

〔総説〕 松本歯学 21 : 1 ~ 13, 1995

key words : catechol-O-methyltransferase — immunocytochemistry — oral tissue

カテコール-O-メチル基転移酵素の免疫組織学的局在 — 口腔組織との関連 —

井上勝博

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 顎・口腔形態機能研究部門

Immunocytochemical Localization of Catechol-O-Methyltransferase with Special Reference to Oral Tissue

KATSUHIRO INOUE

*Laboratory of Oral Structure and Function, Institute for Dental Science, Matsumoto Dental college
(Chief : Prof. K. Inoue)*

Summary

Catechol-O-methyltransferase (COMT) catalyzes the transfer of a methyl group from S-adenosyl-L-methionine to one of the phenolic hydroxyl groups of a variety of catechols. This O-methylation reaction is important in the enzymatic inactivation of circulating catecholamines, the enzymatic inactivation of 2-hydroxyestrogens, the detoxification of xenobiotic catechols and the local inactivation of catecholamines released as transmitters from the terminals of both central and peripheral catecholamine-containing neurons. Many studies have shown that COMT is widely distributed in animals' tissues with the highest levels present in liver and kidney. COMT is an intracellular enzyme that is present predominantly in a soluble form with lesser amounts bound to membrane or microsomal fraction. Several specific antibodies to COMT have been available. Those permit us to examine the localization of COMT in the various organs of animals. COMT-positive cell was observed in the adrenal gland, brain, dental pulp, ductus deferens, gastrointestinal tract, eye, kidney, sublingual gland, liver, lymph node, mammary gland, ovary, oviduct, pancreas, parotid gland, pituitary gland, seminal vesicle, spinal cord, spinal ganglia, spleen, submandibular gland, sweat gland, thymus and uterus. COMT-positive reaction product in reactive cells was diffusely present throughout their cytoplasm, but was absent from the nucleus. In the rat salivary gland, the myoepithelial and striated duct cells contained COMT. COMT was present in the macrophages like cells in the rat dental pulp. The possible functions of COMT *in vivo* have become more apparent with the expanding knowledge of the specific cellular localization.

はじめに

カテコール-O-メチル基転移酵素（以下 COMT と略す）はカテコールアミン（ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンなど）の代謝酵素で、1958年に Axelrod により発見され、肝臓の可溶性分画から精製された (Axelrod and Tomchick, 1958)⁶⁾。COMT はカテコールの2つの水酸基のひとつに S-adenosyl-L-methionine からメチル基を移す酵素である (Fig. 1)。その後1970年に Axelrod はカテコールアミンの研究に対してノーベル医学生理学賞を受けたが、その受賞講演で1955年に National Institutes of Health (NIH) の研究者になったとき、何をすべきか考えて、文献を読んでいるうちに、カテコールアミンの代謝に関してほとんど判っていないことに驚き、それが研究のきっかけになったと述べている (Axelrod, 1971)⁷⁾。研究テーマとの出会いは色々だが、私の場合は千葉大に在職していたとき、第二解剖学講座の永野教授の紹介で1975年に NIH に留学し、そこではじめて COMT と免疫組織学にかかわるようになった。それまで自律神経の実験組織学的な仕事をしてきたので、このテーマは自分にとって初めての分野であった。

1970年の Axelrod の受賞講演で COMT について明らかになっていることは次の通りであった。1) 分子量はおよそ24 kDa である。2) 電気泳動で少なくとも二つの形に分けられる。3) COMT は哺乳動物以外にも植物にも存在する。動物の組織では肝臓と腎臓で最も高い活性を示し、脳にも存在した。4) COMT は主として細胞の可溶性分画にあるが、少量ではあるが、脂肪細胞の

膜、ミクロゾーム分画にも存在した。5) COMT は主として神経細胞の外でカテコールアミンに働くが、少量の COMT は瞬膜と精管の交感神経内にも存在する。

COMT に関する総説はすでにいくつかあるので (Flohe, 1974, Guldberg and Marsden, 1975, Thakker and Creveling, 1990, Tilgmann, 1993, Creveling and Thakker, 1994)^{19,22,24,60,61)}、1970年の Axelrod の受賞講演以降の研究の流れを免疫組織化学的な所見をもとにしてたどってみたい。カテコールアミンを基質として、種々の臓器における COMT の活性を調べると、多くの臓器に COMT が存在することが明らかになった (前記の総説参照)。しかしながら、COMT を組織化学的に染める方法がなかったため、各臓器のどの細胞に COMT が存在するのか、あるいは COMT は細胞外の酵素なのかを決めるのは、免疫組織化学的方法によらなければならなかった。1977年に井上等 (Inoue et al., 1977)³⁵⁾によって初めて、COMT の免疫組織化学的局在が報告された。初めに今迄どのような抗体が報告されているかを見てみたい。

1. COMT に対する抗体 (Table 1)

(Assicot and Bohuon 抗体—Assicot and Bohuon, 1969)⁴⁾

1969年に初めてラット肝臓のホモジネートの上清から450倍に精製された COMT にたいするウサギポリクローナル抗体が作られた。この抗体はラット、モルモット、ネコ、ヒトの COMT の活性を抑制したが、ウシ、ウサギの COMT は抑制しなかった。組織としては、ラットの肝臓、脾臓、肺、脳、心筋と、ヒトの肝臓、癌組織の neuroblastoma、

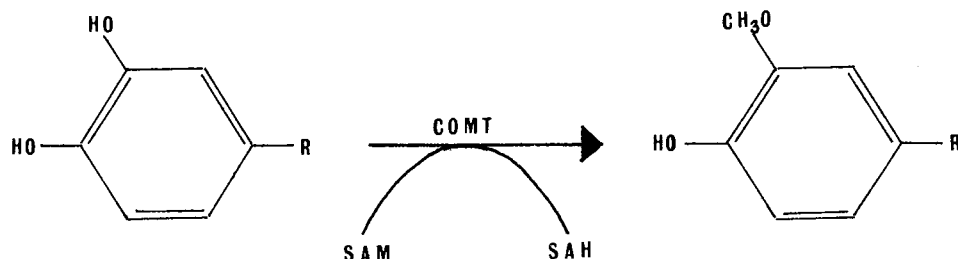


Fig. 1. The enzymatic reaction of catechol-O-methyltransferase (COMT). SAM, S-adenosyl-methionine; SAH, S-adenosyl-L-homocysteine.

Table 1. COMT antisera used in studies

Antiserum	Host	Antigen
Assicot and Bohuon (1969) ⁴⁾	Rabbit	Rat liver soluble COMT
Creveling et al. (1973) ²⁰⁾	Rabbit	Rat liver soluble COMT
Gulliver and Tipton (1979) ²⁵⁾	Rabbit	Pig liver soluble COMT
Veser and Martin (1986) ⁶⁸⁾	Rabbit	Rat liver soluble COMT
Bertocci (1990) ¹¹⁾	Mouse	Pig liver soluble COMT
Tilgmann (1993) ⁶¹⁾	Rabbit	Rat liver soluble COMT
	Rabbit	Rat recombinant soluble COMT
	Guinea pig	Rat recombinant soluble COMT
Karhunen et al. (1994) ⁴⁷⁾	Guinea pig	Rat recombinant soluble COMT
Kastner et al. (1994) ⁴⁸⁾	Rabbit	Pig liver soluble COMT

pheochromocytoma の COMT の活性を抑制した。興味深いことに脳の COMT の活性の抑制は他の器官の半分であった。しかしこの抗体は免疫組織学には使われなかった。

(Creveling 抗体—Creveling et al., 1973)²⁰⁾

その後ラット肝臓の可溶性 COMT に対する抗体が得られた。Creveling 等はラット肝臓から精製した分子量 23 kDa の COMT を抗原としてウサギに打ち、抗体を得ている。この抗体とラット肝臓の可溶性 COMT の間には免疫電気泳動で 3 本の沈降線が得られていることから、分子量 23 kDa の COMT の他にあと 2 種類の COMT があると考えられた。この抗体はラット、マウス、モルモットと交叉反応を示した。ラットの肝臓、腎臓、心臓、血管、脳の COMT と交叉反応があったが、サル、ネコ、イヌ、ヒトの肝臓の COMT とは交叉反応を示さなかった。興味あることに、齧歯類のマイクロゾーム COMT (膜結合 COMT) の活性がこの抗体によって抑制されたことである。膜から遊離された COMT は可溶性 COMT と同じであることが示唆された。その後、この抗体はラットの脈絡叢の COMT とも交叉反応があることが報告された (Kaplan et al., 1980)⁴⁴⁾。さらにこの抗体は免疫学的に詳しく調べられた (Grossman et al., 1985)²⁶⁾。その結果ラットの肝臓から精製した分子量 23 kDa の COMT を抗原として得られた抗体はラットの肝臓、心臓、下垂体、小脳、大脳皮質、area postrema、腎臓、副腎、視床下部のホモジネート内の、分子量 23 kDa, 26 kDa, 66 kDa の COMT と反応した。その反応は分子量 23 kDa が最も高く、その次が 26 kDa であった。またミトコンドリア分画の分子量 26 kDa の COMT と反応したので、この分子量の COMT が膜結合

COMT に相当するとされた。ラット肝臓内の COMT の活性は 90% 以上が可溶性分画にあった。COMT にいくつかの形のあることを明らかにした。

(Gulliver and Tipton 抗体—Gulliver and Tipton, 1979)²⁵⁾

精製したブタ肝臓の COMT を抗原として、ウサギに免疫し抗体を得ている。この抗体は COMT とは沈降反応を示さなかったが、活性は抑制した。ブタ肝臓の COMT は抗原性が低いと述べている。

(Veser and Martin 抗体—Veser and Martin, 1986)⁶⁸⁾

そのほかラット肝臓の可溶性分画から COMT を精製しそれを抗原としてウサギに免疫した抗体が得られている。この抗体の特異性はラット肝臓の COMT の活性を抑制することで確かめられた。

(Kastner 抗体—Kastner et al., 1994)⁴⁸⁾

また最近では、ブタの肝臓から精製した COMT を抗原としてウサギに免疫した抗体も報告されている。この抗体はブタ肝臓の分子量 25 kDa と 28 kDa の両方の COMT と反応した。これらはそれぞれ可溶性 COMT と膜結合 COMT に対応すると考えられた。ところがヒト小脳のホモジネートでは分子量 27 kDa の COMT と反応した。COMT の分子量はブタよりヒトの方が高いのでこの反応したバンドは可溶性に相当し、膜結合 COMT の方は反応するのに十分な量がなかったとされた。

(Tilgmann 抗体—Tilgmann, 1993)⁶¹⁾

3 種類の抗体を作成し比較している。抗原としてラット肝臓の可溶性 COMT と合成したラットの可溶性 COMT をウサギに免疫してえた抗体

(それぞれ AS I と AS II とする), また合成したラットの可溶性 COMT をモルモットに免疫してえた抗体 (AS III) の 3 種である. このうち AS I は可溶性 COMT とだけ反応し, AS II と AS III は可溶性と膜結合 COMT の両者と反応した. 3 種のうち, 免疫組織学的に陽性反応を示したものは AS III のみであった. AS III は次に述べる Karhunen 抗体である.

(Karhunen 抗体—Karhunen et al., 1994)⁴⁷⁾

大腸菌内で合成したラット可溶性 COMT を抗原としてモルモットに免疫した抗体も報告された. この抗体はラットの肝臓, 腎臓, 肺, 胃, 小腸, 副腎, 脾臓, 脳, 下垂体の可溶性 COMT (分子量 24 kDa) と肝臓, 腎臓, 脳, 小腸の膜結合 COMT (分子量 28 kDa) の両方と反応した.

(Bertocci 抗体—Bertocci et al., 1990, Bertocci et al., 1991)^{11,12)}

今迄の抗体はいずれもポリクロナール抗体であるが, 1990年に Bertocci 等はブタ肝臓の可溶性 COMT に対する 3 種類のマウスモノクロナール抗体 (Co 16, Co 54, Co 60) を作成した. これらのモノクロナール抗体の反応は動物によって違っていた. Co 16 と Co 54 はブタの可溶性 COMT とよく反応するのに対して, Co 60 はラット, ブタの可溶性 COMT と同じように反応した. Co 16 はブタ可溶性 COMT のほかにブタ膜結合 COMT も認識した. Co 60 はラット可溶性 COMT と膜結合 COMT の両者を認識した. このことは可溶性 COMT と膜結合 COMT は別々のエピトープを持つことを示している.

今までいくつかのポリクロナール, モノクロナール抗体が報告されてる. 抗原としてはラットの肝臓の可溶性 COMT が多く使われているが, 報告者によって結果はかならずしも一致していない. 抗原とした COMT の精製の程度も問題になるであろう. また Gulliver and Tipton (1979)²⁵⁾ や Tilgmann (1993)⁶¹⁾ が指摘しているように, 免疫する動物によって抗体価の違いがあるものと思われる. 残念ながら, いまのところ可溶性 COMT と膜結合 COMT をそれぞれ区別して認識するモノクロナール抗体も得られていない. ここで可溶性 COMT と膜結合 COMT について簡単に触れてみたい.

2. 可溶性 COMT と膜結合 COMT

Axelrod (1971)⁷⁾ が触れているように, COMT には少なくとも二つの形で組織内に存在する, 即ち, ホモジネートの可溶性分画にある可溶性 COMT とマイクロゾーム分画にある膜結合 COMT である. 二つの形は, 脳 (Borchardt and Cheng, 1978; Roth, 1980)^{14,56)}, 心臓 (Borchardt and Cheng, 1978)¹⁴⁾, 肝臓 (Tong and D'Iorio, 1977, Grossman et al., 1985)^{26,64)}, 赤血球 (Assicot and Bohuon, 1971)⁵⁾ など種々の組織, 動物で報告されている. 可溶性 COMT が活性の大部分を占め, 膜結合 COMT の活性は小さい (Guldberg and Marsden, 1975)²⁴⁾. 二つの COMT は生化学的にも, 免疫学的にも多くの点で共通性がある (Jefery and Roth, 1984; Grossman et al., 1985)^{26,40)}. しかし膜結合 COMT は可溶性 COMT よりカテコールに対する親和性が高い (Assicot and Bohuon, 1971, Rivett et al., 1982, Roth, 1992)^{5,54,57)}. また可溶性 COMT が非神経組織に存在するのに対して, 膜結合 COMT は主にニューロン内にあるとされている (Rivett et al., 1983)⁵⁵⁾. また分子量もラットでは可溶性 COMT が 24 kDa, 膜結合 COMT が 28 kDa とされている (Grossman et al., 1985; Bertocci et al., 1990, 1991)^{11,13,26)}. ラット肝臓, ヒトの胎盤からの可溶性 COMT の分子量はそれぞれ 24 kDa と 25 kDa であることが確認された (Tilgmann and Kalkkinen, 1990, 1991)^{62,63)}. 二つの COMT は単独のメセンジャー RNA から産み出され, 膜結合 COMT は可溶性 COMT の全構造を含み, さらに 43 (ラット) あるいは 50 (ヒト) のアミノ酸が可溶性 COMT の N 末端基に付加していることが明らかになった (Salminen et al., 1990; Bertocci et al., 1991; Lundstrom et al., 1991)^{13,51,58)}. 酵素活性を持つ合成ラット可溶性 COMT, ヒト胎盤の可溶性 COMT も報告され, 膜結合 COMT との違いも明らかにされつつある (Tilgmann, 1993)⁶¹⁾. 以上のように膜結合 COMT が可溶性 COMT とは構造, 分布, 働きにかなりの違いがある (Roth, 1992)⁵⁷⁾. 次に免疫組織学的に COMT の組織内, 細胞内の局在がどのように明らかにされてきたかを見てみる.

3. COMT の免疫組織化学的局在 (Table 2)

免疫組織学に使用される抗体は, 特異性, 抗体価の高いことが望ましいのは言うまでもない. 前述したように COMT に対する抗体はポリクロ

Table 2. Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in various organs

Organ	Species	Cellular location	Reference
Adrenal gland	Rat	Cell of the zona glomerulosa	47
Brain	Rat	Ventricular ependymal cell, cells of the	
	Chinchillas,	choroid plexus, oligodendrocyte,	
	Cattle	astrocyte, Bergmann cell	
	Rat	Cell of pia-arachnoid	45, 47
	Rat	Neuroglia in circumventricular organs	46, 47
	Human	Neuron, glial cell and cell of blood vessel	48
		of the striatum and midbrain	
	Rat	Endothelial and outer layer cells of artery,	47
		striatal neuropil, neuropil of frontal and	
		piriform cortex, tanycyte	
Dental Pulp	Rat	Macrophage	34
Ductus deferens	Rat	Epithelial cell	35
Gastrointestinal tract	Rat	Epithelial cell	47
Eye	Rat	Ciliary epithelium	45, 47
	Rat	Ganglion cells in retina	47
Kidney	Rat	Cell of proximal and distal convoluted	35, 47, 48
		tubule	
Sublingual gland	Rat	Cell of collecting duct	47, 48
	Rat	Myoepithelial cell, small basal cell, stri-	27
		ated duct cell	
Liver	Rat	Hepatocyte	35, 47, 48, 68
Lymph node	Rat	Reticular cell, macrophage	29, 35
Mammary gland	Mouse, Rat	Ductal epithelial cell, endothelial cell lin-	3
		ing blood vessel, fibroblast	
Ovary	Rat	Macrophage	30
Oviduct	Rat	Epithelial cell	30, 35
Pancreas	Rat	Islets of Langerhans	35, 47
Parotid gland	Rat	Striated duct cell, myoepithelial cell	28, 35
Pituitary gland	Rat	Pituitary cell, cleft cell	47
Seminal vesicle	Rat	Round basal cell	35
Spinal cord	Rat	Gray matter	47
Spinal ganglia	Rat	Small sensory neuron	47
Spleen	Rat	Reticular cell, macrophage	29, 35, 47
Submandibular gland	Rat	Myoepithelial cell, duct cell	27, 47
Sweat gland	Rat	Myoepithelial cell	35
Thymus	Rat	Epithelial reticular cell	29, 35
Uterus (pregnant)	Rat	Epithelial cell, Decidual cell	31, 35, 36

ナル, モノクロナールを含めて 8 種類報告されているがそのうち免疫組織学に使用されたのは 5 種類である (Creveling et al., 1973; Veser and Martin, 1986; Tilgmann, 1993; Kastner et al., 1994; Karhunen et al., 1994)^{20,47,48,61,68}). COMT 活性は幅広く動物の組織に認められ, 特に肝臓, 腎臓は高い活性を示すが, 種, 系統によっても違いがある (Guldborg and Marsden, 1975; Kopin, 1985; Thakker and Creveling, 1990; Creveling and Thakker, 1994 の総説を参照)^{19,24,49,60}).

Axelrod (1971)⁷⁾ は Fig. 2 のように交感神経終末から放出されたノルアドレナリンは Effector cell 内の COMT か肝臓の COMT によって分解されるとしている. 多くの薬理学の本では中枢神経では Fig. 3 のように COMT は存在すると考えられている. それでは免疫組織学的所見はどうだろうか. Creveling 抗体 (Creveling et al., 1973, Grossman et al., 1985)^{20,26)} を用いて, ラットの種々の器官内の COMT 含有細胞の所在が明らかにされた (Inoue, 1984, 1985; Inoue and Creve-

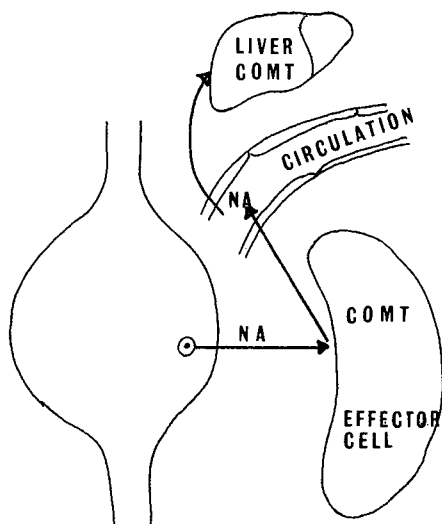


Fig. 2. Fate of noradrenaline (NA) at a varicosity of the sympathetic nerve terminal. COMT, catechol-O-methyltransferase. Modified from Axelrod (1971)⁷⁾.

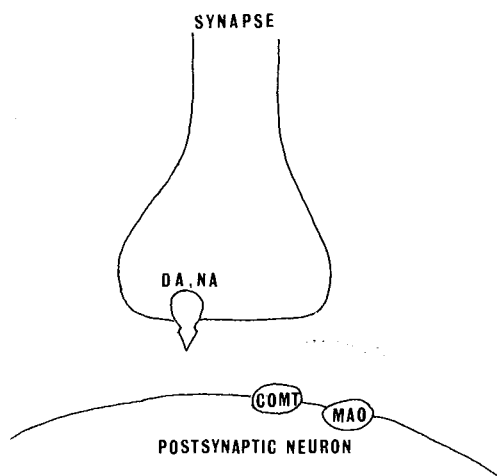


Fig. 3. Schematic model of central noradrenergic or dopaminergic neuron. DA, dopamine; NA, noradrenaline; COMT, catechol-O-methyltransferase; MAO, monoamine oxidase. Modified from Cooper et al (1971)¹⁷⁾.

ling, 1980, 1986, 1991 1993; Inoue et al., 1977, 1980, 1982, 1987, 1991)²⁷⁻³⁷⁾. COMT 陽性反応は肝臓、腎臓を初め、精管、リンパ節、卵管、膵臓、耳下腺、精囊、汗腺、胸腺、妊娠子宮などの細胞に認められた。陽性細胞内の COMT 反応産物は、核を除く細胞質に瀰漫性に存在した。Creveling 抗体を用いて、ラット、チンチラ、子牛の脳で、脳室の上皮細胞、脈絡叢の細胞、神経膠細胞、ラットの脳室周囲組織の細胞そして軟膜、クモ膜の細胞、毛様体上皮が染められた(Kaplan et al., 1979, 1981 a, 1981 b)^{43,45,46)}。正常な乳腺および乳癌の導管上皮も陽性であった(Amin et al., 1983, Amin and Ismail, 1983)^{2,3)}。培養細胞では、脳小血管内皮細胞と平滑筋細胞が染まった(Spatz et al., 1986)⁵⁹⁾。大動脈の内皮細胞と心筋細胞に COMT が存在した(Lowe and Creveling 1979)⁵⁰⁾。凍結切片を初め、パラフィン切片でも同じように染まり、COMT は神経細胞には存在せず、非神経細胞に存在した。

同じくラット肝臓の COMT を抗原とする Veser and Martin 抗体(Veser and Martin,

1986)⁶⁸⁾では、肝細胞にしかも免疫電顕の所見は COMT がグリコーゲン顆粒と密接な関係があるが、核、ミトコンドリア、小胞体は陰性反応であった。しかしながら、ラットの肝細胞内の COMT 反応産物は、核を除く細胞質に瀰漫性に存在した(Inoue et al., 1977; Karhunen et al., 1994; Kastner et al., 1994)^{35,47,48)}ことと、凍結切片によるラット歯髄のマクロファージの電顕所見(Inoue et al., 1991)³⁴⁾でも同じであったことは、エポソ包埋によって COMT の抗原性の一部が失われた可能性がある。

20年近く COMT は非神経細胞に存在する細胞内酵素と考えられてきた。しかしラット脳の線条体の破壊実験では膜結合 COMT は減少し、可溶性 COMT は増加したことから、膜結合 COMT は主としてニューロンに、可溶性 COMT はグリア細胞に存在すると想像された(Kaakola et al., 1987; Rivett et al., 1983)^{42,55)}。また哺乳動物の脳の細胞分画の研究も COMT が神経および非神経要素の両方に存在することを示唆していた(Alberici et al., 1965; Broch and Fonnum, 1972;

Garbarg et al. 1975; Jarrott 1971)^{1,16,23,39}。最近ブタの肝臓の COMT を抗原とする Kastner 抗体 (Kastner et al., 1994)⁴⁸ではヒトの脳が調べられ、神経細胞と血管壁の細胞に COMT が存在することが報告された。神経内に COMT が存在することの最初の報告であり、生化学的結果とも一致した。神経終末とシナプスを作る樹状突起が COMT 抗体に対して陽性であった。また Karhunen 抗体 (Karhunen et al., 1994)⁴⁷を用いてラットの器官が調べられたが、結果は Creveling 抗体の所見とほとんど同じで、多くの非神経細胞に COMT が存在した。しかし脳の neuropil と脊髄神経節の小ニューロンにも COMT は存在した。

今までの免疫組織学的所見は、COMT は神経細胞、非神経細胞の両方に存在することを示している。Creveling 抗体と Kaster 抗体、Karhunen 抗体との結果の違いは、免疫組織学的方法の違いというより、抗原、免疫動物、抗体価の違いによるものであろう。Kaplann 等 (1979)⁴³の報告のなかにも、神経細胞内の存在も否定できないと述べているように、Creveling 抗体には抗体価に問題があるのかもしれない。しかしながら、まだ免疫組織学的には、可溶性 COMT と膜結合 COMT は別々に染められてはいない。

4. 口腔内器官と COMT (Table 2)

いまだで口腔器官として COMT との関連が指摘されているのは大唾液腺と歯髄である。サルの耳下腺、顎下腺に COMT の活性があることが最初に報告された (Axelrod et al., 1959)⁹。In vitro で正常、萎縮、交感神経切除の唾液腺における catecholamine の代謝を調べた実験では、萎縮唾液腺において O-メチル化が劇的に減少するのが見られた (Jonason, 1969)⁴¹。萎縮した唾液腺では、神経組織は正常なので COMT は腺細胞に存在することになり、この所見が COMT が非神経組織に存在する根拠となった。その後、in vivo で同じような実験が行われたが、結果は Jonason (1969)⁴¹の結果とは違っていた。導管結紮では、COMT の活性は下がったが、交感神経切除でも同じように COMT の活性は下がった。しかしながらレセルピンの投与によっても COMT の活性は下がるので、COMT の活性の維持には、正常な神経の存在が必要で、この結果は COMT が神経内

にあることを意味していないとされた (Marsden et al., 1971)⁵²。その他、顎下腺では交感神経切除実験では、COMT 活性は下がるが、immunosympathectomy では変化はないとの報告もあり (Jarrott, 1971)³⁹、COMT と交感神経との関係は明確ではなかった。そこで Broch (1974)¹⁵はラット顎下腺内の COMT に及ぼすレセルピンの影響を調べた。交感神経を切除した顎下腺にレセルピンを投与する実験では、COMT の活性は低下したが、交感神経切除による COMT 活性の低下と、レセルピン投与による COMT 活性の低下は独立したものであることが明らかになった。このことから Broch (1974)¹⁵は、COMT は神経内と非神経外の両方に存在する可能性があるとした。それでは免疫組織化学的な所見はどうであろうか。Creveling 抗体を使用してラット耳下腺の筋上皮細胞に COMT が存在することが初めて報告された (Inoue et al., 1977)³⁵。その後導管の線条部の細胞に (Inoue et al., 1982)³³、耳下腺の他、顎下腺、舌下腺の筋上皮細胞、線条部の細胞にも COMT 陽性反応が認められた (Inoue, 1984)²⁷。いずれも非神経細胞であった。Inoue 等 (1982)³³の実験によれば、導管を結紮した耳下腺では、線条部の COMT は消失したが、筋上皮細胞の COMT はそのまま残っていた。交感神経切除では線条部、筋上皮細胞は共に変化がなかった。このことは COMT 導管結紮による COMT の活性の低下は、導管線条部の細胞内の COMT の消失によることを示しているが、交感神経切断の影響については答えが出されていない。いままでのところ、唾液腺に分布する交感神経に COMT が存在するか否かは免疫組織学的にも明らかではない。神経内の COMT を染めることに成功した Kaster 抗体での研究が望まれる。

歯髄についてはラット切歯の歯髄内に COMT 陽性細胞が認められた。この COMT 陽性細胞は形態からマクロファージと考えられている (Inoue et al., 1991)³⁴。口腔内器官の COMT 分布についての報告は少数である。

5. COMT の体内での働き

(パリアエンザイムとして)

免疫組織学的にも COMT は体内の種々の器官の細胞に存在しグループ分けは難しいが、局在を見ると、気がつくことは、多くの器官で上皮細胞

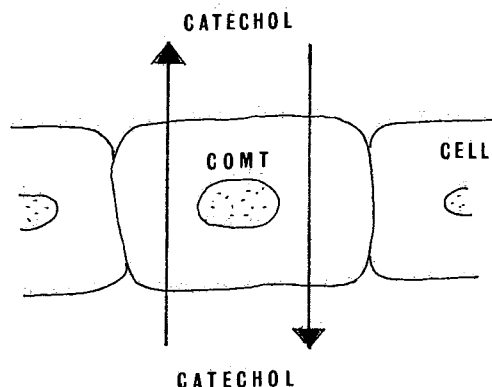


Fig. 4. The epithelial localization of catechol-O-methyltransferase (COMT) may serve as enzymatic barrier to control the passage of catechols between tissue compartments.

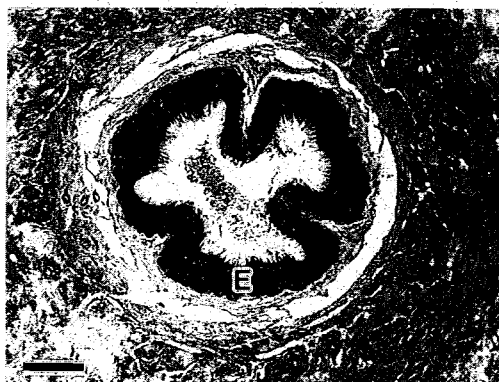


Fig. 5. Ductus deferens. Catechol-O-methyltransferase (COMT) is present in the epithelium (E). Bar=100 μ m.

に存在することである (Figs. 4 and 5). カテコールの酵素的無毒化あるいは生理的不活性化における COMT の機能の重要性は Axelrod によって認められていた。Axelrod は肝臓の COMT がカテコールアミンを O-メチル化して、門脈通過中にカテコールアミンを血清から除くことを示唆した (Axelrod, 1966)⁶⁾。現在ではカテコールアミンだけではなくカテコール基を持つ物質 (例えば カテコールエストロジェン, Xenobiotic catechols) はすべて O-メチル化されることが判ってきている (Ball et al., 1971; Daly et al., 1965)^{10,21)}。以上のことと、上皮細胞に存在することは COMT がバリヤエンザイムとして働いている可能性を示している。例えば脈絡叢の上皮内にある COMT は血液と脳脊髄液と間のカテコールの通過をブロックしている。同じような形態学的、機能的関係は毛様体、脳室、曲尿細管、腎の集合管、精管、卵管、乳腺の集合管の上皮、アストログリア、血管内皮細胞内でもみられる。(カテコールエストロジェン代謝のコントロール)

COMT は妊娠子宮、卵管、卵巣、乳腺、精管、精囊の細胞に存在し、COMT のレベル、活性はホルモンによるコントロールを受けている。妊娠子宮の上皮には着床に先立って COMT が出現し (Inoue et al., 1980)³⁶⁾、しかもこの出現は黄体ホルモンによって調節されている (Inoue and

Creveling, 1991)³¹⁾。乳腺導管上皮の COMT は乳汁を分泌していない女性では欠如し、乳汁を分泌しているマウス、ラットでは顕著に増加する (Amin et al., 1983)³⁾。また耳下腺の線条部では COMT とカテコールエストロジェンが共存していること (Inoue et al., 1987)³⁷⁾。これらの所見はカテコールエストロジェンの生物学的重要性 (Creveling and Inoue, 1994)¹⁸⁾と COMT のカテコールエストロジェンの代謝をコントロールする役割があることを支持している。

(ポストシナプティックなカテコールアミンの不活化)

1994年に Kastner 等⁴⁸⁾によってヒトの脳内のニューロンに COMT が存在することが報告された。彼らの結果は放出されたドーパミンの代謝にはポストシナプティックニューロンが関与していることを強く示唆している。

(カテコールアミンの extraneuronal uptake とその O-メチル化)

交感性の神経終末から放出されたカテコールアミンは大部分は再び神経終末に取り込まれるが、一部分は神経組織以外の種々の細胞に取り込まれる。前者を neuronal uptake (Uptake 1) と呼び、後者を extraneuronal uptake (Uptake 2) という。Extraneuronal uptake は Trendelenburg とその一派によって精力的に研究されている (Trendelenburg, 1978, 1988, 1990)⁶⁵⁻⁶⁷⁾。それに

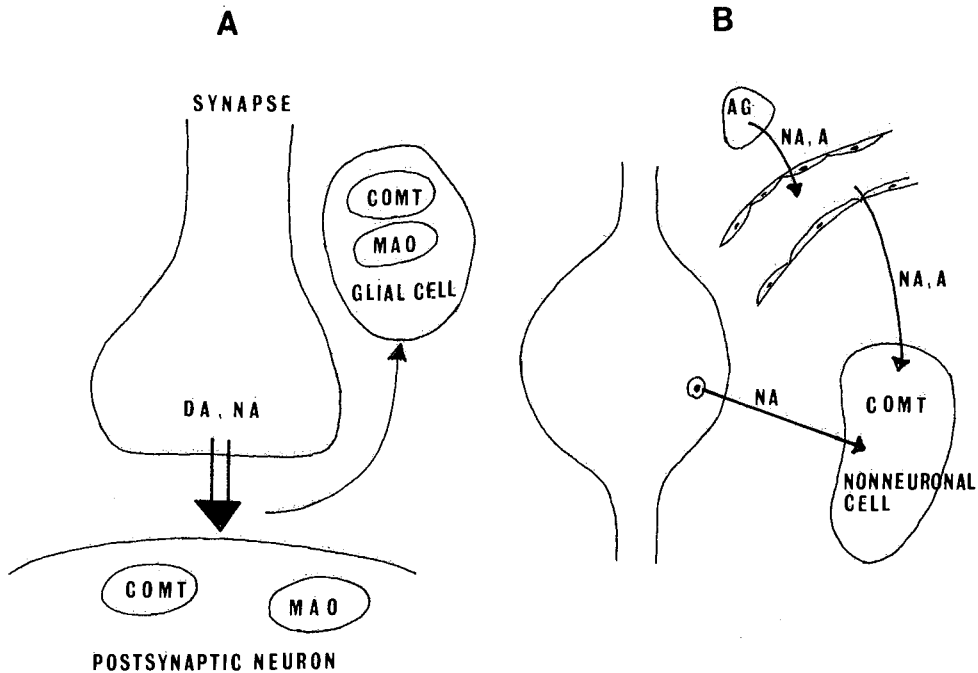


Fig. 6. A, Schematic model for the localization of the COMT in the central nervous system. Modified from Tilgmann (1993)⁶¹⁾. B, Schematic model for the localization of the COMT in the non-neuronal tissues. AG, adrenal gland. Modified from Axelrod (1971)⁷⁾.

よると extraneuronal uptake は細胞内に存在する COMT が関与するシステムの最初のステップであるとしている。実際に耳下腺の筋上皮細胞、マクロファージはカテコールアミンを取り込み、しかもこれらの細胞には COMT も存在する (Inoue, 1985; Inoue and Creveling, 1993)^{28,32)}。

以上のように COMT の体内での働きは、分布の多様性と同じように多様であることを示している。最初 COMT の免疫組織学的局在が、非神経細胞に限定されていたため、バリヤエンザイムという考えが強く提唱されたが、神経細胞内での COMT の存在の報告は、これを変えていくかも知れない。従来バリヤエンザイムと考えられている耳下腺の線条部導管細胞は COMT と同時にカテコールエストロジェンも存在し (Inoue et al., 1987)³⁷⁾。また第三脳室の上皮細胞でも同じ現象が見られた (未発表) ことはその考えを支持しているものと思われる。歯髄内の COMT 含有マクロファージもバリヤエンザイムとは考えにくい。最近歯髄内にドーパとドーパ含有神経が報告された (Inoue et al., 1994)³⁸⁾ ことから、ドーパの代謝

とマクロファージの関係も注目される。今後も非神経組織の COMT の働きは興味ある問題といえる。

ま と め

今までの免疫組織学的結果をまとめると Fig. 6 の様になる。将来にはこのような図が薬理学の教科書にのようになるかも知れない。まだ不明な点も多い COMT の特異的な細胞の局在を明らかにするには、今後はモノクローナル抗体の利用や、in situ hybridization による COMT の mRNA の検出法 (Meister et al., 1993)⁵³⁾ の利用などが必要であろう。COMT は多くのメチル基転移酵素のひとつで、最初 1958 年に Axelrod と Tomchick⁸⁾ によって記載された。COMT は最初循環するカテコールアミンを不活化するのが基本的な機能と考えられていた。しかし、分子生物学、局在の研究、効果的なインヒビターの開発等の進展、さらに COMT の測定法の進展などによって、COMT は人を初め他の哺乳動物において種々の機能的、代謝的な役割をはたしていることが明ら

かになってきている。口腔内の器官、組織についての研究は少なく、今後の発展が期待される分野である。

文 献

- 1) Alberici, M., Rodríguez De Lores Arnaiz, G. and De Robertis, E. (1965) Catechol-O-methyltransferase in nerve endings of rat brain. *Life Sci.* **4**; 1951—1960.
- 2) Amin, A. M. and Ismail, A. A. A. (1983) Immunoperoxidase localization of catechol-O-methyl transferase (COMT) in human breast cancer. *Gegenbaurs morph. Jahrb.* **129**: 125—128.
- 3) Amin, A. M., Creveling, C. R. and Lowe, M. C. (1983) Immunohistochemical localization of catechol methyltransferase in normal and cancerous breast tissues of mice and rats. *JNCI*. **70**: 337—342.
- 4) Assicot, M. and Bohuon, C. (1969). Production of antibodies to catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6) of rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **18**: 1893—1898.
- 5) Assicot, M. and Bohuon, C. (1971) Presence of two distinct catechol-O-methyltransferase activities in red blood cells. *Biochimie*, **53**: 871—874.
- 6) Axelrod, J. (1966). J. Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. *Pharmacol. Rev.* **18**: 95—113.
- 7) Axelrod, J. (1971) Noradrenaline: Fate and control of its biosynthesis. *Science*, **173**: 598—606.
- 8) Axelrod, J. and Tomchick, R. (1958) Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *J. Biol. Chem.* **233**: 702—705.
- 9) Axelrod, J., Albers, W. and Clemente, C. D. (1959) Distribution of catechol-O-methyl transferase in the nervous system and other tissues. *J. Neurochem.* **5**: 68—72.
- 10) Ball, P., Knuppen R. and Breuer, H. (1971). Purification and properties of a catechol-O-methyltransferase of human liver. *Eur. J. Biochem.* **21**: 517—525.
- 11) Bertocci, B., Garotta, G., Zürcher, G., Miggiano, V. and Da Prada, M. (1990) Monoclonal antibodies recognizing both soluble and membrane bound catechol-O-methyltransferase. *J. Neural Transm. (Suppl)* **32**: 369—374.
- 12) Bertocci, B., Garotta, G., Da Prada, M., Lahm, H.-W., Zürcher, G., Virgallita, G. and Miggiano, V. (1991) Immunoaffinity purification and partial amino acid sequence analysis of catechol-O-methyltransferase from pig liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **1080**: 103—109.
- 13) Bertocci, B., Miggiano, V., Da Prada, M., Dembic, Z., Lahm, H.-W. and Malherbe, P. (1991) Human catechol-O-methyltransferase: Cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 1416—1420.
- 14) Borchardt, R. T. and Cheng, C. F. (1978) Purification and characterization of rat heart and brain catecholmethyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, **522**: 49—62.
- 15) Broch, O. J. (1974) Effect of reserpine on catechol-O-methyl transferase in rat submaxillary gland. *J. Pharm. Pharmac.* **26**: 375—377.
- 16) Broch, O. J. Jr. and Fonnum, F. (1972) The regional and subcellular distribution of catechol-O-methyltransferase in the rat brain. *J. Neurochem.* **19**: 2049—2055.
- 17) Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H. (1971) The biochemical basis of neuropharmacology. Second Edition, 90—174, Oxford University Press, London.
- 18) Creveling, C. R. and Inoue, K. (1994) Catechol-O-methyltransferase: Factors relating to the carcinogenic potential of catecholestrogens. *Polycyclic Aromatic Compounds*. **6**: 253—259.
- 19) Creveling, C. R. and Thakker, D. R. (1994) O-, N-, and S- methyltransferases. *In Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 112, Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity, Chapter 7, 189—216, Springer-Verlag, Berlin.
- 20) Creveling, C. R., Borchardt, R. T. and Isersky, C. (1973) Immunological characterization of catechol-O-methyltransferase. *In Frontiers in Catecholamine Research*, 117—119, Pergamon Press, New York.
- 21) Daly, J., Inscoe, J. K., and Axelrod, J. (1965). The formation of O-methylated catechols by microsomal hydroxylation of phenols and subsequent enzymatic catechol O-methylation. Substrate specificity. *J. Med. Chem.* **8**: 153—157.
- 22) Flohé L. (1974) Catechol-O-methyltransferase. *Int. Pharmacopsychiat.* **9**: 52—60.
- 23) Garbarg, M., Baudry, M., Benda, P. and Schwartz, J. C. (1975) Simultaneous presence of histamine-N-methyltransferase and catechol-

- O-methyltransferase in neuronal and glial cells in culture. *Brain Res.* **83**: 538—541.
- 24) Guldberg, H. C. and Marsden, C. A. (1975). Catechol-O-methyltransferase: Pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol. Rev.* **27**: 135—206.
 - 25) Gulliver, P. A. and Tipton, K. F. (1979) The purification and properties of pig brain catechol-o-methyltransferase. *J. Neurochem.* **1525**—1529.
 - 26) Grossman, M. H., Creveling, C. R., Rybczynski, R., Braverman, M., Isersky, C. and Breakefield, X. O. (1985) Soluble and particulate forms of rat catechol-O-methyltransferase distinguished by gel electrophoresis and immune fixation. *J. Neurochem.* **44**: 421—432.
 - 27) Inoue, K. (1984) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in the major salivary glands of the rat. *Jap. J. Oral Biol.* **26**: 967—970.
 - 28) Inoue, K. (1985) Correlation between the extraneuronal uptake of noradrenaline and localization of catechol-O-methyltransferase in the rat parotid gland. *Jap. J. Oral Biol.* **27**: 1263—1266.
 - 29) Inoue, K. and Creveling, C. R. (1980) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in lymphoid tissue and bone marrow of rat. *Acta Histochem. Cytochem.* **13**: 368—376.
 - 30) Inoue, K. and Creveling, C. R. (1986) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in the oviduct and in macrophages in corpora lutea of rat. *Cell Tissue Res.* **245**: 623—628.
 - 31) Inoue, K. and Creveling, C. R. (1991) Induction of catechol-O-methyltransferase in the luminal epithelium of rat uterus by progesterone. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 823—828.
 - 32) Inoue, K. and Creveling, C. R. (1993) The macrophage as a site of extraneuronal uptake and O-methylation of norepinephrine. *Biogenic Amines*, **9**: 291—294.
 - 33) Inoue, K., Creveling, C. R. and Tice, L. W. (1982) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in rat parotid gland (41478). *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **171**: 65—71.
 - 34) Inoue, K., Nishino, T. and Creveling, C. R. (1991) Immunocytochemical evidence for the site of O-methylation in rat dental pulp. *J. Dent. Res.* **70**: 966—969.
 - 35) Inoue, K., Tice, L. W. and Creveling, C. R. (1977) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase. *In Biochemistry and Function of Monoamine Enzymes*, 835—859, Marcel Dekker, New York.
 - 36) Inoue, K., Tice, L. W. and Creveling, C. R. (1980) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in the pregnant rat uterus. *Endocrinology*, **107**: 1833—1840.
 - 37) Inoue, K., Yoshizawa, I. and Creveling, C. R. (1987) Immunocytochemical evidence for the coexistence of catecholestrogen and catechol-O-methyltransferase in the rat parotid gland. *J. Dent Res.* **66**: 1627—1629.
 - 38) Inoue, K., Creveling, C. R., Karasawa, N., Isomura, G. and Nagatsu, I. (1994) Measurement of DOPA and immunolocalization of L-DOPA-positive nerve fibers in rat dental pulp. *Brain Res.* **657**: 307—309.
 - 39) Jarrott, B. (1971). Occurrence and properties of catechol-O-methyl transferase in adrenergic neurons. *J. Neurochem.* **18**: 17—27.
 - 40) Jeffery, D. R. and Roth, J. A. (1984) Characterization of membrane-bound and soluble catechol-O-methyltransferase from human frontal cortex. *J. Neurochem.* **42**: 826—832.
 - 41) Jonason, J. (1969) Metabolism of dopamine and noradrenaline in normal, atrophied and post-ganglionically sympathectomized rat salivary glands in vitro. *Acta physiol. scand.* **76**: 299—311.
 - 42) Kaakola, S., Männistö, P. T. and Nissinen, E. (1987) Striatal membra-bound and soluble catechol-O-methyltransferase after selective neuronal lesions in the rat. *J. Neural Transm.* **69**: 221—228.
 - 43) Kaplan, G. P., Hartman, B. K. and Creveling, C. R. (1979) Immunohistochemical demonstration of catechol-O-methyltransferase in mammalian brain. *Brain Res.* **167**: 241—250.
 - 44) Kaplan, G. P., Hartman, B. K. and Creveling, C. R. (1980) Anti-catechol-O-methyltransferase: Demonstration of specificity and immunological cross-reactivity with the enzyme from rat liver, kidney, brain, and choroid plexuses. *Neurochem. Res.* **5**: 869—877.
 - 45) Kaplan, G. P., Hartman, B. K. and Creveling, C. R. (1981a) Localization of catechol-O-methyltransferase in the leptomeninges, choroid plexus and ciliary epithelium: Implications for the separation of central and peripheral catechols. *Brain Res.* **204**: 353—360.

- 46) Kaplan, G. P., Hartman, B. K. and Creveling, C. R. (1981b) Immunohistochemical localization of catechol-O-methyltransferase in circumventricular organs of the rat: Potential variations in the blood-brain barrier to native catechols. *Brain Res.* **229**: 323—335.
- 47) Karhunen, T., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Julkunen, I. and Panula, P. (1994) Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **42**: 1079—1090.
- 48) Kastner, A., Anglade, P., Bounaix, C., Damier, P., Javoy-Agid, F., Bromet, N., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (1994) Immunohistochemical study of catechol-O-methyltransferase in the human mesostriatal system. *Neuroscience*, **62**: 449—457.
- 49) Kopin, I. J. (1985) Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol. Rev.* **37**: 333—364.
- 50) Lowe, M. C. and Creveling, C. R. (1979) Immunocytochemical localization of catechol-O-methyltransferase in cardiovascular tissues. *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers*, **1**: 219—221.
- 51) Lundström, K., Salminen, M., Jalanko, A., Savolainen, R. and Ulmanen, I. (1991) Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol.* **10**: 181—189.
- 52) Marsden, C. A., Broch, Jr., O. J. and Guldberg, H. C. (1971) Catechol-O-methyl transferase and monoamine oxidase activities in rat submaxillary gland: Effects of ligation, sympathectomy and some drugs. *European J. Pharmacol.* **15**: 335—342.
- 53) Meister, B., Bean, A. J. and Aperia, A. (1993) Catechol-O-methyltransferase mRNA in the kidney and its appearance during ontogeny. *Kidney Int.* **44**: 726—733.
- 54) Rivett, A. J., Eddy, B. J. and Roth, J. A. (1982) Contribution of sulfate conjugation, deamination, and O-methylation to metabolism of dopamine and norepinephrine in human brain. *J. Neurochem.* **39**: 1009—1016.
- 55) Rivett, A. J., Francis, A. and Roth, J. A. (1983) Distinct cellular localization of membrane-bound and soluble forms of catechol-O-methyltransferase in brain. *J. Neurochem.* **40**: 215—219.
- 56) Roth, J. A. (1980) Presence of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in human brain. *Biochem Pharmacol* **29**: 3119—3122.
- 57) Roth, J. A. (1992) Membrane-bound catechol-O-methyltransferase: A reevaluation of its role in the O-methylation of the catecholamine neurotransmitters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **120**: 1—29.
- 58) Salminen, M., Lundström, K., Tilgmann, C., Savolainen, R., Kalkkinen, N. and Ulmanen, I. (1990) Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase. *Gene* **93**: 241—247.
- 59) Spatz, M., Kaneda, N., Sumi, C., Nagatsu, I., Creveling, C. R. and Nagatsu, T. (1986) The presence of catechol-O-methyltransferase activity in separately cultured cerebrovascular endothelial and smooth muscle cells. *Brain Res.* **381**: 363—367.
- 60) Thakker, D. R. and Creveling, C. R. (1990) O-methylation. *In* Conjugation reaction in drug metabolism, 193—231. Taylor & Francis, London.
- 61) Tilgmann, C. (1993) Purification, molecular cloning and expression of rat and human catechol-O-methyltransferases (Thesis, University of Turku, Turku, Helsinki) p. 1—53.
- 62) Tilgmann, C. and Kalkkinen, N. (1990) Purification and partial characterization of rat liver soluble catechol-O-methyltransferase. *FEBS Lett.* **264**, 95—99.
- 63) Tilgmann, C. and Kalkkinen, N. (1991) Purification and partial sequence analysis of the soluble catechol-O-methyltransferase from human placenta: Comparison to the rat liver enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 995—1002.
- 64) Tong J. H. and D'Iorio, A. (1977) Solubilization and partial purification of particulate catechol-O-methyltransferase from rat liver. *Can. J. Biochem.* **55**: 1108—1113.
- 65) Trendelenburg, U. (1978) Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. *Life Sci.* **22**: 1217—1222.
- 66) Trendelenburg, U. (1988) The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. *in* Catecholamines, Handbook of experimental pharmacology, Vol. 90—1, 279—319. Berlin, Springer-Verlag.
- 67) Trendelenburg, U. (1990) The interaction of transport mechanisms and intracellular enzymes in metabolizing systems. *J. Neuro. Transm. [Suppl]* **32**: 3—18.
- 68) Veser, J. and Martin, R. (1986) Isolation of the

low-molecular-mass form of catechol O-methyltransferase from rat liver and immunocytochemical localization of the enzyme

in the glycogen compartment. *Eur. J. Biochem.* **154**: 657—663.