

【 66 】

氏名	引 間 啓 祐 ひき ま けい すけ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 162 号
学位授与の日付	昭 和 39 年 6 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	<b>Histochemical Studies on Dehydrogenases and Dia- phorases with Special Reference to Their Specificity</b> (脱水素酵素およびデアフォラーゼの組織化学的研究, とくにそ の特異性について)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 松 英 雄 教 授 岡 本 耕 造 教 授 翠 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

脱水素酵素の組織化学的証明には、水素受容体として Tetrazolium 塩類が広く用いられている。この化合物は水溶性でほとんど無色であるが、還元されると不溶性で有色の Formazan になり、顕微鏡下に認め得ようになる。しかし、Tetrazolium 塩と緩衝液のみで、特定の基質を含まない反応液に組織片を incubate しても標識薬としての Tetrazolium 塩が還元されて陽性反応を呈する場合がある。これを内元性脱水素酵素反応と称しているが、この本態に関しては不明な点が多い。この非特異的な Tetrazolium 塩の還元反応を除去して、特異的な脱水素酵素反応を把握することを目的として本研究が行なわれた。

脱水素酵素の組織化学的研究は、Cryostat の普及とともに、ほとんど新鮮凍結切片のみを用いて行なわれてきたが、非特異的な内元性脱水素酵素反応や、組織中の脂肪に Formazan の溶解等が認められることがあり、酵素活性の局在を判定するのに容易でない場合がある。そこで、新鮮組織片を冷アセトンで数時間固定・脱水し、その後キシロールで透徹、パラフィン（融点 48°~50°C）に包埋して作成したパラフィン切片をも用いて、新鮮凍結切片と比較検討した。

内元性脱水素酵素反応はいかなる場合に増強し、また減弱消失するかを、Phenazine methosulfate, Menadione, DPN, TPN 等を添加した各種の反応液で、pH6.0 から 9.0 までの範囲で実験を行なった。Tetrazolium 塩としては、Nitro Blue Tetrazolium および Tetranitro Blue Tetrazolium を用い、また組織は主に白鼠と家兎の腎・肝・心・副腎・唾液腺等を使用した。

その結果、pH6.5 以下では添加物の有無に関係なく全て陰性反応を呈したが、新鮮凍結切片では pH7.0 から次第に陽性反応が増強して認められた。しかしパラフィン切片の場合には pH7.0 では完全に陰性であり、pH8.0 になると、DPN や Menadione を添加した反応液では弱陽性反応が認められた。

したがって、脱水素酵素反応の組織化学的証明には、非特異的な反応を除去する目的から、新鮮凍結切片よりもパラフィン切片を用いる方が望ましいという結論を得た。そこでパラフィン切片を作成する過程で酵素活性におよぼす影響について各種の固定剤や透徹剤を用いて、さらに温度条件も考慮して検討し

た。固定剤ではアセトンが酵素活性を保持する点では最も優れており、温度は $0^{\circ}\text{C}$ よりも $-20^{\circ}\text{C}$ の方が形態学的にも優れ、小組織片の場合には約2~3時間で固定・脱水が可能である。このパラフィン切片による証明方法では、切片のパラフィンを除去してから incubate すると著明な酵素活性の低下をきたすので、脱パラフィンする前に Incubation を行なった。このような方法で各種脱水素酵素、デアフォラーゼ反応を行なうと、基質を加えない場合は完全に陰性で、各々の基質混合液に incubate した際に特異的に酵素活性を証明し得た。

SH 基の阻害剤である N-ethyl maleimide や p-chloromercuribenzoate の 0.1 M 溶液で1時間前処置を行なった場合には、新鮮凍結切片、パラフィン切片ともに内元性脱水素酵素反応は完全に消失したが、基質を加えた反応液に作用させても陽性反応は認められず、基質に特異的な脱水素酵素の活性も完全に阻害された。しかし、デアフォラーゼの活性はなお DPNH や TPNH を基質として作用させると、Tetrazolium 塩の還元反応が認められた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、現今テトラゾリウム塩等をもちいての各種脱水素酵素の組織化学的証明に、しばしば認められる非特異的着色および所謂内元性脱水素酵素反応の原因究明と、その除去を目的として行なわれ、新鮮凍結切片とパラフィン切片との比較、反応液の pH、助酵素等添加による影響、臓器組織による活性の差異および阻害剤をもちいた組織中 SH 基との関係等を検討し、適当な操作によるパラフィン切片をもちいるならば、非特異的着色は完全に除外され、特異的の各種脱水素酵素反応を証明し得ることを明らかにしたのである。

さらにパラフィン切片を作成する過程において、酵素活性ならびに形態学的所見におよぼす影響についても多数の固定剤や透徹剤の温度、時間等の条件を詳細に検討し、パラフィン切片法による脱水素酵素の組織化学的証明法が有意義であることを明らかにしている。

このように、本研究は脱水素酵素の組織化学的証明法の特異性に関する重要問題を解明した研究であって、医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。