



Title	炭酸脱水酵素アイソザイムVIおよびIIのヒト唾液腺における免疫組織化学的研究
Author(s)	洪, 性修
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38352
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名 洪性修

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)

学位記番号 第10396号

学位授与年月日 平成4年9月17日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文名 炭酸脱水酵素アイソザイムVIおよびIIのヒト唾液腺における
免疫組織化学的研究

論文審査委員 (主査) 教授 八木俊雄

(副査) 教授 栗栖浩二郎 助教授 白砂兼光 助教授 滝川正春

論文内容の要旨

【研究目的】

炭酸脱水酵素(E.C.4.2.1.1;)は、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ の反応を触媒する酵素で、アイソザイムは現在のところ7種類存在すると言われている。CAの各アイソザイムは生体内の臓器・組織に広く分布しているが、個々の臓器・組織においてCAが果たしている役割に関しては、多くの場合、推測の域を出でていないのが現状である。今、個々の臓器・組織におけるCAの役割を明らかにさせようとする場合、その臓器・組織を構成する細胞および細胞内における各CAアイソザイムの局在に関する情報が大きなかかりを与えるものと考えられる。

ヒト唾液腺におけるCAアイソザイムの局在に関しては、光顕免疫組織化学的にCA-VIとCA-IIの局在を中心にして議論が行なわれているが、未だに意見の一一致を見るには至らず、電顕免疫組織化学的研究を含めた詳細かつ広範な免疫組織化学的研究が待たれている。

以上の状況をふまえ、本研究はヒト唾液腺におけるCA-VIとCA-IIの局在を光顕および電顕免疫組織化学的に明らかにする目的で行なわれた。すなわちこれらのアイソザイムに対する抗体を作製し、各抗体の特異性を検定した後、頸下腺の免疫組織化学に応用した。

【研究方法】

- CAの分離: CM-Sephadexを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、CA-VIはOgawaらの方法に従いヒト唾液より、CA-IおよびCA-IIはOsborneとTashianの方法に従いヒト赤血球より、それぞれ分離した。さらに病理解剖の際に得られたヒト頸下腺のホモジネートの上清から、CA-VIと同様の方法でCAを分離し、頸下腺のCAとした。
- CAのendoglycosidase処理: CA-VIおよび頸下腺のCAをOgawaらの方法に従いendo- β -N-acetylglucosaminidaseF(endoF)で37°C、18時間処理した。
- 抗CA抗体の作製: CA-VI, CA-I, CA-IIをそれぞれウサギに免疫した。得られた各抗血清よりIgGを分離して抗体として使用した。各抗体の特異性の検定はWestern blotおよびDot blotで行なった。

4. 免疫組織化学：唾液腺腫瘍の手術の際に得られた正常顎下腺を periodate-lysine-4% paraformaldehyde 固定液にて固定した後、OCT compound に包埋し凍結した。凍結切片に酵素抗体間接法による免疫組織化学を施し、光顕および電顕標本を作製して観察を行なった。
5. その他の方法：CA 活性の測定は Sapirstein らの方法に、蛋白質の定量は Lowry らの方法に、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Leammlie の方法に、それぞれ従って行なった。

【結果】

1. CA の分離：分離した各 CA アイソザイムは SDS-PAGE で、CA-VI が 42KD、CA-I と CA-II が共に 30KD の単一のバンドを示した。顎下腺の CA は 42KD と 30KD のバンドを含む複数のバンドを示した。
2. CA の endo F 处理：endo F 处理後の CA-VI 及び顎下腺の CA の SDS-PAGE では、42KD のバンドのみ消失していた。
3. 抗体の特異性：各抗体はそれぞれの対応する抗原と反応したが、CA-I と CA-II の間には Dot blot でわずかな交差反応が見られた。顎下腺の CA のバンドのうち 42KD のバンドは抗 CA-VI 抗体と、30KD のバンドは全ての抗体と反応した。
4. 免疫組織化学：顎下腺実質細胞は抗 CA-VI 抗体と抗 CA-II 抗体に反応したが、抗 CA-I 抗体とは反応しなかった。さらに抗 CA-VI 抗体は導管内容物とも反応した。実質細胞内では、CA-VI は漿液腺細胞の分泌顆粒と cytosol に存在したのに対し、CA-II は漿液腺細胞、介在部導管細胞、線条部導管細胞の cytosol に存在した。

【結論】

1. ヒト唾液腺実質における CA アイソザイムの局在に関しては、CA-VI が漿液腺細胞の分泌顆粒と cytosol に、CA-VI は漿液腺細胞、介在部および線条部の導管上皮細胞の cytosol に存在する。
2. 漿液腺細胞の分泌顆粒の CA-VI は分子量 42KD の N-グリコシド結合を有する糖蛋白質であるのに対し、cytosol の CA-VI は分子量 30KD の N-グリコシド結合を持たない分子（蛋白質？）と考えられる。
3. 以上の各 CA アイソザイムの役割については漿液腺細胞の分泌顆粒の CA-VI は唾液の一成分として口腔に達した後、口腔内の pH の調整に関与しているものと思われる。いっぽう漿液腺細胞の cytosol の CA-VI と CA-II は原唾液の分泌に関与しているものと思われる。さらに導管細胞の cytosol の CA-II は原唾液の修飾に関与しているものと思われる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、炭酸脱水酵素 (CA) アイソザイムおよびの分離、それらに対する抗体の作製、その特異性の検討を行ない、さらにこれら抗体を用いてヒト顎下腺における各アイソザイムの局在を免疫組織化学的手法により光顕ならびに電顕的に調べたものである。

その結果、得られた抗体は互いに交差反応を示さず、それぞれ抗原特異的であることが示された。またこれら抗体を使った免疫組織化学では CA-VI は漿液腺細胞の分泌顆粒および cytosol に分布し、導管細胞には存在しなかった。

これに対して CA-II は漿液腺細胞、介在部および線条部導管細胞の cytosol にのみ存在していることが明らかにされた。

分泌顆粒と cytosol に存在する CA-VI の性状の差異について顎下腺より分離した CA の免疫学的検討結果と考え合わせると、分泌顆粒の CA-VI は 42KD の分子、cytosol の CA-VI は CA-VI と免疫学的に類似した 30KD の分子であることを示唆する新しい知見が得られた。

この研究の結果は、唾液腺における CA アイソザイムの細胞内局在を明らかにするとともに、唾液の分泌機構を考えるうえでの基礎資料となるものであり、価値ある業績と認められる。よって、本研究者は、博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。