

I-B-O-19

クエン酸鉛による5'-Nucleotidase活性検出の検討

岡山 雅信、斎藤 多久馬

(自治医大・1解剖)

【目的】5'-Nucleotidase(5'-N)[E.C.3.1.3.5.]活性検出には、硝酸鉛(Wachstein and Meisel 1957, WM法)およびセリウム塩(Robinson et al 1983)を使う方法が用いられている。クエン酸鉛は、Alkaline phosphataseなど多くの酵素活性検出の良好な捕捉剤として知られているが、現在まで、5'-N活性検出に用いた報告はない。私たちは、クエン酸鉛を用いた5'-N活性検出を試み、WM法と比較を行ったので報告する。

【材料および方法】ラット網膜を用い、6%ショ糖を含む0.1M Cacodylate buffer(pH7.4) 2% glutaraldehyde, 4℃で30分浸漬固定を行い、洗浄後、40μm切片作成、37℃で15~30分反応を行った。一部は、光顕標本とし、残りは、1%四酸化オスミウム液で後固定0℃、60分、脱水後、エポキシ樹脂包埋を行い、電顕観察を行った

【結果と結語】光顕観察の結果は、WM法と比較し、クエン酸鉛法では、網膜外節および外顆粒層の染色傾向は同じものの、より特異的に強染した。また、電顕観察から、酵素活性の局在の場は、視細胞原形質膜および外節円板膜上にあり、よりfineであり、クエン酸鉛が、5'-N活性検出においても、硝酸鉛、セリウム塩同様、良い捕捉剤と成り得ることを示している。

I-B-O-20

セリウム塩を捕捉剤としたCa-ATPase活性の組織化学的検出法の検討

岡田暉彦、小林俊博、瀬口春道、

高知医大・第2解剖、

細胞内で、Ca⁺⁺イオンが種々の重要な機能を果たしていることは、よく知られている。細胞内のCa⁺⁺イオン濃度を調節するものの一つとして、形質膜および小胞体膜に存在するCa⁺⁺ポンプがある。今回、我々はこのCa⁺⁺ポンプの主体をなすCa-ATPaseの活性を、セリウム塩を捕捉剤とした組織化学的検出方法を試み、骨格筋、心筋を用いて検討した。

ラットの骨格筋、心筋を2%paraformaldehyde液にて固定、50μmの厚さに薄切し、酵素活性を検出した。反応液は、基質としてp-nitrophenylphosphateを、酵素反応の結果生じたリン酸を捕捉するのにCeCl₃を使用した。反応は中性領域で行った。Ca⁺⁺依存性の検討のためには、切片を反応前にEGTAを含む溶液でよく洗浄した。

骨格筋および心筋のCa-ATPase活性はCa⁺⁺濃度に依存し、1~10μMで最大の活性を示し、5mMでは、酵素活性は阻害された。酵素活性の反応産物は、主として筋小胞体膜に局在しているのが認められた。固定液に対するこの酵素活性は、paraformaldehydeには抵抗性を示すが、glutaraldehydeでは容易に失活した。