑膜を $0.5\text{cm}^3 \sim 1.0\text{cm}^3$ の大きさに切り出し、直ちに4%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液(パラホルムアルデヒドから作製)にて室温で24時間固定の後、通常のパラフィン包埋とし、厚さ $4\mu\text{m}$ の切片を作製した。脱パラフィン後、本切片にWGA-HRP溶液($25\mu\text{g}/\text{ml}$)を室温湿潤箱内で1時間反応させた。その後15分3回洗浄した。核染色はヘマトキシリンでおこなった。

II. 電子顕微鏡的研究

Altmanら¹²⁾の方法を参考にし各操作時間を短縮した。すなわち、 0.5cm^3 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, カロリン酸緩衝液, pH 7.2)で 4°C , 24時間固

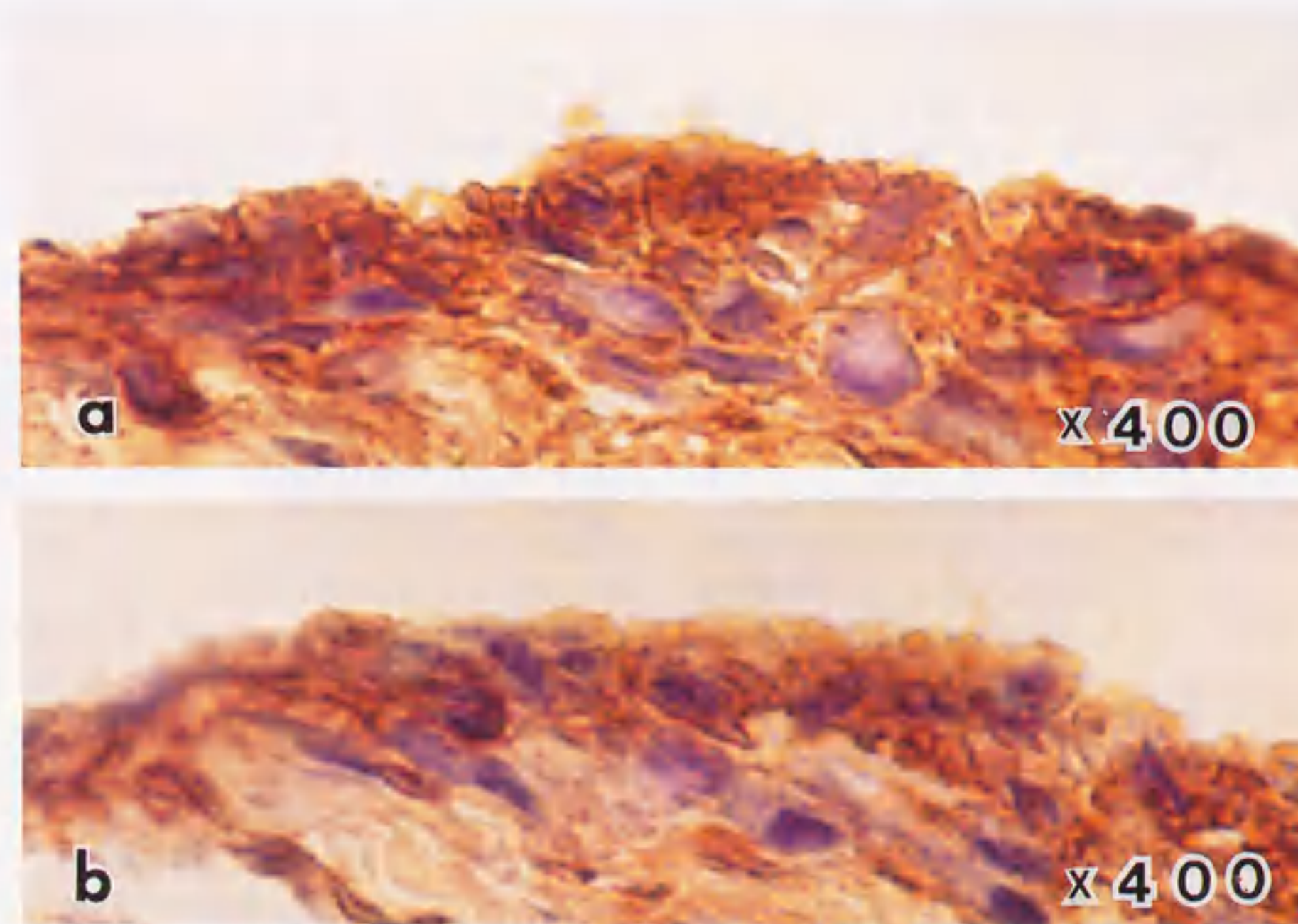


FIG. 1 Light micrographs of synovial lining cells in RA.

- a: The WGA-HRP-conjugated method. The cytoplasm is generally stained, especially on the surface of the cells. Sublining connective tissues are also seen to be stained.
b: The binding of WGA lectin preincubated with GlcNAc is inhibited, but not entirely.

定した。次に、同緩衝液で洗浄、エタノール系列で脱水、Lowicryl K4Mで包埋した。紫外線重合は3日間行ない、ブロックを作製した。

同ブロックより $1\mu\text{m}$ のsemithin sectionを作製し、トルイジンブルー染色を行い滑膜表層部を同定した。

超薄切片作製後、切片をフォールンパール膜を張ったニッケルグリッド上に取り、PBS中で5分間浸漬し、colloidal gold標識WGAレクチン液($15\mu\text{g}/\text{ml}$)で1時間反応させた。余剰レクチンを同緩衝液と蒸留水でそれぞれ6回(各2分)洗浄し、酢酸ウラニールと酢酸鉛で二重染色後、JEM100S型電顕(日本電子)で観察した。固定以外のすべての操作は室温で行った。

III. レクチン結合阻害試験

標識WGAと特異単糖(0.2M-GlcNAc)を30分間混合した後、IおよびIIと同じ操作をおこない、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(FIG. 1a)。ControlのWGA反応性はRA滑膜よりも結合は低下した(FIG. 2a)。

阻害試験では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と比較し結合阻害度は低下した(FIGs. 1b, 2b)。

II. 電顕所見 (TABLE 1)

RAとcontrolの滑膜における細胞内小器官への金粒子の結合は同様であった。すなわち、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(FIG. 3)。また、RA滑膜表層細胞のいわゆる線維芽細胞型細胞(F型細胞)はほとんど中間型のM-F

型細胞に変化しており、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(FIG. 4)、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。

GlcNAcを用いたレクチン結合阻害試験では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(FIG. 5)。また、ゴルジ装置には微かに金粒子の結合が残存した(FIG. 6)。

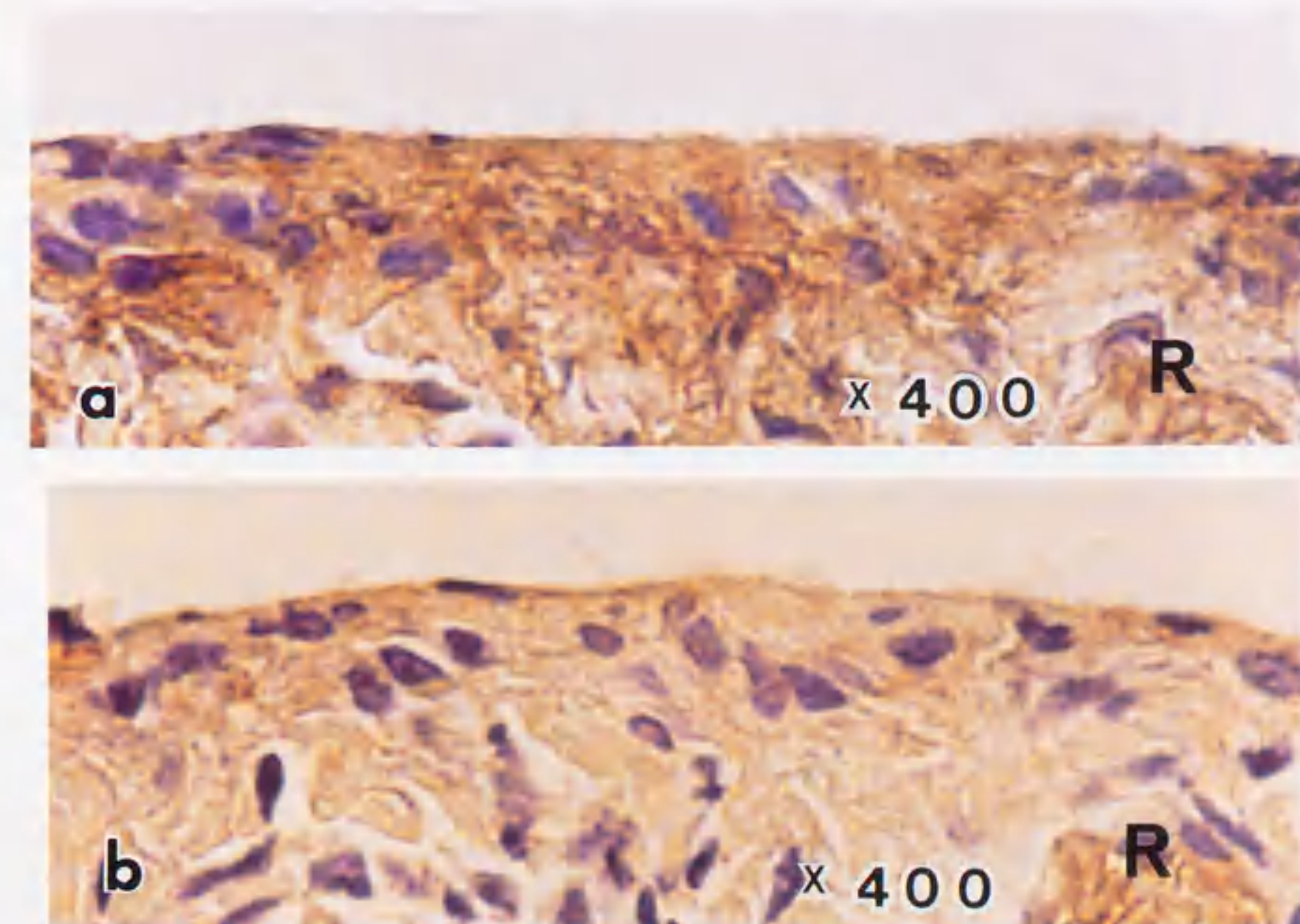


FIG. 2 Light micrographs of normal synovial lining cells.

- a: The cytoplasm is stained by the WGA-HRP-conjugated lectin.
b: The binding of WGA lectin preincubated with GlcNAc. The staining of the lining cells is inhibited, but that of red blood cells (R) remains unchanged.

TABLE 1 Localization of gold particles in electron micrographs

	Macrophage-type		Fibroblast-type	
		Hapten sugar inhibition		Hapten sugar inhibition
Cell process	++	+	++	±
Cell membrane (excluding cell process)	+	±	+	-
Golgi apparatus	++	+	++	±
Lysosome	++	+	+	±
Pinocytotic vesicle			+	-
Nucleus	-	-	-	-
RER	-	-	-	-
Mitochondria	-	-	-	-

FIGS. 3 to 6 Electron micrographs of synovial lining cells in RA. WGA binding was carried out by the lectin colloidal gold method. Bar=0.5 μ m

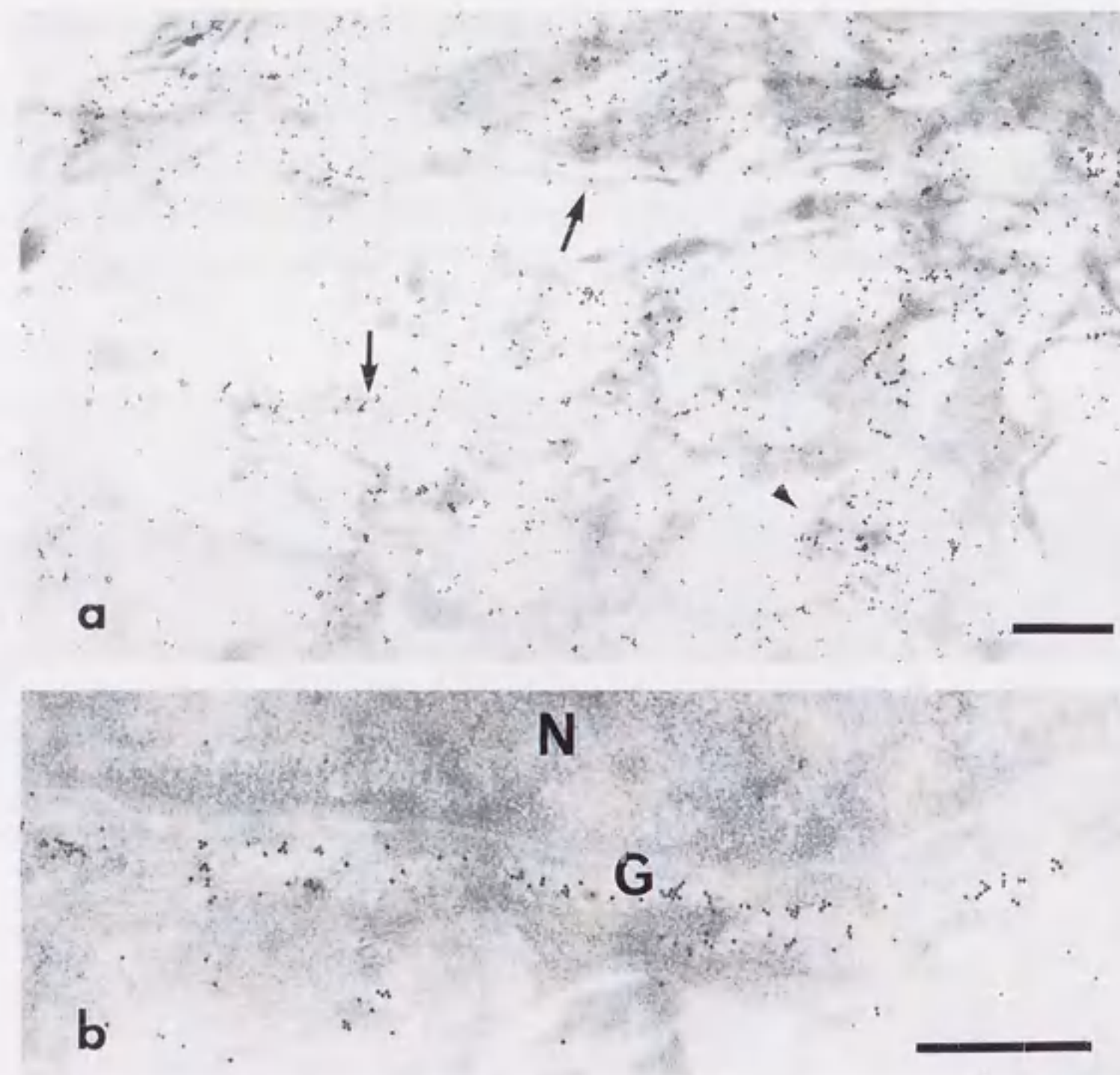


FIG. 3 Macrophage type cell in RA.
a: The cell processes (\rightarrow) and lysosome (\blacktriangleright) are labeled.
b: The Golgi apparatus (G) is labeled.
N: nucleus

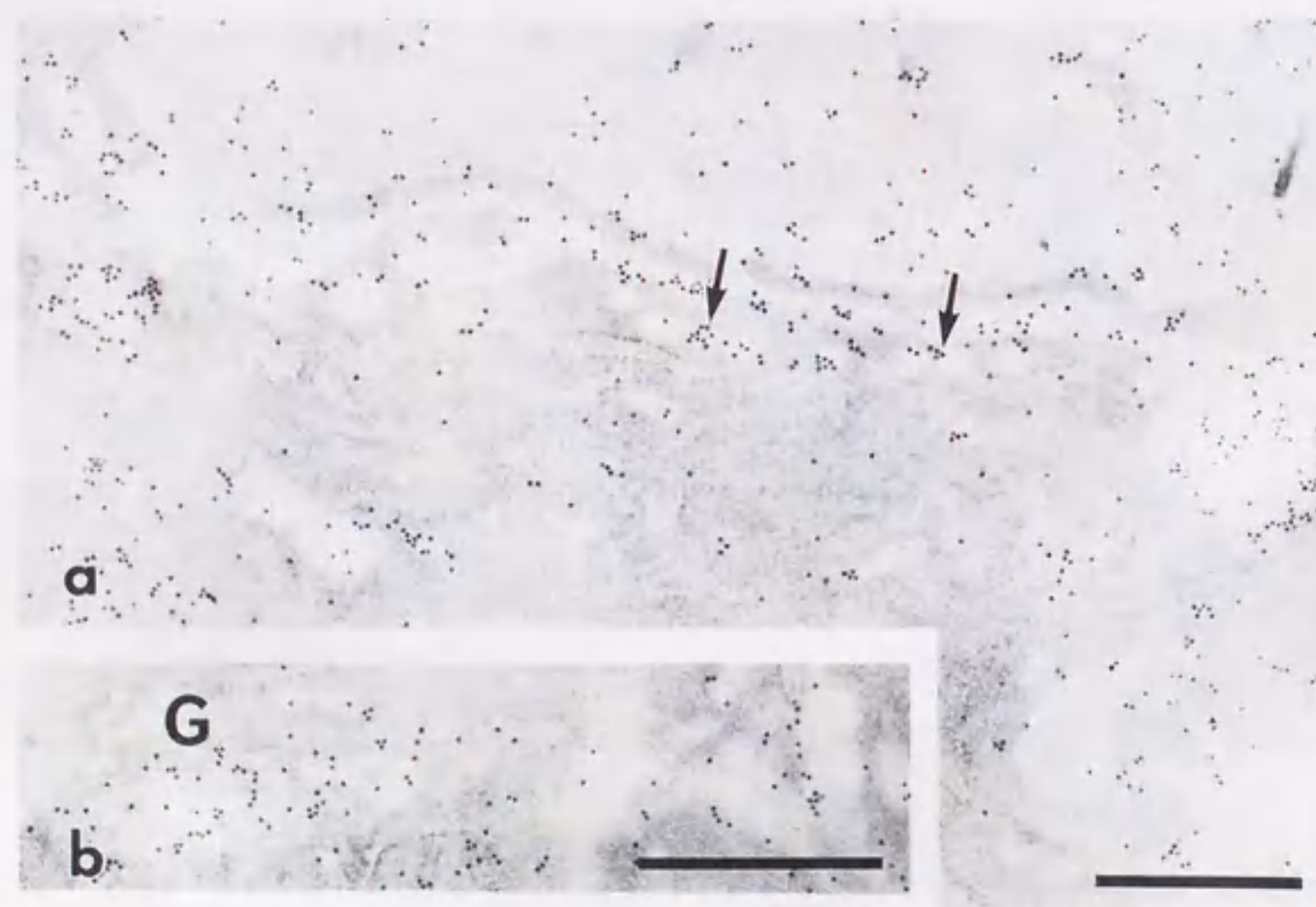


FIG. 4 Fibroblast type cell in RA.
a: The cell surface containing pinocytotic vesicles (\rightarrow) is labeled.
b: The Golgi apparatus (G) is labeled.



FIG. 5 Macrophage-type cell in RA. There is binding of WGA lectin preincubated with GlcNAc. The cell processes (\rightarrow) are fairly well labeled. This labeling show the WGA binding to the NANA.

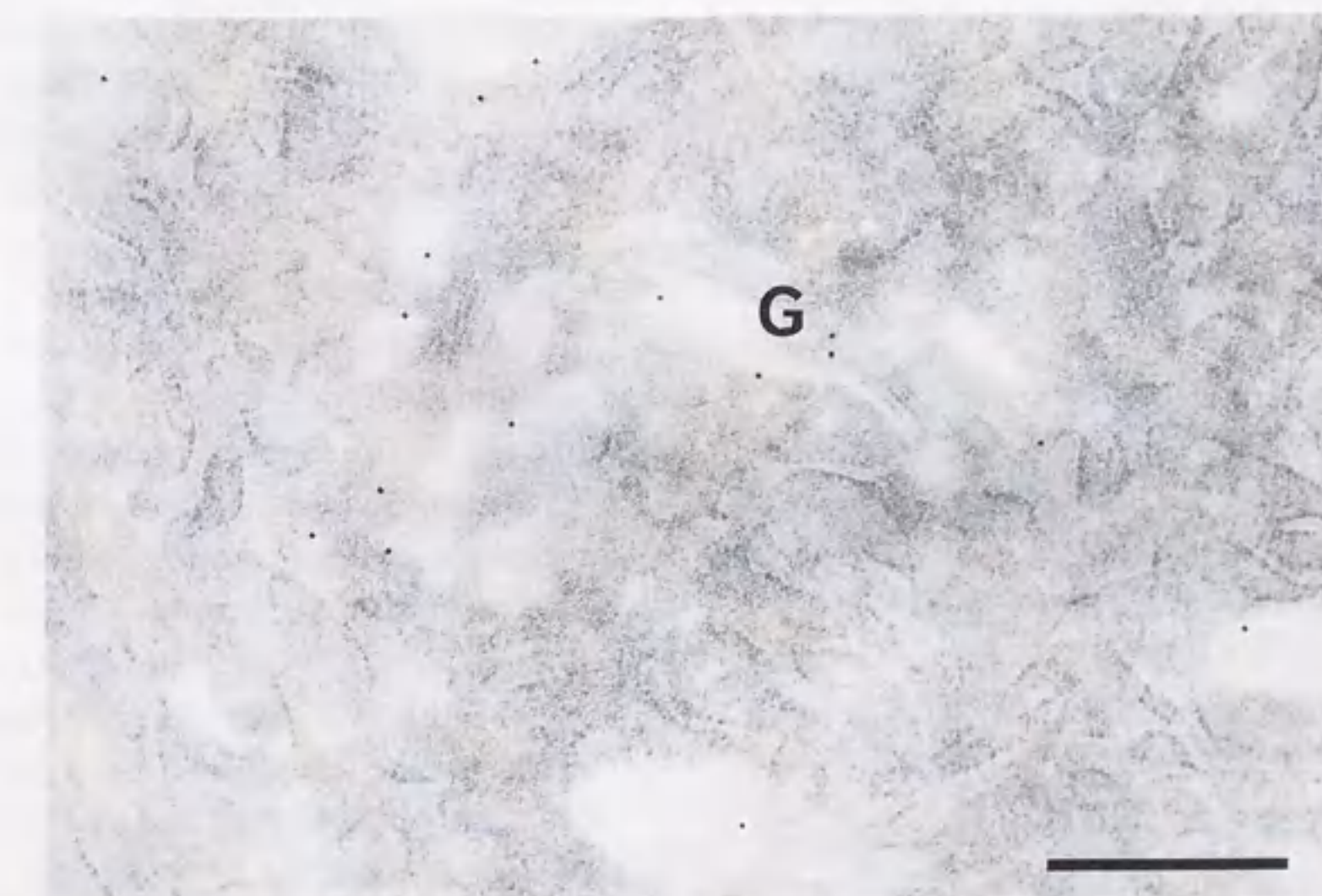


FIG. 6 Fibroblast-type cell in RA. There is binding of WGA lectin preincubated with GlcNAc. The gold particles on the Golgi apparatus (G) are sparse.

考 察

これまでの報告で植物性血球凝集素レクチンは滑膜表層細胞に結合することは知られていたが、細胞小器官における結合部位は明らかにされていなかった。本研究は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。また、細胞内でのWGA結合はGlcNAcとNANAを含む複合糖質が滑膜以外での組織におけるこれまでの研究¹³⁾で示されたほぼ同じ小器官に存在するを見出した。

これまでに言われている滑膜におけるヒアルロン酸の局在に関する光顕的研究の所見は次のようである。I) 滑膜表層は増感ジアミン染色で陽性であった¹⁴⁾。II) 細胞外基質はアルシアンブルー染色(pH2.4)で軽度陽性であった。一方、電顕的研究の所見では以下のようなものである。I) ヒアルロン酸合成はラジオオートグラフィイ(glucosamin-³H)によって示された⁸⁾。II) ヒアルロン酸の局在に関するコロイド鉄法において electron dense particles は滑膜細胞表層、基質、空胞、ゴルジ小胞にみられた⁷⁾。このような諸家の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、すでに究明されているように、GlcNAc や NANA がゴルジ装置で複合糖鎖に付加されること¹⁵⁾ などより、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る¹⁶⁾。

また、これまでの報告では F 型細胞は細胞質内によく発達した粗面小胞体を有し、蛋白に富んだ分泌液を産出する。それに対し M 型細胞は粗面小胞体が未発達であり、そのために蛋白合成は少ないと考えられるが、複合糖鎖で構成されるヒアルロン酸の局在を証明するコロイド鉄法¹⁷⁾では M 型細胞にも陽性反応を示した。すなわちヒアルロン酸の合成は粗面小胞体のリボゾームに関与せず、複合糖鎖合成はゴルジ装置で行われる⁸⁾。これらの報告と 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する。そして、二次ライソゾームに観察された金粒子は M 型あるいは M-F 型細胞に貪食された残屑の一部に結合しており、この所見は軟骨における多胞体の残屑への WGA 結合部位¹⁸⁾と類似している。

WGA レクチンは先にも述べたように GlcNAc および NANA と特異結合する。GlcNAc 単糖による WGA レクチン阻害試験では RA 滑膜は control に比し結合阻害度は低い。これは WGA が NANA と結合するからである。すなわち、RA 滑膜は control に比べ NANA が多く存在するものと考えられる。このことも諸家の報告に一致する結果である³⁾⁻⁹⁾。

阻害試験において RA 滑膜表層細胞の電顕所見は 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。また、RA 滑膜表層細胞における細胞突起の発達と NANA の局在を観察したが、NANA は急性炎症や組織壊死⁵⁾を伴う疾患や悪性腫瘍に多く存在する事実は、細胞レベルでの病態を考える上で、今後 RA の病因の解明に手がかりを与えるものである。すなわち、RA 滑膜表層細胞の激しい増殖とこれらの所見より明らかに変性細胞であることが確認された。

結 論

RA 滑膜表層細胞における WGA 結合部位をレクチンコロイド金法を用いた電顕的研究により明らかにした。WGA 金粒子は主に細胞突起、ライソゾーム、ゴルジ装置にみられた。GlcNAc 単糖の WGA 結合阻害試験において RA 表層細胞での結合はかなり残存したが、control 表層細胞での結合は低下した。これらの結果は RA 滑膜表層細胞における NANA 含有量が control よりも高いことが推察された。

稿を終えるにあたり、ご協力をいただいた岐阜県立下呂温泉病院加藤正夫院長、有本勝彦博士、宮下剛彦博士に深謝致します。

文 献

- 1) Stillmark H: Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den samen von ricinus comm. L. und einigen anderen euphorbiaceen: Inaug. Diss., Dorpart, 1888
- 2) Boyd WC, Shapleigh E: Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). *Science*, 119: 419 (1954)
- 3) Yotsumoto S, Tsuyama S, Tashiro M, Murata F: Ultracytochemistry of glycoconjugates in rat brunner's gland with labeled lectins. *J Electron Microsc* 39, 26-32 (1990)
- 4) Roth J: Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *J Histochem Cytochem* 31, 987-999 (1983)
- 5) Ashwell, G., and Morell, A. G.: In *meister, A., and Wiley, J. (eds.): Advances in Enzymology*. Orlando, Florida, Academic Press, 1974, 99p
- 6) Toda N, Doi A, Jimbo A, Matsumoto I, Seno N Interaction of sulfated glycosaminoglycans with lectins. *J Biol Chem* 256, 5345-5349 (1981)
- 7) Roy S, Ghadially F N: Synthesis of hyaluronic acid by synovial cells. *J Path Bact* 93, 555-557 (1967)
- 8) Barland P., Smith C, Hamerman D: Localization of hyaluronic acid in synovial cells by radioautography. *J Cell Biol* 37, 13-26 (1968)
- 9) Itokazu M, Bradley J, Francis MJO, Duthie RB: The histochemical demonstration of lectin receptors on synovia from patients with joint disorders. *Med Sci Res* 15, 317-319 (1987)
- 10) Itokazu M, Bradley J, Francis MJO, Duthie RB: Localization of Specific Carbohydrate Configuration in the Hemophilic Synovial Membrane. *Clin. Orthop.* 230, 284-288 (1988)
- 11) Borisch B, Huniche K, Helbig B: Localisation of glycoprotein moieties in the human synovial membranes. a lectin-histochemical investigation. *Z mikrosk. anat, Forsch, Leipzig* 100, 847-855 (1986)
- 12) Altman LG, Achmeider BG, Papermaster DS: Rapid embedding of tissues in lowicryl K4M for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 32, 1217-1223 (1984)
- 13) Ellinger A, Pavelka M: Subdomains of the rough endoplasmic reticulum in colon goblet cells of the rat: lectin-cytochemical characterization. *J Histochem Cytochem* 40, 919-930 (1992)
- 14) Okuda T, Matsui N, Taneda Y, Otsuka T,

- Hirabayashi Y, Yamada K: A histochemical study of glycosaminoglycan in rheumatoid synovial membrane. *J Jpn Orthop Assoc* 66, 1282 (1992)
- 15) Dunphy WG, Rothman JE: Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* 42, 13-21 (1985)
 - 16) Mallinger R, Geleff S, Bock P: Histochemistry of glycosaminoglycans in cartilage ground substance. alcian blue staining and lectin-binding affinities in semithin epon sections. *Histochemistry* 85, 121-127 (1986)
 - 17) Ghadially F N: Synovial membrane. *Fine Structure of Synovial Joints*, London, Butterworths 1983. 545 p
 - 18) Kashiwaya Y: Ultrastructural localization of wheat germ agglutinin binding sites in rat epiphyseal cartilage. *Nihon Univ. Dent J* 62, 387-395 (1988)

