

エックリン汗腺の新しいマーカー, OE-1 抗体

鉄田真知子

近畿大学医学部皮膚科学教室

抄 録

エックリン汗腺の新しいマーカーを見つげだす目的でヒトのエックリン汗腺由来の腫瘍と考えられている Clear Cell Hidradenoma から抽出した種々の大きさのタンパク質を用いて種々の抗体を作成したところ, 17 kDa, pI 9.5の塩基性タンパクに対する抗血清 (OE-1) が免疫組織学的にヒトエックリン汗腺の分泌部, 真皮内導管, 角層を含めた表皮内導管の cuticular border と特異的に反応することを発見した。この抗体は, アポクリン汗腺の分泌部, 導管とは反応しなかった。また, 種々のエックリン汗腺起源の腫瘍と反応陽性であった。免疫電顕学的に抗原はエックリン汗腺の分泌部の暗調細胞 (luminal cells) の細胞膜近傍, 特に導管内腔に面した細胞膜近傍に極めて多数認められた。さらに, この17 kDa タンパクのN末端アミノ酸配列の解析を試みたところ, 19番までのアミノ酸の内9番目, 17番目と18番目を除く全てのアミノ酸の配列がヒトのヒストン3の配列と完全に一致した。また, OE-1は Immunoblotting 上市販のヒストンと交叉反応を示し, また逆に市販の抗ヒストン抗体は17 kDaのタンパクと交叉反応を示した。

Key words: eccrine sweat duct, eccrine cuticular border, histone-3, eccrine sweat gland specific antibody

緒 言

一般に, ヒト汗腺腫瘍の診断に際してエックリン起源か, アポクリン起源か, 或いは汗腺以外の腫瘍か, 鑑別診断に困難を感じる事が多い。近年, 各種抗体を用いた免疫組織化学的検討が行われ, エックリン汗腺を特異的に認識する抗体として, 正常組織では CEA¹⁻⁶, EMA⁷, ケラチン-19⁸⁻¹⁰ に対する抗体が挙げられる。しかしこれらのうち現時点でエックリン汗腺の最も特異的なマーカーとされている CEA でも, 腫瘍の場合は陽性¹¹, 時に陰性¹²を示し, またアポクリン汗腺でも陽性を示した報告¹³があり結果が一定していない。そこで, エックリン汗腺と特異的に反応する抗体を作成する目的で Clear cell hidradenoma より抽出した各種タンパクに対して抗体作製を試みた。

材料および方法

材 料

動物は家兎 (♂, 1.4 kg, 日本クレア) を用いた。また免疫実験試薬として, Freund 完全アジュバント (和光純薬, 大阪), labelled streptoavidin biotin

(LSAB) kit (ダコジャパン, 京都), Multigel (アクリルアミド濃度15-25%の gradient gel) (第一化学薬品, 東京), PVDF 膜 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), ペルオキシダーゼラベルヤギ抗家兎 IgG 抗体 (Organon Technica Corporation, Durham NC, USA), Unicryl K4M resin (BioCell, Cardiff, UK), 金顆粒ラベルヤギ抗家兎 IgG 抗体 (アムシャム, ジャパン KK, 東京), 抗 CEA 抗体 (ダコジャパン, 京都) を用いた。

方 法

タンパク質の抽出

-80°Cで凍結保存していたヒト Clear cell hidradenoma 組織0.48 g を室温で融解後, 生理食塩水中で細切して3回洗浄した。次に氷冷した50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) 中でホモジナイズ後, 室温で30分攪拌抽出し, さらに2,000 xg, 15分間遠心した。得られた沈渣に4 µl の 2-mercaptoethanol を含む40 ml の50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) を加え, 室温で更に30分攪拌した。その後2,000 xg, 15分間遠心を行い沈渣 (沈査-p) を得た。この沈査-p を抗体作成用抗原バンドの出発材料とした。

抗体作成

沈渣-pの0.4 gを2% SDSを含む50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) 0.5 mlに溶解し, SDSを含む15-25%のアクリルアミド gradient gelにて一次元電気泳動した. 泳動後のゲルは, Coomassie Brilliant Blue R-250で30分染色した. 今回用いた抽出法では, 分子量15 kDa 前後に明瞭な3本のバンドが観察されたので(図1), 先ずそのうちの17 kDaのバンドに注目して抗体を作製することにした. 染色後のゲルを20%メタノールを含む10%酢酸溶液にて脱色洗浄後, 17 kDaのバンドを切り出し, -80°C に保存した. 切り出したゲルが十分量集まった時点で,

この17 kDaのバンドを含むゲル断片をPBSでホモジナイズし, その0.5 mlを等容量の Freund complete adjuvantと混和し, ウサギ(雄)背部皮下に注射した. 初回免疫後, 4週目より毎週追加免疫を行い, 計5回の抗原投与を行った. 最終免疫後3日目に頸動脈より全採血をし, 抗血清(OE-1)を得た.

特異抗体産生の検討

Immunoblot analysis

沈渣-pより2% SDSを含む50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)で抽出したタンパクを, 同様に1次元 SDS-PAGEを行って分離し, PVDF膜に転写

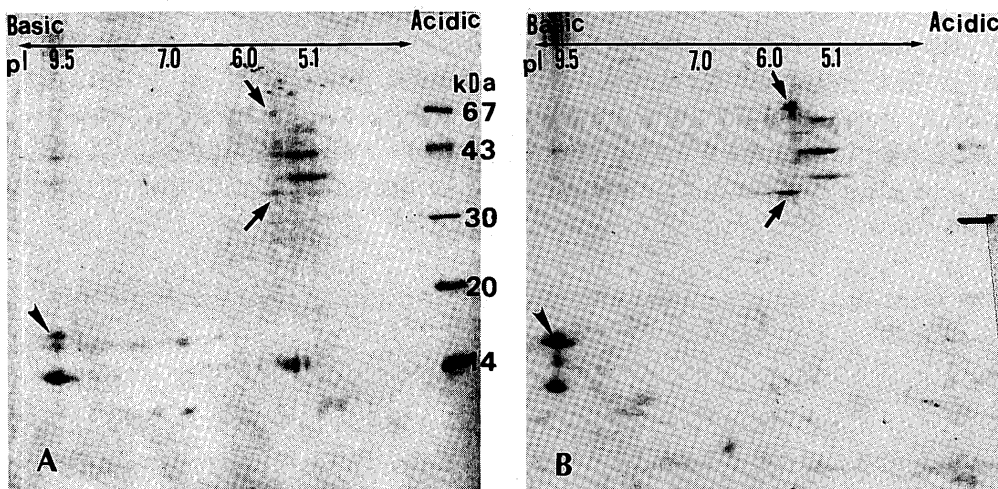


図1 Immunoblot 解析

A, B: 表皮抽出液の2次元電気泳動

A: タンパク染色, B: OE-1による Immuno-blotting, 矢じり印: 17 kDa, pI 9.5の spot

矢印: pI 6.0の33と67 kDaの spots

C: 沈渣-pとヒストン3の1次元電気泳動

1, 2: OE-1による Immunoblotting

3, 4, 5: タンパク染色

1, 4: 沈渣-p

2, 3: ヒストン

5: 分子量マーカー

矢印: 17 kDaと33 kDaのタンパク

矢じり印: ヒストンの33 kDaと67 kDaのタンパク

後、500倍希釈 OE-1 と 4°C で 24 時間反応させ、次に 1000 倍希釈 ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗家兎 IgG 抗体と 90 分間室温で反応させた。最後に 0.05% 3'-diamino benzidine tetrahydrochloride (DAB) と 0.01% 過酸化水素を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) で発色した。対照は同倍希釈した免疫前のウサギ血清を用いた。

さらに、OE-1 と交叉反応する表皮タンパクの有無を確認する目的で 2 次元電気泳動を行った。すなわち、2 mg の Clear cell hidradenoma 細胞塊を 10 M urea と 2% NP-40 を含む 0.5 M Tris 溶液 (pH 9.2) で抽出し、キャピラリー等電点電気泳動を行い、続いて前記 Multigel で SDS-PAGE を行った。その後 PVDF 膜に転写し同様に酵素抗体法で反応タンパク質のスポットを検出した。これらの実験結果について、タンパク染色のスポットの濃さと Western blot での反応の濃さを比較して、前者に比較して後者があきらかに高くなったものを陽性とした。

免疫組織学的検討

手術時に得られた 5 歳男児の正常ヒト頭皮を細切後、OCT Compound に包埋し、液体窒素で凍結、クリオスタットで 4 μm 厚の切片を作製した。切片はスライドガラスに貼付後、97% の冷エタノール (-20°C) で 10 分間固定した。またホルマリン固定パラフィン切片を脱パラフィン後、Dako 社のマニュアルに従って 10 分間トリプシン処理し、免疫組織化学染色を行った。

OE-1 (凍結切片に対して 400 倍希釈、パラフィン切片に 300 倍希釈して用いた) を 1 次抗体として、LSAB キットを用いて酵素抗体染色を行い、抗原の局在部位を検討した。予備的実験で抗血清の希釈倍率を 100 倍より開始し、角層、表皮における非特異的反応がなくなった時点で以後の実験に用いる希釈倍率を決定した。さらに正常ヒト腋窩アポクリン汗腺及びエックリン汗腺由来の腫瘍 10 種類 (Eccrine poroma, Syringoma, Clear cell hidradenoma, Syringocystadenoma papilliferum, Chondroid syringoma, Eccrine spiroadenoma, Eccrine hydrocystoma, Eccrine porocarcinoma, Eccrine adenocarcinoma, Eccrine duct carcinoma) のパラフィン切片について LSAB 法で免疫染色して抗血清の反応性を比較検討した。

免疫電子顕微鏡的検討

手術時に得られたヒト皮膚 (前腕) を 1 mm³ に細切後、1% グルタルアルデヒドで 4°C、1 時間、さらに 2% パラホルムアルデヒドで 4°C、1 時間固

定を行った。PBS で洗浄後、エタノールで脱水し、Unicryl 樹脂中に包埋して -20°C で 2 日間、続いて室温で 3 日間紫外線下で重合させた。作製した超薄切片を 1% の BSA、20% の無免疫ヤギ血清を含む PBS 中で 37°C、30 分間インキュベートしてブロッキングを行った後、50 倍希釈 OE-1 抗血清と 37°C で 60 分間反応させた。続いて二次抗体として 40 倍に希釈した 15 nm 金顆粒ラベルヤギ抗ウサギ IgG 抗体と 37°C で 60 分間反応させ、PBS で洗浄後、2.5% グルタルアルデヒドで室温 15 分、後固定し、蒸留水で 10 分間洗浄した後、飽和酢酸ウラニウムと硝酸鉛で各々室温 20 分間染色した。観察は H-7100 型透過電子顕微鏡 (日立、東京) で行った。

N 末端アミノ酸配列の解析

沈査-p より 2% SDS を含む 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 で抽出したタンパクを 1 次元 SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写後、蒸留水でよく洗浄し、97% メタノールに数秒浸し、続いて 40% メタノール、1% 酢酸を含む 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 染色液で約 1 分間染色した。その後、50% メタノールを含む 10% 酢酸液中で脱色後、蒸留水で十分に洗浄して、17 kDa のバンドを切り出した。続いてエドマン分解法より N 末端アミノ酸配列を解析した。

成 績

抗体の特異性の検討

OE-1 抗血清に反応する表皮タンパクとして、2 次元電気泳動上、分子量 17 kDa、等電点約 9.5 の強く反応したスポットと、pI 約 6.0 で分子量 67 kDa と 33 kDa の 2 つの spots が認められた (図 1-A, B)。しかし、17 kDa の大きさの spot は 1 つのみであった。また OE-1 は、Immunoblotting 上市販のヒストンの分子量 33, 67 kDa の 2 本のバンドと交叉反応を示した (図 1-C-2)。

皮膚における局在

光顕レベルでの検討

正常ヒト頭皮パラフィン切片を用いた酵素抗体染色ではエックリン汗腺の分泌部、真皮内導管および表皮内導管の cuticular border と反応した (図 2-A, B, C)。しかしアポクリン汗腺分泌部と導管には反応しなかった (図 2-D)。また免疫前血清を用いた対照では反応陰性であった。

また、種々のエックリン汗腺由来の汗腺腫瘍を用いた検討でも、殆どの腫瘍が反応陽性であった (表 1)。

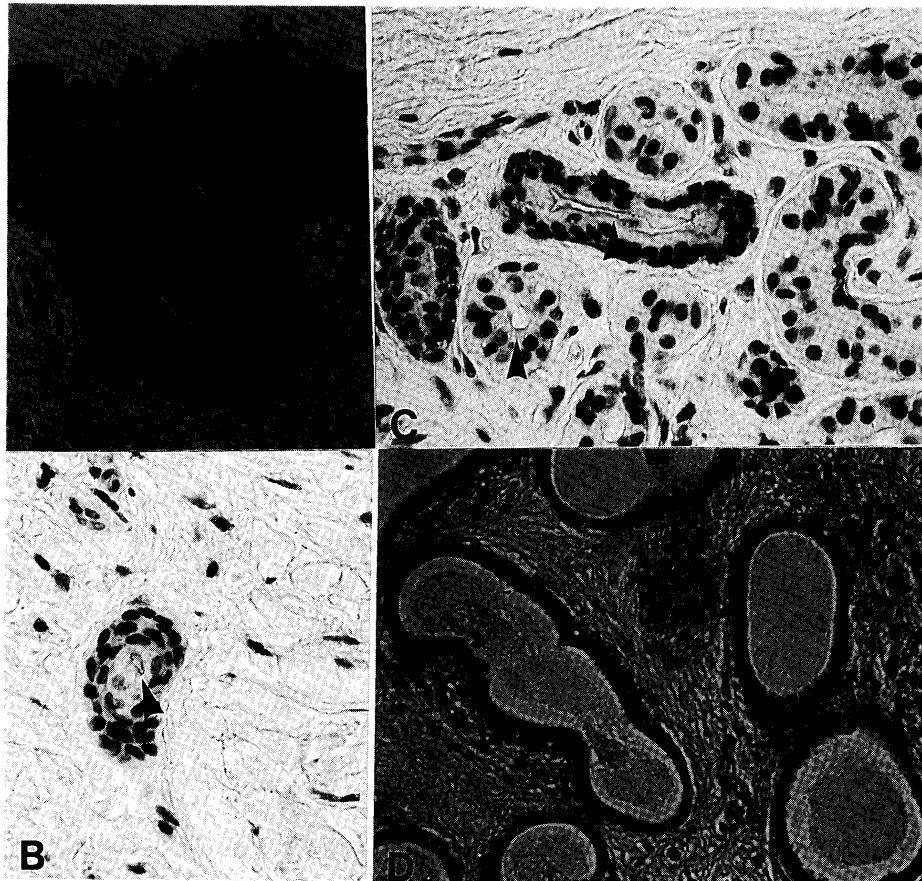


図2 OE-1による免疫組織化学染色所見
 A：表皮内汗管（×300） B：真皮内汗管（×300） C：エックリン腺分泌部（×300） D：アポクリン腺（×85）
 矢じり印：陽性反応が認められた cuticular border

表1 エックリン腺腫瘍のOE-1に対する免疫組織学的反応成績

Tumors	No. of cases	reactivity
1. Eccrine poroma	10	8
2. Clear cell hidradenoma	1	1
3. Syringocystadenoma papilliferum	1	1
4. Syringoma	10	7
5. Chondroid syringoma	3	3
6. Eccrine porocarcinoma	5	3
7. Eccrine adenocarcinoma	3	1
8. Eccrine spiroadenoma	3	1
9. Eccrine duct carcinoma	1	1
10. Hidradenocarcinoma	1	1

Paraffin-embedded section (×300)

免疫電子顕微鏡的検討

図3 A, Bに示されているように、エックリン腺分泌部では、大部分の金顆粒は暗調細胞(D)の細胞膜、特に管腔に面した細胞膜と暗調細胞間の微絨毛の近傍に存在した。しかし、明調細胞(C)には局在は

認められなかった。

また、表皮内導管の luminal cells(E)の、管腔に突出した微絨毛の細胞膜近傍に多数の金顆粒が認められた(図3-C)。さらに、エックリン汗腺分泌部の暗調細胞と明調細胞の写真を3,600倍に拡大して5



mm²の小区画に分け、細胞膜近傍、細胞質や核内の金顆粒の数を計測したところ、暗調細胞の内腔に面した細胞膜近傍に、統計学的に有意の差をもって多くの金顆粒が存在していた(表2)。

N末端アミノ酸配列の解析

17 kDa のバンドを切り出して、N末端アミノ酸配列をエドマン分解法により解析したところ、アミノ酸配列は9番目、17番目および18番目を除いて1番から19番目までヒストン3のN末端アミノ酸配列と完全に一致した(表3)。

図3 免疫電子顕微鏡所見

A: エックリン腺分泌部

金顆粒は暗調細胞の微絨毛と内腔に面した細胞膜の近傍に多数認められた
D: 暗調細胞, C: 明調細胞, L: 腺腔
矢印: 分泌顆粒, 米印: 多房性脂肪滴
Scale は 1μ

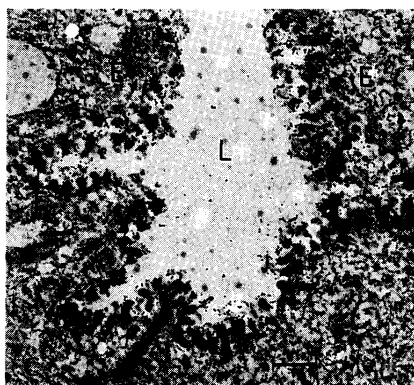
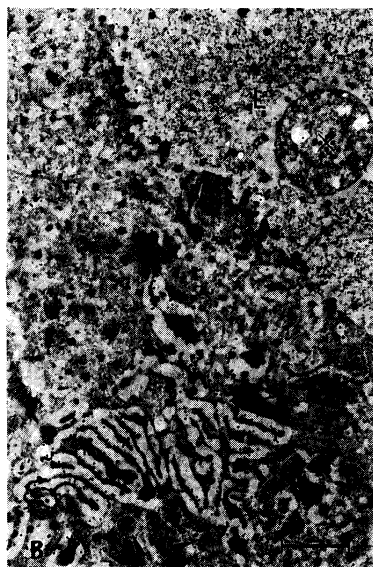


図3 B: Aの1部の拡大像

金顆粒は微絨毛突起に多く認められた
L: 腺腔 米印: 多房性脂肪滴, 矢印: 分泌顆粒, 矢じり印: デスモソーム, Scale は 1μ
C: 表皮内汗管
金顆粒は導管内腔に突出した微絨毛に多数認められた
L: 導管内腔, E: luminal cells
矢じり印: デスモソーム
Scale は 1μ

表2 免疫電顕下での金顆粒の分布状態

a) 内腔に面した暗調細胞の細胞膜	9.533 ± 2.416		<p>*p < 0.0001 **p < 0.001 †p < 0.05</p>
b) 細胞質	6.067 ± 2.282		
暗調細胞	4.400 ± 1.844		
明調細胞	1.667 ± 0.976		
c) 核	4.867 ± 1.598		
暗調細胞	3.200 ± 1.014		
明調細胞	1.667 ± 0.724		
		m ± SD (grain/0.25 μ ²)	

表3 N末端アミノ酸配列の解析

	5	10	15	20
17 kDa, pI 9.5	ARTKQTAR	STGGKAP	Q	
histone 3	ARTKQTARKSTGGKAPRQ			

考 按

まずこの抗血清, OE-1の特異性に関して考察すると, OE-1は1次元電気泳動で17 kDaのタンパクを切り出して家兎を免疫して作成したものであるから, 仮に17 kDaの位置に微量の他のタンパクが混在し, これに対する抗体も産生されていたとすれば, 2次元 immunoblotting で17 kDaの位置に異なったpIを持つ陽性spotが認められるはずである。しかしながら, 図1-Bに示されている様に17 kDaの分子量の陽性spotは, pI 9.5のspot 1つのみしか検出されなかった。また, 図1-BからpI 6.0で分子量33 kDaと67 kDaの2つのspotsが交叉反応性を示した。これら2つのspotは, 図1-Cの1のレーンに泳動した腫瘍抽出物には含まれていないが, レーン2のヒストンに対応する33 kDaと67 kDaの陽性バンドと同じものと考えられる。従って, この抗体OE-1作成に用いた抗原は分子量17 kDaの単一のタンパク質であり, しかもOE-1はヒストン3にも交叉反応性を示す抗体と考えられる。

エックリン腺分泌部は, 内腔に面した暗調細胞と, 基底部に位置し塩類分泌細胞である明調細胞とからなっており, 最近ではエックリン腺分泌部暗調細胞は断頭分泌も行っているのでアポクリン腺細胞と類似した細胞と考えられている¹⁴。しかしながら, OE-1は暗調細胞と反応したがアポクリン腺細胞とは反応せず, 断頭分泌の有無だけで汗腺細胞を分類することが無理であることを示している。

エックリン腺の組織化学的マーカーとしてCEA¹⁻⁶, EMA⁷, ケラチン^{19⁸⁻¹⁰}がすでに用いられている。一方, エックリン腺起源の腫瘍の同定に際して, それらの多くはCEA陽性であるが, 陰性例も報告されている¹²。今回開発したOE-1ポリクローナル抗血清の正常皮膚での免疫染色パターンは抗CEA抗体のそれにほぼ一致している。また, エックリン汗腺由来の良性腫瘍で80%, 悪性腫瘍で54%に陽性であり, これらの成績も抗CEA抗体の成績とほぼ一致する。従って, OE-1はエックリン腺の新しい免疫組織学的染色マーカーとして十分に役立つと考えられる。

一方, 腫瘍から抽出した17 kDaタンパク質にmonospecificなOE-1抗血清は意外なことにヒス

トン3とも反応した。核以外にヒストンタンパクが存在しているとする報告は, 筆者が調べた限りでは見出せなかった。免疫に用いた17 kDaタンパク質とヒストン3との相互関係は現在のところ不明であるが, N末端アミノ酸配列のほぼ完全一致は, 17 kDaタンパク質がヒストン3のN末断片であるか, あるいは同じヒストン3遺伝子からの alternative splicingの産物である可能性を示唆する。OE-1がヒストン3に反応する抗体であるのに, 核中のヒストンと免疫組織学的に全く反応しなかった理由は不明だが, 恐らく, 核内ヒストンの抗原決定基がマスクングされていて反応しなかったと考えられる。

また, ヒストンが皮膚で殺菌的に働いてカンジダの増殖を抑制している¹⁵, あるいは塩基性タンパクとして口腔内細菌に静菌的に作用している可能性がある¹⁶などの報告が散見されるが, ヒストンがどのような生物学的役割を演じているのか, 現時点では不明と言わざるを得ない。

謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導ならびに御校悦賜りました皮膚科学教室手塚正教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を遂行するにあたり, 終始懇切なる御指導, 御助言を賜ったライフサイエンス研究所 高橋昌江助手ならびに皮膚科学教室 愛須きぬ代研究助手に心より感謝いたします。

文 献

1. Penneys NS, Nadji M, McKinney EC (1981) Carcinoembryonic antigen present in human eccrine sweat. *J Am Acad Dermatol* 4: 401-403
2. Penneys NS, Nadji M, Morales A (1981) Carcinoembryonic antigen in benign sweat gland tumors. *Arch Dermatol* 118: 225-227
3. Penneys NS, Nadji M, Ziegels-Weissman J, Ketabchi M, Morales AR (1982) Carcinoembryonic antigen in sweat gland carcinoma. *Cancer* 50: 1608-1611
4. Cotton DWK (1986) Immunohistochemical staining of normal sweat glands. *Br J Dermatol* 114: 441-449
5. Maiorana A, Nigrisole E, Papotti M (1986) Immunohistochemical markers of sweat tumors. *J Cut Pathol* 13: 187-196
6. 宮下光男, 安井由美子, 馬場俊一, 鈴木啓之, 森岡貞雄 (1987) 汗管腺腫の分化の方向性に関する検討. *日皮会誌* 97: 1565-1570
7. 野村佳弘, 北村清隆 (1993) Papillary eccrine adenomaの1例. *皮膚臨床* 35: 621-624
8. Eckert F, Nilles M, Altmannsberger (1992) Eccrine syringofibroadenoma: a case report with analysis of cytokeratin expression. *Br J Dermatol* 126: 257-261
9. Watanabe S, Mogi S, Ichikawa E, Takahashi H, Minami H, Harada S (1991) Immunohistochemical analysis of keratin distribution in eccrine poroma. *Am J Pathol* 142: 231-239

10. Watanabe S, Horose M, Sato, Takahashi H (1994) Immunohistochemical analysis of cytokeratin expression in eccrine spiradenoma: similarities to the transitional portions between secretory segments and coiled ducts of eccrine glands. *Br J Dermatol* 131: 799-807
11. 原 一夫, 松本義也, 大橋 勝, 後藤重己(1993) エックリン汗腺への分化を示した, いわゆる皮膚混合腫瘍の1例: 7歳児の足底に生じた. *日皮会誌* 103: 1075-1081
12. 東 一紀, 亀山孝一郎, 衛藤 光, 神崎 保(1987) エックリン汗腺癌の1例: 免疫組織学的診断を中心にして. *日皮会誌* 97: 1565-1570
13. 市川 進, 木庭幸子, 倉石由子, 久保美代子, 齋田俊明, 清野真理, 近藤昭二(1995) 左下眼瞼部に生じたアポクリン汗腺癌の1例. *皮膚臨床* 37: 565-568
14. 安田健次郎(1984) 汗腺の構造と機能, 人体組織学結合組織・皮膚とその付属器. 小川和朗, 鈴木昭男, 清寺 真他編. 東京: 朝倉書店 340-351
15. Kashima M (1991) H1 histones contribute to candidacidal activities of human epidermal extract. *J Dermatol* 18: 695-706
16. 富田陽一, 桐村和子(1995) 口腔内微生物の乳酸生成活性に及ぼすヒストンの影響. *歯学* 83: 382-395