

ウシ乳腺組織における分泌型炭酸脱水酵素 (CA-IV) の機能的意義について

Functional Significance of Carbonic Anhydrase Isozyme (CA-IV) in Bovine Mammary Glands

浅利昌男, 西田利穂, 紫野正雄

麻布大学大学院獣医学研究科

Masao Asari, Toshiho Nishita, Masao Shino

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. The localization of bovine carbonic anhydrase isozyme VI (CA-VI) was examined immunohistochemically in bovine mammary glands during early lactation period (after 2-3 days of postpartum) and dry period (at about 2 months preparturition in adults) and young calves (at 30 and 150 days after birth) using specific CA-VI antiserum. The immunoreaction for anti-CA-VI antiserum was very weak in the mammary glands in young (prepubescent) calves. In dry period, CA-VI was also weakly expressed in secretory epithelial (acinar) and ductal cells. In contrast, the reaction was intense in mammary gland cells in early lactation period. Dot blotting analysis indicated that anti-CA-VI reacted positively to beastings and mature saliva, but weakly or not at all to milk during the dry period or calf saliva, respectively. The intense expression of CA-VI in the mammary glands in early lactation period might compensate for low levels of secretion from functionally and structurally immature salivary glands in young calves.

目 的

炭酸脱水酵素アイソザイム VI (CA-VI) は、羊の耳下腺および唾液中 (1) に発見された、炭酸脱水酵素アイソザイム中で唯一の分泌型アイソザイムである。CA-VI は羊 (1) やラット (2, 3), ヒト (4, 5, 6) および牛 (7) の唾液より抽出されており、口腔内の酸塩基平衡緩衝作用に関与していると考えられている (8)。免疫組織化学法ならびに *in situ* hybridization 法により、いくつかの動物種における CA-VI の分泌母地は唾液腺の腺細胞であることが示され、またこれらの研究により哺乳類の耳下腺および下顎腺の腺細胞で産生される CA-VI が唾液中に分泌されることを明らかにしている (7, 9, 10)。幼獣では唾液が乳汁消化作用を補い、また上部消化管の

酸塩基平衡維持に関与していると考えられている (11)。一方、幼獣に初期免疫機能や栄養素を供給する乳汁が産生される乳腺組織における酸塩基平衡維持機構に関する研究は殆ど行われていない。本研究は若齢仔牛、泌乳初期牛ならびに乾乳期牛の乳腺組織における CA-VI の組織内発現ならびに分布について精査し、その意義について検討することを目的とする。

材料と方法

組織: 8頭のホルスタイン雌牛 (出産後2-3日の泌乳初期牛: 3頭, 分娩前約2か月の乾乳期牛: 3頭, および生後30ならびに150日齢の弱齢仔牛: 各1頭) より、乳腺組織を採取した。採取した組織は10%中性緩衝ホルマリンおよびブアン液にて漬浸固

定し、アルコールによる脱水、キシレンによる透徹を施した後、パラフィン包埋した。得られたパラフィンブロックより厚さ4 μm の切片を作製した。

免疫組織化学法：パラフィン切片を脱パラフィンした後、内在性ペルオキシダーゼ阻害の為に0.3% H_2O_2 含有メタノール処理ならびに一次抗体の非特異的反応除去の為に正常ヤギ血清で処理した後、一次抗体と反応させた。一次抗体は既に特異性が確認されている抗CA-VI家兎抗体を用いた(7)。反応後、SABC法にて処理し、DABを用いて発色した。発色後ヘマトキシリンで核染色し、脱水、透徹、封入後、光学顕微鏡にて観察した。

ドットブロッキング法：出産後2～3日の泌乳初期牛(3頭)の乳汁、分娩前2ヶ月の乾乳期牛の乳汁、生後2～3日の新生仔牛ならびに出産後2～3ヶ月の泌乳期牛の唾液を使用した。全てのサンプルは使用時まで -20°C で保存した。全てのサンプル(40 μl)および5%スキムミルクをPVDC膜にプロットした。各プロットを15% BSAで処理した後、抗牛CA-VI家兎抗体で反応させた。反応後ABC法で処理して、DABにて発色を行い、分析した。

結 果

若齢牛乳腺組織におけるCA-VI免疫反応は非常に弱かった。この時期の乳腺組織は、泌乳初期の牛の乳腺組織と比べて、腺細胞ならびに導管上皮細胞が組織学的に未成熟であった(図1)。乾乳期の腺細胞ならびに導管上皮細胞のCA-VI免疫反応は非常に弱かった。腺上皮細胞の形態は、若齢仔牛のものと類似していた。また間質にはマクロファージ様の細胞がCA-IV免疫反応を示した(図2)。一方泌乳初期乳腺組織の腺細胞ならびに導管上皮細胞は、強い免疫反応を示した。腺房ならびに導管の内腔には分泌物を認め、内腔は拡張していた。内腔内の内容物もまたCA-VI免疫反応を示した。腺房の筋上皮細胞は免疫反応を示さなかった(図3)。10%中性緩衝ホルマリン固定組織とブアン液固定組織の間に免疫反応の違いは認めなかった。

ドットブロッキング法では、泌乳初期牛の乳汁ならびに泌乳期牛の唾液が強い免疫反応を示したが、乾乳期の乳汁ならびに新生仔牛の唾液はわずかな免疫反応を示したのみであった(図4)。

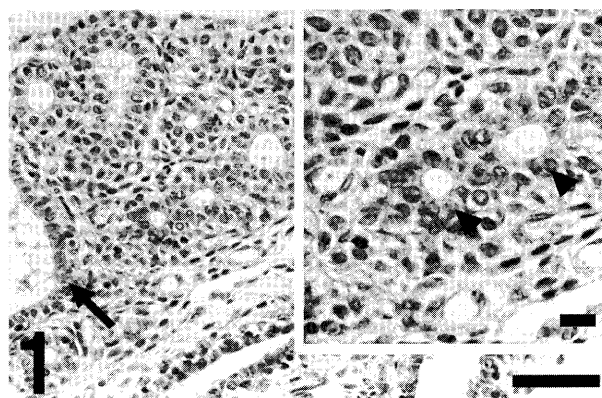


Fig. 1. Immunoreactivity to anti-CA-VI in epithelial cells of mammary glands from prepubescent 30-day-old calf is very weak. At this stage, acini and duct segments seem histologically more immature than adult structures (see also Fig. 3). Arrows show ductal epithelium. Arrowheads show immature acinar cells. Bar: 50 μm . Right square is higher magnification view. Acinar cells had a cubic immature shape without elongated cytoplasm. Bar: 10 μm .

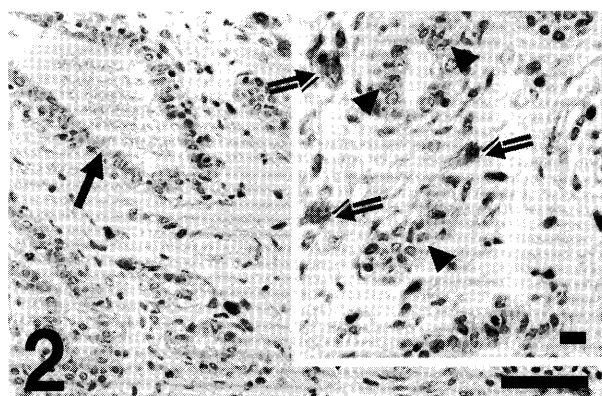


Fig. 2. Acini and ductal epithelial cells of mammary glands during dry period (About 2 months preparturition) display weak immunoreactivity to anti-CA-VI. Arrows show ductal epithelium. Arrowheads show very weak reaction to CA-VI in acinar cells. Double arrows show CA-VI positive macrophage-like cells in slightly expanded interstitium. Bar: 50 μm . Right square is higher magnification view. Interstitium region is slightly expanded, but acinar cells are cubic and small with little cytoplasm. Bar: 10 μm .

考 察

炭酸脱水酵素(CA; EC 4.2.1.1)は亜鉛を含んでいる金属酵素であり、哺乳類の組織で広く分布して、呼吸、酸塩基平衡、イオン輸送および骨再吸収などに関与している(12, 13, 14)。CA-VIは菌や口腔上皮の微小環境中の微生物によって生産された過剰な有機酸の中和を促進し、また細胞質型アイソザイムと補完しながらヒトの上部消化管上皮内の酸塩基緩

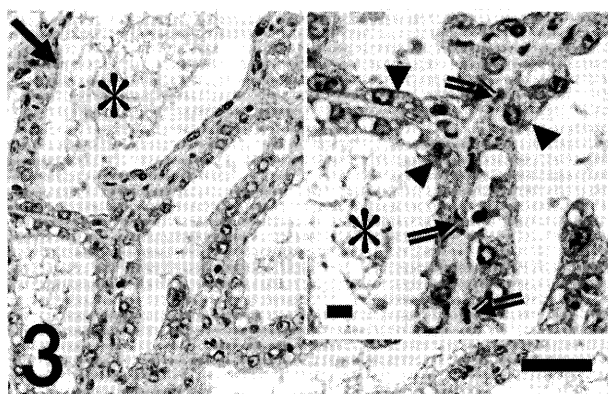


Fig. 3. Acini and ductal epithelial cells of mammary glands during early lactation.

Cells at about 2-3 days postpartum are immunoreactive to anti-CA-VI. Arrows show ductal epithelium. Arrowheads show active mature acinar cells in milk secretion. Immunoreaction (*) to anti-CA-VI is positive in lumen of duct and acinous cells of mammary glands. Double arrows showed myoepithelial cells that did not react to anti-CA-VI. Bar: 40 μ m. Right square is higher magnification view. Acinar cells are mature and slightly varied in size with cytoplasm that is intensely positive (brownish color) to anti-CA-VI. Bar: 10 μ m.

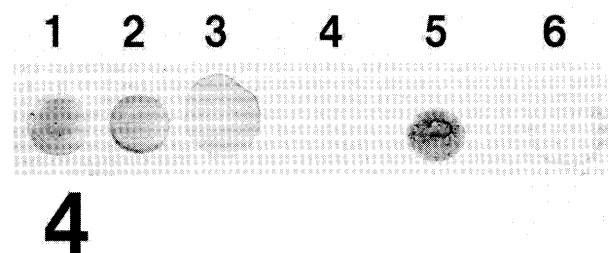


Fig. 4. Dot blotting analysis of milk and saliva by anti-bovine CA-VI antiserum. Positive reactions were detected to beastings spots at early lactation period (spots 1 and 2) and to saliva spots at lactation period: 2 months postpartum (spot 5), but weakly positive reaction was detected to milk at dry period (spot 3) and very weak to saliva at newborn calves (spot 6). Control spot: 5% skim milk was routinely negative (spot 4).

衝系を形成する (8)。CA-VI は、味覚や嗅覚との関係も示唆されており、また味蕾の分化における栄養因子でもある (15, 16)。舌の von Ebner 腺も CA-VI を含んでいる (17)。CA-VI は様々な動物の耳下腺と下顎腺に (2, 4, 6, 7, 10)、ラットと羊の涙腺に発現が認められている (18, 19)。小川らによると (18)、CA-VI は涙腺で産生され、わずかであるが涙液中へ分泌されることより、眼球表面の酸/塩基平衡維持の機能も有していると考えられている。ヒトとラットの乳腺中の CA-VI の発現に関してはわずかに、Karhumaa ら (20) の報告があるのみだが、彼らは

CA-VI の含有量が、初乳中には通常の乳汁に比べ、8 倍多いことを明らかにした。今回の研究で得られたドットブロッキング法ならびに免疫組織化学法の結果は、CA-VI が牛乳腺組織の腺房細胞や導管上皮細胞で産生され、泌乳期初期に乳汁中に分泌されることを示した。分泌された CA-VI は乳汁中の酸塩基平衡維持に関わるだけでなく、新生仔牛の未熟な唾液腺の低い CA-VI 分泌能を補い、新生仔の上部消化管内酸塩基平衡調節に大きく関与しているものと考ええる。

要 約

ウシの唾液を抗原として作製した分泌型炭酸脱水酵素 (CA-VI) の抗血清を用い、若齢仔牛 (生後 30 日ならびに 150 日)、泌乳期牛 (出産後 2 または 3 日) ならびに乾乳期牛 (分娩前約 2 ヶ月) の乳腺組織における CA-VI の組織局在について免疫組織化学法を用いて調べた。その結果、乾乳期の乳腺組織において腺細胞と導管上皮細胞に弱い免疫反応を認めた。一方、泌乳期の乳腺組織の腺細胞ならびに導管上皮細胞には非常に強い免疫反応を認めた。若齢仔牛の乳腺では非常に弱い免疫反応を認めた。またドットブロッキング法において、泌乳期の乳汁ならびに唾液に CA-VI の強い免疫反応を認めたが、乾乳期の乳汁ならびに新生仔 (生後 2 または 3 日) の唾液にはわずかな免疫反応しか認められなかった。得られた結果から、新生仔牛では唾液腺からの CA-VI の分泌能は低く、母体からの乳汁に含まれる CA-VI が、唾液腺からの低い CA-VI 分泌能を補い、新生仔牛の上部消化管内酸塩基平衡調節に大きく関与しているものと考ええる。

文 献

- 1) Fernley, R. T., Wright, R.D. and Coghlan, J. P. *FEBS Lett.* 105: 299-302. 1979.
- 2) Feldstein, J. B. and Silverman, D. N. *J. Biol. Chem.* 259: 5447-5453. 1984.
- 3) Ogawa, Y., Chang, C. K., Kuwahara, H., Hong, S.S., Toyosawa, S. and Yagi, T. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 807-817. 1992.
- 4) Kadoya, Y. T., Kuwahara, H., Shimazaki, M., Ogawa, Y. and Yagi, T. *Osaka City Med. J.* 33: 99-109. 1987.
- 5) Murakami, H. and Sly, W. S. *J. Biol. Chem.* 262: 1382-

1388. 1987.
- 6) Parkkila, S., Kaunisto, K., Rajaniemi, L., Kumpulainen, T., Jokinen, K. and Rajaniemi H. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 941-947. 1990.
- 7) Asari, M., Miura, K., Ichihara, N., Nishita, T. and Amasaki, H. *Cells Tissues Organs* 167: 18-24. 2000.
- 8) Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Leinonen, J. and Rajaniemi, H. *J. Physiol.* 520: 315-320. 1999.
- 9) Ogawa, Y., Hong, S. S., Toyosawa, S., Kuwahara, H., Shimazaki, M. and Yagi, T. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 343-351. 1993.
- 10) Peagler, F. D., Redman, R. S., McNutt, R.L., Kruse, D. H. and Johansson, I. *Anat. Rec.* 251: 190-198. 1998.
- 11) Veronesi, R., Cecin, H., Correa, A., Tavares, J., Moraes, C. and Bertoldo, O. J. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 19: 126-134. 1975.
- 12) Tashian, R. E. *BioEssays* 10: 182-192. 1989.
- 13) Tashian, R. E. *Adv. Genet.* 30: 321-356. 1992.
- 14) Wilbur, K. M. and Anderson, N.G.. *J. Biol. Chem.* 176: 147-154. 1948.
- 15) Henkin, R. I., Martin, B. M. and Agarwal, R. P. *Am. J. Med. Sci.* 318: 380-391. 1999a.
- 16) Henkin, R. I., Martin, B. M. and Agarwal, R. P. *Am. J. Med. Sci.* 318: 392-404. 1999b.
- 17) Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Koivunen, P. and Rajaniemi, H. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 657-662. 2001.
- 18) Ogawa, Y., Toyosawa, S., Inagaki, T., Hong, S. S. and Ijuhin, N. *Histochem. Cell Biol.* 103: 387-394. 1995.
- 19) Ogawa, Y., Matsumoto, K., Maeda, T., Tamai, R., Suzuki, T., Sasano, H. and Fernley, R.T. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 821-827. 2002.
- 20) Karhumaa, P., Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Tapanainen, J. and Rajaniemi, H. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 11604-11608. 2002.