

氏 名（本籍）	たか 高	はし 橋	おさむ 攻
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	医	第	1 6 9 4 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 6 0 年 9 月 1 1 日		
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当		
最 終 学 歴	昭 和 5 3 年 3 月 岩 手 医 科 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業		
学 位 論 文 題 目	免 疫 組 織 化 学 に よ る オ ル ニ チ ン , ケ ト 酸 , ト ラ ン ス ア ミ ナ ー ゼ の 眼 球 組 織 内 分 布		

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 水 野 勝 義 教 授 多 田 啓 也

教 授 京 極 方 久

論文内容要旨

< 緒 言 >

遺伝性網膜脈絡膜萎縮症の病態解明の端緒となった脳回転状脈絡網膜萎縮症 (Gyrate atrophy of the choroid and retina : GA) は高度近視と進行性の夜盲を呈し、融合した網脈絡膜萎縮巣が脳回転状を示す疾患である。本症はアミノ酸代謝異常症の1種であり、オルニチン・ケト酸・トランスアミナーゼ (OKT) 欠損による事が判明している。しかし、OKTが生体内でどのような機能を営み、その欠損が網脈絡膜の病態にどのように関与しているかは未だ不明である。従ってOKTの正常眼組織内分布を知る事が解明をさらにすすめるために必要と考えられる。早坂らは酵素学的に眼内におけるOKT活性分布を報告したが、詳細な正常眼組織内OKTの分布は解っていない。

この度、大浦らがヒト肝より分離・精製したOKTに対する抗血清を用い、免疫組織化学的にOKTの眼内組織分布を明らかにしたので報告する。

< 方 法 >

1) 光学顕微鏡的組織化学

成熟SDラット眼球を摘出し、PLP固定液にて一晚固定した後、脱水、パラフィン包埋を行ない、マイクロームにて3 μ mの切片を作成した。その後、脱パラフィン、洗浄し、1%牛血清アルブミン・0.05% Tween 20加0.05Mトリス緩衝液 (1% BTT)にて非特異反応を減少させた後、一次抗体として抗ヒトOKT血清を4 $^{\circ}$ Cにて24時間作用させた。二次抗体にはヤギ抗ウサギIgGを、その後、Peroxidase antiperoxidase (PAP)を同条件で作用させ、DAB反応液にて発色させた。核染色にはメチルグリーン液を用いて光学顕微鏡にて観察した。

対照には一次抗体を作用させる段階で抗ヒトOKT血清の代わりに、(1) 1% BTT, (2) 免疫していないウサギからの血清, (3) 抗ヒトOKT血清に精製したOKTを加えて吸収させたものを用いた。

2) 電子顕微鏡的免疫組織化学

1)と同様にラット眼球摘出後、1%グルタルアルデヒド液にて4 $^{\circ}$ Cで一時間固定した後、毛様体、網膜に分離細切して0.5 μ m以下の試料とし、PBSで洗浄してから0-35 $^{\circ}$ Cの低温下で段階的にエタノールにて脱水した。その後、-35 $^{\circ}$ CでLowicryl K 4Mに包埋、紫外線(360nm)下に24時間反応させた後、室温下でも2-3日反応させた。試料はLKBマイクロームにて超薄切片を作成し、ニッケルメッシュ上にとり、1% BTTに浸した後、一次抗体として抗ヒトOK

K T血清を室温で2時間反応させ、その後ヤギ抗ウサギ IgGをやはり室温で2時間作用させた。さらにプロテインA-金コロイド複合体を1時間作用させ、5%酢酸ウランで電子染色して、日本電子100C型透過型電子顕微鏡にて観察した。

＜ 結 果 ＞

1) 光顕組織化学

O K Tは特に虹彩、毛様体、網膜で著明に認められた。虹彩では色素上皮細胞に、毛様体では無色素上皮細胞内に著明な顆粒状として認められた。網膜では神経節細胞層および内顆粒層、なかでもミュラー細胞、双極細胞に多く認められ、色素上皮細胞にはこれらにくらべてわずかに認められるにすぎないが、視細胞層には全く認められなかった。角膜、水晶体、脈絡膜、強膜には認められなかった。また、対照実験を行なったものではいずれの組織も全く染色されなかった。

2) 電顕組織化学

O K Tは毛様体無色素上皮内のミトコンドリアのCristae上に特異的にプロテインA-金コロイド粒子の付着として認められた。

＜ 考 察 ＞

O K Tは哺乳動物組織、特に肝・腎に多く存在しているミトコンドリア内の酵素である事が知られている。眼組織におけるO K Tが注目を浴びるようになったのは、遺伝性網脈絡膜変性症の1種であるG Aの患者に血漿および尿中オルニチン値が高値である事が報告され、次いでO K Tの欠損が判明して以来である。その成因として、T. Saito, 早坂らはO K T欠損によるプロリンの不足を考え、眼球組織内低プロリンの存在を仮定した。早坂らの酵素学的O K Tの眼球組織内分布では虹彩、毛様体、網膜色素上皮、神経網膜に酵素活性の高い事が報告されている。プロリンのラジオオートグラムを行なった水野らの報告でも、その分布はやはり虹彩、毛様体無色素上皮、網膜色素上皮細胞および水晶体上皮にみられている。これらの結果と今回の結果はほぼ類似しており、G Aのプロリン欠乏説を裏付けていると考えられる。以上の網膜内でのO K Tの分布により、この酵素欠損に伴う初発変性部位が神経節細胞層、内顆粒層および色素上皮細胞であって、視細胞層ではない事が示唆される。

審 査 結 果 の 要 旨

遺伝性網脈絡膜萎縮症のうち、代謝異常が解明された唯一の疾患、脳回転状脈絡膜網膜萎縮症（Gyrate atrophy of the choroid and retina : GA）は高オルタニチン血症を伴い、オルタニチン ケト酸トランサミナーゼ（OKT）の欠損症であることが明らかとなった。然し、OKTが眼内に如何様に分布し、どのような働きをしているかは従来、全く不明であった。早坂らによれ生化学的分析結果はあるが、細胞レベルでの分布は未だ明らかでなかったので、組織化学的研究の開発が望まれていた。

そこで著者は、大浦らがヒト肝から分離、精製したOKTに対する抗血清を用い、免疫組織化学的にOKTの眼内分布を明らかにした。

光学的顕微鏡的組織化学ではSDラット眼球をPLP固定、脱水、パラフィン包埋後3 μ m切片とし、脱パラフィン後、3%牛血清アルブミン・0.05%Tween 20加0.05Mトリス緩衝液にて非特異反応を減少させた後、一次抗体として抗ヒトOKT血清を4 $^{\circ}$ C、24時間使用させた。二次抗体にはヤギ抗ウサギIgGを、その後、peroxidase antiperoxidase（PAP）を同条件で作用させ、DAB反応で発色させた。その結果、OKTは虹彩色素上皮、毛様体無色素上皮に著明な顆粒状の反応産物として、網膜では神経節細胞層、内顆粒層におけるミュラー細胞と双極細胞にも著明な反応産物として見られた。その他、色素上皮にも軽い反応がみられた。

次いでOKTの電顕組織化学を試みた。ラット眼球を1%グルタルアルデヒド固定、毛様体及び網膜を0.5mm巾以下に細切し、PBSで洗滌後、エタノール脱水した。試料を-39 $^{\circ}$ CにてLowicryl K4Mに包埋し、紫外線下にて24時間反応させた。LKBマイクロトームにて超薄切片とし、メッシュ上にとり、1%BTBに浸した後、一次抗体として抗ヒトOKT血清を2時間反応させ、その後ヤギ抗ウサギIgGを2時間反応させ、更にプロテインA-金ゴールドを1時間作用させた。5%酢酸ウランで電子染色後日本電子100C電顕にて観察した。その結果、OKT活性部位を示すプロテインAゴールド粒子は毛様体無色素上皮細胞内のミトコンドリアCriste上にみとめられた。

以上の結果は早坂らによるOKTの生化学的分布、及び水野らによるプロリンの分布に関する組織化学の結果と一致している。従って、本研究によりGAのプロリン欠乏説は一層確かとなった。

本研究はOKTの組織化学を免疫組織化学的に始めて確立したのみならず、GAの成因に関するプロリン欠乏説に強力な支持を与えた点において意義と価値があり、本論文に医学博士の称号を与えるに値する。