

ヒト正常脳および膠芽腫組織における S-100 蛋白 サブユニット (α 鎖, β 鎖) の局在に関する 免疫組織化学的研究

岡山大学脳神経外科学教室 (指導: 西本 詮教授)

福岡 高 宏

(昭和60年9月13日受稿)

Key words: S-100 蛋白サブユニット (α 鎖, β 鎖),
ヒト正常脳, 膠芽腫組織,
免疫組織化学

緒 言

1965年 Moore 等¹⁹⁾によって初めて牛脳より分離された S-100 蛋白は, 中性領域においては100%飽和硫酸液にも可溶性 (soluble) である事にちなんで命名された, 分子量約2万の酸性蛋白である。その後の研究により S-100 蛋白は, α 鎖および β 鎖の2つのサブユニットから構成される2量体であり, 現在 S-100 a (α , β), S-100 b (β , β), S-100 a₀ (α , α) の3分子種が同定されている¹¹⁾。S-100 蛋白は物理化学的には, 1分子につき2個の Ca⁺⁺ を結合する能力を持つカルシウム結合蛋白であるが, その生物学的意義については未だ推定の域を出ていない。S-100 蛋白は, はじめ神経外胚葉由来の細胞 (グリア細胞, シュワン細胞等) に特異的に存在すると考えられていた。しかしその後諸家の報告により, 神経組織以外の種々の細胞にも S-100 蛋白の存在が明らかとなってきた。即ち, 皮膚のランゲルハンス細胞²¹⁾, メラノサイト²²⁾, リンパ節の interdigitating reticulum cell^{21), 22)}, 軟骨細胞²⁷⁾, 脂肪細胞¹⁸⁾ 等である。さらに最近になり S-100 蛋白のサブユニットである S-100 蛋白 α 鎖, β 鎖各々についての免疫組織化学的局在検索が行われ, その結果, S-100 蛋白の分子種 (S-100 a, b, a₀) による局在証明が正常組織のみならず, 腫瘍組織についても試みられつつある。正常組織では, S-100 a はグリア細胞, メラノサイトに,

S-100 b はシュワン細胞に, S-100 a₀ は神経細胞, マクロファージ等に存在する事が報告されている。一方, 腫瘍組織においては, S-100 a は, 星細胞腫細胞, 悪性黒色腫細胞に, S-100 b は, 神経鞘腫細胞に, S-100 a₀ は色素母斑細胞等に存在する事が報告されている³³⁾。しかし S-100 蛋白サブユニットの細胞内微細局在に関する報告は少ない。今回著者は, S-100 蛋白サブユニットに対するマウスモノクローナル抗体を用いてヒト正常脳およびヒト膠芽腫における S-100 蛋白サブユニットの局在を光顕並びに電顕的に検索した。その結果, S-100 蛋白の機能を推測する上で重要と思われる所見を得たので文献的考察を加えて報告する。

実験材料および方法

1) 対象

ヒト大脳組織は深在性脳腫瘍に対する内減圧術の目的で切除を行った5例の脳組織 (主に前頭葉) を用いた。また6例の膠芽腫組織は当教室において開頭術により摘出された生検材料を用いた。

2) 免疫組織化学的検索

(A) 光顕的検索 生検組織は採取後すみやかに10%中性ホルマリン液で固定した後, パラフィン包埋し, 8 μ の切片を作製した。切片は脱パラフィン処理後, 組織の内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化する為, 0.5%過酸化水素加

メタノールに室温で30分間浸漬した。リン酸緩衝生理食塩水(以下PBSと略す)にて切片を洗浄後、組織のFcレセプターをブロックする目的で正常ヤギ血清(PBSにて10倍希釈)を室温で10分間作用させた。次に第1次抗体として、抗S-100蛋白 α 鎖マウスモノクローナル抗体(PBSにて50倍希釈, 日本抗体研究所), 抗S-100蛋白 β 鎖マウスモノクローナル抗体(PBSにて25倍希釈, 日本抗体研究所)を4°Cで12時間作用させた。対照抗体として抗ヒトB cellマウスモノクローナル抗体(PBSにて25倍希釈, Orthomune社, 米国)を用いた。第2次抗体として horseradish peroxidase 標識抗マウス IgG ヤギ IgG (PBSにて10倍希釈, 日本抗体研究所)を室温で1時間作用させた後、0.005% H₂O₂ 加 DAB 溶液 (Sigma社, 米国 20mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride/100ml 0.05M Tris-HCL buffer, pH7.6)に10分間浸漬し発色反応を行った。PBSで洗浄後エタノール列にて脱水し包埋の後鏡検した。写真撮影には、ニコン M-35FA型撮影装置を使用した。以上の光顕レベルにおける免疫組織化学的検索手順の概略は表1-Aに示した。

(B) 電顕的検索 組織は採取後ただちに McLean¹⁶⁾の PLP 固定液に 4°Cで12時間浸漬し、さらに10%ショ糖加 PBSにて4°Cで12時間、15%ショ糖加 PBSで4°C 4時間、20%ショ糖加 PBSで4°C 2時間洗浄し、OCT compound (Miles Laboratory, 米国)に包埋後、ドライアイスアセトンにより組織をすみやかに凍結させ、クリオスタット(サクラ CM-41)にて10 μ の凍結切片を作製した。スライドガラス上の切片に正常ヤギ血清(PBSにて10倍希釈)を室温で10分間作用させ、組織のFcレセプターのブロックを行った後、第1次抗体として、抗S-100蛋白 α 鎖マウスモノクローナル抗体(PBSにて50倍希釈, 日本抗体研究所), 抗S-100蛋白 β 鎖マウスモノクローナル抗体(PBSにて25倍希釈, 日本抗体研究所)を4°Cで12時間作用させた。対照抗体としては、抗ヒトB cellマウスモノクローナル抗体(PBSにて25倍希釈, Orthomune社, 米国)を用いた。第2次抗体として、horseradish, peroxidase 標識抗マウス IgG ヤギ IgG

(PBSにて10倍希釈, 日本抗体研究所)を室温で1時間作用させた後、3%グルタルアルデヒド(リン酸緩衝液 pH7.4にて希釈)により室温で10分間後固定を行った。次に切片をDAB溶液に室温で30分間浸漬した後、0.005% H₂O₂ 加 DAB 溶液にて、室温で10分間発色反応を行った。次に2%オスミウム酸(0.2M カコジル酸緩衝液, pH7.4で希釈, Merck社, 米国)により室温で30分間後固定を行い、さらにエタノール列による脱水処理の後エポン812(応研商事)に包埋した。ウルトラマイクロトーム(Sorvall社 Porter-Blum)により超薄切片を作製し重金属による電子染色を行うことなく日立H-700型あるいは日立HS-8型電子顕微鏡にて観察した。以上の電顕免疫組織化学的検索手順の概略は表1-Bに示した。

結 果

1) 光顕所見

(A) ヒト正常大脳 S-100蛋白 α 鎖に対する褐色の免疫組織化学的陽性反応は、星状膠細胞、希突起膠細胞、神経細胞に認められた。しかし脳室上衣細胞については検索出来ていない。脳軟膜直下のglia limitansおよび白質において特に強い陽性反応を呈する星状膠細胞が観察された。希突起膠細胞の陽性反応の程度は星状膠細胞のそれに比し一般に弱かった。神経細胞においては陽性反応の強いもの弱いもの、ほとんど陽性反応の認められないもの等、反応の程度が細胞間でかなり異なっていた。S-100蛋白 α 鎖に対する陽性反応の細胞内局在は、星状膠細胞の細胞質、細胞突起に観察され、神経細胞においては、細胞質、軸索に陽性反応が認められた。星状膠細胞、神経細胞においては核に陽性反応が認められるものもあった。希突起膠細胞においては細胞核に陽性反応が観察されたが、細胞質に陽性反応が存在するか否かは光顕レベルでは充分判定できなかった(図1-a, 1-b, 1-c)。S-100蛋白 β 鎖に対する免疫組織化学的陽性反応は、星状膠細胞、希突起膠細胞に観察されたが、神経細胞では全く陰性であった。星状膠細胞、希突起膠細胞における陽性反応の細胞内局在は、S-100蛋白 α 鎖のそれと

表 1. 免疫組織化学的検索の概略

A) 光顕

- 1) 8 μ ホルマリン固定パラフィン切片および 10 μ PLP 固定凍結切片
- ↓
- 2) 脱パラフィン処理後 0.5% 過酸化水素加メタノールに浸漬 (内因性ペルオキシダーゼの不活化) 室温、30 分間
- ↓
- 3) 正常ヤギ血清 (10 倍希釈) 室温、10 分間
(組織 Fc レセプターのブロック)
- ↓
- 4) 抗 S-100 蛋白 α 鎖マウスモノクローナル抗体 (50 倍希釈、日本抗体研究所)
抗 S-100 蛋白 β 鎖マウスモノクローナル抗体 (25 倍希釈、日本抗体研究所)
対照抗体 …… 抗ヒト B cell マウスモノクローナル抗体 (25 倍希釈、オルソミューン)
4 $^{\circ}$ C、一晚
- ↓
- 5) 抗マウス IgG HRP 標識ヤギ抗体 (10 倍希釈、日本抗体研究所) 室温、1 時間
- ↓
- 6) 0.005% 過酸化水素加 DAB 液* 室温、10 分間

B) 電顕

- 1) 10 μ PLP 固定凍結切片の作製
- 2) 正常ヤギ血清 (10 倍希釈) 室温、10 分間
- 3) 抗 S-100 蛋白 α 鎖マウスモノクローナル抗体 (50 倍希釈、日本抗体研究所)
抗 S-100 蛋白 β 鎖マウスモノクローナル抗体 (25 倍希釈、日本抗体研究所)
対照抗体 …… 抗ヒト B cell マウスモノクローナル抗体 (25 倍希釈、オルソミューン)
4 $^{\circ}$ C、一晚
- 4) 抗マウス IgG HRP 標識ヤギ抗体 (10 倍希釈、日本抗体研究所) 室温、1 時間
- 5) 3% グルタルアルデヒド (PBS で希釈) による後固定 …… 室温、10 分間
- 6) DAB 液* に浸漬 …… 室温、30 分間
- 7) 0.005% 過酸化水素加 DAB 液* で発色 室温、10 分間
- 8) 2% オスミウム酸 (カコジル酸緩衝液で希釈) による後固定 …… 室温、30 分間
- 9) エタノール脱水後、エポン 812 で包埋
- 10) ウルトラマイクロトーム (Sorvall 社 Porter-Blum) による超薄切片の作製
- 11) 日立 H-700 および日立 HS-8 型電子顕微鏡による観察

*DAB 液: 20mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride / 100ml 0.05M Tris-HCl buffer

区別できなかつた (図 1-d)。

(B) 膠芽腫組織 光顕レベルで免疫組織化学的検索を行った膠芽腫 6 例のうち、S-100 蛋白 α 鎖, β 鎖ともに陽性であったのは 1 例、S-100 蛋白 α 鎖のみ陽性であったのは 1 例、S-100 蛋白 β 鎖のみ陽性は 2 例、両者ともに陰性は 2 例であった。S-100 蛋白 α 鎖, β 鎖ともに陽性例は、個々の腫瘍細胞間で陽性反応の程度がまちまちであった。陽性反応は主に腫瘍細胞の細胞質に観察され、時に核にも陽性反応が認め

られるものもあつた (図 2-a, 2-b)。S-100 蛋白 α 鎖のみの陽性例においては、同一切片において比較的弱い陽性反応を呈している細胞群の中に陽性反応の強い細胞が混在した所見が認められた (図 2-c)。S-100 蛋白 β 鎖のみの陽性例においては、比較的小型で、核が陽性反応を呈している腫瘍細胞群が島状に散在していた (図 2-d)。

2) 電顕所見

(A) 正常膠細胞 (星状膠細胞, 希突起膠細胞)

S-100 蛋白 α 鎖に対する電子密度の高い陽性免疫反応（以下陽性反応と略す）は、主に膠細胞の細胞質にびまん性に観察された。時に RER (rough endoplasmic reticulum) やミトコンドリアの外膜に一致して陽性反応が観察された。しかし RER やミトコンドリアの内部は陰性であった。核質に陽性反応がびまん性に観察されるものがあったが、クロマチンに一致した反応は認められなかった（図 3-a）。血管周囲の血管足にも陽性反応がびまん性に存在しているのが観察された（図 3-b）。S-100 蛋白 β 鎖に対する陽性反応の細胞内局在様式は、S-100 蛋白 α 鎖に対するそれと基本的には同じであったが、一般に陽性反応の程度は、S-100 蛋白 β 鎖に対する方が、 α 鎖に対する反応より強い傾向が認められた（図 3-c, 3-d）。

(B) 神経細胞 S-100 蛋白 α 鎖に対する陽性反応は、主に神経細胞の細胞質にびまん性に観察され、時に RER やミトコンドリアの外膜に一致して陽性反応が観察されることがあったが、RER やミトコンドリアの内部は陰性であった。核質に塊状の陽性反応が散在して観察されたが、ヘテロクロマチン、核小体とも陰性であった。また樹状突起の内部に陽性反応が観察されるものがあった（図 4-a, 4-b）。しかし、S-100 蛋白 β 鎖に対する陽性反応は全く認められなかった。

(C) 膠芽腫細胞 電顕的に検索することのできた 1 例の S-100 蛋白 α 鎖陽性例において、陽性反応は、主に膠芽腫細胞の細胞質にびまん性に観察され、時に RER やミトコンドリアの外膜に一致して陽性反応が観察されることがあった。しかし RER やミトコンドリアの内部は陰性であった。核質に陽性反応が散在性に観察されることがあり、時に核小体の周囲に一部陽性反応が認められた。また、外核膜に一致した部分に強い陽性反応が観察される部分があった。時に細胞質にグリアフィラメントと思われる中間線維の認められる細胞があったが、線維に一致した陽性反応は観察されなかった（図 5-a, 5-b）。なお、この症例では、S-100 蛋白 β 鎖に対する陽性反応は全く認められなかった。

考 按

S-100 蛋白は、1965年 Moore ら¹⁹⁾によりはじめて牛脳から分離された分子量約 2 万の酸性蛋白であり、その後の研究により S-100 蛋白は α 鎖、 β 鎖により構成される 2 量体である事が判明している。S-100 蛋白は 1 分子あたり 2 個の Ca^{++} イオンを結合する能力をもち、カルモデュリンやトロポニン C 等とともに、EF-Hand 型の Ca^{++} 結合基を持つことが知られている¹¹⁾。S-100 蛋白は、はじめ神経外胚葉由来の細胞に特異的に存在すると考えられていたが、免疫組織化学的知見の集積に伴い、諸臓器の種々の細胞に広く存在する事が明らかになっている。即ち、グリア細胞、シュワン細胞のみならず、皮膚のランゲルハンス細胞²¹⁾、メラノサイト²²⁾、リンパ節の interdigitating reticulum cell^{22), 21)}、軟骨細胞²⁷⁾、脂肪細胞¹⁹⁾等にも存在が報告されている。S-100 蛋白はそれを構成する α 、 β サブユニットの組成から S-100 a (α , β)、S-100 b (β , β)、S-100 a₀ (α , α) の 3 分子種が存在することが指摘されている¹²⁾。昨今のペプチド分離精製技術の進歩に伴い、S-100 蛋白サブユニットの分離も可能となり¹²⁾その結果、各 S-100 蛋白サブユニットに対する抗体も作製されるようになってきた。高橋ら³³⁾により、正常組織ならびに腫瘍組織における S-100 蛋白サブユニットの免疫組織化学的検索が報告されているが、その検索結果及び今回の著者の検索成績から判断して、従来用いられてきた多くの抗 S-100 蛋白抗体は主に S-100 蛋白 β 鎖と反応するものと考えられる。高橋らの報告によると、S-100 a の存在する正常組織細胞として、グリア細胞、メラノサイト、軟骨細胞等、S-100 b の存在する細胞としてシュワン細胞、皮膚のランゲルハンス細胞、リンパ節の interdigitating reticulum cell 等、さらに S-100 a₀ の存在する細胞として、神経細胞、マクロファージ等が報告されている。腫瘍組織においては、S-100 a は星細胞腫細胞、悪性黒色腫細胞、S-100 b は神経鞘腫細胞に、S-100 a₀ は色素母斑細胞等に存在する事が報告されている。従来から神経細胞に S-100 蛋白が存在するか否かは異論の多いところであった。

Hydén ら⁸⁾は家兎ダイテルス核における S-100 蛋白の存在を指摘し, Tabuchi ら²⁸⁾はハムスターの小脳プルキンエ細胞に S-100 蛋白の存在を報告し, また Haglid ら⁷⁾はラット脳におけるシナプス後膜に S-100 蛋白の存在を報告している。しかし神経細胞における S-100 蛋白の存在を否定する報告も散見される^{23), 25)}。この様に諸家のこれまでの報告に差異が生じたのは, 検索に用いられた抗 S-100 蛋白抗体の特異性が, 研究者により不均一であった為ではないかと考えられる。S-100 蛋白サブユニットに対する特異抗体を用いることができるようになった現在, 少なくとも正常の神経系においては, 抗 S-100 蛋白サブユニット抗体を用いた検索を行うことにより, グリア細胞, 神経細胞, シュワン細胞の識別が免疫組織化学的に可能であると云える。さらに神経系の腫瘍組織においても腫瘍の発生母組織を推測する有力な手段の一つになりうると考えられる。これまで S-100 蛋白の組織局在に関しては, 多くの免疫組織化学的研究がなされてきているが, S-100 蛋白のもつ生物学的意義については必ずしも見解の一致をみていない。S-100 蛋白によるシナプス伝達の調節⁹⁾, 膜を介するカチオンの輸送への関与²⁾, 核内機能への関与¹⁷⁾, プロテインキナーゼの活性化⁴⁾, 微小管脱重合への関与¹⁾, ホルモン分泌への関与¹⁰⁾等, 幅広い役割が想定されている。最近の Shashoua らの報告²⁶⁾によれば S-100 蛋白が細胞内よりも細胞外液, 髄液に数倍も高濃度に存在することをラット脳で証明し, S-100 蛋白の細胞外への放出機構が存在している可能性を指摘するとともに S-100 蛋白が細胞間のカチオンの輸送に関与している可能性をも示唆している。S-100 蛋白および, S-100 蛋白サブユニットの細胞下レベルでの局在証明に関する報告は少ないが^{23), 29), 30)}, Sano ら²⁵⁾は, 抗 S-100 蛋白 β 鎖抗体を用いて, 株化ラットグリオーマ C6 細胞における S-100 蛋白 β 鎖の局在検索を光顕レベルで行っている。それによると静止期の細胞においては S-100 蛋白 β 鎖に対する免疫組織化学的陽性反応は, 細胞質および核内に観察されるが, 分裂期の細胞においては染色体に一致した S-100 蛋白 β 鎖の存在を認めており, S-

100 蛋白が細胞核分裂に関与する可能性を示唆する興味ある所見を報告している。このように S-100 蛋白の細胞下レベルでの局在を検索することは, その機能を探る上で有意義な方法の一つと思われる。今回著者が行った検索結果からヒト正常大脳における, 正常膠細胞 (星状膠細胞, 希突起膠細胞) には, 光顕的検索結果と同じく S-100 蛋白 α 鎖, β 鎖の存在が電顕レベルでも観察された。S-100 蛋白 α 鎖, β 鎖に対する免疫細胞化学的陽性反応は, 神経膠細胞の, 主に細胞質にびまん性に存在し時に RER やミトコンドリアの外膜に一致して観察された。Rusca らによれば, 膜結合性 S-100 蛋白は S-100 蛋白全体の 3—6% を占めるとされているが, 上記の所見は膜結合性 S-100 蛋白²⁴⁾の存在を強く示唆しているものと考えられる。正常膠細胞の核内においては, S-100 蛋白サブユニットに対する陽性反応が観察される場合と, そうでない場合があるがその理由として, 組織固定の際の抗原の移動, 抗原性の失活の程度の相違等が考えられる。今回使用した抗 S-100 蛋白サブユニット抗体は, IgG であり, IgG (Fab')₂ もしくは Fab' を使用すればさらに, 抗体の細胞内への深達度が増すものと考えられる。今回, 著者がヒト正常大脳灰白質の神経細胞について光顕レベルで S-100 蛋白 α 鎖の免疫組織化学的検索を行った結果, 神経細胞によっては陽性反応の認められる場合とほとんど陰性の場合があり, ある種の神経細胞では S-100 蛋白の果たす役割を他の蛋白, たとえば同じ EF-Hand グループに属する Ca⁺⁺ 結合蛋白であるカルモデュリン等が果たしている可能性が考えられる³¹⁾。今後は S-100 蛋白と他の Ca⁺⁺ 結合蛋白との機能上の関連性を追求していくことも必要であろう。電顕レベルでの神経細胞における S-100 蛋白 α 鎖に対する陽性反応の局在は正常膠細胞におけるそれと基本的には同じであったが, 陽性反応の程度は, 正常膠細胞におけるそれに比してかなり弱かった。Miani ら¹⁷⁾は S-100 蛋白が核小体の RNA ポリメラーゼの活性化に関与していることを実験的に証明しているが, これは今回の検索で, 膠芽腫細胞の核小体の一部に S-100 蛋白の局在が観察されたことと矛盾しない。さ

て、著者が S-100 蛋白サブユニットの局在検索を光顕レベルで行った膠芽腫 6 例においては、S-100 蛋白 α 鎖、 β 鎖ともに陽性の例、どちらか一方のみ陽性の例、両者とも陰性の例が観察された。S-100 蛋白 α 鎖、 β 鎖ともに陽性例において連続切片で個々の膠芽腫細胞における S-100 蛋白サブユニットの局在を観察した限りでは、 α 鎖陽性細胞と β 鎖陽性細胞は異なった別個の細胞であるように思われた。このようにヒト膠芽腫間で S-100 蛋白サブユニットの局在に差異があり、また同一腫瘍組織でも部位によって反応の程度に著しい差が認められる理由はよくわからない。従来のポリクローナル抗体を用いた S-100 蛋白の定量については、Haglidら⁶⁾や当教室の守屋ら²⁰⁾の報告の如く、神経膠腫における生物学的悪性度と腫瘍組織の水溶性 S-100 蛋白量が逆相関するという結果と、反対に Jacques¹³⁾らのように相関関係はないという結果とがみられる。これらの相違は、検索に用いた抗 S-100 蛋白抗体の相違により生じた可能性が考えられる。また、従来用いられてきた抗 S-100 蛋白抗体の多くが神経細胞における S-100 a₀ (α , α) を検出できなかった事実を考えると、神経膠腫組織における S-100 蛋白 α 鎖を検出できなかった可能性も指摘できよう。今後は各サブユニットに特異的な抗体を用いた S-100 蛋白の定量を行うことが必要と考える。ヒト正常膠細胞においては S-100 蛋白 α 鎖、 β 鎖の存在は明らかであるが、膠芽腫細胞においては腫瘍化に伴い、S-100 蛋白 α 鎖、 β 鎖のどちらか一方、あるいは両方とも産生されなくなる可能性が考えられる。また S-100 蛋白サブユニットに対する抗体と反応しないような、抗原性を異にする S-100 蛋白 (S-100 蛋白と呼んでよいか否かは疑問である) が産生されている可能性も考えられる。Labourdet¹⁴⁾や当教室の古田ら⁶⁾は、株化ラットグリオーマ C6 細胞において S-100 蛋白量が、細胞周期の各時期において変化する事を報告しているが、膠芽腫のように分裂増殖のさかんな腫瘍においては、各腫瘍細胞の細胞周期が異なる為、個々の腫瘍細胞間での S-100 蛋白量に差異を生じている可能性があり、こうしたことが膠芽腫における S-100 蛋白

の免疫組織化学的染色性の不均一さの一因となっているとも考えられる。著者が免疫電顕的に検索しえた S-100 蛋白 α 鎖陽性例の膠芽腫細胞において、陽性反応は細胞質、核質、RER やミトコンドリアの外膜等に認められ、その局在様式は、ヒト正常膠細胞における S-100 蛋白 α 鎖のそれと本質的に同じであったが、膠芽腫細胞の核小体の周囲に S-100 蛋白 α 鎖の局在が観察されたことは、前述した Miani らの実験結果に照らしあわせて興味深い所見と思われる。今後は S-100 蛋白 β 鎖の膠芽腫における局在を電顕的に検索することが必要であろう。S-100 蛋白の細胞内局在を生きたままの細胞で観察できればその機能を推測する上で最適であるが、免疫組織化学では組織固定が強くなればなる程、一般に標的物質の抗原性が阻害され易いという、二つの相反する要素の均衡の下で行わざるを得ない。それ故に物質の局在のみからただちにその機能を推測することは困難である。今回著者が行った検索結果より、正常膠細胞、神経細胞、膠芽腫細胞を問わず S-100 蛋白サブユニットの局在が、細胞質、細胞内小器官の外膜、核質、細胞突起に観察されたことから判断して、S-100 蛋白はその機能の一つとして細胞内における Ca^{++} 、 Mg^{++} 等のカチオンの輸送へ広く関与している可能性が示唆されたものと考えられる。

結 論

カルシウム結合酸性蛋白の一つである S-100 蛋白を構成するサブユニット (α 鎖、 β 鎖) のヒト正常大脳 (5 例) およびヒト膠芽腫組織 (6 例) における局在を、各サブユニットに対するモノクローナル抗体を用いた間接酵素抗体法により、光顕および電顕レベルで検索した。その結果、光顕レベルでは、ヒト正常大脳の膠細胞 (星状膠細胞、希突起膠細胞) および神経細胞に S-100 蛋白 α 鎖に対する免疫組織化学的陽性反応が観察された。一方、S-100 蛋白 β 鎖に対する陽性反応は、ヒト正常大脳では膠細胞にのみ観察され、神経細胞には認められなかった。またヒト膠芽腫においては、S-100 蛋白 α 鎖、 β 鎖両者に対する陽性反応が観察されるもの 1 例、

どちらか一方のみが陽性のもの 3 例, 両者ともに陰性のもの 2 例であり様々であった。電顕的局在検索では, ヒト正常大脳の正常膠細胞においては, S-100 蛋白 α 鎖, β 鎖いずれに対する陽性免疫反応も, 主に細胞質に観察され, 時に核質, RER やミトコンドリアの外膜に一致して観察された。ヒト神経細胞において, S-100 蛋白 α 鎖に対する陽性免疫反応は, 細胞質, 核質に観察され, 時に RER やミトコンドリアの外膜に存在した。しかし S-100 蛋白 β 鎖に対する陽性反応は全く認められなかった。電顕的に検索し得た S-100 蛋白 α 鎖陽性のヒト膠芽腫例において, 陽性免疫反応は主に膠芽腫細胞の細胞質に観察され, 時に核質, 核小体の周囲, RER やミトコンドリアの外膜に一致して観察された。

以上の結果から, S-100 蛋白は, ヒト正常大脳の膠細胞(星状膠細胞, 希突起膠細胞), 神経細胞, ヒト膠芽腫細胞を問わず, 一般に細胞質, 核質, 細胞内小器官の外膜に存在し, 細胞内における Ca^{++} などのカチオンの輸送に広く関与している可能性が示唆されたものと考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました恩師西本 詮教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究に御指導, 御助言を頂きました香川医科大学脳神経外科学教室の田淵和雄助教授はじめ, 諸先生, 諸氏諸嬢に感謝いたします。なお本論文の要旨は, 第26回日本神経病理学会にて発表した。

文 献

1. Baudier, J., Briving, C., Deinum, J., Haglid, K., Sörskog, L. and Wallin, M.: Effect of S-100 proteins and Calmodulin on Ca-induced disassembly of brain microtubule proteins in vitro. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Sci) Lett.* **147**, 165—167, 1982.
2. Callisano, P. and Bangham, A.D.: Effect of two brain specific proteins (S-100 and 14-3-2) on cation diffusion across artificial lipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 504—509, 1971.
3. Cocchia, D.: Immunochemical localization of S-100 antigen in the brain of rat. *Cell Tissue Res.* **214**, 529—549, 1981.
4. De-Fang Qi, R.S. Turner and J.F. Kuo: S-100 and other acidic proteins promote Ca-independent phosphorylation of protamine catalyzed by a new protein kinase from brain. *J. Neurochem.* **42**, 458—465, 1984.
5. 古田知久: 培養グリオーマ細胞の形態学的分化に伴う DNA ヒストグラムならびに S-100 蛋白量の経時的変化に関する研究。岡山医学会雑誌, **94**, 1113—1125, 1982.
6. Haglid, K.G., Stavrou, D., Rönback, L., Carlsson, C.A. and Weidenback, W.: The S-100 protein in water and pentanol-extractable form in normal human brain and tumors of the human nervous system. A quantitative study. *J. Neurol. Sci.* **20**, 103—111, 1973.
7. Haglid, K.G., Hambergen, A., Hansson, H.A., Hydén, H., Presson, L. and Rönback, L.: S-100 protein in synapses of the central nervous system. *Nature* **251**, 532—534, 1974.
8. Hydén, H. and MacEwen, B.: A glial protein specific for the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **55**, 353—358, 1966.
9. Hydén, H.: A calcium-dependent mechanism for synapse and nerve cell membrane modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 2965—2968, 1974.
10. Ishikawa, H., Nogami, H. and Shirasawa, N.: Novel clonal strains from adult rat anterior pituitary producing S-100 protein. *Nature* **303**, 711—713, 1983.
11. 磯部俊明, 石岡憲昭, 奥山典生: 脳のタンパク質—Calmodulin と S-100 タンパク質—。神経進歩, **24**, 983

- 1007, 1980.
12. Isobe, T., Ishioka, N., Masuda, T., Takahashi, Y., Ganno, S. and Okuyama, T.: A rapid separation of S-100 subunits by high performance liquid chromatography. The subunit compositions of S-100 proteins. *Biochem. Intern.* **6**, 419—426, 1983.
 13. Jacque, C.M., Kujas, M., Poreau, A., Raoul, M., Collier, P., Racado, J. and Baumann, N.: GFA and S-100 protein levels as an index for malignancy in human gliomas and neurinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**, 479—483, 1979.
 14. Labourdette, G., Mahony, J.B., Brown, I.R. and Marks, A.: Regulation of synthesis of a brain specific protein in monolayer cultures of clonal rat glia cells. *Eur. J. Biochem.* **81**, 595—597, 1977.
 15. Matus, A. and Mughal, S.: Immunohistochemical localization of S-100 protein in brain. *Nature* **258**, 746—748, 1975.
 16. McLean, I.W. and Nakane, P.K.: Periodate lysine-paraformaldehyde fixative; a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1077—1083, 1974.
 17. Miani, N., Michetti, F., Renzis, G. and Canglia, A.: Effect of a brain specific protein (S-100 protein) on the nucleolar RNA polymerase activity in isolated brain nuclei. *Experientia* **29**, 1499—1501, 1973.
 18. Michetti, F., Dell'Anna, E., Tiberio, G. and Cocchia, D.: Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res.* **262**, 352—356, 1983.
 19. Moore, B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 739—745, 1965.
 20. 守屋芳夫, 古田知久, 坪井雅弘, 田淵和雄, 西本 詮: ヒト脳腫瘍とS-100蛋白質. *神経化学*, **17**, 265—268, 1978.
 21. Nakajima, T., Watanabe, S., Sato, Y., Shimosato, Y., Motoi, M. and Lennirt, K.: S-100 protein in Langerhans cells, interdigitating reticulum cells and histiocytosis X cells. *Gann* **73**, 429—432, 1982.
 22. Nakajima, T., Watanabe, S., Sato, Y., Kameya, T., Shimosato, Y. and Ishihara, K.: Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer* **50**, 912—918, 1982.
 23. 大西林吉: ヒト正常脳及び脳腫瘍におけるS-100蛋白の局在に関する免疫組織化学的研究. *岡山医学会雑誌*, **96**, 197—216, 1984.
 24. Rusca, G., Calissano, P. and Alemda, S.: Identification of membrane bound fraction of the S-100 protein. *Brain Res.* **49**, 223—227, 1972.
 25. Sano, M., Kato, K., Seto-Ocshima, A. and Mizutani, A.: Immunocytochemical localization of S-100 protein and Calmodulin in C6 glioma cells. *Acta Histochem. Cytochem.* **17**, 251—258, 1983.
 26. Shashoua, V.E., Hesse, G.W. and Moore, B.W.: Proteins of the brain extracellular fluid: Evidence for release of S-100 protein. *J. Neurochem.* **42**, 1536—1541, 1984.
 27. Steffansson, K., Wollmann, R.L., Moore, B.W. and Arnasson, B.G.W.: S-100 protein in human chondrocytes. *Nature* **295**, 63—64, 1982.
 28. Tabuchi, K. and Kirsch, W.M.: Immunocytochemical localization of S-100 protein in neurons and glia of hamster cerebellum. *Brain Res.* **92**, 175—180, 1975.
 29. Tabuchi, K., Kirsch, W.M. and Nakane, P.K.: The fine structural localization of S-100 protein in rodent cerebellum. *J. Neurol. Sci.* **28**, 65—76, 1976.

30. Tabuchi, K., Nishimoto, A. and Kirsch, W.M.: Immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in cultured rat glioma cells. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 52, 159—162, 1978.
31. Tabuchi, K., Ohnishi, R., Nishimoto, A., Isobe, T. and Okuyama, T.: Reverse cellular distribution of calmodulin to S-100 protein in primate brain. *Brain Res.* 298, 353—357, 1984.
32. Takahashi, K., Yamaguchi, H., Ishizeki, J., Nakajima, T. and Nakazato, Y.: Immunohistochemical and immunoelectron microscopic localization of S-100 protein in the interdigitating reticulum cells of the human lymph node. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 37, 125—135, 1981.
33. Takahashi, K., Isobe, T., Ohtsuki, Y., Akagi, T., Sonobe, H. and Okuyama, T.: Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 45, 385—396, 1984.

附 図 の 説 明

図 1. ヒト正常大脳 (光顕)

- a. ヒト大脳灰白質, S-100 蛋白 α 鎖染色 (200倍)
軟膜直下の glia limitans (g.l)
星状膠細胞 (A) 及び希突起膠細胞 (O) が陽性である。
- b. ヒト大脳灰白質, S-100 蛋白 α 鎖染色 (200倍)
神経細胞 (N), 星状膠細胞 (A) 及び希突起膠細胞 (O) が陽性である。
神経細胞はほとんど陰性のもの (n) も認められる。
- c. ヒト大脳白質, S-100 蛋白 α 鎖染色 (200倍)
星状膠細胞 (A) が陽性である。また、その突起である血管足 (f) にも陽性反応が認められる。
- d. ヒト大脳白質, S-100 蛋白 β 鎖染色 (200倍)
星状膠細胞 (A) 及び希突起膠細胞 (O) が陽性である。神経細胞 (N) には陽性反応は認められない。

図 2. ヒト膠芽腫 (光顕)

- a. ヒト膠芽腫, S-100 蛋白 α 鎖染色 (200倍)
腫瘍細胞は陽性反応を呈しているがその染色性は様々で不均質である。
- b. 図 2—a と同一症例の膠芽腫, S-100 蛋白 β 鎖染色 (200倍)
 α 鎖の場合に比べ、陽性細胞の数は少ないが、強陽性の細胞も散見される。
- c. α 鎖のみ陽性のヒト膠芽腫, S-100 蛋白 α 鎖染色 (200倍)
比較的弱い陽性反応を呈する細胞群の中に強陽性の細胞が散在している。
- d. β 鎖のみ陽性のヒト膠芽腫, S-100 蛋白 β 鎖染色 (200倍)
比較的小型で核が陽性の細胞集団が観察される。

図 3. 正常膠細胞 (酵素免疫電顕)

- a. S-100 蛋白 α 鎖
陽性反応は細胞質にびまん性に認められ、核質にも観察される。
ミトコンドリアや粗面小胞体の外膜に一致して陽性反応が認められる。
N: 核, m: ミトコンドリア, r: 粗面小胞体, Bar: 1 μ

- b. S-100 蛋白 α 鎖, 血管周囲の膠細胞突起内に陽性反応が観察される (矢印).
c : 血管内腔, e : 血管内皮細胞, Bar:1 μ
- c. S-100 蛋白 β 鎖
陽性反応は細胞質にびまん性に認められ, 核質は塊状の陽性反応が観察される。核小体は陰性である。
ミトコンドリアや粗面小胞体の外膜に一致して陽性反応が観察される。
N : 核, n : 核小体, m : ミトコンドリア, r : 粗面小胞体, Bar:1 μ
- d. S-100 蛋白 β 鎖
血管周囲の膠細胞の突起内にびまん性に陽性反応が観察される (矢印).
c : 血管内腔, e : 血管内皮細胞, Bar:1 μ

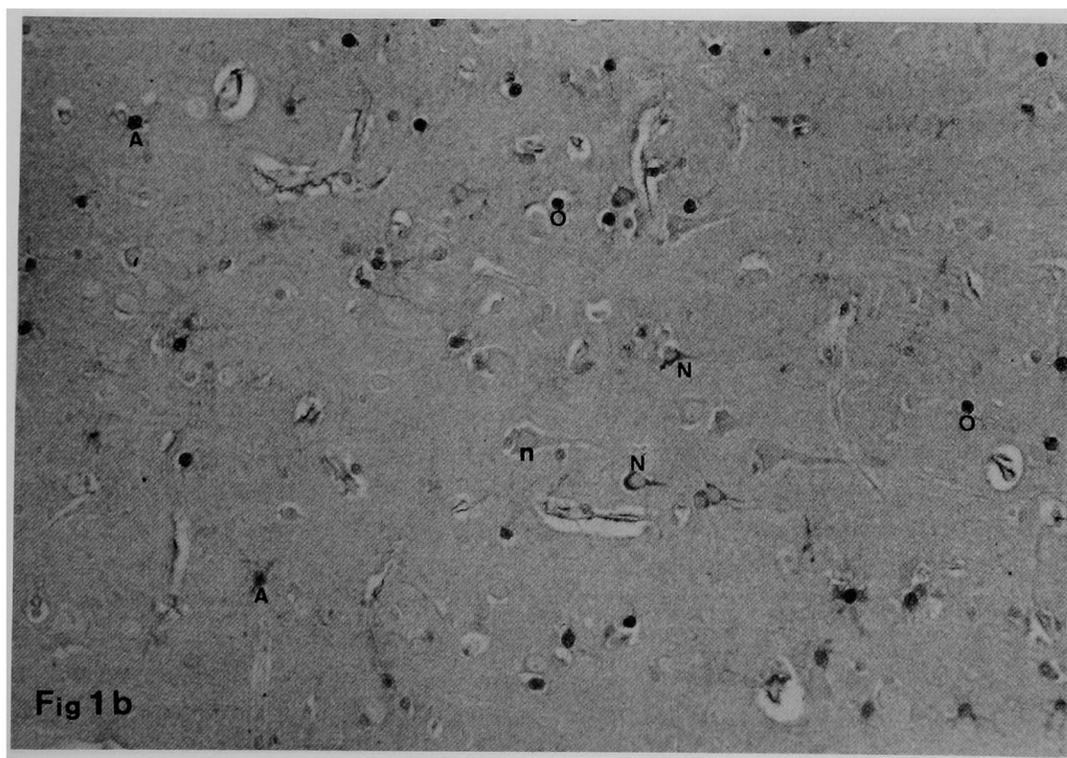
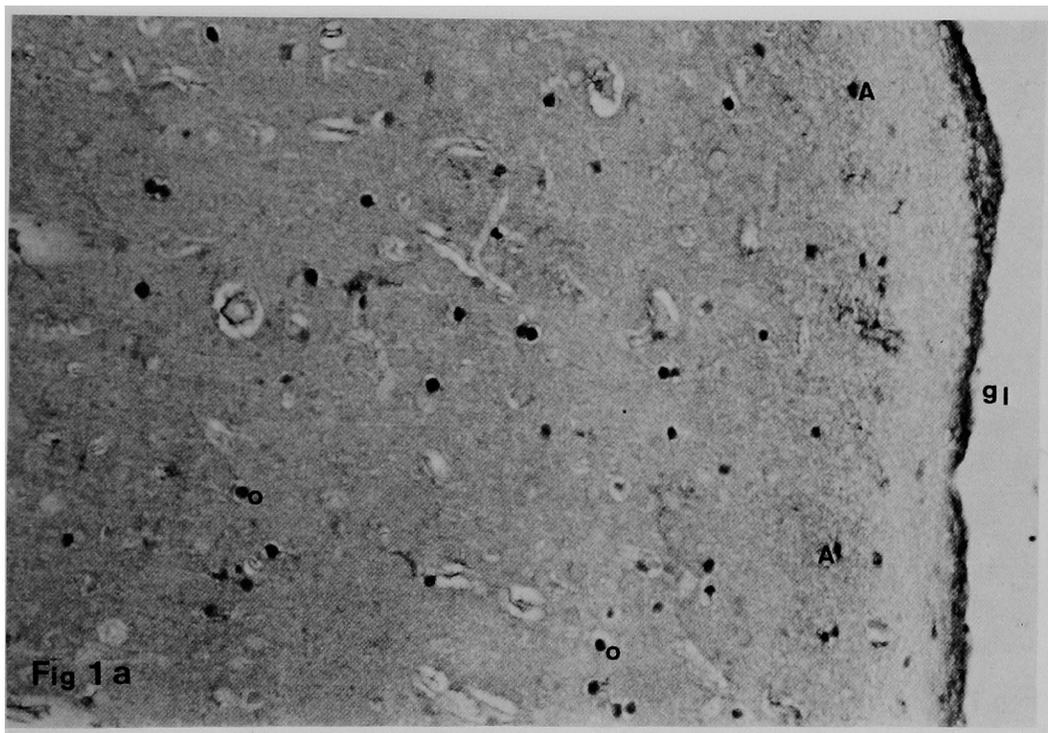
図 4. 正常神経細胞 (酵素免疫電顕)

- a. S-100 蛋白 α 鎖
陽性反応は主に細胞質にびまん性に認められ, 核質には塊状に観察される。核小体は陰性である。
ミトコンドリアや粗面小胞体の外膜に一致して陽性反応が観察される。
N : 核, n : 核小体, m : ミトコンドリア, r : 粗面小胞体, Bar:1 μ
- b. S-100 蛋白 α 鎖
神経細胞によってはほとんど陽性反応の認められないものもある。
樹状突起と思われる部に陽性反応が観察される (矢印).
N : 核, n : 核小体, L : リポフスチン, Bar:1 μ

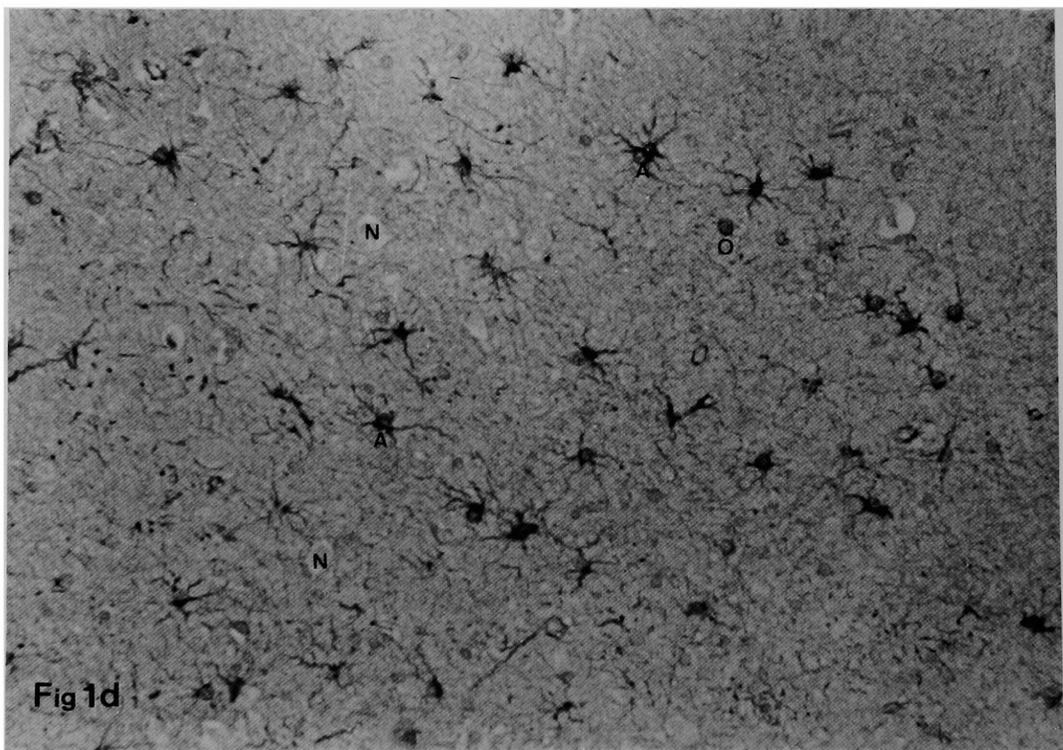
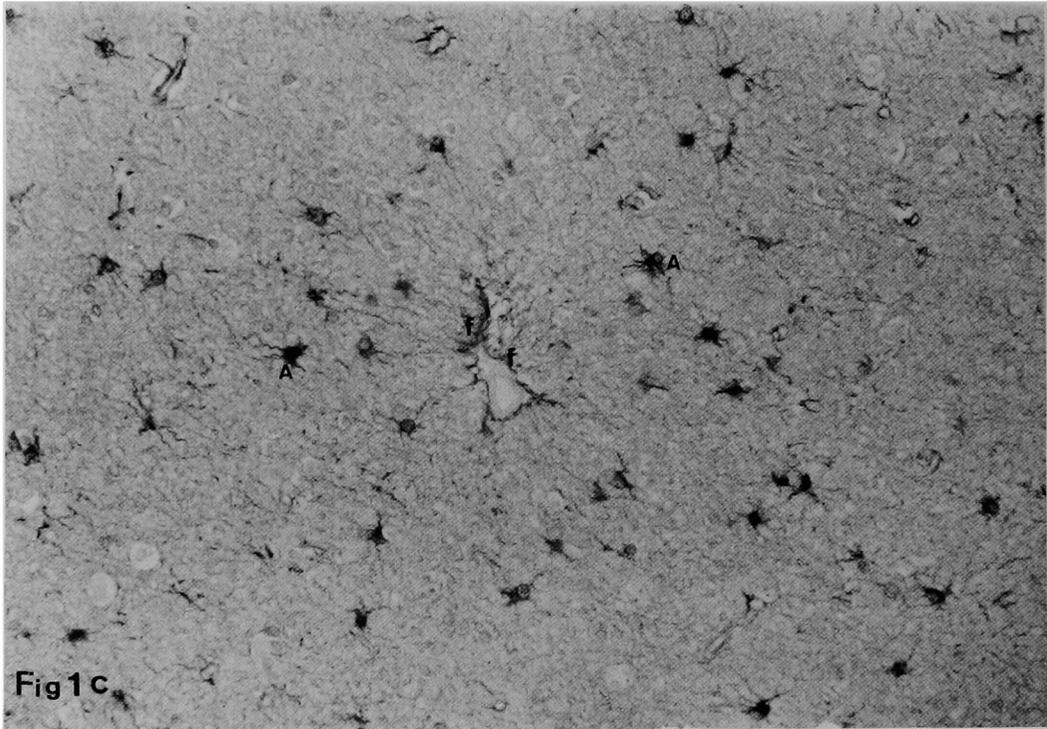
図 5. 膠芽腫細胞 (酵素免疫電顕)

- a. S-100 蛋白 α 鎖
陽性反応は細胞質にびまん性に観察され, 核質, 核小体の周囲にも認められる。また, ミトコンドリアや粗面小胞体の外膜や, 外核膜に一致して陽性反応が観察される。
N : 核, n : 核小体, m : ミトコンドリア, r : 粗面小胞体, om : 外核膜, Bar:1 μ
- b. S-100 蛋白 α 鎖
細胞質にグリアフィラメントと思われる中間線維の観察される細胞があるが, フィラメントに一致した陽性反応は認められない。
m : ミトコンドリア, f : グリアフィラメント, Bar:1 μ

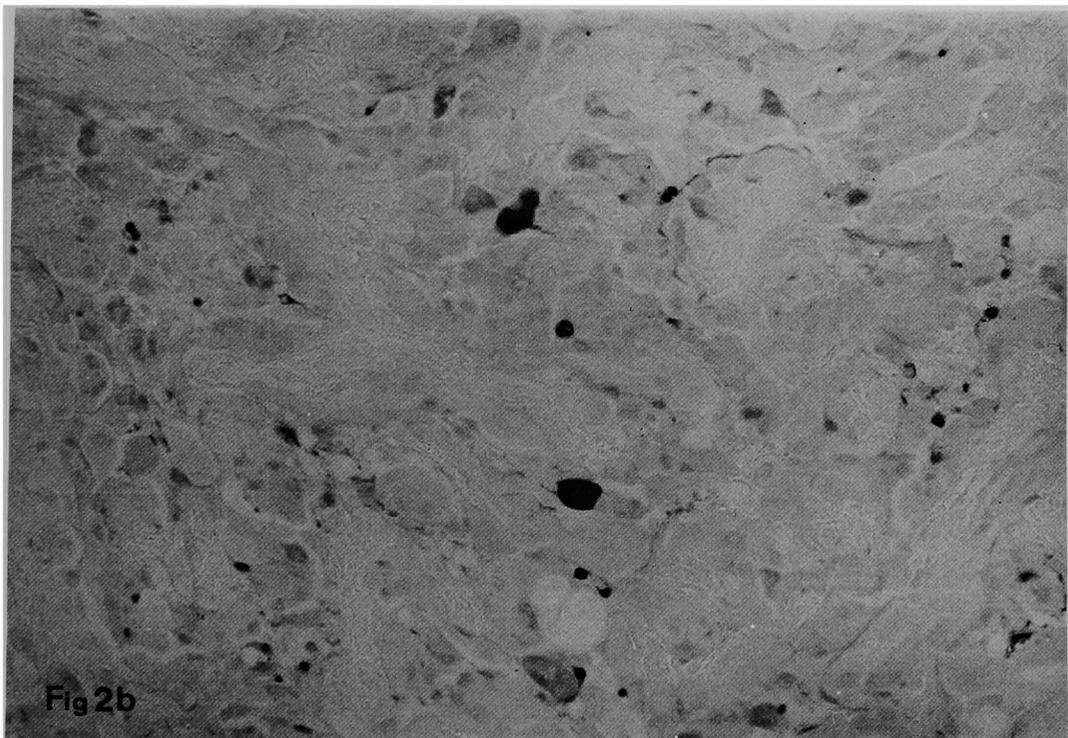
福岡 高宏 論文 附 図



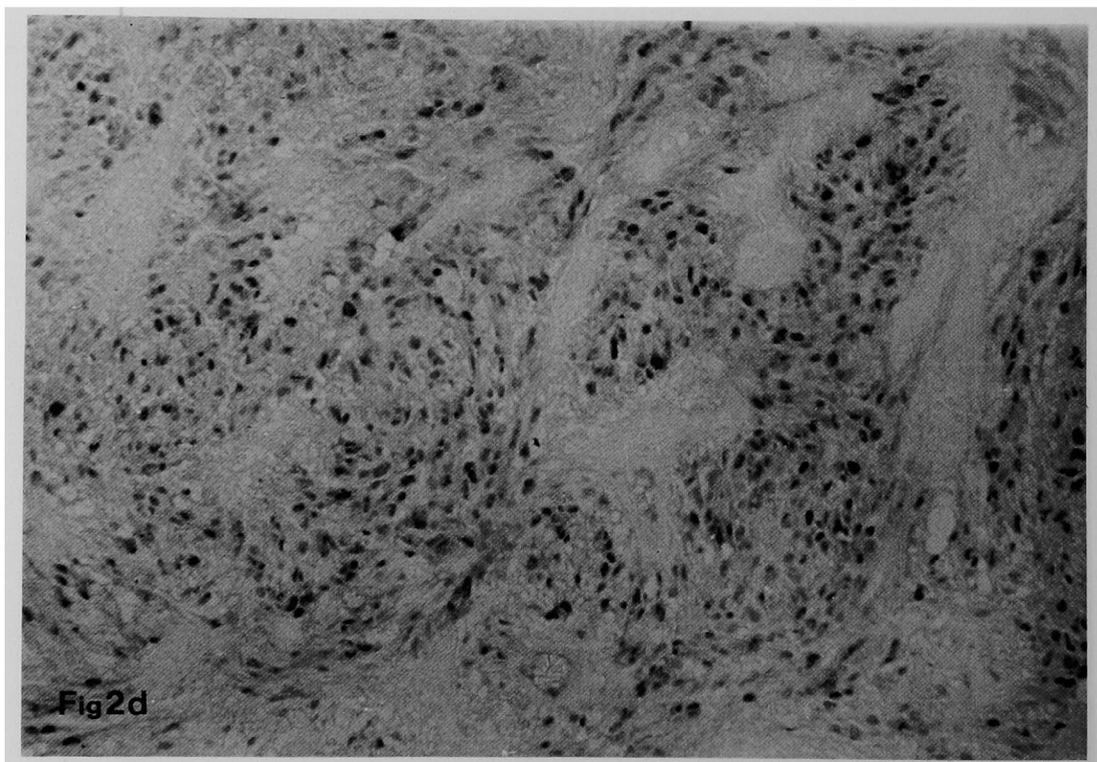
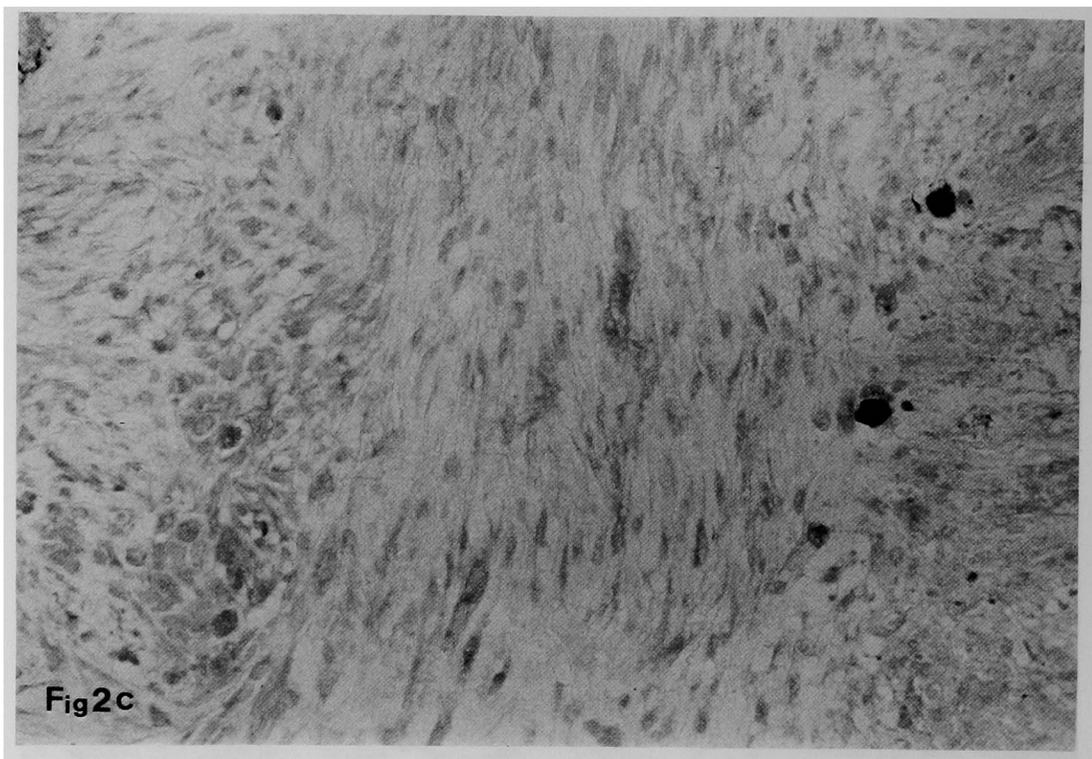
福 岡 高 宏 論 文 附 図



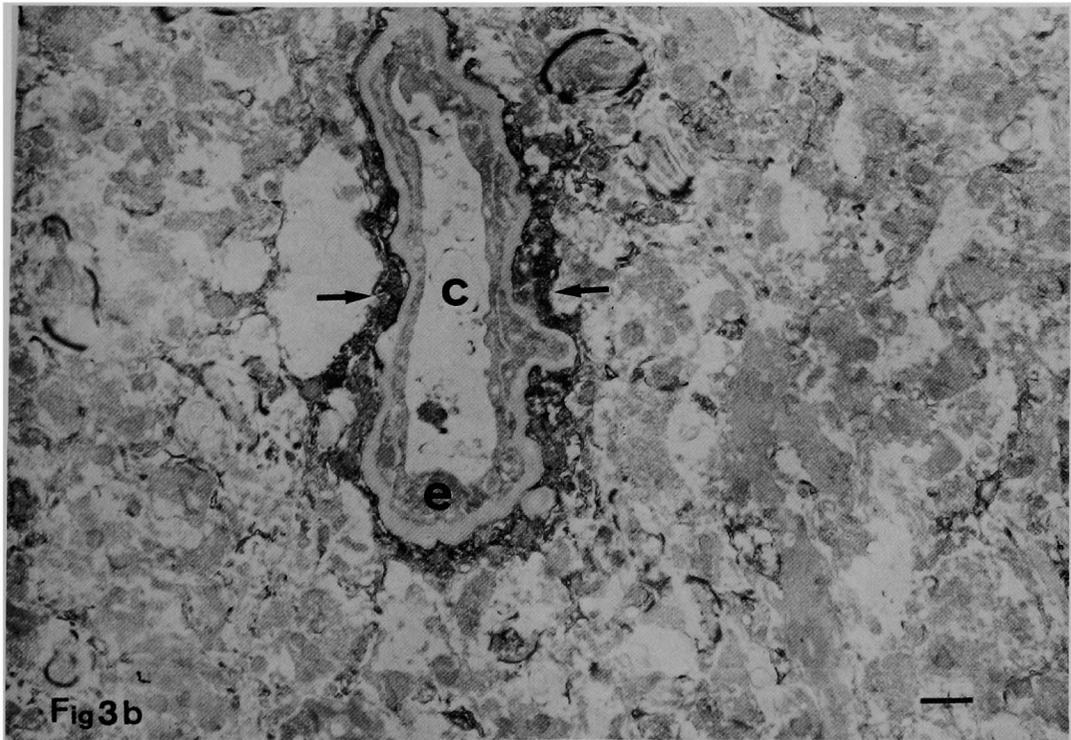
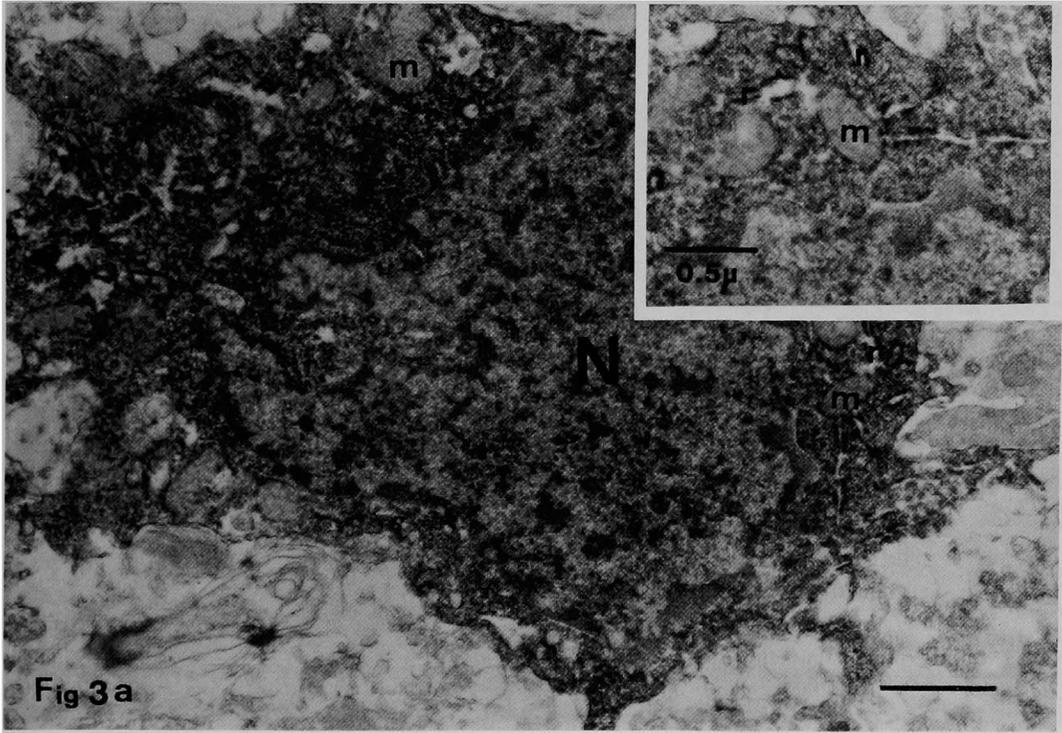
福岡 高宏 論文 附 図



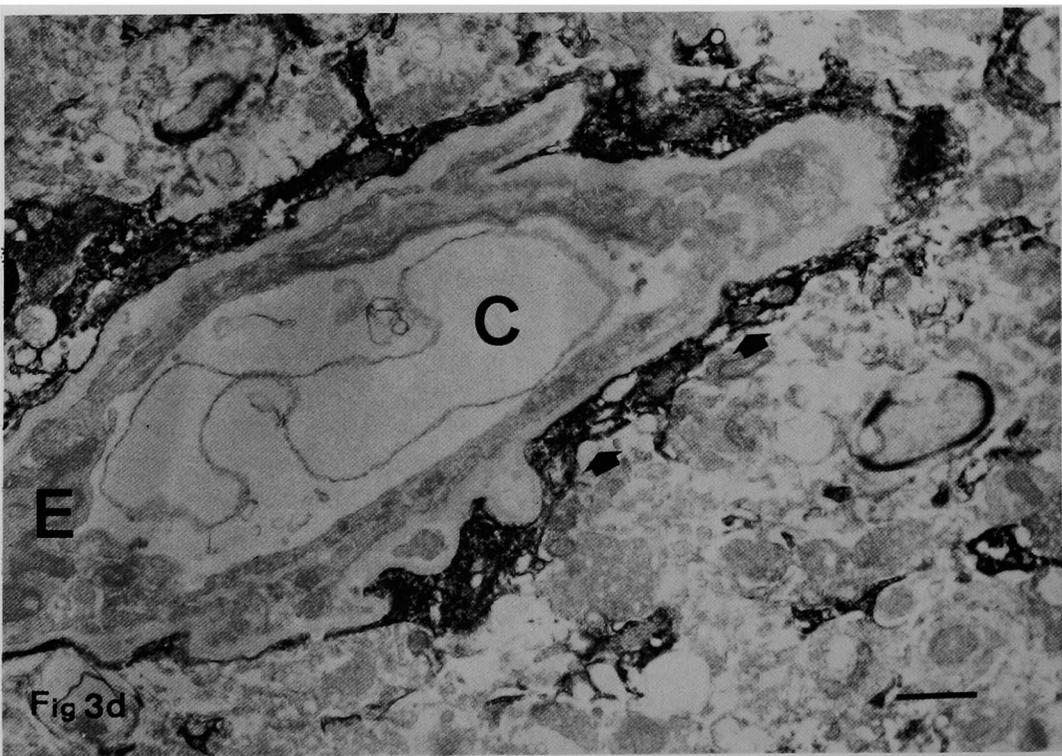
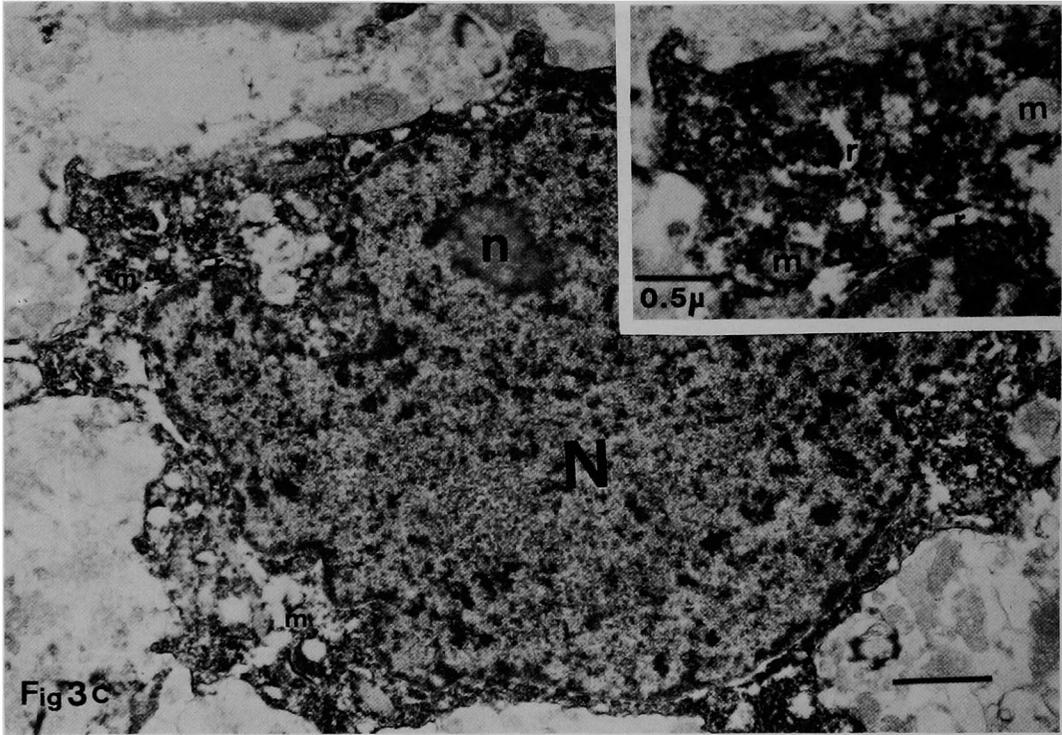
福 岡 高 宏 論 文 附 図



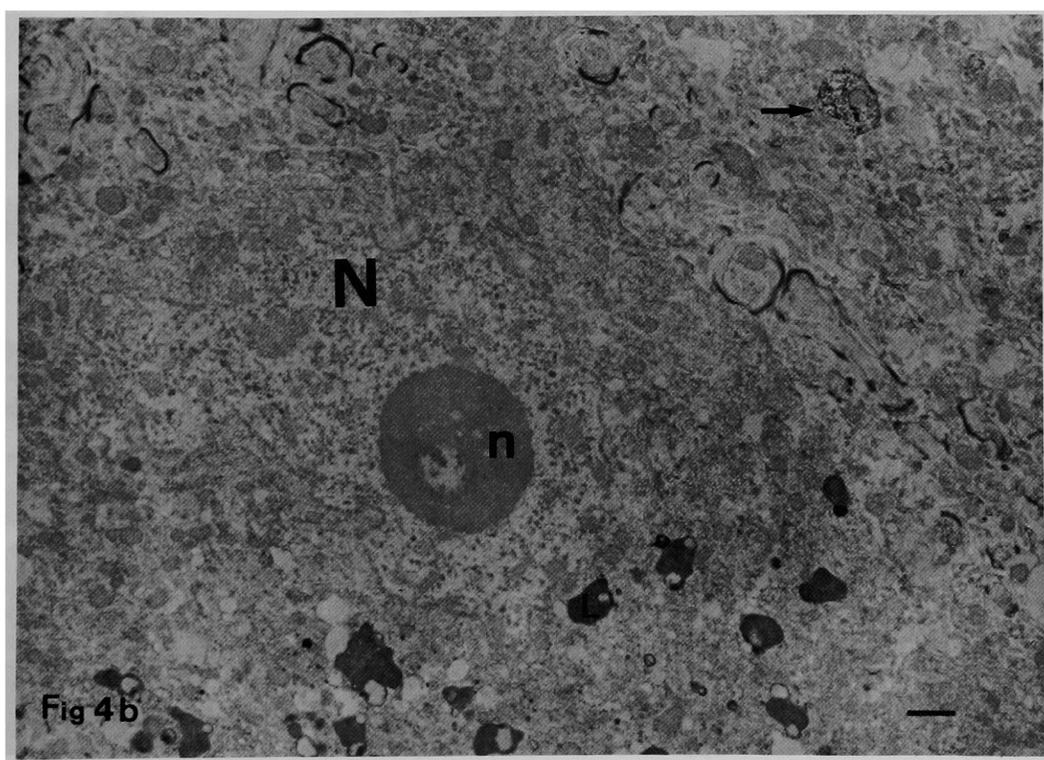
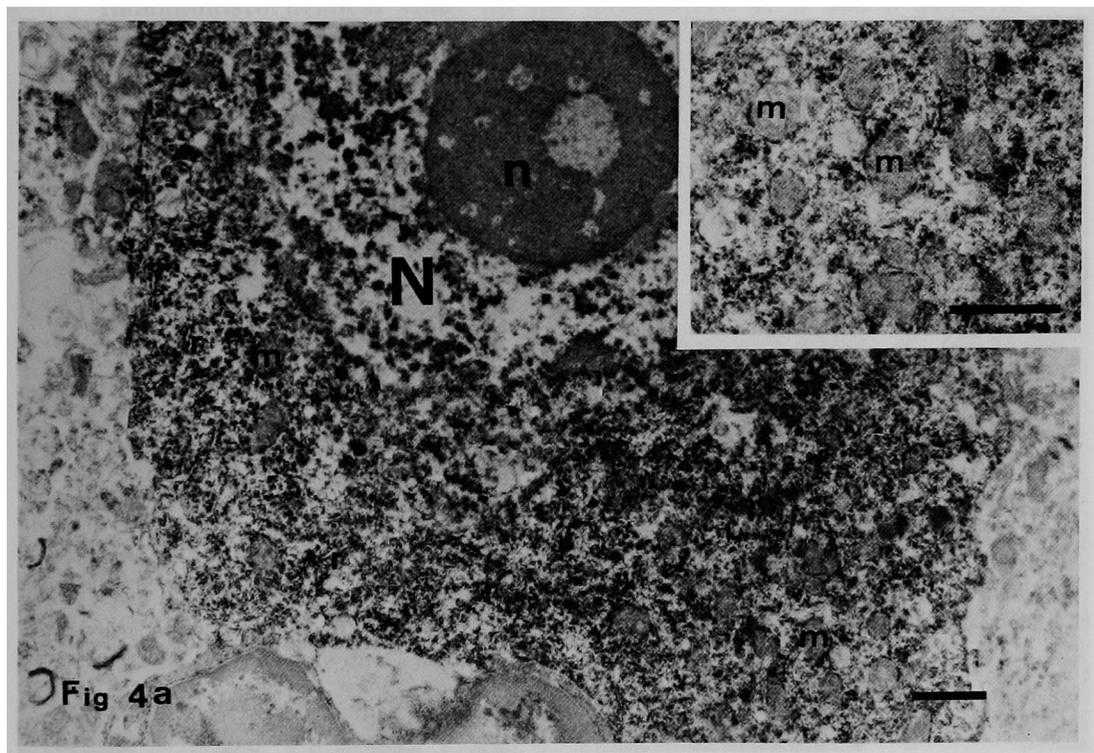
福岡高宏論文附図



福岡高宏論文附図



福岡高宏論文附図



福 岡 高 宏 論 文 附 図

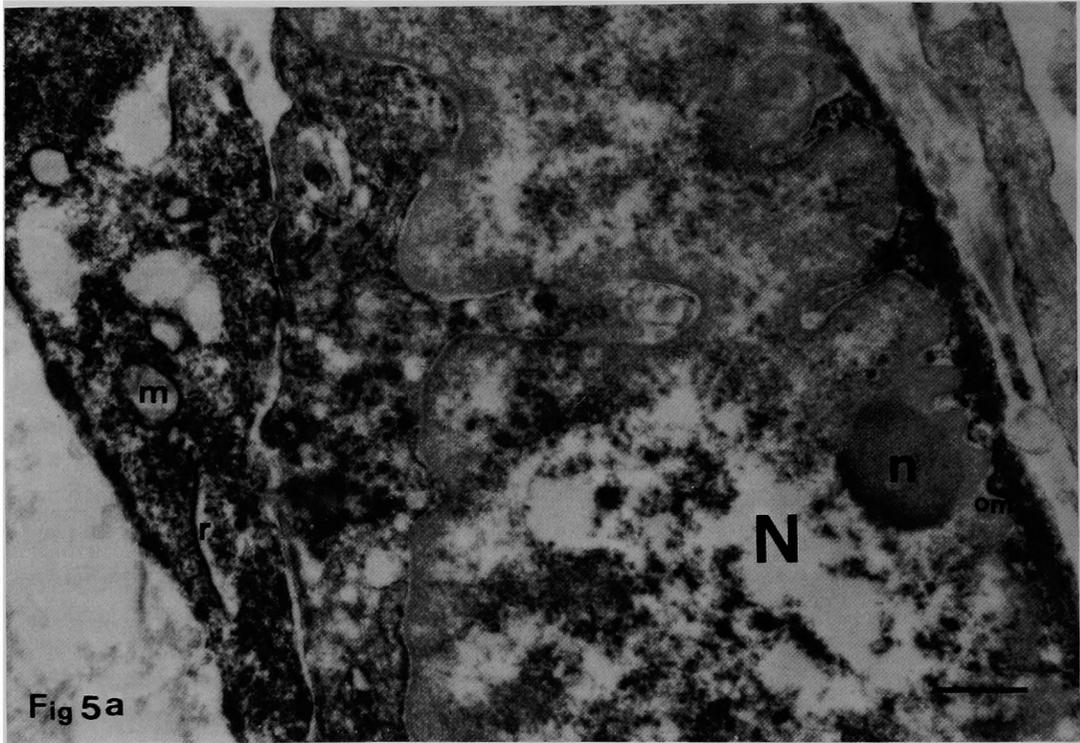


Fig 5a

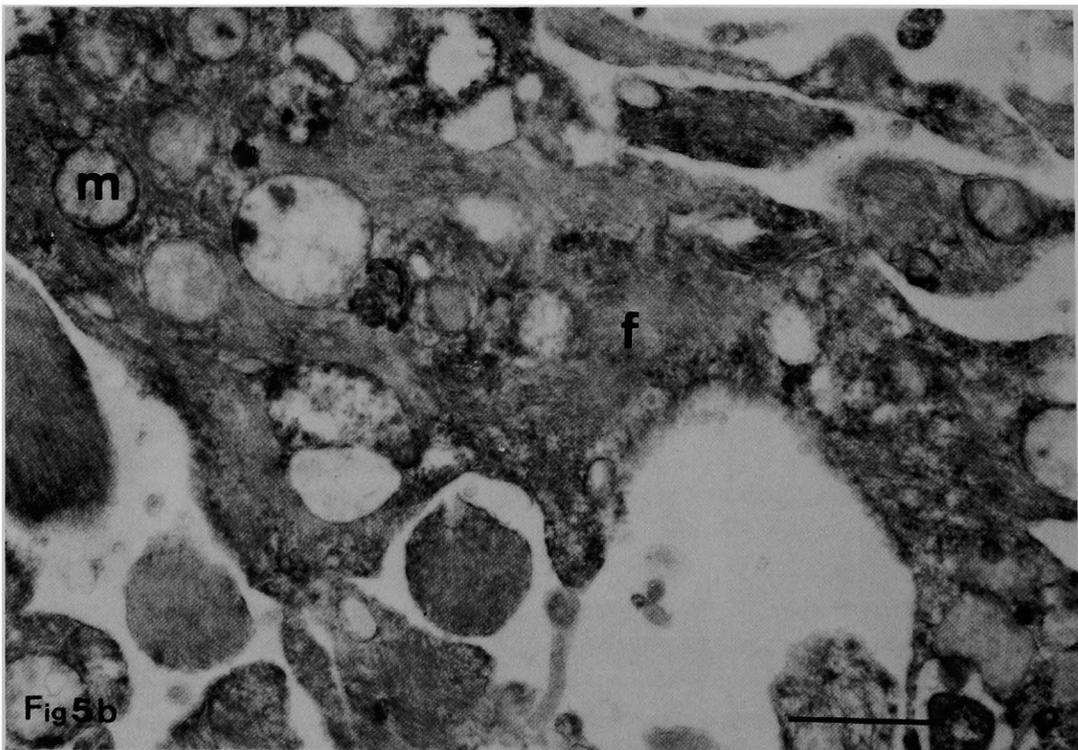


Fig 5b

**Immunohistochemical study on the localization of α and β subunits
of S-100 protein in normal human brain and glioblastoma tissues.**

Takahiro FUKUOKA

Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. A. Nishimoto)

The author studied the immunohistochemical localization of alpha and beta subunits of S-100 protein in normal human cerebral and glioblastoma tissues by an indirect immunoperoxidase method. The glial cells including astrocytes and oligodendrocytes showed positive staining for both alpha and beta subunits of S-100 protein, however, the neurons revealed positive staining for alpha subunit only. The positive staining for both alpha and beta subunits of S-100 protein was revealed in one case of 6 glioblastomas examined and the positive staining for either alpha or beta subunit in three cases. The other 2 cases showed no positive staining. By immunoelectron microscopy, the glial cells revealed positive reaction product for both alpha and beta subunits of S-100 protein throughout the cytoplasm. Occasionally, the positive reaction products for both alpha and beta subunits were observed in the glial nucleoplasm and outer membrane of cell organelles including rough endoplasmic reticulum. The subcellular localization of alpha subunit of S-100 protein in the neurons and glioblastoma cells is basically similar to that of the glial cells. The immunoelectron microscopic study of the subcellular localization of S-100 protein subunits seems to be one of the useful methods in assuming the biological role of S-100 protein.