

脱水素酵素の組織化学的研究

〔第1篇〕所謂内元性脱水素酵素反応の本質について

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

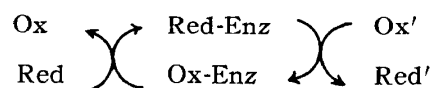
（昭和34年6月30日受付）

目 次

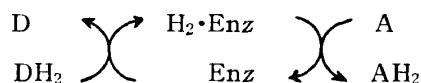
1. 緒 言
歴史的にみた脱水素酵素の組織化学
2. 実験材料及び実験方法
3. 実験成績
 - 1) 固定剤の影響
 - 2) 温度の影響
 - 3) 各種イオンの影響
 - 4) 基質物質の影響
 - 5) 阻害剤の影響
4. 総括並びに考按
 - 1) tetrazolium 塩及び tellurite について
 - 2) 内元性脱水素酵素反応の性格
 - 3) 内元性脱水素酵素反応の機序
5. 結 論

1 緒 言

衆知の如く生体内の代謝において極めて重要な反応の一つに酸化還元過程があり、そこに脱水素的酸化機転が関与しているが、これに触媒的に働く酵素に対して、主に脱水素酵素 (dehydrogenase) の名が与えられている。この種の酵素の作用する反応系には、基質 $\rightleftharpoons$ 生成物の系 (Red/Ox), とその *electrone* 受授を行う系 (Ox'/Red'), 及びその中間において *electrone* 移動の橋渡しをなし、且、特定の基質のみに作用する酵素系 (Ox-Enz/Red-Enz) と、少なくとも3つの酸化還元系が関与するものである。即ち次の如き模式図で表現される。



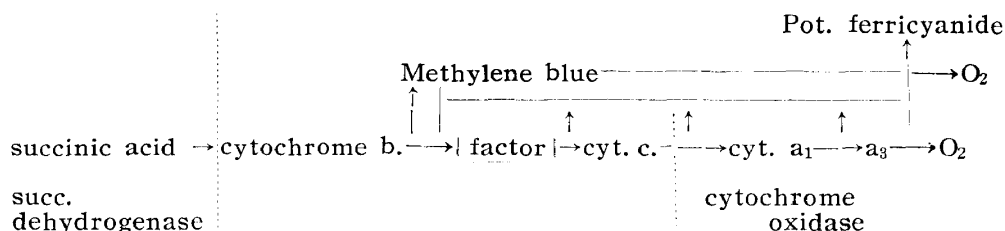
更に脱水素的反応においては *electrone* の移動は水素原子の移動として現わされ、RedをDH₂（水素受容体）で表現すると、その(2H⁺+2e⁻)の移動によつて反応が進行し、Ox'に相当するA（水素受容体）のAH₂への変化で終了する



生体内ではこの中間の水素運搬体には酸化還元酵素以外に *glutathione* とか *ascorbic acid* のような非酵素的な物質も存在する。

而して、生体内においては種々の酸化還元系が錯綜し、有機的な連携を以て存在し、夫々の系の示す酸化還元電位に従つて各系の間に水素乃至 *electrone* の運搬が行われる。例えば *Krebs*¹⁾ あるいは *Green* 等²⁾ の示すクエン酸廻路のように、コハク酸その他の物質間の水素移動に従つて代謝過程が循環し、更に外部から焦性葡萄糖その他の物質が関与し、夫々に特異的な脱水素酵素が働いている。

更に、例えばその中でコハク酸の酸化系のみにおいても、基質としてのコハク酸と、水素受容体としての酸素との間に種々の過程が関与している。即ち、*Slater*³⁾ によれば次の如き模式図を示している。



このように極めて複雑な生体内の脱水素酵素の組織化学的研究においては、その特異性と云う事が極めて重要な問題である。一般に酵素の組織化学的研究において、単に反応液に基質を加えたからとて、その成績が直ちに特定の酵素作用の結果であるとは必ずしも云えないが、脱水素酵素の場合、特にこれが強調される。即ち脱水素酵素の組織化学的研究においては、(1), 対象とする酵素群が、一般に極めて不安定で使用する材料が非常に制限される事、(2), 他の加水分解酵素等では一般に反応産物を直接捕捉する方法がとられているが、脱水素酵素の場合には、水素受容体として水溶性のもので、且、還元されて非水溶性となるような適当な試薬を使用し、これを組織と反応せしめ、還元物質を組織切片上に沈着、発色せしめる方法が行われ、いわば間接的な方法である事、この2つの理由から一層研究が困難であり、又、特異性が問題にされるのである。

歴史的にみた脱水素酵素の組織化学

さて、この水素受容体として使用される試薬としては、種々の tetrazolium 塩と pot. tellurite があげられる。歴史的に眺めると tetrazolium 塩については、1894年 Pechman 及び Runge⁴⁾ が formazylbenzol その他の formazyl 化合物から triphenyltetrazolium chloride (TTC) その他の tetrazolium 塩を初めて合成したが、これが組織化学に応用されたのは約50年も後である。Kuhn と Jerchel ('41)^{5) 6)} がそれらの化学的性状を詳細に検討し、植物組織や細菌等が、20°C, pH7 で無色の TTC を還元し、formazan の沈着がみられ、ascorbic 酸, cysteine, glutathione 等は pH 9 以上で初めて還元作用を示すところから、この TTC の還元が酵素作用による事を暗示した。Mattson, Jensen 及び Dutcher⁷⁾ ('47) は種々の新鮮動植物組織が pH 6.9 で TTC を還元して formazan を作る事を認め、糖等による還元作用は pH 11.0 以上を必要とする事、Jerchel 等⁸⁾ の測定によると TTC の酸化還元電位が -0.083 又は -0.088ボルトである事、あるいは組織を 82°C 以上に加熱すると上記の

還元反応が認められない事等から、この還元反応は酵素、特に Co I あるいは Co II を助酵素とする脱水素酵素の作用によるものと推定した。更に、葡萄糖脱水素酵素がその基質の存在において、pH 6.6 で TTC を還元する事を示し、tetrazolium 塩の還元が酵素作用によつて行われる事を明らかにした。

1948年 Straus, Cheronis 及び Straus⁹⁾ は腫瘍の組織片を検鏡し、腫瘍細胞が TTC をよく還元する事を認めた。これが、病理組織学的に tetrazolium 塩の使用された最初の報告であろう。又、Kun & Abood¹⁰⁾ は 1949年、鼠の腎、肝、脳、筋肉等の homogenate を用いて、TTC に対する還元反応からコハク酸脱水素酵素の活性を生化学的に定量した。ついで、Seligman, Rutenburg 等 ('50~'53)^{11) 12) 13)} は homogenate の実験等から、更に新鮮組織切片でコハク酸を基質とし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、脱水素酵素の組織化学的あるいは生化学的研究に tetrazolium 塩は広く使用されている。

一方、pot. tellurite については Wachstein ('49, '55)^{14) 15)} が動物組織について初めて使用したのであるが、近年、高松・大林 ('54)¹⁶⁾ による金置換法の発見されるに及んで広く用いられるようになった。又、小田 ('58)¹⁷⁾ によつて電子顕微鏡的組織化学にも応用された。

而して、tetrazolium 塩及び tellurite の組織細胞による還元を検討する方法は次の如く大別されよう。

1) 生体染色：これは初期に行われた方法で前述の Straus 等 ('48),⁹⁾ Rutenburg 等 ('50)¹¹⁾、更に Tynen & Underhill ('49)¹⁸⁾ あるいは Black 等 ('53)¹⁹⁾ の報告等がある。即ち、動物の皮下、あるいは静脈内に tetrazolium 塩の稀薄溶液を注射し、一定時間後に屠殺し、各臓器の染色状態を観察する方法であるが、一般に tetrazolium 塩は毒性が強く (Seligman 等¹¹⁾ によれば、彼等の合成した blue tetrazolium chloride (BT) は neotetrazolium chloride (NT) よりも更に毒性が強い)、使用量に制限があり、そのため染色度が弱く、主と

して腎、肝等にみられるのみである。今日ではこの方法は殆んど使用されない。

2) 組織の homogenate あるいは細菌等の微生物を使用する方法：生化学的な定量によく使用され、Kuhn & Jerchel('41)⁶¹, Kun & Abood('49)¹⁰¹ ('51)²⁰¹, Rutenburg 等 ('50)¹¹¹, Fred & Knight('49)²¹¹, Gunz('49)²²¹, Bielg 等 ('49)²³¹, Sevag & Forbes('50)²⁴¹ 等の報告があり、更に Brodie & Gots('51)²⁵¹, ('52)²⁶¹ は酵母あるいは動物組織から抽出した各種酵素そのものを使用して tetrazolium 塩に対する還元機構を追求した。

3) 超生体染色：新鮮組織を厚さ 2～3 mm 以下の小片とし、直接 tetrazolium 塩等の溶液内で 37°C 一定時間反応せしめた後固定、凍結切片として検鏡する方法である。新鮮組織をそのまま使用する事により、細胞内の所謂「内元性活性」(endogenous activity) により tetrazolium 塩あるいは tellurite が還元されて formazan あるいは Te が沈着するものである。この方法は操作が簡単で、且、反応も強く、現在まで広く応用されている。即ち、Wachstein¹⁴¹ ¹⁵¹, Black 等¹⁹¹ ⁽²⁷⁻³⁸⁾, Rutenburg 等 ('50)¹¹¹, Calcutt('52)³⁹¹, Hiatt & Shorr('53)⁴⁰¹ 高松・大林('54)¹⁶¹ 等の報告があり、Goddard & Seligman('52)⁴¹¹ は甲状腺の新鮮切片を数回水洗する事により、あるいは Shelton & Schneider('52)⁴²¹ は凍結により内元性活性を著減せしめ、特にこの活性の弱い組織では切片にしなくてもコハク酸脱水素酵素を染め出す可能性を示している。その外、菩提寺('56)⁴³¹ は tetrazolium 塩と共に methylene blue を併用することにより皮下組織の伸展標本について、その還元作用が強く増強される事を示している。

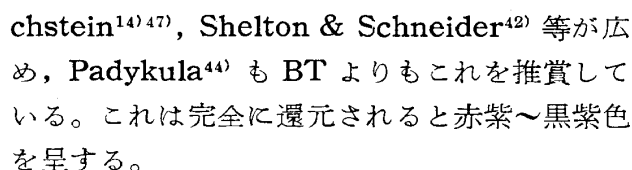
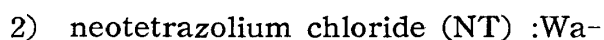
4) 凍結切片を用いる方法：Seligman, Rutenburg 等 ('51)¹²¹, ('53)¹³¹ は各種動物組織の新鮮凍結切片を sod. succinate を加えた BT の液に incubate することによつてコハク酸脱水素酵素の組織化学的証明に成功した。これは(1)コハク酸を入れなければ反応がおこらない事、(2)予め切片を 50°C に加熱すると反応が

おこらない事、(3) malonate を加えると顯著に抑制される事、(4) tetrazolium を還元する可能性のある sulfhydryl, enol, α -aldol, α -ketol 等は pH9～12 で約 2 時間要する事、等の理由から、その方法はコハク酸脱水素酵素に特異的な組織化学的証明法であるとした。ついで Padykula('52)⁴⁴¹ は BT よりも NT の方が鋭敏度においてまさる事を示し、又 Shelton & Schneider('52)⁴²¹ は凍結切片では内元性活性が殆んど消失し、30～70 μ の厚い切片では僅かに着色する事を報告した。このコハク酸脱水素酵素は CAC-cycle の一員をなすコハク酸の酸化に与り、極めて重要な酵素であり、且、脱水素酵素の中では比較的安定であるところから、新鮮切片による方法は主としてこの酵素を対象に広く研究されて来た。Mustakallio & Telkka('52)⁴⁵¹, Rennels & Ruskin('54)⁴⁶¹, Wachstein 等¹⁵¹ ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾, Wattenberg('54)⁵¹¹, Pearson & Defendi('54, '55)⁵²¹ ⁵³¹ Rosa & Velardo('54)⁵⁴¹, Villarreal & Burgos('55)⁵⁵¹, Nachlas 等 ('57, '58)⁵⁶¹ ⁵⁷¹, Buno & Germino('58)⁵⁸¹ 等枚挙にいとまがない。

その他 Pearse('57, '58)⁵⁹¹ ⁶⁰¹ は基質液に Co, Cd その他の金属塩をまぜ、formazan を metal chelate とする方法を發表している。又、Wachstein('55)¹⁵¹ は新鮮切片について脱水素酵素のみでなく、各種酵素にも使用して良好な成績を得ている。更に Farber, Sternberg & Dunlap('54～'56)⁶¹¹ ⁶³¹ は DPN- 及び TPN-diaphorase の組織化学的証明法を考案し、これが乳酸その他の基質に特異的でなく、DPN 又は TPN に特異的であり、腎臓においてはコハク酸脱水素酵素とその分布を異にする事を明らかにして、更にこれらの反応機転を論じた。又 Pearson & Defendi('54)⁵²¹ は α -glycerophosphate を基質として使用し、この脱水素酵素がコハク酸脱水素酵素とその分布を異にする事を述べている。

而して 3), 4) の方法を行つた後、formazan を acetone 等の有機溶媒で抽出して定量的觀察も可能で、上記の報告の中でも多数見られる。

1) 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) : 初期から最も広く使用され, Black 等が最も良く用い, Brodie その他の報告も多い。


$$\begin{array}{c}
 \text{H}_5\text{C}_6-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{N}-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ | \\ \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3 \\ | \\ \text{Cl}^- \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{H}_5\text{C}_6-\text{N}-\text{N} \\ | \\ \text{OCH}_3 \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_3 \\ | \\ \text{Cl}^- \end{array} \quad \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \\ \searrow \end{array} -\text{C}_6\text{H}_5 \\
 \text{OCH}_3 \quad \text{OCH}_3
 \end{array}$$
$$\text{H}_5\text{C}_6-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N}-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \\ \searrow \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4\text{I} \\ \quad \quad \quad + \\ \quad \quad \quad \text{Cl}^- \end{array}$$
$$\begin{array}{c} \text{H}_5\text{C}_6-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{N}-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \\ \searrow \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4 \end{array} \begin{array}{c} | \\ + \\ \text{Cl}^- \end{array} \text{O}_2\text{NH}_4\text{C}_6-\text{N}-\text{N} \begin{array}{l} \nearrow \text{C} \\ \searrow \text{N}=\text{N} \end{array} \text{C}- \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4 \end{array}$$

にとけない長所を持つ。又沃度化合物もみられる。**nitro NT** は **Pearson ('58)⁶⁴⁾** が使用しているが、この **formazan** は **alcohol** にとけない。

2 実験材料及び方法

1. 実験材料：正常白鼠及び廿日鼠の肝臓，腎臓，心臓並びに牛の心臓を厚さ1～2 mmの小組織塊とし，剔出後30分（牛心は3時間）以内に使用した。

1% potassium tellurite	5cc
(又は 0.5% NT.	5cc)
M/10 磷酸緩衝液	5cc
(pH7.4 及び一部 NaOH で pH 8.5 に調整したもの)	

上記の組織片を一定の反応液に漬し、37°C、特に断りのない場合には1時間反応せしめ、その色調の変化を肉眼的に観察し、又、一部 formalin 固定後凍結切片とし検鏡した。

3 実験成績

1. 固定剤の影響

4°C に冷却した 10% formalin に 2 時間固定後水洗, あるいは純 alcohol, 又は acetone で 1 時間固定, 乾燥後反応液に incubate したが, 何れも反応全く陰性, 又, 新鮮組織を M/10 三塩素醋酸 1cc を原液に加えた液に漬しても反応は殆んど陰性であるが, 腎臓で時に僅かに淡赤乃至薄紫の formazan を形成する事がある。又, 何れの場合でも Ca, Mg, Al, Mn 等を添加しても formazan あるいは free-Te の形成はみられない。

2. 温度の影響

(a), 加熱: 37°C 2 時間放置すれば, 組織の変性が強く現われ, 反応の低下がみられる。50°C 15 分では若干活性が残っているが, 60°C 15 分間加熱によつて完全に反応は消失する。これらは加熱した水に入れると, 活性物質の流失する可能性を考慮して, 孵卵器を使用した。

(b) 低温処理: 4°C の氷室に 24 時間保存してもなお可成りの活性を保っているが, 3 日以上経過すれば著しく減弱する。

更に低温処理として freezing microtome 上で一定時間凍結せしめた後, 融解, 反応液に漬し, 経過を観察した。この場合, 反応液の pH を 7.4 及び 8.5 とした。その成績は第 1

表に示す通りである。

一般に組織の凍結, 融解によつて活性は著しく減弱する。特に pH 7.4 で反応せしめる時には 5 ~ 10 分の凍結で著しく活性は消失するが, pH 8.5 で反応せしめれば, 心臓では可成り消失するが, 腎臓, 肝臓では 10 分の凍結では未だ相当の活性がみられ, 30 分凍結でも白鼠肝等では可成りの活性が残っている。

3. 各種イオンの影響

pH 7.4 に調整された M/100 CaCl₂, MgCl₂, AlCl₃, CoCl₂, CdCl₂, MnO₂ を 1cc 宛添加した液に漬したが, 肉眼的に判定出来る程の特別な反応の増強あるいは抑制効果を認めなかつた。

4. 基質物質の添加による影響

各種脱水素酵素の基質となり得るような種々の化合物を反応液に添加して, pot. tellurite 及び NT の還元を調べた。即ち, sod. succinate, fumarate, sod. lactate, sod. glycerophosphate, asparagin, glutamate, malate, acetic acid, glucose, DPN, DPN + sod. lactate, 等を使用した。これらは何れもその M/10 水溶液を N/10 NaOH 又は N/10 HCl で pH 7.4 に調整し, 各 1cc を反応原液に加えた。

i) 肉眼的所見

その結果, 一般に incubate 後 5 分で既に基質を加えない対照群を含めてすべての例において, 腎臓及び肝臓で淡黒 (Te) あるいは淡赤色 (NT) に着色し, 15 分後に, 腎臓, 肝臓の着色は明確になり, 腎では皮質及これから少々反応の弱い層を隔てて髓質の部が最も強く反応している。心臓では僅かに薄い着色をみるのみである。基質添加による特別の影響は肉眼的には認められない。唯, コハク酸等の場合に, 腎臓及び肝臓の反応が少々促進されるようである。その後, 着色は次第に増強し, 1 時間後には, 腎臓において最も反応強く, 皮質と髓質との中間層の反応が弱かつた部分も肉眼的には殆んど区別出来ない程度に顕著な陽性を示す。肝臓においても全体に強い Te 又は formazan の着色を認めた。心臓でも反応陽性であるが, 腎臓, 肝臓ほど強くない。以上, 腎臓, 肝臓では対照で

表 I 低温処理 (凍結融解) の影響

		処理時間	0	5 分	10 分	30 分
マウス	肝	PH 7.4	卅	±	±	±
		8.5	卅	卅	+	+
	腎	7.4	卅	±	—	—
		8.5	卅	卅	+	+
	心	7.4	+	—	—	—
		8.5	+	±	±	—
ラット	肝	7.4	卅	+	±	±
		8.5	卅	卅	卅	+
	腎	7.4	卅	±	±	±
		8.5	卅	卅	卅	+

も極めて強く出る故、肉眼的に基質添加による特異的な差を認める事は困難であつたが、早期の反応等から、コハク酸、乳酸等の場合、少々反応の促進が認められる。又、**sod. glycerophosphate** で腎臓において早期に少々反応が促進された。更に乳酸又は **DPN+乳酸** の場合に腎臓乳頭部の着色が強く、特にその先端部において濃厚であつた。心臓では一般に反応が弱く、且、基質添加による増強も顕著でない。

ii) 顕微鏡所見

次に **formalin** 固定後、凍結切片を作製して検鏡した場合、**NT** を使用した群ではその浸透が極めて悪く、1時間の反応では外表に近く液に接する部のみにしか **formazan** の沈着がみられず、腎臓、肝臓等では殆んどその用を為さない。一方 **tellurite** を使用した場合には、高松・大林法 (54)¹⁶⁾ に従つて塩化金置換、後染色を施すと所見は更に明確になるが、金置換の時間によつては反応の弱い部では消失する事があり、あるいは非特異的な金の沈着を来す事があるので注意を要する。

対照群では、腎臓においては **proximal convoluted tubules** に中等度陽性、髓質及び皮質髓放線の **Henle** 氏係蹄の上行脚並びに皮質の **distal convoluted tubules** と思われる部に最も強く陽性に見られる。又、コハク酸脱水素酵素の場合 (**Padykula**⁴⁴⁾) のように皮髓移行部附近の反応の低下は余り顕著でない。

Henle 氏下行脚の細胞は陰性、腎小体は概ね陰性であるが、**Bowman** 氏囊外葉で中等度陽性、糸毬体でも弱陽性の事がある。髓質が乳頭への移行によつて陽性部は明確に区別され、乳頭では反応が弱い。然し、その集合管が軽度に反応を示し、特に先端部で少々濃い。

種々の基質液を添加した例でも概ね同様の所見で、夫々に特異的な所見はみられない。唯、コハク酸、乳酸、**glycerophosphate** 等の場合に少々濃い着色がみられ、乳酸、あるいは **DPN** と乳酸を併用した場合等に乳頭部集合管での反応が増強され、特に先端部において著しい。又糸毬体でも明らかに陽性のものを認める。

肝臓では一般に腎臓よりも液の浸透が悪く、

染り方が均一でない為に明確な活性度は決め難いが、概ね小葉の周辺性に活性が強いようであるが、明らかに中心性に強陽性の部も認める。基質添加による特異的な差は認められない。

心臓においては、腎臓、肝臓よりも活性度が遙かに低く、着色が薄い、概ね筋線維の走行に沿つて **Te** の沈着を認める。基質による特異的な所見は認め難い。

而して各臓器における **formazan** あるいは **Te** の分布は、何れも原形質に限定され、核では陰性である。腎臓において、反応の強い部で原形質全体にみられるが、一部の細尿管では基底部あるいは内腔に近く分布している。

5. 阻害剤の影響

次の各試薬の **M/10** 水溶液を反応原液に加え、**pH 7.4**、最終濃度 **0.02M** になるように調整した。

KCN, **NaF**, **NaN₃**, **NaAsO₃**, **2,4-dinitrophenol (DNP)**, **monoiodoacetate**, **NaF+monoiodoacetate**, **NaN₃+monoiodoacetate+DNP**, **malonic acid**.

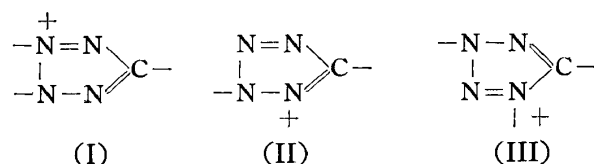
その結果、**monoiodoacetate 0.02M** の場合に幾分抑制がみられたが、その他、何れも特別な阻害作用を認めなかつた。又、興味ある事は、牛の心臓では対照群では弱陽性を示すに過ぎないが、**0.002 M. KCN** 添加によつて反つて反応が増強された。

総括並びに考按

1. tetrazolium 塩及び pot. tellurite について

i) tetrazolium 塩

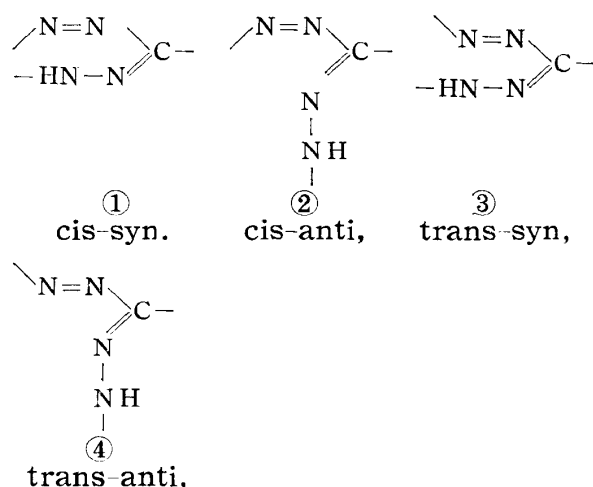
tetrazolium 塩としては、前記の様に種々のものが使用されているが、何れも共通の構造式として、次の様な分子構造を有する。



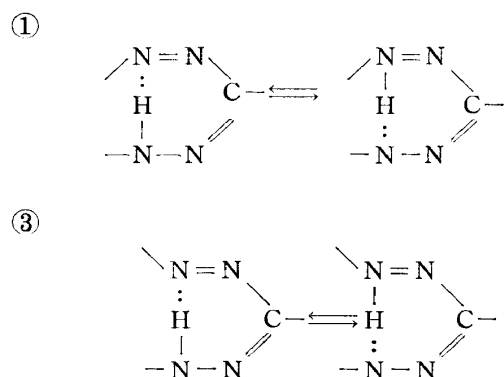
(I) は (2H) **tetrazole** より合成され、(II)、(III) は (1H) **tetrazole** から誘導される

何れも水溶液で無色，又は淡黄色であるが，還元されると $-\text{N}=\text{N}-\overset{\text{I}}{\text{C}}=\text{N}-\text{NH}$ を持つところの **formazan** となり，これが非水溶性で，赤，紫又は青色を呈する。

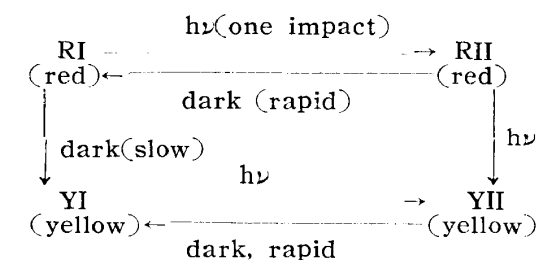
Nineham ('55)⁶⁵⁾ によれば，これら **formazan** 分子には次の様な異性体が考えられる



而して①③は夫々 **chelated hydrogen-bridge** 構造をとり共鳴 (resonance) が行われる。

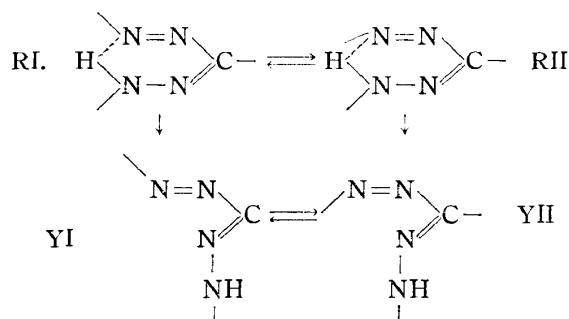


これらの形が有色性であるが，②④の構造を持つものは両端窒素原子の距離が離れている為に **H** による **chelate** 構造を形成しない。又彼は光による脱色について次の様に考えている。



R I 上記③に相当 Y I 上記②に相当
R II 〃 ① 〃 Y II 〃 ④ 〃

即ち， $\text{R I} \rightleftharpoons \text{R II}$ は **cis-trans** の変化であり， $\text{R II} \rightarrow \text{Y II}$ の反応は $-\text{C}=\text{N}-$ が **anti-configuration** をおこして，**chelation** が消失し，褪色するのである。



この光による褪色は **TTC** の場合に強く，**NT**, **BT** 等の **formazan** は比較的安定な様である。著者の経験では **NT** を使用し，**glycerine** 封入を行つた標本で，1年以上経過しても尙褪色は認められない。

扱て，**tetrazolium** 塩の還元について **Jám-bor**('54)⁶⁶⁾ は **polarography** による研究で，**TTC** は pH 6 以下で還元された時は主として無色の生成物を認め，それより **alkali** 側では赤色の **formazan** が形成されるが，不溶性の **formazan** を形成するには，酸化還元電位が **Jerchel** 等 ('44)⁸⁾ の測定した -0.08 volt

(**Jerchel & Mohle** の原著によると，**TTC** に対して，**indigotrisulfate** 及び **indigodisulfate** を指標とした場合， -0.083 volt ，**anthrachinonedisulfate** では -0.088 volt と云う数字をあげている) よりも更に十側に偏移した値であろうと考えている。更に彼は⁶⁷⁾ 溶媒の高度のアルカリ性は **TTC** の平衡失調及び化学的還元をおこすのみでなく，**formazan** の酸化をもおこし，この可逆性は 20°C , pH14 以上でみられ，それ以下では不可逆性をます。又「光 **TTC**」について，この還元が普通の化学的還元と異なる機構であり，**BT** の **diformazan** は光によつて **cis-trans** 転移をおこして青から赤になり，暗所ではこの逆に移行すると報告している。更に，**ascorbic** 酸の存在下に，注意深く **alkali** 性にすると **BT** の一部は容易に水，**alcohol**, **benzene** に溶解するところの赤色 **formazan** を生ずる事を明らかにした。その他非

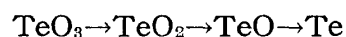
酵素的還元については Shelton & Schneider ('52)⁴²⁾ が TTC は pH 6~7.5 で容易に自然還元をおこし、又、pH 3 で数時間で黄色になると報告して居る。Kuhn & Jerchel ('41)⁶⁾, Mattson 等 ('47)⁷⁾, Seligman & Rutenburg ('51)¹²⁾, Smith ('51)⁶⁸⁾, Padykula ('52)⁴⁴⁾, 等は何れも ascorbic acid, cysteine, その他の生体内の還元作用を示す物質による tetrazolium 塩の還元は概ね pH 10 以上の場合におこる。Parker ('55)⁶⁹⁾ によれば、各種油、特に linseed oil, cedar oil 等が pH7 で TTC の光還元を強く触媒し、暗色では formazan の形成をみない。従つて TTC を使用する場合は光を遮断する必要があると警告している。又 formazan が脂溶性である事も見逃せない点で、Tynen & Underhill ('48)¹⁸⁾ は TTC による生体染色で皮下組織の中性脂肪が染る事を認め、Zweifach 等 ('51)³¹⁾ は白鼠及び犬の副腎の内元性活性の研究に於いて、formazan が結晶としてみられないで、脂肪滴に溶融しているのを認めた。Shelton & Schneider ('52)⁴²⁾ は ① 酵素的に生成された formazan が脂質にとけ、diffuse する事、② 脂質そのものが tetrazolium 塩を還元する可能性がある事、この2つの理由で十分な注意を喚起している。その他 Rosa ('55)⁷⁰⁾ に対し Novikoff の討論がみられる。

これら諸家の報告は何れも細胞内の tetrazolium の還元は主として酵素作用によるものであるが、そのすべてが酵素作用の表現とみるのは危険で、一部は細胞内の還元物質その他の作用によるところの非酵素的作用による可能性も考慮せねばならない点に於いて一致している。又、普通よく使われる TTC, NT, BT では、組織への滲透と云う点では TTC が最も良い様である (Shelton 等⁴²⁾) が、少々長時間の incubation を要し、その間に非酵素的還元がおこり易い。NT は反応が最も鋭敏で、細い沈着をおこし、且、非特異的沈着が少い様で最もすぐれている。BT はこれらの中に位する。

然し乍ら、何れにせよ、著者の実験でも明らかな様に、小組織塊をその儘 incubate する場

合には、組織への滲透が悪く、肝臓、腎臓等の実質臓器では周囲の僅かの部分しか反応をおこさぬ場合が多い。その意味で、内元性活性 (特に実質臓器の場合) の研究には tetrazolium 塩は適当でない。

ii) Tellurite : tellurite としては普通、pot. tellurite を使用する。これは次の如く段階的に還元されて遊離の Te を生じ、組織に淡灰黒色の沈澱として認められる。



これを更に塩化金の液に漬して金と置換すると青紫色の鮮鋭な像として見られ、且、有機溶媒にとけない為、美麗な永久標本とする事が出来る。但し、還元作用に対する鋭敏度は tetrazolium 塩より少々劣り、又、金置換の時間に注意を要する。著者は Te の儘のものと、金置換を行つたものと両方の標本で比較し乍ら検討した。又、tellurite は脂肪に溶けない事も普通の tetrazolium に比してすぐれている。

tellurite 法では腎等でも1時間の incubate でも充分滲透して Te の沈着を示し、肝では少々滲透が悪いが、tetrazolium 塩より遙かに勝る。

2. 内元性脱水素酵素反応の性格について

i) 固定剤の影響：各種固定剤の処理によつて活性は完全に消失する。但し、組織塊が厚く且、固定時間の短い場合には一部活性を残しているが、これは液の滲透が不完全な為で、腎臓、肝臓等の実質臓器では時にみられる。少くとも十分に液の作用した部では完全に消失する。Wachstein ('49)¹⁴⁾ も yeast, E. coli 及び組織片による実験で、alcohol, acetone, formalin 等で活性の消失を認め、Gunz ('49)²²⁾ は既述の様に yeast の acetone, alcohol, ether 処理乾燥粉末で、尙7カ月後にも tetrazolium の還元能を有する事を認め、これが 60°C 加熱で不活性となり、2~24時間の透析でも不活性化する事を認めている。しかし、Parker ('55)⁶⁹⁾ はこれを追試して yeast を 16% acetone 又は alcohol で24時間処理し乾燥したものは尙活性を有し、50%液1時間処理では完全に反応の消失する事を述べている。菩提

寺('56)⁴³⁾ は伸展皮下組織に於いて、10分間処理で完全に不活性化することを報告している。但し、この場合、固定後、「充分水洗」してから反応せしめているが、この水洗によつて還元能を持つ酵素その他の物質の流失する可能性は組織片の場合よりも更に多い。尙、彼は乾燥によつても著しく活性の低下する事も報じている。著者は組織塊の固定実験に併行して、肝臓及び腎臓の塗抹標本について同様に 0°C 10分、acetone 又は無水 alcohol の固定を行い、乾燥後直ちに反応液に投じたが、反応は全くみられなかった。

以上の様に固定によつて活性が殆んど消失する事は tellurite 又は tetrazolium 塩を還元する物質が極めて不安定である事を示し、これが酵素作用によるとしても、一般の加水分解酵素が概ね acetone, alcohol 固定によつて活性を保持するのに比し、更に不安定なものである。

ii) 温度の影響：

(a) 一般に内元性活性は熱に対する抵抗性が極めて弱い。即ち、50°C、15分加熱では若干活性が残るが、60°C 15分で完全に消失する、この事は他の研究者によつても同様の成績が報告されている。Wachstein ('49)¹⁴⁾、Rutenburg 等 ('50)¹¹⁾ は組織片を煮沸水に入れて活性を失う事、Gunz ('49)³²⁾ は yeast が 60°C 10分3回で完全に活性を消失する事、更に50°C で不活性化する事¹²⁾、菩提寺 ('56)⁴³⁾ は 60°C 5分で皮下組織の細胞が還元能を失う事を報じている。以上、加熱の方法に若干の疑問を残すものもあるが、一般に 50~60°C 以上の熱によつて容易に反応の消失する事は、この還元反応が酵素作用による可能性を強くする。

(b) 低温処理の影響：4°C の氷室保存では24時間後でも可成りの活性を保持している。凍結処理による影響としては、pH 7.4 の反応液で作用せしめる時には10分間凍結によつて著しく活性は減弱し、30分で殆んど完全に反応は消失するが、pH 8.5 の液では腎臓、肝臓の様な活性度の高い臓器では30分処理でも尙可成りの活性を示す。これは特定の脱水素酵素の研究

の場合に、その特異性に関連して充分注意しなければならない。又、新鮮標本を凍結切片にする事によつて、その内元性活性を著しく減弱せしめる事が出来るが、この場合に切片の厚さが問題になる事は多数の学者の認めるところである。Rutenburg 等 ('50~'53)^{11)~13)} によれば、切片でも腎、肝、時に小腸に活性がみられ、30~40 μ の厚さでは内元性活性が残り、8 μ ではコハク酸脱水素酵素の活性も消失する。Shelton & Schneider ('52)⁴²⁾ は 30~70 μ で薄い着色が一樣におこることを認め、Padykula ('52)⁴⁴⁾、Wattenberg ('54)⁵¹⁾、Pearson ('54)⁵²⁾、('55)⁵³⁾、('58)⁶⁴⁾ は cryostat を使用して薄切切片としてコハク酸脱水素酵素その他の特定の脱水素酵素の証明に良好な成績を得ている。

iii) 各種イオンの影響

Ca, Mg, Al, Co, Cd, Mn 等、何れも反応に特別な影響を与えなかつた。Schneider & Potter ('43)⁷¹⁾ によればコハク酸脱水素酵素に Ca 及び Al が必要で、cytochrome 系は Al を必要とする。又 Swingle 等 ('42)⁷²⁾ は Ca が malate を oxaloacetate に分解するに必要なところの Co I の分解を促進し、oxaloacetate の産出を防ぐと推論し、又、Keilin & Hartree ('49)⁷³⁾ は Ca 及び Al がコハク酸脱水素酵素系自身を activate すると考えている。Shelton ('56)⁷⁴⁾ は組織 homogenate の研究で、Ca 及び Al は特に tetrazolium の還元力を上昇せしめない事を報告している。組織化学的には Padykula ('52)⁴⁴⁾ はコハク酸脱水素酵素の研究で、腎臓の皮質と髓質との間の移行部が Ca 及び Al の添加によつて強く賦活される事を認めている。又、Farber 等^{61)~63)} は TPN-diaphorase の証明に MnCl₂ を加えている。これは malate の分解を促進するとの根拠からである。

これらの報告にも拘らず、内元性活性ではこの種 ion の影響は少い。

iv) 内元性脱水素酵素反応の分布及び基質用物質添加の影響

a. 肉眼的所見：白鼠、廿日鼠共に、検討した3種の臓器では、腎臓に於いて最も活性強

く、肝臓がこれにつぎ、心臓は遙かに弱い。即ち、反応開始後5分で腎には薄い着色がみられ15分後では腎臓で相当顕著に黒色 (Te) 又は赤紫色 (NT) の着色を認め、肝臓でも漸く着色が著しいが、心臓では未だ明確でない。その後次第に色が濃くなり、1時間後には腎臓では殆んど全体に着色するが、皮質及び髓質の一部に特に強くみられる。肝臓でも略々全体に強い着色を認めるが、心臓では前2者に比して遙かに薄い。Rutenburg 等 ('50)¹¹⁾ の BT を使用しての報告によれば、内元性活性の強度は概ね次の様な順序になる。即ち、腎臓に於いて最も強く、以下、肝、副腎皮質、甲状腺、脳、唾液腺、卵巣、骨骼筋、皮膚、脾、心、腸、肺、胃及び睪丸の順である。

次に脱水素酵素の基質となり得る様な種々の物質を添加して反応せしめたところ、対照群でも上記の様に強い反応を示すので肉眼的な比較は困難であるが、コハク酸、乳酸等で比較的早期から着色がみられたところから、反応が促進されたと解釈される。しかし、反応の弱い心臓に於いて他の腎、肝以上に反応が増強された様な所見は認められなかった。これらは Kun ('51)²⁰⁾、Pearson ('54)⁶²⁾ 等の所見と一致するところがある。その他 Gunz ('29)²²⁾ は yeast の抽出液について種々の糖類を加えた結果、glucose, galactose, mannose その他の添加によつて TTC の還元が促進され、dulcitol, inositol 等では促進されなかったと報告した。Shelton & Schneider ('52)⁴²⁾ は少々厚い切片について、コハク酸を添加すれば反応が促進されるが、乳酸、hypoxanthine では効果を認めなかった。又 Fried & Zweifach ('55)⁷⁶⁾ の報告によれば、腸間膜その他の血管に於ける NT の還元が mannose によつて可成り促進される。

b. 顕微鏡所見：凍結切片による顕微鏡所見では、腎臓に於ては proximal convoluted tubules に中等度陽性、distal convoluted tubules 及び Henle 氏係蹄の上行脚と思われる部に特に強い陽性を認め、これらの所見は Shelton & Schneider ('52)⁴²⁾、Wachstein

('55)¹⁵⁾ の所見に略々一致するが、その他腎小体の Bowman 氏囊外葉にも中等度陽性、糸球体にも時に弱陽性、乳頭集合管にも弱陽性で、先端部では少々強い。

各種基質を入れた場合、概ね対照と同一の分布を示し、特に反応が増強された所見は明確でない。唯、乳酸等の場合、乳頭集合管特に先端部附近で Te の沈着が強い。

腎臓に於ける特定の脱水素酵素の分布としては、コハク酸脱水素酵素は著者の実験、Seligman 等 ('51 及 53)^{12) 13)}、Padykula ('52)⁴⁴⁾、Wachstein ('55)¹⁵⁾ 等によれば、proximal convoluted tubules (特にその proximal portion)、distal convoluted tubules、Henle 氏上行脚等が特に強い様で、皮質と髓質の移行部の proximal convoluted tubules と Henle 氏係蹄を含む部で反応少々弱く、又、髓質の乳頭三角部に移行する部に於いて急に活性が弱まり明確に区別がつけられる。集合管は陰性又は弱陽性、腎小体は陰性である。次に Farber 等 ('54)⁶¹⁾ ('56)⁶³⁾ による diaphorase の分布はコハク酸脱水素酵素と比較して最も特徴的な点として、DPN で乳頭集合管が全部強く染り、TPN ではその先端部のみで強陽性であり、その他外髓質の Henle 氏上行脚は DPN ではコハク酸脱水素酵素と同様に強陽性であるが、TPN では弱い。一方、下行脚の薄い部では TPN で強く染り、糸球体でも TPN の反応が強陽性である。その他、血管内皮、間質等の反応も認めている。又、Pearson & Defendi ('54)⁶²⁾ によると、 α -glycerophosphate dehydrogenase の分布は Henle 氏下行脚、distal convoluted tubules 等に強陽性であり、proximal convoluted tubules や Henle 氏上行脚等は弱陽性、集合管は陰性である。

これら特定の脱水素酵素と内元性活性の分布とを比較してみるに、概ねコハク酸脱水素酵素の分布に平行する様であるが、コハク酸を入れた為に特に反応が増強されたと考えられる様な所見はなく、又、乳頭部や腎小体の所見はむしろ diaphorase に類似する。乳酸添加の場合等に乳頭部の反応が強調されたのは、恐らく

DPN-diaphorase の作用が強く現われた為であろう。しかし、上述の Farber 等の所見と完全に併行するわけではない。又、 α -glycerophosphate dehydrogenase の分布とも平行しない。このことは sod. glycerophosphate の添加の場合でも同様である。市販のこの試薬は主として β 型であるが、 α も含まれ、又、Lovern('55)⁷⁶⁾ によれば、 α - 及び β - 型は中間にリン酸の遊離をおこすことなしに可逆性に移動し、alkali 側では $\alpha \rightarrow \beta$ 、酸性側では $\beta \rightarrow \alpha$ の傾向を持つていと云われ、著者の実験でも Pearson 等の所見に近い成績を得る事が期待されたが、Henle 氏下行脚は何れも強陽性とはならなかつた。

これらの所見を比較検討してみるに、既知の方法による単一の酵素の作用とは考え難く、そこに異つた機構の存在を考えざるを得ないのである。

次に肝臓に於ける分布としては、腎臓の場合よりも液の透過が悪く、結果は一定しないが、概ね小葉の周辺性及び一部中心性に存在し、中間帯は陰性の様である。然し乍ら、これは液の透過が管内性に行われ易い事も併せ考えて、これを以て直ちに活性度の判定を行う事は危険であり、尙今後の検討を要する。基質添加による特別の所見は認められない。心臓に於ても特別の所見を得られなかつた。

v) 各種阻害剤の影響

tetrazolium 塩の還元は一般に無酸素的条件下に於いて強くおこり、酸素は阻害的に働く事が認められている (Seligman 等 ('51,'53)¹²⁾ 13), Brodie & Gots('51)²⁵⁾, Shelton & Schneider('52)⁴²⁾。Padykula('52)⁴⁴⁾ は反応液を煮沸して酸素を除き、更に pyrogallol を通して酸素を除いた窒素ガスを通し乍ら反応させている。一方 Pearson & Defendi('54)⁵²⁾, Wachstein('49)¹⁴⁾ ('55)¹⁵⁾ 等の様に有酸素的に行つてゐる者も少なくなく、著者はすべての実験を特に液を煮沸することなく行つた。KCN, NaN_3 , As_2O_3 等は各種 oxidase の作用を阻害し、monoiodoacetate は alcohol (酵母), triosephosphate 脱水素酵素等に対して低濃度でも強く阻

害し、その阻害はそれらの蛋白担体に働く。又 monoiodoacetate は aldehyde mutase も阻害する。NaF は adenylypyrophosphatase その他の各種 phosphatase 作用を阻害する (坂口・植村 ('49)⁷⁷⁾。Krebs('35)⁷⁸⁾ によれば、cyanide, azide, malonate の 0.001 M が腎臓の酸素消費を50%阻害する事を述べている。又、malonic acid はコハク酸脱水素酵素の阻害剤として有名である。DNP は oxidative phosphorylation を特異的に阻害し、又、脂肪酸の酸化に当つて sparker の作用を阻害して脂肪酸の酸化は誘発されない (Hotchkiss('44)⁷⁹⁾, Green 等 ('49)⁸⁰⁾。

扱て、これら各種阻害剤の作用を試みた結果、monoiodoacetate 0.02M の高濃度で抑制がみられた事は SH 基を活性基として持つ酵素系の関与が考えられるが、その他肉眼的にも顕微鏡的にもはつきりした効果を認めなかつた。Wachstein('49)¹⁴⁾ は SH 試薬で前処置して消失し、0.1% iodoacetate 1時間前処置しても消失する事を報告している。Fred & Knight('49)⁸¹⁾ は Penicillium chrysogenum による TTC の還元を malonic acid, NaN_3 , DNP, NaF, monoiodoacetate が M/100 で何れも阻害作用を示さず、KCN の M/100 は阻害し、M/1000 では反応が遅くなる。又 undecylenic acid は完全に阻止した事を報じ、Rutenburg 等 ('50)¹¹⁾ によれば $2 \times 10^{-3}\text{M}$ NaCN が抑制作用を示し、又、組織 homogenate では 0.1M KCN が完全に阻害し、M/100 NaF, sod.iodoacetate は阻害しない。Gunz('49)²²⁾ は yeast による TTC 還元が、M/90 iodoacetate, KCN NaF, で不活化されず、M/60 iodoacetate で遅くなる事を述べ、Black 等は NaN_3 ('49)²⁷⁾, NaF, malonate, NaN_3 ('51)³³⁾ の作用を正常及び腫瘍組織について検討し、 NaN_3 では或程度の抑制が、NaF は腫瘍組織では正常組織より阻害の程度が少く、反つて TTC の還元を促進する (特に腎の癌) が、その起源を解糖作用に求めているが、決定的でない³²⁾。Fried & Zweifach('55)⁷⁶⁾ によれば mannose による還元作用の促進が Liver VDM, ferritin で著変なく、CN, azide, malonate (何れも 0.001

M) では僅かに抑制を示し, DPN (0.025%) は無効, 還元 glutathione は顕著に抑制作用を示した。

著者の場合, KCN で豚心臓では反つて反応の増強がみられたが, Shelton ('56)⁷⁴⁾ は homogenate による還元が cyanide で軽微な促進を示す事を述べ, Green 等 ('36)⁸¹⁾, ('37)⁸²⁾ は反応産物である焦性葡萄糖, oxaloacetate の様な keto 酸が青酸と cyanhydrine を作つて反応を阻害しない事をのべている。その外, KCN 自身が還元作用を持つ事も考慮しなければならない。

何れにせよ, これらの成績は諸家の推測する如く, 内元性活性がコハク酸脱水素酵素, その他の単一な脱水素酵素によるものではなく, 多くの酵素が tellurite や tetrazolium 塩の還元に関与している事を暗示している。

3. 内元性脱水素酵素反応の機序について

内元性活性の機構は, 前述の諸家の報告及び著者の実験に示された様に, それが①予め50°C以上に加熱すれば活性を失う事, ②formalinその他の固定剤で活性を失う事, ③組織内の還元作用を持つ sulfhydryl, enol, α -ketol, α -aldol の様な物質は pH 9 以下では殆んど tetrazolium 塩を還元しない事等から, その大部分が酵素作用による事は明らかである。しかも多くの加水分解酵素等は acetone 固定等でもよく活性を保持するのに対して, 本反応は容易に消失する事や, 凍結・融解によつても著しく活性が減弱し, 更に凍結切片にする事によつて時には殆んど消失する様な事実から極めて不安定な酵素系と考えられる。而して, tellurite 又は tetrazolium 塩が水素受容体として働くところから, その酵素系は当然酸化還元に関与する酵素系である。

既に1947年 Mattson⁷⁾ は種々の動植物を使つての TTC の還元から, これが Co I 或いは Co II を必要とする脱水素酵素系によるものであらうと推論している。Straus ('48)⁹⁾ は人の腫瘍細胞での還元能はその増加した解糖作用によつて強調されると述べているが, 一方 Gunz

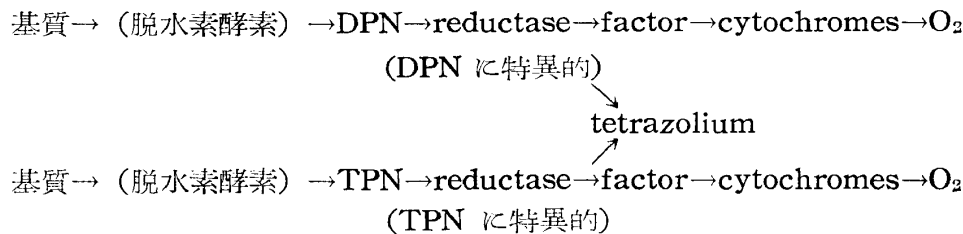
('49)²²⁾ は酵母を使つての実験で, その酸酵作用とは無関係にでも TTC を還元する事を報告している。Kun & Abood ('49)¹⁰⁾ が生化学的にコハク酸脱水素酵素が TTC を還元する事を示して以来, 内元性活性の中に於ても特定の酵素を特に強調しようとする傾向がみられ, Rutenburg 等 ('50)¹¹⁾ は組織 homogenate でコハク酸では tetrazolium 塩を還元し得るが, リンゴ酸, 乳酸では Co I を加える事が必要で, 又, cysteine脱水素酵素もこの還元に関与する可能性を示した。ついで Jensen ('51)⁸⁴⁾ は Corn embryo について, 酸化還元電位の立場から, TTC の持つ -0.08 volt より高い電位の succinate/fumarate, glutamate/ α -ketoglutarate の系は着色を示さず, それより低位の malate/oxaloacetate 以下10種余りの脱水素酵素系は着色を示す事を報告した。然し, これについてはその結論を支持するに足るだけの実験成績が示されていない。又, 以上の報告は何れも夫々の脱水素酵素によつて直接 tetrazolium の還元が行われたものであるか, 或いは何等かのこれらに結合している還元酵素系によつて間接的に還元されたものか明らかにしていない。

Bielig 等 ('49)²³⁾ は各種細菌による TTC の還元作用では flavine 酵素, 特に恐らく diaphorase が直接の electrone donor であらうと推定した。Kuhn ('50)⁸⁵⁾ も TTC の還元は還元型 DPN が diaphorase で酸化される事によつて起ると報告し, ついで Brodie & Gots ('51, '52)^{25) 26)} も flavine 酵素が直接の electrone donor である事を示した。即ち, 酵母その他から抽出した結晶の乳酸, alcohol その他の脱水素酵素の研究で, 酵素結晶, その基質及び DPN 又は TPN を添加して反応せしめても TTC 及び NT の還元はおこらないが, これに diaphorase を加えると formazan が形成される事を明らかにした。更にこの酵素は還元 DPN 又は TPN の存在で tetrazolium 塩を還元する事が出来, 更に D-amino acid oxidase が D-amino 酸を基質として NT を還元する事が出来るが, これを透折して得た apo-

enzyme はもはや NT の還元をおこなないが、flavine adenine dinucleotide (FAD) を添加すれば約60%活性を恢復して NT の還元がおこり、しかもこれが添加した FAD の濃度の函数として示される事を明らかにした。この diaphorase と amino acid oxidase との関係は Warburg & Christian ('39)^{87) 88)} や Straub 等 ('39)^{87) 88)} の研究で、所謂心臓筋肉からの diaphorase が FAD を有する flavine 酵素であり、且、この FAD が D-amino acid oxidase の助酵素である事が判つている。同様に Shelton & Schneider ('52)⁴¹⁾ も結晶乳酸脱水素酵素を精製し、これのみでは勿論、DPN を加えても tetrazolium の還元はおこらず、又、還元型 DPN を基質として乳酸脱水素酵素

を作用せしめても還元はみられない。唯、肝の **homogenate** を加えると **formazan** の形成がおこり、結局、**DPN-cytochrome C reductase** がこの系の **tetrazolium** の還元に必要な事を明らかにし、**xanthine oxidase** についても同様な検討を行つた。

Farber, Sternberg & Dunlap ('54~'56)
⁶¹⁻⁶³⁾ は乳酸, リンゴ酸等の DPN 結合の脱水素酵素群や TPN 結合の脱水素酵素群の組織化学的研究で, これらの tetrazolium 還元反応が各基質に特異性があるのではなくて, DPN-及び TPN-diaphorase に特異的であつて, 腎臓に於いてコハク酸脱水素酵素とは夫々その分布を異にする事を明らかにし, その還元機構を次の様な模式図で示した。



以上、諸家の報告を通覧すると、何れも **te-trazalium** の還元には **flavoproteine** 乃至は **flavine** 酵素が極めて重要な役割を演じていると考える点に一致している。特に **Farber** 等の研究以来 **diaphorase** の役割が内元性活性の重要な部分として注目されてはいるが、これらも決して内元性活性のすべてとは云い難い。著者の実験に於いて、腎臓における内元性活性の分布は必ずしも **Farber** 等の両 **diaphorase** のそれとは一致しないで、コハク酸脱水素酵素の分布との中間的な像を与える。

その他の flavine 酵素として、D-amino acid, xanthine, hypoxanthine oxidase 等についても、これらが直接内元性活性に主役を占めると云う根拠はない。又、monoamine oxidase も tetrazolium や tellurite を還元する可能性があるが、Glennner 等 ('57)⁸⁹⁻⁹¹⁾ によれば、indol carboxyl compound を介して diaphorase 型の系がその electrone の移送に参与している様である。尙 diaphorase の生化学的意義等については更に第 2 篇において触れる事

にする。

扱て、上述の flavine 酵素及び Co I, Co II を助酵素とするところの pyridine 酵素以外に重要な酸化還元酵素として、cytochrome, cytochrome oxidase を必要とする群がある。コハク酸脱水素酵素はその代表的なもので、 α -glycero 燐酸, oxyglutal 酸（筋肉）の脱水素酵素等も含まれる。これらはその助酵素と蛋白担体とが緊密に結合して解離し難いといわれ

(Adler 等⁹²⁾), その化学構造も多く不明である。コハク酸脱水素酵素については, 近年 Singer & Kearney ('54~'55)^{93) 94)} は組織の acetone 粉末から溶性のコハク酸脱水素酵素を抽出し, 鉄を含む flavoproteine の如く見えたと報告していることは注目すべきである。従つて本酵素が flavine 酵素の中に分類されるものであるか否かの論議はさておいて, Seligman 以来, 本酵素が tetrazolium を還元する事はよく知られて居るが, Farber 等 ('56)⁶³⁾ はこの特異性に若干の疑問を提示した。即ち, この酵素系の組成が完全に判つて居らず, Slater³⁾, 95

-97) の示した「factor」の問題もあり、コハク酸脱水素酵素の組織化学的方法と云われるものはその酵素と併行して反応するところの伝達系の反応であり、単に “succinic dehydrogenase system” 染色と云う様に名付けるべきだとしている。

何れにせよ、内元性活性に本酵素系の関与が充分考えられる。近年小田 ('58)¹⁷⁾ は廿日鼠肝の homogenate を主とする実験で、コハク酸を基質とする場合、極めて高度の tetrazolium 還元反応が現われる事を明らかにしている。更に彼は各種阻害剤を用いて反応を解析した結果、この系において、その還元反応の約35%は cytochrome b 乃至 c₁ の反応に共転し、15%がコハク酸脱水素酵素そのものの反応、残る50%は更に高位の cytochrome oxidase の反応に共転したものであると報告している。彼はその実験で、内元性活性が非常に低い値である事を示しているが、この homogenate による成績はその儘新鮮組織塊を用いる場合には適用出来ない。即ち、その操作によつて不安定な酵素系の活性が消失し、比較的安定なコハク酸脱水素酵素等の活性が主として現われる可能性が強いからである。著者の実験でも、内元性活性が腎、肝に強く現われるが、①元来コハク酸脱水素酵素活性の特に強い心臓において内元性活性が余り強くないし、コハク酸を添加しても余り反応が促進されなかつた事② malonic 酸を入れてもこの反応は特別に抑制されなかつた事③腎臓における組織化学的分布について該脱水素酵素のそれとは必ずしも一致しなかつた事、等の事実から、現在著者の問題にしている内元性活性が主としてコハク酸脱水素酵素活性の表現であるとは考えられない。小田の示す様にその系の中での還元反応でも 50%は cytochrome oxidase による事も注目しなければならない。

この様に考えて来る時、現在の組織化学的手法の段階では組織の内元性活性に関与する特異的な酵素系を決定する事は困難である。

扱て、ここで注目すべき事として Green の cyclophorase がある。即ち、生化学の分野において、古くから多数の学者によつて各種酵素

が抽出、精製され、in vitro で分解、合成両面に亘つて再現される様な努力が払われて来たが、一定の数の酵素、化学薬品で生体内の複雑な物質代謝の実験を再現する事は不可能であつて、生体内における酵素の実際の動きを外部から窺うには余りに困難な条件が多過ぎた。1948年 Green²⁾ は pH, 操作時間等独特の条件のもとに低温で組織を処理する事により、細胞内における有機的な酵素の結合単位を可及的に他の不活性な細胞構成物質から切り離して、同時に比較的体内の酵素の特性を保持している標準を作る事に成功した。これは我国でも早石教授によつて紹介されている⁹⁸⁾。ここにその概要をみれば、例えば腎臓からの標品で通常5分以上 blender で処理すると活性は殆んど 0 となり、0°C で 2～3 時間安定であるが、1 晩 0°C に放置するとその酸素消費量は約50%に低下する。然し、冷凍、乾燥 M/10 以上の高浸透圧溶液、有機溶媒、蒸留水、pH 4.0 以下、又は 10以上の環境等は容易に cyclophorase 作用を消失せしめる。Green 等はこの標品によつてクエン酸廻路の酸化²⁾、脂肪酸の酸化⁹⁹⁻¹⁰¹⁾、アミノ酸の酸化¹⁰²⁻¹⁰⁵⁾、更にこれに関連して酸化の燐酸化の問題^{80) 106, 107)}、flavine 酵素の問題^{108, 109)} 等広範囲に亘る物質代謝、特に酸化機構を追求した。これらの一連の研究を通じて要約される事は、生体内のこれら酵素は助酵素と結合して存在し、主に糸粒体に存在するが、生細胞が破壊され、或いは人為的作用を蒙ると次第に独特の構造を失つて個々の酵素が分離し、独立した分子となる為に溶性酵素に変換され、助酵素も亦脱落するために生体外にとり出された酵素は助酵素の添加を必要とする様になる。即ち結合型 (conjugated form) が解離型 (dissociated form) に移行する。この事は Still & Kaplan ('50)¹¹⁰⁾ の報告にもみられる。即ち、兎の肝、腎を常法により処理した際、沈渣及び上清の諸酵素の分布では、不溶性酵素として従来扱われている α -ketoglutaric 酸やコハク酸々々化酵素 (彼等は dehydrogenase と云う言葉を使わずに、oxidase と云う言葉を使っている) は主としてその沈渣に、溶性酵素は主に上清に

分布している。例えば乳酸脱水素酵素は S_1K (腎の第1回遠心沈澱で得られた沈渣) では結合型と遊離型が混在し、前者は反応をおこさしめるに DPN の添加を必要とせず、至適 pH 7~7.5 であるが、後者は DPN を必要とし、至適 pH は 9~9.5 である (この事は著者の実験で凍結融解後、pH 8.5 にあげれば、反応が尙可成りみられた事と併せ考え興味深い)。尙、これらの事は Green 等の第10¹⁰⁸⁾、11報¹⁰⁹⁾ にも詳しく報告されている。かくして cyclophorase 標品中の酵素と従来抽出精製された酵素の性状に著しい差がみられ、時には基質が同じでも恰も全く異つた別種の酵素の如く見える場合もある。その例として、上述の乳酸、リンゴ酸、クエン酸その他の pyridine 酵素は、従来の方法で抽出精製されたものの多くは DPN 或いは TPN の添加を必要とするものであるが、cyclophorase においては DPN, TPN を必要とせず、これを加えると反つて阻害される事がある (Huennekens & Green)¹⁰⁸⁾。又、低温での成熟 (aged at 0°C for some hours), 凍結融解, 蒸溜水, 高張塩類溶液, DNP, 亜硫酸塩, acetone, alcohol 等による処理によつて、助酵素を必要としなかつた上述の各種酵素が DPN 又は TPN を要求する様になり、これらの処理によつて結合型から解離型に変換したと考られる (Huennekens & Green)¹⁰⁹⁾。その他あらゆる種類の酸化酵素について従来の酵素標品とは著しく異つた性状を示し、抽出された酵素の性格と、実際生体内におけるそれら酵素との隔りが指摘された。

ここで再び組織化学に目を転じて考えるに、内元性活性として現われる新鮮組織塊の性格は Green 等の cyclophorase preparation 以上に生体の反応に近いものであり、従来行われた凍結切片、或いは homogenate によつて示される種々の性質は云わば変換 (transform) されたものである。従つてそれで示される種々の条件をもとの内元性活性に当てはめて考える事自体が既に問題である。組織の凍結・融解によつて内元性活性が著しく減弱する事も cyclophorase のそれに通ずるところがある。従つて

種々の操作によつて比較的「変換」の少いコハク酸或いは diaphorase の様な酵素の性格は組織化学的にも把握され、それらの性格が強調されても、それが新鮮組織の反応の大部分を占めているとは云い難い。又、ここで考慮すべき事として、存在する酵素の量と、現われる活性との問題である。市川 ('56)⁹⁸⁾ は tetrazolium による脱水素酵素反応の研究で、特定の基質の添加を必要としない酵素と云う意味で、diaphorase の意義を特に重視し、内元性活性の解釈にこの酵素の存在を強調しているが、例えば、氏の解釈によれば (文献 (98) の p142), 表の第4群 (原著の表の第4群は基質の有る場合陽性となつてゐるが、恐らく陰性の誤植であろう) は基質の有無に拘らず反応陰性の場合で、これは脱水素反応が存在していない事を意味するが、だからと云つて脱水素酵素が存在しないと云う事にはならない。著者の実験において、心臓の反応は一般に極めて弱い。然し乍ら、実際には diaphorase もコハク酸脱水素酵素も極めて豊富に存在する。即ち、酵素そのものは多量に存在するが与えられた実験条件では脱水素反応が充分に行われないと云うだけの事で、事実一定の条件で行えば何れも極めて強く反応陽性となる。即ち、組織における酵素の有無と脱水素酵素反応の有無とは切り離して考えねばならない。唯、組織塊を使用する反応は、少くとも切片或いは homogenate による反応等よりも生体における実際の反応と条件に近い事は確かであろう。かくして、著者の実験は、内元性活性に対する具体的な酵素系に関しては何ら積極的な成績を与えるものではなかつた。然し内元性活性には組織化学的によく知られているコハク酸脱水素酵素や diaphorase も勿論関与しているのであるが、現在の段階では、分離された幾つかの酵素系の反応と見ないで、統合された生体内の酸化還元機能の動的な一つの断面の表現と考えるべきで、凍結或いは homogenate 等の操作を加えた後に現われるものはそこに些かの変異を考えねばならない。この意味で、いろいろの場合に組織化学的に組織塊における内元性活性を追求するのは有意義である

う。又、この場合、特定の基質となり得る様な物質を反応液に入れて、それをその儘特定の脱水素酵素の反応と考える如きは戒められなければならない。例えば Foraker, Denham その他¹¹²⁻¹¹⁶⁾ の一連の実験は何れも新鮮組織塊を使用し、反応液にコハク酸を加えて、而もその一部には「コハク酸脱水素酵素活性」と名付けている。或いは Wattenberg ('55)¹¹⁷⁾ が新鮮切片を使用して基質に乳酸その他を加えてそれぞれの脱水素酵素の名を与えているが如き、何れもその組織化学的特異性を無視したものと云わねばならない。

尙、最後にこの内元性活性の細胞内分布については、主として原形質に見られ、核には殆んど出ない。Hogeboom 等('46~'50)¹¹⁸⁻¹²⁴⁾ は細胞内の種々の構成成分を分割遠心沈澱によつて分別し、一定の酵素が形態学的な単位、即ち糸粒体に結合して居り、cyclophorase もこれが形態学的には糸粒体である事を明らかにし、Harman ('50)^{125) 126)}, Still & Kaplan ('50)¹¹⁰⁾ も同様に糸粒体に主眼をおいている。Wachsstein ('50)¹²⁷⁾ は正常並びに病的の血球と骨髓細胞での NT 還元について研究したが、Janusgreen B による糸粒体染色と、NT の還元とは逆の関係が認められた。即ち、成熟した顆粒細胞は糸粒体が殆んど認められないのに NT の還元力は最も強く現われたと報告している事を紹介するに止めて、今回はこれらの問題に触れない事にする。

結 論

脱水素酵素の組織化学的研究について歴史的に概観して考察を加え、その特異性と関連して最も重要な問題である所謂内元性活性について多角的な検討を加えた。即ち neotetrazolium chloride (NT) 及び potassium tellurite を

水素受容体として使用し、白鼠、廿日鼠の腎、肝、心臓及び一部牛の心臓について、厚さ 2~3mm 以下の新鮮組織塊を用いて種々の条件下におけるこれらの還元反応を調べた。その結果、次の様な結論を得た。

1. NT は組織への透過が悪く適当でない。tellurite は鋭敏度において稍々劣るが、透過が遙かに良好で、この目的には tellurite の方がすぐれている。

2. 本還元反応は10% formalin, acetone, alcohol 等の固定剤で容易に反応消失し、又、熱に対しても極めて抵抗が弱い。又、凍結・融解処理によつて著しく活性を減弱するが、pH 8.5 では腎、肝において尚可成りの還元反応を示す。

3. Ca その他各種 ion, コハク酸その他の各種酵素の基質となり得る物質, KCN, malon 酸その他の阻害剤等による影響について、肉眼的及び凍結切片による顕微鏡的観察を行つたが、若干の時間的、量的の変化は認めるものの、特定の酵素作用に帰着すべき所見は得られなかつた。

4. 以上の所見を総合して、新鮮組織塊における内元性活性は主として酸化還元系の酵素作用によるものであり、組織化学的によく知られている diaphorase, コハク酸脱水素酵素等もこれに関与して居るのであろうが、Green 等の cyclophorase の概念も併せ考えて、分離された幾つかの酵素系の反応とはみないで、生体内の統合された酸化還元機能の動的な一断面の表現と考えるべきである。この場合、一定の基質を添加して反応せしめても、その結果を直ちに特定の脱水素酵素作用に帰着せしめるのは誤りである。

(文献は後出)