The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cytochrome Oxidaseの組織化学的検出法の新変法とその検討
Author(s)	要, 明雄
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29270
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【62】

氏名・(本籍)	要(かなめ)　明(あき)　雄(お)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　1071　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	**Cytochrome Oxidase の組織化学的検出法の新変法とその検討**
論文審査委員	(主査) 教授 陣内伝之助 (副査) 教授 清水 信夫　教授 浜　清

論文内容の要旨

〔目　的〕

Cytochrome Oxidase (C-o-aseと略記) の組織化学的検出法として，古くは Nadi 反応があり，近来 Nachlas, Burstone らの方法が知られている。しかし酵素活性の忠実な検出と精確な局在性の表現についての詳細な検討はなされていない。従来より組織化学反応の条件は主に生化学的知見を基にして決定されていた観が強く，C-o-ase についても例外ではない。著者は，反応液中の試薬の化学的条件，ことに緩衝液の濃度および pH の変化が組織所見とくに局在性の表現に著しい変動をきたすことに着目し，この点に重点をおいて本酵素の組織化学的検出法における緩衝液の濃度および pH の至適条件を決定するため，従来使用されていた試薬のほか，多くの試薬について検索を行ない，新たに極めて優れた反応と局在性の得られる方法を見出した。

〔方法並びに成績〕

方法：各種顕色剤23種とアミン12種より得られる342種の試薬の組合せについて，燐酸緩衝液の pH 6.0 および7.8の条件下における酸化剤過沃素酸による発色の状態と，人胃凍結切片における組織化学的反応とを対比検討した結果，(A) 1-(3′-ethylsulfamoyl) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone とp-amino-N-ethyl-N-hydroxyethylaniline, (B) 1-(3′-chloro) phenyl-3-methyl-5-pyrazolone と N-phenyl-p-phenylen ediamine の 2種の組合せが極めて強い発色と優れた局在性を示すことを知った。そこで，これらについて，さらに緩衝液の濃度および pH (以下単に濃度，pH と略称) の反応におよぼす影響を確めるため，0.005～0.2 M, pH 5.5～8.0 の範囲内で試薬の酸化剤による純化学的発色およびラット肝ミトコンドリア浮游液を用いた生化学的反応による発色について，光電比色法によって検討し，さらに組織化学的反応所見と比較して，これら試薬の特性を明らかにするとともに，新たに C-o-ase 検出法として有効に応用しうるか否かを検討した。

成績：組合せ (A) について；この組合せにおける生成色素は化学的および生化学的反応ともに波長 435 mμ と 520 mμ に主な吸取帯を有し，化学的反応で 0.1 M, pH 6.75 で，生化学的反応では0.01M, pH 7.8でもっとも強い反応を示した。組織反応における活性の強さは上述の生化学的至適条件と全く一致するけれども，生成色素の拡散，結晶化等があって局在性は劣り，pH 6.75 では逆に局在性は極めて良好となるが活性はやゝ減弱し，pH 7.2, 0.02 M で両者ほゞ満足な組織化学的所見が得られた。

組合せ (B) について；この組合せにおける生成色素の主な吸収帯は化学的，生化学的反応ともに，波長 410 mμ（第 1 吸収帯）と 510 Å（第 2 吸収帯）にあり，低 pH では第 1 吸収帯が主に現れ黒紫色を示すが，pH 値の上昇につれて第 2 吸収帯の増大がみられ赤紫色を呈する。反応は，化学的には 0.1 M, pH 6.7（第 1 吸収帯），pH 8.0（第 2 吸収帯）で吸光度は最大であり，生化学的には 0.02 M, pH 8.0 で両吸収帯ともに最大の吸光度を示した。組織所見では，低pH では反応はやゝ弱いが，黒紫色で局在性は極めて優れているけれども，pH 値の上昇とともに赤紫色となり，活性は増強し，生化学的至適条件と一致するが，生成色素の拡散，移動，結晶化等を生じ局在性は極めて悪化することから，第 2 吸収帯の吸光度の増加が局在性悪化の原因と考えられ，第 1 吸収帯の化学的至適 pH で最良の局在性を示した。すなわち，0.01 M, pH 6.7でもっとも満足する結果が得られた。

これら 2 つの組合せ (A), (B) を通じて，生化学的反応の至適条件では組織化学的には強い活性は得られても局在性は悪い。とくに pH に関しては，(B) では化学的反応の至適 pH で，(A) では生化学的反応の至適 pH よりもさらに低い pH で最良の局在が得られた。これは生成色素の溶解度，組織親和性等の性質が反応液の化学的条件により変化するためと考えられ，このことは，純化学的反応で沈澱生成と上澄透明化が低 pH では極めて早く，高pH では発色は強いが沈澱形成，上澄透明化は遅延することからも容易に類推できる。また低 pH での活性減弱は (A), (B) いずれも反応時間の延長で補うことができ，局在性には影響をみない。

本反応の酵素特異性については，Moog の方法その他によって阻害対照実験を行ない，本反応を C-o-ase 反応として使用できることを確認した。局在性の検討としては，細胞内発色部位が位相差法による新鮮標本のミトコンドリア分布と一致することを確めた。さらに人胃化生腸上皮，十二指腸およびラット肝，心，腎につき本変法による組織化学的所見を検討した結果，局在性は極めて満足すべきものであり，酵素特異性，反応の強さ，局在性からみて，この 2 つの試薬組合せは十分 C-o-ase の新検出法として適用しうることを知った。

〔総　　括〕

各種顕色剤23種とアミン12種より得られた342種の試薬組合せを化学的および組織化学的に検討し，C-o-ase の組織化学的反応として極めて優れた 2 種の組合せを見出し，これに生化学的検討をも併せ行なって局在性に重点をおいた組織化学的至適条件を検索した。本 2 新変法を通じて得られた組織所見は，活性強度に関しては生化学的至適条件，すなわち高 pH に一致して強い発色を示すが局在性は劣っており，局在性の点ではむしろ純化学的反応の至適条件に近い低 pH で優れた結果が得られ，これは生成色素の性質が反応液の化学的条件により変化するためと思われた。また細胞内発色部位は位相差法による新鮮標本のミトコンドリア分布に一致し，正しい局在性を示すことが知られた。

論文の審査結果の要旨

Cytochrome Oxidase の組織化学的検出法には，種々の方法が発表されているが，細胞内の分布すなわち局在性という点では，いづれもかなりの欠陥がある。本研究は，特に良好な局在性を得ることを主眼として，総計 342 種の試薬組合せについて化学的，組織化学的検討を行なって Screening し，その中から極めて良好な局在性の得られる新変法 2 種を見出したものである。さらに，組織化学では，ことに酵素に関しては，精確な局在性を得ることは不可欠の条件である。本研究では反応液中の緩衝液の濃度および pH によって組織所見上，ことに局在性の良否に著しい影響があることを指摘し，新変法 2 種について，組織化学的検出法での至適条件を決定するために，化学的，生化学的検討を行なって分光分析的解析を試みる一方，組織標本による反応所見を対比して，この至適条件を検討した結果，本試薬による Cytochrome Oxidase の検出法に関する限り，組織化学的反応での至適条件は，化学的および生化学的反応での至適条件の折衷点に存在するという結論に達したものである。因みに既存の方法には，本研究の如き詳細な検討はなされておらず，主に生化学的知見に基づいて反応条件を決定している観があり，本研究はこの点に関しても，試薬の化学的特性を考慮して組織化学での反応条件を決定する必要のあることを指摘したもので，組織細胞化学分野で有益な示唆を与えたものと思われる。優れた所見を示す新変法は，種々の病変の組織化学的研究面で極めて有益であると考えられる。