

29-II-23

腎糸球体細胞動脈におけるT型カルシウムチャネルの
遺伝子発現に関する組織細胞化学的検討

池田 稔¹⁾、谷岡 正淑¹⁾、能登谷 満¹⁾、
木村 和弘¹⁾、小野 克重²⁾、
Edward Perez-Reyes³⁾
塩野義製薬株式会社 創薬研究所¹⁾
大分医科大学 医学部 生理学講座 (第二)²⁾
Loyola University, Department of Physiology³⁾

【目的】電位依存性カルシウムチャネルは膜電位の脱分極により活性化し、開口することで選択的にカルシウムイオンを透過させる。このチャネルは電気生理学の実験に基づいて、膜電位閾値 -40mV 以上で活性化される高閾値型と、 -50mV 以下で活性化される低閾値型に大別される。前者にはL型、N型、P/Q型、R型などが存在し、後者にはT型が知られている。L型チャネルは血管平滑筋やその他の細胞に発現しており、その拮抗薬が高血圧や狭心症などの循環器疾患に広く用いられている。腎血管系において、L型チャネルは糸球体輸入細動脈に発現していて輸出細動脈には発現しないことが知られている。従って、その拮抗薬は輸入細動脈を著明に拡張させるが輸出細動脈にその作用は及ばない。一方、T型チャネルを抑制する薬剤は輸出細動脈の弛緩作用を有しており、これによって糸球体内圧を低下させ腎に保護的であることが薬理学実験で確認されている。このことからT型チャネルは輸出細動脈に存在する可能性が示唆されるものの、その局在について詳細は明らかでない。T型チャネルの腎臓血管系における局在を解析することは、腎微小循環調節におけるカルシウムチャネルの役割を知る上で極めて重要であり、今回我々は同チャネルの遺伝子発現態様を病態モデル動物で調査することにした。

【方法】本態性高血圧症モデルラット (Spontaneously Hypertensive Rat) を解剖に供試し、4% paraformaldehyde-DEPC処理水溶液で灌流固定後に腎臓を摘出した。常法によるパラフィン包埋を経て組織切片を作製した。T型チャネル α_1 サブユニットの α_{1G} 、 α_{1H} 、および α_{1I} 各サブタイプcDNAにおける特異的配列約600bpを鋳型としcRNAプローブを調製してnon-RI DIG in situ hybridizationを行った。DAB immuno-peroxidase法による標的mRNAの検出後、PAS補染色し検鏡に供した。輸入細動脈、輸出細動脈の峻別については、連続切片の観察を通じ小葉間動脈からの分岐と毛細血管への枝分かれにより確認・同定した。

【結果】腎糸球体細胞動脈においてDAB特有の茶褐色なシグナルが検出された。陽性反応が観察されたのはT型チャネル α_{1G} であり、輸出細動脈、輸入細動脈それぞれの血管平滑筋に局在すると見受けられた。複数の切片で検討を重ねた結果、輸出細動脈における局在がより明瞭であった。同 α_{1H} 、 α_{1I} ではシグナルが確認されなかった。以上、糸球体細胞動脈域におけるT型チャネルの存在が明らかとなった。

29-II-24

生体外および生体内凍結技法によるヒトおよびマウス流動赤血球の元素分析法

藤井 靖久、寺田 信生、大野 伸彦、馬場 健、
大野 伸一
山梨大学 大学院医学工学総合研究部 解剖学第1
教室

【目的】急速凍結技法は、生物試料の三次元的微細構造以外に細胞内可溶性物質や電解質等を瞬時に氷晶中に保存できる物理固定法である。すでに我々は、生体内凍結技法を用いて流動赤血球の形態像が各臓器内で可逆的に変化することを報告した。今回、流動赤血球形態変化と電解質イオン移動を明らかにするために、生体外および生体内凍結技法を用いてヒトおよびマウス流動赤血球を電顕的に検索した。

【材料と方法】I) (A) 生体外凍結技法：ヒト新鮮静脈血 (36°C および 4°C) を、採血静止下および種々流出圧下 ($0\sim 220\text{mmHg}$) で液体窒素で冷却したイソペンタン・プロパン混合寒剤内 (-193°C) に駆出して急速凍結した。(B) 生体内凍結技法：ネブタール麻酔下の正常および心停止後のマウスを開腹し、肝臓を冷却メス刃で生体内凍結した。II) これらの凍結試料をエイコーFD-3AS内において低温・高真空下 (-95°C , $5 \times 10^{-7}\text{torr}$) で凍結乾燥した。III) さらにヒト赤血球試料については、カーボン板上に両面テープで接着後、剥離して単層の赤血球試料を作製した。またマウス肝臓試料は、両面テープで肝臓の凍結切断面を接着後、剥離して試料台に付着させ、一部はカーボン含有樹脂で試料台に固定した。IV) 各試料をカーボン蒸着し、X線微小分析装置付き日立S-4500走査型電子顕微鏡で元素分析を行った。

【結果】ヒト流動赤血球の生体外凍結試料では、 36°C で流動方向に伸長することで典型的な両側陥凹像は消失した。またX線微小分析の結果、流出圧の上昇に伴ってNa, Clの上昇が認められた。しかし 4°C 冷却試料では、高流出圧においても両側陥凹像を有する赤血球の残存とともに、X線微小分析では、明らかな電解質イオンの移動は認められなかった。マウス生体内凍結試料の肝臓洞内流動赤血球では、明瞭な両側陥凹像は見られなかった。しかし心停止後マウス肝臓では、肝臓洞内で赤血球は局所的にうっ滞し、両側陥凹像が見られた。またX線微小分析によると、採血静止状態のマウス赤血球では、K, Clのピークが最も高く、P, Sが続き、Naが最も低かった。しかしマウス生体内凍結試料では、Pのピークが最も高く、K, Clが続き、Naは低かった。また心停止後マウスにおいては、Naの上昇が認められた。

【結論】流動赤血球の生体外凍結技法およびマウス臓器での生体内凍結技法は、赤血球の動的形態変化と、それに伴う元素組成変化の解析に有用であることが示唆された。