

【154】

氏 名	大 川 欣 一 おお かわ きん いち
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	論 医 博 第 303 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 6 月 21 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	HISTOCHEMICAL STUDIES ON THE LIPID REQUIREMENT FOR THE OXIDATIVE ENZYME ACTIVITIES (酸化酵素類の脂質要求性に関する組織化学的研究)
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

酸化酵素類及び脱水素酵素類を組織化学的に証明する場合、新鮮未固定組織切片が一般に用いられており、冷純アセトン固定、軟パラフィン（融点 $48^{\circ}\text{C}\sim 52^{\circ}\text{C}$ ）包埋操作に耐えうる場合でも $5\mu\sim 7\mu$ の厚さの切片を脱パラフィンするとこれらの酵素活性が失われ、組織化学的には証明できなくなることが知られている。しかし、組織学的な切片標本作製操作によって酸化酵素類及び脱水素酵素類の活性が減弱ないしは消失する真の原因については知られていない。著者は純アセトン固定、軟パラフィン包埋組織切片について、組織片の固定及び包埋操作と切片の脱パラフィン操作のそれぞれがこれらの酵素活性に対して及ぼす影響を比較検討し、さらに、純アセトン及び90%水性アセトンなどによる切片の前処理及び Sudan Black B による脂質染色法などによって、組織学的標本作製操作の際に酸化酵素類及び腐水素酵素類の活性が減弱ないしは消失するのは組織細胞内構造の磷脂質が溶解抽出されるためであることを明らかにし、磷脂質がこれらの酵素活性発現に重要なものであることを明確にした。さらに19種類の酸化酵素及び脱水素酵素類について酵素活性と磷脂質との関連性について検討し、ミトコンドリアに局在しているとされているチトクローム酸化酵素、コハク酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素、 β -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、 α -グリセロリン酸脱水素酵素及びコリン脱水素酵素などが特に磷脂質と密接な関連性をもっていることを明らかにした。これらの酵素類は純アセトン固定、軟パラフィン包埋切片をキシロールで脱パラフィンした後に純アセトンを通して水洗して酵素反応を行わせる場合には、組織細胞構造内の磷脂質がある程度溶解されているにもかかわらず、基質液中に0.5%~1.0%のレシチン、ケファリン、セリンケファリン及びフォスファチヂールイノシトールなどの磷脂質を 0.05 ml~0.3 ml 加えるか、 C_6Q_6 及び C_6Q_{10} の 0.1%~0.5% アセトン溶液を 0.05 ml~0.3 ml 加えるかまたは 0.5%~1.0% β -リポ蛋白質を 0.05 ml~0.3 ml 加えることによって組織化学的な酵素反応が認められるようになる。すなわち、これらの酵素活性は組織細胞構造内の磷脂質が溶解抽出されると失われるが、磷脂質を加えると失われていた酵素活性が再び回復することが明らかにされ

た。さらに、組織切片をフォスホリパーゼA、フォスホリパーゼC及びフォスホリパーゼDそれぞれによって前処理して組織細胞構造内の磷脂質分子をそれぞれ相当する部位で加水分解することによってフォスホリパーゼAがチトクローム酸化酵素、DPNH ジアフォラーゼ、TPNH ジアフォラーゼ、コハク酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素などの活性を著しく減少させるかまたはほとんど消失させるが、フォスホリパーゼC及びフォスホリパーゼDの阻害作用は極めて微弱であるかまたはほとんどないことから、磷脂質分子の脂肪酸部分が酵素活性発現のために重要であることを明らかにした。以上のごとく酵素の脂質要求性を基礎として、チトクローム酸化酵素、DPNH ジアフォラーゼ、TPNH ジアフォラーゼ、コハク酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、 β -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素およびグルタミン酸脱水素酵素などのために新しい組織化学的証明法を確立した。この新しい方法ではテトラゾリウム塩の非特異的還元反応が pH 9.3 附近に至るまで認められないので在来の方法に比較して優れていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

通常の組織化学的切片標本作製操作によると、酸化酵素および脱水素酵素はその活性を失ない組織化学的に証明し得なくなるが、著者は2種類の酵素を対象として、組織学的操作が酵素活性におよぼす影響を比較検討し、これらの酵素が組織学的操作により活性を失なうのは、組織細胞内の磷脂質が有機溶媒によって溶解抽出されるためであることを明らかにした。さらに、19種類の酸化酵素および脱水素酵素を対象として、冷アセトン固定、軟パラフィン包埋切片においても、基質液中にレシチン、ケファリンおよびその他2種類の磷脂質、Co Q 類などを添加すれば主として糸粒体に局在している酵素類は活性を回復して組織化学的に証明しうるようになることを明らかにし、固定切片における新しい証明法を述べている。さらに、磷脂質を必要とする酵素と組織細胞内の微細構造との関連性について論議し、フォスホリパーゼA, C, Dの3種類の酵素で組織切片を前処理した場合の酵素活性の消長を比較検討し、グリセリンの α および β の位置に結合する脂肪酸部分が磷脂質分子の機能上重要な意義を有することを述べた。

本研究は組織化学の基礎的重要研究で医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。