

脱水素酵素の組織化学的研究

〔第Ⅱ篇〕 乳酸及び林檎酸脱水素酵素系の組織化学的研究

京都大学結核研究所（所長 教授 植田三郎）

病理学 部（指導 教授 高松英雄）

水 谷 昭

（昭和34年6月30日受付）

目 次

1. 緒 言
乳酸及び林檎酸脱水素酵素系の歴史
2. 実験材料及び実験方法
3. 実 験 I
 - 1) 腎臓における所見
 - 2) 心臓における所見
 - 3) 胃における所見
4. 実 験 II
 - 1) 正常白鼠の全身主要臓器における所見
 - 2) 人の胃及び胃癌組織における所見
 - 3) Butter Yellow 飼育白鼠の肝における所見
5. 総括並びに考按
 - 1) formazan について
 - 2) 作用機序について
 - 3) 各種組織における分布について
6. 結 論

1 緒 言

第Ⅰ篇で述べたように脱水素酵素の組織化学的研究は1941年 Kuhn & Jerchel^{5,6)} が TTC を用いて、植物組織が適当な条件でこれを還元して formazan を形成し、その酸化還元電位その他の根拠から、これが主として酵素作用に起因するものであると報告して以来、動植物の新鮮組織による tetrazolium 塩あるいは tel-lurite の還元反応が広く追求され、所謂内元性活性としてある種の酸化還元酵素の作用によるものと考えられて来た。著者は第Ⅰ篇において、この内元性活性に関して種々検討した結果、これは分離された幾つかの酵素の作用とみないで、生体内の統合された酸化還元機能の動

的な一断面と考えるべきであると結論した。

而してこの内元性活性としての tetrazolium 還元反応と併行して、還元作用を示す脱水素酵素を個々に分析しようとの試みがあり、1947年 Mattson⁷⁾ は Co I あるいは Co II を必要とする酵素系が関与していると考え、Kun & Abood ('49)¹⁰⁾ は組織の homogenate を使つて TTC がコハク酸脱水素酵素によつて還元される事を報告し、又、同じ頃 Bielig 等 ('49)²³⁾ は細菌による TTC の還元を研究して、flavo-proteine 乃至は diaphorase が TTC の還元に関与している事を暗示して以来、特定の脱水素酵素による tetrazolium の還元反応を分離して追求しようとする動きが活発となった。Kuhn ('50)⁸⁵⁾ は diaphorase の還元作用を重視し、Brodie & Gots ('51,'52)^{25), 26)} も酵素あるいは細菌から抽出した脱水素酵素の研究で、flavine 酵素が直接 tetrazolium 塩を還元する事を明らかにした。又、Shelton & Schneider ('52)⁴²⁾ も同様の事を述べている。一方 Jensen 等 ('51)⁸⁴⁾ は corn embryo の DPN, TPN 結合の種々の脱水素酵素による還元反応を述べているが、その diaphorase の問題には触れていない。

このような動きの中にあつて、1951年 Seligman & Rutenburg^{12,13)} は新鮮組織切片において、コハク酸脱水素酵素の組織化学的証明に成功した。その後、コハク酸脱水素酵素の組織化学的研究は今日に至るまで数々の報告があるが、それ以外の酵素に関しては極めて少ない。ついで Farber, Sternberg & Dunlap ('54~'56)^{61, 62, 63)} が diaphorase の組織化学的技

を發表し、その反応は DPN 又は TPN 結合の脱水素酵素 そのものに 特異的でなく、兩種の **diaphorase** に特異的である事実を明らかにした。これはコハク酸脱水素酵素と共にその生物学的意味においても、組織化学的特異性からも注目されるところである。又、Pearson & Defendi ('54)⁵²⁾ の α -glycerophosphate 脱水素酵素に関する研究があり、腎において、コハク酸脱水素酵素や **diaphorase** とその分布が稍々異つている。

その他、Shearer, Hodes & Farber ('52)¹²⁸⁾ の林檎酸脱水素酵素の報告があるが、これは Farber 自身のその後の研究から、これ単独でなく、**diaphorase** も関与したものであり、Rosa & Velard ('53~'55)^{70, 129, 130)} が「乳酸脱水素酵素-DPNH 酸化酵素系」の研究を發表しているが、著者の調べ得たのは何れも抄録であつて、その詳細を検討する事が出来なかつたのは残念である。しかし、その報告から推察されるところでは、恐らく、**diaphorase** による **tetrazolium** の還元反応であろう。我国でも市川 ('56)⁹⁸⁾ が新鮮切片で、乳酸その他各種の基質を用いて脱水素酵素の組織化学的研究を行っているが、氏自身述べている如く非特異的染色に苦慮しているようである。

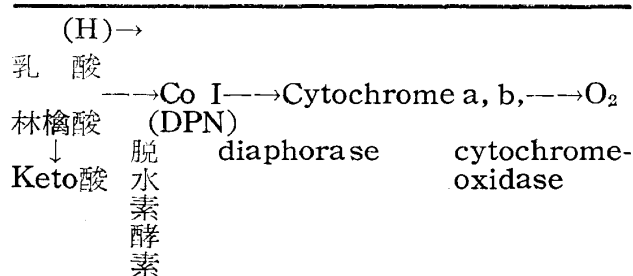
このように単一の脱水素酵素系の組織化学的証明法は極めて少なく、特異性と云う組織化学の第一条件を満たすような方法はまれである。酵素の組織化学的研究、特にその手技について考察するに当つては充分な化学的、生化学的な理解なしには出来ない。

歴史的にみた乳酸及び林檎酸脱水素酵素系の研究

さて、林檎酸脱水素酵素はコハク酸脱水素酵素と同様にクエン酸廻路の一員として重要なものであり、乳酸脱水素酵素は解糖作用、あるいはクエン酸廻路と関連してこれまた極めて重要な酵素である。前者は林檎酸を脱水素的に酸化して **oxalo 醋酸** とし、後者は同じく乳酸を焦性葡萄糖酸へと酸化する。これら酵素の研究を歴史的にみれば、1919年 Meyerhof¹³¹⁾ が動物筋肉で乳酸が酸化される事を報告し、同時にこ

れに **coenzyme** が関与していると暗示した事に始まるようである。その後、Szent-Györgi 一派の研究¹³²⁻¹²⁸⁾ で **coenzyme**、酸化還元電位その他の問題が論議され、Quastel & Whetham ('24)¹³⁹⁾, Stephenson ('28)¹⁴⁰⁾, Cook ('30)¹⁴¹⁾, Barron ('32, '34)^{142, 143)}, Wagner-Jauregg 等 ('34, '35)^{144, 145)}, Ogston & Green ('35)¹⁴⁶⁾ 等は主として大腸菌その他の細菌や酵母の酵素について研究した。一方 Warburg & Christian ('34~'35)¹⁴⁷⁾, 或いは Lohman ('31)⁴⁸⁾, Ohlmeyer ('36)¹⁴⁹⁾, 更に Adler, Euler ('34~'37)¹⁵⁰⁻¹⁵⁷⁾ によつて Co I, Co II が夫々化学構造は **diphospho- & triphosphopyridine nucleotide** であることが明らかとなり、その生物学的意義も究明されて来た。1936年 Green & Brosteaux^{82, 158)} が豚の心臓から乳酸及び林檎酸脱水素酵素を抽出して、これらの性格を広く検討し、各種動物の全身主要臓器における分布を明らかにした。又、これらの酵素系において、未知の酵素の存在を示し、その後の研究¹⁵⁹⁻¹⁶⁷⁾ で、「**coenzyme factor**」と呼ぶ新しい酵素が、恰も脱水素酵素の如く還元型 **coenzyme** に働き、生物体内においてその呼吸に当り、脱水素酵素系と、**cytochrome- 酸素系** の間の中間的な水素運搬体としての重要な役割を持つものである事が明らかになった。又時を同じうして Adler, Euler 等 ('37)¹⁶⁸⁾ が同様に還元型 Co I が従来の **flavine** 酵素或いはコハク酸脱水素酵素と異なる酵素で脱水素される事を明らかにし、「**Überträger**」の意味として **Diaphorase** の名を与えた¹⁶⁹⁾。その後の研究でその性質が明らかにされ^{91, 170)}, **glutamic 酸** の脱水素的酸化に関連して Co II を酸化する **diaphorase** の存在が示され¹⁷¹⁾, 更に主要臓器における分布が報告された¹⁷²⁾。かくして、Euler 等及び Green 等の研究に要約される様に **diaphorase** (又は **coenzyme factor**) は Co I を助酵素とする乳酸、林檎酸その他の脱水素酵素、或いは Co II を助酵素とする **hexosemono 磷酸脱水素酵素系**等と **methylene 青** の還元反応の中間の水素運搬体として作用し、更に亦、この **diaphorase** は **cytochrome** を

殆んど還元しないが, cytochrome a, b を速やかに還元し, 両者は cytochrome oxidase によつて再び酸化される事が明らかになった。ここにおいて乳酸及び林檎酸の生体内における酸化機構は次の様に体系化されたのである。



その後, Warburg & Christian ('38)⁸⁶⁾, Straub 等 ('39)^{87,88)} によつて diaphorase が FAD を有する flavine 酵素であり, 且, この dinucleotide が D-amino 酸酸化酵素の助酵素である事が明らかにされた。又, Straub ('40)¹⁷³⁾ は乳酸脱水素酵素を結晶として抽出した。更に Green 等の cyclophorase 標品によるこれ等酵素の研究 ('50)^{108,109)} によつて, in vivo と in vitro における変換の状態が明らかにされた。その後, Slater ('48)³⁾ の提唱した cytochrome b 及び c の間に介在する factor を中心として, cytochrome-cytochrome oxidase 系の所謂終末電子伝達系の研究が主として対象になつている (Slater ('49—'53)^{95-97,174)}, Clark, Wdimer 等 ('54)^{175,176)}, Green 等 ('55,'58)^{177,178)}, 小田 ('58)¹⁷⁹⁾。

この様に生化学方面の目覚しい進歩にも拘らず, 前述の如く組織化学的研究は洵に遅々としたものである。これは実に問題の核心が等閑に附されてこの種の酵素系の特異的な組織化学的証明法がなかつた事に起因し, Farber 等の diaphorase の研究によつて僅かにその一端を覗うに過ぎなかつた。

著者はこの様な生化学的, 組織化学的理解の上にたつて, まず diaphorase とは別個に, これら脱水素酵素単独の作用を知る為, 組織化学的にその生成産物を直接把握しようと試みたが, 何れも充分特異的な成果を得られなかつた。そこで, neotetrazolium chloride (NT) を用いて乳酸及び林檎酸脱水素酵素「系」(di-

aphorase 作用を含む) について組織化学的に検討を加えた。上述の様に, 或いは小田 ('58)¹⁷⁹⁾ の研究に見る様に, この酵素系における酸素への水素伝達には幾つかの段階を経て行われ, 脱水素酵素そのものが tetrazolium 塩の水素供与体とはなり得ず, 次の DPNH-diaphorase-cytochrome の段階において主として還元されるところから, そこに表現される formazan 生成反応は脱水素酵素活性に対してはいわば間接的な方法である事を免がれない。しかしながら, これら脱水素酵素作用が, 生体内において diaphorase の作用とは無関係には存在し得ないところから, 「脱水素酵素-diaphorase」系として, その機構を組織化学的に追求する事も亦有意義であろう。

2 実験材料及び実験方法

白鼠の各種臓器及び人の胃を屠殺又は手術摘出後, 速やかに freezing microtome で 20~30 μ の新鮮切片とし, これを水に浮べる事なく直接被覆硝子に貼布, 乾燥する。又, cryostat で 10~15 μ の新鮮切片とし, 同様に硝子に貼布する。前者は方法が比較的簡単ではあるが, 小さな臓器では技術的に困難で, 特に室温の高い場合には殆んど不可能であるが, 後者の方法ではその様な問題はない。組織切片の一部は冷却した acetone (-5~0°C) で10分間固定, 乾燥する。その後次の基質液に1時間 incubate した。

I 液: 0.1 M Na. lactate(又は malate) 0.3cc			
(Na OH で pH を中性附近に調整したもの)			
0.1 %	DPN		0.5cc
0.1 M	Na. glutamate		0.5cc
0.1 M	KCN		0.5cc
0.1 %	NT		1cc
0.1 M	磷酸緩衝液 (pH 7.4)		2cc

(この基質液は Farber 等の処方に準じたものである)。

II 液:

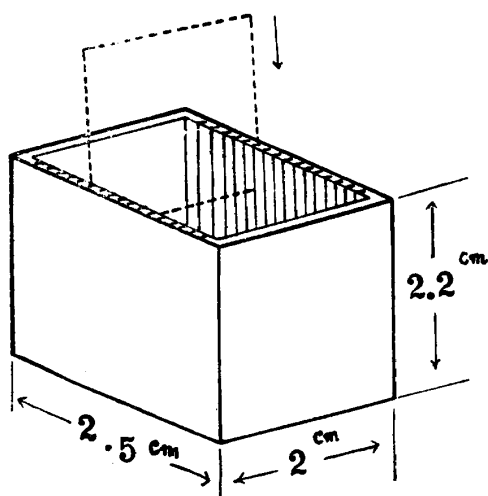
(1)液の pH を磷酸緩衝液の代りに 3-amino-2-methyl-1, 3-propane diol (AMPD)-塩酸緩衝液で pH 9~9.2 に調整したもの。

■ 液：

0.1 M Na. lactate 又は malate (pH 9. by NaOH)	0.5cc
0.1 % DPN	0.5cc
0.1 % NT	0.5cc
M/15 AMPD-HCl 緩衝液	2cc

その他、液の pH を変化させたもの、或いは対照として基質その他を除いて蒸留水を加えたもの等についても行った。

尚、実施に当つては、高価な試薬を使用するので、少量の液で充分有効に使う為、当研究室の東の発案による次の様な合成樹脂製の小容器を使つた。



3 実験 I

まず、反応のよく出る白鼠の腎臓、心臓、胃について、主として上記3種の基質混合液での反応を比較検討した。

1 腎臓に於ける所見

腎臓の組織構造は組織化学的立場から4層に大別される (Farber 等 ('56)^{63, 11)})。即ち、①外皮質、②内皮質、③外髓質、④内髓質 (乳頭部) の4層である。

i) I 液による反応：乳酸の場合には、外皮質の細尿管は概ね赤色に着色し、それに、紫の formazan 顆粒の沈着を認める。腎小体は殆んど陰性である。内皮質の細尿管は更に薄い。外髓質の Henle 氏係蹄上行脚 (太い部分)、或いは集合管は少々濃い赤色の上に更に中等度に紫の細顆粒を認め、又、細い下行脚は淡青紫色に染つている。この外髓質部が最も活性顕著であ

る。内髓質では集合管に紫色の formazan 沈着を認め、又、乳頭上皮も僅かに紫色である。その他の細尿管或いは間質も時に淡青紫色に染る事がある。acetone 固定標本における所見の変化は殆んど認められないが、外皮質の反応が少々減弱している。

林檎酸の場合には、乳酸に比して全般に反応が強い。外皮質において、その細尿管では赤色以外に青紫色の顆粒の沈着が強く、外髓質と略々同程度の着色を示す。又、腎小体も時に陽性である。又、内皮質、内髓質共に乳酸の場合よりも反応が強い。而して、acetone 固定によつて内、外髓質の反応が少々低下し、乳酸の場合の様に外髓質の活性が特に強調される事なく、最も反応の強い外皮質以下乳頭迄略々均等に活性が分布している。この点で、乳酸と林檎酸とでは所見は必ずしも完全には一致しない。

ii) II 液による反応：II 液は I 液の pH を 9 迄あげたものであるが、これによる反応は I の場合よりも全体に活性が著しく強くなつている。

乳酸では外皮質細尿管の反応も、赤色以外に濃い紫の顆粒の沈着があるが、腎小体では殆んど陰性である。その他の各層の反応は何れも I 液の場合より強くみられる。acetone 固定によつて、外皮質の活性少々低下して赤色調をおび、内髓質の反応も少々減弱して外髓質の反応が主として強調される傾向にある。

林檎酸では、腎臓における各種反応液の中で最も反応が強く、I 液の場合の様に各部曲細尿管或いは Henle 氏上行脚が赤色調の上へ強く青紫色の顆粒の沈着があり、或いは Henle 氏下行脚や集合管が紫色に強く染り、腎小体、血管壁、乳頭間質細胞、乳頭上皮等にも明らかに青紫色の反応を認める。新鮮切片では外皮質及び外髓質の反応が特に強いが、acetone 固定によつて、外髓質の反応が少々減弱し、略々均等な分布を示す傾向は I 液の場合と同様であるが、全体に反応は遙かに強い。

iii) III 液による反応：この反応液は KCN や glutamate を含まないものであるが、III 液では一般に反応が弱い。

乳酸の場合には外皮質の細尿管が淡赤色に染り、内皮質は更に薄く、外髄質の Henle 氏係蹄上行脚に相当する部が赤色の上に紫色の顆粒を僅かに認める。又、内髄質の集合管や乳頭上皮も僅かに淡紫色に染つている。acetone 固定では一般に更に反応が弱い様である。

林檎酸では乳酸の場合より少々反応が強く、外皮質の赤色調が濃く、髄質部における紫色の formazan 沈着も少々強い。

以上の様に腎臓における両脱水素酵素系の分布については乳酸よりも林檎酸の方が反応が強く、Farber ('56)^{63, 11)} の報告の様な定型的な分布は林檎酸では見られるが、乳酸の場合には活性弱く、必ずしもその成績は一致しない。又、固定操作で、乳酸の場合には終始外髄質部の反応が強調されるが、林檎酸では外皮質の反応もよく残り、外髄質の活性が特に強調されるわけではない様な傾向が窺い得る。

2 心臓に於ける所見

i) I 液による反応：乳酸を基質とする場合、新鮮、固定組織共に中等度に紫色の formazan 顆粒の形成を認め、その分布は概ね心筋線維の走行に一致して細顆粒状に認められる。しかし、完全に連続的ではなく、横紋と関連して断続的である。間質は概ね陰性であるが、時に細線維状に紫色に染つている部があり、神経線維の走行に類似しているが明らかでない。又、血管壁にも細顆粒の沈着を僅かに認める事

がある。acetone 固定による影響は殆んど認められない。

林檎酸の場合も略々同様の所見を示し、心筋線維に強く認められる。固定による影響も認められない。

ii) II 液による反応：乳酸、林檎酸共に I 液による所見と略々同様に、唯、反応程度が更に強く、強陽性に心筋に認められる。又、acetone 固定による影響も殆んど認めない。

iii) III 液による反応：I 液より更に強く、II 液と同程度に乳酸、林檎酸何れも強陽性に活性を示し、紫色の顆粒の沈着が強く認められ、又、新鮮、固定による差異も認められない。

3) 胃に於ける所見

I, II 液共に略々同様の所見が認められた。即ち、粘膜層、特にその壁細胞に主として陽性に認められ、微細顆粒状の formazan の沈着がその原形質に広く存在する。その他、粘膜筋板、筋層及び血管壁も中等度陽性である。固定による影響は認められない。

III 液による反応では主として粘膜層に限定され、壁細胞に強陽性である。又、主細胞も弱陽性で、被覆上皮は赤色に僅かに染る程度である。筋層その他では時に極めて薄く淡赤色に染まる事もあるが、概ね陰性である。

対照として上記の各反応液の基質、或いは DPN 何れかを除いたもの、及び標本を予め加熱した場合等は何れも反応は完全に陰性で、酵

表 1

臓 器	I 液 (pH. 7.4)				II 液 (pH. 9.0)				III 液 (pH. 9.0) (KCN. glutamate を含 まない)			
	乳 酸		林 檎 酸		乳 酸		林 檎 酸		乳 酸		林 檎 酸	
	新 鮮	アセ ト ン 固 定	新 鮮	固 定	新 鮮	固 定	新 鮮	固 定	新 鮮	固 定	新 鮮	固 定
腎	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++ ±	++ ±	+	+
心	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
胃 粘 膜 筋 層 血 管	++ +	++ +	++ +	++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +

註：腎に於ける成績は個々の部分による分布は多少異なるが総合した成績で判定した。

素作用による事を確認した。

以上の所見を総括すれば表1の如く示される。

4 実験Ⅱ

正常白鼠の全身主要臓器（但し、腎、心、胃は実験Ⅰに記載したので省略）及び人の胃、胃癌の手術剔出標本、並びに **butter yellow** で飼育した白鼠の肝等について、主として前記反応液のⅢを使用してその反応を調べた。**butter yellow** 飼育については、体重約 150 g の白鼠（Whister 系）に対し、olive 油にとかした（5%の割）**butter yellow** を0.1%の割に小米に混じたものを主食とし、その他蛋白質（主として干魚）及び新鮮野菜で3～6カ月間飼育した。

1 正常白鼠の全身主要臓器に於ける所見

i) 骨骼筋：大腿部の筋肉に就いて調べたが、乳酸と林檎酸との基質による差はなく、略々同様の所見を得た。この脱水素酵素系の活性は均等でなく、概ね2種類に大別される。即ち、強い活性を示す所の稍々細い筋束と、極めて反応の弱い稍々太い筋束とが存在する。而して、この細い筋束における分布は、概ね筋線維の走行に沿って紫色の細顆粒状の沈着として認められるが、完全に連続しては居らず、横紋に関連して断続している。又、横断面の所見から主として周辺性に強い活性を示す。又、縦断面において、長軸に沿い桿状に或いは紡鐘状に極めて強陽性に **formazan** の沈着があり、且、これらが縦に細線維状に連絡している。時にはその強陽性部に楕円形の明らかに核の存在を示して色の欠除を認める。これは Bennett ('56)¹⁷⁹⁾ の電子顕微鏡による筋組織の微細構造に関する報告と併せ考えて、筋細胞の糸粒体並びにそれに接続する **sarcoplasmic reticulum** の一部に相当する。その他間質の血管壁に陽性、又、恐らく筋紡鐘と思われる部にも強陽性である。

以上の所見は Calcutt ('51)³⁹⁾ の内元性活性や Buno & Germino ('58)⁵⁸⁾ のコハク酸脱水素酵素の所見と比較して興味深い。

ii) 肝：林檎酸の場合には略々均等に肝細胞に陽性であるが、乳酸では反応弱く、概ね淡赤色に染色される程度で所見は一定しない。尚、Ⅰ、Ⅱの反応液を使用しても略々同様の成績であつた。これら何れの場合でも核は陰性である。又、前者では血管壁、胆管上皮等に陽性のものを認めた。

iii) 肺：気管支上皮に弱陽性であるが、他は概ね陰性である。血管壁に時に陽性である。

iv) 睪丸：主として間質細胞に陽性で、精子形成系の細胞は淡赤色に染る程度である。精虫は殆んど陰性である。

v) 卵巣：間質細胞に反応最も強く、卵胞及び Graf 氏卵胞も陽性である（**Theca interna** に強く陽性で **Theca externa** に弱い傾向がみられる）。黄体は赤色に染る。但し、卵巣の細胞には脂質が多く、新鮮組織では脂質の中に **formazan** がとけて認められる。**acetone** 処理の標本ではこの害は少い。尚、緩衝液に NT をとかした液に新鮮組織を一夜放置しても殆んど染らない事から脂質による自然還元はこの場合おこらないものと考えてよい。尚Ⅰ、Ⅱ液でも略々同様の所見であつた。

vi) 腸：腸粘膜上皮は何れも淡赤色に染るのみで、又、筋肉、血管等も僅かに淡赤色又は淡紫色に染る程度である。

vii) その他、脳、脾、脾、淋巴腺、唾液腺等の反応は極めて弱く、僅かに血管壁等に陽性に認められる程度である。

2 人の胃組織に於ける所見

得られた材料は主として胃潰瘍又は胃癌の診断のもとに外科的に剔出されたものである。

i) 正常組織：略々正常の胃組織では実験Ⅰにおける白鼠の例と同様に粘膜腺上皮に主として陽性で、壁細胞の原形質に極めて明確に微細顆粒の沈澱として認められる。その他、主細胞、副細胞、被覆上皮等は赤色に染る程度であるが、主細胞では時間を稍々延長してやれば原形質に紫色の顆粒の沈着も認める。又、白鼠の場合と同様に、Ⅲ法では筋肉、血管等には殆んど活性を認めないが、Ⅰ、Ⅱ法では陽性顆粒を

認める。

ii) 萎縮性胃炎：萎縮性胃炎で腺上皮が萎縮し、粘膜層が菲薄になつたものでは該部の残存壁細胞の活性減弱し、上皮細胞全体に一樣に赤色に染り、紫の顆粒状の沈着は殆んど認めない。

iii) 胃癌：胃癌の組織学的な分類に関しては古典的なものから種々論議されて居るところであるが、ここでは、①比較的良好分化した円柱乃至立方上皮性腺癌、②腺腔形成が明確でなく、殆んど充実性に浸潤、増生している腺癌、③腺癌の中でも粘液変性が著しい所謂膠様癌、④未分化な単純癌等に分類して記載する。

比較的良好分化した定型的な円柱乃至立方上皮性腺癌においては活性はむしろ低く、赤色に染る程度であるが、深部に浸潤してその腺構造の一層不整な部においては紫色の顆粒の沈着を認める。変性、壊死に陥つた部では殆んど陰性である。腺癌でも、殆んど充実性に増生し、細胞の形態も円柱状と云うよりもむしろ立方乃至は不整多角形で、一部に不完全な腺様構造を形成して居る様な例では少々活性強く、紫色の顆粒が、一樣に赤色に染つた上に沈着している。しかしながら、これらの顆粒は概ね粗大で、正常壁細胞にみられた様な微細顆粒の密な沈着ではない。又、活潑な浸潤増生を示している部の間質結合組織細胞（線維芽細胞）も明らかに強度に陽性である。

膠様癌においては殆んど陰性又は僅かに淡赤色に染る程度で、印環細胞も殆んど陰性である。未分化な単純癌や、或いは腺癌の中でも部位によつては異型性甚だ強く、殆んど単離して浸潤している様な部の癌細胞では微細顆粒状に強度の陽性を示す。

この様に未分化な、且、浸潤、増生の活潑な細胞ほど活性が強く、且、formazan の粒子も微細、密になり、又、間質結合組織細胞も陽性となる。一方、膠様癌や変性、壊死に陥つた部では陰性化すると云える。

3 Butter yellow 飼育白鼠の肝に於ける所見

butter yellow 飼育白鼠の肝癌発生に関する

研究については、既に1937年木下、¹⁸⁰⁾ ついで丸谷等¹⁸¹⁾ の詳細な報告があり、宮地 ('48)¹⁸²⁾ による総括的な記載がある。又、近年、Novikoff ('57)¹⁸³⁾ はその移植型について、生化学的、組織化学的に詳細な報告を行つているが、これらの記載に見られる様に B. Y. による肝の変化は概ね2つに大別される。①細胆管及び結合組織の増殖による肝硬変、この場合、通常の輪状肝硬変の如く結合組織の増殖が主体である場合と、むしろ胆管増生が強く、良性乃至は悪性腺腫の様な像を呈するものとある。何れにせよ、これらの増殖の為に肝細胞は圧迫され萎縮性になつている。②肝細胞自身の結節状肥大から、腺腫、更には腺癌の発生となるもの。

而して、本例の両脱水素酵素系の組織化学的所見としては、元来、肝細胞に於ては林檎酸を基質とした場合には中等度陽性であるが、乳酸の場合は弱陽性で、赤色に染る程度であり、本例においても、一般に林檎酸を基質とした場合の方が反応が強い。

胆管の増生及び結合組織の増殖による肝硬変の部においては殆んど陰性で、島状に残存した肝細胞には弱陽性にみられる。一方癌細胞においては明らかに陽性であるが、その程度は種々である、時には強陽性に紫色の顆粒の沈着を認める。一般に単離した腫瘍細胞の方が、腺様構造をとつて配列する部よりも反応が強い。この所見は肝自身におけるよりも、転移した腹腔リンパ腺において顕著である。又、変性壊死の部においては殆んど陰性である。

以上の所見は正常肝細胞におけると同様、Ⅰ～Ⅲ法の中、Ⅱ法、特に林檎酸の場合に最も反応強く、且、新鮮及び固定組織における差は認められない。

5. 総括並びに考按

元来、乳酸及び林檎酸脱水素酵素作用そのものを組織化学的に把握するには、一般の加水分解酵素におけると同様に、反応産物であるところの焦性葡萄糖或いは oxalo 醋酸を直接捕捉、発色せしめる方法が最も望ましい。例えば、これら keto 酸は 2, 4, -dinitrophenyl-

hydrazine 等と結合して hydrazone を形成する故、更にこれを azocoupling する方法等が考えられるが、組織化学的条件の制約の為に成功しなかつた。従つて、通常、酸化還元系酵素の組織化学に屢々用いられるところの、水素受容体として tetrazolium 塩、或いは tellurite を使用して、その還元反応を以て酵素活性の指標とする方法を用いた。然し、後者においては、金置換を行つても検鏡に適する程の発色を認めなかつたので専ら NT を使用した。

1: formazan に就て。

NT を使用した場合、所見として、赤色の弥漫性の染色と、青紫色の顆粒状（時に結晶状）の沈澱と2種類に大別されるが、NT の様な ditetrazolium の場合、その還元過程として、理論的にも、2段階の過程が考えられ、一般に赤色 formazan は不完全還元型、青紫色顆粒は完全還元型の diformazan であると解釈されている。事実、著者の実験成績においても、時間の短縮その他で反応の不完全な場合、本来紫色の顆粒の沈澱を認める場合でも赤色調のみの染色がみられ、所見の記載でも両者は明記した。又、この赤色に染つた切片を Na_2S の液に浸して強く還元すれば紫色となる。

Findlay ('55)¹⁸⁴⁾ は $-\text{SH}$ による還元反応で、NT の還元物が赤及び青の2種にわけられる事を指摘した。Burtner 等 ('56, '57)^{185, 186)} はこの2種のものは NT 還元の段階を示すものではなく、異なる tetrazole に起因するものと考えて、それらの明確になるまでは定量的観察には ditetrazolium を使用しないように注意している。何れにせよ、これらが酵素の還元作用によるものではあるが、Farber 等 ('56)^{63) II)} も指摘するように赤色の formazan は組織中に拡散する傾向がある、従つて組織化学的所見の判定には充分の注意を要し、局在性については青紫色の顆粒の場合以上に慎重であらねばならない。

2. 乳酸及林檎酸脱水素酵素系の作用機序に就て。

既述の如く、Adler & Euler や Green 等

の生化学的研究によつて、この脱水素酵素系の作用機序が体系化され、酸素への水素移動の中間体として、DPN(助酵素), diaphorase, cytochrome-cytochrome oxidase 系が関与している事が明らかになつた。又、これら脱水素酵素の反応産物であるところの焦性葡萄糖等の keto 酸が、微量でも強くその作用を抑制するところから、反応液に cyanide を入れてこれを cyanhydrin として除く方法が一般に行われているが、Huennekens & Green ('50)¹⁰⁹⁾ の cyclophorase の研究で、この両酵素の生体における状態の所謂結合型(conjugated form)では反応液に DPN の添加を必要とせず、cyanide なしでは反応が殆んどおこらず、且、至適 pH が 7.0 位であるのに対して、acetone 固定等の処理によつて「split out」した解離型(dissociated form)では DPN の添加を必要とし、KCN のような fixative は必要としないで、且、至適 pH は 8.5~9.5 である事を明らかにした。

一方、第 I 篇で述べた如く、Bielig 等 ('49)²³⁾, Kuhn ('50)⁸⁵⁾, Brodie & Gots ('51)^{25, 26)} の報告等に見るように、乳酸或いは林檎酸脱水素酵素そのものの反応においては tetrazolium 塩が水素受容体とはなり得ないで、次の diaphorase による還元型 DPN の酸化過程において始めて tetrazolium 塩が還元される事が明らかである。

この様な観点から、著者は最初に予備実験として、実験方法で述べたように腎、心の新鮮切片を acetone 固定し、これについて、乳酸、DPN、牛心より抽出した diaphorase を含む液 (Sumner 等¹⁸⁷⁾) の混合液で pH 7.0 乃至 11.0 の範囲における反応を調べた結果、pH 8.8 以下及び 10 以上では反応陰性、9~9.5 の時最も強く formazan の生成が認められた。又反応液から基質、或いは DPN を除いた場合や、標本を約 50°C に加熱した場合には何れも完全に陰性であるところから、この還元反応が該酵素系の作用によると考えられた。然し乍ら、厳密な対照実験の結果、牛心より抽出した diaphorase の添加は必ずしも必要でない事が

明らかになり、組織の diaphorase が固定によつて尙活性を保持して居り、これがその反応に関与していると解釈せざるを得なかつた。Dewan & Green は始め diaphorase (彼等は coenzyme factor と呼んでいる) が 52°C 15分, acetone 沈降或いは乾燥によつて破壊されると報告した ('37)¹⁶³⁾ が、翌年発表した diaphorase の総括的論文においては、これが acetone 固定, 乾燥によつてもよく活性を保持する事を明らかにした ('38)¹⁶⁷⁾。即ち、組織化学的に両種の脱水素酵素の活性を保持するような操作においては、併行して diaphorase の活性も保持される。従つて、著者の予備実験に示された成績も、組織の diaphorase の活性が関連しているものである。

Diaphorase の組織化学的方法に就ては度々引用したように Farber, Sternberg & Dunlap ('54~'56)^{61,62,63)} によつて報告されたが、専ら腎臓組織における研究で、乳酸その他の基質に関係なく、即ち、脱水素酵素作用には非特異的に、専ら DPN および TPN の diaphorase に特異的であると報告している。而して生体内において、例えば DPNH-diaphorase 作用の表現は、その前段階として、DPN を助酵素とする脱水素酵素作用による DPN の還元なくしては起り得ないし、又、この DPNH の diaphorase による酸化がその脱水素酵素と遠隔の部において行われようとは考えられない。即ち一定の細胞内の小器官 (恐らく糸粒体) に共存し、少なくとも別個の細胞における作用はあり得ない。この種脱水素酵素活性の存在部位には必ず diaphorase 活性が併行するものであろう。しかし乍ら、DPNH-diaphorase が機能的に乳酸、林檎酸、葡萄糖その他の脱水素酵素に広く結合している所から、逆に diaphorase 活性部に特定の脱水素酵素活性が必ず存在すると云う証拠はない。組織化学的方法で、この種脱水素酵素活性を保持する範囲においては diaphorase 活性を除き得ないし、特定の基質を入れて反応せしめても、tetrazolium 塩を還元指標として用いる限り、その反応陽性部位が悉く該脱水素酵素活性を保有しているとは断定

し難い。即ち、in vivo の場合と異り、反応液に含まれる DPN が脱水素酵素作用によつて還元されても、その部で完全に酸化されずに、他の部に移動して diaphorase 作用を受ける可能性は否定出来ない。ここに組織化学的成績に関し根本的な疑問が提示されるが、そうかと云つて、Farber 等の如く脱水素酵素には全く非特異的であると断定してしまうのも割り切れないところがある。

ここで著者の実験成績を考えてみるに、Ⅰ液は Farber 等の方法に準拠したもので、Ⅱ液はその pH を更に9.0迄高めたものである。Ⅲ液は前述のような立場から、著者の予備実験に使用した反応液から diaphorase 抽出液を除外したもので、Ⅱ液と異なる点は KCN 及び glutamate を含んで居ない。而して、Farber 等の成績及び著者自身の (対照実験の) 成績から、これらの反応が何れも脱水素酵素作用も含めた酵素作用によることは肯定される (KCN 自身が還元作用を持つて居り、これが tetrazolium 或いは DPN を非特異的に還元する可能性があるが、対照実験でこれも影響ない事が判つた)。また腎臓における所見であるが、Ⅰ、Ⅱ液何れでも乳酸を基質とした場合よりも、林檎酸の場合の方が強く、pH 7.4 のⅠ液で乳酸の場合には Farber 等の記載したような定型的な所見を得られないで、赤色に着色する場合が多かつた。Ⅱ液ではⅠ液より反応が強く、乳酸でも中等度以上に陽性である。又、Ⅲ液では一般に反応が弱く、赤色調を主体とする。而して、最も反応の強いⅡ液から、最も弱いⅢ液への移り変り、更に新鮮組織から固定組織による反応減弱の様子、或いは時間、濃度の差等による所見の変化を検討してみるに、乳酸の場合には反応高度の時には外皮質部にも青紫色の formazan 顆粒を認めるが、反応の減弱によつて容易にこの顆粒は消失して赤色調を主体とし、内外髓質の反応が強調され、最後には外髓質の Henle 氏上行脚に淡赤色にみられるのみである。一方、林檎酸では、外皮質部において、固定その他で反応の減弱する程度が軽く、Ⅱ液における固定標本では外髓質よりもむしろ

顆粒の沈澱が強い。

このように反応の変化を仔細に検討すれば、乳酸と林檎酸とでは、単に強弱のみでなく、その活性度の変化に幾分差異が認められる。即ち、各脱水素酵素に対し Farber 等の考える以上に可成りの特異性を示す。又著者の実験で diaphorase 抽出液を入れた場合、液中の DPN が酸化されて、液が赤～紫色に若干着色するが、組織の染色は、これを含まない場合とほとんど変りない事からも、これら脱水素酵素作用以外の部に於ける染色のおそれは、少くも光学顕微鏡的には可成り少いものである。

即ち、これらの方法が、各脱水素酵素の作用に対し、間接的な方法ではあるが、可成り特異的にその作用を反映していると考えてよい。しかし、勿論脱水素酵素のみならず、diaphorase も関与している故「乳酸（又は林檎酸）脱水素酵素系」、もつと厳密には「……脱水素酵素—diaphorase 系」の作用或いは活性と呼ぶべきである。

扱、次に心臓における所見であるが、何れの反応液でも強く陽性に出るが、Ⅰ液よりもⅡ液の方が反応更に強く、又、腎臓の場合と異り、乳酸、林檎酸でも略々同程度に反応を示す。又、Ⅱ液においても新鮮、固定、何れの標本でも高度の活性を認めた。

ここで再び Green 等の研究を考えてみるに、その cyclophorase 標品による研究は、たしかにそれ迄の生化学的概念から大きく進歩した劃期的なものであるが、その結合型から解離型への変換説 (transformation theory) の根拠となる実験成績において、例えばその第11報('50)¹⁰⁹⁾ の定量的実験も、その条件が極めて複雑で、且種々の処理前後における酵素の絶対量が異つて居り、生体内において、酵素が 100% 結合型であるものか明らかでないし、これらの処理によつて実際に結合型が解離型になるのか、或いは始めから混在して居つた結合型が活性を失つたものか明確でない。この Green の説と、著者の実験成績にみるように、腎臓では或程度固定の影響を認めるが、心臓では何れも強く陽性に出る事、更に予備実験として、Ⅲ液

で pH 8.5 以下や、Ⅰ液で KCN を除いた場合には完全に陰性である事、更に DPN を除外すると反応が陰性となる事等を併せ考えてみるに、上記の組織化学的方法で何れも DPN の添加を必要とするところから、生体内の酵素系の状態から「変換」のあつた事は事実で、解離型であるにしても、Green 等の意見とは必ずしも一致しない。例えば、腎臓の所見で、Ⅲ液よりもⅡ液での反応が遙かに強い事は KCN の作用によつて反応の障害が除かれた結果と考えれば、pH 9 の領域においても KCN の存在を必要とする、即ち、生じた keto 酸によつて強く障害される型、換言すれば Green 等の結合型に近い性格を持つ型の酵素の存在を意味している。又、Ⅰ液で、特に林檎酸の場合、固定しても反応は陽性であるが、その KCN を除いたもの、或いはⅢ液の pH 7 附近では全く反応がみられなかつた事は固定とは無関係に、中性附近の領域においては fixative の存在なくしては作用し得ない事を示している。

ここにおいて、diaphorase が殆んど変換作用を受けない（早石⁹⁸⁾ の p116）事も併せ考えて、著者は次のような仮説を提案したい。

「これら脱水素酵素は凍結処理、acetone 固定等の操作によつて、外部から DPN の添加を要求するような所謂解離型になるが、この場合、少くとも機能的には、尙 KCN 等の fixative の存在を必要とする型 (A型と仮称) と、これを必要としない型 (B型と仮称) と2種類存在する。」

但し、これは機能的な表現で、分子的に別個の酵素蛋白であるか、或いは同一のものが KCN によつて促進的な効果を受けてこのような反応を示すものであるかは明確でない。この中 B型は Green 等の「解離型」に相当し、pH 8.5 以下では殆んど作用を示さない。又、A型はその「結合型」と「解離型」との中間的な性格を有する。この A型が pH 7 及び 9 附近に至適 pH を持つものとして更に2種類に小さく分類されるものか、或いは同一種で広く作用域を持つものであるかは、組織化学的に精細な定量的実験が困難で、何れとも決め難い。

又、これらが生体内において如何なる状態にあるかは勿論明らかでない。更に又、このA、B型の関係について、A型が更にB型に移行するものであるか、或いはその儘活性を消失するものであるかの疑問が提起されようが、生化学的成績で、種々の解離条件の中でも、acetone固定はこの両種の酵素には最も強い作用を示し、固定標本でも尙A型の存在する事は、次の過程には活性消失の方向に向うものと暗示している。

扱、腎臓においては KCN の効果が比較的顕著であり、A型の作用が強いが、心臓や胃の壁細胞等においては KCN がなくても強い活性を示し、B型の作用の強い事を物語るが、これは、組織化学的にはA型の作用が存在しないという事にはならない。

次に、I、II法においては、一般にII法のpH 9の場合に反応が強いが、Green & Brosteaux ('36)⁸²⁾ が cyclophorase 以前の研究で、豚の心臓の乳酸脱水素酵素が pH 6 以上12に亘る広い域に活性を示し、又、Euler & Hellström ('38)¹⁷⁰⁾ は diaphorase が pH 7以上11の域に亘って活性を示し、特に9~10.5の範囲に強い活性を持つことを示して居り、このことも関係して居るのであろう。この際、硼酸緩衝液は作用を抑制し、磷酸塩 + N/10 NaOH で良好な成績を得ているが、著者が検討したところでは、硼酸緩衝液、trisbuffer、では余り反応が出ず、磷酸塩 + NaOH 又は AMPD-HCl で良好な成績を得た。その他、物理化学的に pH の高い方が乳酸（又は林檎酸）→ keto 酸の反応がおこり易いことも考慮しなければならない。

かくして、Green 等の生化学的成績による解釈のみでは不完全であり、又組織化学的に Farher 等の方法を固執して、新鮮切片で、pH を中性附近に限定して、或いは反応液に KCN 等を必ず添加しなければならないと考えるのは行きすぎで、この反応系の一面をさぐるに過ぎない。著者は最も鋭敏な方法として、II法を推賞するが、この場合、第I篇で触れたように中性附近の場合以上に非特異的染色に注意

し、厳密な対照実験が必要である。又、更に、同時にIII液、或いは新鮮、固定両者の切片についても検討し、その酵素系の推移を多角的に視察する事が望ましい。

以上、両種脱水素酵素系の組織化学的方法が、tetrazolium 塩を水素受容体としてその指標に用いる限り、diaphorase の還元による間接的な方法であることは免れないとはいえ、特に一種類の方法に拘泥せず、多角的に検討すれば、各脱水素酵素自身の性格の反映として、可成り忠実に現象を把握する事が出来よう。

3. 各種臓器における活性の分布に就て。

第I、第II実験を総合して、白鼠においては、心、腎、胃、骨骼筋、睪丸、卵巢等に主として活性がみられ、その他林檎酸では肝にもみられた。乳酸では肝の反応は一般に弱い。これらの成績は Green & Brosteaux ('36)⁸²⁾ による乳酸脱水素酵素、同じく Green ('36)¹⁵⁸⁾ の林檎酸脱水素酵素の生化学的所見に略々一致するが、唯、脳においては、組織化学的には何れの方法でも余り強い活性は認められなかった。

次に、人の胃癌例及び白鼠の butter yellow 肝癌では、何れも未分化な腫瘍細胞に強い活性を示し、比較的分化した型では弱い。又、変性、壊死に陥つた部では陰性である。これらの所見は Wattenberg ('59)¹⁸⁸⁾ の大腸腫瘍における diaphorase 活性の所見と略々一致する。

一般に各種酵素では、生化学的にも、組織化学的にも、腫瘍細胞においては活性が減弱するものが多い (Greenstein ('43)¹⁸⁹⁾, Rutenburg 等 ('50)¹¹⁾, Novikoff ('57)¹⁸³⁾, Wattenberg ('59)¹⁸⁸⁾) が、この種脱水素酵素系は特に未分化のもので強い活性を示すことは興味深い。

結 論

NT を使用して、乳酸及び林檎酸脱水素酵素系の組織化学的研究を行つた。tetrazolium 塩を還元標示薬として、酵素活性を表現しようとする限り、diaphorase 作用の関与を免れ得ず、いわば間接的な方法ではあるが、種々の条

件で多角的に検討した結果、間接的にでも、各脱水素酵素自身の性格の反映として可成り忠実に現象を理解出来ることを明らかにした。

反応は pH 9 附近で最も鋭敏であるが、必ずしも KCN のような keto 酸の固定剤を必要としない反応も存在することを指摘し、Green 等の生化学的研究と比較して、凍結・融解、acetone 固定等による解離過程において、機能的には KCN を必要とするものと、必要でないものと2種類の型があるとの仮説を提案した。

更に、正常白鼠の全身主要臓器における分布を調べ、又、butter yellow 肝癌、人の正常胃、胃癌組織等についてもその反応を検討した。

撰筆するに当つて、終始、指導、教示を賜つた恩師高松英雄教授に深く感謝し、又、貴重な手術材料を提供された京都大学医学部外科第一講座荒木千里教授並びに第二講座青柳安誠教授に対しても併せて深甚の謝意を表明する。

文 献

- 1) Krebs, H. A. : Adv. Enzymol., **3** ; 191-252, 1943.
- 2) Green, D. E., W. F. Loomis, & V. H. Auerbach : J. Biol. Chem., **172** ; 389-403, 1948.
- 3) Slater, E. C. : Nature, **161** ; 405-406, 1948.
- 4) Pechman, H. V., and P. Runge : Ber. dtsh. chem. Ges., **27** ; 2920-2930, 1894.
- 5) Kuhn, R., & D. Jerchel : Ibid. **74B** ; 941-948, 1941.
- 6) Kuhn, R., & D. Jerchel : Ibid. **74B** ; 949-952, 1941.
- 7) Mattson, A. M., C. O. Jensen, & R. A. Dutcher : Science, **106** ; 294-295, 1947.
- 8) Jerchel, D., & W. Möhle : Ber. dtsh. chem. Ges., **77B** ; 591-601, 1944.
- 9) Straus, F. M., N. D. Cheronis & E. Straus : Science, **108** ; 113-115, 1948.
- 10) Kun, E., & L. G. Abood : Ibid. **109** ; 144-146, 1949.
- 11) Rutenburg, A. M., R. Gofstein, and A. M. Seligman : Cancer Research, **10** ; 113-121, 1950.
- 12) Seligman, A. M., & A. M. Rutenburg : Science, **113** ; 317-320, 1951.
- 13) Rutenburg, A. M., M. Wolman, & A. M. Seligman : J. Histochem. & Cytochem., **1** ; 66-81, 1953.
- 14) Wachstein, M. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **72** ; 175-178, 1949.
- 15) Wachstein, M. : J. Histochem. & Cytochem., **3** ; 246-270, 1955.
- 16) Takamatsu, H., & K. Obayashi : Acta Tuber. Jap., **4** ; 55-58, 1954.
- 17) 小田 琢三 : 細胞化学シンポジウム, **8** ; 157-190, 1958.
- 18) Tynen, J., & S. W. F. Underhill : Nature, **164** ; 236, 1949.
- 19) Black, M. M., B. W. Zweifach, & F. D. Speer : Am. J. Clin. Path., **23** ; 332-339, 1953.
- 20) Kun, E. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **78** ; 195-197, 1951.
- 21) Fred, R. B., and S. G. Knight : Science, **109** ; 169-170, 1949.
- 22) Gunz, F. W. : Nature, **163** ; 68, 1949.
- 23) Bielig, H. J., G. A. Klausche, & H. Hardick : Ztschr. f. Naturforsch., **4b** ; 80-91, 1949.
- 24) Sevag, M. G., & M. Forbes : Arch. Biochem., **29** ; 229-230, 1950.
- 25) Brodie, A. F., & J. S. Gots : Science, **114** ; 40-41, 1951.
- 26) Brodie, A. F., & J. S. Gots : Ibid. **116** ; 588-589, 1952.
- 27) Black, M. M., & I. S. Kleiner : Ibid. **110** ; 660-661, 1949.
- 28) Black, M. M., S. R. Opler, & F. D. Speer : Am. J. Path., **26** ; 1097-1102, 1950.
- 29) Zweifach, B. W., M. M. Black, & E. Shorr : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **74** ; 848-854, 1950.
- 30) Black, M. M., I. S. Kleiner : Ibid. **76** ; 437-441, 1951.
- 31) Zweifach, B. W., M. M. Black, & E. Shorr : Ibid. **76** ; 446-454, 1951.

- 32) Black, M. M., I. S. Kleiner, & F. D. Speer : *Ibid.* **77** ; 611-615, 1951.
- 33) Black, M. M., & F. D. Speer : *Am. J. Path.*, **27** ; 743, 1951.
- 34) Black, M. M., I. S. Kleiner, & F. D. Speer : *Cancer Research*, **11** ; 237-238, 1951.
- 35) Black, M. M., & F. D. Speer : *Am. J. Clin. Path.*, **23** ; 218-227, 1953.
- 36) Black, M. M., & F. D. Speer : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **82** ; 289-291, 1953.
- 37) Black, M. M., & F. D. Speer : *J. Nat. Cancer Inst.*, **14** ; 1147-1158, 1954.
- 38) Black, M. M., & F. D. Speer : *Arch. Path.*, **57** ; 152-162, 1954.
- 39) Calcutt, G. : *Nature*, **170** ; 42, 1952.
- 40) Hiatt, H. H., & E. Shorr : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **82** ; 543-546, 1953.
- 41) Goddard, J. W., & A. M. Seligman : *Anat. Rec.*, **112** ; 543-566, 1952.
- 42) Shelton, E., & W. C. Schneider : *Ibid.* **112** ; 61-81, 1952.
- 43) 菩提寺幹人 : *日本体質雑誌*, **21** ; 35-68, 1956.
- 44) Padykula, H. A. : *Am. J. Anat.*, **91** ; 107-145, 1952.
- 45) Mustakallio, K. K., & A. Telkkä : *Science*, **118** ; 320-321, 1953.
- 46) Rennels, E. G., & A. Ruskin : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **85** ; 309-314, 1954.
- 47) Wachstein, M., & E. Meisel : *Science*, **119** ; 100, 1954.
- 48) Wachstein, M., & E. Meisel : *Am. J. Path.*, **30** ; 147-165, 1954.
- 49) Wachstein, M., & E. Meisel : *Ibid.* **31** ; 353-365, 1955.
- 50) Wachstein, M., & K. Lange : *Ibid.* **34** ; 835-861, 1958.
- 51) Wattenberg, L. W. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **87** ; 535-538, 1954.
- 52) Pearson, B., & V. Defendi : *J. Histochem. & Cytochem.*, **2** ; 248-254, 1954.
- 53) Defendi, V., & B. Pearson : *Ibid.* **3** ; 61-69, 1955.
- 54) Rosa, C. G., and J. T. Velardo : *Ibid.* **2** ; 110-114, 1954.
- 55) Villarreal, R., & M. Burgos : *J. Cell. & Comp. Physiol.*, **46** ; 327-339, 1955.
- 56) Nachlas, M. M., K. C. Tsou, E. DeSouza, C. S. Cheng, & A. M. Seligman : *J. Histochem. & Cytochem.*, **5**, 420-436, 1957.
- 57) Nachlas, M. M., K. C. Tsou, E. DeSouza, C. S. Cheng, & A. M. Seligman : *Ibid.* **6** ; 99-100, 1958.
- 58) Buno, W., & N. I. Germino : *Ibid.* **6** ; 101, 1958.
- 59) Pearse, A. G. E. : *Ibid.* **5** ; 515-528, 1957.
- 60) Pearse, A. G. E. : *Ibid.*, **6** ; 86-87, 1958.
- 61) Farber, E., W. H. Sternberg & C. E. Dunlap : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **86** ; 534-537, 1954.
- 62) Farber, E., W. H. Sternberg, & C. E. Dunlap : *Am. J. Path.*, **30** ; 616-619, 1954.
- 63) Farber, E., et al : *I. J. Histochem. & Cytochem.*, **4** ; 254-265, 1956. *II. Ibid.* **4** ; 266-283, 1956. *III. Ibid.* **4** ; 283-294, 1956. *IV. Ibid.* **4** ; 347-356, 1956. *V. Ibid.* **4** ; 357-362, 1956.
- 64) Pearson, B. : *Ibid.* **6** ; 112-121, 1958.
- 65) Nineham, A. W. : *Chem. Rev.*, **55** ; 355-483, 1955.
- 66) Jámbo, B. : *Nature*, **173** ; 774-775, 1954.
- 67) Jámbo, B. : *Ibid.* **176** ; 603, 1955.
- 68) Smith, F. E. : *Science*, **113** ; 751-754, 1951.
- 69) Parker, J. : *Nature*, **176** ; 647-648, 1955.
- 70) Rosa, C. G. : *J. Histochem. & Cytochem.*, **3** ; 399-400, 1955.
- 71) Schneider, W. C., & V. R. Potter. : *J. Biol. Chem.*, **149** ; 217-227, 1943.
- 72) Swingle, K. F., A. E. Axelrod, & C. A. Elvehjem : *Ibid.* **145** ; 581-591, 1942.
- 73) Keilin, D., & E. F. Hartree. : *Biochem. J.*, **44** ; 205-218, 1949.
- 74) Shelton, E. : *J. Histochem. & Cytochem.*, **4** ; 427-428, 1956.
- 75) Fried, G. H., & B. W. Zweifach. : *Anat. Rec.*, **121** ; 97-107, 1955.
- 76) Lovern, J. A. : *The Chemistry of Lipids of Biochemical Significance.* (1955) p. 7,

- Methuen & Co. LTD, London.
- 77) 坂口謹一郎, 植村定治郎: 酵素(1949), p71-84及び212-213. 修教社.
 - 78) Krebs, H. A. : Biochem. J., **29** ; 1620-1644, 1935.
 - 79) Hotchkiss, R. P. : Adv. Enzymol., **4** ; 153-199, 1944.
 - 80) Cross, R. J., J. V. Taggart, G. A. Covo, & D. E. Green : J. Biol. Chem., **177** ; 655-678, 1949.
 - 81) Fred, R. B., & S. G. Knight : Science, **109** ; 169-170, 1949.
 - 82) Green, D. E. & I. Brosteaux : Biochem. J., **30** ; 1489-1508, 1936.
 - 83) Green, D. E., & S. Williamson : ibid. **31** ; 617-618, 1937.
 - 84) Jensen, C. O., W. Sacks & F. A. Baldu-ski : Science, **113** ; 65-66, 1951.
 - 85) Kuhn, R. (1950) : 25) より引用
 - 86) Warburg, O., & W. Christian : Biochem. Z., **298** ; 150, 1938.
 - 87) Straub, F. B. : Nature, **143** ; 76-77, 1939.
 - 88) Straub, F. B., H. S. Corran & D. E. Green : Ibid. **143** ; 119, 1939.
 - 89) Glenner, G. G., H. J. Burtner, & G. W. Brown : J. Histochem. & Cytochem., **5** ; 591-600, 1957.
 - 90) Glenner, G. G., H. J. Burtner, & G. W. Brown : Ibid. **5** ; 601-605, 1957.
 - 91) Glenner, G., H. Weissbach, & C. Mi-toma : Ibid. **6** ; 91-92, 1958.
 - 92) Adler, E., H. v. Euler & W. Hughes : Z. physiol. Chem. **252** ; 1-23, 1938.
 - 93) Singer, T. P., & E. B. Kearney : Bio-chim. et Biophys. Acta, **15** ; 151-153, 1954. (63) I より引用.
 - 94) Singer, T. P., & E. B. Kearney : Fed. Proc., **14** ; 912, 1955. (63) I より引用.
 - 95) Slater, E. C. : Biochem. J., **45** ; 1-8, 1949.
 - 96) Slater, E. C. : Ibid. **45** ; 14-30, 1949.
 - 97) Slater, E. C. : Ibid. **46** ; 484-499, 1950.
 - 98) 早石修 : 医学の進歩第7集 ; 75-121, 1951.
 - 99) Grafflin, A. L., & D. E. Green : J. Biol. Chem., **176** ; 95-115, 1948.
 - 100) Knox, W. E., B. N. Noyce, & V. H. Auerbach : Ibid. **176** ; 117-122, 1948.
 - 101) Atchley, W. A. : Ibid. **176** ; 123-131, 1948.
 - 102) Taggart, J. V., & R. B. Krakauer : Ibid. **177** ; 641-653, 1949.
 - 103) Still, J. L., M. V. Buell, W. E. Knox, & D. E. Green : Ibid. **179** ; 831-837, 1949.
 - 104) Still, J. L., M. V. Buell, & D. E. Green : Arch. Biochem., **26** ; 406-412, 1950.
 - 105) Still, J. L., M. V. Buell, & D. E. Green : Ibid. **26** ; 413-419, 1950.
 - 106) Green, D. E., W. A. Atchley, J. Nord-mann, & L. J. Teply : Ibid. **24** ; 359-374, 1949.
 - 107) Albaum, H. : Ibid. **24** ; 375-382, 1949.
 - 108) Huennekens, F. M., & D. E. Green : Ibid. **27** ; 418-427, 1950.
 - 109) Huennekens, F. M., & D. E. Green : Ibid. **27** ; 428-440, 1950.
 - 110) Still, J. L., & E. H. Kaplan : Experi-mental Cell Research, **1** ; 403-409, 1950.
 - 111) 市川収 : 細胞化学シンポジウム, **4** ; 113-146, 1956.
 - 112) Foraker, A. G., & S. W. Denham, : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **80** ; 132-134, 1952.
 - 113) Foraker, A. G., S. W. Denham, & M. H. Johnston : Arch. Path., **55** ; 147-153, 1953.
 - 114) Foraker, A. G., S. W., Denham, & D. D. Mitchell : Science, **117** ; 449-451, 1953.
 - 115) Foraker, A. G., P. A. Celi, & S. W. Denham : Cancer, **7** ; 100-105, 1954.
 - 116) Foraker, A. G., S. W. Denham, & D. D. Mitchell : J. Histochem. & Cytochem., **2** ; 471-472, 1954.
 - 117) Wattenberg, L. W. : Am. J. Path., **31** ; 875-881, 1955.
 - 118) Hogeboom, G. H., A. Claude, & R. D. Hotchkiss : J. Biol. Chem. **165** ; 615-629, 1946.
 - 119) Schneider, W. C. : Ibid. **165** ; 585-593, 1946.
 - 120) LePage, G. A., & W. C. Schneider : Ibid. **176** ; 1021-1027, 1948.
 - 121) Hogeboom, G. H., W. C. Schneider, & G. E. Pallade : Ibid. **172** ; 619-636, 1948.

- 122) Hogeboom, G. H. : Ibid. **177** ; 847-858, 1949.
- 123) Schneider, W. C., & G. H. Hogeboom : J. Nat. Cancer Inst., **10** ; 969-975, 1950.
- 124) Hogeboom, G. H., & W. C. Schneider : Ibid. **10** ; 983-987, 1950.
- 125) Harman, J. W. : Experimental cell Research, **1** ; 382-393, 1950.
- 126) Harman, J. W. : Ibid. **1** ; 394-402, 1950.
- 127) Wachstein, M. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **73** ; 306-308, 1950.
- 128) Shearer, G., R. Hodes, & E. Farber : Am. J. Physiol., **171** ; 766-767, 1952.
- 129) Rosa, C. G., & J. T. Velardo : Anat. Rec., **117** ; 532, 1953.
- 130) Rosa, C. G., & J. T. Velardo : Ibid. **121** ; 278, 1955.
- 131) Meyerhof, O. : Pflügers Arch. gesamte Physiol, **175** ; 20-87, & 88-93, 1919.
- 132) Szent-Györgyi, A. : Biochem. Z., **157** ; 50-66, 1925.
- 133) Szent-Györgyi, A. : Ibid. **157** ; 67-84, 1925.
- 134) Szent-Györgyi, A. : Biochem. J., **24** ; 1723-1727, 1930.
- 135) Banga, I., L. Schneider, & A. Szent-Györgyi : Biochem. Z., **240** ; 462-472, 1931.
- 136) Banga, I., & A. Szent-Györgyi : Ibid. **246** ; 203-214, 1932.
- 137) Banga, I., K. Laki, & A. Szent-Györgyi : Z. physiol. Chem., **217** ; 43-51, 1933.
- 138) Szent-Györgyi, A. : Ibid. **217**, 51-53, 1933.
- 139) Quastel, J. H., & M. D. Whetham : Biochem. J., **18** ; 519-534, 1924.
- 140) Stephenson, M. : Ibid. **22** ; 605-614, 1928.
- 141) Cook, R. P. : Ibid. **24** ; 1526-1537, 1930.
- 142) Barron, E. S. G., & C. P. Miller, Jr. : J. Biol. Chem., **97** ; 691-715, 1932.
- 143) Barron, E. S. G., & A. B. Hastings : Ibid. **107** ; 567-578, 1934.
- 144) Wagner-Jauregg, T., H. Rauen & E. F. Möller : Z. physiol. Chem., **228** ; 273-276, 1934.
- 145) Wagner-Jauregg, T., & E. F. Möller : Ibid. **236** ; 216-221, 1935.
- 146) Ogston, F. J., & D. E. Green : Biochem. J., **29** ; 1983-2204, 1935.
- 147) Warburg, O., & W. Christian : Biochem. Z., **274** ; 112-116, 1934. Ibid. **275** ; 112-113, 1935. Ibid. **275** ; 464, 1935. Ibid. **282** ; 157-205, 1935. Ibid. **282** ; 220-229, 1935. Ibid. **285** ; 156-158, 1936. Ibid. **286** ; 81-82, 1936. Ibid. **287** ; 291-328, 1936.
- 148) Lohman, K. : Ibid. **233** ; 460-469, 1931. Ibid. **241** ; 67-86, 1931.
- 149) Ohlmeyer, P. : Ibid. **287** ; 212-225, 1936.
- 150) Euler, H. v., & E. Adler : Z. physiol. Chem., **226** ; 195-212, 1934.
- 151) Adler, E., & H. v. Euler : Ibid. **232** ; 6-35, 1935.
- 152) Adler, E., H. Hellström, & H. v. Euler : Ibid. **242** ; 225-249, 1936.
- 153) Adler, E., & M. Michaelis : Ibid. **238** ; 261-268, 1936.
- 154) Euler, H. v., E. Adler, G. Günther, & H. Hellström : Ibid. **245** ; 217-245, 1937.
- 155) Euler, H. v., & F. Schlenk : Ibid. **246** ; 64-82, 1937.
- 156) Euler, H. v., E. Adler, & G. Günther : Ibid. **249** ; 1-15, 1937.
- 157) Euler, H. v., E. Adler, G. Günther & R. Vestin : Ibid. **247** ; 127-134, 1937.
- 158) Green, D. E. : Biochem. J., **30** ; 2095-2110, 1936.
- 159) Green, D. E., & D. Richter : Ibid. **31** ; 596-616, 1937.
- 160) Dewan, J. G., & D. E. Green : Ibid. **31** ; 1074-1085, 1937.
- 161) Green, D. E., J. G. Dewan, & L. F. Leloir : Ibid. **31** ; 934-949, 1937.
- 162) Green, D. E., & J. G. Dewan : Ibid. **31** ; 1069-1073, 1937.
- 163) Dewan, J. G., & D. E. Green : Nature, **140** ; 1097-1098, 1937.
- 164) Green, D. E., D. M. Needham & J. G. Dewan : Biochem. J., **31** ; 2327-2352, 1937.
- 165) Corran, H. S., & D. E. Green : Nature, **142** ; 149-150, 1938.
- 166) Corran, H. S., & D. E. Green : Biochem. J., **32** ; 2231-2240, 1938.
- 167) Dewan, J. G., & D. E. Green : Ibid. **32** ;

- 626-639, 1938.
- 168) Adler, E., H. v. Euler, & H. Hellström ;
Arkiv för Kemi, **12B** ; Nr 38, 1937.
- 169) Adler, E., H. v. Euler, & G. Günther :
Ibid. **12B** ; Nr 54, 1938.
- 170) Euler, H. v., & H. Hellström : Z. physiol. Chem., **252** : 31-40, 1938.
- 171) Adler, E., H. Hellström, G. Günther, &
H. v. Euler : Ibid. **255** ; 14-26, 1938.
- 172) Euler, H. v., & K. Hasse : Naturwiss.,
26 ; 187, 1938.
- 173) Straub, F. B. : Biochem. J., **34** ; 483-
486, 1940.
- 174) Slater, E. C. : Annual Rev. Biochem.,
22 ; 23-33, 1953.
- 175) Clark, H. W., H. A. Neufeld, C. Widmer
& E. Stotz : J. Biol. Chem., **210** ; 851-
859, 1954.
- 176) Widmer, C., H. W. Clark, H. A. Neufeld,
& E. Stotz : Ibid. **210** ; 861-867, 1954.
- 177) Green, D. E., S. Mii, & P. M. Kohout :
Ibid. **217** ; 551-567, 1955.
- 178) Green, D. E. : 細胞化学シンポジウム, **8** ;
145-155, 1958.
- 179) Bennett, H. S. : J. Biophys. & Biochem.
Cytol. **2** (suppl.) ; 171-174, 1956.
- 180) 木下良順 : 日病会誌, **27** ; 665-727, 1937.
- 181) 丸谷八郎 : 癌, **33** ; 203-205, 1939.
- 182) 宮地徹 : アゾ色素による実験的肝癌 (1948),
南条書店.
- 183) Novikoff, A. B. : Cancer Research, **17** ;
1010-1027, 1957.
- 184) Findlay, G. H. : J. Histochem. & Cyto-
chem., **3** ; 331-338, 1955.
- 185) Burtner, H. J. : Ibid. **4** ; 428-431, 1956.
- 186) Burtner, H. J., R. C. Bahn, & J. B.
Longley : Ibid. **5** ; 127-134, 1957.
- 187) Sumner, J. B., & G. F. Somers : Labora-
tory Experiments in Biological Chemi-
stry. (1949) p. 134-135.
- 188) Wattenberg, L. W. : Am. J. Path., **35** ;
113-137, 1959.
- 189) Greenstein, J. P. : Adv. Enzymol., **3** ;
315-348, 1943.

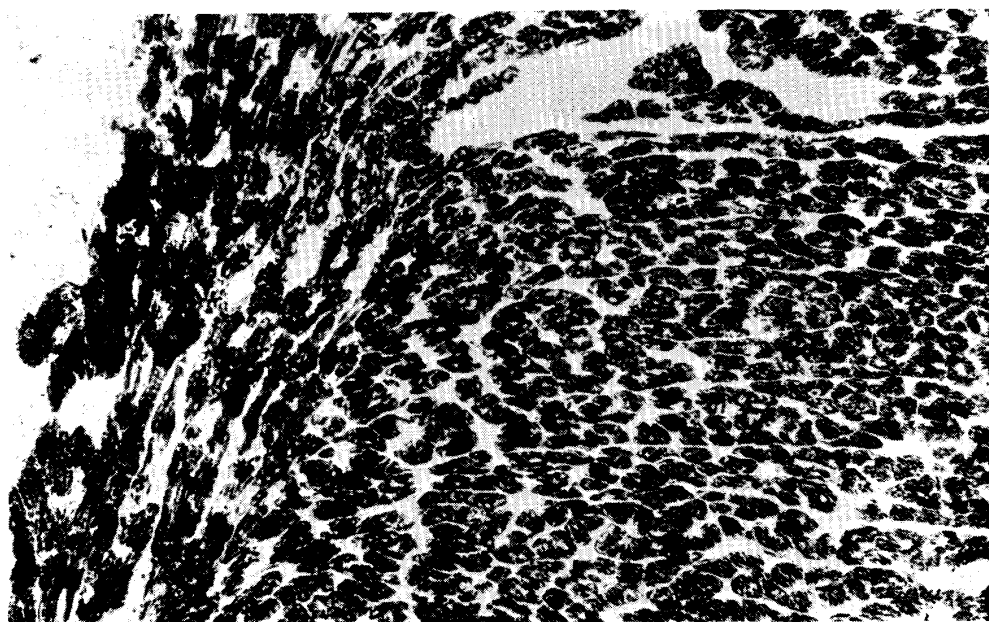


図1. Ⅲ法, 乳酸, 白鼠, 心臓, アセトン固定. ×100

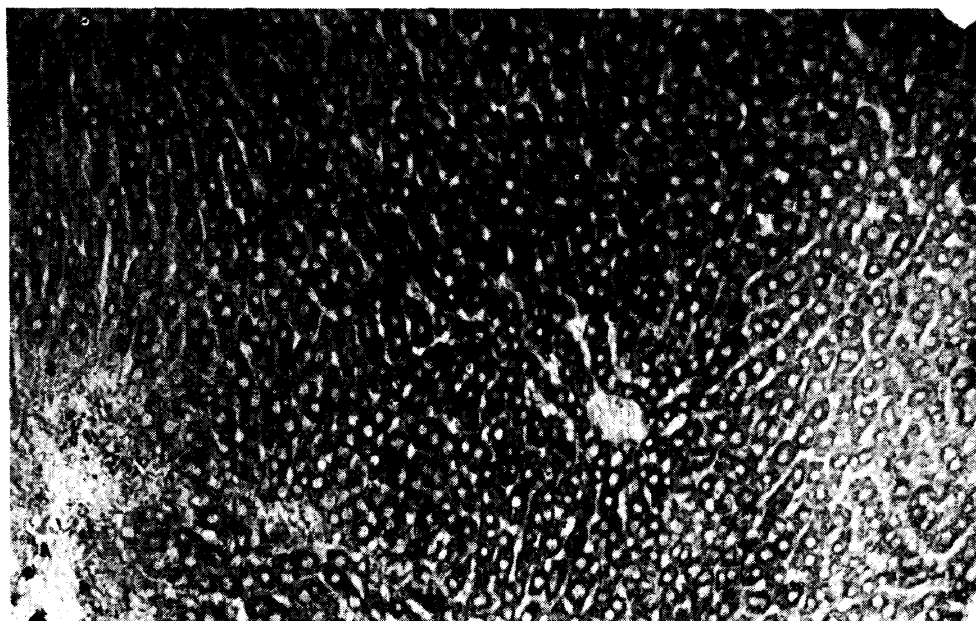


図2. Ⅲ法, 林檎酸 白鼠, 肝臓, アセトン固定。核は陰性である。 × 100

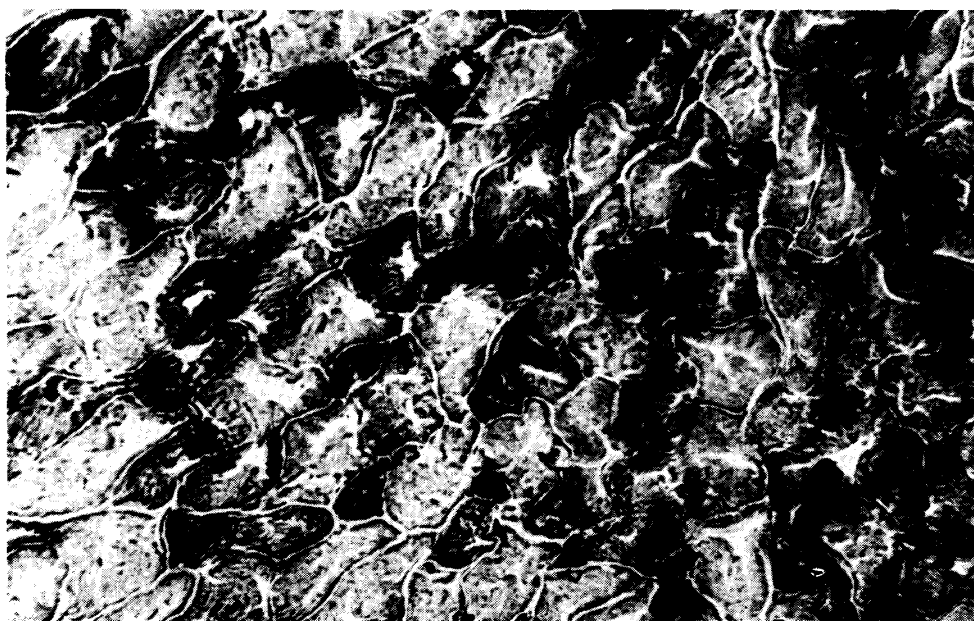


図3. Ⅲ法, 乳酸, 白鼠, 大腿筋, アセトン固定。(横断面) 染色性の異なる2種類の筋束が区別される。概ね小さい筋束に強い陽性を示す。

× 200



図4. 図3に同じ，縦断面，明らかに核は陰性で，その両側を中心として強陽性である。又横紋に一致して反応の強弱がみられる。

× 900



図5. 図3に同じ，筋紡錘と思われる部に強く陽性に出る。(縦断面)

× 900

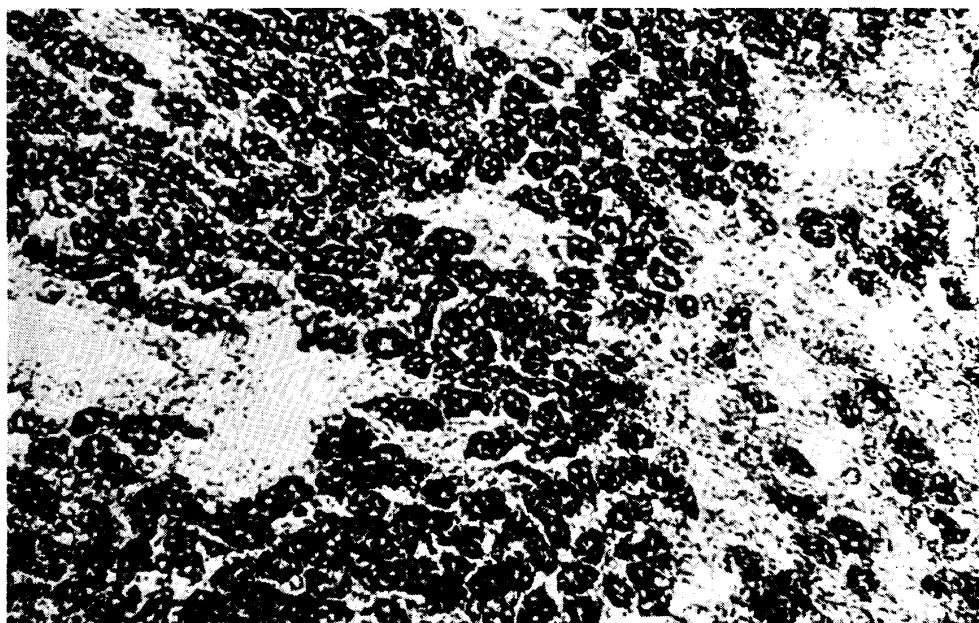


図6. II法，乳酸，白鼠，腎，アセトン固定．外髄質の Henle 氏上行脚に強陽性である。右方内髄質（乳頭）でも，集合管に強陽性である。

× 100

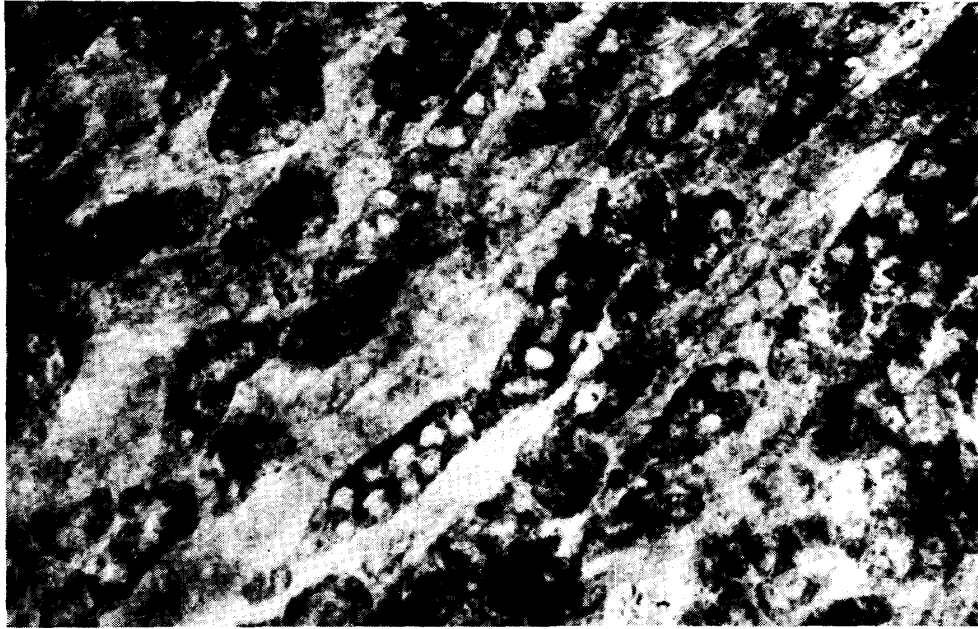


図7. Ⅲ法，乳酸，白鼠，腎．アセトン固定．外髄質部の強拡大である。これではよくわからないが図6のⅡ法に比して，実際は反応が遙かに弱い。核は陰性である。
× 400



図8. Ⅱ法，林檎酸，白鼠，新鮮組織．左半分の粘膜腺上皮，特に壁細胞に強陽性である。その他，固有筋板，平滑筋，血管壁にも弱陽性である。
× 100

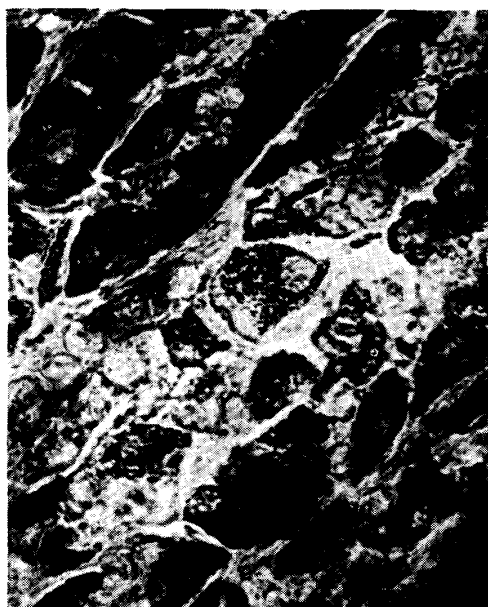


図 9



図 10

何れも図8の粘膜層の強拡大で、壁細胞原形質に微細顆粒状に formazan の沈着を示している。核は陰性である。図10の細胞(↑)原形質に於ける線状の陰性部は細胞内導管と思われる

× 400



図11. Ⅲ法, 乳酸, 白鼠, 肺臓, アセトン固定, 気管支上皮に僅かに陽性である。

× 100



図12. Ⅲ法，乳酸，白鼠，睪丸，アセトン固定．間質細胞に主として陽性で，精子形成細胞は赤色に染る。 × 200

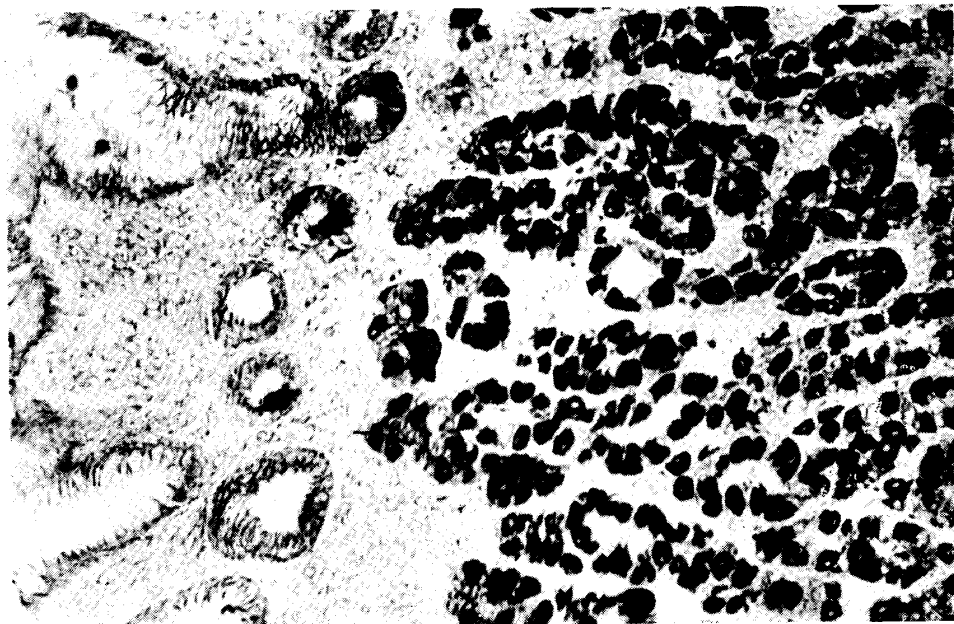


図13. Ⅲ法，乳酸，人，胃．アセトン固定 主として壁細胞に強陽性で，左方の粘膜上皮は淡赤色に染るのみである。 × 100

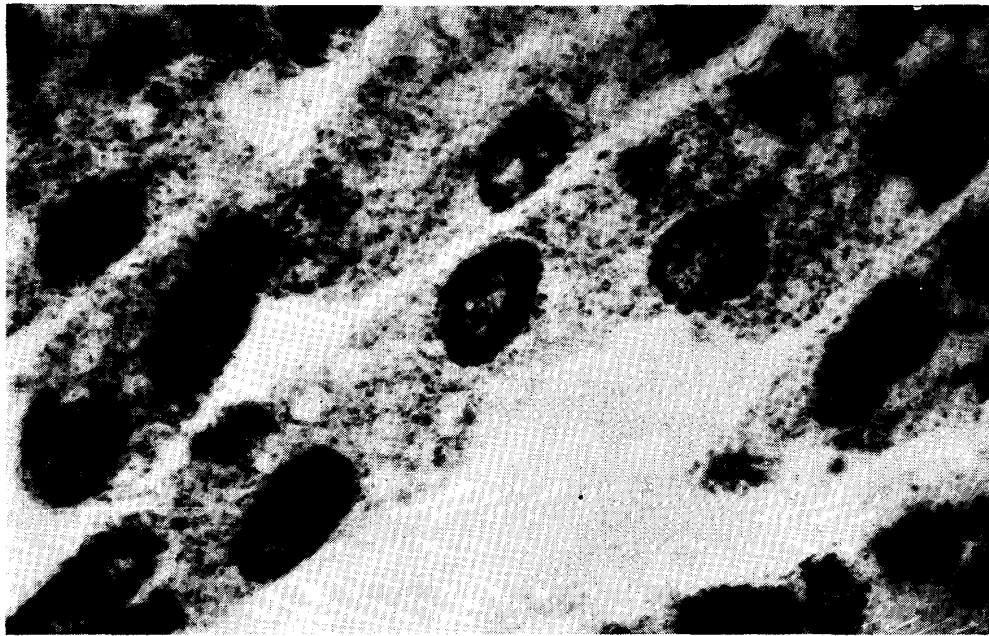


図14, 図13の強拡大で, 壁細胞が特に強い反応を示し, 主細胞等では僅かに顆粒の沈着を認める。 × 400

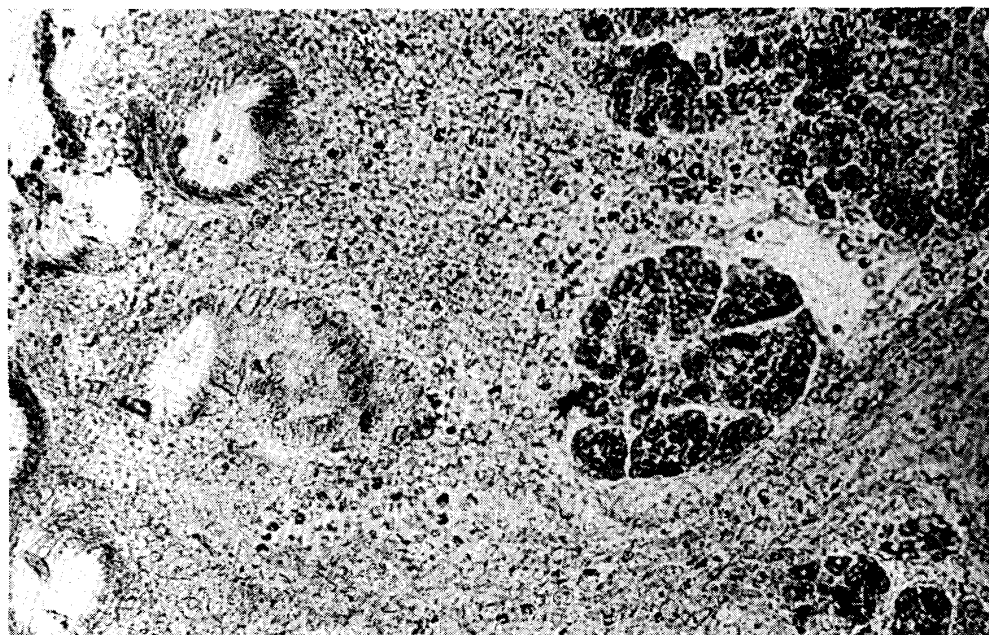


図15. Ⅲ法, 乳酸, 人, 胃, アセトン固定. 胃癌に伴う萎縮性胃炎の部で, 腺上皮は萎縮性で, 間質が増えている。腺細胞では活性低下し, 赤色に染るのみである。図13と比載。 × 100

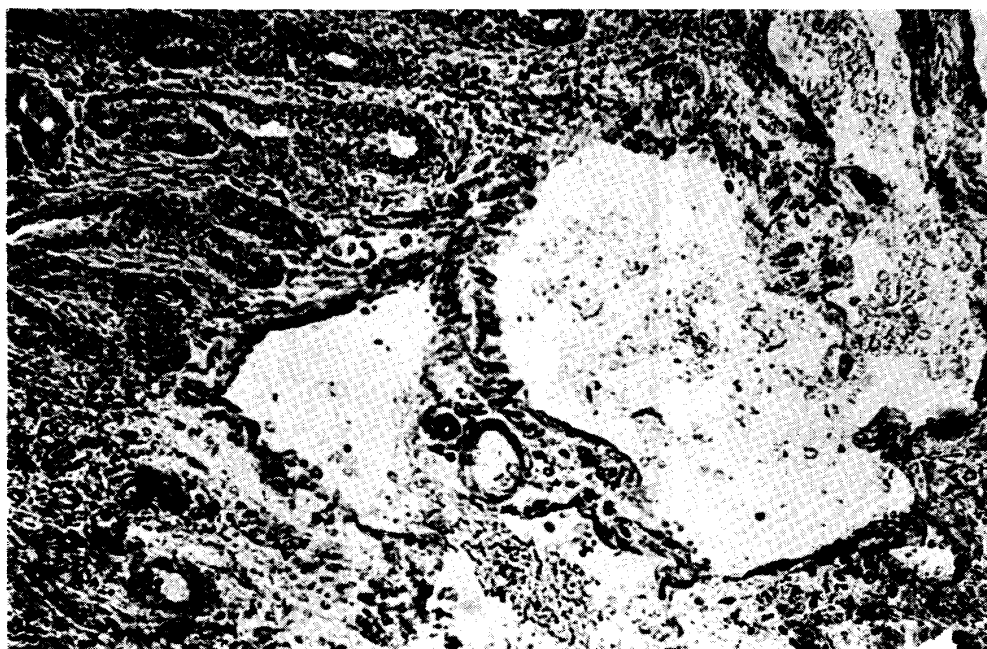


図16. Ⅲ法，人，胃癌，アセトン固定．左方は表層近く，比較的分化した癌細胞（腺癌）であるが，ここでは赤色調が主である。右半は稍深部に浸潤，増生して，腺構造が非常に不整になつて居り，この部の癌細胞では紫色の顆粒沈着としてみられる。 × 100



図17. Ⅲ法，乳酸，人，胃癌，アセトン固定．立方乃至多角形の細胞よりなる腺癌で，腺構造も不整で，分化の程度が低い。紫色の粗大顆粒として沈着している。又，間質細胞にも陽性にみられる。 × 200



図18. 方法は17に同じ, 単純癌, 殆ど単離して浸潤した小形の癌細胞には強陽性である。

× 400

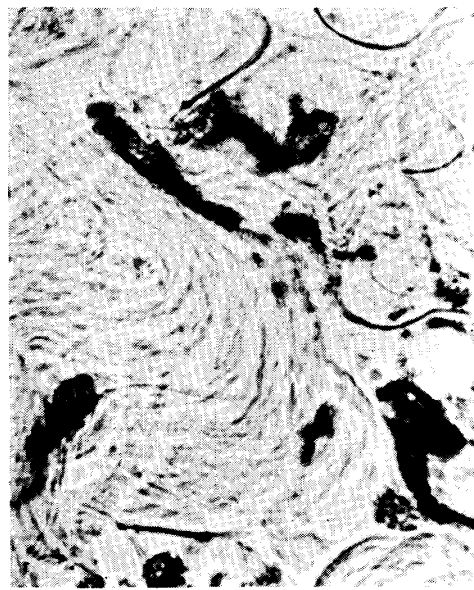


図19. 方法は17に同じ. 間質の腺維芽細胞も強陽性である。

× 400

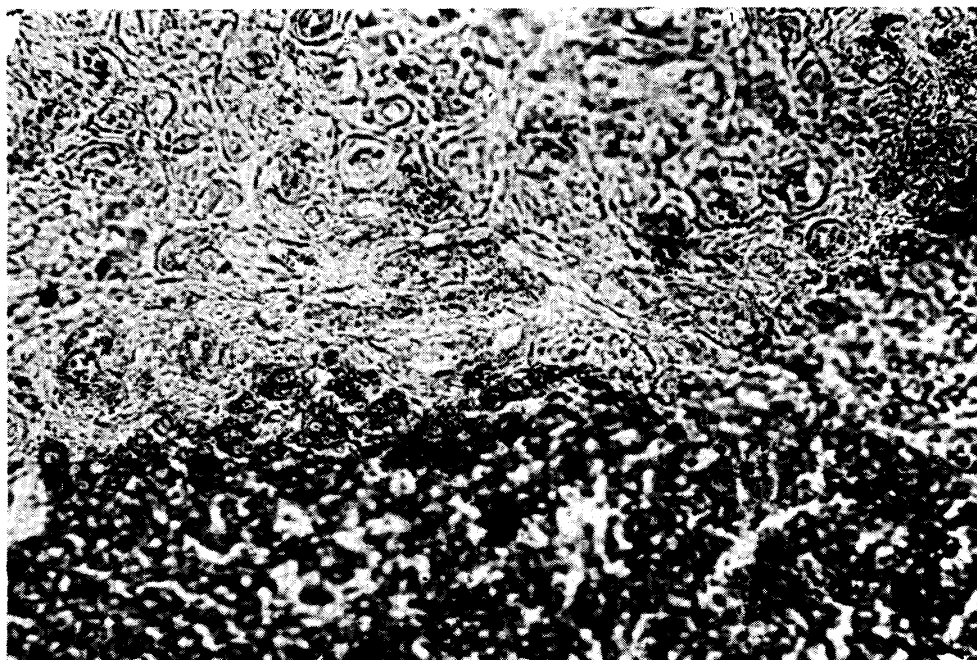


図20. II法, 林檎酸, 白鼠, Butter Yellow 飼育肝, 新鮮組織. 下方の肝細胞は陽性であるが, 上方の結合織及び胆管の増生部は陰性である。

× 100

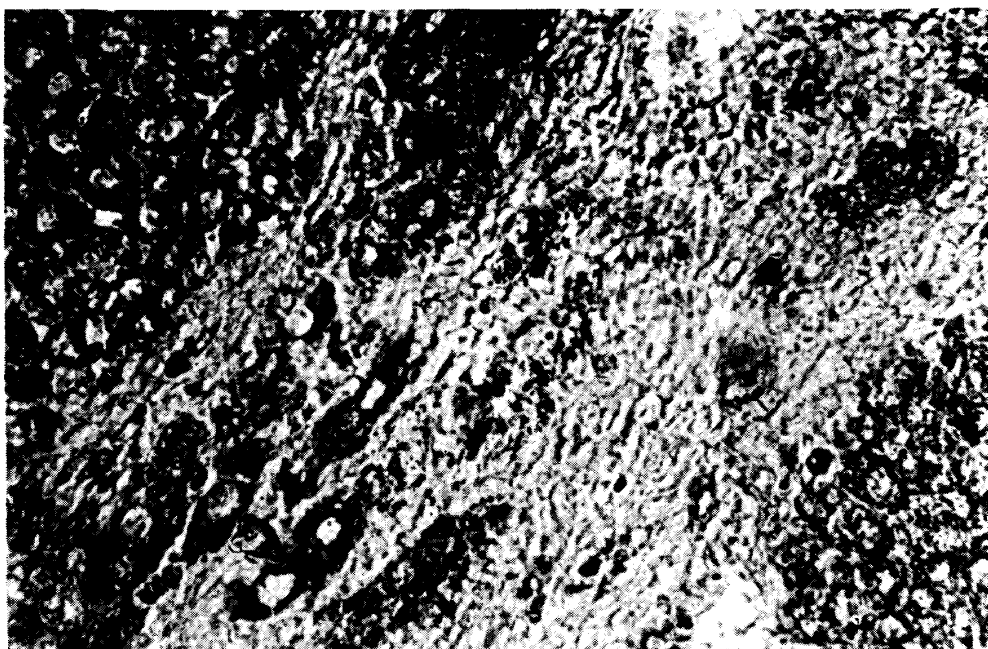


図21. Ⅲ法, 林檎酸, 白鼠, Butter Yellow 飼育肝, アセトン固定. 増殖した結合組織の為に島状に残存した肝細胞には尚陽性である。 × 200

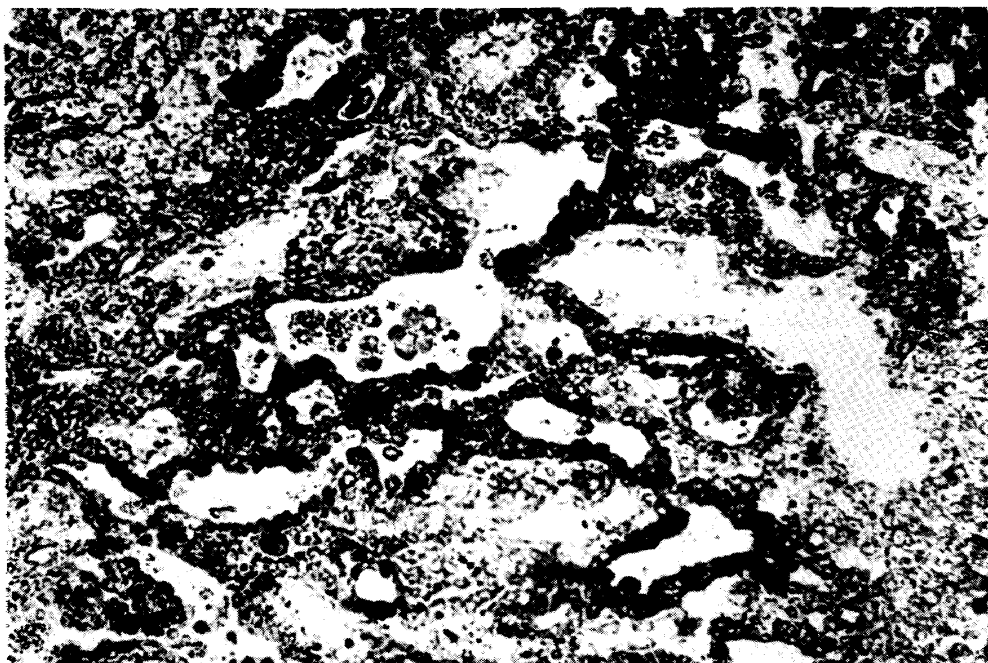


図22. Ⅱ法, 林檎酸, 白鼠, Butter Yellow 飼育肝, 新鮮組織. 腺癌の像を呈し, 不規則に強陽性である。 × 100

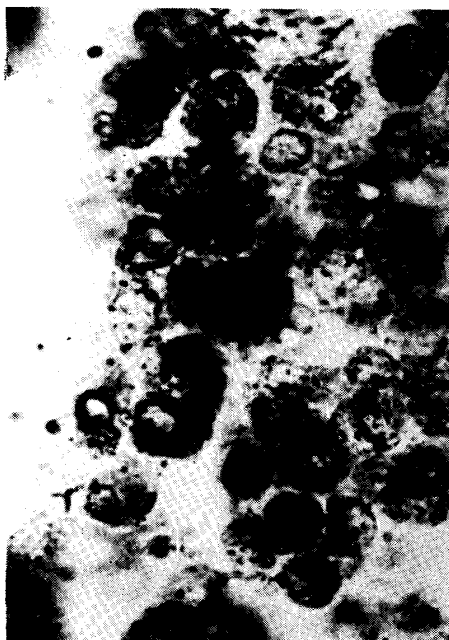


図23 22の標本の強拡大で、遊離した腫瘍細胞に強陽性である。

× 400



図24 材料は22に同じ，Ⅱ法，乳酸，アセトン固定．左上方の腫瘍細胞は強陽性であるが，中央部の細胞は核周囲に顆粒状の沈着を認める，核は陰性である。

× 400