

ラット母児間の charge barrier の局在

新潟大学医学部腎研究施設免疫病態学部門（主任：清水不二雄）

新潟大学医学部産婦人科学教室（主任：田中憲一）

山崎 一郎

Localization of the Charge-dependent Materno-fetal
Barrier in the Rat

Ichiro YAMAZAKI

Department of Immunology Institute of Nephrology Niigata

University School of Medicine

(Director: Prof. Fujio Shimizu)

Department of Obstetrics and Gynecology Niigata

University School of Medicine

(Director: Prof. Kenichi Tanaka)

Near-term rats placentas were directly injected with two pairs of proteins differently charged. The placental localization of the proteins 60 min after the injection was determined by immunohistochemical staining and light microscopic autoradiography. Immunohistochemical studies (ie, immunofluorescence and immunoperoxidase studies) showed that there was no preferential localization in the placenta of native proteins injected. In contrast, cationized proteins injected were localized significantly in the Reichert's membrane. By light microscopic autoradiography, a large number of positive grains were found in the Reichert's membrane which is strongly positive for periodic acid-Schiff stain. And positive grains were also associated with trophoblast, parietal endoderm and visceral endoderm cells following the injection of cationized proteins. However, it is consistent with the immunohistochemical findings that positive grains were observed scarcely in the placenta when native proteins were injected.

The present study suggest that Reichert's membrane in the rat may play an important role for the charge-dependent materno-fetal barrier since the rodent parietal yolk sac is well known to serve as a route via placenta.

Key words: charge barrier, cationic protein, placenta, rat.

チャージバリアー, 塩基化蛋白, 胎盤, ラット.

Reprint request to: Ichiro YAMAZAKI,
The Department of Immunology Institute
of Nephrology Niigata University School
of Medicine, Niigata City, 950 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部腎研究施設免疫病態学部門
山崎 一郎

概 要

荷電の異なる2種類の蛋白をラット胎盤へ局注し、60分後の各蛋白の局在を免疫組織化学的にさらにオートラジオグラフィーで検討した。蛍光抗体法及び酵素抗体法による免疫組織化学的検索では主に Reichert's membrane (RM) に、塩基性蛋白が局在した。対照として用いた native な蛋白では、はっきりとした陽性所見を認めなかった。オートラジオグラフィーによる検索では塩基性蛋白は RM, 迷路部の trophoblast cell, parietal endoderm cell, visceral endoderm cell に局在したが特に PAS 染色陽性の RM に強い陽性像を認めた。native な蛋白は特異的な局在を示さなかった。げっ歯類では parietal yolk sac が母児間の高分子物質の移行経路となっており、RM に荷電依存性のバリアー機能のあることが示唆された。

はじめに

血管内皮細胞表面または基底膜の陰性荷電部位が、荷電依存性の物質の血管の透過性または免疫複合体の沈着に重要な働きをしていることは、腎糸球体¹⁾²⁾³⁾、脳血液関門⁴⁾、皮膚⁵⁾で報告されている。荷電依存性の胎児血管透過性については電顕レベルで ferritin, horseradish peroxidase を用いたモルモット胎盤での灌流実験があり⁶⁾⁷⁾、trophoblast cell や基底膜の陰性荷電部位についてはヒトの娩出後の胎盤で ruthenium red による報告⁸⁾がある。この陰性荷電部位を構成しているのは、細胞表面のシアル酸、磷脂質及び基底膜の heparan sulfate proteoglycan とされている。これらは、生物活性のある物質(血清蛋白, ウィルス, 細菌, ある種のホルモンまたはサイトカイン等)の選択的透過性にも関与していると考えられる。従ってその構造、機能を解析することで母児間の物質の透過性につきより理解を深めることができると思われる。ところで膜構造は、生体内でダイナミックに代謝されているため⁹⁾、機能している陰性荷電部位を検討するには in vivo での実験が有用と考えられる。

本報では2種類の蛋白を塩基化し、ラット胎盤へ投与し免疫組織化学的及びオートラジオグラフィーでその局在を観察した結果を報告し若干の考察を試みたい。

材料及び方法

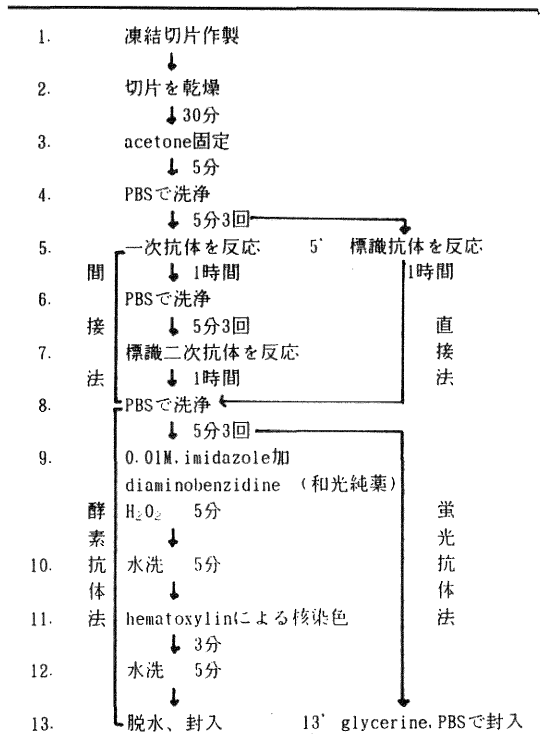
ラット: 8~10週齢の Wistar 系雌ラット (Charles River 社) を用い vaginal smear 中に精子を確認した

日を妊娠1日目とした。妊娠18~19日目に ether 麻醉下に開腹し、2つの胎盤の迷路部へ 27G の針を用いて試料蛋白 100µg を注入した。60分後に妊娠ラットを屠殺し、蛋白を注入した胎盤を摘出し免疫組織化学的にまたはオートラジオグラフィーで蛋白の局在を観察した。

蛋白の塩基化: ヒト IgG 及び bovine serum albumin (BSA) を Oite らの方法³⁾に従い塩基化した。即ち、1-ethyl-3 (3 dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (Sigma 社) を activator として N, N-dimethyl-1, 3-propanediamine (Eastman Kodak 社) を用いて nucleophile を carboxyl group に置換した。等電点は、等電点電気泳動を施行して定めた。塩基化ヒト IgG (CHIgG) 及び BSA (CBSA) の等電点は 9.0以上だった。対照としての native なヒト IgG (NHIgG) と BSA (NBSA) の等電点は 5.8~7.2と 4.9 だった。

ラジオアイソトープの標識: chloramine-T 法¹⁰⁾で ¹²⁵I を試料蛋白に標識した。 ¹²⁵I の95%以上が蛋白と結合しているものを、以下の実験に用いた。各標識蛋白の specific activity は CHIgG 2.4×10⁵ cpm/µg, NHIgG

表1 免疫組織染色のフローチャート



2.1×10^5 cpm/ μ g, CBSA 1.3×10^5 cpm/ μ g, NBSA 2.0×10^5 cpm/ μ g だった。

免疫組織化学的検索：ラット屠殺後、試料蛋白を注入した胎盤を摘出し -70°C の n-hexane で急速凍結後、 $4\mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。ヒト IgG の局在は蛍光抗体法、酵素抗体法の直接法、BSA の局在は蛍光抗体法の直接法、酵素抗体法の間接法を施行した(表 1)。抗体は fluorescein 標識 rabbit 抗 human IgG (Hoechst 社)、fluorescein 標識 rabbit 抗 BSA (自家製)、peroxidase 標識 sheep 抗 human IgG (Fab 分画、医学生物学研究所)、peroxidase 標識 swine 抗 rabbit IgGs (Dakopatts 社)、自家製の rabbit 抗 BSA 血清(硫酸分画)を用いた。

オートラジオグラフィ：ラットを屠殺後、試料蛋白を注入した胎盤の子宮胎盤胎児を一塊として24時間ホルマリン固定した。パラフィン包埋した試料から、 $5\mu\text{m}$ の切片を作製し乳剤(コニカ NR-M2)を塗布し 4°C 8週間暗室で露出した。現像処理はコニカドールX、コニカフィックス(コニカ社)を用いた。切片は periodic acid Schiff (PAS) 染色した。

結 果

I. 蛍光抗体法および酵素抗体法による免疫組織化学的検索

1. 蛍光抗体法

塩基化ヒト IgG (CHIgG) を胎盤内に投与すると、60分後には Reichert's membrane (RM) に局在していた(写真 1a)。対照として用いた native なヒト IgG (NHIgG) は、CHIgG と同量投与したにもかかわらず蛍光抗体法ははっきりとした局在を認めなかった(写真 1b)。塩基化 BSA (CBSA)、native な BSA (NBSA) を用いた場合でも同様の所見を得た。写真 1c は CBSA を投与した60分後の RM の蛍光陽性像である。写真 1d は、対照の NBSA を投与した胎盤で、NHIgG と同様にはっきりとした陽性所見は認められなかった。

2. 酵素抗体法

胎盤内に投与した CHIgG の60分後の局在を、酵素抗体直接法で検索した。局在を示す酵素反応物は、RM、迷路部の trophoblast cell の表面に認めた(写真 2a)。対照として用いた NHIgG は、蛍光抗体法の所見と同様にはほとんど陽性所見を認めなかった(写真 2b)。CBSA、NBSA についても CHIgG、NHIgG と同様の所見だった。CBSA は RM、迷路部の trophoblast cell の表面に局在を認めたが(写真 2c)、NBSA は はっきりと

した陽性像は、得られなかった(写真 2b)。

II. オートラジオグラフィによる検索

ラジオアイソトープを標識した各試料蛋白投与後60分の、局在をオートラジオグラフィでも検索した。CHIgG、CBSA の grain は PAS 染色陽性の RM、迷路部の trophoblast cell に認めた。visceral endoderm cell および parietal endoderm cell にも CHIgG。CBSA の grain は明かに局在した(写真 3a, c)。しかし対照として用いた NHIgG、NBSA の投与後60分では grain は散在性でその数も極端に少なかった(写真 3b, d)。

考 察

今回人工的に塩基化(陽性荷電となるように化学修飾)したヒト IgG (CHIgG) または BSA (CBSA) をラット胎盤へ局注し、免疫組織化学的にさらにオートラジオグラフィを用いその局在を、塩基化していないヒト IgG (NHIgG) または BSA (NBSA) のそれと比較した。いずれの方法でも塩基性蛋白と native な蛋白(陰性または中性に荷電)の間で明かな局在の差を示した。即ち、胎盤内へ局注後に CHIgG、CBSA は、PAS 染色陽性の厚い基底膜 (BM) である Reichert's membrane (RM) に選択的に局在していた。一方、native な蛋白である NHIgG、NBSA の場合、RM への選択的結合はほとんど認めなかった。また parietal endoderm cell, trophoblast cell, visceral endoderm cell にも塩基性蛋白が native な蛋白に比して有意に結合していた。以上、同じ分子量をもつ物質でも荷電状態(等電点)で局在が異なり、塩基性蛋白が、RM に強い親和性を持っていることが判明した。このことは、RM に陽性荷電物質のレセプターとして働く陰性荷電部位が局在することを強く示唆する。

ラット胎盤における charge barrier (荷電依存性のバリアー)、しいては陰性荷電部位の存在は、荷電蛋白のトレーサー実験でも明かである¹¹⁾。その実験では上述の形態学的アプローチに用いた各トレーサー (NHIgG、NBSA、CHIgG、CBSA) を放射性ヨードでラベルし、投与後の胎児胎盤系における局在を定量的に検討した。下大動脈への注入後の各蛋白の母体血中レベルに対する局在の割合、胎盤内への局注後の局在のいずれにおいても、胎盤 (chorioallantoic placenta) 及び胎児で塩基化蛋白が native な蛋白より有意に多かった。

ラットでの高分子物質の母体から胎児への移行については、gamma-globulin¹²⁾¹³⁾ や horseradish peroxidase¹⁴⁾ を用いた報告がある。モルモットやヒト胎盤では、荷電

依存性の物質の透過性および陰性荷電部位に関する報告がある⁶⁾⁷⁾⁸⁾がラットでの検討は稀である。これまでの報告から得られた主な母体から胎児への物質の移行経路は、母体血中から chorioallantotic placenta の parietal yolk sac→ yolk sac cavity→ visceral yolk sac→ 胎児とされている。parietal yolk sac は parietal endoderm cell, Reichert's membrane (RM), trophoblast cell から構成されている。中でも RM は、妊娠14日頃には 5~11 μ m の厚さとなる BM で parietal endoderm cell で合成されると考えられている laminin, type IV collagen, entactin, heparan-sulfate proteoglycan (HSPG) などから構成されている¹⁵⁾¹⁶⁾。BM の機能としては、皮膚表皮における BM のように主に細胞の接着、支持に役立つものと、腎糸球体基底膜 (GBM) のように物質交換、濾過にあずかる機能がよく知られている¹⁷⁾。GBM では HSPG, シアル酸関連蛋白等が陰性荷電部位を構成し高分子物質の透過性を制御していると考えられている¹⁸⁾。RM も上述のように GBM と同様の BM 成分から構成されかつその厚さも GBM の 0.25 μ m に比べ著しく厚い。蛋白の定量的トレーサー実験から荷電依存性のバイヤー機能が、胎盤内に存在することがわかったが¹¹⁾、今回の実験からその解剖学的な部位として RM もその候補にあがる可能性がでてきた。

Immune complex (IC) の GBM に沈着する機序に GBM の陰性荷電部位は、重要な働きをしている³⁾。胎盤を場とした免疫反応、炎症反応の解析には生理活性物質 (IC 等の高分子物質, サイトカイン, 血液凝固及び線溶系物質, ホルモン) の胎児胎盤系における局在の解析が重要な糸口となる。このためにも今後 charge barrier を含めた生物機能をもつ胎盤の、細胞分子レベルでの検討が必要と考えられる。

稿を終えるに臨み、終始ご指導と御校閲を賜りました産科婦人科学教室竹内正七名誉教授、田中憲一教授に深く感謝いたします。また直接ご指導を頂いた腎研究施設免疫病態学部門追手魏助教授、清水不二雄教授に深謝致します。

尚、本論文の要旨の一部は第40回日本産科婦人科学会にて発表した。

参 考 文 献

- 1) **Rennke, H.G., Cotran, R.S. and Venkatachalam, M.A.:** Role of molecular charge in glomerular permeability. Tracer studies with cationized ferritin. *J. Cell Biol.*, **67**: 638~646, 1975.
- 2) **Bohrer, M.P., Baylis, C., Humes, D., Glassock, R.J., Robertson, C.R. and Brenner, B.M.:** Permselectivity of the glomerular capillary wall. *J. Clin. Invest.*, **61**: 72~78, 1978.
- 3) **Oite, T., Batsford, S.R., Mihatsch, M.J., Takamiya, H. and Vogt, A.:** Quantitative studies of in situ immune complex glomerulonephritis in the rat induced by planted, cationized antigen. *J. Exp. Med.*, **155**: 460~474, 1982.
- 4) **Peress, N.S. and Tompkins, D.:** Effect of molecular charge on choroid-plexus permeability: tracer studies with cationized ferritins. *Cell Tissue Res.*, **219**: 425~431, 1981.
- 5) **Kazama, T., Kihara, I., Oite, T., Shimizu, F., Ito, M. and Sato, Y.:** Ultrastructural localization of anionic sites in the rat skin demonstrated with cationic probes. *J. Dermatol.*, **12**: 472~478, 1985.
- 6) **Sibley, C.P., Bauman, K.F. and Firth, J.A.:** Molecular charge as a determinant of macromolecule permeability across the fetal capillary endothelium of the guinea-pig placenta. *Cell Tissue Res.*, **229**: 365~377, 1983.
- 7) **Berhe, A., Bardsley, W.G., Harkes, A. and Sibley, C.P.:** Molecular charge effects on the protein permeability of the guinea-pig placenta. *Placenta*, **8**: 365~380, 1987.
- 8) **King, B.F.:** Distribution and characterization of anionic sites in trophoblast and capillary basal laminas of human placental villi. *Anat. Rec.*, **212**: 63~68, 1985.
- 9) **Mutsaers, S.E. and Papadimitriou, J.M.:** Surface charge of macrophages and their interaction with charged particles. *J. Leuk. Biol.*, **44**: 17~26, 1988.
- 10) **McConahey, P.J. and Dixon, F.J.:** A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **29**: 185~189, 1966.
- 11) **Yamazaki, I., Shimizu, F., Takeuchi, S., Tanaka, K. and Oite, T.:** The charge dependent materno-fetal barrier in the rat. *Clin. exp. Immunol.*, submitted.

山崎論文付図(I)

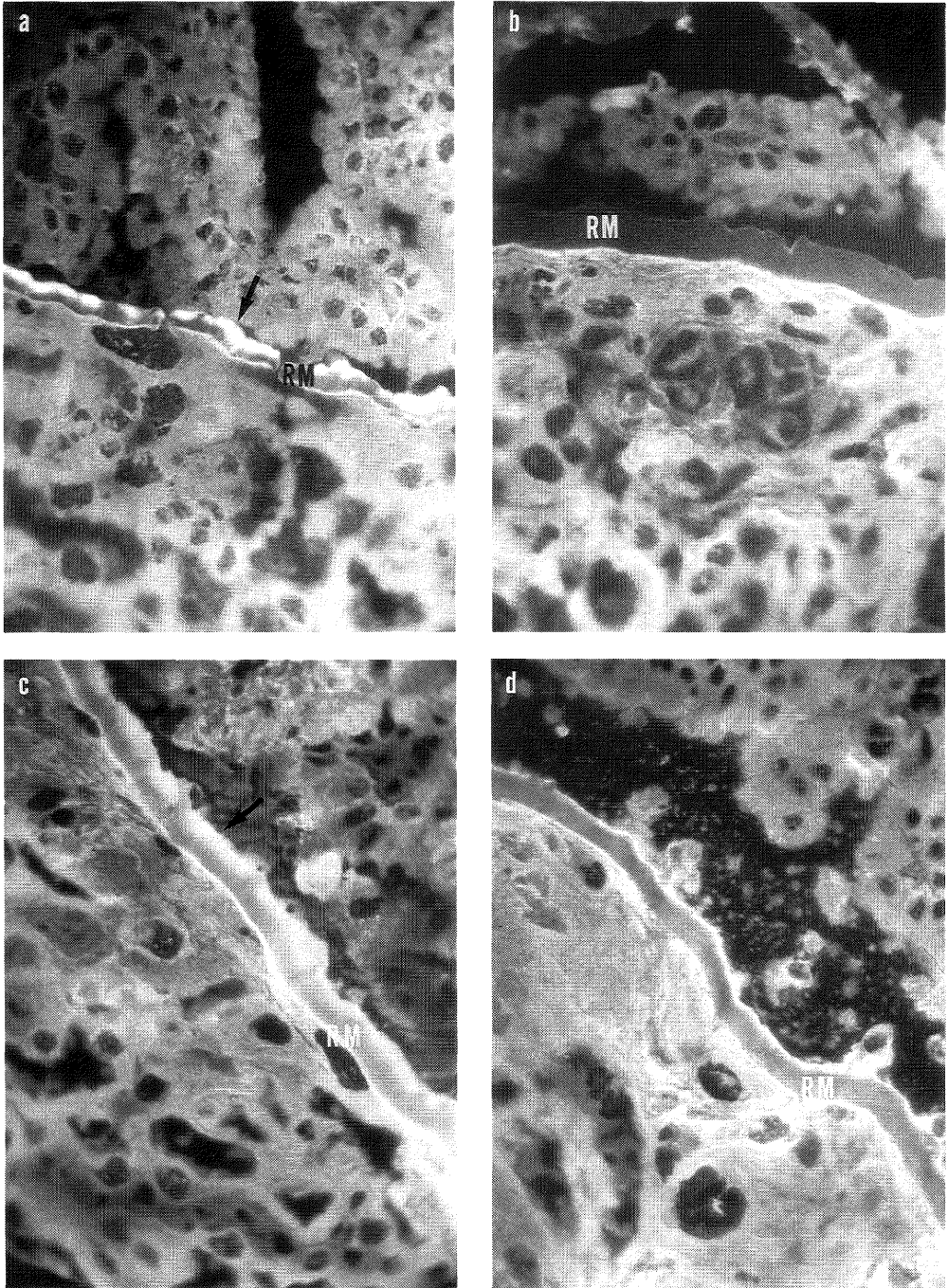


写真 1 (a) CHIgG (c) CBSA は, Reichert's membrane (RM) に蛍光陽性像 (↓) を認める. (b) NHIgG (d) NBSA は, ほとんど蛍光陽性像を認めない. (蛍光抗体法, 直接法, ×480).

山崎論文付図(II)

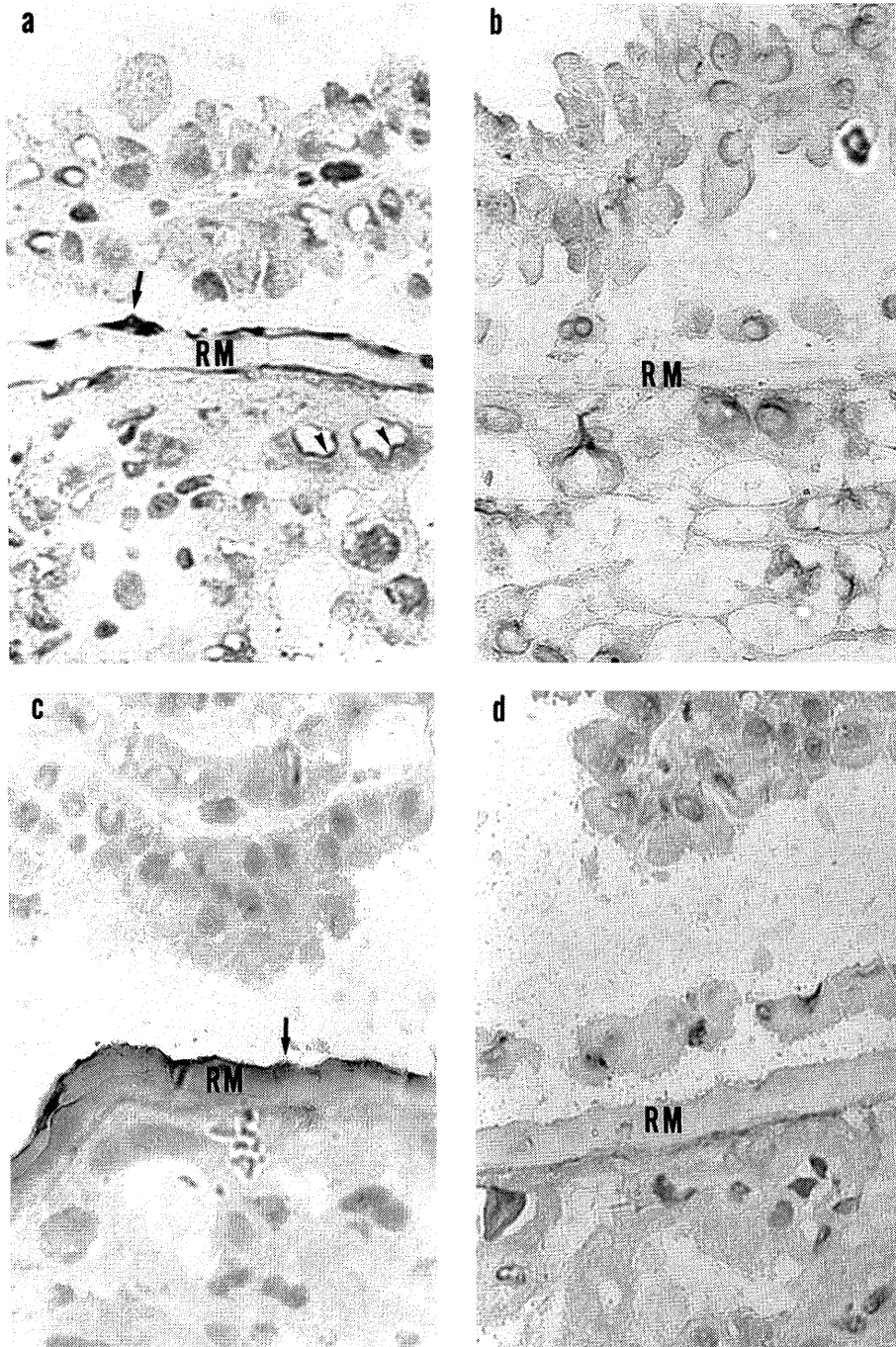


写真 2 (a) CH1gG (c) CBSA は, Reichert's membrane (RM) (↓) と迷路部の trophoblast cell 表面 (↙) に酵素反応物を認める. (b) NHIgG (d) NBSA は, ほとんど酵素反応物を認めない. (酵素抗体法, 直接法 (a) (b), 間接法 (c) (d), ×480).

山崎論文付図(Ⅲ)

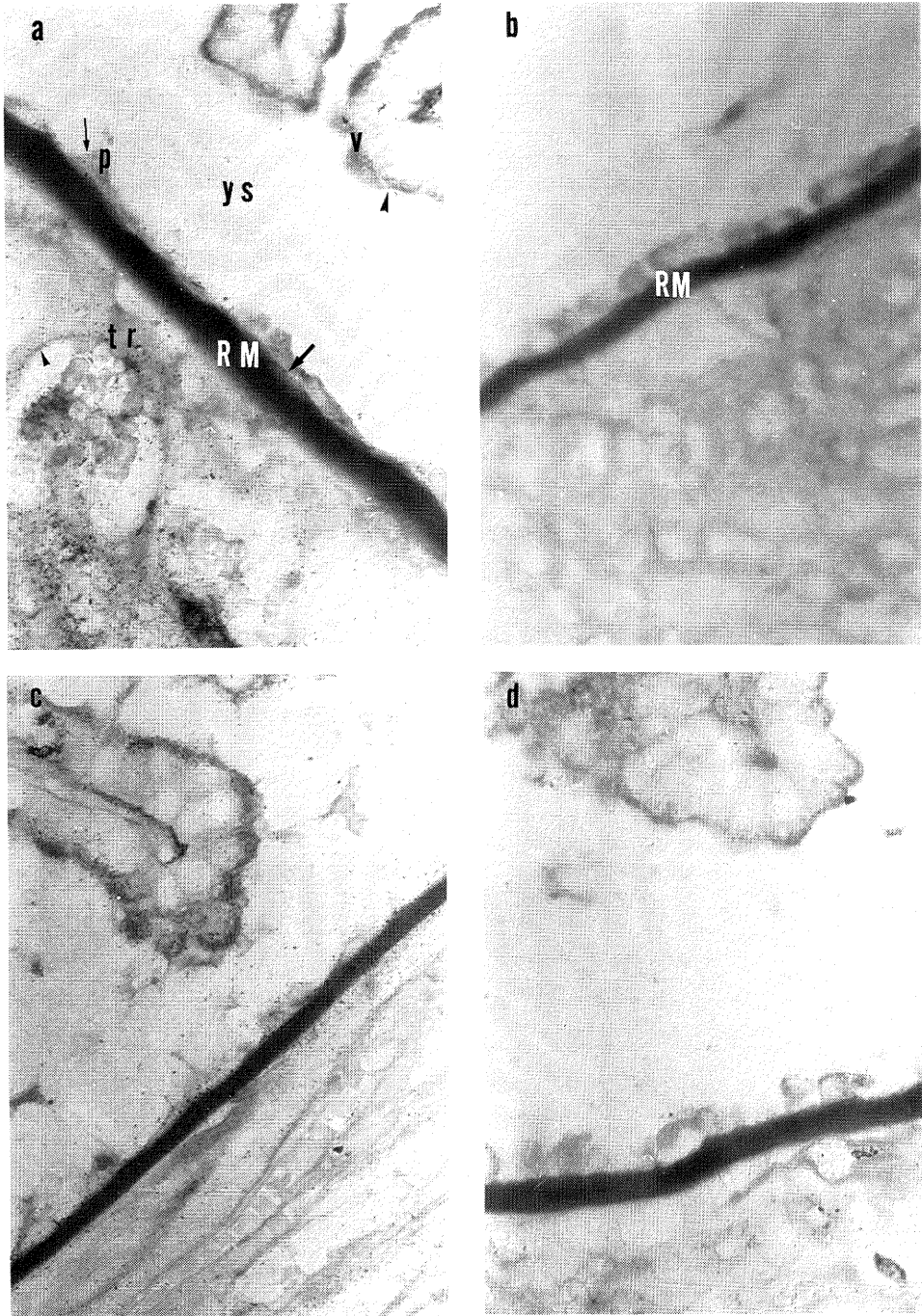


写真3 (a) CHlgG (c) CBSA は, PAS 染色陽性の Reichert's membrane (RM) (↓), 迷路部の trophoblast cell (tr) (▽), parietal endoderm cell (p) (↓) 及び visceral endoderm cell (v) (▽) に grain を認める. (b) NHlgG (d) NBSA は, grain が散在性でその数も極端に少ない. ys: yolk sac cavity (オートラジオグラフィ, PAS 染色, ×480).

- 12) **Brambell, F.W.R. and Halliday, R.:** The route by which passive immunity is transmitted from mother to foetus in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, **145**: 170~178, 1956.
- 13) **Anderson, J.W.:** The placental barrier to gamma-globulins in the rat. *Am. J. Anat.*, **104**: 403~429, 1959.
- 14) **Seibel, W.:** An ultrastructural comparison of the uptake and transport of horseradish peroxidase by the rat visceral yolk sac placenta during mid and late gestation. *Am. J. Anat.*, **140**: 213~236, 1974.
- 15) **Clark, C.C., Minor, R.R., Koszalka, T.R., Brent, R.L. and Kefalides, N.A.:** The embryonic rat parietal yolk sac. Changes in the morphology and composition of its basement membrane during development. *Dev. Biol.*, **46**: 243~261, 1975.
- 16) **Inoué, S., Leblond, C.P. and Laurie, G.W.:** Ultrastructure of Reichert's membrane, a multi-layered basement membrane in the parietal wall of the rat yolk sac. *J. Cell. Biol.*, **97**: 1524~1537, 1983.
- 17) **Amenta, P.S., Clark, C.C. and Martinez-Hernandez, A.:** Deposition of fibronectin and laminin in the basement membrane of the rat parietal yolk sac: Immunohistochemical and biosynthetic studies. *J. Cell. Biol.*, **96**, 104~111, 1983.
- 18) **Kanwar, Y.S., Linker, A. and Farquhar, M.G.:** Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell. Biol.*, **86**: 688~693, 1980.

[特別掲載] (平成2年2月10日受付)
