

イヌの呼吸器と涙器における
炭酸脱水酵素の局在と遺伝子発現の検討

麻布大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程 基礎獣医学健康系 獣医解剖学

DV0602 杉浦 陽介

博士論文

イヌの呼吸器と涙器における
炭酸脱水酵素の局在と遺伝子発現の検討

麻布大学大学院獣医学研究科

杉浦 陽介

(指導：浅利 昌男 解剖学第一研究室教授)

目次

第1章	序説	1
第2章	鼻腔における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索	9
	序文	10
	材料と方法	12
	結果	20
	考察	23
	小括	27
第3章	喉頭及び下部気道における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索	28
	序文	29
	材料と方法	30
	結果	31
	考察	34
	小括	38
第4章	涙器付属腺における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索	40
	序文	41
	材料と方法	43
	結果	46
	考察	51
	小括	55
第5章	総括	56
第6章	要約	60
	図表	68
	参考文献	115
	謝辞	122

第 1 章

序 説

炭酸脱水酵素（carbonic anhydrase [E.C.4.2.1.1]以下 CA）は 1932 年に Merdrum と Roughton（Merdrum and Roughton, 1932）によりウシの赤血球から初めて分離された亜鉛を含む金属結合酵素であり、これまでに哺乳類では 12 種類のアイソザイムと、3 種類の CA 関連蛋白が見つまっている（Fujikawa-Adachi et al., 1999）。

CA の主な働きは CO_2 の水和と、 H_2CO_3 の脱水反応の触媒であり、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ の反応を触媒する。そのターンオーバー数は、 $6 \times 10^5 \text{ sec}^{-1}$ とされており、CA の存在下ではその触媒反応により転換速度は 10^7 倍も早くなり、この酵素が生体内に存在しなければ、 CO_2 の完全な水和は行われないとされている（Stryer et al., 1975）。また in vitro では、さらに数種類のエステルの加水分解、アルデヒドの水和を触媒する多機能酵素としても知られている（今堀ら、1984）。

CA は CO_2 と H_2CO_3 の転換を円滑にすることから、 CO_2 、 H_2O 、 H^+ を産生する臓器、組織の機能と関係が深く（Taki et al., 1986）、生体内に広く分布しており、呼吸、酸塩基平衡、イオンの輸送や骨の吸収などに関与している（Tashian, 1989, 1992）。この CA のアイソザイムは、細胞内での局在別に大きく分けられ、また酵素活性を持たない CA 関連蛋白も報告されている。細胞質型である CA-I、-II、-III は初めて同定されたアイソザイムであり、これまでの研究報告も多い。CA-I は主に赤血球と胃粘膜上皮に存在し、その活性は全てのアイソザイムの中では中程度である（Rickli et al., 1964）。CA-II は全てのアイソザイムの中で最も活性の

高いアイソザイムであり、赤血球や消化管上皮、唾液腺、尿細管上皮など体内に広く分布しており、骨の破骨細胞ではマーカー酵素としても知られている (Spicer et al., 1982; Tashian, 1989)。特に消化管上皮では、胃の壁細胞において H^+ の産生に関与しており (Jacobson, 1978)、一方小腸では HCO_3^- の産生に関与していることが示されている (Swenson, 1991)。

CA-III は主に骨格筋に含まれており (Koester et al., 1977)、その活性は低く CA-I の約 5% であるが、CA 阻害剤のアセタゾラミドに抵抗性を持ち、抗酸化作用を示すことが報告されている (Raisanen et al., 1999)。一方で CA-VII と CA-XIII は細胞質型であると報告されているがその詳細は不明である。膜結合型である CA-IV は、glycosyl phosphatidylinositol (GPI) に結合して細胞外に存在しており、主に肺や腎尿細管に存在する (Waheed et al., 1992)。膜貫通型には、CA-IX, XII, XIV があるが、その詳細は不明である。ミトコンドリア型には、肝臓のミトコンドリアのみに存在する CA-VA と、肝臓以外の臓器に存在する CA-VB がある。そして唯一の分泌型として CA-VI が報告されている (Hewett-Emmett and Tashian, 1996)。これまでに CA-VI は、ラット、ヒツジ、イヌ、ヒトなど様々な哺乳類の唾液中や唾液腺で分離され (Fernley et al., 1989; Parkkila et al., 1990; Ogawa et al., 1992; Asari et al., 2000)、口腔内において酸塩基平衡の調節をされると考えられている (Kivela et al., 1999)。この CA-VI は、細胞内で分泌顆粒の形態をとるタイプと細胞質内にび慢性に存在するタイプの 2 タイプが存在することが報告されている (Ogawa et al.,

1992)。一方で CA-RP VIII, CA-RP X, CA-RP XI は酵素活性を持たない CA 関連蛋白とされ、その機能はまだ明らかとされていない。

分泌型の CA-VI はこれまで唾液型とも呼ばれ、唾液腺を中心とした報告が数多くある。しかし近年、唾液腺以外においてイヌの口腔粘膜や食道など (Kasuya et al., 2007)、ウシの乳腺 (Ichihara et al., 2003) など消化器系以外の器官においても CA-VI の存在が報告されている。また CA-VI は炭酸脱水酵素としての機能以外に、ヒトの味蕾細胞においてアポトーシスを抑制する作用 (Henkin et al., 1999a,b) や、ラットの細気管支分泌細胞において成長因子として働いている可能性を示唆する報告 (Leinonen et al., 2004)、嗅物質の感知や CO₂ 濃度の感知との関連 (Coates, 2001) など、多機能蛋白としての機能が示唆されている。

一方で呼吸器における同様の研究は、前述したように消化器系をはじめとして他器官系統の粘膜系に対する CA の局在と機能に関する研究に比べきわめて少ない。

呼吸器系は鼻腔、咽頭、喉頭、気管、気管支の気道と肺（肺胞）からなる、酸素・二酸化炭素のガス交換を行う独立した器官である。またガス交換以外にも、体温や水分の調節、発声などの生理機能を有する。鼻腔は線毛を有する偽重層上皮に覆われ、これらは前庭部、呼吸部および嗅部の 3 部に区分され副鼻腔粘膜に連続している。気道上に存在する外分泌組織としては鼻前庭に存在する鼻前庭腺や鼻腔粘膜上皮列および気管・気管支粘膜上皮列に存在する単細胞性分泌細胞の杯細胞と、鼻粘

膜呼吸部に独立する鼻腺、鼻粘膜嗅部に存在する嗅腺、上顎洞から中鼻道に至る部分の粘膜下組織に存在する漿液性の外側鼻腺、咽頭および喉頭粘膜下組織に存在する咽頭腺や喉頭腺、さらには気管・気管支にある気管・気管支腺がある。これらの分泌物は一義的に言えば気道中に侵入した異物を排除したり、吸気に湿度を与えたりする。

呼吸器系、特に鼻腔における CA の分布に関する報告として、モルモットの鼻腔での CA-II の組織局在 (Okamura et al., 1996b)、マウスの鼻腔における CA-II と CA-VI の組織局在 (Kimoto et al., 2004)、ヒトの鼻腔における CA-I, -II, -III, -IV, -VA, -VB, -VI, -VII, -IX, -XII, -XIV の遺伝子発現 (Tarun et al., 2003) の研究などがある。これらの研究結果から、CA は細胞質型と分泌型のアイソザイムが相補的に作用しながら、粘膜面での外因性の酸の中和やイオンの輸送、粘膜層の保護に関与すると考えられている。また嗅粘膜における報告では、モルモットにおいて CA-II は形態的に嗅細胞と考えられる細胞に局在することが報告され (Okamura et al., 1996b)、マウスでも CA-II が同様に局在することが報告されている (Kimoto et al., 2004)。機能的に、鼻腔粘膜での CO₂ 濃度の感知が CA 阻害剤によって影響を受けることがラットで報告されている (Coates, 2001)。また、CA の呼吸器系、特に下部気道における報告としては、酵素組織化学によるモルモットの気管 (Okamura et al., 1996a)、免疫組織化学による CA-II のヒトの気管気管支腺 (Spicer et al., 1982)、ラットの肺胞上皮 (Chen et al., 2008)、そして CA-VI のラットの気管と

肺 (Leinonen et al., 2004) での報告がある。これらの研究の結果から、CA は下部気道においても、鼻腔と同様に粘膜層の酸塩基平衡の維持に関わり、粘膜を保護すると考えられている。特に肺胞上皮ではガス交換に重要な役割を果たしていると考えられるが、この部位における CA アイソザイムの組織局在を示した報告はまだ少なく、主に膜結合型である CA-IV の存在が示されているのみである (Waheed et al., 1992; Zhu and Sly., 1992)。

一方、涙器に属する涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺および睫毛腺は涙液をつくり、涙液は眼球表面の微小環境に関与するばかりか、鼻涙管によって鼻腔へと排出される。そのため鼻腔内環境の調節因子を考える上では、涙器との関係も考慮する必要がある。これまでにわずかではあるが、涙器の中でも涙腺での CA の局在が報告されており、ラットの涙腺における CA-VI の存在が免疫組織化学的に検討されている (Ogawa et al., 1995)。また、Ogawa et al. (2002) はヒツジの涙腺組織内に CA の局在を、免疫組織化学と *in situ hybridization* によって蛋白レベルと遺伝子レベルで明らかにしている。これらの報告では分泌型である CA-VI の存在が、耳下腺などの唾液腺と比較して非常に微量ではあるが確認されている。また涙液そのものの pH に関する報告では、イヌで第三眼瞼腺を外科的に切除した際に涙液の pH が若干上昇し、第三眼瞼腺の分泌液が眼球表面の微小環境の維持に関与していることが示唆されている (Saito et al., 2001)。よって、涙腺では CA が涙液の酸塩基平衡の維持に関与し、特に

イヌでは第三眼瞼腺においても CA が産生されている可能性が考えられる。そのため、呼吸器系における CA の存在や機能を検討するにあたって、特に上部気道の鼻腔では涙液との関連も考慮する必要があると考えた。

近年これら呼吸器系や涙器における CA 局在の報告が少数ながらみられ、また前述のようにイヌの第三眼瞼腺において CA の局在が予想されるが、これらの器官における体系だった検討は少ない。よって本研究では、呼吸器と涙器において CA の組織局在と遺伝子発現をイヌにおいて詳細に検討することによって、鼻腔及び喉頭から肺胞に至る呼吸器系上皮と、涙器付属腺における CA 蛋白の発現や分泌動態、機能的側面を類推することを目的とし、以下のように検討を行なうこととした。

本研究において、第 2 章では鼻腔粘膜（鼻前庭部粘膜、鼻粘膜呼吸部、鼻粘膜嗅部、外側鼻腺）、第 3 章では喉頭及び下部気道粘膜（喉頭蓋、気管、気管支、肺）、また第 4 章では、涙器付属腺（涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺）における CA 蛋白の組織局在と遺伝子発現を検討することとした。

その概要は、各組織での CA アイソザイムの局在を明らかにするため免疫組織化学染色を行なった。さらに分泌型とされる CA-VI については、CA-VI 蛋白質をウェスタンブロット法にて検索し、さらにその産生母地を明らかにするために遺伝子発現の確認を RT-PCR によって定性的に確認し、さらに定量的 PCR を行い相対的な遺伝子発現量を比較した。

RT-PCR によって遺伝子発現の認められた組織では、in situ hybridization を行い組織上での遺伝子発現を確認した。また、イヌの涙器には、瞼板腺や睫毛腺などの脂質合成細胞が見られるが、Noda et al. (1987) は皮脂腺での CA-I, -II の組織局在を報告している事から、これらの細胞における CA アイソザイムの検討も合わせて行なった。イヌの第三眼瞼腺の組織構造について、Martin et al. (1988) は漿液腺房とは異なり形態的に脂質合成細胞と思われる細胞が認められたと報告している。この細胞についての報告は他にはみられず、詳細が明らかとされていないことから今回その確認のために脂肪染色を行い、さらに微細構造の確認のために透過型電子顕微鏡にて観察し、脂腺のひとつである瞼板腺と比較した。

第 2 章

鼻腔における CA-I, -II, -III, -VI の
組織局在と遺伝子発現の検索

序文

序説でも述べたように、CA は様々な器官で存在が確認されており (Tashian, 1989, 1992)、呼吸器系、特に近年鼻腔における分布が報告されている (Okamura et al., 1996b; Kimoto et al., 2004)。これらの研究結果から、CA は細胞質型と分泌型のアイソザイムが粘膜面での外因性の酸の中和やイオンの輸送、粘膜層の保護に関与すると考えられている。また CA-VI は、このような機能とは別に、鼻粘膜嗅部で嗅物質や CO₂ の感知との関連が示唆されている (Coates, 2001)。

そこで本章では、イヌの呼吸器系の中で鼻腔について、CA の組織局在と遺伝子発現の詳細を明らかにし、その機能的意義を類推する事を目的として以下のように検索した。

検索対象とするアイソザイムについては、これまでに涙器や呼吸器及び他の器官において多くの報告がある細胞質型アイソザイムとして、CA-I, -II と、CA 阻害剤のアセタゾラミドに抵抗性を持つ CA-III を検討した。また、近年涙器や呼吸器においても報告のある分泌型 CA-VI は、遺伝子発現に関する報告もされており、さらに多機能蛋白としても注目されている事から検討する事とし、中でも CA アイソザイムの中で最も活性が高く代表的アイソザイムである CA-II と、唯一の分泌型である CA-VI を中心に比較検討した。

各 CA アイソザイム蛋白の検索は免疫組織化学染色によって行い、高活性を示す代表的なアイソザイムである CA-II と分泌型である CA-VI に

については、遺伝子発現を確認するために RT-PCR を行った。分泌型である CA-VI については、蛋白レベルでの局在をウェスタンブロット法を併用して検索し、さらにその遺伝子の組織上での局在を明らかにするために in situ hybridization を行い、遺伝子発現量の定量を目的として定量的 PCR も併せて行った。

材料と方法

実験に用いた成犬は、すべて本学解剖学第一研究室及び外科学研究室より実習に用いた後にペントバルビタールの静脈麻酔下で放血死させた個体を使用した。本章の全ての実験において、検索部位として鼻前庭部、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部、外側鼻腺を採材し、陽性対照として耳下腺を採材した。

HE 染色

成犬（ビーグル犬）5 個体（雄 5 個体）より、HE 染色に使用する組織を摘出後、速やかに Bouin 液（飽和ピクリン酸、中性緩衝ホルマリン、氷酢酸を 15 : 5 : 1 の割合で使用時に調整）にて 12～24 時間浸漬固定した。固定後、常法通りアルコール上昇系列で脱水し、キシレンで置換後、パラフィン（HISTOSEC[®]、メルク）に包埋した。パラフィン包埋ブロックはミクロトームで 4 μ m の切片へと薄切し、シランコーティングされたスライドガラスに載せ、40℃の伸展板で伸展し、得られた組織切片を用いて HE 染色を行なった。HE 染色は常法通りに行い、1%エオジン・アルコール溶液と 0.1%マイヤーのヘマトキシリン液を使用した。

免疫組織化学染色

成犬（ビーグル犬）5 個体（雄 5 個体）より、免疫組織化学染色に使用する組織を摘出後、HE 染色と同様に組織切片を作製し、得られた組

組織切片を用いて免疫組織化学染色を行なった。抗体は本学獣医学部生理学第一研究室西田利穂准教授より提供していただいた抗 CA-I、抗 CA-II、抗 CA-III、抗 CA-VI 抗家兔血清を用いた間接法を行なった。この抗体の特異性はウェスタンブロット法と Ouchterlony 法によって確認されている (Asari et al., 2000; Kasuya et al., 2007)。イヌにおいても CA-VI はその遺伝子配列の解析において分泌性蛋白質に特徴的なシグナルペプチドが含まれ、分泌型アイソザイムであるとされる (Kasuya et al., 2007)。

組織切片は常法どおり脱パラフィンさせ水和した後、内因性ペルオキシダーゼの活性阻止を目的として 3% H_2O_2 添加 99.5%メタノールを室温で 10 分間反応させた。続けて 10%正常ヤギ血清 (ヒストファイン SAB-PO®キット、ニチレイ) を室温で 60 分間反応させた後、一次抗体として各々抗イヌ CA-I, -II, -III 抗家兔血清 (希釈倍率 500~2000 倍)、抗イヌ CA-VI 抗家兔血清 (希釈倍率 100~400 倍) を 4℃で 12~24 時間反応させた。また、陰性対照には、10%正常ヤギ血清を同条件で反応させた。反応後、0.01M PBS (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2) で洗浄し、標識二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗家兔 IgG) (GE ヘルスケア・ジャパン) を室温で 60 分間反応させ、0.01M PBS にて洗浄した。発色は、0.005% H_2O_2 添加 0.02% 3-3'ジアミノベンチジン・テトラヒドロクロライド (和光純薬工業) を用い、蒸留水で反応を停止した。発色終了後、ヘマトキシリンにより核染色を行い、常法どおりアルコールによ

る脱水とキシレンによる透徹後、ENTELLAN®neu（メルク）を用い封入し、光学顕微鏡にて観察した。抗 CA アイソザイム抗血清に対する反応が見られた細胞は（+）、見られなかった細胞は（-）、反応が見られた細胞と見られなかった細胞が混在する場合は（±）と評価した。

ウェスタンブロット法

成犬（ビーグル犬）3 個体（雄 3 個体）より、ウェスタンブロット法に使用する組織を摘出後、速やかに液体窒素にて凍結し、使用まで-80℃で保存した。タンパク質の変性を防ぐため、採材した組織を Protease Inhibitor Mix /1M（GE ヘルスケア・ジャパン）と RIPA Buffer（シグマアルドリッチ・ジャパン）（1：50）でホモジェナイズ後、泳動するタンパク質量を一定にするために、タンパク質量（1：200）を吸光度計で測定し、20μg/μl に調整し、可溶化した物質は、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）添加 7.5% ポリアクリルアミドゲルにてタンパク質 10μl およびサンブルバッファー（2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.08% bromphenol blue、62.5mM Tris-HCl pH6.8）10μl の計 20μl を電気泳動し、PVDF メンブレン（日本ミリポア）上に転写した。次いで PVDF メンブレンは 500mM NaCl/0.1 % Tween-20/20mM Tris-HCl pH7.4 (TBST)で洗浄し、ブロッキングのため 5%スキムミルクで 4℃にて一晩反応した。その後 PVDF メンブレンは、抗 CA-VI 抗家兎血清で室温にて 1 時間反応し、次にペルオキシダーゼ標識した抗体で室温にて 1 時間反応後、ECL プラ

スケモイルミネセンスリジェント（GE ヘルスケア・ジャパン）を用いて化学発光を惹起させ、イメージアナライザー LAS-3000（富士フィルム）を用いて検出した。

RT-PCR

成犬（ビーグル犬）5 個体（雄 5 個体）より採材後、組織の RNA 調製に用いるまで、RNAlaterTM（タカラバイオ）中で-20℃にて保存した。RNA の抽出は RNeasy Mini Kit（キアゲン）を使用し、添付のプロトコールに従った。抽出した RNA は、使用まで-80℃で保存した。調製された RNA は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（アプライド バイオシステムズ・ジャパン）を用いて添付のプロトコールに従って cDNA へと合成した。

(1) CA-II

調製された cDNA は、EX Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を用いて PCR 反応を行なった。プライマー配列は、CA-II（XM_855990）よりセンスプライマーを 5'-CAG CAA CCT GAT GGA CTG GCTG-3'、アンチセンスプライマーを 5'-GCC TGC TGT GCA GTG GCT GAG-3'とし、358bp の PCR 産物を生ずる設定とした。初期変性として 95℃3 分間、続いて 95℃30 秒間、62℃30 秒間、72℃30 秒間の条件で 35 サイクル増幅させ、最後に 72℃5 分間の伸長反応を行なった。得られた PCR 産物 5μl は、1.5%アガロースゲル（アガロース S、ニッポンジーン）を用いて電

気泳動し、臭化エチジウム溶液にて染色した後、254nmの紫外線照射下でこのゲルを撮影した。

(2) CA-VI

PCR反応はCA-IIと同様に行なった。プライマー配列は、CA-VI (AB080972) よりセンスプライマーを 5'-CAG CGG CTC GGA GCA TAC-3'、アンチセンスプライマーを 5'-GGC TGG ATC CTG CGG TAG TCA-3'とし、441bp のPCR産物を生ずる設定とした。初期変性として 95℃3 分間、続いて 95℃30 秒間、64℃30 秒間、72℃30 秒間の条件で 35 サイクル増幅させ、最後に 72℃5 分間の伸長反応を行なった。得られたPCR産物はCA-IIと同様に撮影した。

(3) β -actin

内部標準としてイヌ β -actin を使用し、PCR反応はCA-IIと同様に行なった。プライマー配列は、 β -actin (AF021873) よりセンスプライマーを 5'-GGG AGA TCG TGC GTG ACA T-3'、アンチセンスプライマーを 5'-TCA GCA ATG CCA GGG TAC AT-3'とし、316bp のPCR産物を生ずる設定とした。初期変性として 95℃3 分間、続いて 95℃30 秒間、56℃30 秒間、72℃30 秒間の条件で 35 サイクル増幅させ、最後に 72℃5 分間の伸長反応を行なった。得られたPCR産物はCA-IIと同様に撮影した。

定量的 PCR

成犬（ビーグル犬）1 個体（雄 1 個体）より、定性的 RT-PCR を行な

った際に得られた cDNA を鋳型に PCR 反応を行なった。反応には *TaqMan*[®] Gold RT-PCR Kit (アプライド バイオシステムズ・ジャパン) 中の *TaqMan* PCR Core Reagents Kit を用い、イヌ CA-VI cDNA の塩基配列を基に新たにプライマーを設定した。センスプライマーは 5'-TCC CTG TAC TGA GAA CGT CCA TT-3'、アンチセンスプライマーは 5'-GAG GGT CTT ATT CTG GTG ATC CA-3'とした。また、両プライマー間のターゲット領域に特異的にアニールするように *TaqMan* プローブを設定した。鋳型 cDNA 1 μ l を加えた反応液 25 μ l (最終濃度; 200nM センスプライマー、200nM アンチセンスプライマー、100nM *TaqMan* プローブ、25mM MgCl₂、200 μ M deoxyATP、200 μ M deoxyGTP、200 μ M deoxyCTP、400 μ M deoxyUTP、0.01U/ μ l AmpErase UNG、0.0025U/ μ l *AmpliTaq* Gold DNA Polymerase、1 \times *TaqMan* buffer A) を、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (アプライド バイオシステムズ・ジャパン) を使用し、50°C 2 分間、95°C 10 分間の初期反応後、95°C 15 秒、60°C 1 分間の条件で 50 サイクルの増幅を行なった。また、内部標準としてイヌ β -actin を使用した。既知の β -actin cDNA 塩基配列からプライマーと *TaqMan* プローブを設定し使用した。

In situ hybridization

成犬 (ビーグル犬) 3 個体 (雄 3 個体) より各組織を摘出後、速やかに DEPC (ジエチルピロカーボネート) 処理水で作製した 4% パラホルムアルデヒド/PBS (4°C、pH7.4) を用いて 24 時間浸漬固定した。固定後、

常法どおりにアルコール上昇系列で脱水し、キシレンで置換後にパラフィンで包埋した。パラフィン包埋ブロックより、ミクロトームを用いて厚さ 4 μ m の切片へと薄切し、シランコーティングされたスライドガラスに載せ、40℃の伸展板で伸展した。

RT-PCR で得られたイヌ CA-VI の PCR 産物をクローニングしたものを鋳型として、DIG-RNA Labeling Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用い、添付のプロトコールに従って DIG-RNA プローブ (CA-VI mRNA に相補的なアンチセンスプローブ) を作製した。また、陰性対照として CA-VI mRNA と同一の塩基配列を持つセンスプローブも同様に作製した。作製した組織切片を常法どおりに脱パラフィンを行なった後、0.1M PBS で 10 分間洗浄し 40 μ g/ml のプロテイナーゼ K (タカラバイオ) で 20 分間、0.1M PBS 10 分間でプロテアーゼ処理し、後固定として 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間、0.1M PBS で 10 分間処理した。次に 0.2M HCl で 20 分間と 0.1M PBS で 10 分間にて脱プリン化を行なった後、上昇アルコール系列で脱水を行い、風乾した。

ハイブリダイゼーションと発色反応には、DIG Nucleic Acid Detection Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用した。ハイブリダイゼーション溶液は、10mM Tris-HCl (pH7.6) 、10% dextran sulfate、0.6M NaCl、0.25% SDS、1mM EDTA、tRNA(200 μ g/ml)、50 \times Denhardt 液 (1%ポリ塩化ビニル、1%ピロリドン、2%BSA)、脱イオン化した 4%ホルムアミドを用い、そこへ作製したアンチセンスプローブまたはセンスプローブを

加え、85℃ 3 分間の処理で直鎖化を行なった後、湿潤箱内で組織切片に載せ 45℃で 16 時間反応させた。反応終了後、50℃の 5×SSC (Saline Sodium Citrate buffer, 0.75M NaCl, 75mM クエン酸塩) で 3 分間、50℃の 2×SSC (50%ホルムアミド)で 15 分間を 2 回行い洗浄した。次に RNase(10μg/ml)を使用して RNase 処理を 37℃で 30 分間行い、TNE(10mM Tris-HCL、500mM NaCL、1mM EDTA) で 37℃10 分間、2×SSC を 50℃ 20 分間で 2 回、0.2×SSC を 50℃20 分間で 2 回の洗浄を行い、さらに DIG Buffer 1 (100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl) で 1 分間 2 回の洗浄を行った。次に blocking reagent(ブロッキング試薬)を 1.5%含む DIG Buffer 1 を室温で 60 分間反応させブロッキングを行い、DIG Buffer 1 にて 500 倍希釈した anti-DIG antibody を 4℃で 12 時間反応させた。抗体の洗浄は DIG Buffer 1 で 15 分を 2 回、DIG Buffer 3 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) で 3 分間行った。発色は DIG Nucleic Acid Detection Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) の NBT/BCIP (ニトロブルーテトラゾリウム塩 / 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェイト、トリイジニウム塩) を DIG Buffer 1 で 50 倍希釈したもの (20μg/ml) を使用し、遮光した状態で 2~8 時間反応させた。発色反応は TE (10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) で停止後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定後、90%グリセロールで封入した。

結果

免疫組織化学染色

各組織における CA-I, -II, -III, -VI 各アイソザイムの組織局在を免疫組織化学染色により調べた結果を Table1 に示す。

陽性対照として耳下腺を用いた。耳下腺を含む検索を行った全ての組織において、全ての CA アイソザイム抗血清（以下、CA 抗血清）に対する反応は細胞質にび慢性に見られた。なお、粘膜下組織の線維芽細胞や血管内皮細胞は非特異的に CA 抗血清に対して弱い反応を示した。鼻前庭部粘膜では、重層円柱上皮と鼻前庭腺の導管上皮は CA-I, -II, -III, -VI 抗血清に陽性反応を示した (Figs. 1a, 1b, 1c, 1d)。鼻前庭腺の漿液腺房では、全ての CA 抗血清に対して反応を示した細胞と示さなかった細胞が混在していた。また、CA-VI 抗血清に対する反応では、浅層の漿液腺房でやや強い反応を示したのに対し、深層の漿液腺房では弱い反応または反応を示さない細胞が多く見られた。鼻粘膜嗅部上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞からなる (Fig. 2a)。いずれの細胞も全ての CA 抗血清に反応を示した (Figs. 2b, 2c, 2d, 2e)。中でも嗅細胞と思われる細胞の一部では、CA-II, -III, -VI 抗血清に対して特に強く反応していた。嗅腺の漿液腺房には、CA-I, -II 抗血清に対する反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。一方 CA-III, -VI 抗血清に対しては全ての細胞が反応を示した。また、嗅腺の導管上皮は全ての CA 抗血清に反応を示した。鼻粘膜呼吸部では、粘膜上皮は偽重層線毛上皮と杯細胞からなる。線毛上

皮は、全ての CA 抗血清に対して反応を示したが、杯細胞は全ての CA 抗血清に対して反応を示さなかった (Figs. 3a, 3b, 3c, 3d)。鼻腺の漿液腺房は、CA-III 抗血清に対してのみ反応を示した。また、鼻腺の導管上皮は全ての CA 抗血清に対して反応を示した。外側鼻腺の漿液腺房は全ての CA 抗血清に対して反応を示さなかったが、線条導管と介在導管の上皮は全ての CA 抗血清に対して反応を示した (Figs. 4a, 4b, 4c, 4d)。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法にて、鼻腔粘膜における CA-VI 蛋白の検索を行った。その結果、陽性対照とした耳下腺と比較して少量ではあるが、鼻前庭部、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部、外側鼻腺の各部において CA-VI 蛋白の存在が認められた (Fig. 5)。

RT-PCR

採材した各組織由来のトータル RNA を用いた RT-PCR によって、CA-II, -VI の遺伝子発現を定性的に調べた。その結果、CA-II の増幅産物である 358bp のバンドと、CA-VI の増幅産物である 441bp のバンド、内部標準として用いた β -actin の増幅産物である 316bp のバンドは、検索を行った全ての部位（耳下腺、鼻前庭部粘膜、鼻粘膜呼吸部、鼻粘膜嗅部、外側鼻腺）において確認された (Fig. 6)。

定量的 PCR

採材した各組織由来の cDNA を用いて CA-VI の定量的 PCR を行なった。CA-VI の測定値を内部標準として用いた β -actin の測定値で補正を行い、各組織でのイヌの CA-VI mRNA の相対的な発現量を求めた。得られたデータを片対数グラフとして表したものが Fig. 7 である。その結果を外側鼻腺での発現量を基準として比較すると、鼻粘膜嗅部での発現量は約 8 倍、鼻粘膜呼吸部では約 10 倍を示した。一方で、陽性対象とした耳下腺では 10 万倍以上の発現量を示した。

In situ hybridization

RT-PCR によって得られた CA-VI 増幅産物を用いて作製した RNA プローブを使用して、in situ hybridization を行い、組織上での CA-VI 遺伝子発現の確認を行った。陽性対照として使用した耳下腺では、漿液腺房は強い反応を示したが、導管上皮と粘液腺房は反応を示さなかった (Fig. 8)。検索を行った鼻前庭部粘膜 (Fig. 9)、鼻粘膜呼吸部 (Fig. 10)、鼻粘膜嗅部 (Fig. 11)、外側鼻腺 (Fig. 12) の全ての部位において反応は見られなかった。

考察

本章では、イヌの鼻腔粘膜における CA アイソザイムの組織局在と遺伝子発現について検索を行った。その結果、CA-I, -II, -III, -VI の各蛋白が鼻腔粘膜の各組織に存在し、鼻腔における CA 遺伝子の発現量は耳下腺と比較して非常に低かったが、同部位で行なった CA-II, -VI の遺伝子検索でその発現も明らかとなった。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの鼻腔粘膜に少量ながらも存在することが確認された。定性的 PCR によって示された CA-VI の遺伝子発現が in situ hybridization では検出できなかったのは、定量的 PCR によってその発現量が非常に低いことが示されたことから、in situ hybridization の感度の影響であると考えられた。

鼻腔内における CA アイソザイムは、その緩衝能によって、上部気道粘膜において産生される外因性の酸（細菌によって産生される）を中和して粘膜を保護し（Kimoto et al., 2004; Leinonen et al., 2004）、粘膜上皮細胞を介したイオンの輸送に関与する（Cavaliere et al., 1996）と考えられる。粘膜上皮において産生される外因性または内因性の酸は CA によって急速に中和される（Anholt, 1993; Paysan et al., 2001; Shusterman et al., 2003）。消化器系上皮において、細胞質型の CA-II と分泌型の CA-VI は消化管粘膜を保護する相補的なシステムを持っている（Parkkila et al., 1994, 1997）と考えられている。これは、細胞質型アイソザイムが細胞質内において HCO_3^- を産生し、粘液中の分泌型アイソザイム CA-VI は

CA-II によって産生された HCO_3^- を利用して H^+ の中和を行い、酸塩基平衡を維持しているとするものである。イヌの鼻腔においても同様のシステムが働いていると考えられる。鼻前庭部粘膜や鼻粘膜呼吸部の上皮では、細胞質型 CA は細胞内で、また分泌型 CA は導管内や粘液中で、上部気道での呼気や吸気に接する粘膜上の酸塩基平衡の維持に関与し、微小環境が保たれていると考えられる。鼻粘膜の漿液腺房では、鼻前庭腺と嗅腺では全ての CA アイソザイムの局在が見られたが、外側鼻腺では全てのアイソザイムの局在が見られなかった。また鼻腺では CA-III のみ局在が見られた。このように鼻腔の各漿液腺房では CA の局在パターンが異なっていたことから、その分泌成分や腺房細胞の代謝の相違によると考えられた。また、CA-III は抗酸化作用を示す (Raisanen et al., 1999) ことから、鼻腺の漿液腺房の細胞では抗酸化作用が必要とされているかもしれない。外側鼻腺はイヌでは特によく発達しており、体温調節の際に行われる panting 時に必要とされる大量の漿液を産生する。外側鼻腺では、導管上皮において細胞質型と分泌型の双方の CA が確認されたことから、導管上皮細胞内での酸塩基平衡の維持や、導管内の分泌物に対する HCO_3^- の供給に関与していることが示唆された。

本研究において鼻粘膜嗅部では、モルモットやマウスでの報告と同様に、イヌにおいても形態的に嗅細胞と思われる細胞が免疫組織化学染色にて特に強く反応していた。ラットの口腔粘膜において CA は CO_2 の感知に関与している可能性が示唆されている (Komai and Bryant, 1993)。

鼻腔内には三叉神経の終末と嗅神経の終末が分布しており、これらの神経終末は高濃度の（有害な） CO_2 や低濃度の（呼吸時の） CO_2 によって刺激される。双方の神経終末の受容体は、CA 阻害剤であるアセタゾラミドによって CO_2 に対する反応が抑制されることが報告されている（Coates, 2001）。鼻腔内には厚さ $30\mu\text{m}$ の粘液層があり（Anholt, 1993）、この粘液層に分泌された CA-VI は大気中の CO_2 を水和し、粘液層への HCO_3^- と H^+ の拡散を促進すると考えられている（Kimoto et al., 2004）ことから、イヌの鼻粘膜嗅部の CA は CO_2 濃度の変化を感知することに寄与している可能性が考えられた。また、前述の鼻粘膜嗅部の表面を覆う粘液層は支持細胞と嗅腺の分泌物に由来し、嗅物質と嗅細胞との接触に不可欠であり、嗅物質はこの粘液層に溶解しなければ嗅覚は成立しない。この粘液層における Na^+ , K^+ , Ca^{2+} などの電解質濃度は、嗅覚の感受性に影響を与えることが示されている（Frings et al., 1991）。イヌの鼻粘膜嗅部において、CA により産生された HCO_3^- は陰イオン交換体を介して粘液層に分泌され、また同時に産生された H^+ は Na^+ , K^+ -ATPase を介して細胞外に輸送されることが考えられる。この仕組みによって CA は、 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} などの電解質濃度を調製し嗅物質の感知に関与している可能性が考えられた。

イヌの鼻粘膜嗅部では全ての上皮細胞と嗅腺の腺房や導管上皮に、細胞質型 CA と分泌型 CA がともに存在した。一方マウスでは高活性の CA-II は一部の嗅細胞のみで見られた（Kimoto et al., 2004）ことから、

イヌでは嗅粘膜における CA の役割が大きいことが予想された。

このように鼻腔は上部気道という役割とともに感覚器としての機能も併せ持つことから、CA の生理学的役割も多岐にわたる可能性が考えられた。

小括

イヌの鼻腔粘膜（鼻前庭部粘膜、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部、外側鼻腺）において、細胞質型 CA である CA-I, -II, -III と分泌型である CA-VI の組織局在と遺伝子発現を検討した。その結果、免疫組織化学染色にて鼻前庭部の重層円柱上皮と、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部の杯細胞を除く全ての線毛上皮に全てのアイソザイムが存在した。また鼻前庭腺、嗅腺、鼻腺の各漿液腺房ではアイソザイムによって異なるが CA の局在が確認された。また鼻粘膜嗅部では、一部の嗅細胞が CA 抗血清に対して特に強く反応した。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの鼻腔粘膜に少量ながら存在することが確認された。また CA-II, -VI の遺伝子発現は、全ての組織において定性的あるいは定量的 PCR で確認されたが、in situ hybridization では確認されなかった。

イヌの鼻腔において CA は鼻腔粘膜の上皮に存在し、その機能は酵素が持つ緩衝能によって鼻腔粘膜の酸塩基平衡の維持に関与することと考えられる。感覚器でもある鼻粘膜嗅部では、CA は嗅物質と嗅細胞の接触に必要な粘液層の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送に関与すると考えられた。さらに、嗅細胞では抗 CA 血清に特に強く反応する結果が得られたことから、CO₂ や嗅物質の感知との関連も示唆された。

第 3 章

喉頭及び下部気道における CA-I, -II, -III, -VI の
組織局在と遺伝子発現の検索

序文

第2章において、イヌの鼻腔にCAが存在することが確認された。鼻腔から先の下部気道においてのCA局在の報告は、序説で述べたようにまだ少数である (Spicer et al., 1982; Okamura et al., 1996a; Leinonen et al., 2004)。また、同一の動物で、鼻腔から肺胞までの呼吸器を体系的に検索した報告はまだない。そこで本章では、喉頭から気管、気管支、肺胞に至る呼吸器系上皮におけるCAの組織局在と遺伝子発現を明らかにし、呼吸器系におけるCAの機能を類推することを目的として、イヌを用いて第2章と同様の方法で検索した。

本章ではイヌの喉頭及び下部気道におけるCAの組織局在と遺伝子発現について、第2章での鼻腔における検索と同様に、細胞質型であるCA-I, -II, -IIIと、分泌型であるCA-VIについて検討した。各CAアイソザイム蛋白の検索は免疫組織化学染色によって行い、高活性を示す代表的なアイソザイムであるCA-IIと分泌型であるCA-VIは、遺伝子発現を確認するためにRT-PCRによる検索を行った。さらに分泌型であるCA-VIについては、蛋白レベルでの局在をウェスタンブロット法と免疫組織化学染色を用いて検索し、その遺伝子の組織上での局在を明らかにするためにin situ hybridizationを行い、遺伝子発現量の定量を目的として定量的PCRも併せて行った。

材料と方法

実験に用いた成犬は、第 2 章と同様に、すべて本学解剖学第一研究室及び外科学研究室より実習に用いた後にペントバルビタールの静脈麻酔下で放血死させた個体を使用した。全ての実験において、検索部位として喉頭蓋粘膜、気管頸部、気管頸胸部、気管胸部、気管分岐部、右主気管支、肺葉肺門部、肺葉尖端部を採材し、陽性対照として耳下腺を採材した。

免疫組織化学染色・ウェスタンブロット法・RT-PCR

成犬（ビーグル犬）5 個体（雄 5 個体）より、上記の部位を採材し、第 2 章と同様のプロトコールにて行なった。

定量的 PCR

成犬（ビーグル犬）1 個体（雄 1 個体）より、上記の部位を採材し、第 2 章と同様に定性的 RT-PCR を行なった際に得られた cDNA を鋳型に PCR 反応を行なった。

In situ hybridization

成犬（ビーグル犬）3 個体（雄 3 個体）より、上記の部位を採材し、第 2 章と同様のプロトコールにて行った。

結果

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色を用いて、各組織における CA-I, -II, -III, -VI 各アイソザイムの組織局在を調べた結果を Table 2 に示す。陽性対照として耳下腺を用いた。全ての CA 抗血清に対する反応は細胞質にび慢性に見られた。なお、粘膜下組織の線維芽細胞や血管内皮細胞は非特異的に弱い反応を示した。

喉頭蓋粘膜の全ての偽重層線毛円柱上皮、喉頭蓋腺の漿液腺房と導管上皮は、検索を行った全ての CA 抗血清に対して反応を示したが、喉頭蓋腺の粘液腺房は反応を示さなかった (Figs. 13a, 13b, 13c, 13d)。気管では、気管頸部、気管頸胸部、気管胸部、気管分岐部で以下に示す場合と同様の結果であった。気管粘膜では、全ての CA 抗血清に対して偽重層線毛円柱上皮は一様に反応を示した。気管腺の漿液腺房と導管上皮も同様に全ての CA 抗血清に対して反応を示した (Figs. 14a, 14b, 14c, 14d)。一方、粘膜上皮の杯細胞と気管腺の粘液腺房では全ての CA 抗血清に対して反応を示さなかった。主気管支と葉気管支では、気管と同様に偽重層線毛円柱上皮は一様に全ての CA 抗血清に対して反応を示した。気管支腺の漿液腺房と導管上皮では、全ての CA 抗血清に対して反応を示し、杯細胞と気管支腺の粘液腺房は反応を示さなかった (Figs. 15a, 15b, 15c, 15d)。終末細気管支と呼吸細気管支では、単層線毛立方上皮は一様に、全ての CA 抗血清に対して反応を示し、特に線毛基部の細胞質は、基底

膜側の細胞質よりも強く反応していた。細気管支分泌細胞は、全ての CA 抗血清に対して反応を示した (Figs. 16a, 16b, 16c, 16d)。肺では、CA-I 抗血清と CA-III 抗血清に対して、呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞は反応を示さなかったが、CA-II 抗血清と CA-VI 抗血清に対しては両細胞とも一部の細胞で反応を示した (Figs. 17a, 17b, 17c, 17d)。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法にて、喉頭及び下部気道における CA-VI 蛋白の検索を行った。その結果、陽性対照とした耳下腺と比較して少量ではあるが、喉頭蓋粘膜、気管、気管支、肺の各部において CA-VI 蛋白の存在が認められた (Fig. 18)。

RT-PCR

採材した各組織由来のトータル RNA を用いた RT-PCR によって、CA-II, -VI の遺伝子発現を定性的に調べた。その結果、CA-II の増幅産物である 358bp のバンドと、CA-VI の増幅産物である 441bp のバンド、内部標準として用いた β -actin の増幅産物である 316bp のバンドは、検索を行った全ての部位（耳下腺、喉頭蓋粘膜、気管頸部、気管頸胸部、気管胸部、右主気管支、肺葉肺門部、肺葉尖端部）において確認された (Fig. 19)。

定量的 PCR

採材した各組織由来の cDNA を用いて CA-VI の定量的 PCR を行なった。CA-VI の測定値を内部標準として用いた β -actin の測定値で補正を行い、各組織でのイヌの CA-VI mRNA の相対的な発現量を求めた。得られたデータを片対数グラフとして表したものが Fig. 20 である。その結果を肺での発現量を基準として比較すると、喉頭蓋粘膜での発現量は約 19 倍、気管頸部と気管頸胸部では約 10 倍、気管胸部では約 19 倍、気管分岐部では約 7 倍、主気管支では約 1.2 倍を示した。一方で陽性対照とした耳下腺では 3 万倍以上の発現量を示した。

In situ hybridization

RT-PCR によって得られた CA-VI 増幅産物を用いて作製した RNA プローブを使用して、in situ hybridization を行い、組織上での CA-VI 遺伝子発現の確認を行った。陽性対照として使用した耳下腺では、漿液腺房は強い反応を示した (Fig. 8) が、導管上皮と粘液腺房は反応を示さなかった。検索を行った喉頭蓋粘膜 (Fig. 21)、気管 (Fig. 22)、気管支 (Fig. 23)、呼吸細気管支 (Fig. 24)、肺 (Fig. 25) の全ての部位において反応は見られなかった。

考察

本章では、イヌの喉頭及び下部気道における CA アイソザイムの組織局在と遺伝子発現について検索を行った。その結果、喉頭、下部気道粘膜及び肺胞における CA-I, -II, -III, -VI 蛋白の存在と CA-II, -VI の遺伝子発現が明らかとなった。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの下部気道に少量ながら存在することが確認された。喉頭及び下部気道における CA 遺伝子の発現量は耳下腺と比較して非常に低かったため、in situ hybridization での遺伝子発現が確認できなかったと考えられた。

下部気道粘膜の上皮では上部気道と同様に、酸による上皮の障害を防ぐ仕組みが必要である。ヒトの気道粘膜において、酸は気道粘膜の線毛の活動を抑制し、粘膜における抗菌活性を減少させ、細菌感染を起こしやすくすることが報告されている (Nakayama et al., 2002)。呼吸器系においても、消化器系と同様に細胞質型 CA と分泌型 CA による相補的な粘膜上皮の保護システムが必要と考えられ、これは粘膜上皮の細胞質型 CA-I, -II, -III の産生した HCO_3^- を利用して、分泌型 CA-VI が粘液層の H^+ を中和するものである (Parkkila et al., 1994, 1997)。この仕組みにより、CA は気道粘膜において酸塩基平衡を維持する事によって、粘膜上の細菌によって産生される酸を中和し、抗菌活性を高め、粘膜上皮を保護していると考えられている (Kimoto et al., 2004; Leinonen et al., 2004)。今回、イヌの呼吸器上皮においても CA の局在と遺伝子発現が明らかとなったことから、CA はこれまでの報告と同様に、鼻腔から気管支に至る

呼吸器上皮においてその粘膜を保護していると考えられた。

これまでに報告のあるモルモット (Okamura et al., 1996a) では、CA アイソザイムを持つ細胞は気道粘膜上皮の一部の細胞と気管腺の漿液腺房であるとされ、ヒトでは、気道粘膜の線毛上皮では CA の発現はみられず、気管腺の漿液腺房でみられたとされている (Spicer et al., 1982)。

一方、本研究ではイヌの喉頭及び下部気道上皮で CA アイソザイムの局在が確認されたが、組織局在は気道粘膜の全ての線毛上皮で確認された。イヌでは、高体温時に panting という特徴的な浅速呼吸を行い、大量の漿液の気化熱で体温を下げる。Panting の際には大量の気体が気道を通過するために、イヌではモルモットやヒトと比較して呼吸器粘膜と大気の接触する機会が増加すると考えられ、大気中の細菌との接触機会も増加すると考えられる。そのためイヌの気道粘膜上皮に一樣に CA が存在し、細胞質型は細胞内で HCO_3^- を産生し、分泌型 CA はこの HCO_3^- を利用することで、粘膜上の細菌の産生する H^+ を中和する可能性が考えられた。

また、ラットにおいて気管支の線毛上皮では線毛基底部が、免疫組織化学染色で CA-VI 抗血清に対して特に強く反応を示したと報告されている (Leinonen et al., 2004) が、イヌでは気管支ではなく細気管支の単層線毛上皮において、検索した全ての CA 抗血清に対して線毛基底部が強く反応を示した。気管支や細気管支の線毛上皮における CA 抗血清の反応の相違は種差によるものと考えられる。呼吸器粘膜における CA 局在を他の動物と比較すると、イヌの呼吸粘膜の上皮では CA 局在を示す細

胞が一様に見られ、また CA の遺伝子発現も確認された。よってイヌの呼吸器粘膜では、酸塩基平衡など微小環境の維持を果たす役目において CA の役割がこれまでに報告されている他の動物より大きいと考えられた。

またイヌの細気管支分泌細胞においてもラットでの報告と同様、CA アイソザイムの局在が認められた。ラットでは成長段階での CA-VI の発現傾向から成長因子としての可能性が示唆されている (Leinonen et al., 2004)。本研究においてもイヌの細気管支分泌細胞において CA アイソザイムの局在が認められたことから、ラットと同様に成長因子としての可能性も考えられるが、本研究では成犬のみを対象としているのでその意義については今後の検討が必要である。

肺はガス交換を行う器官であることから、肺胞上皮では CA の存在が予想される。しかしこの部位における CA アイソザイムの組織局在に関しては、ラットの肺胞上皮における CA-II (Fleming et al., 1994; Chen et al., 2008) の報告や、膜結合型である CA-IV (Waheed et al., 1992; Zhu and Sly., 1992) の報告などまだ少ない。本研究のイヌを用いた結果において、肺胞では免疫組織化学染色で一部の呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞が CA-II, -VI 抗血清に対してのみ反応を示し、遺伝子発現も確認された。ガス交換時には、肺胞上皮や血管内皮細胞を CO_2 が通過する必要がある。この CO_2 は、主に赤血球に存在する CA-II によって血漿中の H^+ と HCO_3^- から産生される。また、肺胞上皮細胞内の H^+ と HCO_3^- は、肺胞上皮の

CA-II や CA-IV、CA-VI によって CO_2 に変換されることで、肺胞上皮や血管内皮細胞の細胞膜を通過しやすくと考えられた。

呼吸器上皮における CA の局在を示した報告は少なく、また機能的意義についても依然詳細が明らかとされていない。しかし本研究において、イヌの呼吸器において CA の局在と遺伝子発現が確認されたことから、今後は培養下の嗅粘膜上皮や気道粘膜上皮において様々な化学物質や菌の分泌物などを加えた条件下での CA 遺伝子の発現量の変化を確認することで、この酵素の役割が明らかとなるであろう。

小括

イヌの喉頭及び下部気道粘膜（気管頸部、気管頸胸部、気管胸部、気管分岐部、主気管支、肺）において、細胞質型 CA である CA-I, -II, -III と分泌型である CA-VI の組織局在と遺伝子発現を検討した。免疫組織化学染色の結果、喉頭から細気管支に渡る全ての線毛上皮では、全ての CA アイソザイムが存在したが、粘膜上皮の杯細胞では CA アイソザイムの存在は見られなかった。また、喉頭蓋腺、気管腺、気管支腺の漿液腺房と導管上皮でも全ての CA アイソザイムの存在が確認された。細気管支分泌細胞では、全ての CA アイソザイムが存在した。肺胞の呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞では一部の細胞のみで CA-II と CA-VI が存在した。また、ウェスタンブロット法により CA-VI 蛋白は少量ながら存在することが確認された。また CA-II, -VI の遺伝子発現は、全ての組織において定性的及び定量的 PCR で確認されたが、in situ hybridization では確認されなかった。

以上より、イヌの喉頭及び下部気道において CA は気道粘膜の上皮に存在し、細胞質型 CA と分泌型 CA は鼻腔と同様に、 HCO_3^- を用いた酸の中和を行い、気道粘膜の酸塩基平衡の維持に関与すると考えられた。また、気道粘膜の酸による線毛運動の抑制を防ぎ、粘膜を保護する可能性が考えられた。これまでに報告された他の動物と異なり、気道粘膜の全ての線毛上皮に CA が存在する事から、イヌの呼吸器系では微小環境の維持に対する CA の役割は大きい可能性が考えられた。細気管支分泌細

胞における CA アイソザイムの存在が確認されたが、その機能的意義は不明である。肺胞上皮における CA アイソザイムは一部の細胞のみが局在を示した。肺では、ガス交換においては赤血球に存在する CA-II が主に働き、血漿中の H^+ と HCO_3^- から CO_2 を産生する。また肺胞上皮の CA-II や CA-IV、CA-VI は、肺胞上皮細胞内の H^+ と HCO_3^- を CO_2 に変換することで、肺胞上皮や血管内皮細胞の細胞膜を通過しやすくすると考えられた。

第 4 章

涙器付属腺における CA-I, -II, -III, -VI の
組織局在と遺伝子発現の検索

序文

第2章と第3章においてイヌの呼吸器系における CA アイソザイムの局在を詳細に検討した。鼻腔には鼻涙管によって涙液が流入するために、鼻腔内環境の調節因子を考える上では、涙器との関係も考慮する必要があると考えられる。序説でも述べたが、ラットの涙腺 (Ogawa et al., 1995) や、ヒツジの涙腺 (Ogawa et al., 2002) において CA の存在と遺伝子発現が報告されている。また、イヌの第三眼瞼腺の切除による涙液 pH の若干の上昇 (Saito et al., 2001) が報告されていることから、眼球表面の微小環境の酸塩基平衡を考える場合には、涙腺だけではなく涙液を産生する涙器付属腺であるその他の腺 (第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺) における CA 局在を明らかにする必要があると考えられる。

そこで本章では、イヌの涙器付属腺である、涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺における細胞質型 CA-I, -II, -III、及び分泌型 CA-VI の組織局在と遺伝子発現を明らかにし、眼球表面の微小環境における CA の機能的意義を類推する事を目的として、次のように検討した。

第2章、第3章と同様に、各 CA アイソザイム蛋白の検索は免疫組織化学染色によって行い、高活性を示す代表的なアイソザイムである CA-II と分泌型である CA-VI については、遺伝子発現を確認するために RT-PCR を行った。分泌型である CA-VI については、蛋白レベルでの局在をウェスタンブロット法と免疫組織化学染色を用いて検索し、その遺伝子の組織上での局在を明らかにするために in situ hybridization を行い、

遺伝子発現量の定量を目的として定量的 PCR も併せて行った。また、序説でも述べたが、第三眼瞼腺に存在する形態的に脂質を分泌すると思われる細胞が Martin et al. (1988) によって報告されていることから、この細胞を同定するために、脂肪染色として Sudan 黒染色を併せて行った。さらに微細構造を確認するために透過型電子顕微鏡による観察を行い、脂腺である瞼板腺の脂腺細胞との構造的な差異を検討した。

材料と方法

実験に用いた成犬（ビーグル犬）5 個体（雄 5 個体）は、すべて本学解剖学第一研究室及び外科学研究室より実習に用いた後にペントバルビタールの静脈麻酔下で放血死させた個体を使用した。

涙器での検討のために、涙腺、第三眼瞼腺、上眼瞼（瞼板腺と睫毛腺を含む）を採材した。また、陽性対照として耳下腺を採材した。

HE 染色・免疫組織化学染色・ウェスタンブロット法・RT-PCR

成犬（ビーグル犬）5 個体（雄 5 個体）より、上記の部位を採材し、第 2 章と同様のプロトコールにて行なった。

定量的 PCR

成犬（ビーグル犬）1 個体（雄 1 個体）より、上記の部位を採材し、第 2 章と同様に定性的 RT-PCR を行なった際に得られた cDNA を鋳型に PCR 反応を行なった。

In situ hybridization

成犬（ビーグル犬）3 個体（雄 3 個体）より、上記の部位を採材し、第 2 章と同様のプロトコールにて行った。

脂肪染色

成犬（ビーグル犬）3 個体（雄 3 個体）より、第三眼瞼腺を摘出後速やかに 10% シュークロース/PB 溶液に浸漬し、O.C.T. compound（サクラファインテック・ジャパン）で包埋した後、クライオスタットにて常法通りに厚さ $6\mu\text{m}$ の凍結切片を作製後、Sudan 黒染色を行なった。

透過型電子顕微鏡による微細構造の観察

成犬（ビーグル犬）4 個体（雄 4 個体）より、観察に供する組織として第三眼瞼腺と瞼板腺を採材した。採材した組織は 0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液 pH7.2 により表面を十分に洗浄した後、2.5% グルタルアルデヒド/カコジル酸ナトリウム緩衝液に 4°C で浸漬固定した（前固定）。前固定した組織はさらに実体顕微鏡下で 1mm^3 の大きさに細切し、続いて、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液 pH7.2 で 3 回各 10 分洗浄し、1% 四酸化オスミウム水溶液に 2 時間 4°C で浸漬固定した（後固定）。固定後、それぞれの組織を 3 回各 10 分洗浄し、定法どおりアルコール上昇系列で脱水し、プロピレンオキサイドで透徹置換した。その後、樹脂包埋のため、プロピレンオキサイド：エポン樹脂（主剤 EPON812 45.6%、硬化剤 MNA 23.6%、DDSA 30.8% に、加速剤 DMP-30 1.5% を加えたもの、TAAB, UK）= 1 : 1 を 1 時間、プロピレンオキサイド：エポン樹脂 = 1 : 3 を一晩浸透させ、最終的にエポン樹脂に包埋した。樹脂包埋切片は、超薄切片作製に先立ち、ガラスナイフで $1\mu\text{m}$ の厚切り切片

を作製後、メチレンブルー染色をした。その厚切り切片を光学顕微鏡で観察し、瞬膜腺、瞼板腺の腺房の位置を確認した後、さらに必要部位を残し、トリミングをした。厚さ 100nm の超薄切片作製はダイヤモンドナイフを装着した超ミクロトーム（JUM-7、日本電子）で行った。その切片を 0.1% クエン酸鉛により電子染色し、電子顕微鏡（JEM-1210、日本電子）にて観察した。

結果

脂肪染色

一般染色（HE 染色）において、第三眼瞼腺の深部に脂質分泌細胞と思われる細胞が認められた（Figs. 26a, 26b）。これらの細胞は、周囲の漿液腺房とは独立して腺房を形成しており、Sudan 黒染色にてその細胞質に脂質を含むことが確認された（Fig. 27）。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色を用いて、各組織における CA-I, -II, -III, -VI 各アイソザイムの組織局在を調べた結果を Table 3 に示す。陽性対照として耳下腺を用いた。全ての CA 抗血清に対する反応は細胞質にび慢性に見られ、粘膜下組織の線維芽細胞や血管内皮細胞は非特異的に弱い反応を示した。

涙腺では、漿液腺房は CA-I 抗血清に対して反応を示さなかったが、他の CA-II, -III, -VI 各抗血清に対しては少数の細胞のみが弱い反応を示した。導管上皮では CA-I, -II, -III 各抗血清に対して、反応を示した細胞と示さなかった細胞が混在していた。一方 CA-VI 抗血清に対しては全ての細胞が陽性反応を示した（Figs. 28a, 28b, 28c, 28d）。第三眼瞼腺では、漿液腺房は CA-I, -II, -III, -VI 全ての CA 抗血清に対して、一部の細胞のみが反応を示した。導管上皮と脂腺細胞は、全ての CA 抗血清に対して反応を示した。特に CA-II 抗血清と CA-VI 抗血清に対する反応は、導管

上皮の管腔側で強い反応を示した (Figs. 29a, 29b, 29c, 29d)。瞼板腺は脂質分泌を行なう脂腺細胞から成り (Fig. 30)、これらの細胞は全ての CA 抗血清に対して強く反応を示した。特に、腺房の辺縁にある未分化な細胞は管腔側の細胞よりも強い反応を示した。これらの腺の導管上皮細胞は、全ての CA 抗血清に対して弱い反応を示した (Figs. 31a, 31b, 31c, 31d)。睫毛腺は瞼板腺と同様に脂腺から成り、CA 抗血清に対する反応は瞼板腺と同様に全てのアイソザイムで見られ、腺房の辺縁にある細胞がより強く反応し、導管上皮の反応は弱かった (Figs. 32a, 32b, 32c, 32d)。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法にて、涙器における CA-VI 蛋白の検索を行った。その結果、陽性対照とした耳下腺と比較して少量ではあるが、涙腺、第三眼瞼腺、上眼瞼（瞼板腺と睫毛腺を含む）の各部において CA-VI 蛋白の存在が認められた (Fig. 33)。

RT-PCR

採材した各組織由来のトータル RNA を用いた RT-PCR によって、CA-II, -VI の遺伝子発現を定性的に調べた。その結果、CA-II の増幅産物である 358bp のバンドと、CA-VI の増幅産物である 441bp のバンド、内部標準として用いた β -actin の増幅産物である 316bp のバンドは、検索を行った全ての部位（耳下腺、涙腺、第三眼瞼腺、上眼瞼）において確認され

た (Fig. 34)。

定量的 PCR

採材した各組織由来の cDNA を用いて CA-VI の定量的 PCR を行なった。CA-VI の測定値を内部標準として用いた β -actin の測定値で補正を行い、各組織でのイヌの CA-VI mRNA の相対的な発現量を求めた。得られたデータを片対数グラフとして表したものが Fig. 35 である。その結果を上眼瞼での発現量を基準として比較すると、涙腺での発現量は約 26 倍、第三眼瞼腺では約 70 倍を示した。一方で陽性対照とした耳下腺では 2 万倍以上の発現量を示した。

In situ hybridization

RT-PCR によって得られた CA-VI 増幅産物を用いて作製した RNA プローブを使用して、in situ hybridization を行い、組織上での CA-VI 遺伝子発現の確認を行った。陽性対照として使用した耳下腺では、漿液腺房は強い反応を示したが (Fig.8)、導管上皮と粘液腺房は反応を示さなかった。検索を行った涙腺 (Fig. 36)、第三眼瞼腺 (Fig. 37)、瞼板腺 (Fig. 38)、睫毛腺 (Fig. 39) の全ての部位において反応は見られなかった。

透過型電子顕微鏡による微細構造の観察

第三眼瞼腺の終末部を構成する細胞を透過型電子顕微鏡で観察する

と、それぞれの細胞の形態的特徴から 3 種類の細胞に分類できた。

一つ目は、細胞の基底側に偏位する大型円形で不均整な核を持つ細胞で、このタイプの細胞の特徴は核上部の細胞質に全て均一な高電子密度の分泌顆粒を持っていることで、この細胞を I 型とした (Fig. 40)。

二つ目は、大型円形もしくは扁平で不均整な核が細胞の基底側に偏位するもので、この細胞には核上部の細胞質に、2, 3 種の異なる電子密度の分泌顆粒が認められ、この細胞を II 型とした (Fig. 41)。

三つ目は、細胞の基底側に偏位する大型円形もしくは扁平で不均整な核を持ち、核上部の細胞質には、形態の異なる 2 種類の顆粒を持つものであった。少数の顆粒は、前述した細胞にみられた顆粒のような高電子密度な顆粒であったが、大多数の顆粒は空胞様構造であり、この細胞を III 型とした (Fig. 42)。

膵板腺の終末部を構成する細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると、腺房辺縁部にある未分化な細胞では核は大きく細胞の大部分を占め、脂質滴は存在していなかった (Fig. 43)。

しかし、さらに腺腔側のより分化した細胞では、核に対し細胞質の占める割合が増大し、細胞質内に脂質滴も多数観察された。脂質滴は形、数、大きさはさまざまであり、それぞれは限界膜によって画されていた。腺腔側に近い細胞の脂質滴は互いに融合し、次第に大きくなり、限界膜も消失していた (Fig. 44)。

完全に分化した成熟細胞は最終的には細胞全体が崩壊していた。また

その場合、核は萎縮し星形になるものやまたは破壊されているものがみられた。細胞全体は大きくなり変形し、脂肪滴は互いに融合し巨大化し、大部分の限界膜は消失し、細胞質基質は著しく乏しくなっていた (Fig. 45)。

考察

本章では、イヌの涙器における CA アイソザイムの組織局在と遺伝子発現について検索を行った。その結果、CA-I, -II, -III, -VI の各蛋白の組織での存在と CA-II, -VI の遺伝子発現が明らかとなった。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの涙器に少量ながら存在することが確認された。また、涙器における CA 遺伝子の発現量は耳下腺と比較して非常に低かったが、その存在が確認された。定性的 PCR によって示された CA-VI の遺伝子発現が in situ hybridization では検出できなかったのは、第 2、3 章での呼吸器で述べた理由と同様であると考えられた。

これまでに涙器での CA アイソザイムの局在に関して、ラットの涙腺で一部の漿液細胞が CA-VI 抗血清に反応を示した報告や (Ogawa et al., 1995)、ヒツジの涙腺でラットと同様に一部の漿液細胞が免疫組織化学染色で CA-VI 抗血清に反応を示し、さらに CA-VI mRNA の発現が RT-PCR と in situ hybridization によって確認されている (Ogawa et al., 2002)。これらの報告では、CA 蛋白が認められた漿液細胞は涙腺全体の少数であり、その遺伝子発現も耳下腺と比較して非常に少量であった。本章での実験結果はこれらの報告と類似するものであった。また、第三眼瞼腺の導管では、CA-II, -VI 抗血清に対する反応が導管上皮の管腔側で強い反応を示した。Vince et al. (1998) は赤血球膜において、CA-II と HCO_3^- の輸送体である AE-1 (陰イオン交換輸送体 1; Anion Exchanger 1) の結合を報告している。これは、 HCO_3^- の輸送や合成に関与する酵素

群が複合体を形成し、その酵素反応の効率を上げるものであり (Srere, 1987)、近年この複合体は、bicarbonate transport metabolon という概念として提唱されている (Sterling et al., 2001)。今回の導管上皮における管腔側での CA-II のより強い発現は、この複合体との関連が考えられた。

涙器付属腺は、涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺などから成り、これらの腺は涙液を産生する。この涙液は3層から成り、最外層の脂質層は主に瞼板腺の分泌物に由来している。この脂質層は涙液を均等に広げ涙液の安定化に関与する。中間層の水様層は、イヌではその70%が涙腺由来であり、30%が第三眼瞼腺由来であり (Gelatt, 1991; Helper, 1996)、角膜を湿らせまた角膜上皮に栄養を供給している。最内層の粘液様層は、結膜にある杯細胞に由来し、涙液を密接に角膜へ付着している。涙腺と第三眼瞼腺の腺房細胞に関する分類で、イヌの第三眼瞼腺には、ブタなどに見られる深第三眼瞼腺 (ハーダー腺) にある細胞と類似した脂質細胞が見られたとの報告がある (Martin et al., 1988)。今回の研究で、イヌの第三眼瞼腺において形態的に脂腺細胞と考えられた細胞は、脂肪染色である Sudan 黒染色で細胞質に脂質滴を含むことが確認された。透過型電子顕微鏡による観察結果と、Martin ら(1988)による結果を照らせば、高電子密度の顆粒を持つ細胞は、PAS 反応とアルシアンブルー染色 (pH1.5) で陽性であったとの報告より、今回分類したⅠ型とⅡ型細胞は漿液性あるいは漿粘液性分泌細胞であり、Ⅲ型細胞は脂質分泌細胞と思われた。したがってこのⅢ型細胞は涙液の脂質層を形成する脂質を供

給する細胞のひとつと思われる。しかしこの細胞が、一般的な脂腺細胞のような全分泌を示す形態を確認することは出来なかったことから、瞼板腺のように脂質を産生していると考えられるが、その分泌形態は異なっている可能性が示された。

一方、瞼板腺の電子顕微鏡による微細構造の観察では、腺房細胞は皮脂腺細胞と非常に酷似していた。この細胞は腺腔に向かうにつれ変性し、細胞そのものが分泌物となり、腺腔に全分泌される。よってこれらの細胞は、涙液の最外層である脂質層の形成に関与していると考えられる。これまでに脂腺細胞における CA アイソザイムの局在の報告は、皮膚皮脂腺に CA-I, CA-II が発現していると報告がある (Noda et al., 1987) が、この脂質分泌細胞における CA アイソザイムの機能的意義は依然不明である。しかし *in vitro* では、CA は数種類のエステル加水分解を触媒することが知られており (今堀ら 1984)、第三眼瞼腺や瞼板腺、睫毛腺の脂腺細胞における CA アイソザイムは脂質代謝が盛んであるとされる腺房辺縁の未分化な脂腺細胞でより強く発現していたことから、細胞が作る脂質あるいはその形成過程における脂質代謝との関連があることが示唆された。これは CA の新たな機能を示唆していると思われる。今後は、CA と脂質代謝との関連を明らかにするために、涙器付属腺以外の脂腺における CA の局在を検討する必要があると考えられる。

涙腺、第三眼瞼腺などの涙器付属腺によって産生された涙液は、眼球表面を覆うことによってそこでの微小環境を維持する重要な役割を果

たしていると考えられる。涙液全体の 30%を産生する第三眼瞼腺は、イヌにおいては涙腺と同様にその存在意義は大きく、外科的に切除した場合には、乾燥性角結膜炎の発症が増加すること (Brooks et al., 1991) や、涙液産生量の減少及び涙液の pH の若干の上昇 (Saito et al., 2001) が報告されている。これらの報告から、分泌型である CA-VI は、耳下腺などの唾液腺に比較して非常に微量ではあるが涙液中に分泌され、涙液中で HCO_3^- を産生することで、大気中の CO_2 の拡散によって生じる H^+ を中和し角膜上皮の保護を行っていると考えられ (Ogawa et al., 2002)、角膜上皮における細胞質型 CA アイソザイムと相補的にその緩衝能によって角膜上皮を保護していると考えられる。また細胞質型である CA-I, -II, -III は、涙腺や第三眼瞼腺の腺房や導管上皮における微小環境の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送に関わり、第三眼瞼腺や瞼板腺、睫毛腺では脂質代謝への関与や腺房での局所の酸塩基平衡と関わっている可能性が考えられるが、その詳細について更なる検討が必要である。また、涙器によって産生された涙液は鼻涙管を經由して鼻腔内へと流れる。涙器付属腺で産生・分泌された涙液中に含まれる CA-VI の量は非常に少量であるが、涙液中の CA が鼻腔に注ぎ込むことによって多少なりとも鼻腔内環境の維持に関与していることが推論された。

小括

イヌの涙器付属腺（涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺）において、細胞質型 CA である CA-I, -II, -III と分泌型である CA-VI の組織局在と遺伝子発現を検討した。その結果、涙腺と第三眼瞼腺の一部の漿液腺房で CA アイソザイムの存在が確認され、脂腺細胞である瞼板腺や睫毛腺、第三眼瞼腺の脂腺細胞でも CA アイソザイムが確認された。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの涙器に少量ながら存在することが確認された。また CA-II, -VI の遺伝子発現は、全ての組織において定性的・定量的 PCR で確認されたが、in situ hybridization では確認されなかった。また電子顕微鏡による微細構造の確認によって、イヌの第三眼瞼腺には漿液、漿粘液を産生する細胞以外に、脂質生成を行なう細胞があることが明らかとなった。

以上より、イヌの涙器において CA は涙液産生を行う漿液腺房の一部と脂腺細胞に存在し、CA-VI は涙液中に分泌され、CA-I, -II, -III は局所においてその緩衝能によって涙液や眼球表面の酸塩基平衡の維持に関与することで、角膜上皮の障害を防いでいると考えられた。さらに、分泌型 CA は鼻涙管を経て鼻腔内へ至り、鼻腔内の局所における酸塩基平衡の維持に関与する可能性が考えられた。また脂腺細胞における CA の存在が示されたが、その機能については脂質代謝との関連が示唆された。

第 5 章

総 括

上部気道であるイヌの鼻腔粘膜（鼻前庭部粘膜、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部、外側鼻腺）において、細胞質型 CA である CA-I, -II, -III と分泌型である CA-VI の組織局在と遺伝子発現を検討した。その結果、免疫組織化学染色にて鼻前庭部の重層円柱上皮と、鼻粘膜嗅部、鼻粘膜呼吸部の杯細胞を除く全ての線毛上皮に全てのアイソザイムが存在した。また鼻前庭腺、嗅腺、鼻腺の各漿液腺房ではアイソザイムによって異なるが CA の局在が確認された。また鼻粘膜嗅部では、一部の嗅細胞が CA 抗血清に対して特に強く反応した。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの鼻腔粘膜に非常に少量ながら存在することが確認された。また CA-II, -VI の遺伝子発現は、全ての組織において定性的あるいは定量的 PCR で確認されたが、in situ hybridization では確認されなかった。

よって、イヌの鼻腔において CA は鼻腔粘膜の上皮に存在し、その機能は酵素が持つ緩衝能によって鼻腔粘膜の酸塩基平衡の維持に関与することと考えられる。感覚器でもある鼻粘膜嗅部では、CA は嗅物質と嗅細胞の接触に必要な粘液層の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送に関与すると考えられた。さらに、嗅細胞では CA 抗血清に特に強く反応する結果が得られたことから、CO₂ 濃度や嗅物質の感知との関連も示唆された。

次に、鼻腔から連続するイヌの喉頭及び下部気道粘膜（気管頸部、気管頸胸部、気管胸部、気管分岐部、主気管支、肺葉肺門部、肺葉尖端部）において、細胞質型 CA である CA-I, -II, -III と分泌型である CA-VI の組

組織局在と遺伝子発現を検討した。免疫組織化学染色の結果、喉頭から細気管支に渡る全ての線毛上皮では、全ての CA アイソザイムが存在したが、粘膜上皮の杯細胞では CA アイソザイムの存在が見られなかった。また、気管腺、気管支腺の漿液腺房でも全ての CA アイソザイムの存在が確認された。細気管支分泌細胞では、全ての CA アイソザイムが存在した。肺胞の呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞では一部の細胞のみが CA-II, -VI 抗血清に反応した。また、ウェスタンブロット法により CA-VI 蛋白は少量ながら存在することが確認された。また CA-II, -VI の遺伝子発現は、全ての組織において定性的及び定量的 PCR で確認されたが、in situ hybridization では確認されなかった。

以上より、イヌの喉頭及び下部気道において CA は気道粘膜の上皮に存在し、細胞質型 CA と分泌型 CA は鼻腔と同様に、 HCO_3^- を用いた酸の中和を行い、気道粘膜の酸塩基平衡の維持に関与すると考えられた。また、気道粘膜の酸による線毛運動の抑制を防ぎ、粘膜を保護する可能性が考えられた。これまでに報告された他の動物と異なり、気道粘膜の全ての線毛上皮に CA が存在する事から、イヌの呼吸器系では微小環境の維持に対する CA の役割は大きい可能性が考えられた。細気管支分泌細胞における CA アイソザイムの存在が確認されたが、その機能的意義は不明である。肺胞上皮における CA アイソザイムは一部の細胞のみが局在を示した。肺では、ガス交換においては赤血球に存在する CA-II が主に働き、血漿中の H^+ と HCO_3^- から CO_2 を産生する。また肺胞上皮の CA-II

や CA-IV、CA-VI は、肺胞上皮細胞内の H^+ と HCO_3^- を CO_2 に変換すると考えられた。

イヌの涙器付属腺（涙腺、第三眼瞼腺、瞼板腺、睫毛腺）において、細胞質型 CA である CA-I, -II, -III と分泌型である CA-VI の組織局在と遺伝子発現を検討した。その結果、涙腺と第三眼瞼腺の一部の漿液腺房で CA アイソザイムの存在が確認され、脂腺細胞である瞼板腺や睫毛腺、第三眼瞼腺の脂腺細胞でも CA アイソザイムが確認された。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの涙器に少量ながら存在することが確認された。また CA-II, -VI の遺伝子発現は、全ての組織において定性的・定量的 PCR で確認されたが、in situ hybridization では確認されなかった。また電子顕微鏡による微細構造の確認によって、イヌの第三眼瞼腺には漿液、漿粘液を産生する細胞以外に、脂質生成を行なう細胞があることが明らかとなった。

以上より、イヌの涙器において CA は涙液産生を行う漿液腺房の一部と脂腺細胞に存在し、CA-VI は涙液中に分泌され、CA-I, -II, -III は局所においてその緩衝能によって涙液や眼球表面の酸塩基平衡の維持に関与することで、眼球表面の微小環境を維持し角膜上皮の障害を防いでいると考えられる。さらに涙液中の分泌型 CA は、鼻涙管を経て鼻腔内で局所の酸塩基平衡の維持に関与すると考えられた。また脂腺細胞における CA の存在が示されたが、その機能については脂質代謝との関連が示唆された。

第 6 章

要 約

炭酸脱水酵素（carbonic anhydrase[E.C.4.2.1.1]以下 CA）は、亜鉛を含む金属結合酵素で、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ の両方向の反応を触媒する。現在までに哺乳類では 12 種類のアイソザイムと、3 種類の CA 関連蛋白が報告されている。一般的な細胞質型アイソザイムとしては CA-I, -II, -III などがあり、唯一の分泌型アイソザイムとしては CA-VI が知られている。CA の主な機能は pH 調節に不可欠な HCO_3^- を供給し体内の酸塩基平衡を維持することである。近年 CA-VI は鼻腔における嗅物質や CO_2 の感知、細気管支分泌細胞における成長因子としての機能が示唆されるなど、多機能蛋白としての役割も注目されている。体内における CA 局在は、赤血球、腎臓、骨、消化器系などにおいて多数報告されており、体組織全般においてその局在が明らかにされてきている。一方、このような蓄積されたデータの中で、生命活動に必要な呼吸ガスの交換器官である呼吸器系器官、および鼻涙管を通して気道と機能的な関連を持つことが推察される涙器付属腺における CA の局在に関する報告は非常に少ない。そこで本研究ではこれらの器官における CA アイソザイムの局在と遺伝子発現を明らかにし、それらの機能的意義を推論することを目的に、イヌの呼吸器系器官として鼻腔領域、喉頭・気管・気管支・肺の領域、涙器付属腺について 3 章に分けて検討した。検索対象としたアイソザイムは、これまでに呼吸器系に存在しているという報告のある CA-I, -II、CA 阻害剤であるアセタゾラミド抵抗性という特徴を持つ CA -III、及び唯一の分泌型である CA-VI とした。

全ての CA アイソザイムの検索は免疫組織化学染色法を用い、さらに分泌型の CA-VI 蛋白の検索ではウェスタンブロット法を併用した。CA 遺伝子発現の確認は、CA-II と CA-VI では定性的 PCR を行い、さらに CA-VI については定量的 PCR と in situ hybridization による検索も行なった。また、涙器付属腺においては、免疫組織化学染色法による CA の組織局在の観察の他、CA アイソザイム抗血清に反応が見られた第三眼瞼腺および瞼板腺の脂腺細胞の微細構造について透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

【鼻腔における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索】

免疫組織化学染色法による観察では、粘膜上皮と導管上皮では検索を行った全ての CA アイソザイム抗血清（以下 CA 抗血清）に対する反応が見られた。鼻前庭腺、嗅腺、鼻腺の各漿液腺房では一部の細胞において CA 抗血清に対する反応が見られたが、外側鼻腺の漿液腺房では全ての CA 抗血清に対する反応は見られなかった。粘液腺房や杯細胞では全ての CA 抗血清に対して反応は見られなかった。鼻粘膜嗅部では一部の嗅細胞で CA-II, -III, -VI 抗血清に対して特に強い反応があった。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの鼻腔領域に少量ながら存在することが確認された。定性的 PCR では、CA-II, -VI 双方の遺伝子発現が、検索を行った全ての部位で確認された。定量的 PCR の結果、外側鼻腺での CA-VI 遺伝子の発現量と比較して、鼻前庭部での発現量は 100 倍

以上、鼻粘膜嗅部や鼻粘膜呼吸部での発現量は約 10 倍だった。In situ hybridization では、CA-VI の遺伝子発現は確認されず、この結果は下部気道や涙器付属腺においても同様であった。これは、定量的 PCR より CA-VI の遺伝子発現量が低いことが明らかとなっており、検出感度以下であったためと考えられた。

イヌの鼻腔内における CA アイソザイムの機能は、その緩衝能によって上部気道粘膜において産生される外因性の酸を中和し粘膜を保護し、鼻前庭部粘膜や鼻粘膜呼吸部では、このような CA の機能によって上部気道での呼気や吸気に接する粘膜上の酸塩基平衡を維持し、微小環境が保たれていると考えられた。鼻腔粘膜の各漿液腺房や導管上皮では、細胞質型 CA は細胞内の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送を、また分泌型 CA は導管内の分泌物中の酸塩基平衡を維持していると考えられた。鼻粘膜嗅部では既に報告されているモルモット、マウスと同様、イヌにおいても一部の嗅細胞が CA 抗血清に対して特に強く反応していた。鼻粘膜嗅部での CA の存在意義は、粘液層の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送による電解質濃度の調節を通して、CO₂ や嗅物質の感知という機能に関わることを考えられた。

【喉頭及び下部気道における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索】

免疫組織化学染色法による観察では検索を行った全ての CA 抗血清に対する反応が、喉頭をはじめとする気道粘膜上皮、漿液腺房とその導管上皮に見られた。一方で、粘液腺房や杯細胞では全ての CA 抗血清に対する反応は見られなかった。細気管支分泌細胞では、全ての CA 抗血清に対して反応が見られた。肺では、呼吸上皮細胞と大肺胞上皮細胞は、CA-I, -III 抗血清に対して反応は見られなかったが、高活性型である CA-II と分泌型である CA-VI に対しては両細胞とも一部の細胞で反応が見られた。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの喉頭及び下部気道領域に少量ながら存在することが確認された。定性的 PCR では、検索を行った全ての部位で CA-II, -VI 双方の遺伝子発現が見られた。定量的 PCR の結果、肺での CA-VI 遺伝子の発現量と比較して、喉頭から気管支での発現量は約 10 倍、主気管支での発現量はほぼ同量だった。

ヒトにおいて、気道上皮の粘液中の酸が増加することによって細菌の感染性が高くなることが報告されていることから、本研究のイヌにおいて気道上皮の CA アイソザイムの機能は、鼻腔と同様にその緩衝能によって、粘膜上の酸を中和し気道粘膜を保護している可能性が考えられた。気道粘膜上皮の CA 局在は、モルモットなどの報告では一部の上皮でのみ見られたとされているが、イヌでは一様に見られた。イヌは体温調節の際に panting を行い、大量の気体が気道を通過する際の気化熱で体温

を下げる。そのためイヌの気道上皮は、大気との接触が多く、CA は気道粘膜に広く存在する可能性が考えられた。また本研究ではラットと同様、イヌにおいても細気管支分泌細胞に CA アイソザイムの局在が確認された。この局在の意義についてラットでは CA の成長因子としての機能が示唆されていることから、イヌにおいても同様に成長因子としての可能性が考えられたが、本研究では成犬のみ対象としていることから、その意義については今後の検討が必要である。肺胞上皮における CA アイソザイムの局在は、一部の細胞で CA-II と CA-VI が見られたのみであった。肺では、ガス交換においては赤血球に存在する CA-II が主に働き、血漿中の H^+ と HCO_3^- から CO_2 を産生する。また肺胞上皮の CA-II や CA-IV、CA-VI は、肺胞上皮細胞内の H^+ と HCO_3^- を CO_2 に変換すると考えられた。

【涙器付属腺における CA-I, -II, -III, -VI の組織局在と遺伝子発現の検索】

免疫組織化学染色法による観察では全ての CA アイソザイム抗血清に対する反応が、涙腺と第三眼瞼腺の一部の漿液腺房と導管上皮、また第三眼瞼腺と瞼板腺、睫毛腺の脂腺細胞に見られた。瞼板腺や睫毛腺の脂腺の腺房では、腺房辺縁の未分化な細胞でより強い反応がみられた。CA-VI 蛋白はウェスタンブロット法によりイヌの涙器付属腺に少量ながら存在することが確認された。遺伝子発現の検討結果は、呼吸器系と同様に CA-II, -VI の定性的 PCR の結果、両アイソザイムの遺伝子発現が確

認められた。定量的 PCR の結果、上眼瞼（瞼板腺と睫毛腺を含む）での CA-VI 遺伝子の発現量と比較して、涙腺や第三眼瞼腺での発現量は 10 倍以上だった。

涙腺、第三眼瞼腺などの涙器付属腺によって産生された涙液は、眼球表面を覆うことで、その部位の微小環境の維持にとって重要な役割を果たしている。イヌにおいて涙液全体の 30%を産生すると言われる第三眼瞼腺は、涙腺と同様にその存在意義は大きく、外科的に切除した場合には乾燥性角結膜炎の増加や、涙液産生量の減少及び涙液の pH の若干の上昇が報告されている。このことから涙腺や第三眼瞼腺で産生され涙液中に分泌された CA-VI は、涙液中で HCO_3^- を産生することで、大気中の CO_2 の拡散によって生じる H^+ を中和し角膜上皮の保護を行っていると考えられ、角膜上皮における細胞質型 CA アイソザイムと相補的にその緩衝能によって角膜上皮を保護していると考えられる。さらに鼻涙管を経て鼻腔内へと注ぎこむことで、鼻腔内の微小環境の維持に関与している可能性が考えられた。また、涙器付属腺の腺房や導管上皮にみられた細胞質型アイソザイムである CA-I, -II, -III は、他の組織と同様に微小環境の酸塩基平衡の維持やイオンの輸送に関わっていると考えられる。また、第三眼瞼腺で CA アイソザイム抗血清に反応を示した脂腺細胞は、ブタなどに見られる深第三眼瞼腺（ハーダー腺）にある細胞と類似し、涙液の最外層の脂質層を形成する脂質を供給する細胞のひとつと考えられた。この脂腺細胞を透過型電子顕微鏡により観察すると、その微細構

造が同じ涙器付属腺である瞼板腺の脂腺細胞とは異なることが明らかとなった。脂腺細胞中に CA があるとの報告は未だなく、その存在意義は不明である。しかし脂質代謝がより盛んな脂腺の腺房辺縁にある未分化な細胞が、脂質を豊富に含み全分泌される直前の分化した細胞と比べて強く反応したことから、この酵素が細胞内の脂質代謝に何らかの役割を果たしている可能性が考えられ、CA の新たな機能を示唆していると思われた。

図表

Table 1

鼻腔における免疫組織化学染色の結果

		CA-I	CA-II	CA-III	CA-VI
鼻粘膜前庭部	粘膜上皮	+	+	+	+
鼻前庭腺	漿液腺房	±	±	±	±
	導管上皮	+	+	+	+
鼻粘膜嗅部	粘膜上皮	+	+	+	+
嗅腺	漿液腺房	±	±	+	+
	導管上皮	+	+	+	+
鼻粘膜呼吸部	粘膜上皮	+	+	+	+
鼻腺	漿液腺房	-	-	+	-
	導管上皮	+	+	+	+
外側鼻腺	漿液腺房	-	-	-	-
	導管上皮	+	+	+	+

+: CA 抗血清に反応がみられた -: CA 抗血清に反応がみられなかった

±: CA 抗血清に反応がみられた細胞とみられなかった細胞が混在

Table 2

喉頭及び下部気道における免疫組織化学染色の結果

		CA-I	CA-II	CA-III	CA-VI
喉頭蓋	粘膜上皮	+	+	+	+
喉頭蓋腺	漿液腺房	+	+	+	+
	粘液腺房	-	-	-	-
	導管上皮	+	+	+	+
	導管上皮	+	+	+	+
気管	粘膜上皮	+	+	+	+
気管腺	漿液腺房	+	+	+	+
	粘液腺房	-	-	-	-
	導管上皮	+	+	+	+
	導管上皮	+	+	+	+
気管支	粘膜上皮	+	+	+	+
気管支腺	漿液腺房	+	+	+	+
	粘液腺房	-	-	-	-
	導管上皮	+	+	+	+
	導管上皮	+	+	+	+
細気管支	粘膜上皮	+	+	+	+
	細気管支分泌細胞	+	+	+	+
肺	呼吸上皮細胞	-	±	-	±
	大肺胞上皮細胞	-	±	-	±

+: CA 抗血清に反応がみられた - : CA 抗血清に反応がみられなかった

± : CA 抗血清に反応がみられた細胞とみられなかった細胞が混在

Table 3

涙器における免疫組織化学染色の結果

		CA-I	CA-II	CA-III	CA-VI
涙腺	漿液腺房	-	±	±	±
	導管上皮	±	±	±	+
第三眼瞼腺	漿液腺房	±	±	±	±
	脂腺腺房	+	+	+	+
	導管上皮	+	+	+	+
瞼板腺	脂腺腺房	+	+	+	+
	導管上皮	+	+	+	+
睫毛腺	脂腺腺房	+	+	+	+
	導管上皮	+	+	+	+

+: CA 抗血清に反応がみられた -: CA 抗血清に反応がみられなかった

±: CA 抗血清に反応がみられた細胞とみられなかった細胞が混在

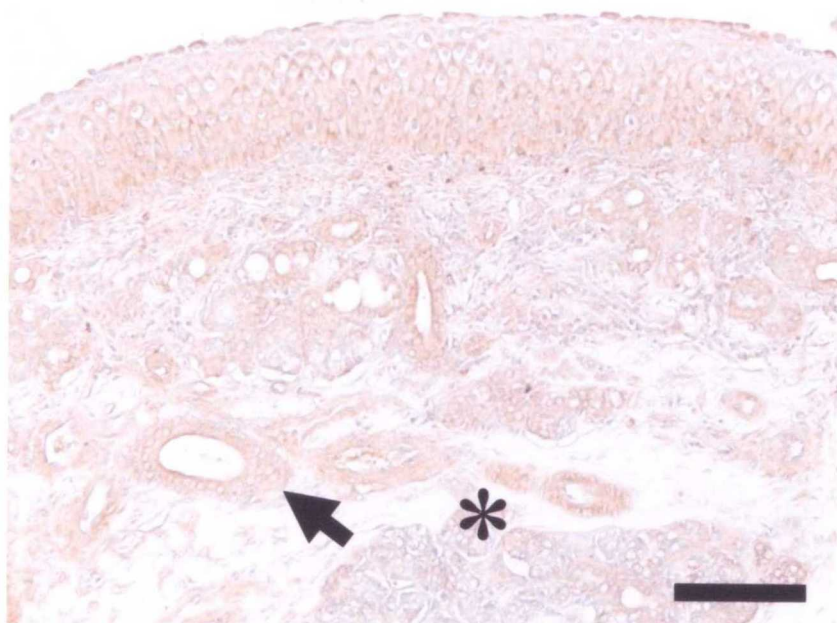


Fig. 1a
鼻前庭部 CA-I (scale; 100 μ m)

重層円柱上皮と導管上皮 (→) はCA-I抗血清に反応を示した。
漿液腺房(*)は反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

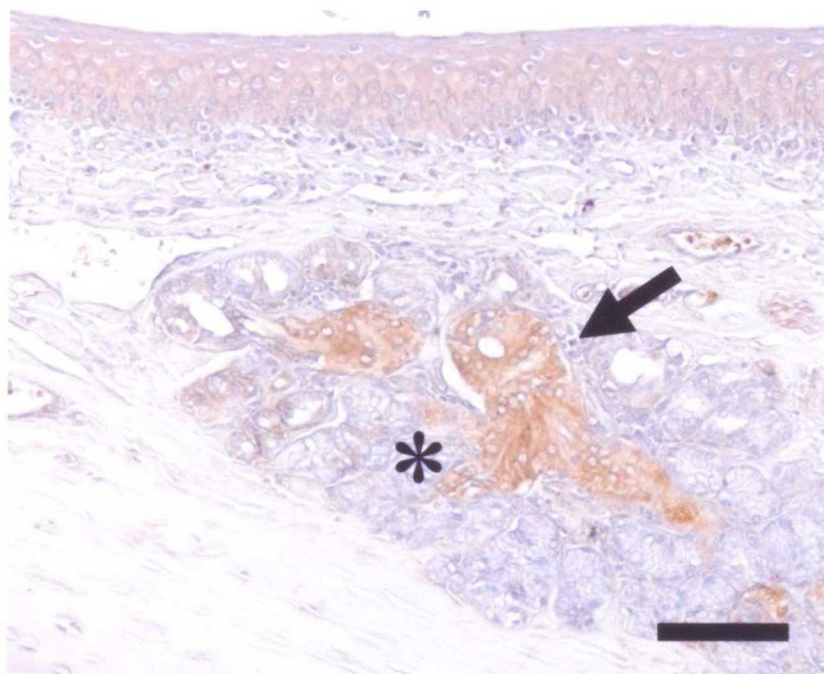


Fig. 1b
鼻前庭部 CA-II (scale; 100 μ m)

重層円柱上皮と導管上皮 (→) はCA-II抗血清に反応を示した。
漿液腺房(*)は反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

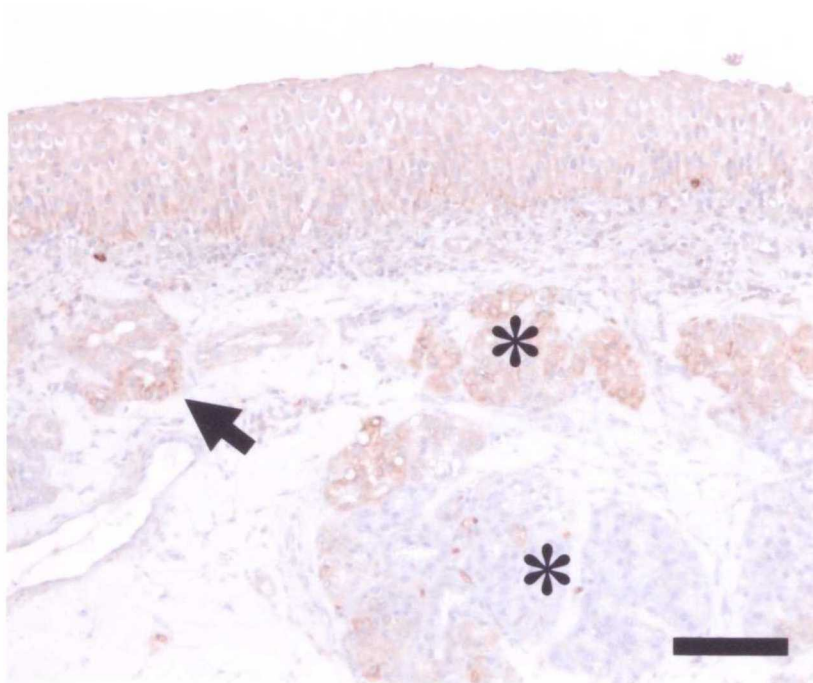


Fig. 1c
鼻前庭部 CA-III (scale; 100 μ m)

重層円柱上皮と導管上皮 (→) はCA-III抗血清に反応を示した。
漿液腺房(*)は反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

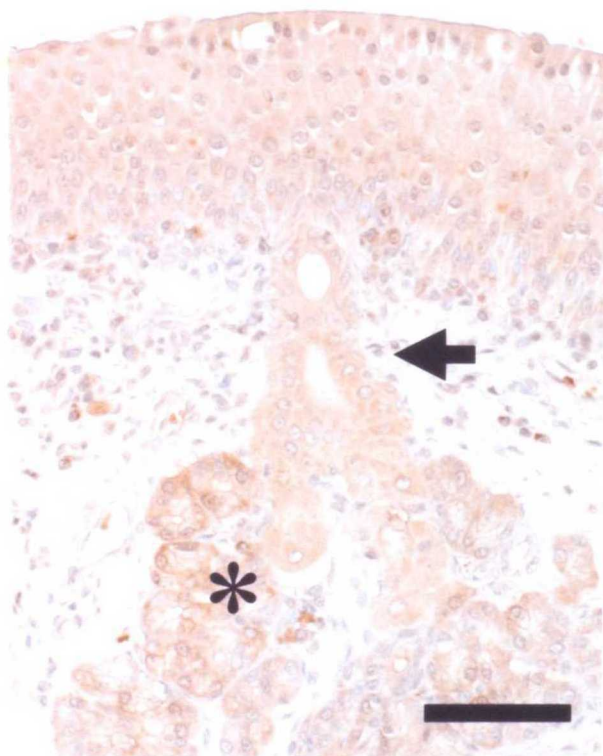


Fig. 1d
鼻前庭部 CA-VI (scale; 100 μ m)

重層円柱上皮と導管上皮 (→) は
CA-VI抗血清に反応を示した。
漿液腺房 (*) は反応を示す細胞
と示さない細胞が混在していた。

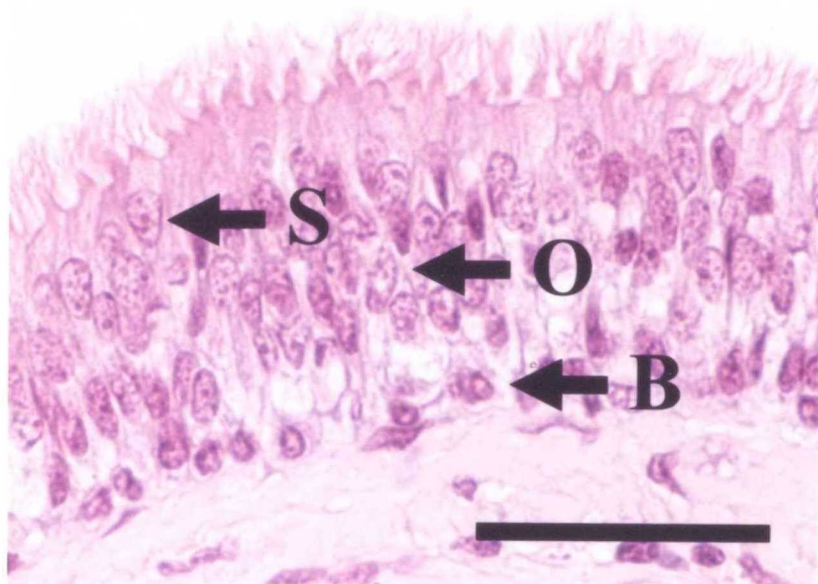


Fig. 2a
鼻粘膜嗅部 HE染色 (scale; 50 μ m)

嗅粘膜は一般的に、管腔側より支持細胞の核 (S)、嗅細胞の核 (O)、基底細胞の核 (B) の3層を示す。

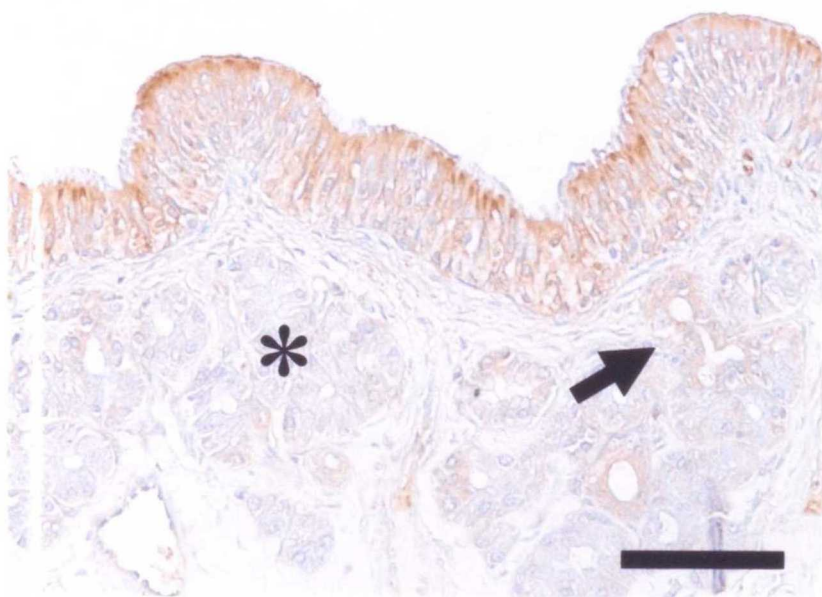


Fig. 2b
鼻粘膜嗅部 CA-I (scale; 100 μ m)

粘膜上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞のいずれの細胞もCA-I抗血清に反応を示した。導管上皮 (→) も同様であった。嗅腺の漿液腺房 (*) は反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

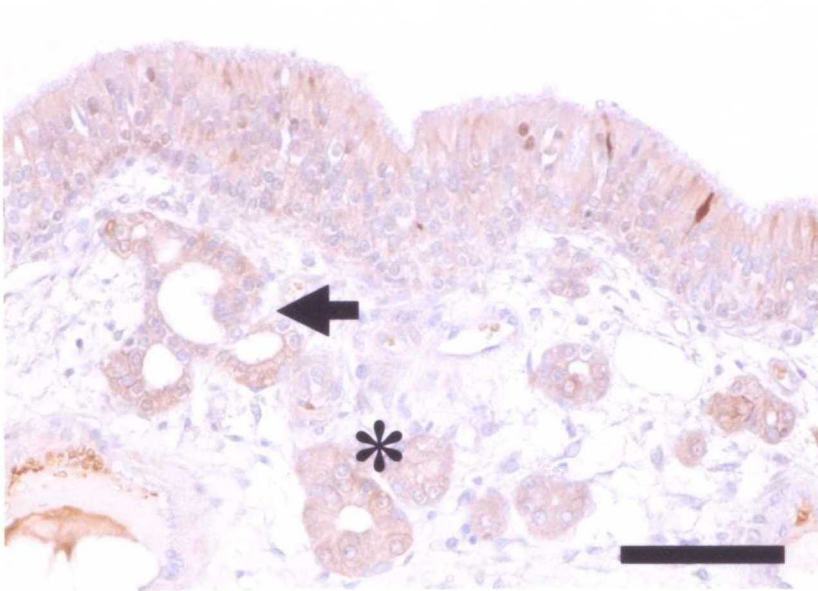


Fig. 2c
鼻粘膜嗅部 CA-II (scale; 100 μ m)

粘膜上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞のいずれの細胞もCA-II抗血清に反応を示した。導管上皮（→）も同様であった。嗅腺の漿液腺房（*）は反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。一部の嗅細胞が、特に強く反応していた。

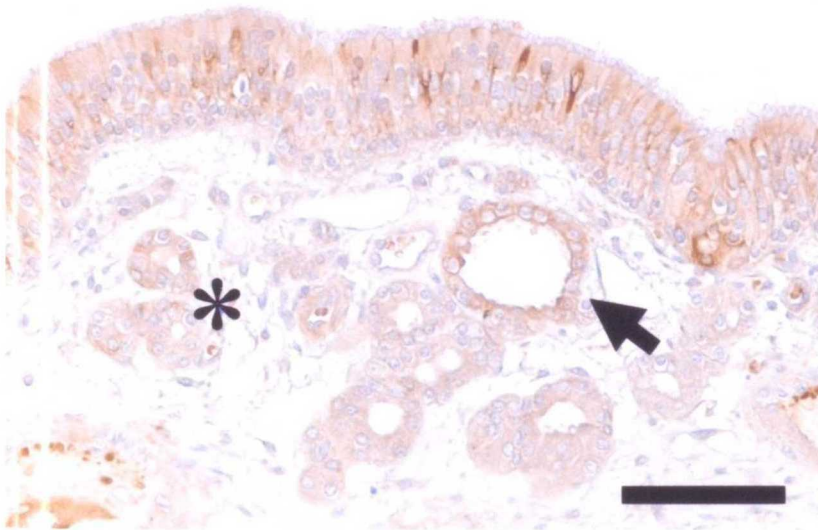


Fig. 2d
鼻粘膜嗅部 CA-III (scale; 100 μ m)

粘膜上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞のいずれの細胞もCA-III抗血清に反応を示した。導管上皮（→）も同様であった。嗅腺の漿液腺房（*）は反応を示した。一部の嗅細胞が、特に強く反応していた。

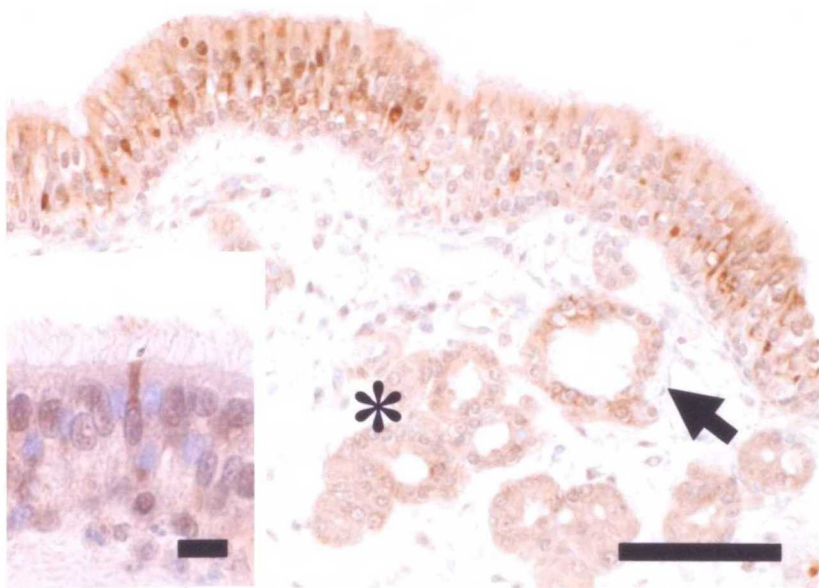


Fig. 2e
鼻粘膜嗅部 CA-VI (scale; 100 μ m)

粘膜上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞のいずれの細胞もCA-VI抗血清に反応を示した。
導管上皮 (→) も同様であった。
嗅腺の漿液腺房 (*) は反応を示した。

左下図 (scale; 20 μ m)
一部の嗅細胞が、特に強く反応していた。

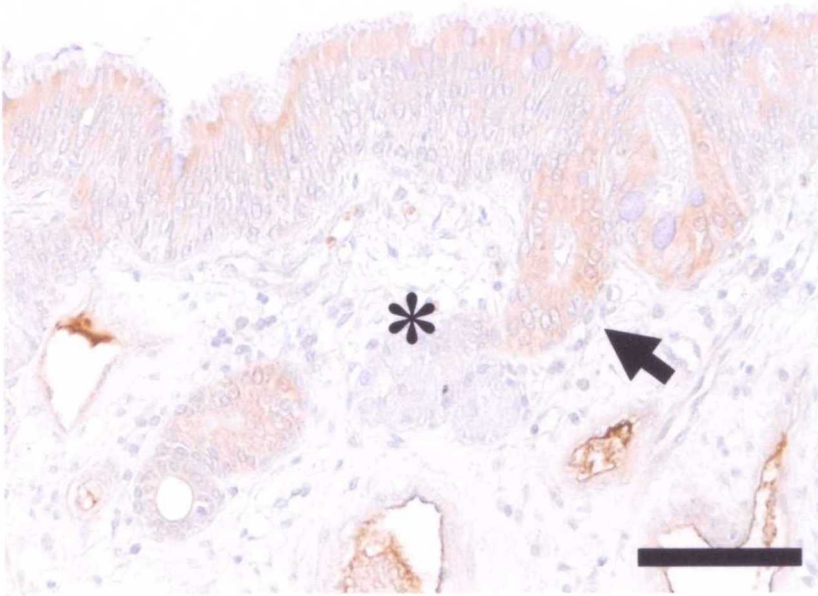


Fig. 3a
鼻粘膜呼吸部 CA-I (scale; 100 μ m)

線毛上皮はCA-I抗血清に反応を示したが、杯細胞は反応を示さなかった。
導管上皮 (→) は反応を示した。
鼻腺の漿液腺房 (*) は、反応を示さなかった。

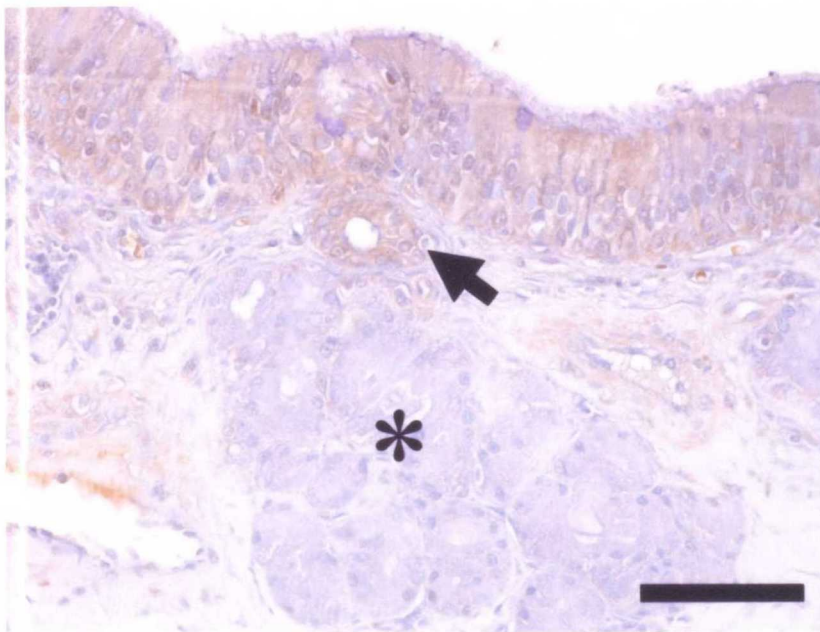


Fig. 3b
鼻粘膜呼吸部 CA-II (scale; 100 μ m)

線毛上皮はCA-II抗血清に反応を示したが、杯細胞は反応を示さなかった。
導管上皮 (→) は反応を示した。
鼻腺の漿液腺房 (*) は、反応を示さなかった。

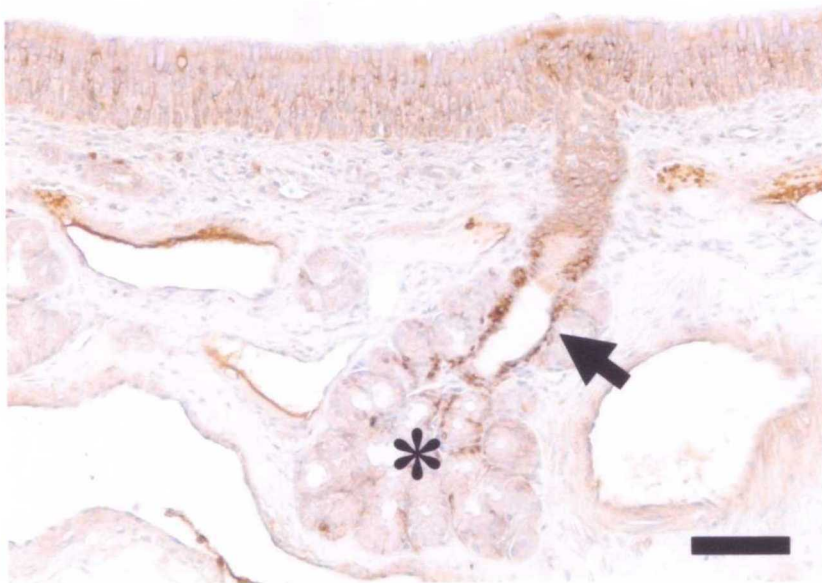


Fig. 3c
鼻粘膜呼吸部 CA-III (scale; 100 μ m)

線毛上皮はCA-III抗血清に反応を示したが、杯細胞は反応を示さなかった。
導管上皮 (→) は反応を示した。
鼻腺の漿液腺房 (*) は、CA-III抗血清に対してのみ反応を示した。

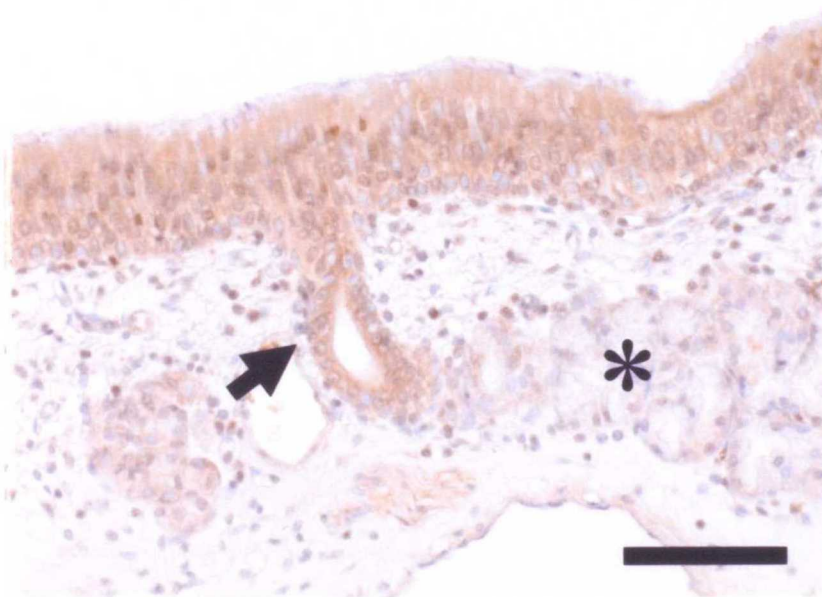


Fig. 3d
鼻粘膜呼吸部 CA-VI (scale; 100 μ m)

線毛上皮はCA-VI抗血清に反応を示したが、杯細胞は反応を示さなかった。
導管上皮は反応を示した。
鼻腺の漿液腺房 (*) は、反応を示さなかった。

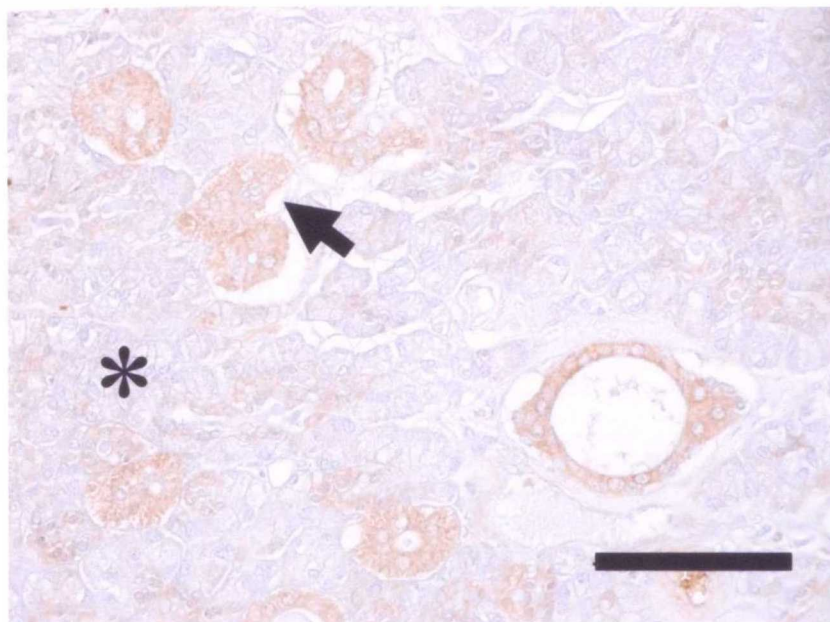


Fig. 4a
外側鼻腺 CA-I (scale; 100 μ m)

漿液腺房 (*) はCA-I抗血清に反応を示さなかった。
線条導管 (→) と介在導管は反応を示した。

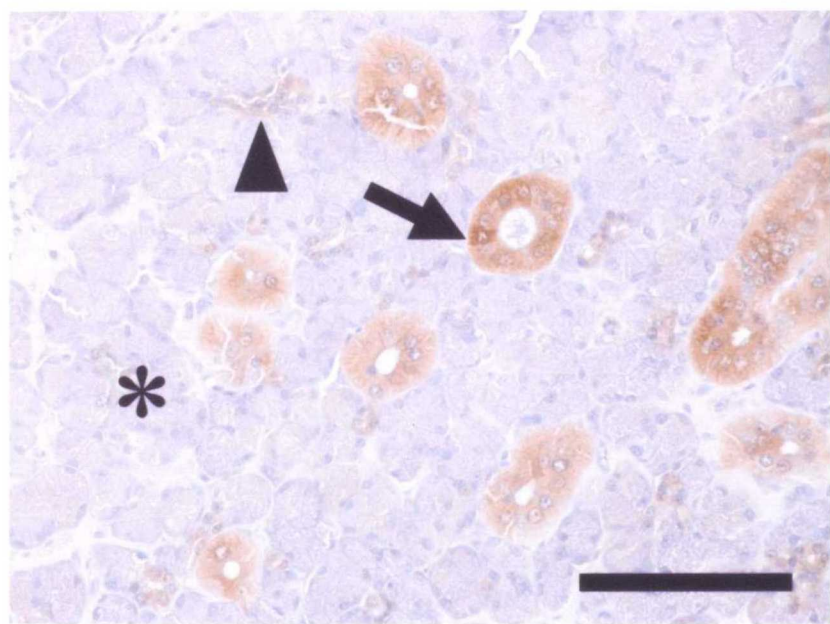


Fig. 4b
外側鼻腺 CA-II (scale; 100 μ m)

漿液腺房 (*) はCA-II抗血清に反応を示さなかった。
線条導管 (→) と介在導管 (矢頭) は反応を示した。

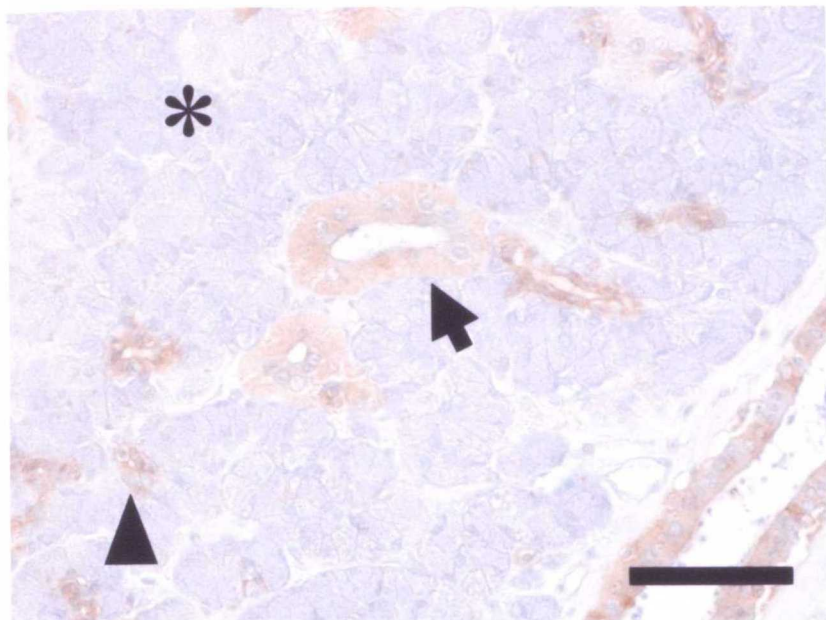


Fig. 4c
外側鼻腺 CA-III (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）はCA-III抗血清に反応を示さなかった。
線条導管（→）と介在導管は反応を示した。

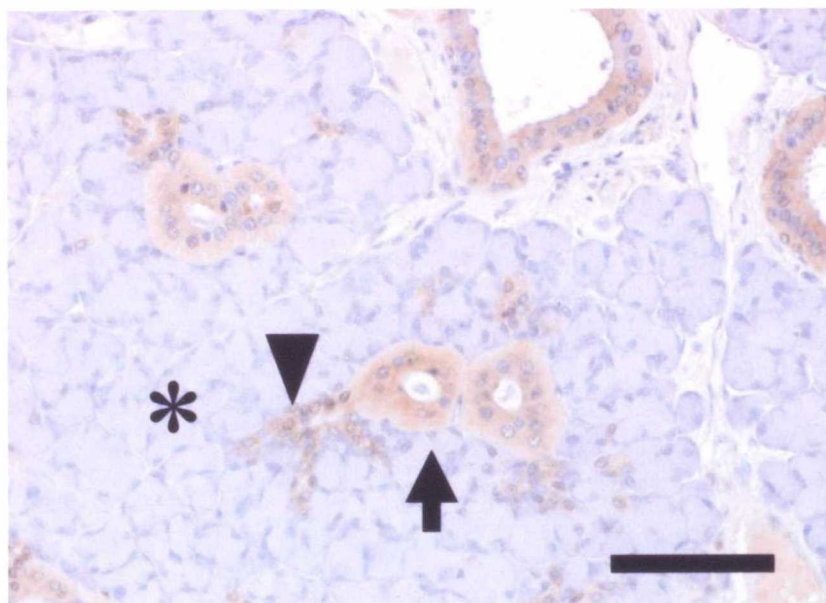


Fig. 4d
外側鼻腺 CA-VI (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）はCA-VI抗血清に反応を示さなかった。
線条導管（→）と介在導管（矢頭）は反応を示した。

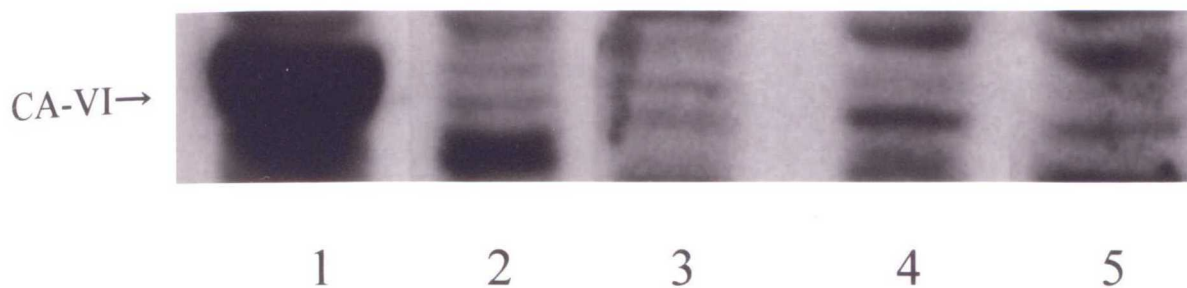


Fig. 5

鼻腔でのウェスタンブロッティングの結果

1：耳下腺 2：鼻前庭部 3：鼻粘膜呼吸部 4：鼻粘膜嗅部 5：外側鼻線

検索を行った全ての部位で少量のCA-VI蛋白が確認された。

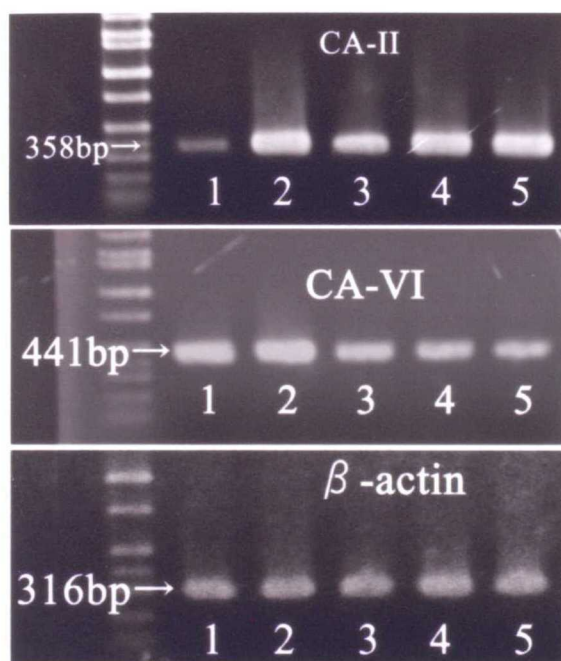


Fig. 6

鼻腔でのRT-PCRの結果

1：耳下腺 2：鼻前庭部 3：鼻粘膜呼吸部 4：鼻粘膜嗅部 5：外側鼻腺

検索を行った全ての部位でCA-II, -VIの遺伝子発現が確認された。

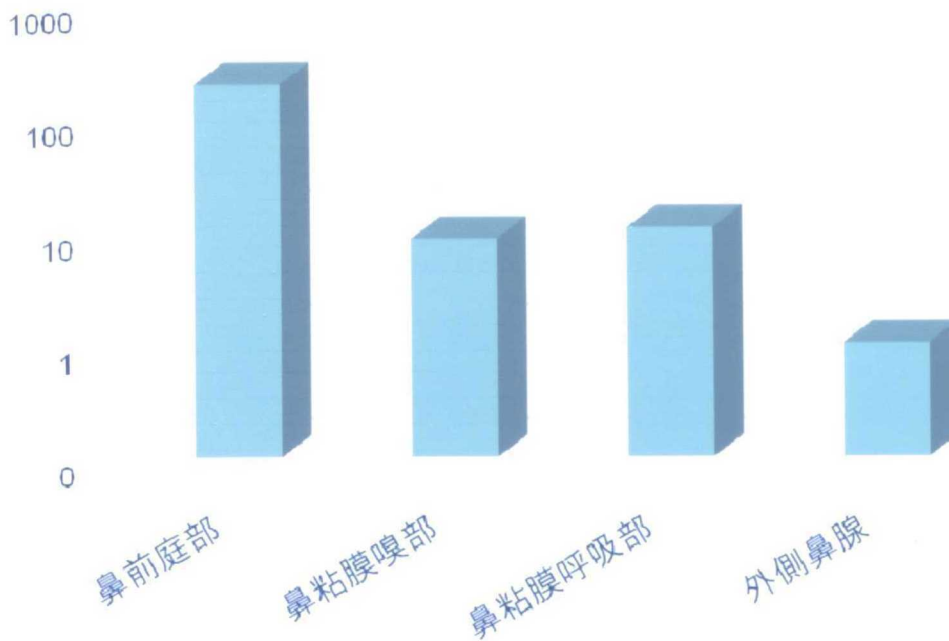


Fig. 7
鼻腔でのCA-VIの定量的PCRの結果

外側鼻腺でのCA-VI mRNAの発現量を基準にして比較すると、鼻前庭部では100倍以上、鼻粘膜嗅部と鼻粘膜呼吸部では約10倍だった。

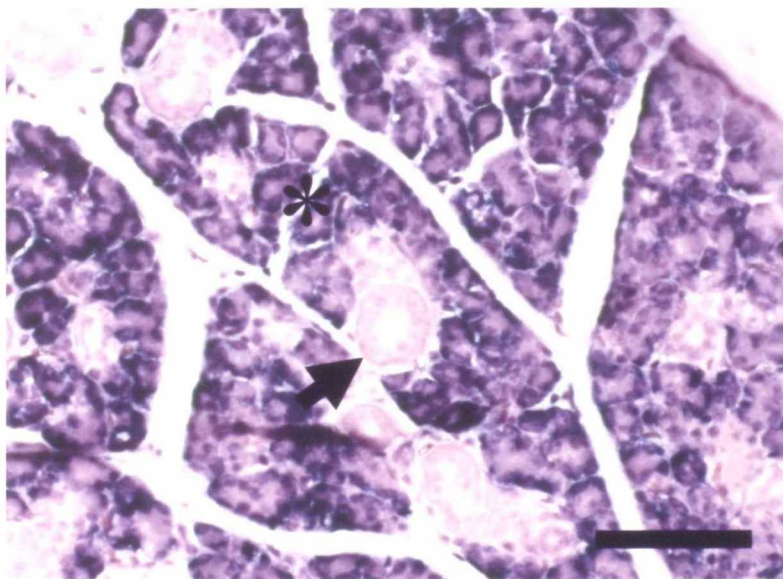


Fig. 8
耳下腺 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）は強い反応を示したが、導管上皮（→）と粘液腺房は反応を示さなかった。

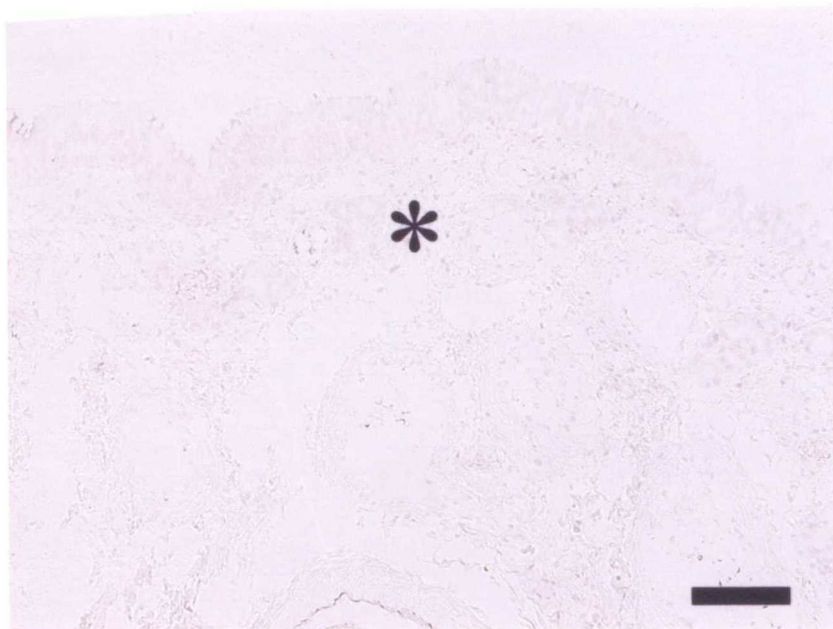


Fig. 9
鼻前庭部 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

(*) : 鼻前庭腺

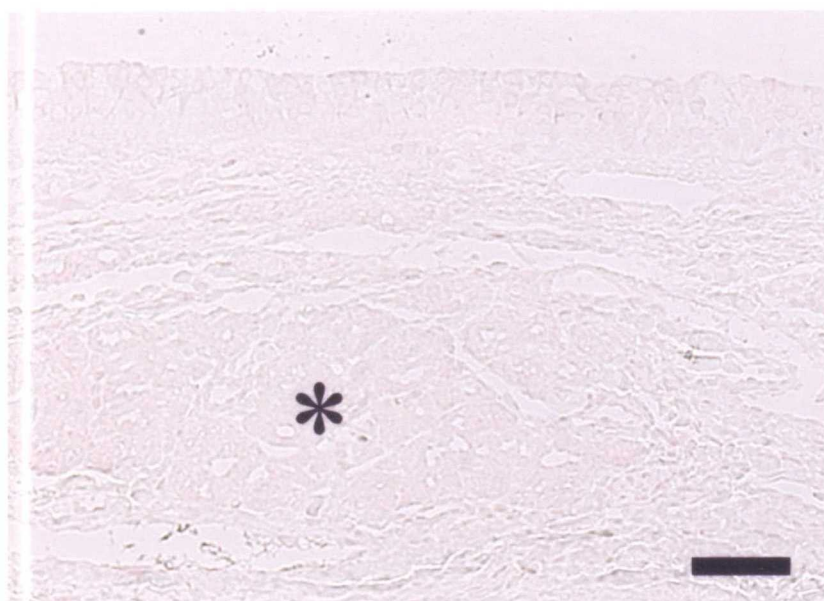


Fig. 10
鼻粘膜嗅部 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

(*) : 嗅腺

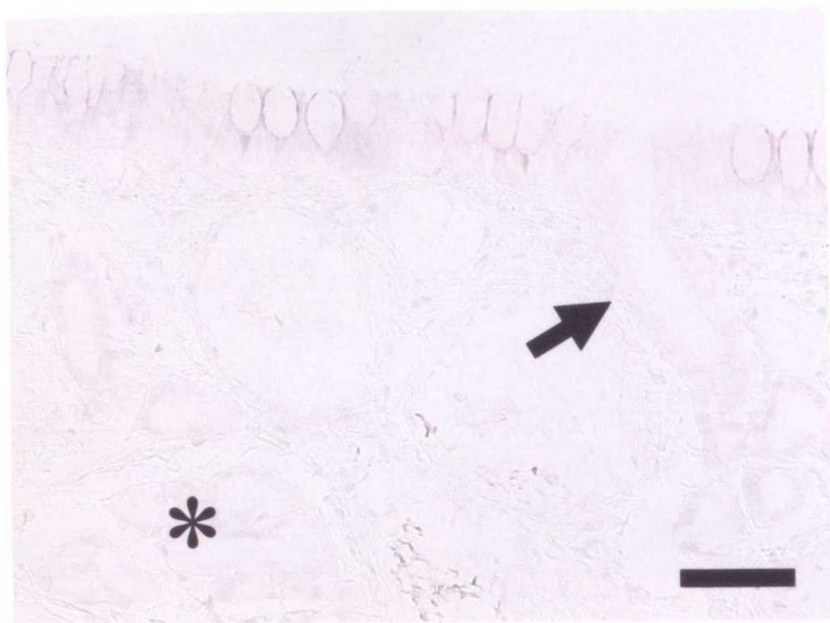


Fig. 11
鼻粘膜呼吸部 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

- (*) : 鼻腺
- (→) : 導管上皮

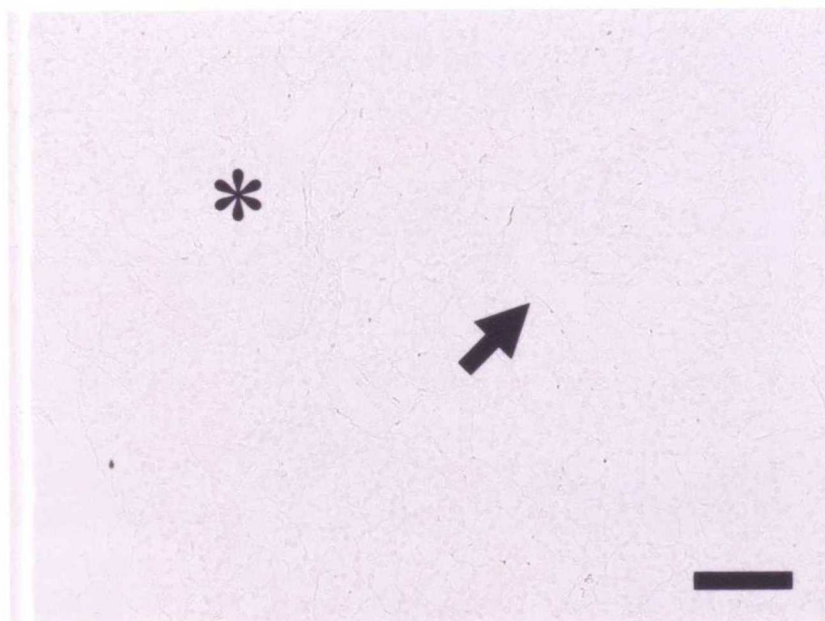


Fig. 12
外側鼻腺 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

- (*) : 漿液腺房
- (→) : 導管上皮

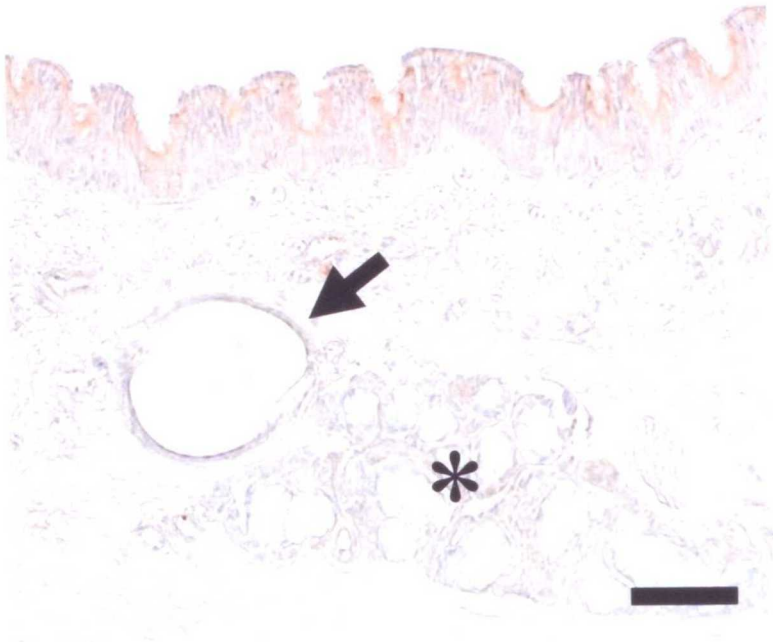


Fig. 13a
喉頭蓋 CA-I (scale; 100 μ m)

偽重層線毛円柱上皮及び喉頭蓋腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-I抗血清に反応を示した。
喉頭蓋腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

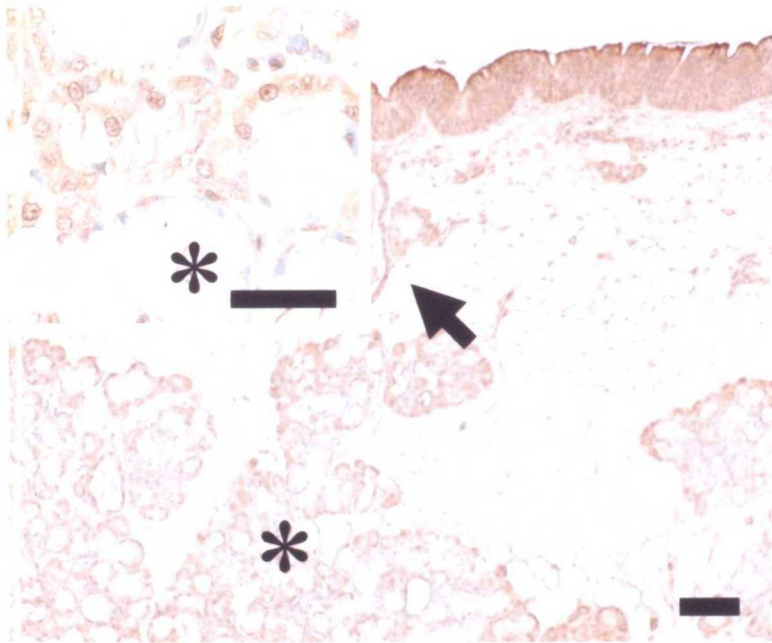


Fig. 13b
喉頭蓋 CA-II (scale; 100 μ m) 左上図 (scale; 50 μ m)

偽重層線毛円柱上皮及び喉頭蓋腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-II抗血清に反応を示した。
喉頭蓋腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

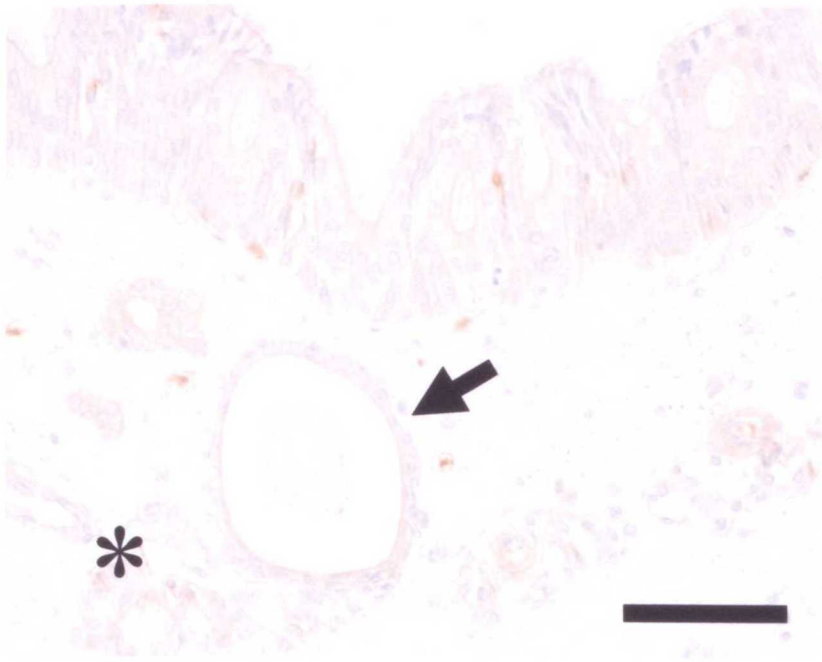


Fig. 13c
喉頭蓋 CA-III (scale; 100 μ m)

偽重層線毛円柱上皮及び喉頭蓋腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-III抗血清に反応を示した。
喉頭蓋腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

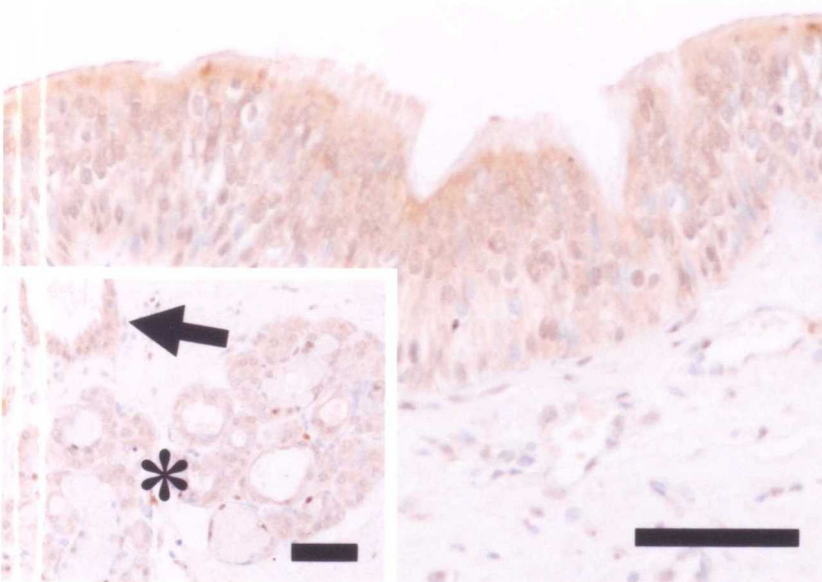


Fig. 13d
喉頭蓋 CA-VI (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

偽重層線毛円柱上皮及び喉頭蓋腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-VI抗血清に反応を示した。
喉頭蓋腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

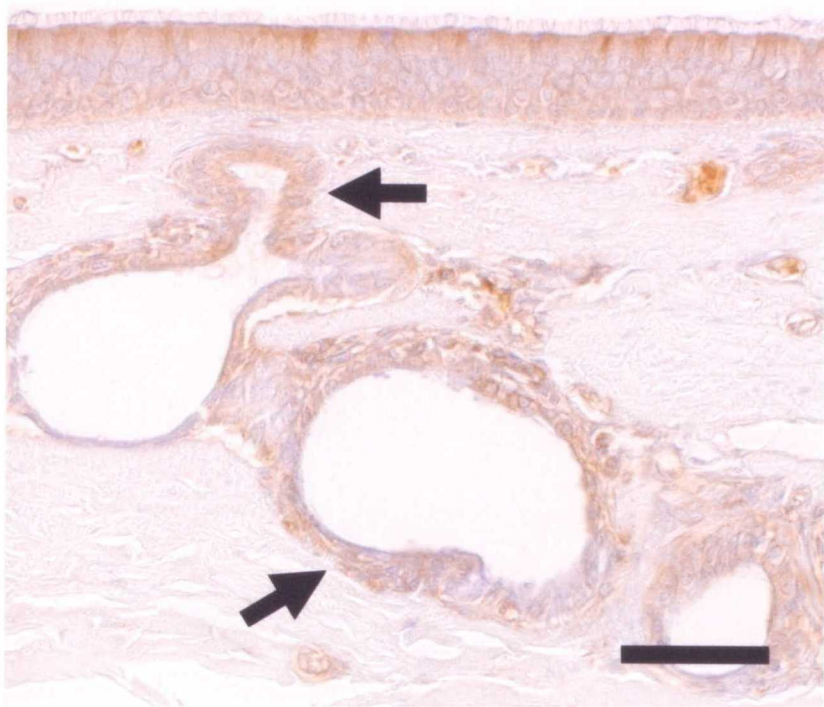


Fig. 14a
気管粘膜 CA-I (scale; 100 μ m)

線毛円柱上皮及び気管腺の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-I抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

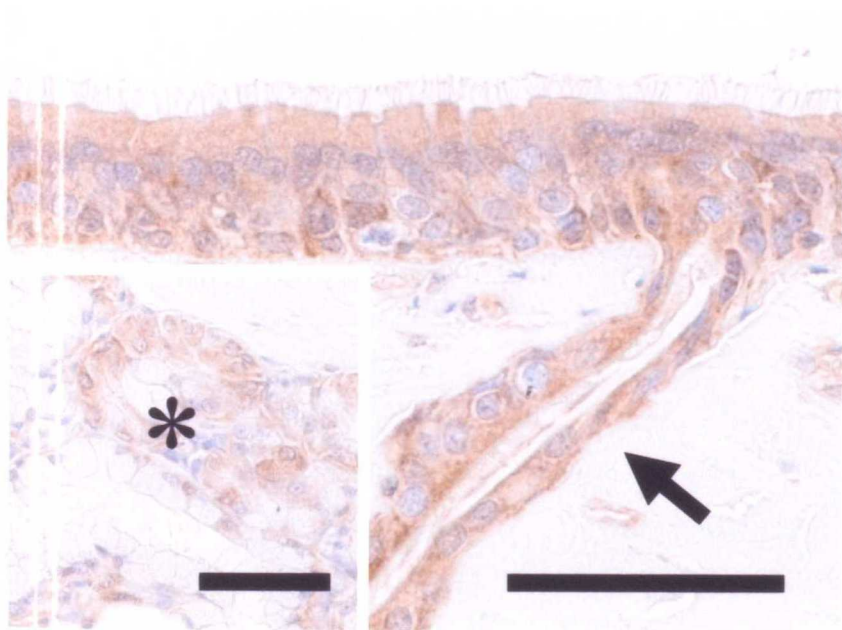


Fig. 14b
気管粘膜 CA-II (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

線毛円柱上皮及び気管腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-II抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

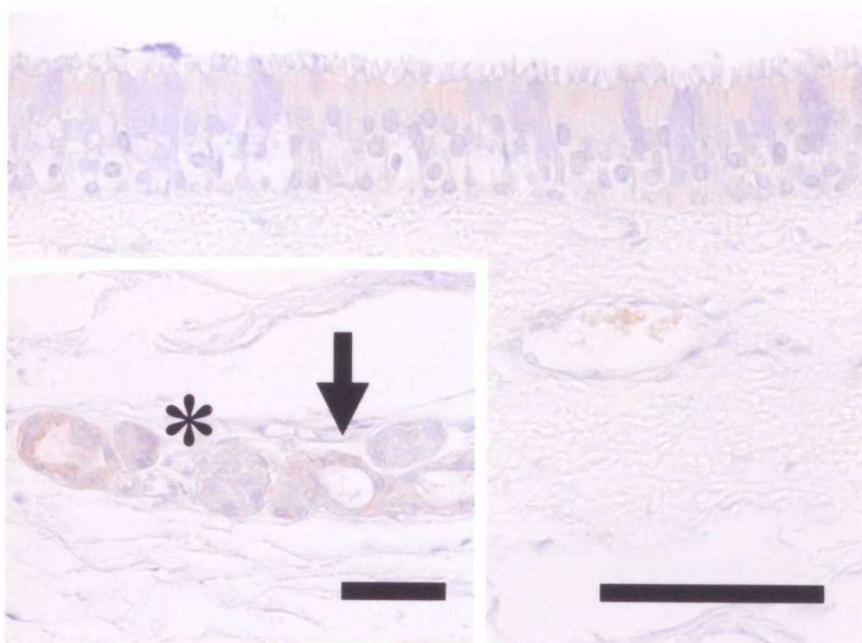


Fig. 14c
気管粘膜 CA-III (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

線毛円柱上皮及び気管腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-III抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

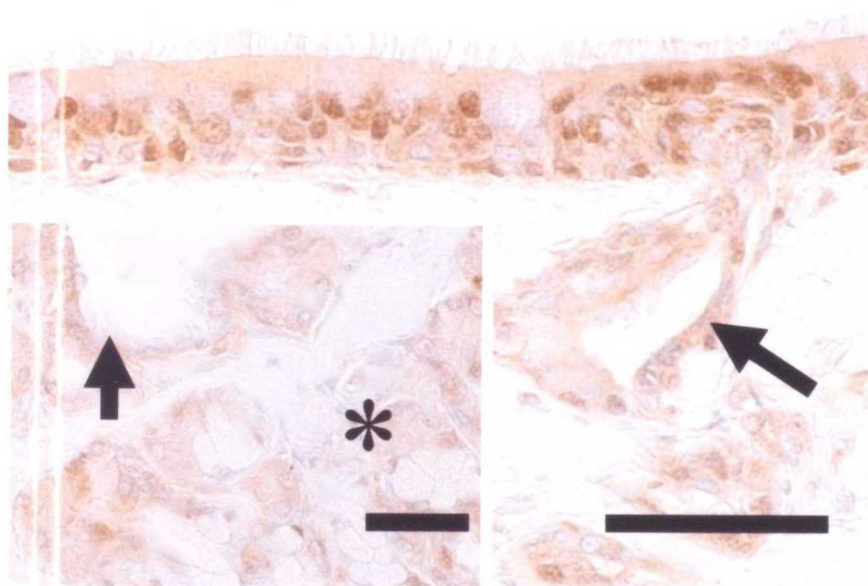


Fig. 14d
気管粘膜 CA-VI (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

線毛円柱上皮及び気管腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）は、CA-VI抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

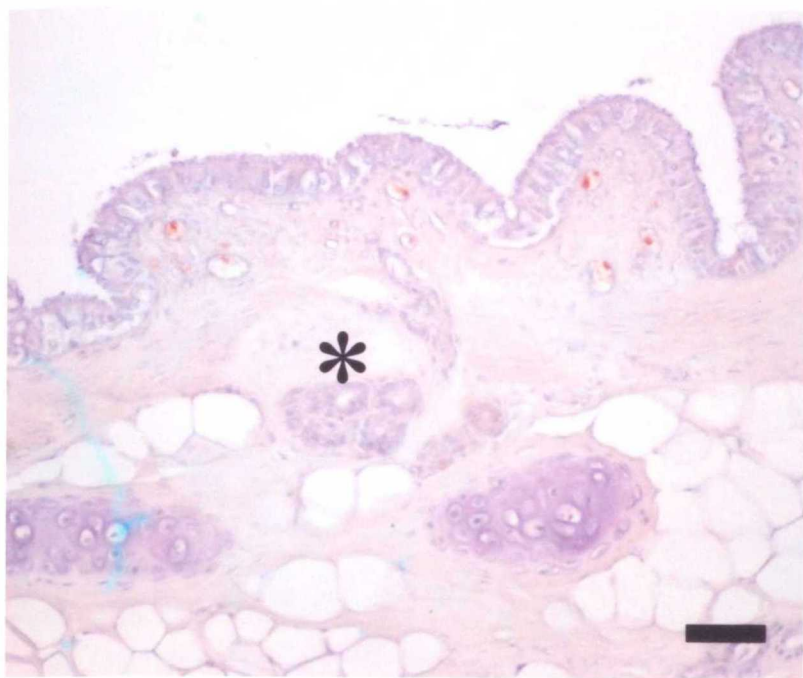


Fig. 15a
気管支粘膜 CA-I (scale; 100 μ m)

線毛円柱上皮及び気管支腺（*）の漿液腺房と導管上皮はCA-I抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管支腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

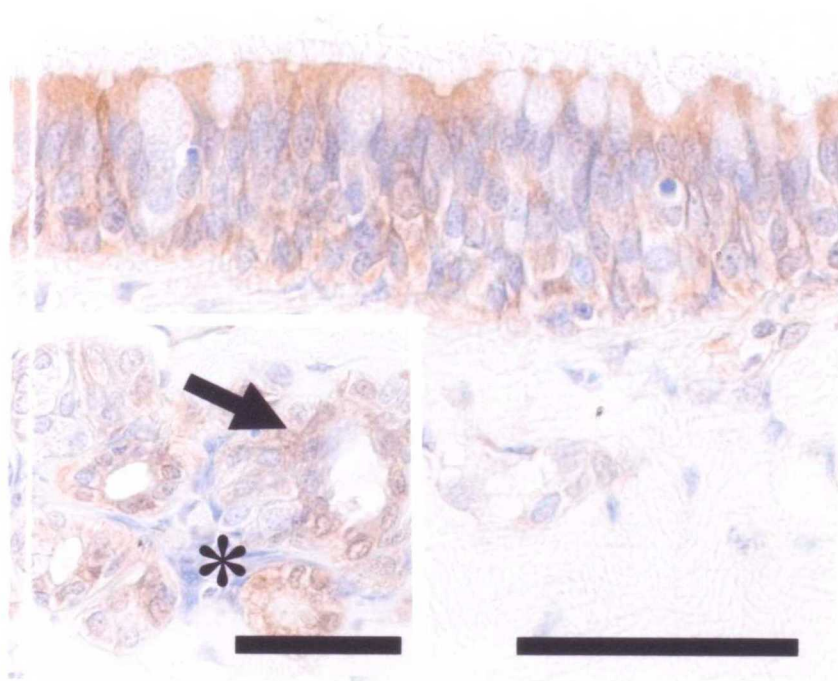


Fig. 15b
気管支粘膜 CA-II (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

線毛円柱上皮及び気管支腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）はCA-II抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管支腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

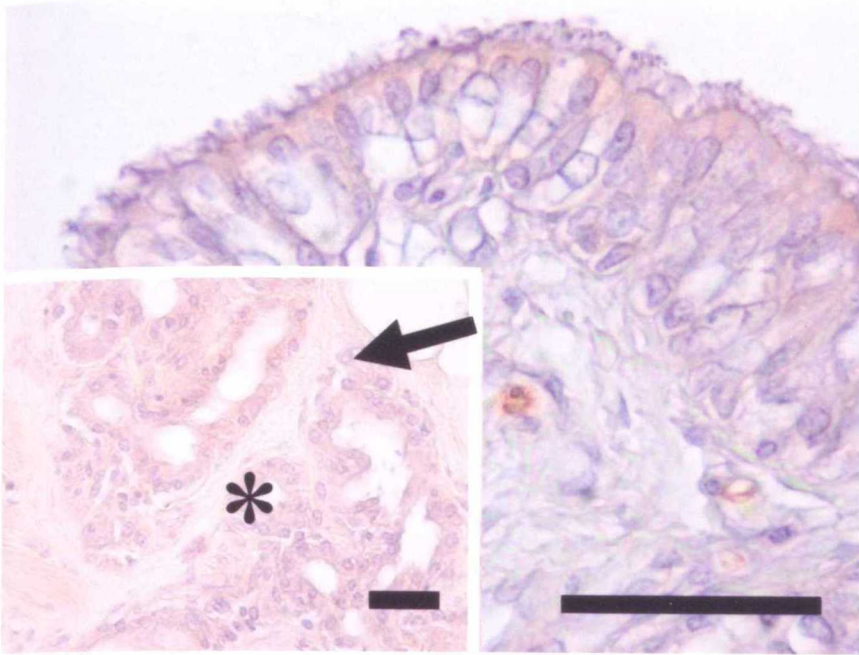


Fig. 15c
気管支粘膜 CA-III (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

線毛円柱上皮及び気管支腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）はCA-III抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管支腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

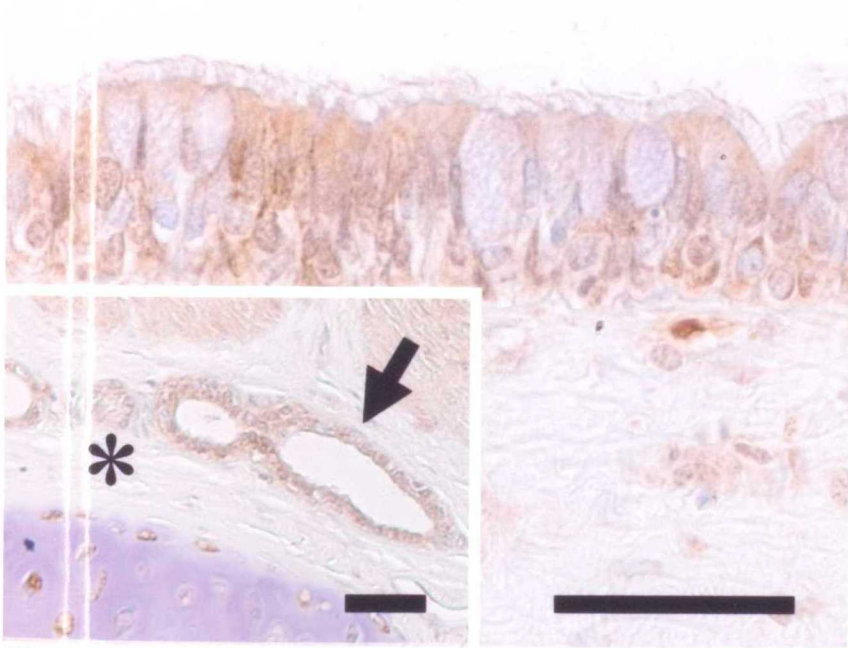


Fig. 15d
気管支粘膜 CA-VI (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

線毛円柱上皮及び気管支腺（*）の漿液腺房と導管上皮（→）はCA-VI抗血清に反応を示した。
粘膜上皮の杯細胞と気管支腺の粘液腺房は反応を示さなかった。

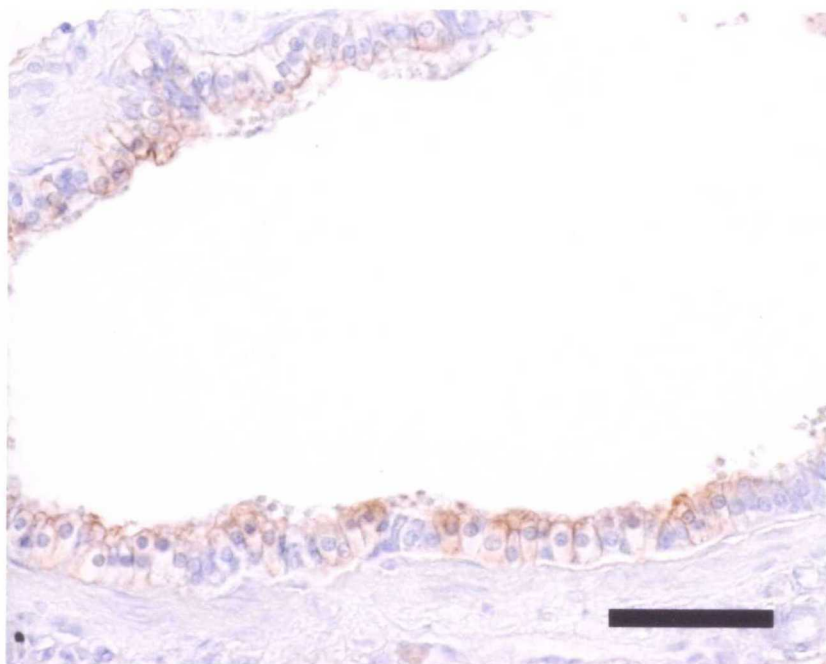


Fig. 16a
細気管支 CA-I (scale; 100 μ m)

単層線毛上皮と細気管支分泌細胞はCA-I抗血清に反応を示した。

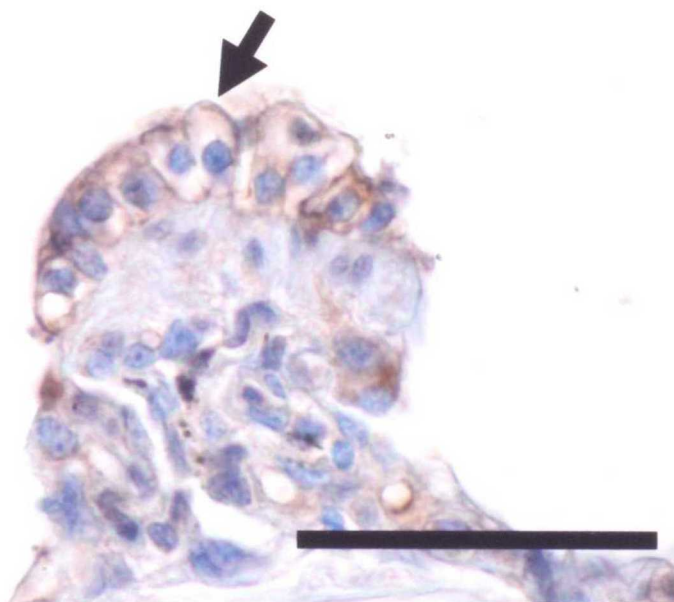


Fig. 16b
細気管支 CA-II (scale; 100 μ m)

単層線毛上皮と細気管支分泌細胞 (→) はCA-II抗血清に反応を示した。

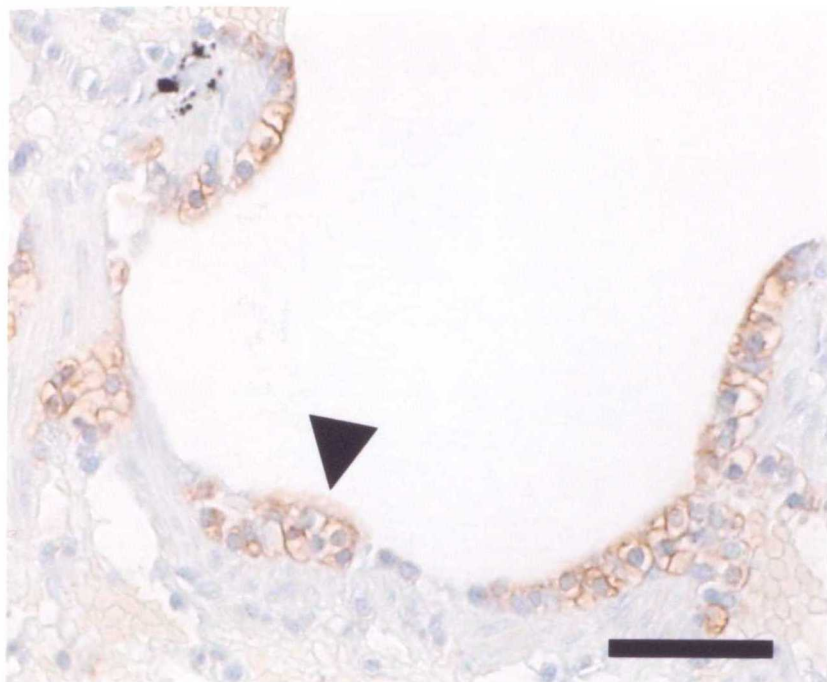


Fig. 16c
細気管支 CA-III (scale; 100 μ m)

単層線毛上皮（矢頭）と細気管支分泌細胞はCA-III抗血清に反応を示した。

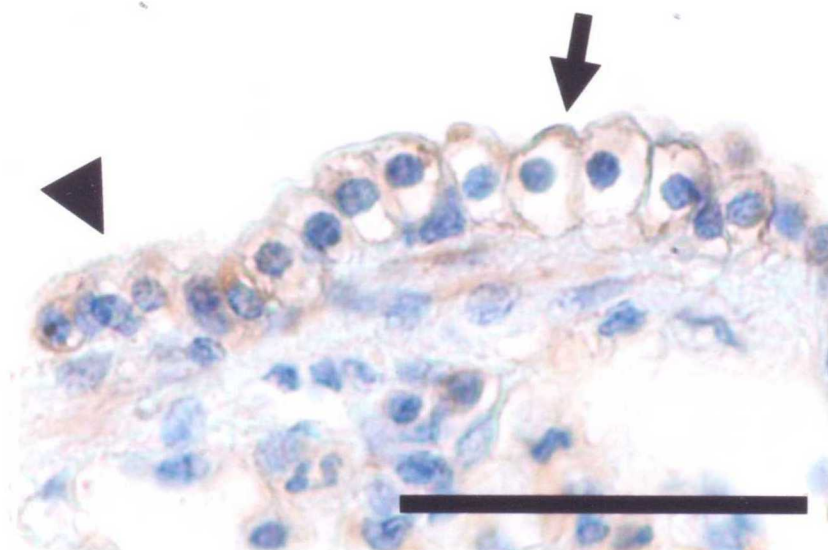


Fig. 16d
細気管支 CA-VI (scale; 100 μ m)

単層線毛上皮（矢頭）と細気管支分泌細胞（→）はCA-VI抗血清に反応を示した。

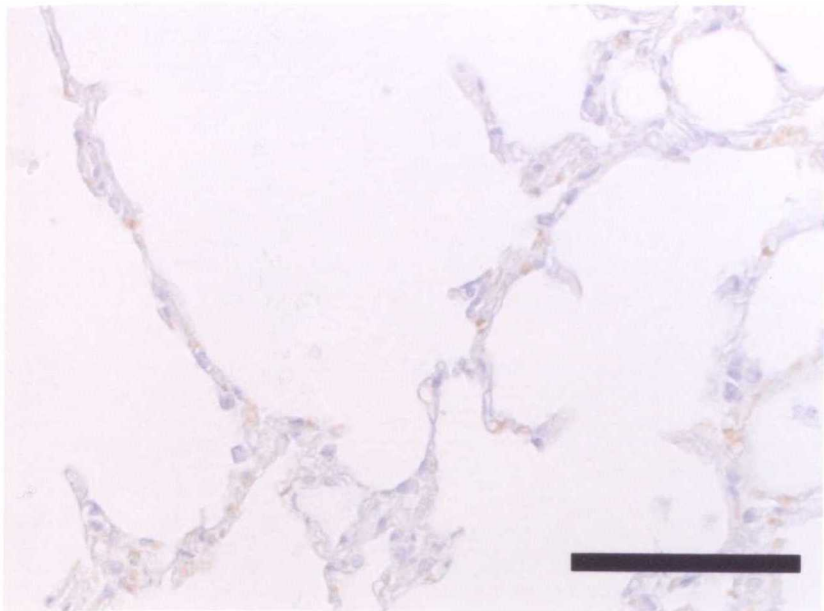


Fig. 17a
肺胞上皮 CA-I (scale; 100 μ m)

呼吸上皮細胞、大肺胞上皮細胞ともにCA-I抗血清に反応を示さなかった。

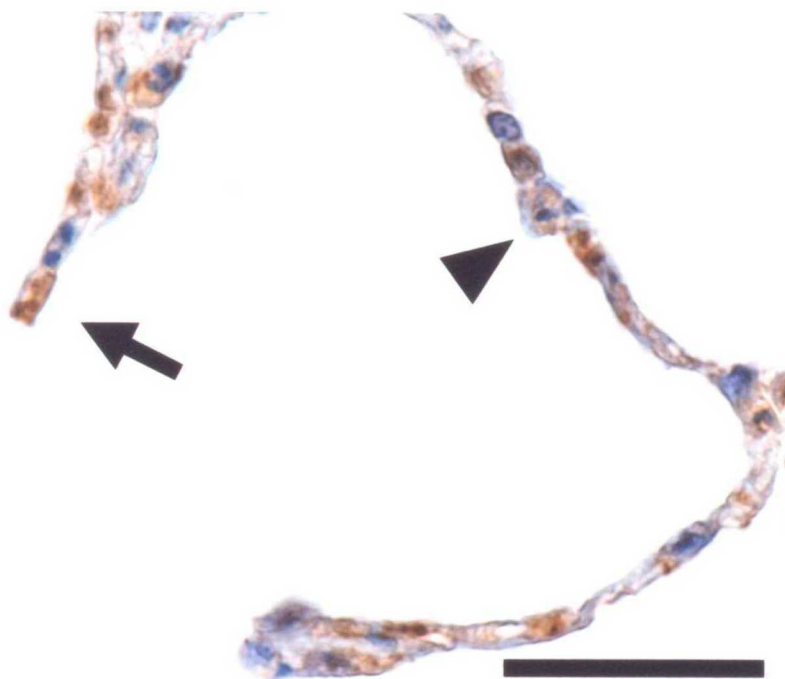


Fig. 17b
肺胞上皮 CA-II (scale; 50 μ m)

少数の呼吸上皮細胞（→）と大肺胞上皮細胞（矢頭）が、CA-II抗血清に弱い反応を示した。

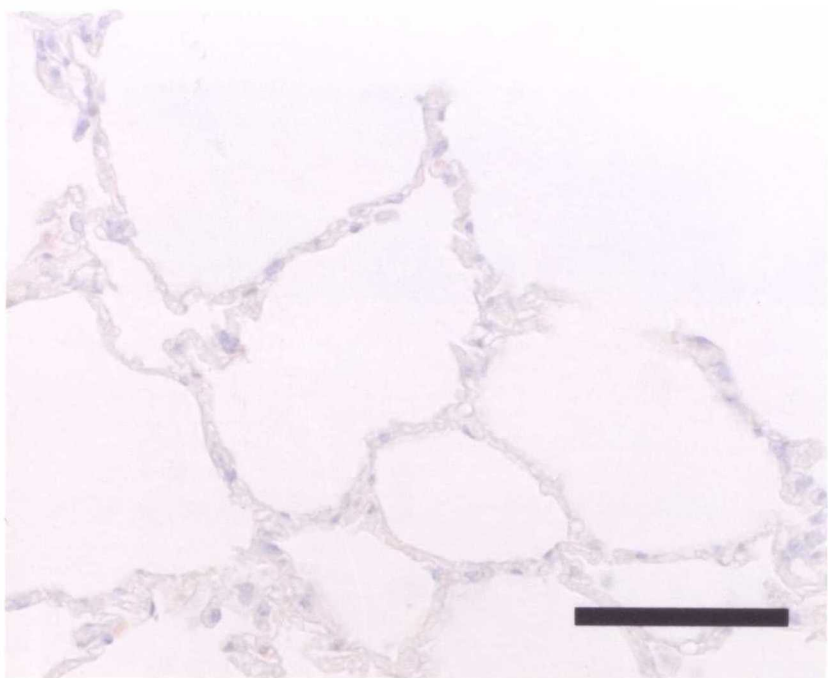


Fig. 17c
肺胞上皮 CA-III (scale; 100 μ m)

呼吸上皮細胞、大肺胞上皮細胞ともにCA-III抗血清に反応を示さなかった。

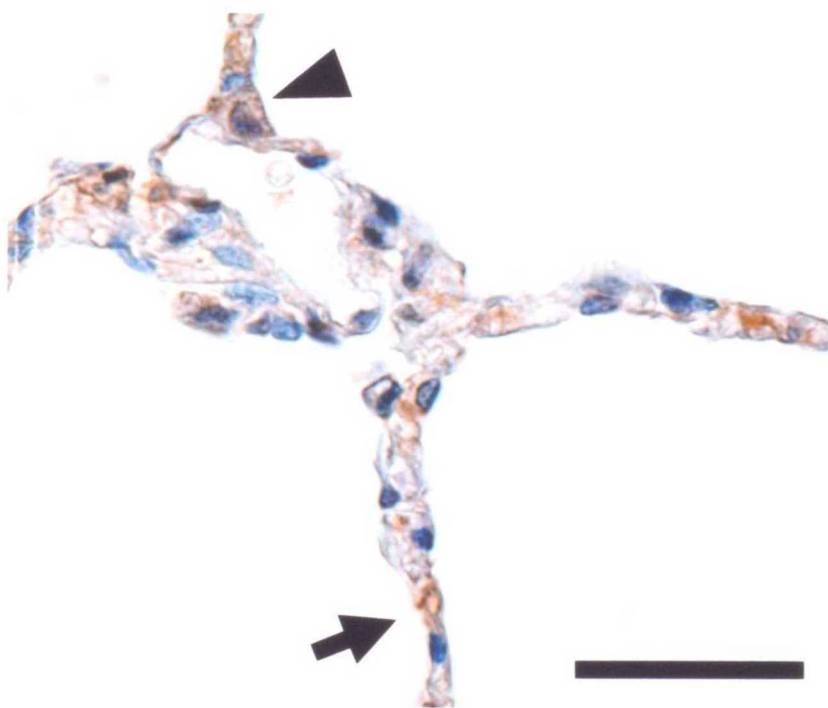


Fig. 17d
肺胞上皮 CA-VI (scale; 50 μ m)

少数の呼吸上皮細胞（→）と大肺胞上皮細胞（矢頭）が、CA-VI抗血清に弱い反応を示した。

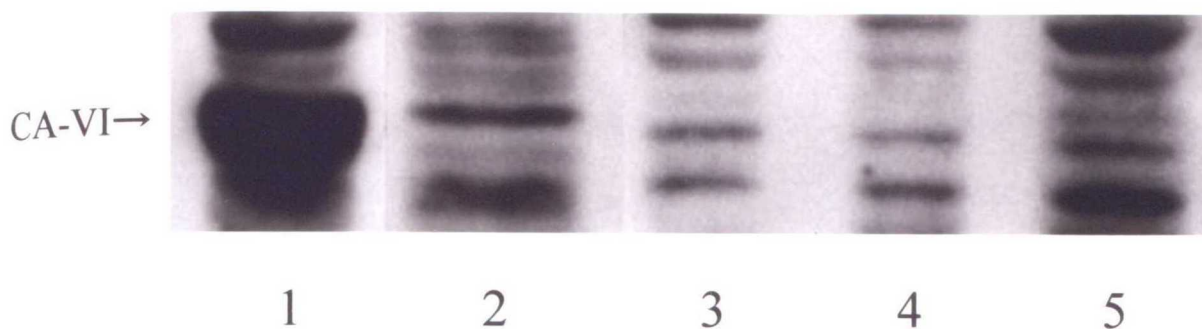


Fig. 18

喉頭及び下部気道でのウェスタンブロッティングの結果

1：耳下腺 2：喉頭蓋 3：気管 4：気管支 5：肺

検索を行った全ての部位で少量のCA-VI蛋白が確認された。



Fig. 19

喉頭及び下部気道でのRT-PCRの結果

1：耳下腺 2：喉頭蓋 3：気管頸部 4：気管頸胸部 5：気管胸部
6：気管分岐部 7：主気管支 8：肺葉肺門部 9：肺葉尖端部

検索を行った全ての部位でCA-II, -VIの遺伝子発現が確認された。

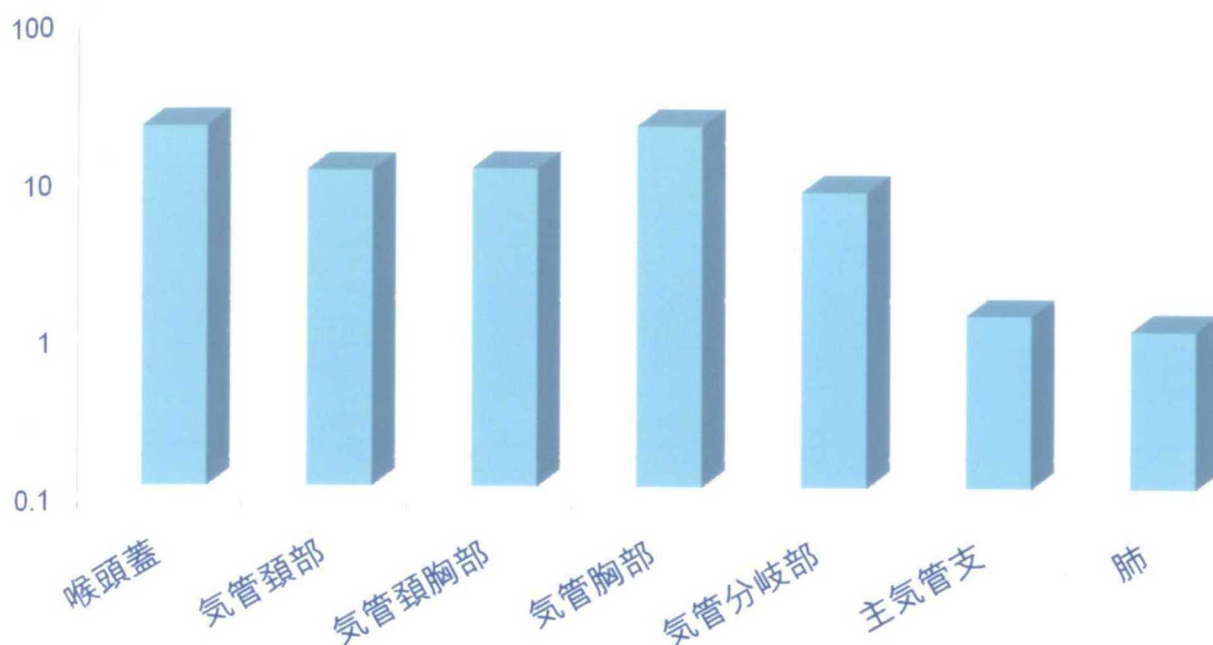


Fig. 20
喉頭及び下部気道でのCA-VIの定量的PCRの結果

肺でのCA-VI mRNAの発現量を基準にして比較すると、喉頭蓋から気管分岐部までは約10倍、主気管支ではほぼ同量だった。

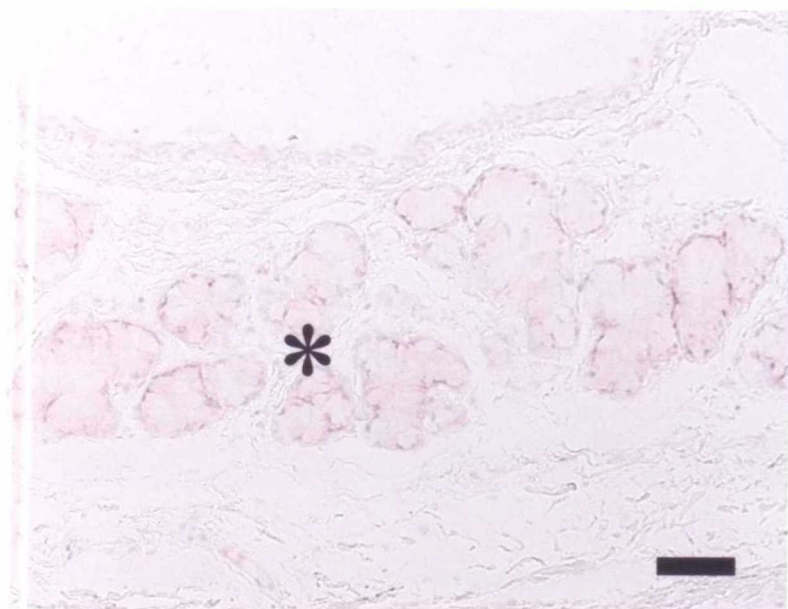


Fig. 21
喉頭蓋 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

(*) : 喉頭蓋腺

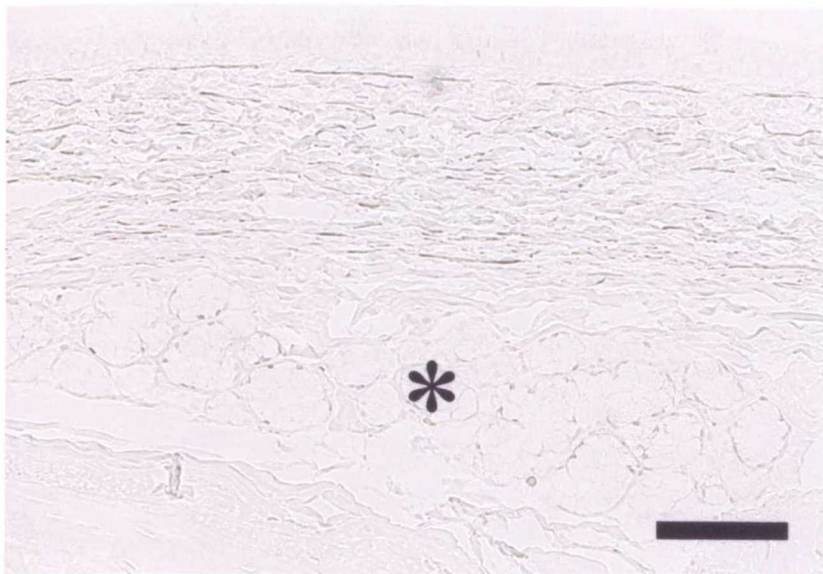


Fig. 22

気管粘膜 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

(*) : 気管腺

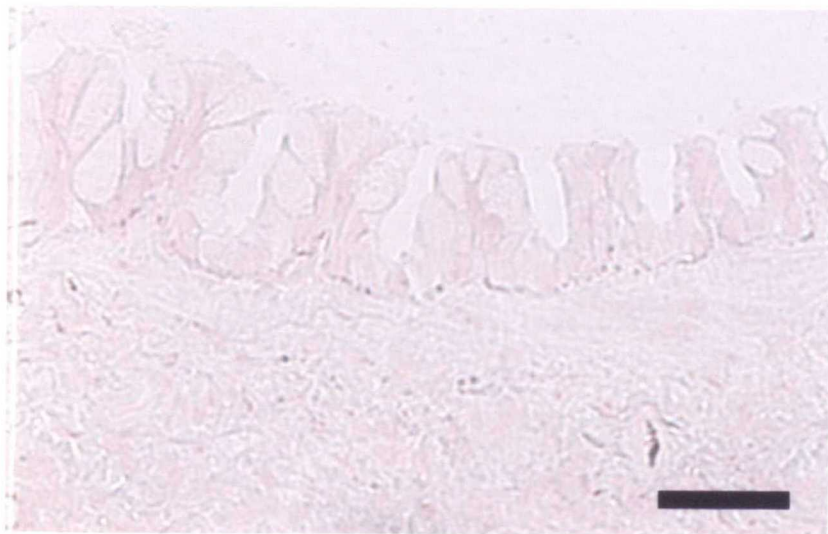


Fig. 23

気管支粘膜 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

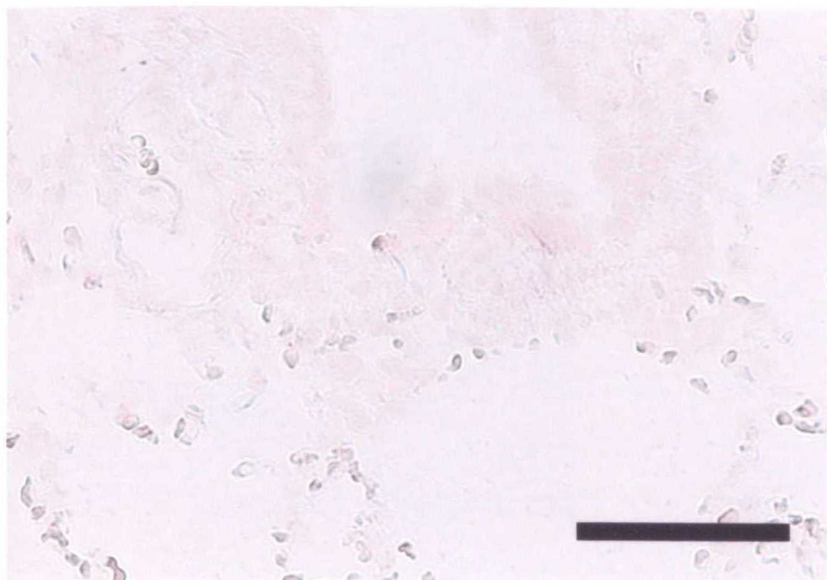


Fig. 24
呼吸細気管支 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

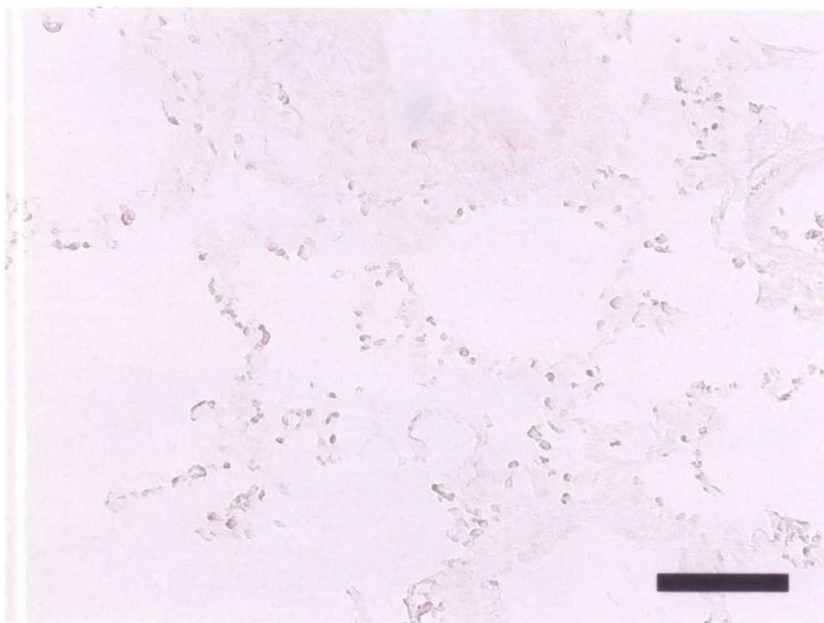


Fig. 25
肺胞上皮 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

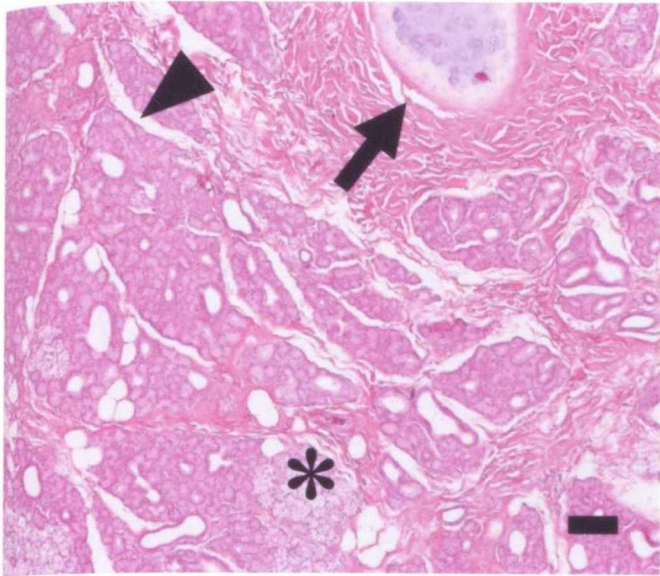


Fig. 26a

第三眼瞼腺 HE染色 (scale; 100 μ m)

(→) : T字軟骨

(矢頭) : 漿液腺房

(*) : 深部にある脂腺様細胞

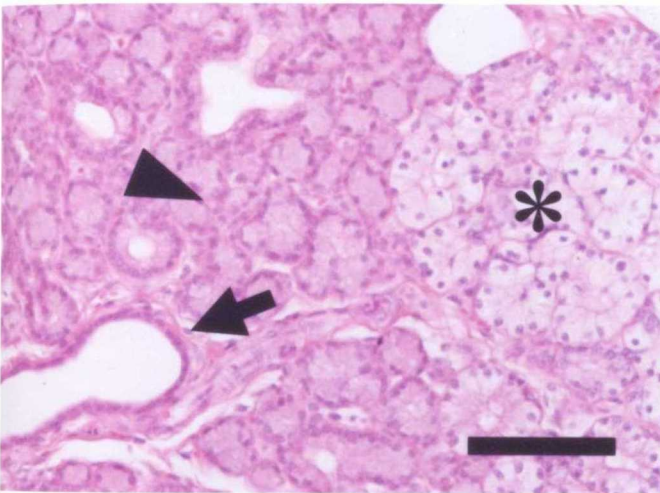


Fig. 26b

第三眼瞼腺 HE染色 (scale; 100 μ m)

矢頭 : 漿液腺房

(→) : 導管上皮

(*) : 脂腺様細胞による腺房

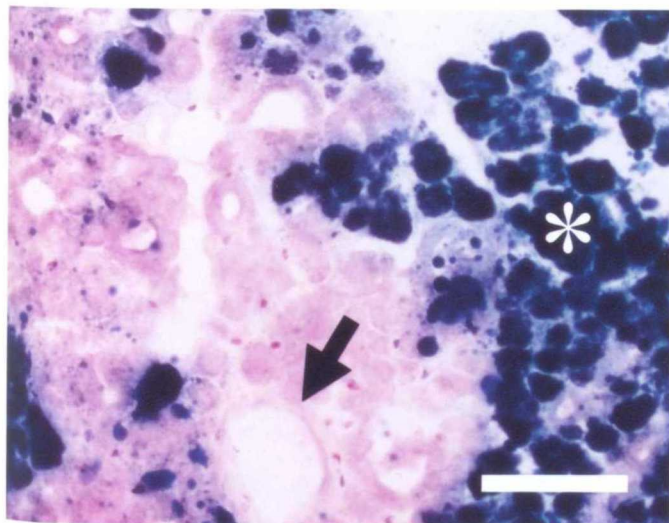


Fig. 27

第三眼瞼腺 Sudan黒染色 (scale; 100 μ m)

脂腺様細胞による腺房 (*) における
脂肪染色の結果、脂質を含むことが明らか
となった。

(→) : 導管上皮

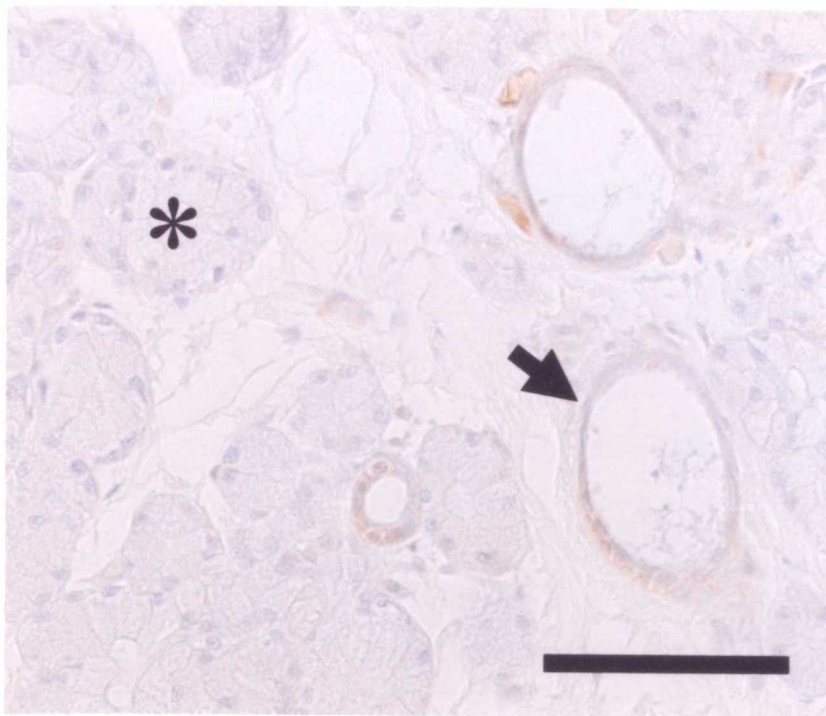


Fig. 28a
涙腺 CA-I (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）はCA-I抗血清に反応を示さなかった。
導管上皮（→）は反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

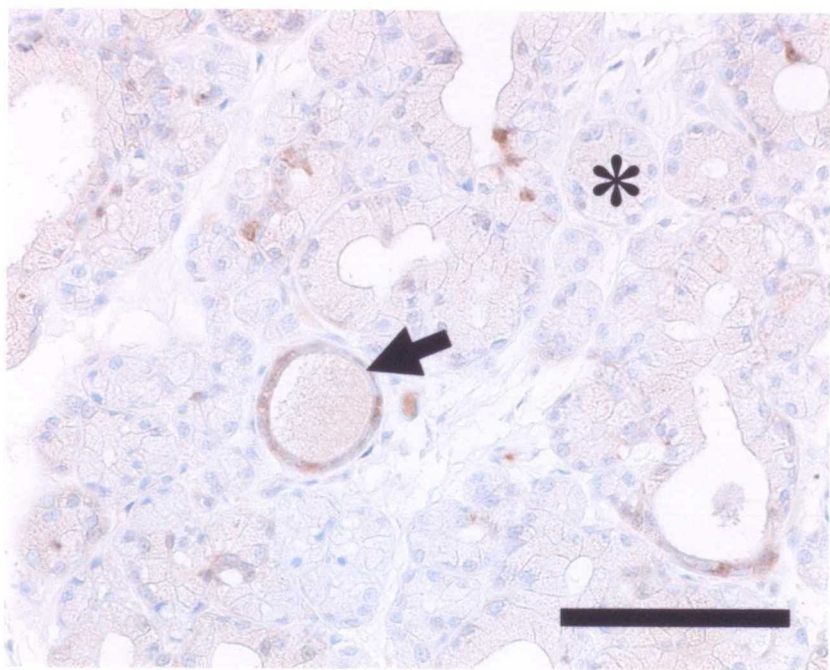


Fig. 28b
涙腺 CA-II (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）は少数の細胞のみがCA-II抗血清に弱い反応を示した。
導管上皮（→）では反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

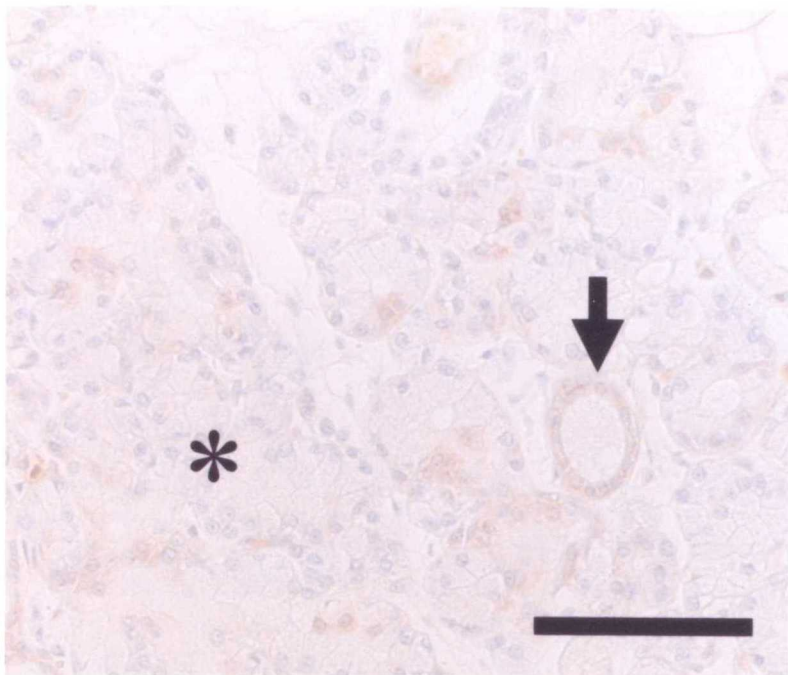


Fig. 28c

涙腺 CA-III (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）は少数の細胞のみがCA-III抗血清に弱い反応を示した。
導管上皮（→）では反応を示す細胞と示さない細胞が混在していた。

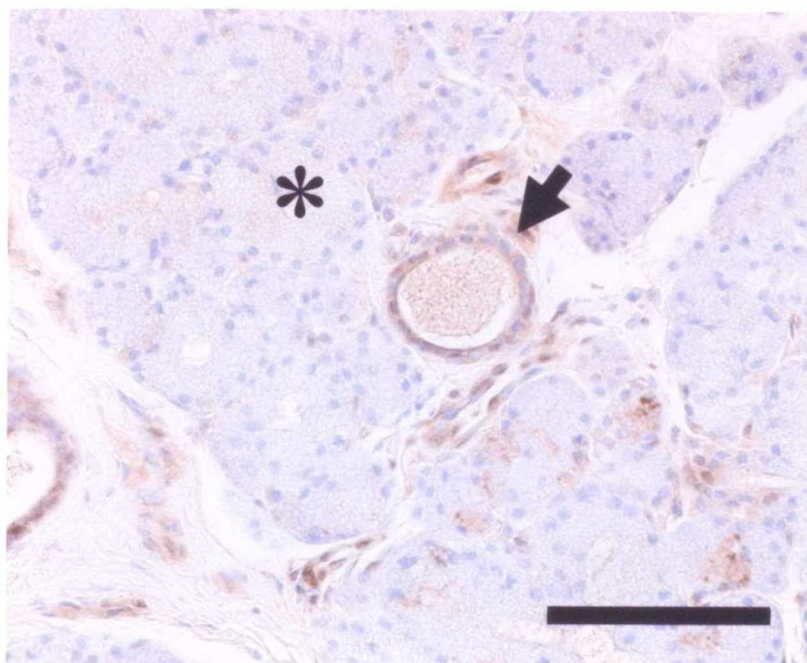


Fig. 28d

涙腺 CA-VI (scale; 100 μ m)

漿液腺房（*）は少数の細胞のみがCA-VI抗血清に弱い反応を示した。
導管上皮（→）では全ての細胞が反応を示した。

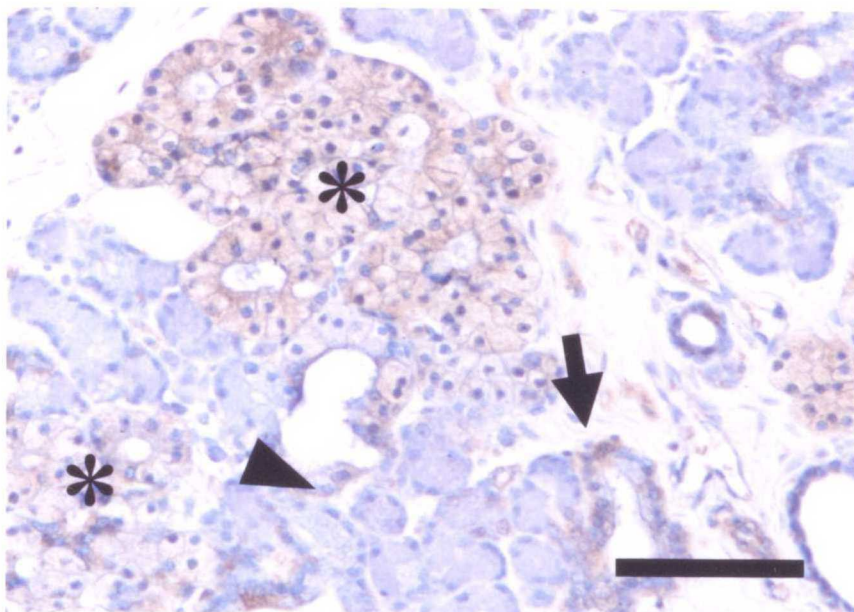


Fig. 29a
第三眼瞼腺 CA-I (scale; 100 μ m)

漿液腺房（矢頭）は少数の細胞のみがCA-I抗血清に弱い反応を示した。
導管上皮（→）と脂腺細胞（*）は、全ての細胞で反応を示した。

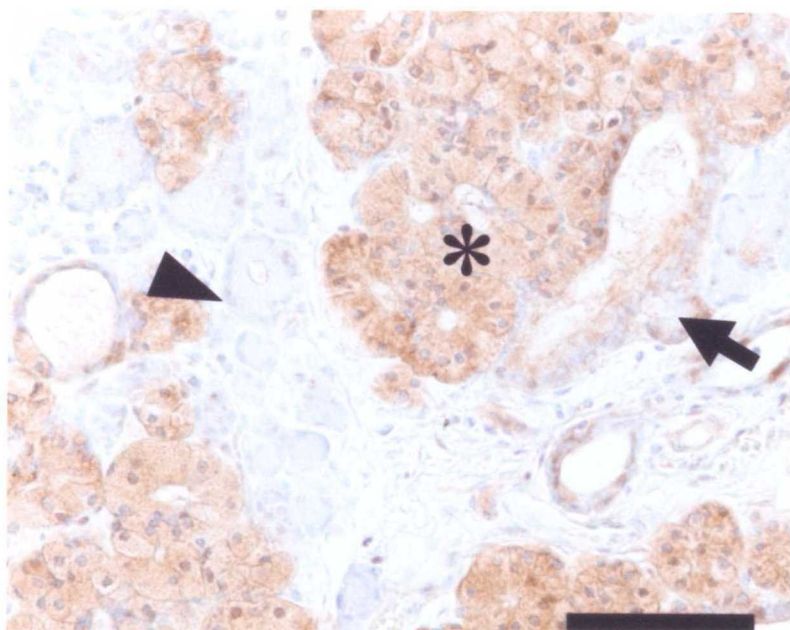


Fig. 29b
第三眼瞼腺 CA-II (scale; 100 μ m)

漿液腺房（矢頭）は少数の細胞のみがCA-II抗血清に弱い反応を示した。
導管上皮（→）と脂腺細胞（*）は、全ての細胞で反応を示した。

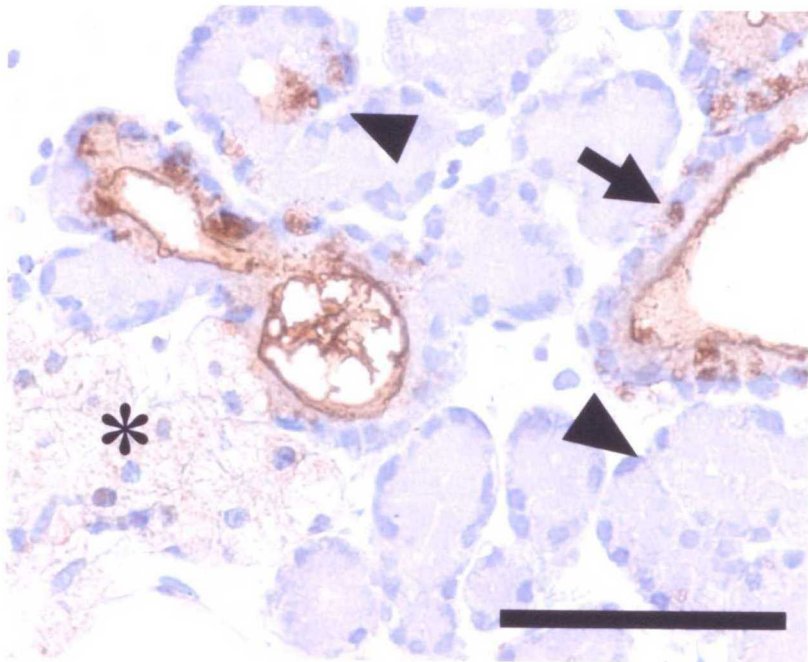


Fig. 29c
第三眼瞼腺 CA-III (scale; 100 μ m)

漿液腺房（矢頭）は少数の細胞のみがCA-III抗血清に反応を示した。
導管上皮（→）と脂腺細胞（*）は、全ての細胞で反応を示した。

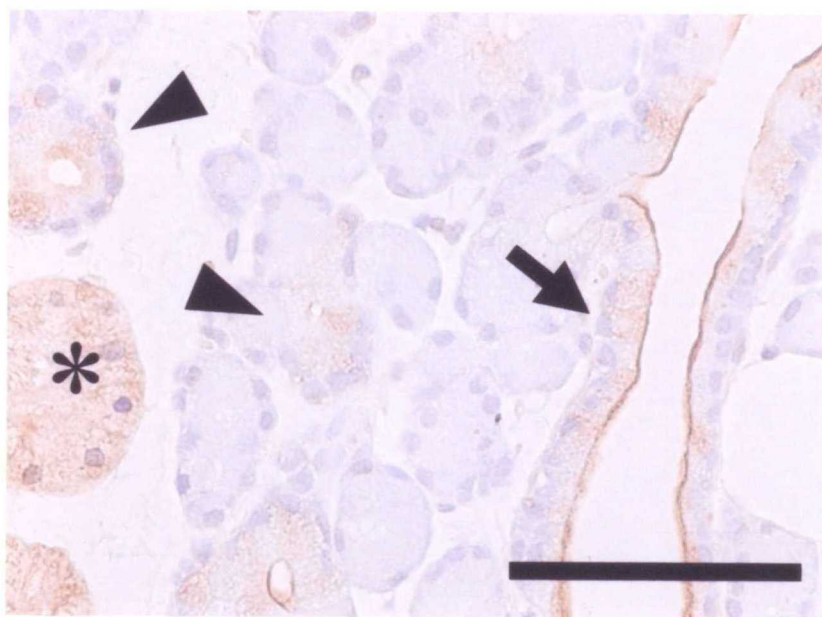


Fig. 29d
第三眼瞼腺 CA-VI (scale; 100 μ m)

漿液腺房（矢頭）は少数の細胞のみがCA-VI抗血清に弱い反応を示した。
導管上皮（→）と脂腺細胞（*）は、全ての細胞で反応を示した。

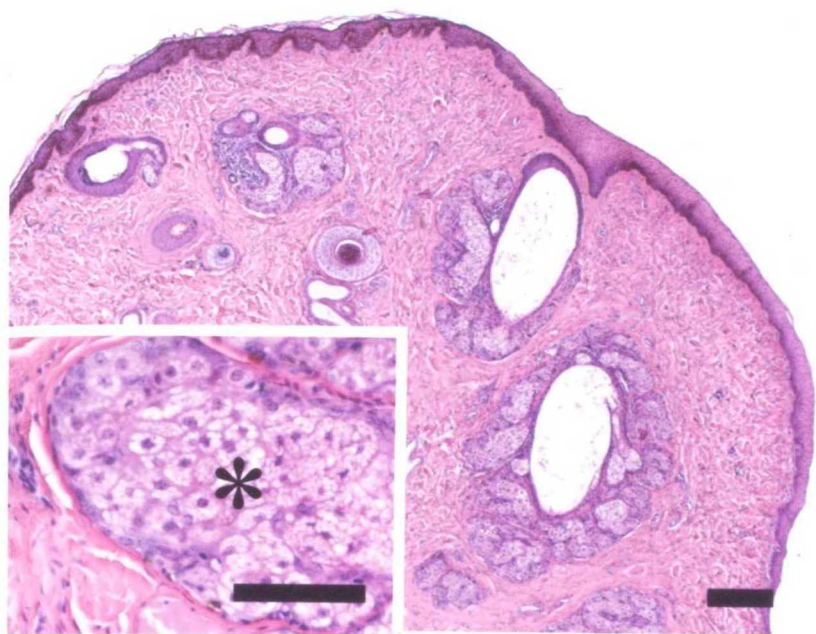


Fig. 30
 瞼板腺 HE染色 (scale; 100 μ m) 左下図 (scale; 50 μ m)

瞼板腺は脂質分泌を行なう脂腺細胞（*）から成り、腺房の辺縁側は未分化な細胞、管腔側はよく分化した細胞からなる。

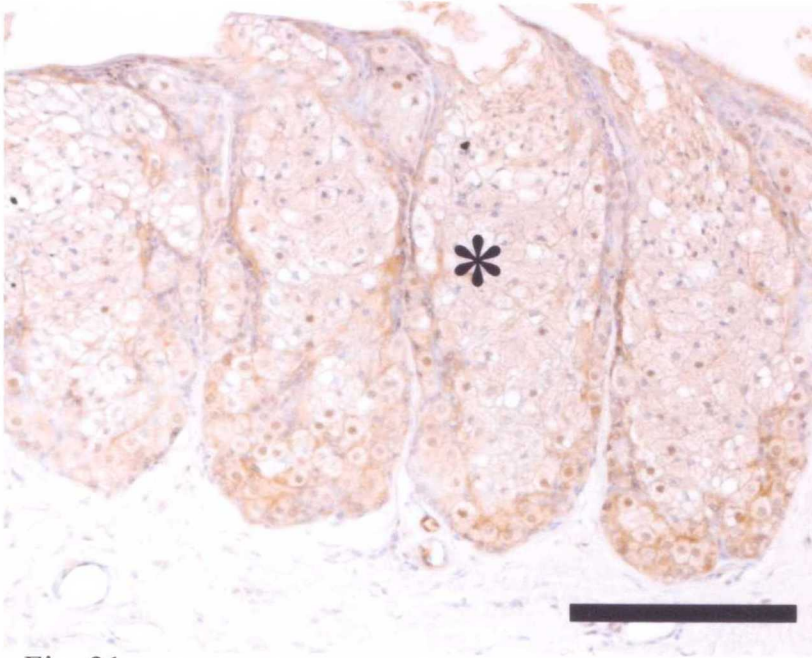


Fig. 31a
膵臓 膵臓 CA-I (scale; 100 μ m)

膵臓細胞（*）はCA-I抗血清に反応を示した。
膵臓の辺縁にある未分化な細胞は管腔側の細胞よりも強い反応を示した。
膵管上皮は、弱い反応を示した。

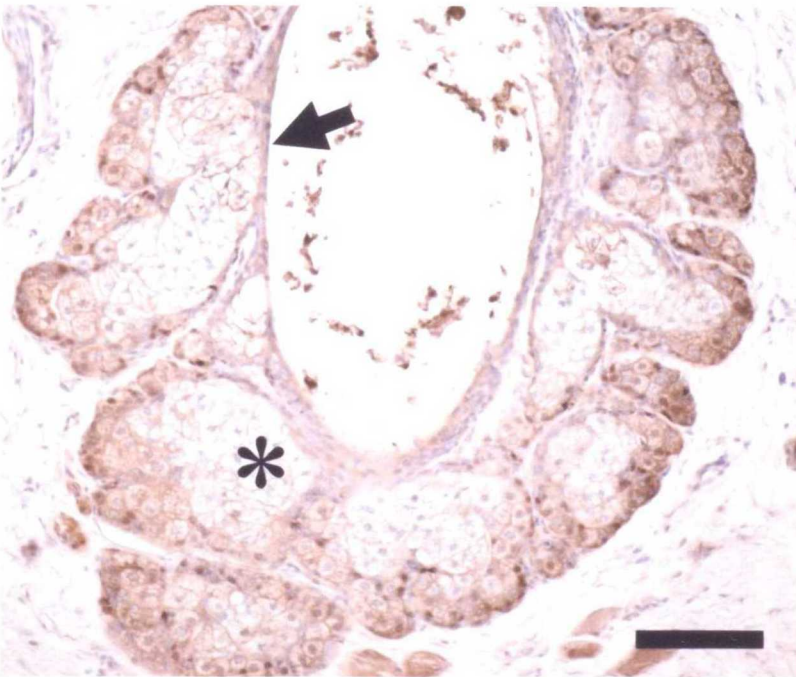


Fig. 31b
膵臓 膵臓 CA-II (scale; 100 μ m)

膵臓細胞（*）はCA-II抗血清に反応を示した。
膵臓の辺縁にある未分化な細胞は管腔側の細胞よりも強い反応を示した。
膵管上皮は、弱い反応を示した。

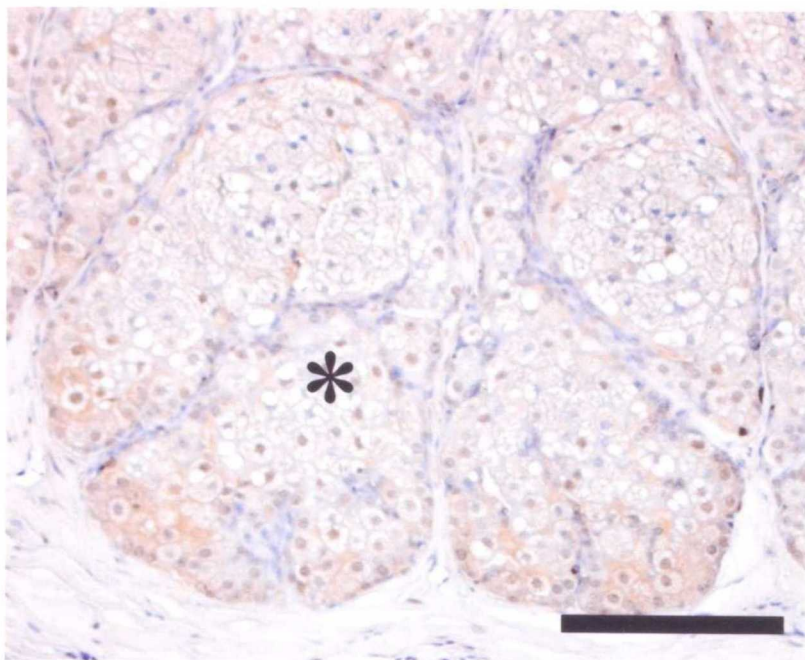


Fig. 31c
 膵板腺 CA-III (scale; 100 μ m)

脂腺細胞（*）はCA-III抗血清に反応を示した。
 腺房の辺縁にある未分化な細胞は管腔側の細胞よりも強い反応を示した。
 導管上皮は、弱い反応を示した。

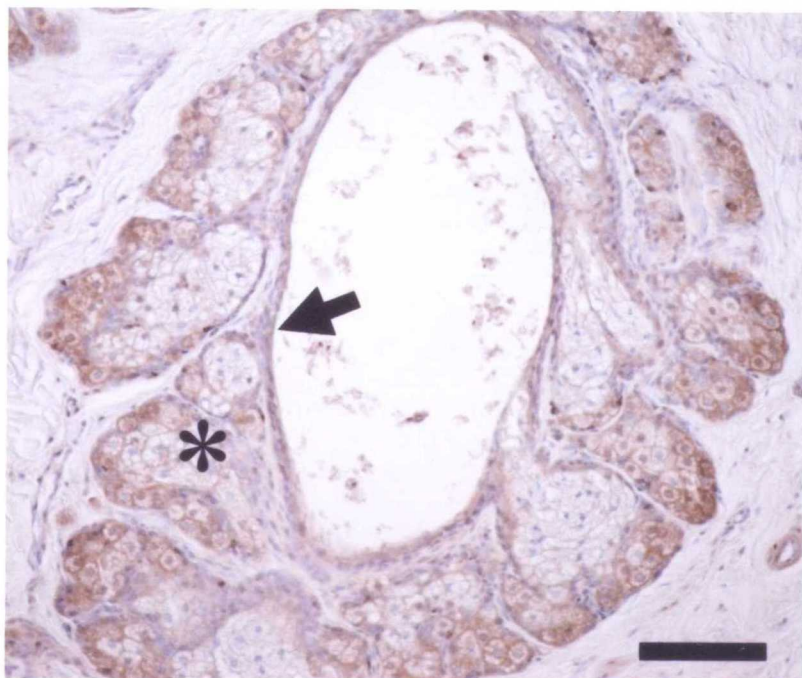


Fig. 31d
 膵板腺 CA-VI (scale; 100 μ m)

脂腺細胞（*）はCA-VI抗血清に反応を示した。
 腺房の辺縁にある未分化な細胞は管腔側の細胞よりも強い反応を示した。
 導管上皮は、弱い反応を示した。

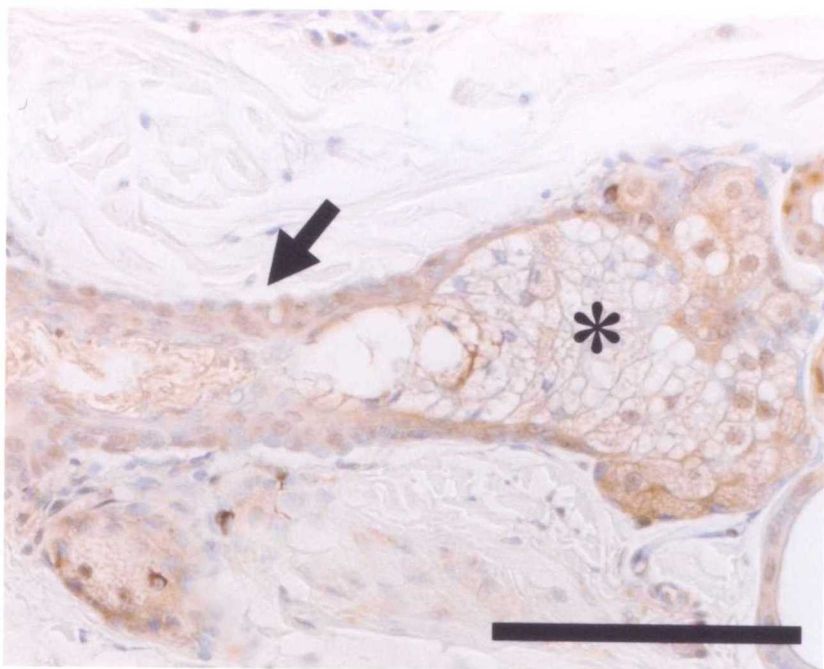


Fig. 32a
 睫毛腺 CA-I (scale; 100 μ m)

脂腺細胞（*）はCA-I抗血清に反応を示した。
 導管上皮（→）は、弱い反応を示した。

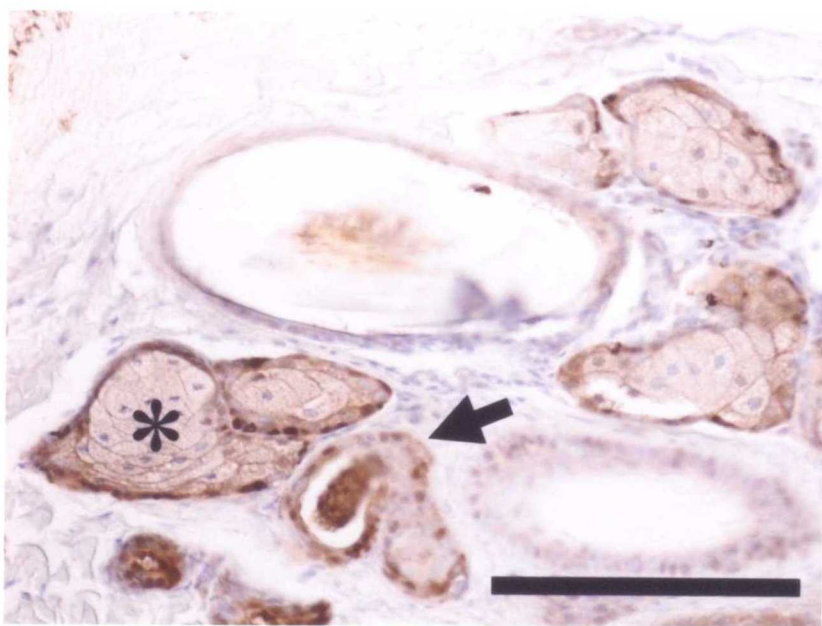


Fig. 32b
 睫毛腺 CA-II (scale; 100 μ m)

脂腺細胞（*）はCA-II抗血清に反応を示した。
 導管上皮（→）は、弱い反応を示した。

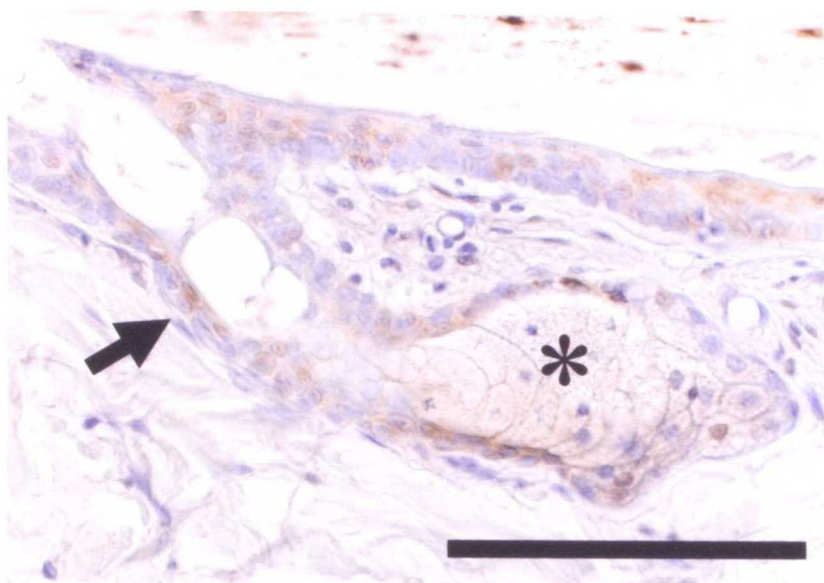


Fig. 32c

睫毛腺 CA-III (scale; 100 μ m)

脂腺細胞 (*) はCA-III抗血清に反応を示した。
導管上皮 (→) は、弱い反応を示した。

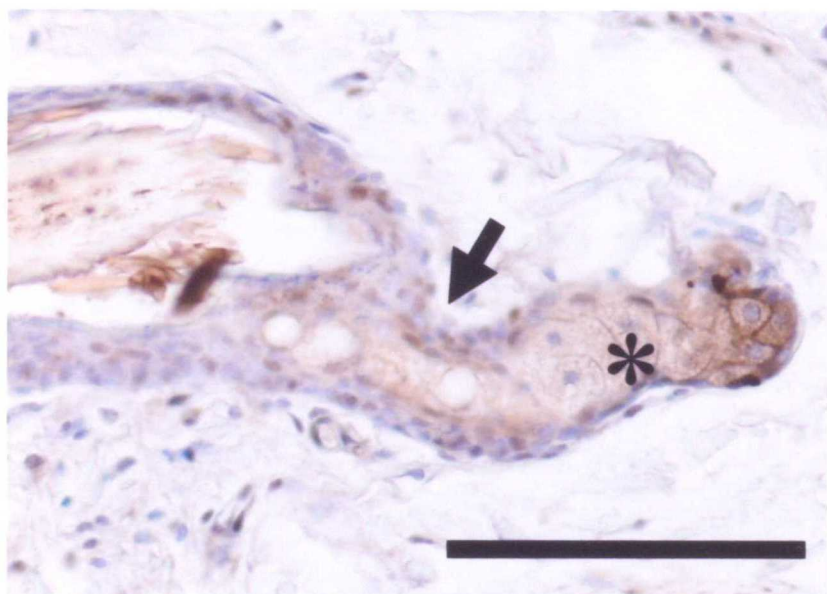


Fig. 32d

睫毛腺 CA-VI (scale; 100 μ m)

脂腺細胞 (*) はCA-VI抗血清に反応を示した。
導管上皮 (→) は、弱い反応を示した。

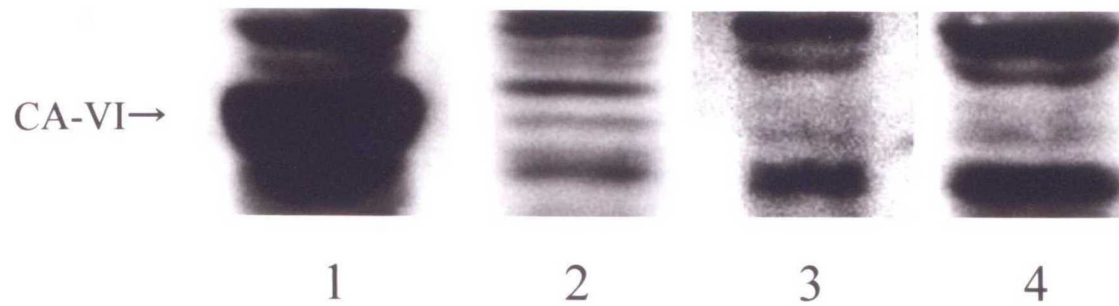


Fig. 33

涙器付属腺でのウェスタンブロッティングの結果

1：耳下腺 2：涙腺 3：第三眼瞼腺 4：上眼瞼（瞼板腺、睫毛腺を含む）

検索を行った全ての部位で少量のCA-VI蛋白が確認された。

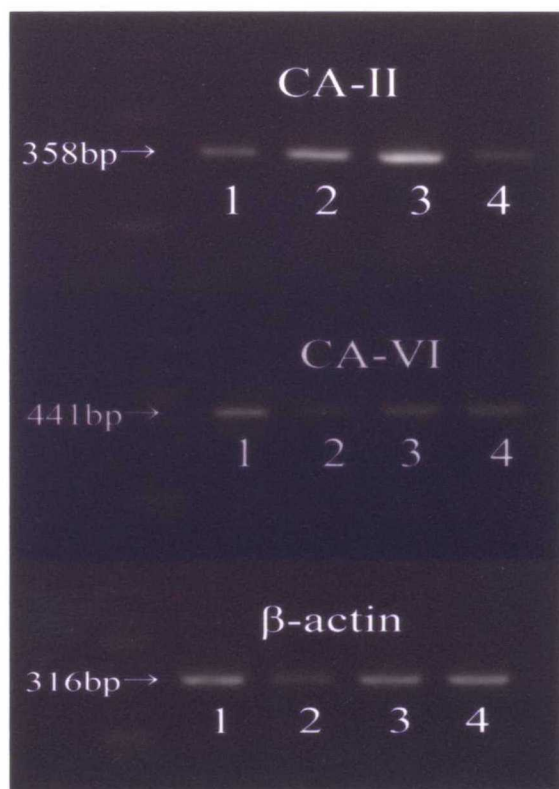


Fig. 34

涙器でのRT-PCRの結果

1：耳下腺 2：涙腺 3：第三眼瞼腺 4：上眼瞼（瞼板腺、睫毛腺を含む）

検索を行った全ての部位でCA-II, -VIの遺伝子発現が確認された。

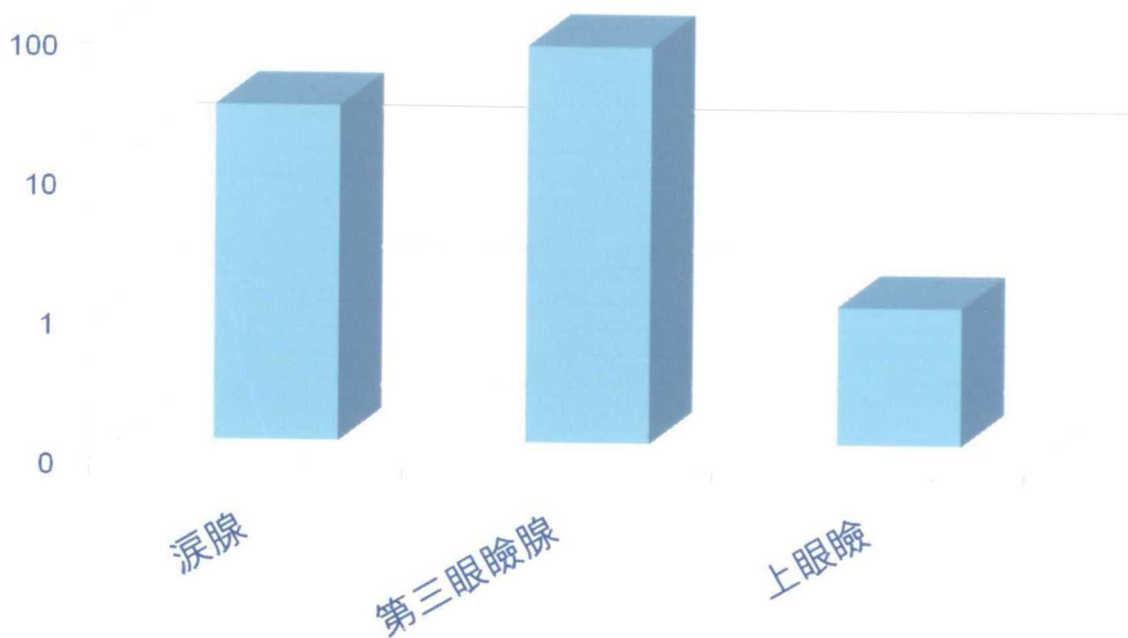


Fig. 35
涙器付属腺でのCA-VIの定量的PCRの結果

上眼瞼（瞼板腺、睫毛腺を含む）でのCA-VI mRNAの発現量を基準に比較すると、涙腺と第三眼瞼腺は10倍以上だった。

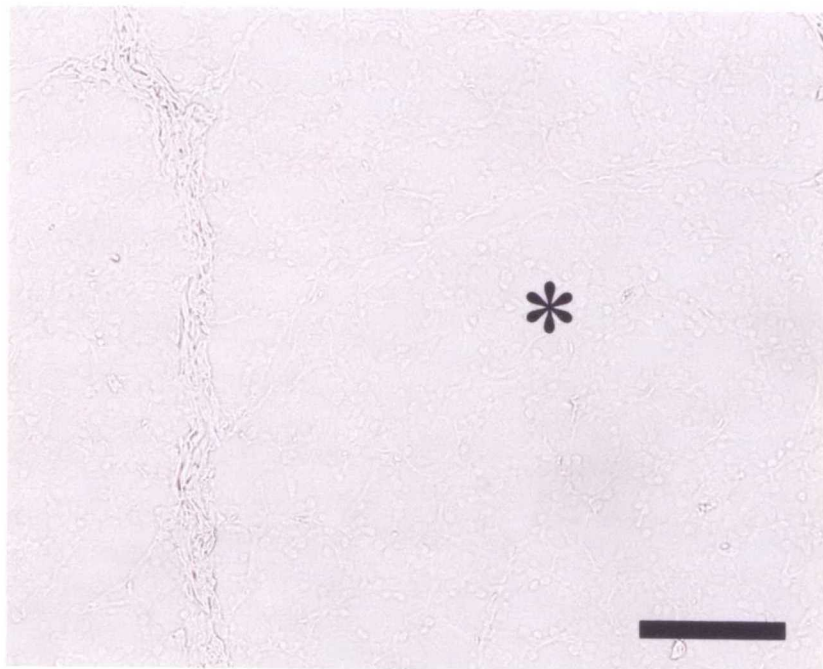


Fig. 36

涙腺 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

(*) : 漿液腺房

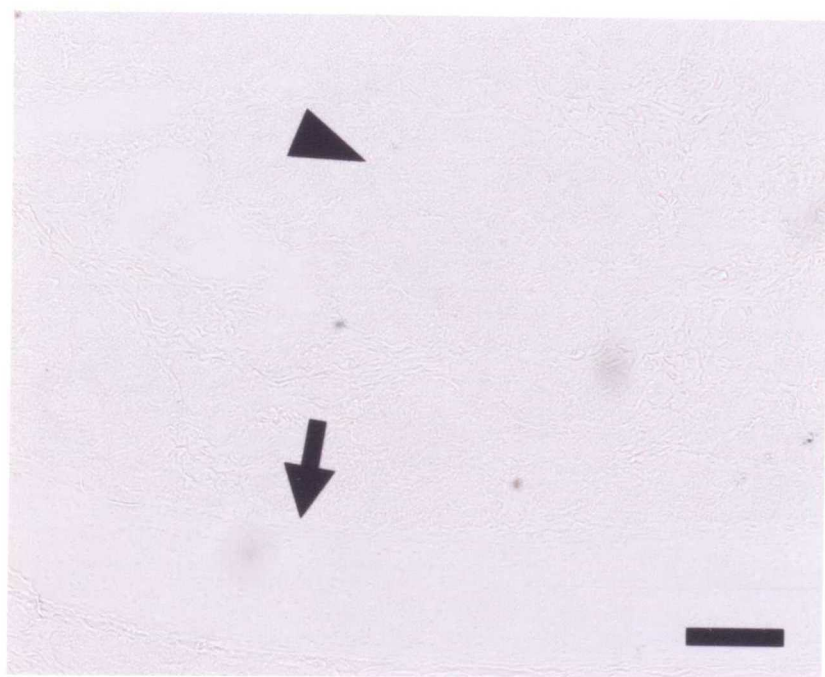


Fig. 37

第三眼瞼腺 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。

(→) : T字軟骨

(矢頭) : 腺房

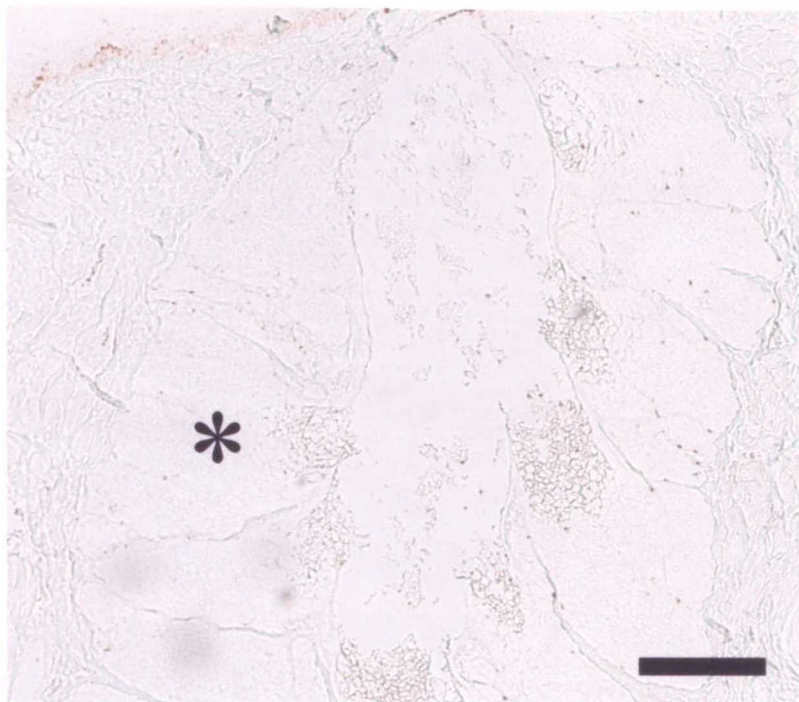


Fig. 38
 瞼板腺 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。
 (*) : 腺房

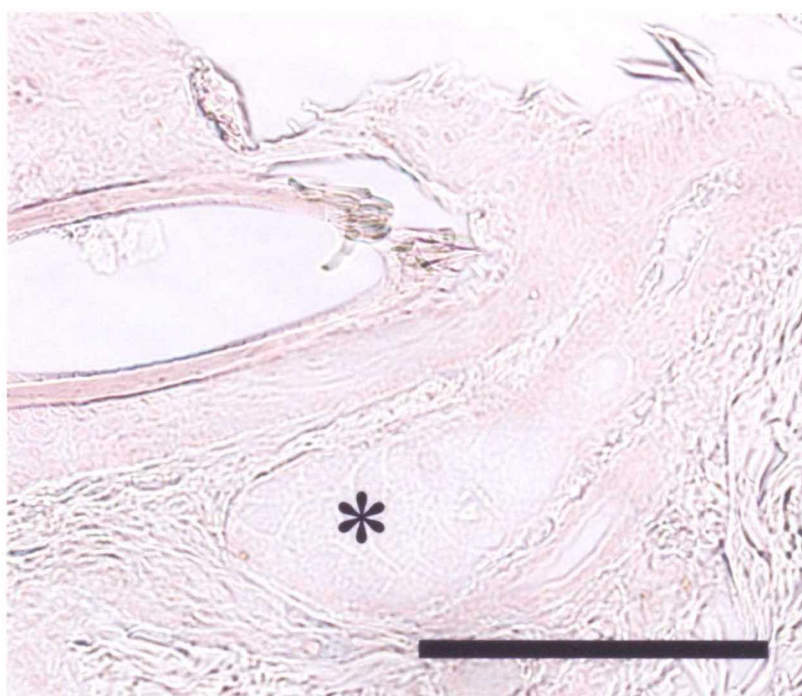


Fig. 39
 睫毛腺 in situ hybridization CA-VI (scale; 100 μ m)

CA-VIの遺伝子発現は確認されなかった。
 (*) 腺房

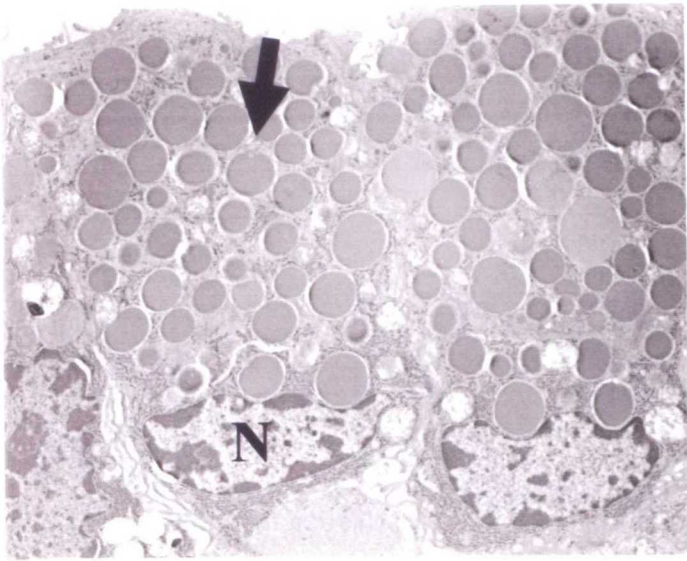


Fig. 40
第三眼瞼腺 透過型電子顕微鏡像（4000倍）

I型細胞

全て均一な高電子密度の分泌顆粒（→）を持っている。

（N）：核

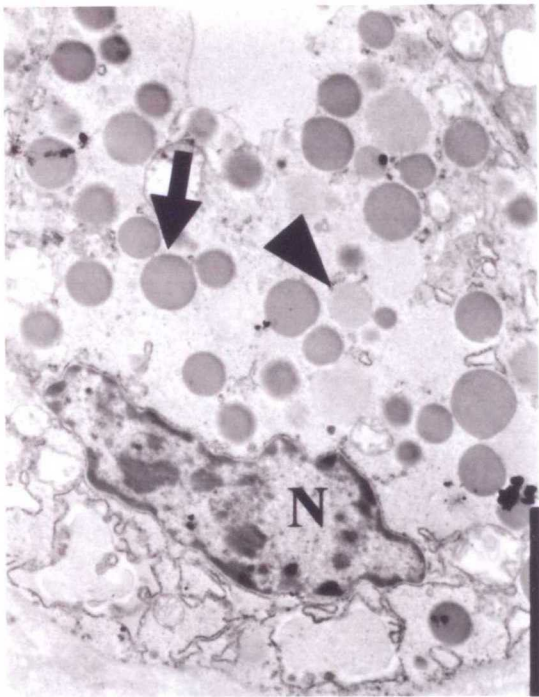


Fig. 41

第三眼瞼腺 透過型電子顕微鏡像（6000倍）

II型細胞

異なる電子密度の分泌顆粒（→、矢頭）が認められた。

（N）：核

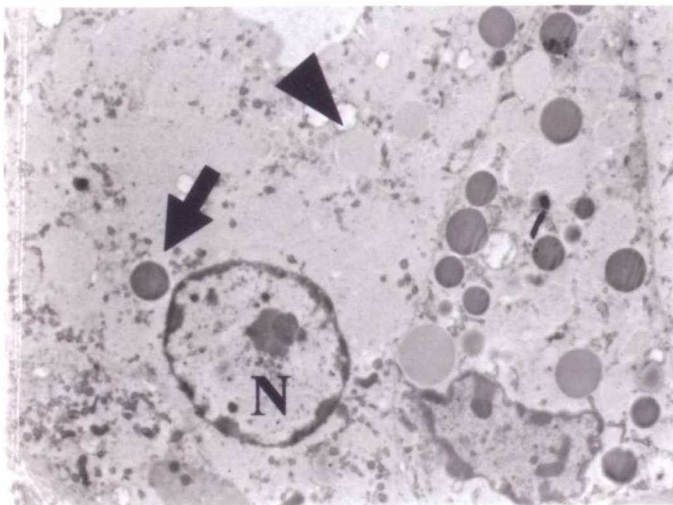


Fig. 42

第三眼瞼腺 透過型電子顕微鏡像（4000倍）

III型細胞

少数の高電子密度な顆粒（→）と、大多数の脂質滴様顆粒（矢頭）を持っている。

（N）：核

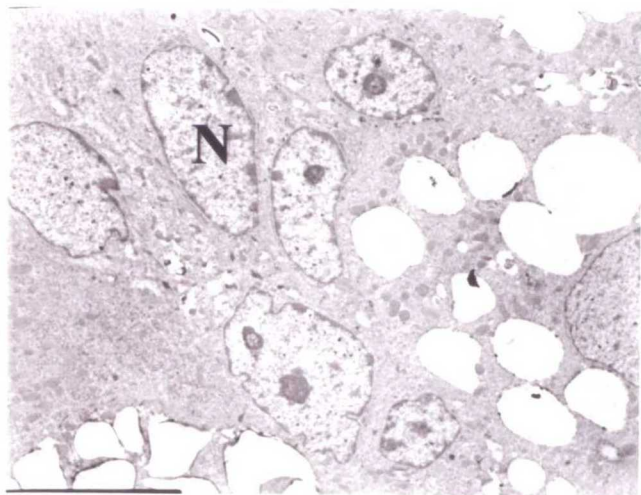


Fig. 43
 瞼板腺 透過型電子顕微鏡像 (2500倍)

未分化な脂腺細胞
 腺房辺縁部にあり、脂質滴は存在しなかった。
 (N) : 核

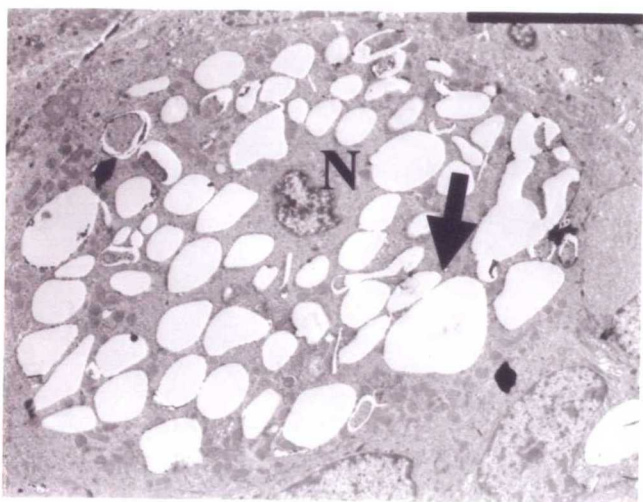


Fig. 44
 瞼板腺 透過型電子顕微鏡像 (2500倍)

中程度に分化した脂腺細胞
 核に対し細胞質の占める割合が増大し、
 細胞質内に脂質滴 (→) も多数観察された。
 (N) : 核

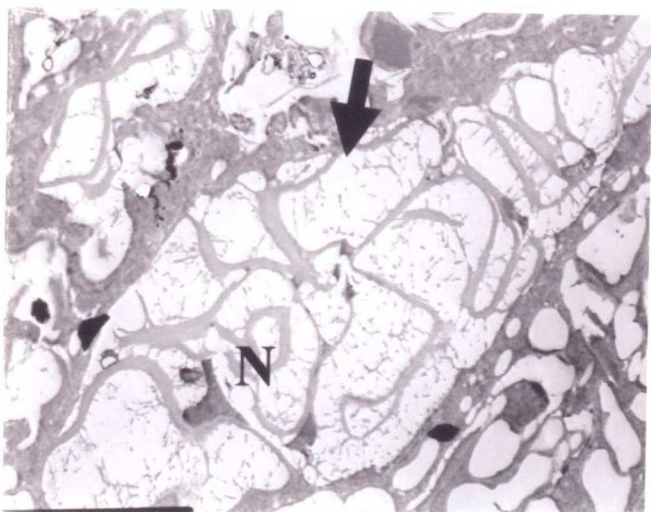


Fig. 45
 瞼板腺 透過型電子顕微鏡像 (2500倍)

高分化な脂腺細胞
 腺房管腔側にあり、脂質滴 (→) は互いに
 融合し巨大化し、細胞質基質は著しく乏し
 くなっていた。
 (N) : 核

参考文献

Anholt, R. R. 1993. Molecular neurobiology of olfaction. Crit. Rev. Neurobiol. **7**: 1-22.

Asari, M., Kimura, H., Ichihara, N. and Kasuya, T. 2000. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, II and III) in canine salivary glands: a distributional and comparative assessment. Anat. Histol. Embryol. **29**: 9-12.

Blatt, C. M., Taylor, C. R. and Habal, M. B. 1972. Thermal panting in dogs: the lateral nasal gland, a source of water for evaporative cooling. Science **177**: 804-805.

Brooks, D. E. 1991. Canine conjunctiva and nictitating membrane. In: *Veterinary Ophthalmology*, 2nd edn (ed. K. N. Gelatt). Lea & Febiger, Philadelphia.

Cavaliere, F., Masieri, S., Nori, S., Magalini, S. and Allegra, S. 1996. Carbonic anhydrase in human nasal epithelium: localization and effect of the inhibition by dichlorphenamide. Am. J. Rhinol. **10**: 113.

Chen, J., Lecuona, E., Briva, A., Welch, L. C. and Sznajder, J. I. 2008. Carbonic anhydrase II and alveolar fluid reabsorption during hypercapnia. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **38**: 32-37.

Coates, E. L. 2001. Olfactory CO₂ chemoreceptors. Respir. Physiol. **129**:219-229.

Fernley, R. T., Darling, P., Aldred, P., Wright, R. D. and Coghlan, J. P. 1989. Tissue and species distribution of the secreted carbonic anhydrase isoenzyme. Biochem. J. **259**: 91-96.

Fleming, R., Moxley, M., Waheed, A., Crouch, E., Sly, W. and Longmore, W. 1994. Carbonic anhydrase II expression in rat type II pneumocytes. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **10**: 499-505.

Frings, S., Benz, S. and Lindemann, B. 1991. Current recording from sensory cilia of olfactory receptor cells in situ. II. Role of mucosal Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} ions. J. Gen. Physiol. **97**: 725-747.

Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T. and Onishi, S. 1999. Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. Genomics **61**: 74-81.

Gelatt, K. N. 1991. Canine lacrimal and nasolacrimal diseases. In: Veterinary Ophthalmology, 2nd edn (ed. K. N. Gelatt). Lea & Febiger, Philadelphia.

Helper, L. C. 1996. The tear film in the dog. Cause and treatment of diseases associated with overproduction and underproduction of tears. Animal Eye Research **15**: 5-11.

Henkin, R. I., Martin, B. M. and Agarwal, R. P. 1999a. Decreased parotid saliva gustin / carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. Am. J. Med. Sci. **318**: 380-391.

Henkin, R. I., Martin, B. M. and Agarwal, R. P. 1999b. Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. Am. J. Med. Sci. **318**: 392-405.

Hewett-Emmett, D. and Tashian, R. E. 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. Mol. Phylogenet. Evol. **5**: 50-77.

Ichihara, N., Asari, M., Kasuya, T., Susaki, E., Nishita, T. and. Amasaki, H. 2003. Immunohistolocalization of carbonic anhydrase isozyme (CA-VI) in bovine mammary gland. J. Vet. Med. Sci. **65**: 1167-1170.

今堀和友、山川民男 監修 1984. 生化学辞典 (第一版). 東京生化学同人会. 東京

Jacobson, E. D. 1978. The gastrointestinal system. In: Essentials of Human Physiology (ed. G. Rase). Tear Book Medical Publishers, Chicago.

Kasuya, T., Shibata, S., Kaseda, M., Ichihara, N., Nishita, T., Murakami, M. and Asari, M. 2007. Immunohistolocalization and gene expression of the secretory carbonic anhydrase isozymes (CA-VI) in canine oral mucosa, salivary glands and oesophagus. Anat. Histol. Embryol. **36**:53-57.

Kimoto, M., Iwai, S., Maeda, T., Yura, Y., Fernley, R. T. and Ogawa, Y. 2004. Carbonic anhydrase VI in the mouse nasal gland. J. Histochem. Cytochem. **52**: 1057-1062.

Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Leinonen, J. and Rajaniemi, H. 1999. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. J. Physiol. **520**: 315-320.

Koester, M. K., Register, Am M. and Noltmann, E. A. 1977. Basic muscle protein, a third genetic locus isoenzyme of carbonic anhydrase? Biochem. Biophys. Res. Commun. **76**: 196-204.

Komai, M. and Bryant, B. P. 1993. Acetazolamide specifically inhibits lingual trigeminal nerve responses to carbon dioxide. Brain Res. **612**: 122-129.

Leinonen, J. S., Saari, K. A., Seppanen, J. M., Myllyla, H. M. and Rajaniemi, H. J. 2004. Immunohistochemical demonstration of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA-VI) expression in rat lower airways and lung. J. Histochem. Cytochem. **52**: 1107-1112.

Martin. C. L., Munnell, J. and Kaswan, R. 1988. Normar ultrastructure and histochemical characteristics of canine lacrimal glands. Am. J. Vet. Res. **49**: 1566-1572.

Merdrum, N. V. and Roughton, F. J. P. 1932. carbonic anhydrase, the CO₂ enzyme present in blood. J. Physiol. **75**: 15-16.

Nakayama, K., Jia, Y. X., Hirai, H., Shinkawa, M., Yamaya, M., Sekizawa, K., Sasaki, H. 2002. Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface

liquid in cultured human airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **26**: 105-113.

Noda, Y., Oosumi, H., Morishima, T., Tsujimura, T. and Mori, M. 1987. Immunohistochemical study of carbonic anhydrase in mixed tumours and adenomas of sweat and sebaceous gland. J. Cutan. Pathol. **14**: 285-290.

Ogawa, Y., Chang, C. K., Kuwahara, H., Hong, S. S., Toyosawa, S. and Yagi, T. 1992. Immunoelectron microscopy of carbonic anhydrase isozyme VI in rat submandibular gland: comparison with isozymes I and II. J. Histochem. Cytochem. **40**: 807-817.

Ogawa, Y., Matsumoto, K., Maeda, T., Tamai, R., Suzuki, T., Sasano, H. and Fernley, R. T. 2002. Characterization of lacrimal gland carbonic anhydrase VI. J. Histochem. Cytochem. **50**: 821-827.

Ogawa, Y., Toyosawa, S., Inagaki, T., Hong, S. S. and Ijuhin, N. 1995. Carbonic anhydrase isozyme VI in rat lacrimal gland. Histochem. Cell Biol. **103**: 387-394.

Okamura, H., Sugai, N., Kanno, T., Shimizu, T. and Ohtani, I. 1996a. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the trachea of the guinea pig. Histochem. Cell Biol. **106**: 257-260.

Okamura, H., Sugai, N. and Ohtani, I. 1996b. Identification of nasal epithelial cells with carbonic anhydrase activity. Brain Res. **728**: 263-266.

Okamura, H., Sugai, N. and Suzuki, K. 1999. Localization of carbonic anhydrase in guinea pig Bowman's glands. J. Histochem. Cytochem. **47**: 1525-1531.

Parkkila, S., Parkkila, A. K., Lehtola, J., Reinila, A., Sodervik, H. J., Rannisto, M. and Rajaniemi, H. 1997. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. Dig. Dis. Sci. **42**: 1013-1019.

Parkkila, S., Kaunisto, K., Rajaniemi, L., Kumpulainen, T., Jokinen, K. and

- Rajaniemi, H. 1990. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. J. Histochem. Cytochem. **38**: 941-947.
- Parkkila, S., Parkkila, A-K., Juvonen, T. and Rajaniemi, H. 1994. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzyme I, II and VI in the human alimentary tract. Gut. **35**: 646-650.
- Paysan, J. and Breer, H. 2001. Molecular physiology of odor detection: current views. Pflugers Arch. **441**: 579-586.
- Raisanen, S. R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P. L. and Vaananen, H. K. 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. FASEB J. **13**: 513-522.
- Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A., Gibbons, B. H. and Edsall, J. T. 1964. Carbonic anhydrase from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes. J. Biol. Chem. **239**: 1065-1078.
- Saito, A., Izumisawa, Y., Yamashita, K. and Kotani, T. 2001. The effect of third eyelid gland removal on the surface of dogs. Vet. Ophthalmol. **4**: 13-18.
- Shusterman, D. and Avila, P. C. 2003. Real-time monitoring of nasal mucosal pH during carbon dioxide stimulation: implications for stimulus dynamics. Chem. Senses **28**: 595-601.
- Spicer, S. S., Sens, M. A. and Tashian, R. E. 1982. Immunocytochemical demonstration of carbonic anhydrase in human epithelial cells. J. Histochem. Cytochem. **30**: 864-873.
- Stere, P. A. 1987. Complex of sequential metabolic enzymes. Annu. Rev. Biochem. **56**: 89-124.
- Sterling, D., Reihlmeier R. A., Casey, J. R. 2001. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. J. Biol. Chem. **276**: 47886-47894.

Stryer, L. 1975. Biochemistry Freeman. International Edition. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

Swenson, E. R. 1991. Distribution and functions of carbonic anhydrase isozymes in the gastrointestinal tract. In: The Carbonic Anhydrases. Cellular Physiology and Molecular Genetics. (ed. Dodgeson, S. J., R. E. Tashian, G. Gros and N. D. Cater), Plenum Presss, New York.

Taki, K., Mizuno, K., Takahashi, N. and Wakusawa, R. 1986. Disturbance of CO₂ elimination in the lungs by carbonic anhydrase inhibition. Jpn. J. Physiol. **36**: 523-532.

Tarun, A. S., Bryant, B., Zhai, W., Solomon, C. and Shusterman, D. 2003. Gene expression for carbonic anhydrase isoenzymes in human nasal mucosa. Chem. Senses **28**: 621-629.

Tashian, R. E. 1989. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. BioEssays **10**: 186-192.

Tashian, R.E. 1992. Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. Adv. Genet. **30**: 321-356.

Vince, J. W., Reithmeier, R. A. 1998. Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. J. Biol. Chem. **273**: 28430-28437.

Waheed, A., Zhu, X. L. and Sly, W. S. 1992. Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung. J. Biol. Chem. **267**: 3308-3311.

Zhu, X. L. and Sly, W. S. 1992. Carbonic anhydrase IV from human lung. J. Biol. Chem. **265**: 8795-8801.

謝辞

本論文を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、多大な御指導と御助言を賜りました麻布大学解剖学第一研究室浅利昌男教授に深く感謝の意を表します。また、本論文の審査にあたり、副査を御引受けいただき貴重な御助言と御指導を賜りました本学解剖学第二研究室山本雅子教授、分子生物学研究室村上賢教授、小動物臨床研究室斑目広郎准教授に深く感謝の意を表します。さらに、本研究を行うにあたり、多大なる御指導とご協力をいただきました本学解剖学第一研究室市原伸恒准教授、生理学第一研究室西田利穂准教授、日本獣医生命科学大学獣医解剖学教室尼崎肇教授、同教室添田聡講師に心より深謝致します。最後に、惜しめない御協力を頂いた解剖学第一研究室内の室生の皆様、ならびに勤務先のスタッフの皆様、そして両親に心より感謝申し上げます。