

脳質コリンエステラーゼ活性分布に関する 組織化学的研究

〔第1篇〕脳質コリンエステラーゼ活性分布検索法の 検討と正常活性分布

京都大学結核研究所小児特異性研究部（指導 教授 佐川一郎）

木 口 尙 好

（昭和34年6月30日受付）

〔内 容 抄 録〕

神経組織の新陳代謝に重要な意義を有するコリンエステラーゼ（ChE）—特に脳質におけるその活性分布に就いて観察するため、その検索法として Koelle & Friedenwald 氏変法, Koelle 氏改良法, Gomori 氏法等を比較し、ついで正常動物の脳質 ChE 活性分布を家兎, モルモット, ラットに就いて検索した。結果は次の通りである。

- 1) 脳質における ChE 活性分布はほとんどすべては特異的 ChE であつて非特異的 ChE は僅かである。
- 2) 検索操作法としては貼布法が良い。
- 3) Koelle 氏改良法が最も検出率が良いが、全 ChE 検索には Koelle & Friedenwald 氏変法の使用が必要である。
- 4) 組織片の凍結度は小指頭大の組織片が僅かに凍結し少し融けかけたところが最適である。
- 5) 動物としては家兎及びモルモットに比してラットの脳質 ChE 活性は幾分強いようである。
- 6) 全 ChE, 特異的 ChE とともに同様な分布を示し、灰白質部に多く、白質部は極めて少ない。
- 7) 神経核、殊に尾状核部で高い ChE 分布を認める。
- 8) 非特異的 ChE は大脳皮質部にて分布が少ない。

1 緒 言

アセチルコリン（A ch）が薬理学、生理生化学上、重要な意義をもっていることは述べるまでもない。A ch に関する研究の進歩は、生体組織の機能を考える上に大きな貢献をなし

とげている。特に神経学領域においての研究は活潑である。アドレナリン性の交感神経節後線維以外の、神経系の伝達機能を体液伝達学説で説明しようとするには A ch の作用を論拠とせざるを得ない。

生体内での A ch 合成系は一般代謝、殊に含水炭素及び脂肪代謝と密接に結びついていると考えられ、SH 基を作用基とする助酵素の力をかりて、コリンを A ch に合成する反応を媒介する酵素が、コリンアセチラーゼ（Ch A）であり、A ch をコリンと醋酸とに分解する酵素がコリンエステラーゼ（Ch E）である。A ch は Ch E によつて水解されて、その生理学的作用が失われてしまう。Ch E には特異的 Ch E と、非特異的 Ch E とがある。

特異的 Ch E は A Ch が稀薄なときに活性値は最大となり、非特異的 Ch E は A ch の濃度の高いところで最大値を示すといわれる。

A ch の神経系における生理作用の解明に当り A ch 分解酵素 ChE が1925年 Abderhalden & Paffrath¹⁾ により証明せられ、A ch の研究と表裏一体となつて研究されてきている。A ch は生物学的に極めて重要な物質であるが、化学的に不安定なるため、比較的安定な Ch E が化学的神経伝導の研究方法として A ch に劣らず利用され Nachmansohn ら²⁾³⁾ の広範な研究をもたらしたのである。

Ch E の組織化学的検索法についても1920年以降いろいろの研究と多大の努力が払われてき

たが、1941年 Glick⁴⁾ は高級脂肪酸のカルシウム、バリウム、コバルトなどの塩類が Ch E により特異的に分解されることから細胞化学的应用の可能性を論じ、Gomori⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾ は高級脂肪酸エステルを用いる Ch E の組織化学的検索法を発表し、1950年 Hard&Peterson⁹⁾¹⁰⁾ は Gomori 法により、イヌの神経組織内Ch E を検索した。また特異的 Ch E および非特異的 Ch E の比較研究のために A ch 類似物質の合成が盛んに行われ、1943年 Mendel & Rudney¹¹⁾ は Acetyl-B-methylcholin, Benzoylcholin に対する特異的 ChE および非特異的 Ch E の性状について述べている。1938年 Renshaw¹²⁾ により合成された Acetylthiocholin は1948年 Friedenwald らにより Ch E の組織化学的検索法に用いられた。

本物質は特異的 Ch E, 非特異的 Ch E の両者により速やかに分解せられるので相互の鑑別はできないが Ch E 全体としての組織化学的証明を行うことができる。また anti Ch E の研究により、1946年 Hawkins & Gunte¹³⁾, 1949年 Hawkins & Mendel¹⁴⁾ の neostigmin 類似物質の発表、1948年 Adrian¹⁵⁾ の Diisopropyl fluorophosphate (DFP) の発表など多数の anti Ch E が発見せられ、非特異的

Ch E の作用を完全に抑制することが可能となり Ch E 研究の発展に寄与した。さらに Ch E の組織化学的鑑別のために Koelle & Friedenwald¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾ は抗 Ch E 剤を利用し, Acetylthiocholin (Athch), Acetyl-B-methylcholin, Benzolcholin, Butylrythiocholin, Isovalerylthiocholin などに関する検索に DFP を加えて特異的 Ch E および非特異的 Ch E の組織化学的検索法を発表し、1951年 Koelle¹⁹⁾ はさらに前法の不備な点を改良した Ch E の組織化学的検索法を発表している。

私は Athch および Gomori 法の基質の一つである Myristoylcholin を用い Koelle 及び Koelle & Friedenwald の Acetylthiocholin 法及び Gomori 法によつて動物の脳組織 Ch E 活性分布状態に就いて追試する機会を得たので、Athch 法の操作そのものについて検討し、その実験結果について報告する。

2 組織化学的検索法

前述のごとく Ch E の組織化学的検索法は最近いちじるしい発達をとげた。現在までに報告されている Ch E の組織化学的検索法は第1表に示すごとくで、そのうち Koelle 改良法

第1表 コリンエステラーゼの組織化学的検索法

1. Koelle 改良法	)	Acetyl- & Butyrylthiocholin
2. Koelle & Friedenwald 変法		
3. Gomori 法—高級脂肪酸 Cholinester 法		
4. Ravin, Tsou & Seligman 法—Azo 色素結合法		
5. Indoxyl 法		
註:		
1. の方法では特異的及び非特異的 Cholinesterase が		
2. の方法では全及び特異的, 非特異的 Cholinesterase が		
3. の方法では非特異的 Cholinesterase を主として, 全及び特異的 Cholinesterase が		
4. の方法では非特異的 Cholinesterase と共に全及び特異的 Cholinesterase, 非特異的 Esterase が		
5. の方法では全 Cholinesterases と非特異的 Esterase が検出される。		

と Koelle & Friedenwald 変法は同種類のものである、大体4種類である。このうち主として用いられるのは Gomori 氏法および Koelle 氏法である。

1) 原 理

Ch E の組織化学的検索法の原理は「Ch E 自体の直接的証明でなく、Ch E により分解せられた基質の分解産物に沈澱呈色反応を起さ

せる間接的証明法」である。この原理からも明らかなように Ch E 検索法は、基質の選択と Ch E および組織構成要素の保存から成り立つ。

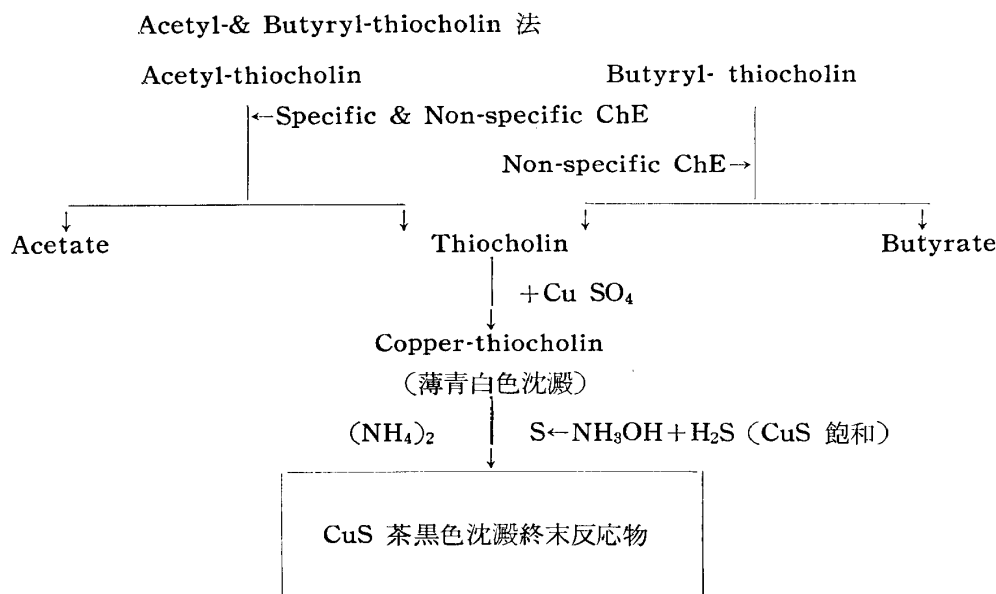
(1) 基質の選択。特異的 Ch E および非特異的 Ch E に対する基質の選択には A ch を主体として、acetyl 基を変換することと結合のかわりに S を導入することで行われている。

(2) Ch E および組織要素の保存。酵素作用保存のためには組織は生であることが必要である。非特異的 Ch E の検出には有機固定液の使用が可能である。

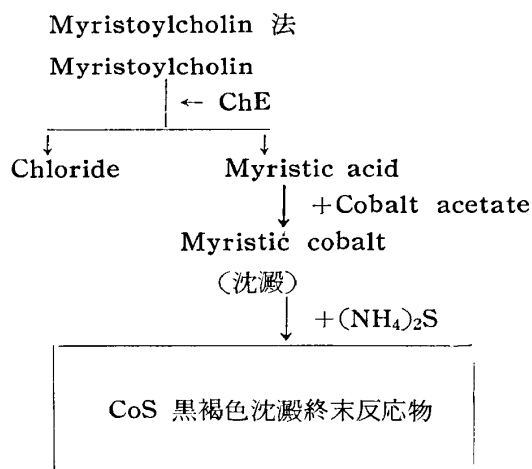
(3) 化学反応型式。Koelle & Friedenwald

の Athch 法では特異的 Ch E および非特異的 Ch E の証明には基質としてそれぞれ Athch, Butyrylthiocholin (Buthch) が用いられ、その基本的化学反応様式は第2表に示す通りである。Gomori は高級脂肪酸 Choline-ster を基質とした Ch E 検索法を発表し、その Myristoylcholin 法の反応様式は第3表に示す通りで、新鮮切片あるいは Formalin 等の固定標本ともに大部分は非特異的 Ch E を表現する。Ravin, Tsou-Seligman の Azo 色素結合法²⁰⁾の化学反応型式は第4表に示すごとくであり、これも非特異的 Ch E を検出する。

第2表 コリンエステラーゼの組織化学的検索法の原理 化学反応型式(1)



第3表 コリンエステラーゼの組織化学的検索法の原理 化学反応型式(2)



2) Ch E の阻害剤について

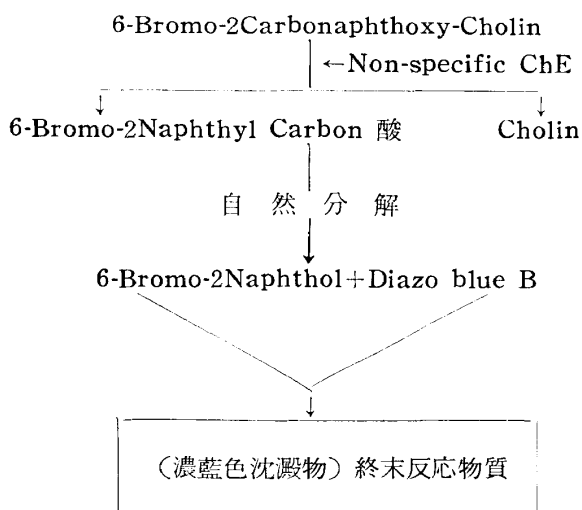
Ch E の酵素作用の分析は組織化学の領域においてもきわめて重要な問題であり、その分析には基質および阻害剤を用いることによりおこない得る。その関係は第5表、第6表のごとくである。

上述のごとく各種 Ch E の検索法が相ついで発表され、基質及び阻害剤の組合せから Ch E を Esterase 群よりわけて組織化学的に検出することができるようになるとともに、特異的、非特異的 Ch E をほぼ完全に分離検索し得るようになった。

しかしながらこれら 4 種の検索法のうち特異的 Ch E の検索法としては Koelle の Athch 法が、非特異的 Ch E の検索法としては But-hch を用いる Koelle の方法および高級脂肪

第 4 表 コリンエステラーゼの組織化学的検索法の原理 化学反応型式 (3)

Azo 色素結合法



第 5 表 コリンエステラーゼの組織化学的検索法の原理 分解能

酵 素	基 質
非特異的 Esterase	分 解 α -Naphthyl acetate Acetyl-thiocholin θ -Acetyl-indoxyl 非分解 Myristoylcholin
全 Cholinesterase	分 解 α -Naphthyl acetate Acetyl-thiocholin θ -Acetyl-indoxyl Myristoyl cholin
非特異的 Cholinesterase	分 解 α -Naphthyl acetate Acetyl-thiocholin Myristoylcholin Butyryl-thiocholin
特異的 Cholinesterase	分 解 α -Naphthyl acetate Acetyl-thiocholin Myristoylcholin Acetyl- β -methylcholin 非分解 Butyryl-thiocholin

第 6 表 コリンエステラーゼの組織化学的検索法の原理 阻害剤

酵 素	基 質	阻 害 剤
非特異的 Esterase	α -Naphthyl acetate Acetyl-thiocholin	Eserin 10^{-4} M Taurocholate 5×10^{-3} M
全 Ch E	α -Naphthyl acetate	Eserin $10^{-6} \times 2$ M
非特異的 Ch E	Acetyl-thiocholin	DFP 10^{-6} M Nu 683 10^{-8} M Nu 1250 10^{-5} M
特異的 Ch E	Acetyl-thiocholin	DFP 10^{-5} M Nu 638 10^{-4} M Nu 1250 10^{-8} M

酸の Cholinester を用いる Gomori の方法が適当であると考えられている。

3 実 験 方 法

Ch E の組織化学的検索法についての詳細な説明紹介はすでに豊田²¹⁻²⁴⁾・岡本²⁵⁾ 他が発表しているのでここでは簡単に説明する。私は Koelle 改良法で特異的 Ch E を、Koelle & Friedenwald 変法で全 Ch E および特異的 Ch E を、Gomori の方法で非特異的 Ch E を検索した。

1) 組織切片の作製

脳質における Ch E の活性分布の検索のため家兎、モルモット、ラッテを用いた。家兎は耳静脈内空気注射、モルモット、ラッテはエーテル麻酔あるいは全採血法により死亡させて、直ちに脳、脊髄を適出し実験に供した。適出した脳脊髄は常温生理食塩水で軽く且つ短時間洗滌し、直ちに Sartorius 凍結 Mikrotom で $20 \sim 30 \mu$ の厚さに切り、電気冷蔵庫で冷却した蒸溜水中に浮遊させ一部は大型デッキガラス

に自然に乾燥，密着貼付し，一部は電気冷蔵庫内で乾燥密着させて貼付し，反応液ならびにその後の操作を実施し，又，一部は固定の前までデッキガラスに貼付せず，浮游法により反応操作を行つた。更に切片とせず残つた組織片は冷アセトン中に投入し冷蔵庫内に置き固定して Gomori 法の検索材料とした。

2) 反応試薬およびその調製

(1) Koelle 改良法

第1液

グリココール	3.75 g
結晶硫酸銅($\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	2.50 g
溜水	100 cc

第2液

マレイン酸ソーダ	9.60 g
1 N 苛性カリ	52.2 cc
溜水	100 cc

第3液

40%硫酸ソーダ水溶液 (38°C, PH=6.0)

第4液

9.52%塩化マグネシウム水溶液

第5液

アセチルチオコリン原液: Athch iodid 23 mg, 溜水 1.2 cc, 0.1 M CuSO_4 0.4 cc を加え振盪遠沈濾過する。

チオコリン銅 (Cu-thch)

Athch 29 mg, 溜水 1.0 cc, 0.1 M CuSO_4 0.6 cc を加え振盪遠沈濾過後 1 cc の蒸溜水で2度洗滌し濾液に加える。これに 0.1 M Cu SO_4 1 cc およびグリココール 苛性カリ液 (Glycin 1.88 g, 1N-K OH 2 cc, 溜水50cc) 1 cc を加え, 1 N K OH で PH=9~10 とし沈澱を生ぜしめ遠沈し Cu-th ch の沈澱をとる。

上記各試薬を第7表の通り調製し基質液を作る。

第7表 反応基質液の調整法(1)

Koelle 改良法

酵素	試薬	試 薬 混 合 比					
		Cu-gly.	H_2O	Mal.	Na_2SO_4	Mg Cl_2	Cu th ch
		I		II	III	IV	V
特異的 Ch E		0.6	2.1	1.5	9.0	0.6	微量
対 照		0.4	1.4	1.0	6.0	0.4	微量

(2) Koelle & Friedenwald 法

グリココール 苛性カリ液

グリココール	1.88 g
1N 苛性カリ水溶液	2 cc
溜水	50 cc

0.1 M 硫酸銅水溶液

0.2 M 第1 磷酸カリウム ($\text{KH}_2 \text{PO}_4$) 水溶液

0.2 M 第2 磷酸ソーダ ($\text{Na}_2 \text{H PO}_4$) 水溶液
10⁻⁵ D F P 水溶液

私は 0.1 %D F P 注射液を使用前30分以内に溜水で 10⁻⁵ M になるよう稀釈した。

アセチルチオコリン原液

沃化アセチルチオコリン	29 mg
溜水	1.5 cc
0.1 M 硫酸銅水溶液	0.5 cc

遠沈濾過する。

チオコリン銅

調製法は Koelle 改良法と同じ。

上記各試薬を基として作る基質液および洗滌液は第8表の通りである

(3) Gomori 法

第1液

1/10 M トリス (ヒドロキシメチル) —アミノメタン—マレイン 酸塩緩衝液—PH=7.5~7.7 100cc

第8表 反応基質液洗滌液調製法 (2)

Koelle & Friedenwald 変法

酵素	試薬	試 薬 混 合 比					
		H ₂ O	Gly.-KOH	Cu SO ₄	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	DFP
			I	II	III	IV	V
全 Ch E		3.8	0.2	0.2	3.5	1.5	—
特異的 Ch E		2.8	0.2	0.2	3.5	1.5	1.0
洗 滌 液		19.2	0.8	—	16.0	4.0	—

0.1 M 醋酸コバルト水溶液 50 cc
 塩化カルシウム 1 mg
 塩化マグネシウム 1 mg
 塩化マンガン 1 mg
 溜水 300 cc
 樟脳 微量

第2液

0.02 M ミリストイルコリンエステル水溶液。微量の樟脳を加える。

上記試薬による基質液の調製は第9表の通りである。

第9表 基質液の調製法 (3)

Gomori 法

酵素	試薬	試 薬 混 合 比	
		Buffer et.	Myristoylcholin
		I	II
非特異的 Ch E		50.0	1.0

3) Ch E 標本の作製

(1) Koelle 改良法

i) 凍結法により作つたデッキガラス上の切片はつぎの前操作液に30分間浸ける。

{ 10⁻⁶M D F P 液 1.5 cc
 40%硫酸ソーダ液 9.0 cc
 溜水 4.5 cc

この 10⁻⁶M D F P 液も 0.1 % D F P 注射液を希釈して調製した。

ii) 切片を基質液に移すまで次の液に 30~35°C で浸漬。

{ 40%硫酸ソーダ水溶液 9.0 cc
 溜水 6.0 cc

iii) 切片を基質液中に入れ、37°C で30分前後浸漬する。なお基質液は Cu th ch までは第7表のごとく順次各試薬を加え、38°C に15分以上保ち、使用前に A th ch を加え、濾過後使用する。

iv) チオコリン銅飽和20%硫酸ソーダ水溶液で5分間以上洗滌。

v) チオコリン銅飽和10%硫酸ソーダ水溶液で1分間洗滌。

vi) チオコリン銅飽和水で1分間洗滌。

vii) 硫化銅飽和多硫化アンモニウム稀釈液中に20秒浸漬。

私は硫化アンモン液を冷蔵庫内に保存し、使用時にこの液を25倍に稀釈し、0.1 M 硫酸銅水溶液約 2 cc を加え、濾過後使用した。

viii) 水洗—浮游法によつたものはここでデッキガラスに貼付した。

ix) 硫化銅飽和10%中性ホルマリンで固定。

x) 硫化銅飽和アルコールにて脱水。

xi) 硫化銅飽和キシロールにて透徹。

xii) カナダバルサムにて封入。

(2) Koelle & Friedenwald 法

a) 全コリンエステラーゼ

i) 凍結法により作つたデッキガラス上の切片を基質液 (第8表 Total Ch E) 中に投入し、37°Cで15~60分間浸漬。

なお基質液は Na₂PO₄ までは第8表のごとく加え、少量の Cu th ch を加えて十分に混和し少なくとも15分間 37°C~38°C に保温し、

濾過し、直ちに A th ch を加え用いる。

ii) 切片を洗滌液 (第8表) 中に少なくとも5分間浸漬し過剰の硫酸銅を除去する。

iii) 硫化銅飽和多硫化アンモニウム液中に20秒間入れる。切片は茶黒色に変色する。

iv) 水洗

v) 硫化銅飽和水により充分洗滌。

vi) 浮游法によつたものはここでデッキガラスに貼付。

vii) 10%中性ホルマリンで固定。

viii) 上昇アルコールにて脱水。

ix) キシロールで透徹。

x) バルサムにて封入。

b) 特異的コリンエステラーゼ

i) 凍結切片作製後切片を基質液 (第8表特異的 Ch E) 中に入れ、38°C で30分間浸漬。

ii) 以下の操作は全 Ch E と同様に行う。

(3) Gomori 法 一部は凍結切片作製後基質液へ。一部は

i) 材料を冷アセトンで12~24時間固定。

ii) 室温のアセトンで12~24時間固定。

iii) 組織片を冷アルコール・エーテル中に移し1~3時間浸漬。

iv) 4%セロイジン液中に組織片を入れ、冷蔵庫内で12時間浸漬。

v) 組織片を冷クロロホルム中に1時間ずつ2回浸漬—計2時間。

vi) パラフィン包埋、切片作製。

vii) 切片を基質液 (第9表) 中に投入し、37°C で2~24時間浸漬。なお基質液は第1液を37°C~40°C に加温し、これに第2液を加える。

viii) 2分間水洗。

ix) 多硫化アンモニウム稀釈液に切片を入れる。私は2分間浸漬した。

x) 水洗。

xi) 後染色。

xii) 上昇アルコール脱水

xiii) キシロールで透徹。

xiv) バルサム封入。

第10表 脳コリンエステラーゼ活性分布

モルモット

	No.	大脳皮質	大脳髄質	尾状核	小脳皮質
特異的 Ch E	S 1	++	+	+++	++
	S 2	+	+	+++	++
全 Ch E	A 1	++	+	+++	++
	A 2	+	+	+++	++
非特異的 Ch E	N 1	±	—	—	—
	N 2	—	—	—	—

家 兎

	No.	大脳皮質	大脳髄質	尾状核	小脳皮質
特異的 Ch E	R	+	±	+++	++
	B	±	±	++	+
非特異的 Ch E	Y	±	—	—	—
	W	—	—	—	—

ラ ッ テ

	No.	大脳皮質	大脳髄質	尾状核	大脳脚部	橋部	小脳皮質
特異的 Ch E	T 1	++	+	+++	++	++	++
	T 2	+	+	+++	++	+	+
	T 3	++	+	+++	+++	++	++
	T 4	++	+	+++	+++	++	+++
全 Ch E	Z 1	++	+	+++	++	++	++
	Z 2	+	+	+++	++	+	+
	Z 3	++	+	+++	+++	++	++
	Z 4	++	+	+++	+++	++	+++
非特異的 Ch E	H 1	±	—	—	—	—	—
	H 2	±	—	—	—	—	—

上記 Ch E 検索法を用い正常家兎、ラ ッ テ、モルモットの脳につき Ch E 活性分布を検討した。Ch E 活性の検索は全、特異的および非特異的 Ch E に分別した。また対照標本群にはまったく Ch E 活性を示す終末反応は認めなかつた。検索した各部位は大脳皮質 (皮質部、髄質部) 小脳皮質、尾状核、大脳脚部、橋部である。

成績の概要は第10表に示す通りで、更にこれらの部位における Ch E の分布について説明する。

モルモット及びラ ッ テにおける全 Ch E

4 実 験 成 績

1) 大脳皮質

大脳皮質部は一般に Ch E 活性は比較的弱く肉眼的には皮質および髄質の区別のできる程度で大脳皮質の各層を区別することはできない。

弱拡大顕微鏡所見では表在層には Ch E の分布は少なくほとんど陰性である。外顆粒層, 外錐体細胞層, 内顆粒層, 内錐体細胞層等における Ch E 分布は各層ともに大部分神経細胞に分布し細胞間にも微弱な硫化銅反応を認める。

強拡大顕微鏡所見では上記各層における各種神経細胞による Ch E 分布は少なく, 各層細胞間の Ch E 分布にいちじるしい差異を認めず, 各層における Ch E 分布の差異は細胞数に左右されている。

つぎに髄質部における Ch E の分布はあまり大きなものでなく, 一部線維状に分布している。

2) 尾状核部

尾状核部における Ch E の分布はほかの部分に比し極めて大で大脳皮質よりも著るしく多い。肉眼的にも大なる Ch E の存在を認める。

弱拡大所見では極めて強い Ch E の分布を示す細胞を Ch E 活性を示す網状組織上に認め, 毛細血管内皮細胞にも弱い Ch E の分布を認める。神経線維にも弱い Ch E の分布を認める。

強拡大所見では神経細胞の Ch E 分布は細胞によりかなり差異があり原形質が明らかなものほどその分布が大である。Glia 細胞の核は極めて強い Ch E 分布を認める。

3) 小 脳

小脳皮質における Ch E の分布は大脳皮質に比べ多い。

肉眼的所見では, Ch E 分布状態により2層に分けることが出来る。外層部は僅かしか Ch E 分布を認めないが, 内層にはかなりの程度に認め, 両層はほぼ皮質の半分ずつを占めている。

弱拡大顕微鏡所見では神経細胞層と顆粒層においては大きな Ch E の分布密度を示し, 分子層には Ch E の分布は少ない。

強拡大顕微鏡所見では分子層は全般にきわめて弱い Ch E の分布を示し散在性の Ch E 分布を認める。

Purkinje 氏細胞層は大きな神経細胞の配列する層で, 顆粒層とは区別できなかった。

顆粒層における Ch E 分布は大で小脳皮質 Ch E 活性の大部分を占めている。特に顆粒細胞原形質中に限局して分布している。

モルモット, ラッテ, 家兎における特異的 Ch E

1) 大脳皮質

所見はほぼ全 Ch E と同様で弱拡大所見ではやや弱い Ch E の分布にまじって強い Ch E 分布を原形質にもつた神経細胞の散在が認められる。強拡大所見では Ch E の分布は比較的まばらで神経細胞に相当する部分に Ch E 活性の強いことが認められる。

2) 尾状核部

この所見も大体全 Ch E と同様であるが, 肉眼的所見においては尾状核部はきわめて大なる Ch E の分布を示している。弱拡大顕微鏡所見では Ch E は主として神経細胞内に分布し, 有髄神経線維にはあまり Ch E の分布は認められない。強拡大顕微鏡所見では, 神経細胞内における Ch E 分布は多く, しかも神経細胞内に分布し, 細胞原形質周辺部に限局していて, 神経細胞核には Ch E 分布は認められず白くぬけてみえる。

3) 小 脳

この所見も全 Ch E と同様で, 小脳皮質は Ch E 分布の強弱より2層に分けられるが, 外層はほとんど Ch E の分布を認めず, 内層は強い分布を認め, 顆粒層の細胞に相当して強い Ch E 活性を認める。

4) 大脳脚部 (ラッテ)

大脳脚部の横断面における Ch E 分布につ

いて説明すると、

肉眼的所見では Ch E 分布は広範囲に認められる。特に高度の分布を示しているのは両側大脳脚部にある黒質部で両側に帯状になつて認められる。また脚間核にもきわめて大きな分布を認める。また中心灰白質の前にかかなり大きな Ch E 分布を示している細胞群がある。左側白質部中央より散在性の点状分布を認める。中心灰白質は分布は少ない。

強拡大顕微鏡所見では、黒質における神経細胞内の Ch E 分布はきわめて大きく、原形質内に均等に存在している。核には全く分布は認められない。さらに黒質内の神経膠細胞および神経線維に分布を認める。他の神経核の分布も同様であるが、細胞外にも網状線維状の分布を認める。しかし全体としては黒質に比し分布は少ない。

そのほか中心灰白質などの諸神経細胞群は Ch E 分布は全般に疎である。

5) 橋 部

橋の横断面における Ch E の分布状態について説明する。

肉眼的所見では Ch E 分布の比較的大なるものは橋核、中心灰白質その他の核の細胞群である。その中でも中心灰白質および橋核に大きな分布を認める。

顕微鏡所見では中心灰白質内に散在性に原形質内に分布を認める。また白質の一部で網状線維状の分布を認める。

橋核における神経細胞内 Ch E の分布は他の核よりも大きな分布を示している。

ラッテ及び家兎、モルモットの非特異的 Ch E

非特異的 Ch E は大脳皮質において僅かに分布を認めるのみで、尾状核部、小脳皮質ともに反応は陰性であつた。

5 総括及び考按

1) 切片の作製について

Ch E の検索には本酵素の活動性を保存し、同時に酵素の移動を最小限にする方法を用いな

ければならない。本酵素ことに特異的 Ch E は固定法を行なうと、その活性はほとんど消失するので当然凍結法により切片を作らなければならない。私は Sartorius 凍結 Mikrtom を用いて切片を作り、冷却した蒸溜水中に切片を浮遊させ、速やかにデッキガラス上にとり、乾燥により切片を固着させる貼付法と冷蒸溜水に浮遊させたものをそのまま硝子棒で操作する浮游法と2つの方法で実験した。

ここで問題になる諸点について考察してみると、第1は切片を冷蒸溜水に浮遊させることにより、Ch E の移動、組織の破壊のおこることである。この点については Adamston & Tayler²⁶⁾ の用いたドライアイス法すなわちメスおよび作つた切片を凍結させたまま特殊容器を用いてデッキガラス上に切片を貼げる方法は極めて有効であるが、私はメスおよび蒸溜水を予め電気冷蔵庫の冷却装置室内に入れ1時間後に蒸溜水一氷になつている一を冷蔵庫内へ出し、メスはそのまま1時間以上冷却使用前までおき、出して手早く使用した。

第2に私はデッキガラス上の切片を室温に放置し自然乾燥によりガラスに密着せしめる方法²⁰⁾ と電気冷蔵庫内に置く方法をとつたが、乾燥密着とも電気冷蔵庫内の方がデシケーターを用い真空乾燥下で実施する方法には及ばないが自然放置より幾分よいようであつた。

第3の問題は Sartorius Mikrotom ではあまり薄い切片が作れないこと、連続切片を作ることができないことおよび組織片の凍結度が適当でないと綺麗な切片がとれないこと等である。

薄切、連続切片については白木ら²⁷⁾ の液体空気、イソペンタンによる凍結乾燥法の利用は極めて有効であると考え、また Holz, Sommers & Warren²⁸⁾ も切片作製に凍結乾燥法を用いて研究を進めている。組織片の凍結度は繰返し実験を重ねることにより、又季節により場所によつて異なるであろうし、事実、各報告²⁹⁾ をみても凍結の程度を適当にする。と述べているのみで具体的な程度は述べられていないが、私の経験では四季を通じ、小指頭大の組織片が

漸く凍結し少し融けかけたぐらい、実際には凍結させた組織片を指頭で3度位軽く触れて切ると組織の損壊を最少限にし得ると考える。

2) 反応液と標本作製について

反応液を作るための各試薬は純度のよい薬品を用いるほど結果がよいのは当然で、私は総て特級試薬を使用した。Koelle & Friedenwald 法および Koelle の改良法、Gomori 法を通じて容器は生化学的に清浄であることが必要である。

Koelle & Friedenwald 法では硫化アンモニウム水の調製に注意が必要であり、又その新鮮度が問題となる。Koelle 改良法においては Malein 酸ソーダの作製と苛性ソーダ液の pH の調整が問題であるが、Malein 酸ソーダについては Temple³⁰⁾ の報告があり、苛性ソーダは 38°C で pH=6.0 にしなければならず、38°C 以下では苛性ソーダの溶解度は40%に達しない。又一度加温して溶けたものも 38°C 以下になると再結晶して pH が規定できない。私は恒温箱内で正しく 38°C として pH を規定し、更に pH メーターにかけて確かめた。Gomori 法では基質の選択が問題となり、私の使用した Myristoylcholin の他 Lauroylcholin, Palmitoylcholin, Stearoylcholin があるが²⁵⁾、それによつて基質液浸漬時間が異なってくる。Myristoylcholin の場合 2~16時間、6時間位、12~24時間²⁵⁾、4~12時間²³⁾、固定しない場合は 1~4時間²⁵⁾といわれているが、私は固定標本は12~16時間、無固定標本は4~6時間浸漬した。その結果、上記浸漬時間内ではほとんど検索状態に差異を認めなかつた。なお動物により基質を選択すべきであるともいわれる。反応液および洗滌液中における切片は浮游法では切片の破損強く殊に硫化アンモン浸漬時に著しく損壊し完全な標本を作ることが出来ず、硫化アンモン浸漬時間を少し短くして10~15秒にすると結果が充分でない。反応基質液の少いためデッキガラスに貼付して操作する時は、一枚一枚浸漬し、もし二枚以上を同時に浸漬するときは、よほど慎重にしないと互に標本

を傷つける。ことに洗滌液中では静かに標本を動かしながら洗う必要がある。上記の如く、浮游法と貼付法を比較すると、長時間を要する難点はあるが、貼付法の方が完全に近い標本を得ることが出来る。

3) 完成 Ch E 標本について

完成標本像における硫化銅の沈着の分布が正しい Ch E 活性の部位を示しているか、否かの点については Hard & Peterson⁹⁾ は 6-Br-omo-carbonaphthocholin iodid を用いての非特異的 Ch E の検索結果から、Koelle & Friedenwald の Ath ch 法では、Ch E に分解されてできた Cu th ch はほかの部位に移動することを指摘している。私は Hard & Peterson の方法を追試する機会を得ないので、この点について検討することはできない。

しかし Koelle 改良法による実験成績からは Ch E の移動に対して抑制措置がとられているものと考えられる。

Koelle & Friedenwald 法と Koelle 改良法による Ch E の所見は実験成績の項において少し検討したが両者の相違は、前法では Na₂SO₄ により Ch E を沈澱させる操作を行なっていないので Ch E により分解されてできた Cu th ch の移動が認められるという。私の実験では幾分その傾向を認めたが、Koelle 改良法によつたものとの間に大きな差異は認めなかつた。

Koelle 改良法については、動物が異なることにより、少しの差異はあつたが、現在までの諸報告の所見とほとんど一致した所見を示し、実際の分布を比較的正しく示していると考え

る。

4) 大脳皮質における Ch E の分布について

大脳皮質における Ch E の化学的定量については種々検索がおこなわれているが^{29) 31)}、Ch E 分布が小であるから皮質各層の Ch E 分布を区別して検索することは困難である。又組織化学的に検討した系統的研究も少なく1950年 Koelle のネコについての検索¹⁷⁾、1952年 Pope³²⁾ のマウスの大脳皮質における検索、昭和29年

豊田²¹⁾ のイヌの中樞神経系における検索などがある。

人体については1949年, 1952年, Pope, Carveness, Lingston ら³³⁾ の正常人脳, 精神病患者脳についての検索, 昭和32年室³⁴⁾ の人の大脳皮質における Ch E 活性分布の検索があり, 大脳における Ch E の正常分布について十分な検索はおこなわれていない現状では多くの問題が残っていると考える。私は家兎, モルモット, ラッテに就いて Ch E 分布を検索し, 動物により活性の強弱はあるが, ほとんど同様の分布を示す所見を得た。

5) 脳基底核その他の神経核について

脳基底核における Ch E の定量的分布は大脳皮質の数十倍にあたるといわれ, このようなきわめて大きな分布はおそらくこの領域における機能の大小と関係を有すると考えられ, 私の実験成績では脳基底核, 黒質, オリーブ核にはほかの錐体細胞群に比し Ch E 分布はかなり大である。もちろん組織化学的方法是定性的方法で正確に定量することはできないのであるが, Koelle のいうごとく半定量的な価値はあると思われ, 数多くの標本を観察し, その活性分布をみるときは, ある程度定量的にも論じ得るものと考ええる。

6) 非特異的 Ch E について

神経系の Ch E はほとんど特異的 Ch E で, 非特異的 Ch E もある領域には明かにみられるといい³¹⁾, 事実前記室の報告でも人脳における Ch E は特異的 Ch E が主であるが, 非特異的 Ch E も存在すると述べている。検索法としては Ravin らの Azo 結合法³⁴⁾ もあるが, 私は Gomori の方法で Myristoylcholin を基質として使用し, 検索動物も異つているのであるが, その結果ほとんど陽性所見を得なかつた。陰性所見でも Ch E が分布存在していないといえないとされ³⁵⁾, また高松³⁶⁾ のいうごとく動物の種族や組織の種類によつて基質に対する働きが異なり, 見ているものが何であるかを判ずるには慎重であらねばならない。脳質の Ch E 検索に, この方法を捨てすることは出来

ないが, 私の実験結果からは良い成績は得られなかつた。

6 結 論

私は脳組織における Ch E の分布を組織化学的面より検討する目的で Koelle & Friedenwald の方法を追試し, さらに Koelle 改良法につき検討し, Gomori 法も併せ行なつて検索法を最少の設備で良い結果を得るよう操作法を検討し, Koelle 改良法, Koelle & Friedenwald 法, Gomori 法により家兎, モルモット, ラッテの脳組織の活性分布状態を検索した。そして次のような知見を認めた。

- 1) 脳質における Ch E 活性分布はほとんど特異的 Ch E である。
- 2) 検索操作法としては貼付法が良い。
- 3) Koelle 改良法が最も検出率が良いが全 Ch E の検索も必要で, そのためには Koelle & Friedenwald 法を行う必要がある。
- 4) 組織片の凍結度は小指頭大の組織片が漸く凍結し, 少し融けかけたころがよい。
- 5) 動物としてはラッテが家兎およびモルモットに比して脳質 Ch E 活性は幾分強いようである。
- 6) 全 Ch E 特異的 Ch E とも同様な分布を示し, 全般に灰白質部に多く, 白質部には少ない。
- 7) 神経核, 殊に尾状核部で大きい Ch E 分布を認める。
- 8) 非特異的 Ch E は大脳皮質部にて僅かに分布を示す。

本論文の一部要旨は昭和32年度京都大学結核研究所学術講演会において発表した。

稿を終るにのぞみ, 御指導と御校閲いただいた恩師佐川教授に深謝する。また御指導御援助をいただいた研究所諸先生, 御協力願つた稲田雅美君に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Abderhalden, E. & Paffrath, H. : Fermentforschung 8, 299 (1925)
- 2) Nachmansohn, D. : Bull. Soc. Chem. Biol. 21, 761 (1939)

- 3) Nachmansohn, D. & Machado, A. L. : J. Neurophysiol. 6, 397 (1943)
- 4) Glick, D. : J. Biol. Chem. 137, 357 (1941)
- 5) Gomori, G. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Medicine. 58, 362 (1945)
- 6) Gomori, G. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 62, 33 (1946)
- 7) Gomori, G. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 60, 354 (1948)
- 8) Gomori, G. : S. Lub. & Clin. Med. 37, 526 (1951)
- 9) Hard, W. L., Peterson, A. C. & Fox, M. D. : Anat. Record 57, 108 (1950)
- 10) Hard, W. L., Peterson, A. C. & Fox, M. D. : J. Neuro. & Exp. Neurol. 48, 10 (1951)
- 11) Mendel, B. & Rudney, H. : Biochem. J. 37, 59 (1943)
- 12) Renshaw, R.R., Dreisbach, P. F., Ziff, M. & Green, D. : J. Am. Chem. Soc. 60, 1765 (1938)
- 13) Hawkins, R. D. & Gunter, J. M. : Biochem. J. 40, 192 (1946)
- 14) Hawkins, R. D. & Mendel, B. : Biochem. J. 44, 260 (1949)
- 15) Adrion, E.D., Feldberg, E. & Kilby, B. A. : Brit. J. Pharm. 2, 56 (1947)
- 16) Koelle, G. B. & Friedenwald, J. S. : Proc. Soc. Biol. & Med. 70, 617 (1949)
- 17) Koelle, G. B. & Friedenwald, J. S. : J. Pharm. & Exp. Therap. 100, 158 (1950)
- 18) Koelle, G. B. & Friedenwald, J. S. : J. Pharm. & Exp. Therap. 160, 180 (1950)
- 19) Koelle, G. B. : J. Pharm. & Exp. Therap. 103, 153 (1951)
- 20) Ravin, H. A., Tsou, K. C. & Seligman, A. M. : J. Biol. Chem. 191, 843 (1951)
- 21) 豊田正輝 : 日新医学. 40, 559 (昭和28)
- 22) 豊田正輝 : 日新医学. 41, 34 (昭和29)
- 23) 豊田正輝 : 日新医学. 42, 243 (昭和30)
- 24) 豊田正輝 : 日新医学. 42, 302 (昭和30)
- 25) 岡本耕造他 : 顕微鏡の組織化学 P.402 (昭和31)
- 26) Adamstone, F. B. & Tayler, A. B. : Stain. Technol. 23, 109 (1948)
- 27) 白木博次 : 総合臨床. 10, 218 (昭和30)
- 28) Holz, M.S., Sommers, S. C. & Warren, S. : Anat. Record. 112, 177 (1952)
- 29) 吉川政己 : 細胞化学シンポジウム4, 53 (昭和30)
- 30) Temple, J. W. : J. Am. Chem. Soc. 51, 1754 (1929)
- 31) 宇尾野公義 : 総合臨床. 6, 189 (昭和32)
- 32) Pope, A. : J. Neurophysiol. 15, 115 (1952)
- 33) Pope, A., Caveness, W. & Lingstone, K. E. : Arch. Neurol. & Psychiat. 68, 425 (1952)
- 34) 室隆雄 : 日新医学. 44, 223 (昭和32)
- 35) L. リゾン, (今泉正訳) : 組織化学および細胞化学, 理論と方法. P. 461 (1954)
- 36) 高松英雄 : 総合臨床. 4, 1371 (昭和30)

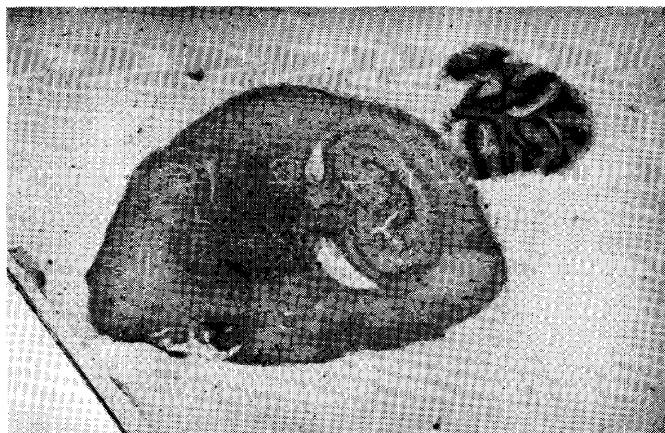


図1 大脳および小脳（ラッテ）矢状断 Ch E 活性分布肉眼的所見

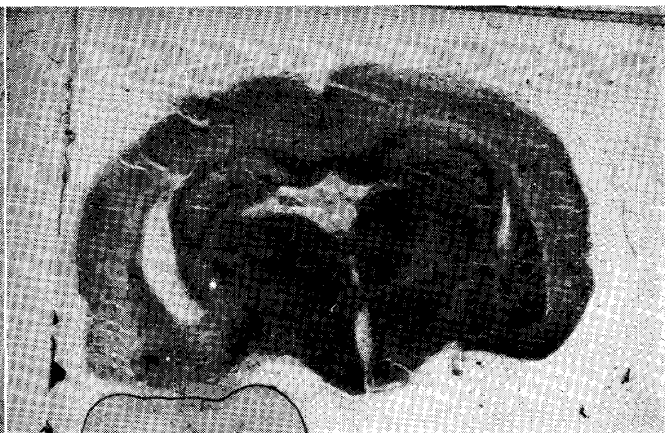


図2 大脳（ラッテ）横断 Ch E 活性分布肉眼的所見

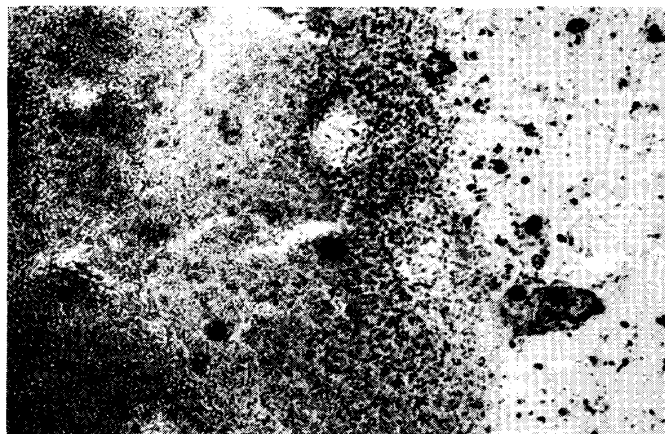


図3 大脳皮質（ラッテ）Ch E 活性分布拡大所見



図4 尾状核（ラッテ）Ch E 活性分布拡大所見

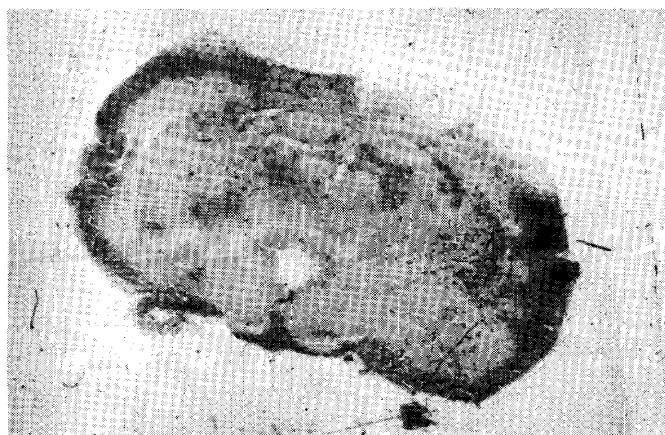


図5 中脳（ラッテ）横断 Ch E 活性分布肉眼的所見



図6 尾状核（モルモット）Ch E 活性分布拡大所見