

Title	高濃度食塩水添加によるアルカリ性フォスファターゼの組織化学的新検出法
Author(s)	植月, 俊一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29261
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	植 月 俊 一 うえ つき しゆん いち
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1069 号
学位授与の日付	昭 和 42 年 1 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	高濃度食塩水添加によるアルカリ性フォスファターゼの 組織化学的新検出法
論文審査委員	(主査) 教 授 陣内伝之助 (副査) 教 授 坂本 幸哉 教 授 清水 信夫

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

alkaline phosphatase の組織化学的検出法には従来金属塩法, アゾ色素法などあるが, これらの方法では反応液中の基質・発色剤の非酵素的分解, 反応生成物の拡散・吸着などによって酵素活性部以外の場所に色素沈着を生じ, 眞の活性部を正しく把握することは困難である。そこで私は食塩の塩析効果を利用して拡散・吸着を防止し, 活性部にのみ局限して染色される良好な標本を作る目的で反応液中に高濃度に食塩を加えるという変法を考案し, 従来の方と比較検討するとともに, 一方, 食塩の酵素活性に及ぼす影響を生化学的に検討し, 組織化学的所見を判定する助けとした。

〔方法及び成績〕

A 生化学的実験: 酵素材料としてはラッテ腎 homogenate を用い, 酵素活性の測定には血清 alkaline phosphatase のための Bessey-Lowry 法を応用し, 光電比色測定を行なった。

1. 食塩濃度と酵素活性との関係: 500 倍希釈 homogenate を用い, 食塩濃度を変えて酵素活性を時間的に測定した。

成績: 食塩の濃度が 0.83 M の場合は食塩を含まぬ場合に比して活性は増強される傾向にあるが, 濃度が大になるにつれて活性は阻害され 3.33 M の場合その活性は約 60% に低下する。しかしこの食塩による活性阻害は, ある一定時間までは反応時間を延長することによって補うことができる。

2. 食塩添加時の酵素量と酵素活性との関係: 酵素材料として上記 homogenate の 100~10,000 倍希釈を用い, 食塩の濃度 3.33 M における酵素活性の変動を調べた。

成績: 食塩を添加した場合も添加しない場合も, 酵素活性は酵素量に正比例し, 食塩による活性阻害の比率は酵素量に関係なく一定であった。

3. 食塩添加時の反応温度と酵素活性との関係: 酵素材料として 500 倍希釈 homogenate を用い,

食塩濃度を 3M と定め、反応時間を 15 分、30 分とした。

成績：同じ反応温度では、食塩を含む場合の活性より低い。20°C の 3 M 食塩水の場合の活性は、10°C の食塩を含まぬ場合の活性に比べてやや低い、その差はきわめて少ない。すなわち 20°C での 3 M 食塩水による活性阻害は反応温度を 20°C より 10°C に下げたための阻害にほぼ等しい。

B 組織化学的研究

材料としてラットの腎・小腸、人および犬の肝を用い、凍結融解法によってパラフィン包埋後、薄切々片とした。

1. 食塩によるジアゾニウム塩（ジ塩と略す）の分解抑制作用の検討：アルカリ液中でのジ塩の自然分解の程度と食塩による分解抑制の程度とを光電比色法によって比較した。

成績：ジ塩の分解はその種類によって程度に差はあるが、食塩を含まぬ場合にはかなり速やかに分解する。しかし食塩を加える場合は、その濃度が高いほど分解は抑制される。また低温にするとジ塩の分解は抑制されるが、3M 食塩水の場合の分解抑制効果は、食塩を含まぬ場合の反応温度を 22°C より 10°C に下げた時の抑制効果にほぼ等しいか、またはそれ以上である。

2. 食塩の組織化学的反應に対する作用：4 M の濃度に食塩を含む反応液を用いた。この点が従来の方法と異なる。金属塩法では基質として β -glycerophosphate を用い、アゾ色素法では α - β -naphthyl phosphate, naphthol AS-MX phosphate を基質とし、発色剤として fast blue B, fast red RC, fast red violet LB を用いた。

成績：金属塩法では、食塩を含む場合の酵素活性は同一反応時間では食塩を含まぬ場合より明らかに弱い、生化学的実験 1 で示されたように、反応時間を延長すると同程度になる。活性が同程度の標本を比較すると両者の間には著しい差がみられる。すなわち、食塩を含まぬ場合の活性部からの色素の拡散、組織全体の着染は、食塩を含む場合には著しく減少し、活性は小腸の小皮縁、腎の刷子縁などに一致して現われ、微細な構造も明瞭となる。アゾ色素法では金属塩法と異なり、食塩を含む場合でも含まぬ場合と同じ反応時間で同程度の活性が得られる。酵素の局在性は基質と発色剤との組合せの如何にかかわらず食塩を含む場合の方がはるかに良好である。すなわち食塩を含まぬ場合にみられる活性部からの色素の拡散は著明に減少し、いままで認めがたかった小腸絨毛上皮のゴルジー野、腎糸球体毛細血管などまでが明らかに反応を示すようになる。生じた色素粒子に関しては、fast blue B と α -naphthyl phosphate との組合せは他の組合せに比し粒子がきわめて小さく、小皮縁の櫛様の微細構造なども金属塩法の場合と同様にきわめてよく現われる。

〔総括〕

反応液に食塩を高濃度に加えることによって、酵素活性部はきわめて鮮明な局在を示すようになった。これは食塩の塩析効果によって基質の直接染色性が高まり、ジ塩の自然分解が抑制されてアルカリ液中でも安定化し、生じた反応生成物の溶解度は減少して反応場所に沈澱し、拡散現象が減少するためと考えられる。酵素の少ない部分が食塩によって活性の出現を抑制されて見かけ上鮮明な局在性を示したのではないことは前述の生化学的実験 2 の結果でも明らかである。またこのことは食塩を加えることによっていままで表現しえなかったゴルジー野、糸球体毛細血管まで活性が出現することでも推察できる。

以上の如く食塩を用いることによって組織化学的のみならず細胞化学的精度で alkaline phosphatase を検索しうるようになったものと信ずる。

論文の審査結果の要旨

この研究はアルカリ性フォスファターゼの新しい組織化学的検出法を考察したもので、反応液に高濃度の食塩水を加えると酵素活性部の局在性がよくなるという研究である。

組織学的に細胞の機能を正しく知ろうとするためには、どうしても組織化学的に正確な局在性を示す標本を作ることが必要となる。

ところで本酵素の検出法には従来金属塩法、アゾ色素法などがあるが、いずれも反応液中の基質・発色剤の非酵素的分解産物や反応生成物の拡散・吸着などによって酵素活性部以外の場所にも色素沈着を生じ、真の局在性を示さない欠点がある。

そこで著者は拡散・吸着を防止し、活性部にのみ局限して染色される良好な標本を作る目的で、反応液中に塩析効果の大なる食塩を高濃度に加えるという変法を考案し、従来の方法と比較して優秀であることを確かめるとともに、一方、食塩の酵素活性に及ぼす影響を生化学的に検討し、組織化学的所見を判定する根拠としたものである。本検出法の考案は組織化学的研究の上にかわめて有意義な仕事である。