潰瘍性大腸炎大腸粘膜における Dolichos biflorus
agglutinin (DBA), soybean agglutinin (SBA),
concanavalin A (Con A) の結合性および結合部位

井 上 文 彦・古 川 裕 夫・内 野 治 人*

Jpn. J. Clin. Immun., 10(2), 194~200, 1987.

Distribution of lectin binding sites in the colonic mucosa in ulcerative colitis

Fumihiko Inoue, Hiroo Furukawa and Haruto Uchino*

Department of Internal Medicine, Otsu Red Cross Hospital

* *The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University*

【Summary】

The distribution of binding sites for three lectins labeled with rhodamine was studied by using immunofluorescence microscopy in the colonic mucosa in ulcerative colitis.

Binding sites for Dolichos biflorus agglutinin (DBA), a lectin specific to terminal α -N-acetylgalactosamine residue, and soy bean agglutinin (SBA), specific to terminal α or β -N-acetylgalactosamine residue of surface glycoprotein in the endoscopically uninvolved mucosa in ulcerative colitis were almost equal in distribution to those of normal human colon. These two lectins were markedly decreased in distribution in the endoscopically involved mucosa, whereas they were also decreased in the boundary zone which was considered as locating between the involved and the uninvolved portion. On the other hand, there was no definite difference in binding sites for concanavalin A (Con A), a lectin specific to terminal α -mannopyranoside, α -glucopyranoside, between normal colon and ulcerative colitis.

These results suggest that a quantitative and/or qualitative alteration in the colonic mucin has an important role in the colonic mucosa in ulcerative colitis. And lectins may be developed into a powerful probe for the detection of biochemical change in the colonic mucosa in ulcerative colitis.

Key words : ulcerative colitis,
lectin,
goblet cell mucin

【概 要】

潰瘍性大腸炎大腸粘膜におけるレクチンの結合性の分布を、標識レクチンを用いて、蛍光抗体法により検討した。

患者大腸粘膜の内視鏡的正常部では、*Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), soybean agglutinin (SBA) とともに、正常対照群と同様に、杯細胞粘液に陽性で、減少傾向はみられなかった。内視鏡的境界部、病変部では、両者の分布はともに減少し、特に、病変部粘膜で著明であった。concanavalin A (Con A) は、間質の細胞に陽性であったが、一定の傾向は示さなかった。

潰瘍性大腸炎大腸粘膜では、DBA, SBA の結合性が変化し、それは、杯細胞粘液の量的 and/or 質的（糖鎖構造）な変化が重要であると考えられ、今後の検討が必要である。また、レクチンは、本症大腸粘膜での生化学的変化を検索するうえで、有用な手段であることが示唆された。

I. 緒 言

レクチンは、植物由来の赤血球凝集素として発見された蛋白質であるが、今日では、動物にも存在することが知られており、一般的には、植物、動物、微生物などに存在する蛋白質のうち、糖鎖に対する特異的結合活性を持った物質の総称として用いられている¹⁾。

一方、細胞膜や細胞内の膜系に存在する複合糖質の糖鎖構造は、細胞の分化、加齢、変性、悪性化などにより変化することが知られており、こうした糖鎖構造の変化は、特定の糖構造と特異的に結合するレクチンを用いて、組織化学的に解析することができる²⁾。

今回、著者らは、糖結合性の判明している3種類の標識レクチンを用い、潰瘍性大腸炎大腸粘膜におけるレクチン結合パターンについて、蛍光抗体法により検討し、若干の興味ある知見を得た。

II. 材料と方法

1. 大腸生検標本

正常者：大腸内視鏡検査で病変がなく、内視鏡的に正常な部位より生検し、Hematoxylin・Eosin 染色（H・E 染色）で、組織学的に正常と考えられた5例のヒト大腸組織を対照として使用した。

潰瘍性大腸炎患者：厚生省特定疾患研究班による潰瘍性大腸炎の診断基準³⁾により、臨床症状、注腸X線検

査、内視鏡検査、組織学的検査で確定診断を得たもので、全例で15例である。全症例につき、大腸ファイバースコープを用いて、内視鏡的正常部、境界部および病変部から生検を施行、標本を採取した。この際、境界部とは、本症の特徴である連続病変が次第に消退して正常へ移行する部、すなわち、血管透見像の消失、粘膜の易出血性、脆弱性、多発性潰瘍、びらんなどの所見が消失していく部位であり、正常部とは、この境界部から10 cm以上離れた部位とした⁴⁾。標本は、型の如く、ホルマリン固定、パラフィン包埋ののち、薄切切片（厚さ4 μm）を作成し、脱パラフィン後、蛍光抗体法に供し、また、連続切片をH・E染色し、結合部位を検討した。

2. レクチン

糖特異性の判明している *Dolichos biflorus* agglutinin（以下 DBA と略す）、soybean agglutinin（以下 SBA と略す）および concanavalin A（以下 Con A と略す）の3種類のローダミン標識レクチンを用いた。DBA（E-Y Lab. 製, lot 020806）、SBA（E-Y Lab. 製, lot 022307）、Con A（E-Y Lab. 製, lot 022911）である。濃度は、予備実験から、すべて 0.1 mg/ml として使用した。

3. 蛍光抗体法

既述の薄切標本を PBS にて洗浄後、ローダミン標識

表 1 大腸粘膜における DBA, SBA, Con A の結合性

Lectin	糖結合特異性	正 常 対照者	潰瘍性大腸炎		
			正常部	境界部	病変部
DBA	α -GalNAc	++~+++	+~+++	-~++	-~+
SBA	α -GalNAc > β -GalNAc	++~+++	+~+++	-~++	-~+
Con A	α -Man > α -Glc	+~++	+~++	+~++	+~++

a 正常部：杯細胞および粘液に強陽性である

b 境界部：染色性はやや減少している

c 病変部：わずかに染色されるが、著明に減少している

図 1 潰瘍性大腸炎大腸粘膜の DBA 染色性 (×200)

a 正常部：杯細胞および粘液に強陽性である

b 境界部：染色性は若干減少している

c 病変部：腺構造は乱れ、染色性は減少している

図 2 潰瘍性大腸炎大腸粘膜の SBA 染色性 (×200)

a 正常部：腺管細胞には陰性で，間質の細胞が陽性である

b 病変部：正常部と比べ，はっきりした差は認めない

図3 潰瘍性大腸炎大腸粘膜の Con A 染色性 (×200)

レクチンと室温で1時間反応後，PBSにて十分洗浄し，緩衝グリセリン液で封入後，鏡検した。すなわち，蛍光抗体直接法を行った。鏡検には，ニコン社製落射式蛍光顕微鏡を使用した。

観察に際しては，蛍光の分布を，(－)認められない，(＋)わずかに認める，(++)散在して認める，(+++)多数認める，の4段階に分類した。

III. 結 果

観察の結果は，表1のとおりである。DBAおよびSBAの染色部位は，H・E染色標本との対比および，著者らが，蛍光抗体法を用いて行った大腸粘膜における大腸杯細胞粘液染色の検討⁴⁾から杯細胞粘液に相当すると考えられた。正常対照者大腸粘膜では，DBAは杯細胞

粘液に強く染まり，SBAと，ほぼ同様のパターンを示した。Con Aは，腺管細胞は染まらず，間質の細胞が強く染色された。潰瘍性大腸炎大腸粘膜においても，図1，図2に例示したように，DBAはSBAとほぼ同様のパターンを示した。すなわち，内視鏡的正常部では，正常対照に近い染色性を示し，境界部粘膜では染色性が減少し，病変部粘膜ではさらに減少し，ほとんど染色されない例もみられた。Con Aについては，図3に一部例示したように，部位による染色性の変化は明らかでなく，一定の傾向を示さなかった。また，正常対照との差異も明らかでなかった。

IV. 考 案

レクチンは，ある糖鎖末端の残基と特異的に結合する

ため、これを利用して膜構造の変化を組織化学的に検索するのに使用される^{1,2)}。著者らは今回、糖特異性のうから、特に腸管での specificity が強いと考えられる3種類のレクチンを用いたが、それぞれの糖特異性は、DBA が N-Ac- α -galactosamine (α -GALNAc), SBA が, N-Ac- α or β -galactosamine (α -GALNAc or β -GALNAc), Con A が, α -D-mannopyranoside (α -Man), α -D-glucopyranoside (α -Glc) である。

レクチンを用いた組織化学的方法には、螢光色素、Horseradish peroxidase (HRP), フェリチン, 金コロイド, アイソトープなどによる標識レクチンを用いる方法がある。螢光色素による標識レクチンは、HRP に比べると高感度であると考えられ⁵⁾、今回の実験には、ローダミン標識レクチンを使った螢光抗体法を用いた。

従来から、レクチンを用いて、消化管複合糖鎖に関する検索が行われている⁵⁻⁷⁾。大腸粘膜については、細胞の分化、悪性化についての報告がみられる^{8,9)}。Boland ら⁸⁾は、FITC 標識レクチンを使い、例えば、DBA では、ヒト大腸の正常粘膜、腺腫などの良性病変では結合性がみられ、癌ではそれが消失するとし、peanut agglutinin (PNA) では、悪性化により PNA 結合性がみられるとした。吉岡ら⁹⁾も、ヒト大腸の癌、腺腫、腺腫様病変におけるレクチンの結合性を、lectin-antilectin-PAP 法により検討し、癌化により PNA 結合性が出現するとした。

さて、潰瘍性大腸炎は、未だ病因不明の炎症性腸疾患のひとつであるが、近年、免疫学の進歩に伴い、本症の病態における免疫異常の報告が増加している^{11,12)}。著者らは、螢光抗体法を用いて、本症大腸粘膜における secretory component (SC), IgA, 大腸杯細胞粘液の3者の分布を観察し、これらの主要な腸管局所粘膜防御因子が、内視鏡的正常部から境界部、病変部に移行するにつれて分布が減少しており、局所免疫不全の状態にあることを示した⁴⁾。また、そうした s-IgA 系の免疫不全に対する代償として、ラクトフェリン含有細胞が増加している可能性を示した¹³⁾。このうち、今回著者らの行ったレクチン結合性の検討と関連して興味深いのは、杯細胞粘液の分布の変化である。潰瘍性大腸炎では、クローン病、感染性腸炎などと異なり、その病理学的特徴のひとつとして、活動期大腸粘膜において、杯細胞の減少がみられることは事実であり、著者らは、本症における細胞性自己免疫は、選択抗原としての大腸杯細胞粘液に対して成立したものであることを証明した^{14,15)}。今回、H・E 染色標本との対比なども含めて、DBA および SBA の結合性の分布が、大腸杯細胞の分布と、ほとんど一致して

変化したことは注目に値する。既に、DBA 結合性は、正常の杯細胞粘液に陽性であることが知られており⁸⁾、DBA と類似した糖特異結合性を有する SBA が同様の分布を示すことは容易に理解できる。したがって、潰瘍性大腸炎において DBA, SBA の結合性が減少したことは、杯細胞粘液の量的な減少をも反映していると考えられる。

一方、DBA, SBA の結合性は、杯細胞の分化過程あるいは、悪性化により変化する事が知られている⁸⁾。これは、細胞の分化、悪性化に伴う糖鎖構造の変化を表現しているものと考えられている。こうした観点からみれば、今回の結果は、潰瘍性大腸炎大腸粘膜における杯細胞粘液の糖鎖構造の変化、すなわち質的な変化として考えられる可能性がある。ただ、H・E 染色による組織検査により dysplasia を含めて、悪性化の所見を認めなかったため、こうした結果が、悪性化の表現ではないことは事実である。本症における大腸粘膜粘液の化学組成の変化は、Fillipe ら¹⁶⁾、Fraser ら¹⁷⁾も指摘しているところであり、著者らの用いたレクチンによる検索も、今後、有用な手段となり得よう。

Con A については、正常対照者、潰瘍性大腸炎患者ともに、大腸粘膜杯細胞粘液は染色されず、間質の細胞が陽性を示した。陽性細胞については、本法では同定が困難であった。両者の間で、明らかな分布の差異は認められず、潰瘍性大腸炎の内視鏡的正常部、境界部、病変部の間でも、一定の傾向は示さなかった。これらについては、理由は不明であり、他方面からのアプローチを含めて、今後の検討が必要であろう。

尚、組織におけるレクチン結合性は、血液型により差があるかどうかの問題であるが、諸家の報告^{8,9)}では、血液型による差は認められておらず、今回の著者らの検索では、検討しなかった。

最近、本邦においても、潰瘍性大腸炎に大腸癌が合併する症例の報告が散見されるようになり、そうした症例における大腸粘膜での生化学的変化を検索する目的にも、標識レクチンを用いる方法は有用であると考えられる。事実、Boland ら¹⁸⁾は、18人の本症患者の直腸粘膜を FITC 標識レクチンを用いて検討し、この方法が、本症における癌の合併の危険性をみるのに有用である可能性を示唆した。ただ、レクチン結合性で示されるような、単に数個程度の糖蛋白質の変化だけで、癌化全体を説明することはいまいしめられよう。

今回は潰瘍性大腸炎以外の炎症性腸疾患、虚血性大腸炎、薬剤性大腸炎他の検討は行わなかったため、対比はできなかったが、今後これらの疾患における同様の検索

も考慮中である。また、さらに他の種々のレクチンを用いて、潰瘍性大腸炎大腸粘膜における結合性の検討をすすめる必要もあると考える。

V. 結 語

ローダミン標識レクチンを用いた蛍光抗体法で、潰瘍性大腸炎大腸粘膜におけるレクチン結合性につき検討し

た。本症大腸粘膜では、DBA, SBA の結合性の分布が減少し、それは、杯細胞粘液の量的 and/or 質的 (糖鎖構造) な変化を表現する重要な事実であると考えられた。

本研究の要旨の一部は、第 28 回日本消化器病学会大会 (金沢) で発表した。

文 献

- 1) 大沢利昭・森 良一・編：レクチン，講談社，東京，1976.
- 2) 平野 寛・高田邦明：レクチンの組織化学的应用。組織細胞化学，日本組織化学学会編，学際企画，東京，1983，pp. 113~132.
- 3) 厚生省特定疾患潰瘍性大腸炎調査研究班・診断基準分科会：潰瘍性大腸炎の診断基準（案）について。日医新報，No. 2673：31，1975.
- 4) 井上文彦・古川裕夫・他：潰瘍性大腸炎大腸粘膜における secretory component, IgA, 大腸杯細胞粘液の相互関連について。日本臨床免疫学会会誌，7：68~76，1984.
- 5) Watanabe, M., Muramatsu, T. et al. : Discrete distribution of binding sites for Dolichos biflorus (DBA) and peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. J. Histochem. Cytochem., 29：779~790，1981.
- 6) 山口嘉和・伊藤正高・他：ヒト健常食道粘膜におけるレクチン結合パターン組織細胞化学的検討。解剖誌，60：104~108，1985.
- 7) Peschke, P., Kuhlmann, W.D. et al. : Histological detection of lectin binding sites in human gastrointestinal mucosa. Experientia, 39：286~287，1983.
- 8) Boland, C.R., Montgomery, C.K. et al. : Alterations in human colonic mucin occurring with cellular differentiation and malignant transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79：2051~2055，1982.
- 9) 吉岡正和・山口和克・他：ヒト大腸の癌，腺腫，腺腫様病変における peanut agglutinin (PNA), Dolichos biflorus agglutinin (DBA) の結合性
- Lectin-antilectin-PAP 法による組織化学的検討一。癌の臨床，31：45~51，1985.
- 10) Boland, C.R., Montgomery, C.K. et al. : A cancer-associated mucin alteration in benign polyp. Gastroenterology, 82：664~672，1982.
- 11) 古川裕夫・内野治人・他：大腸抗原の追求。最新医学，37：1095~1102，1982.
- 12) 古川裕夫・内野治人：炎症性腸疾患と免疫学的所見。臨床免疫，17：134~152，1985.
- 13) 井上文彦・古川裕夫・他：潰瘍性大腸炎大腸粘膜におけるラクトフェリンの分布に関する検討。日本臨床免疫学会会誌，9：31~36，1986.
- 14) 古川裕夫・内野治人・他：ヒト胎児大腸フェノール・水抽出物の抗原性—多糖類画分における抗原性の確認—。消化器と免疫，No. 8：84~88，医歯薬出版，東京，1982.
- 15) 古川裕夫・内野治人・他：潰瘍性大腸炎における大腸粘膜 goblet cell 粘液多糖類の抗原性。消化器と免疫，No. 10：56~60，医歯薬出版，東京，1983.
- 16) Fillipe, M.I., Dawson, I.M.P. : The diagnostic value of mucosubstances in rectal biopsies from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut, 1：229~237，1970.
- 17) Fraser, G.M., Clamp, J.R. : Changes in human colonic mucus in ulcerative colitis. Gut, 16：832~833，1975.
- 18) Boland, C.R., Lance, P. et al. : Lectin binding indicates an abnormality of the goblet cell glycoconjugates in ulcerative colitis. (abstr.). Gastroenterology, 82：1021，1982.