

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

角化症研究会記録集 (1993.12) 8巻:22～23.

ヒト皮膚におけるロリクリン局在の免疫電顕的検討 acrosyringial L-granulesの多様性

山本明美, 飯塚一



ヒト皮膚におけるロリクリン局在の免疫電顕的検討——acrosyringial L-granulesの多様性

山本明美, 飯塚 一
旭川医科大学皮膚科

Immunoelectron microscopic study of loricrin distribution in human skin-heterogeneous L-granules in acrosyringia

Ishida-Yamamoto A & Iizuka H
(Department of Dermatology, Asahikawa Medical College)

Cornified cell envelope (CE)の主要成分の1つロリクリンは^{1,2)}, 新生仔マウス表皮においては初め顆粒細胞内で球状のL-granules (L顆粒)として現われ, その後角層細胞のCEに移行するが³⁾, ヒト表皮顆粒細胞内には同様の顆粒は存在しないため異なるロリクリンの存在様式が推定される。今回われわれは, 免疫電顕法を用いてヒト表皮および表皮内汗管(ここでは多様な細胞内顆粒が存在する⁴⁾)におけるロリクリンの局在を, フィラグリンと対照しながら検討した。

材料と方法

手術時に得られたヒト正常皮膚を用いた。免疫組織化学には1次抗体として抗ロリクリン抗体(Dr.Hohl博士より供与)および市販の抗フィラグリン抗体を用いた。光顕レベルの観察には凍結切片あるいはLowicryl K11M樹脂包埋切片⁵⁾にイムノゴールド銀染色法を施した。免疫電顕にはLR white樹脂⁶⁾もしくはLowicryl K11M樹脂包埋標本の超薄切片をポストエンベッディング法によりイムノゴールドを用いて標識し, 酢酸ウランにて染色した。

通常透過電顕は, 標準的な方法⁶⁾によった。

結 果

光顕的免疫組織化学

ロリクリンの免疫反応は, 表皮においては最上層の顆粒細胞⁷⁾の胞体および核内にみられた(写真1A)。フィラグリンの免疫反応は全層の顆粒細胞の胞体内および角層細胞内に認められた(写真1B)。付属器では毛包漏斗部と表皮内汗管にフィラグリンとロリクリンの反応がみられた(写真1C)。

表皮の電顕的免疫組織化学

付属器官表皮ではロリクリンの反応は最上層顆粒細胞内に⁸⁾び漫性にみられた(写真2)。フィラグリンの反応はケラトヒアリン顆粒に局在していた。角層細胞ではロリクリンの反応はCEの内側に限局しており, フィラグリンの反応は細胞内全

写⁹⁾ 体に見られた(写真3)。

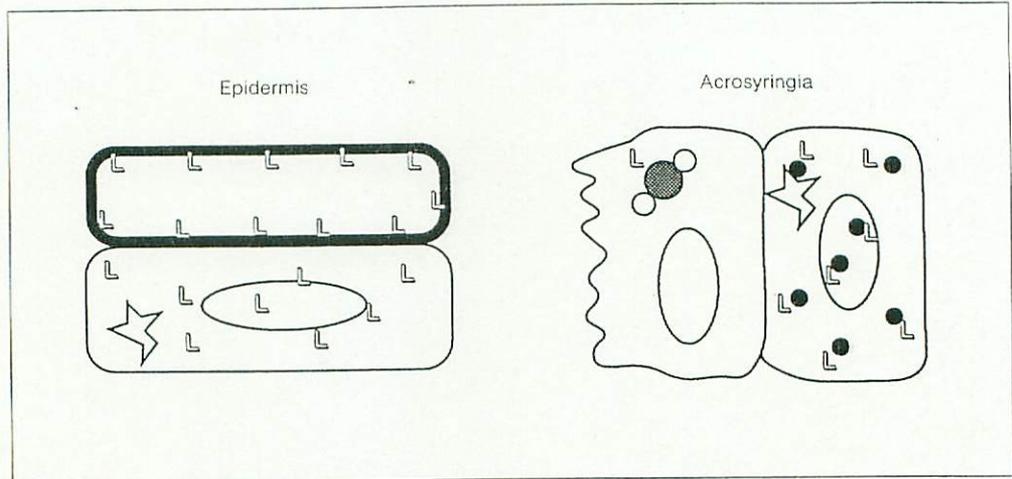
表皮内汗管の通常透過電顕および免疫電顕的観察

写⁹⁾ 4 表皮内汗管は内層と外層の2つの細胞層からなる(写真4)。このうち外層の細胞内には2種類の顆粒が見られた。1つは表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒と区別のつかない形状をしており, 抗フィラグリン抗体で陽性に染色された。他方の顆粒は非常に高い電子密度をもつ円形小型の顆粒で, 核内においては孤立性に, 細胞内においては孤立性にあるいは前述のフィラグリン陽性顆粒と相接して存在していた。オスミウム酸による固定を行わないとこの円形顆粒は電子密度が低く,

写⁹⁾ 5 オスミウム好性が示された(写真5)。免疫電顕法で本顆粒は

図1-ヒト皮膚におけるロリクリン(L)局在の模式図

表皮においては顆粒細胞内に散らばっていたロリクリン分子が角層細胞で辺縁帯の内側に組み込まれる。表皮内汗管壁ではロリクリンは外層細胞内の小型球状の顆粒として蓄えられたのち辺縁帯形成にあずかる。内層細胞のロリクリン免疫反応陽性顆粒の意義は現在のところ不明。



写⑥ ロリクリン陽性であった(写真6)。ロリクリンの陽性反応は細胞膜下(写真6B), および角質化した外層細胞のCEにおいても見られた。

一方表皮内汗管壁細胞内では比較的平滑な輪郭を有する顆粒が細胞質内にみられ、その多くは高い電子密度を有し(写真

写⑦ A, B), フィラグリン陽性であった(写真6A, 7)。これ以外の顆粒は電子密度がこれよりやや低く、通常前者の顆粒と相接して認められ、フィラグリン陰性であった(写真4A, B, 6A, 7)。本顆粒は37°C 1時間の抗ロリクリン抗体との反応では陰性であったが(写真6A), 4°C オーバーナイトの反応を行うと陽性に標識された(写真7)。

考 察

今回の観察では、L顆粒はヒト皮膚の付属器間表皮においては見られなかった。Yonedaらの報告⁷⁾では、ロリクリン陽性反応はヒト表皮顆粒細胞のフィラグリン陽性ケラトヒアリン顆粒のうえにみられたとされている。われわれの観察では、むしろケラトヒアリン顆粒をさけるようにして細胞内全体にみられたが、この結果の明らかな違いの理由は不明である。角層細胞においてはロリクリンの反応は主にCE内側面にみられ、ヒトにおいてもロリクリンはCE前駆体であることを支

持した。

表皮内汗管壁細胞内には多様な細胞内顆粒が観察されているが⁴⁾, その本態は不明であった。今回われわれは2種類のL顆粒がここに存在することを示した。一方は外層細胞内に、他方は内層細胞内に存在していた。前者は齧歯類のL顆粒³⁾に極めてよく似た特徴を有していた。一方内層細胞のL顆粒はこれらとは形態的に異なり、またロリクリン抗体への反応性も低く、内層細胞にはあきらかなCEの形成が見られないため、この顆粒の意義は不明である。以上の観察結果を模式的に図1に示した。

本研究の一部は日本リディアオリリー協会からの研究助成金によった。本研究に協力ならびに助言をいただいたR.A.J. Eady博士に深謝する。

文 献

- 1) Mehrel T et al : *Cell* 61 : 1103-1112, 1990
- 2) Hohl D et al : *J Biol Chem* 266 : 6626-6636, 1991
- 3) Steven AC et al : *J Struc Biol* 140 : 150-162, 1990
- 4) Kastl I & Anton-Lamprecht I : *Arch Dermatol Res* 282 : 71-75, 1990
- 5) Shimizu H et al : *Arch Dermatol Res* 281 : 443-448, 1989
- 6) 石田明美ほか : *日皮会誌* 97 : 785-792, 1987
- 7) Yoneda K et al : *J Biol Chem* 267 : 18060-18066, 1992

DISCUSSION

飯塚 どうもありがとうございます。ご質問、ご討議お願いします。

真鍋 ロリクリンが核の中にあるというのはどういうことなのでしょう。Sequenceをみましても核の中に移行できるようなシグナルはもっていませんよね。どうやって中に入っていくのでしょうか。また何をそこでやっているとお考えですか。免疫電顕で見たときに核の中の顆粒も染まっていましたか。

山本 どうして核の中に移行するのかその機

序は推測の域を出ませんし、それは今の段階では私の答えるべき範囲ではないと思っています。核内L-granuleはnew born mouse表皮においても観察されており、今回のわれわれの観察結果とも一致しております。

真鍋 先生が見たときも、やはり核の中は染まっていたのですか。

山本 ええ、そうです。

真鍋 核の外側はどうですか。グリシムループというのは、よくケラチンとくつつく構造

ですから、核膜のラミンとくつついてしまうということはないですか。

山本 核膜にL-granuleが接している像は観察しておりません。

真鍋 集合する前に、バラバラになった状態で核膜と反応しているようなことはないですか。

山本 そういう像はありませんでした。用いた抗体はロリクリンのC末端の14個のアミノ酸配列に対する抗体なんですけれど、その部

分が最近ほかのcornified cell envelopeの前駆体などとhomologyを示すことが示されており、あるいはロリクリンとはまた違ったものを何か核内の部分はひろっているのかしれないとは思いますが。

真鍋 どうもありがとうございました。

飯塚 真鍋先生、核内移行シグナルという意味は、蛋白のsequenceを指しているわけですね。

真鍋 そうです。

飯塚 あれは、全部確定されているわけではないですね。

真鍋 でも、かなり似たような構造をもっているのです。ところが私は一度もみつけたことはないのですけど、トリコヒアリンが核の中でみつかるというのです。そのときのディスカッションでは、アクチンが核の中に入ることがあるらしいのですが、アクチン自体はシグナルを持っていないのですけれど、何かが引っぱっていつてくれて中に入ってしまうということでした。

飯塚 例えばステロイドレセプターが核の中に入っていきますね。あのときもレセプターがheat shock proteinを介してアクチンと結合していて、それが切り離された瞬間に核

内移行シグナルに従って、さっと走るようになっていますね。ただしそのシグナルは、いくつか知られてはいるのですけれど、全部がつかまったわけではないと私は理解していたものですから。

真鍋 ただ、ロリクリンのsequenceを見ますと、およそそういうものとはちがうような気がしました。

二瓶 私も免疫電顕で同じように核の中がケラチンで染まって、これはどうしてかとずいぶん悩んだことがあります。Wayneの橋本健先生に聞きましたら、核の中の成分の中で金とか銀とかそういった重金属と吸着する物質があるからだと言われてしまっていて、そんなものかなと思ったことがあります。そういったことはどうなのでしょう。

三橋 Acrosyringiumの内層細胞と外層細胞で顆粒のなかのロリクリンの反応が、一時間incubateしたときには内層細胞は陰性で、オーバーナイトすると陽性になったとおっしゃいましたね。それは、抗原性が外層細胞と内層細胞では異なっているということでしょうか。

山本 それが考えられると思います。先ほどの真鍋先生のとときの解答で申し上げましたよ

うに、本抗体はC末端に対するポリクローナル抗体ですが、最近他のcornified cell envelopeの前駆体などとhomologyがみつかっております。若干抗体に対する反応性が違うのは、ロリクリンと一部似たアミノ酸配列をもつ他の物質であるためなのかもしれません。それから先ほどの二瓶先生への解答ですが、通常電顕で核内にあいう細胞質内と同様の電子密度の高い特徴的な顆粒が観察されました、それがロリクリン陽性の顆粒であったということです。それをno-specificな所見とは私どもはとらえておりません。

飯塚 どうもありがとうございました。

座長一飯塚 一
旭川医科大学皮膚科

真鍋 求
順天堂大学医学部皮膚科
二瓶義道
福島県立医科大学皮膚科
三橋善比古
弘前大学医学部皮膚科

5. ヒト皮膚におけるロリクリン局在の免疫電顕的検討—acrosyringial L-granulesの多様性

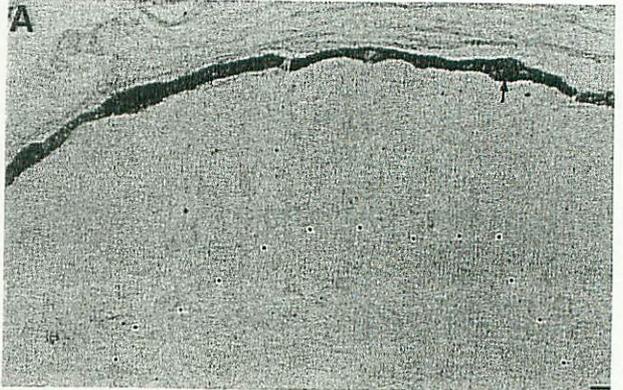
写真1—ロリクリンとフィラグリンの光顕的免疫組織化学

A: ロリクリンの反応は最上層の顆粒層細胞の細胞質内および核内(矢印)に見られる。

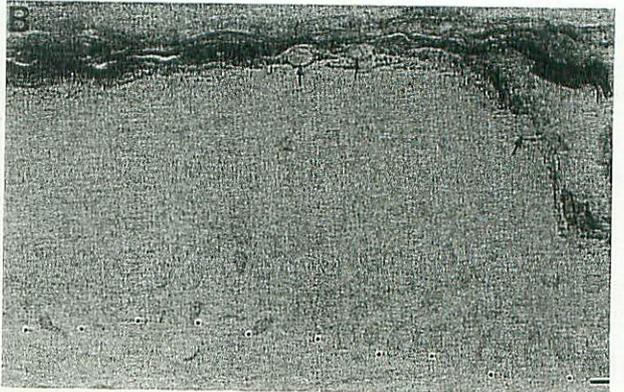
A-B: Lowicryl K11M樹脂包埋切片, ×370

C: 凍結切片, ×210

表皮真皮境界をドットでマークしてある。Bar=10mm



B: フィラグリンの反応は顆粒層、角層細胞に見られるが、核内(矢印)は染まっていない。



C: ロリクリンの反応は表皮内汗管にも強く認められる。

図中C: 角層

図中G: 顆粒層

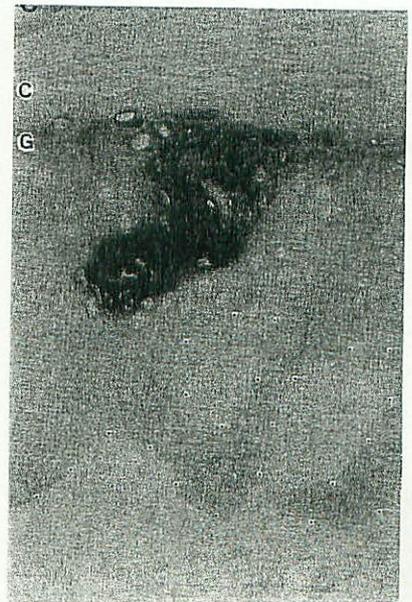


写真2-表皮顆粒層細胞におけるロリクリンの免疫電顕

LowicrylK111M切片を10nmの金コロイドで標識した。最上層の顆粒細胞内には多数の金粒子が見られるが(右上)、I層下の細胞内には見られない(左下)。ケラトヒアリン顆粒(kh)はほとんど標識されていない。
d: デスマソーム, ×19,500

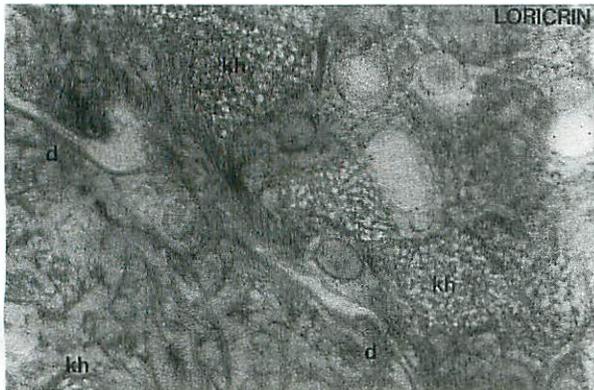


写真3-ロリクリンとフィラグリンの角層細胞における免疫電顕

LRWhite切片をそれぞれ10nmと30nmの粒子で標識してある。ロリクリンの標識は細胞辺縁より25ないし30nmほど内側に線状に見られるのに対し、フィラグリンは細胞内にび慢性に反応が見られる。
d: デスマソーム, ×32,000

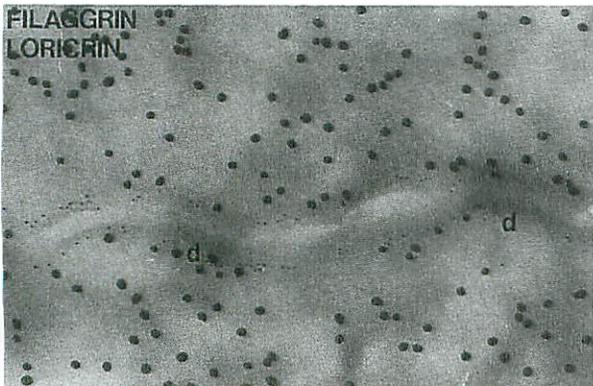
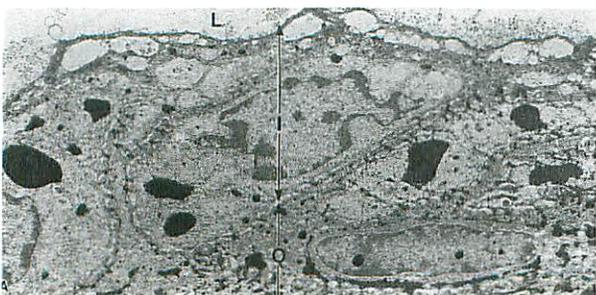


写真4-表皮内汗管の通常透過電顕

A: 内層(I)および外層(O)細胞内に様々な形状の顆粒が存在する。Lは管腔。内層細胞顆粒と外層細胞顆粒の強拡像をそれぞれBとCに示す。×3,600



B: 内層細胞内では平滑な輪郭の濃淡に差のある顆粒が相接して混成顆粒をなしている。×8,800
C: 外層細胞には細胞質内および核内に高電子密度の円形顆粒が見られる(矢印)。C: 辺縁帯を形成し角質化した外層細胞, ×9,600

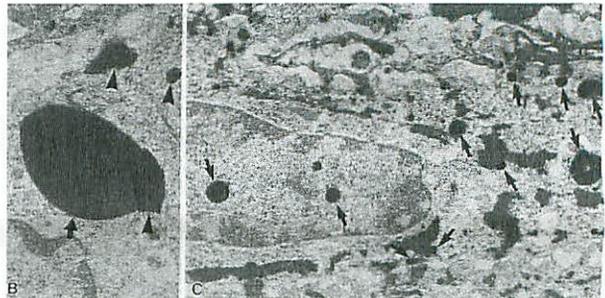


写真5-グルタルアルデヒドとオスミウム酸による2重固定標本(A)と、グルタルアルデヒドのみによる固定を行った標本(B)における表皮内汗管外層細胞の顆粒(矢印)の電子密度の違い

前者では後者より非常に電子密度が高く、オスミウム好性であることがわかる。×7,800

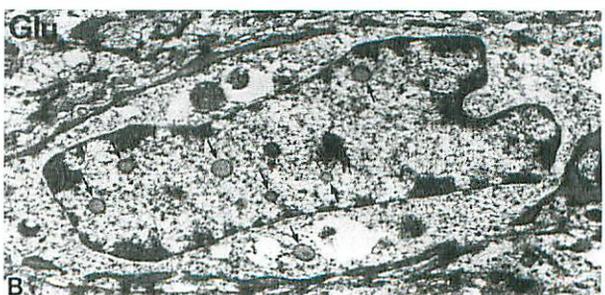
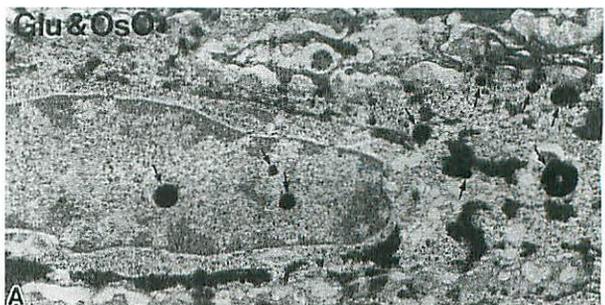
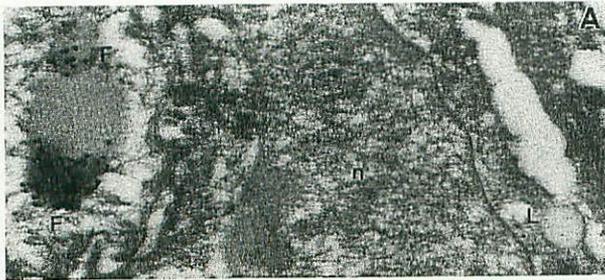


写真 6 - 表皮内汗管壁細胞のLRWhite切片を用いた免疫電顕

A: 左手の内層細胞内にはフィラグリン(30nm粒子)に陽性の部分と(F)それにはさまれた陰性の部分をもつ混成顆粒が存在し、中央から右手の外層細胞内にはロリクリン(10nm粒子)陽性の円形小型の顆粒(L)が見られる。n: 核, ×17,400
抗ロリクリン抗体との反応は37°C 1時間行った。



B: 外層細胞内のロリクリンの標識は円形顆粒(L)内と細胞膜下に認められた。d: デスマソーム, ×23,900



写真 7 - 表皮内汗管内層細胞混成顆粒のフィラグリン(30nm粒子)とロリクリン(10nm粒子)のLRWhite切片を用いた免疫電顕

両端はフィラグリン陽性, 中央はロリクリン陽性である。ロリクリン抗体とは4°Cオーバーナイト反応させた。×29,000

