

原 著

マイクロウェーブ固定で観察した鼻アレルギー 鼻粘膜中の好酸球

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

廣瀬 壮

要 旨 好酸球顆粒内蛋白は組織障害性物質であることが知られている。しかし、これらの蛋白がどのように細胞外へ放出されるかの報告は非常に少ない。今回、我々はタンニンを含んだ固定液を用いてマイクロウェーブ照射 (MWI) を試みた。タンニンは蛋白の固定力が強く、蛋白を高電子物質として可視化する。好酸球顆粒内蛋白がどのように顆粒外に出てくるかを検討した。MWIを施して、そしてこの結果が既に報告されているDAB法による顆粒蛋白 (EPO) の局在と一致するか検討した。

【方法】 RAST検査でハウスダスト陽性のアレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜を対象とした。粘膜採取後直ちにマイクロウェーブ迅速処理装置 (MI-77) を使用し300W60秒間連続照射を行った。

コントロールはMWIなしの従来の固定法とDAB (diaminobenzidine) 法によるEPO染色とした。その後、エポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡 (日本電子製JEM-1200EX) で観察した。

【結果】 好酸球が活性化すると顆粒膜に管状構造の出現が認められた。マイクロウェーブ固定では、この管状構造の中に顆粒蛋白と思われる高電子物質が観察された。顆粒蛋白が管状構造物を通して細胞外に放出される像は観察できず、顆粒蛋白は細胞質内に観察された。

【結論】 MWIによりタンニンが組織深部まで瞬時に浸透したため顆粒から漏出した顆粒蛋白を生体内の状態で見ることが出来たものと考えられる。顆粒内蛋白はまず顆粒から細胞質内に放出されるものと考えられた。この結果はDAB法によるEPOの局在と一致する結果であった。

Key Words : マイクロウェーブ照射, 電子顕微鏡, 好酸球, タンニン酸

はじめに

好酸球顆粒内にはmajor basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil derived neurotoxin (EDN), eosinophil peroxidase (EPO) の4種類の顆粒蛋白が含まれており、これらの蛋白は寄生虫に対し毒性を発揮し組織障害性物質であることは知られている。現在まで、これらの好酸球顆粒内蛋白がどのように細胞外へ放出されるかについての報告は非常に少ない。渡辺等¹⁾が組織化学的手法により、第一段階として顆粒から細胞質へEPOが放出され、第二段階として細胞膜の破綻により細胞外へ放出されることを報告してい

る。しかし、EPOを染色する過程で拡散像 (diffusion) を起こした可能性も否定できなかった。このアーチファクトの疑いを否定するには蛋白を生体に近い状態で瞬時に固定する必要がある。マイクロウェーブ照射 (MWI) は瞬時に組織を固定する方法として報告されている^{2,3)}。MWIによる顆粒蛋白固定を行い顆粒蛋白の局在を検討した。これらの組織障害を引き起こす顆粒蛋白の脱顆粒のメカニズムを解明する事はアレルギーにおける好酸球の役割を解明する手掛かりになるのではないかと考えられる。

方 法

RAST検査において3又は4のハウスダスト鼻アレルギー患者5名の下甲介粘膜を実験材料として使用した。粘膜採取後直ちに0.1%のタンニンを加えた2%グルタルアルデヒド固定液 (0.1M カコジレイト緩衝液 pH7.2) を入れたバイアルビンに入れ、水道水のみを入

平成22年3月5日受付, 平成22年5月10日受理

別刷請求先: 廣瀬 壮

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科



図 1A 通常の固定法で観察した好酸球

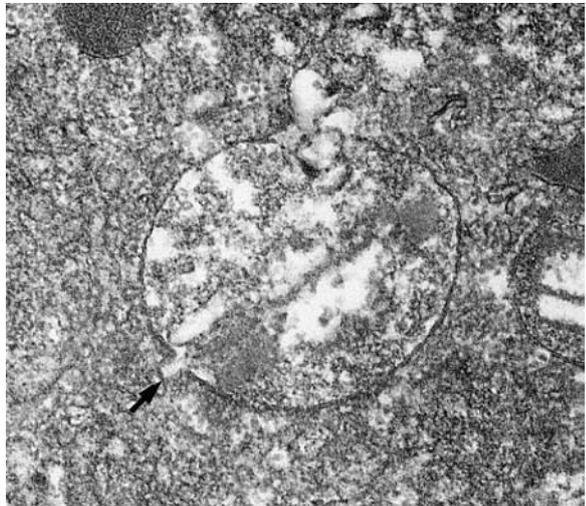


図 1B Aの矢印拡大像 矢印：顆粒膜上の微細管

れたダミーに用いた6本のバイアルビンと共に照射した。照射の際、これら7本のバイアルビンは水道水を満たした大きなペトリ皿の中に置いた。照射はマイクロウェーブ迅速処理装置（東屋医科機械 MI-77）を使用し、300W60秒間連続して照射を行った。照射後でも水温は40℃以下になるように設定した。コントロールはマイクロウェーブ照射なしの従来の固定法とした。照射後さらに60分間4℃で固定を行った。その後、カコジイト緩衝液で3回水洗し、1%オスミウム酸で40分間後固定した。さらにEPOを組織化学的手法で染色したものと比較するため、下甲介粘膜の一部を2%グルタルアルデヒドで固定後マイクロスライサーで4 μ mの切片を作製しDAB反応を施した後にオスミウム酸で後固定を行った。全ての標本はアルコールで脱水後、エポン812に包埋した。超薄切片を作製し、ウラン鉛二重染色を行い透

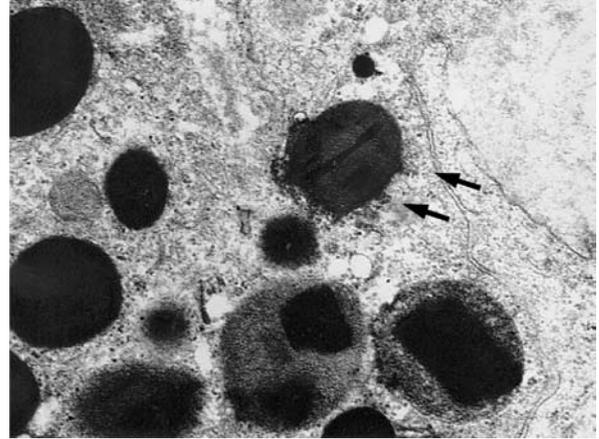


図 2 矢印：顆粒膜上に出現した微細管内に顆粒蛋白と考えられる高電子物質が観察できる。

過型電子顕微鏡（日本電子製JEM-1200EX）で観察した。

本研究は獨協医科大学越谷病院の倫理委員会の承認を得て行っている。

結 果

コントロールのMWIなしの電子顕微鏡像において顆粒膜上に微細管が5例全例に認められた（図1A, B矢印）。

MWIの電子顕微鏡像でも5例全例に顆粒膜に出現した微細管内に高電子物質を観察できた（図2矢印、図3矢印）。顆粒周囲にも高電子物質が認められた（図3矢頭、図4矢頭）。高村⁴⁾によれば鼻粘膜に遊走した好酸球は全て活性化されたものであったと報告されており、顆粒蛋白が細胞質へ漏出した好酸球は活性化好酸球であると考えられる。好酸球の活性化が進めば細胞質へ顆粒蛋白が漏出し顆粒内には殆ど高電子物質は認められなくなる（図4矢印）。

DAB (diaminobenzidine) 反応によるEPOの染色でも5例全例に顆粒膜に出現した微細管内（図5矢印）、さらに顆粒周囲（図6矢頭）にEPOが認められた。

考 察

渡邊等¹⁾はDAB法により好酸球顆粒蛋白EPOの染色を試みた。彼等は好酸球が活性化すると顆粒膜に微細管が出現し、その微細管内にEPOが観察され顆粒蛋白がこの微細管より顆粒外に放出される事を示した。管状構造が好酸球顆粒に出現するという報告は既にされており^{5,6)}、Okuda等⁶⁾は微細管が顆粒蛋白の細胞外へ放出される通路となると推察した。しかし、渡邊等¹⁾はこの微細管が細胞膜まで伸びて直接細胞外へEPOが放出される像は見られないと報告した。EPOは微細管を通し

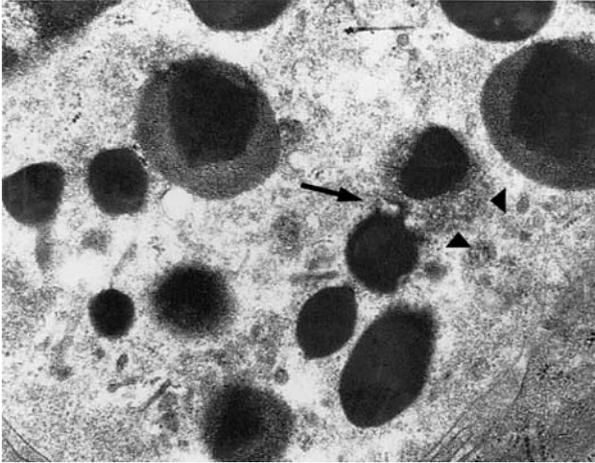


図 3 : 微細管内 (矢印) と顆粒周囲の細胞質 (矢頭) に顆粒蛋白と思われる高電子物質が認められる。

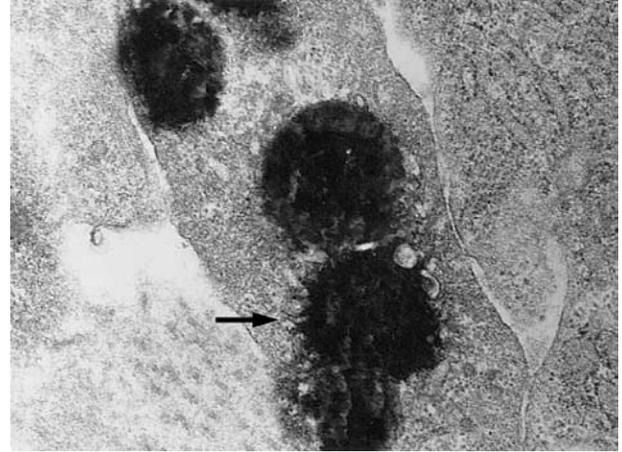


図 5 DAB法によるEPOの検出 矢印：顆粒膜に出現した微細管内にEPOが観察できる

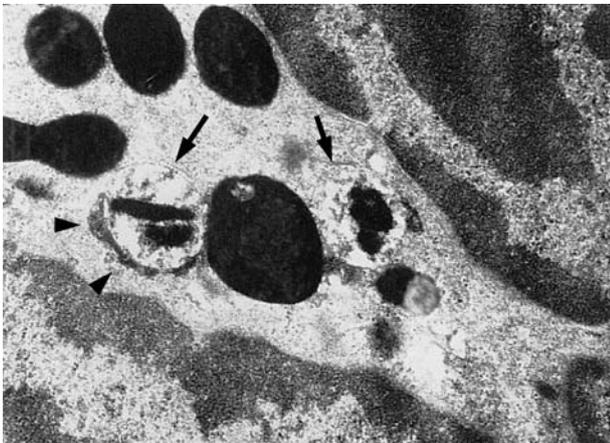


図 4 矢頭：顆粒周囲に顆粒蛋白と考えられる高電子物質が認められる

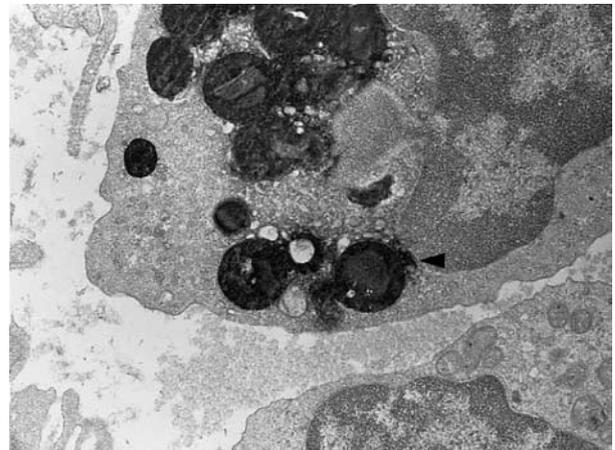


図 6 DAB法によるEPOの検出 矢頭：顆粒周囲に顆粒蛋白の集積

て細胞質内に放出され、細胞質内がEPOで充満する事を示した。しかし、この細胞内に漏出したEPOが組織化学的手法を行う過程でのアーチファクトによる拡散像(diffusion)の可能性を指摘する意見もあった。顆粒蛋白を生体内にある時と同じ状態で証明するには、組織を短時間、瞬時に固定する必要がある。ある大きさの組織を固定液に浸漬すれば、どうしても組織の中央部の固定には時間がかかり、蛋白の拡散像(diffusion)が発生する可能性が生じる。今回は蛋白の強力な固定力で知られているタンニン固定を併用した。通常、タンニン固定は組織の表層のみで深部にタンニンは到達しないので上皮表面などに応用されてきた⁷⁾。従って、今回の実験でMWIを行わないコントロールにはあえて固定液中にタンニンは溶解しなかった。今回は組織の深部まで存在する好酸球においてもMW照射を併用することによりタンニン固定で蛋白が高電子物質として検出できることを

証明した。タンニンを使用しない通常の固定による電子顕微鏡観察では微細管内にも顆粒周囲にも高電子物質を検出することは出来なかった。この高電子物質は顆粒に起源を持つ顆粒蛋白と考えられる。

タンニンを含む固定液に浸漬した標本をMWIする方法は組織化学を行う為の固定前の超薄切片を作る必要もなくDAB法より簡便であり、しかも正確な蛋白の局在を知る事ができた点でDAB法に匹敵するか、それ以上の有利な固定法と考えられた。

今回示した高電子物質はタンニンによって検出した蛋白であり、顆粒内の4種の顆粒蛋白を等しく染色したものと考える。従って、この方法では個々の顆粒蛋白を染め分けることは出来ない。しかし、組織の深部にまでMWIを併用する事により、タンニンが入ることが証明され、今後の電子顕微鏡レベルで蛋白検出の際の応用範囲を示した貴重な結果と考える。

MWIは1969年にMayers⁸⁾が初めて生物試料固定の為にMWIを使用し、光顕像が良く保存されていたと報告したことに始まる。MWIは欧州、特にオランダの臨床病理学者達によって発展してきた。その後、米国やオーストラリアの病理学者などの参入もあり、MWIによって有用な試料が得られたとの報告が多数認められたが理論的根拠は不明であった。1987年に水平^{9,10)}は国内で初めてマイクロウェーブ照射による固定法について発表し、1990年Mizuhira^{11~13)}は³H-formalinを用いた実験でMWI例と非MWI例を比較し、MWI例では³H-formalinが瞬時に全組織ブロックの隅々まで均等かつ十分な量が浸透し、非MWI例では³H-formalinが組織ブロック内へ浸透することはなかったと報告した。このことよりMizuhiraはMWIで組織ブロック全体が同レベルで良い固定効果が得られることを証明し、その有用性を明らかにした。

また龍見¹⁴⁾はMWIによる固定は軟組織だけでなく硬組織の中にある蝸牛コルチ器においても優れた固定力があることを証明している。

DAB法による渡邊等¹⁾の観察ではEPOが細胞内に充満している像が示されている。しかし、今回の固定液の中にタンニンを加えた上、MWIした方法では顆粒周辺に高電子物質を検出できたが、細胞質内に充満する像は得られなかった。さらに、DAB法ではEPOが好酸球から放出されるのは細胞膜が破綻した部位から細胞質に充満していたEPOが漏出することを示したが、今回の方法では高電子物質が細胞外へ漏出する像も得られなかった。DAB法で検出された細胞質内にEPOが充満した像や細胞外へ漏出する像が拡散(diffusion)によるかどうかという問題であるが、今回の全く異なる固定液の結果でも、細胞質に顆粒蛋白が証明された事は拡散(diffusion)による顆粒蛋白の漏出を否定する結果と考えて良いだろう。

タンニンがマイクロウェーブのエネルギーで深部に入ったとしても、蛋白濃度がある程度高い部位は検出できるが、蛋白濃度が低い部位では高電子物質として検出できなかったと思われる。顆粒から放出された直後の顆粒周囲は顆粒蛋白濃度が高いので検出されたが、細胞質中に拡散した状態では蛋白濃度が下がり、タンニンで検出できなかったものとする。しかし、今回の実験により顆粒蛋白はまず、顆粒膜に出現した微細管を通して細胞質に放出されることは確認出来たと考える。

参考文献

- 1) 渡辺建介, 喜友名朝盛, 三須俊宏: 鼻アレルギー鼻粘膜内に遊走した好酸球の脱顆粒様式. アレルギー **48**: 500-506, 1999.
- 2) 水平敏知, 長谷川博司, 能登谷満: 照射による生物試料の固定法. 生物と化学 **28**: 535-544, 1993.
- 3) Vinci Mizuhira, Hiroshi Hasegawa, Mitsuru Notoya: Microwave Fixation and Staining Method for Biomedical Specimens. J. Clin. Electron Microscopy **24**: 5-6, 1991.
- 4) 高村博光: 鼻アレルギー患者の下甲介粘膜における好酸球の免疫組織学的検討. 日耳鼻 **97**: 61-67, 1994.
- 5) Komiyama A and Spicer SS: Microendocytosis in eosinophilic leukocytes. J. Cell Biol **64**: 622-635, 1975.
- 6) M Okuda, T Takenaka, S Kawabori, Y Ogami: Ultrastructural Study of The Specific Granule of The Human Eosinophil. J. Submicrosc. Cytol **13**: 465-471, 1981.
- 7) Vinci Mizuhira: The digital pads of rhacophorid treefrogs. Journal of Electron Microscopy **53**: 63-78, 2004.
- 8) CP Mayers: Histological fixation by microwave heating. Technical methods **23**: 273-275, 1969.
- 9) 水平敏知: マイクロウェーブ固定法の基礎と応用. 日本臨床電子顕微鏡学会誌 **27** 巻増刊: P55, 1994.
- 10) Mitsuru Notoya, Hiroshi Hasegawa, Vinci Mizuhira: New Tissue Fixation Method For Cytochemistry By The Aid of Microwave Irradiation II. Details Acta Histochem. Cytochem **23**: 525-536, 1990.
- 11) 水平敏知: マイクロウェーブ照射による生物試料の固定法. 医学のあゆみ **149**: 907-911, 1989.
- 12) Vinci Mizuhira, Mitsuru Notoya, Hiroshi Hasegawa: NEW Tissue Fixation Method For Cytochemistry Using Microwave Irradiation I. General Remarks Acta Histochem. Cytochem **23**: 501-523, 1990.
- 13) 水平敏知, 長谷川博司, 能登谷満: マイクロウェーブ固定法. 生体の科学 **42**: 148-159, 1991.
- 14) Tatsumi A, Watanabe K: Fixation of soft tissue surrounded by bone with microwave irradiation: Electron microscopic observation of guinea pig inner ear. Annals of Otolaryngology & Rhinology **114**: 404-410, 2005.

Eosinophils Contained in the Nasal Mucosae of Nasal Allergy Patients : Observation Through Microwave Fixation

Takashi Hirose

Department of Otorhinolaryngology, Dokkyo Medical University, Koshigaya Hospital

Objective : It is known that proteins in the eosinophilic granules are tissue disrupting substances. However, studies on the manner by which these proteins are released into extra-cellular space are extremely rare. In this study, an attempt was made to use microwave irradiation (MWI) by employing a fixation solution containing tannin, which is a potent protein fixing agent that renders proteins visible as high electron substances. This study was conducted to observe the manner by which eosinophil granular proteins are released into extra-granular space. By applying MWI, the results were examined if they coincided with the localization of eosinophil peroxidase (EPO) according to the DAB method that has already been reported.

Method : Mucosa from the inferior concha was collected from patients with allergic rhinitis who gave positive responses to house dust at RAST tests. Immediately after collection, the mucosal specimens in a fixation solution containing tannin were continuously irradiated at 300 W for 60 seconds.

The specimens used for the control were subjected to a conventional fixation method without microwave irradiation

and to an EPO staining by the DAB method. They were observed under transmission electron microscopy.

Results : Activation of eosinophils was followed by the development of a tubular structure in the granular membrane. Microwave fixation allowed one to observe a high electron substance, which was suspected to be a granular protein, in this tubular structure. No image was observed that was suggestive of a release of this granular protein through the tubular structure and into the extra-cellular space. The granular protein was observed in the cytoplasm.

Conclusion : The belief was that microwave fixation instantly causes tannin to infiltrate into a deep section of the tissue, thus allowing one to observe the granular protein that has leaked from the granules, while reproducing the process that would take place in vivo. It was suggested that granular protein is first released from the granules into the cytoplasm. This observation coincides with the localization of EPO according to the DAB method.

Key words : microwave irradiation (MWI), electron microscopy, eosinophils, tannic acid