

結核性肺病巣に於ける脱水素酵素系の組織化学的 並びに生化学的研究, 特に TCA-サイクルを中心として

〔第1篇〕 肺に於ける脱水素酵素系の組織化学的並びに 生化学的検査法の検討

京都大学結核研究所外科療法部 (主任 教授 長石忠三)

生 嶋 宏 彦

(受付 昭和33年8月26日)

目 次

緒 論
第1章 研究材料並びに研究方法
第2章 研究成績綜括並びに考按
第1節 組織切片の作成法の検討
第2節 組織懸濁液の作成法の検討
第3節 各種 tetrazoles 色素の比較
第4節 色素濃度並びに基質濃度の問題
第5節 基質混液中に入れる組織量の問 題
第6節 反応至適 pH の問題

第7節 反応温度並びに反応時間の問題
第8節 反応時に於ける空気との接触如何 による差違
第9節 助酵素添加の問題
第10節 賦活剤添加の問題
第11節 各種有機溶媒の比較
第12節 基質を省いた対照が発色した場合の 検討
結 論

緒 論

結核症に関する基礎的研究は、従来主として病理学的、細菌学的或いは免疫血清学的に行われたものが多く、生化学的、特に酵素化学的研究が行われるようになったのはごく近年のことである。

併し、ここ数年来の肺結核に関する酵素化学的研究をみると、未だ緒に着いたばかりなのにも拘らず、その進歩には実に目覚ましいものがある。

例えば、結核菌の代謝面に就いては、これ等動的な研究により、その本態が更に確められつつある現状であり、各種化学療法剤に就いても菌の物質代謝に対する阻害作用を追究することにより、その作用機作が始めて明らかにされようとしている。^{24) 34) 35) 36)}

又、生体側からするこれ等酵素化学的研究も、近年までは体液或いは排泄物に就いての臨床的研究が主となっていたが、今日では結核性肺病巣の乾酪化機転や、或いは軟化融解機転に

就いてかなり積極的に検討されている。併しながら、本質的な問題に就いては今日尙不明に属する点が多く、今後更に究めるべき広い領域が残されている。^{13) 15) 16) 20) 32) 33)}

特に、人の切除結核肺を対象とし、その病巣に就いて、これを物質代謝の面から系統的に追究した研究は乏しいように思われる。

そこで、著者は我々の研究所で行われつつあるこの方面の研究の一端として本研究を企てた。

周知のように、生体組織に於ける物質代謝の究極は TCA- サイクルにあるが、肺に於いても、その細胞は組織呼吸によつて酸素を消費し、栄養素を酸化して窮極的には CO_2 と H_2O とが生じ、この際遊離されるエネルギーを利用して物理化学的反應を営むものである。これ等の諸反應は、多数の酵素群と酸化還元系との関与により円滑に行われているのであるが、この酸化還元機構を司る重要な酵素の一つに脱水素酵素がある。

生体内での有機化合物の酸化は、通常殆んど凡て脱水素反応を介して行われており、TCA-サイクルに於いても、脱水素反応が要所要所に存在し、それ等が主軸となつて進行している。^{2) 3) 5) 6) 11) 12) 18)}

ここにいう脱水素酵素とは、脱水素反応の際に、被酸化物である基質の水素を易動化する働きを持つものであり、結核性肺病巣では、この脱水素酵素系の円滑な働きが何等かの形で障害されているものと考えられる。

それであるから、若しも結核性肺病巣に於ける脱水素酵素系の異常を、TCA-サイクルを中心として組織化学的並びに生化学的に検討することが可能ならば、肺結核に於ける複雑な病像の一端を明らかにする上に、何等かの緒を見出し得るものではなかろうかと考える。

併しながら、生体に於けるこれ等の基本的な反応は、極めて終局的なものであり、且つ又微生物に於いても高等動物に於いても著しい差違のないものであることから、この代謝系の異常で以つて、直ちに病巣部に於ける生化学的な状態を推論することには、現段階ではかなりの無理があるかと思われる。

それであるから、本研究に当つて著者の目的とするところは、脱水素反応の変動からして直ちに結核性肺病巣の病態を論じようとするのではなく、あくまでも脱水素酵素系の検索を一つの研究手段として、結核肺に於ける物質代謝の扉を開き、将来究めねばならぬ多くの問題の解明に対して、その緒を作ろうとするに過ぎないのである。

以上の考え方に従つて、著者は昭和30年1月以降本研究を行いつつあるが、その間肺に於ける脱水素酵素系の検査法を確立し、結核性肺病巣の各期に於ける酵素活性の変動に就いて検討した結果、結核肺に於ける物質代謝に関連して二、三の興味ある成績を得たので、ここにその大要を報告する次第である。

以下、第1篇では検査法に就いてその至適反応条件を中心として検討し、第2篇では脱水素反応の阻害因子に就いて実験的に検討し、又、第3篇では脱水素酵素の活性度や、その局在性

に就いて経時的に観察し、それ等の諸成績から結核性肺病巣に於けるTCA-サイクルの動態に就いて考察する。

ここで、脱水素酵素に就いての文献をみると、これを組織化学的に検索しようとする試みは、肺外の諸臓器ではかなり古くから行われている。^{1) 4) 9) 14) 19) 21)}

例えば、1935年 Semenoff は²⁹⁾、古典的な Thunberg 法を改良し、メチレンブラウを用い、この色素がコハク酸の存在下で酵素作用により還元脱色されることから、組織切片を用いて一つの脱水素酵素の検出法を考案している。この方法は反応が陽性か陰性かの判定が往々にして困難な為に、現在ではあまり用いられていない。その後、Zweifach 等³⁷⁾は tetrazolium 塩を用いて、コハク酸脱水素酵素の活性部位の証明に成功している。この方法は Seligman & Rutenberg の方法^{23) 28)}にも利用せられ、今日広く行われているものである。その他、テルル酸加里、インドフェノール紫等を用いた諸研究があり、我国に於いても高松等³¹⁾により新しい証明法が考案されているが、それ等の諸方法も亦未だ一般化されていない。

又、Seligman の原法では基質としてコハク酸のみを用いており、コハク酸以外の基質を用いた研究は極めて乏しく、Shelton,³⁰⁾ Dianzani⁷⁾ 等により、又我国では市川¹⁷⁾、沢田^{25) 26) 27)}、高松等³¹⁾によつて二、三の報告が行われているのみである。

これは、コハク酸が古くから知られている脱水素酵素基質であり、その酸化に助酵素を必要とせず、一般に活性が高くて検出が容易であつた為かと思われる。

又、これ等の諸研究は殆んど凡て動物の腎、肝、脾又は心筋等を対象としたものであり、人の諸臓器、特に人の肺に於ける脱水素酵素系に就いて行われたものではない。これは、以上の諸研究が従来主として生物化学者により行われていた関係上、人の新鮮な肺を対象として行うことが困難であつたこと、及び肺なる臓器では酵素量が比較的少なく、在来の方法ではその検出が困難であつたこと等によるものと考えら

れる。

そこで、著者は、人の新鮮な切除肺を容易に入手し得る胸部外科医の立場を活用して、人の極めて新鮮な切除肺に就いて、コハク酸及びTCA-サイクルに關与する数種の基質を用い、結核性肺病巣の脱水素酵素活性の変動に就いて追究しようとした。

併し、前述のように肺を材料としたこの種の研究が従来殆んど行われていなかった關係上、特定の検査法が明らかではなく、やむなく他の臓器に就いて行われていた諸検査法の応用を試みた処、それ等は何れも失敗し、肺なる臓器には不適当なものであることが明らかとなつた。

そこで、著者は種々の反応環境下に於ける至適検査条件に就いて検討し、肺を対象とした場合に於ける脱水素酵素系の検査法を確立しようと試みた。

第1章 研究材料並びに研究方法

研究材料は、健常なマウスの肺及び人の切除肺である。マウスとしては16gm前後の純系マウス（雄雌を問わず）を使用した。

又、臓器の対照としては、健常なマウスの腎を使用した。

マウスでは、撲殺後直ちに肺及び腎を剔出し、可及的に除血してこれを4°Cの氷室に保存し、人の切除肺では、切除後直ちにこれを氷室に入れ、12時間以内に以下の諸研究に使用した。

研究方法としては、主として活性部位の組織化学的検索を行う為に、基本的方法としてSeligmanの原法を応用し、成績に最も影響を及ぼすと考えられる各種の検査条件に就いて詳細に検討すると共に、コハク酸以外の基質に就いても同様に検討した。又、組織切片と共に、組織懸濁液による生化学的定量実験をも併せ行つた。

第2章 研究成績綜括並びに考按

第1節 組織切片の作成法の検討

脱水素酵素は不安定なものである為に、固定、脱水、包埋等の操作により殆んど完全に破壊さ

れてしまうと考へねばならない。従つて、組織切片作成にあつては出来得る限りこれ等の操作を避け細心の注意を必要とする。

Altmanにより考案され、Gershによつて改良された冷凍乾燥法¹⁰⁾は、その目的に適い、この種酵素の組織化学的検索には甚だ有効であるが残念ながら一般化されていない。そこで、Zweifach等³⁷⁾の報告している組織の小片をそのまま基質混液に入れて反応させ、その後ホルマリンで固定、然る後凍結切片とする方法を追試した。その結果、肺のように酵素量の少ない組織では発色の判定がやや困難であるばかりか、組織塊の表面と中心部とでは反応の程度に操作上の誤差が入ることを免れ得ない。そこで種々検討した結果、肺組織を未固定のまま通常の凍結ミクロトームで薄切切片とし、直ちに基質混液に入れて反応させ、その後10%ホルマリンで固定することにより充分觀察にたえ得る標本を作成した。

又、肺組織は他の諸臓器に比較して一般に酵素量は少ないとされている。

凍結ミクロトームにより薄切組織切片を作る場合、このことを考慮に入れなければならない。

組織切片の厚さを15 μ から60 μ までとし、コハク酸を基質としてSeligmanの原法に従い、その発色度を比較した。その結果、15 μ 乃至20 μ では発色度が不明であり、酵素活性部位は漠然とみられ、30 μ では酵素活性部位は判然とし、明らかに紫色を呈した。40 μ 以上の厚さでは、染色効果は良く、従つて酵素活性度は明らかであるが、細部にわたつては明確さを欠き検鏡上不都合と思われる。特別の場合を除き、組織切片の厚さは30 μ が適当と考える。

尙、対照とした腎では、15 μ の切片に於いて既に充分の発色を認めている。

第2節 組織懸濁液の作成法の検討

組織懸濁液を作成するにあつて、肺組織は、他の臓器組織に比べて線維成分が多いことを考慮せねばならない。その為に組織塊をそのまま懸濁液とすることは困難であり、充分な均等懸

濁液は得られない。従つて、前以つて組織を細切細挫し、然る後蒸溜水を加えて10%組織懸濁液を作成した。この方法により全く均等な懸濁液が得られた。

組織ホモジェナイザーは、Potter-Elvehjem のホモジェナイザーを使用した。これは機械的に細胞膜を破壊し、しかも原形質中に含まれている細胞成分を変性又は破壊せず最も適当なホモジェナイザーであると考える。

組織懸濁液を作成する操作は出来得る限り短時間に仕上げなければ、時間の経過と共に酵素活性は低下すると考えねばならない。

第3節 各種 tetrazoles 色素の比較

一般に脱水素酵素の検索に際して用いられている **tetrazoles** 色素は三種ある。即ち、**2,3,5-triphenyltetrazolium** 塩、**neotetrazolium** 塩及び **dimethoxyneotetrazolium** 塩がそれである。この中、**dimethoxyneotetrazolium** 塩は入手出来なかつたので、他の二種の色素に就いて肺組織を材料としてその還元力を比較した。

その成績は第1表の通りである。発色の程度により十から卅までとし、発色を示さないものを一とした。色素は何れも0.1%，基質はすべ

第1表 tetrazoles 色素の還元力の比較

基 質	色 素 組 織	ネオテトラゾリウム塩				トリフェニールテトラゾリウム塩			
		肺	腎	肺	腎	肺	腎	肺	腎
焦性ブドウ酸		卅	卅	+	卅				
クエン酸		一	卅	一	+				
α-ケトグルタル酸		+	卅	±	卅				
コハク酸		卅	卅	卅	卅				
リンゴ酸		±	卅	一	+				
対 照		一	一	一	一				

て0.1M液とし、pH7.6 として基質混液を作り、37°C に於いて2時間作用させた成績である。その結果、発色の程度は Neotetrazolium 塩の方が優れていることを知った。

第4節 色素濃度並びに基質濃度の問題

基質混液中の色素濃度並びに基質濃度が反応成績に及ぼす影響を検討すると第2表の通りである。

これはpHを6.5, 7.5及び8.5とし, 反応時間を2時間として, クエン酸及びコハク酸を基質として行つたものの成績である。

第2表 基質濃度及び色素濃度の影響

[illegible]

これによると、色素濃度はクエン酸を基質とした場合にやや差違がみられるが、コハク酸に於いては殆んど差が認められない。併し、基質濃度に於いては若干その影響がみられ、0.2Mが最も良く反応していることが示されている。

この場合、pH がかなり影響していることが注目される。

第5節 基質混液中に入れる組織量の問題

基質混液中の色素濃度及び基質濃度が反応成績に影響することは前節で述べた。

然らば、検査に供する組織中の脱水素酵素量は一定であり、基質及び色素の量も一定であるとすれば、基質混液量と組織量との比によつても発色度に変化を来すものと考えねばならない。

この両者の量的比に就いて、コハク酸を基質とし、組織切片は 30 μ 、懸濁液は10%としてその成績を比較検討した。

先ず、組織切片では、基質混液の量を20 ccと定め、約 1cm 平方の肺組織凍結切片5枚、10枚、15枚、20枚及び30枚の場合に就き比較した結果、次のような成績を得た。

即ち、15枚以内では発色度は一定である。20枚を入れて作用させた場合には比較的発色度に差違が認められ、30枚では明らかに発色効果は低下している。

組織懸濁液では、懸濁液と基質混液との比は1対2が最も良く、その差が大きくなる程反応は表われてこず、1対1の場合又はそれ以上に懸濁液の量が多い場合は、発色度は不安定であつた。これは反応が充分行われないうえと考える。

第6節 反応至適 pH の問題

肺組織を材料として、試験管内実験に於ける脱水素反応の至適 pH に就き比較検討した。

その成績は第3表の通りである。何れも0.2%色素液、0.2M基質液とし、37°C 2時間の成績である。

これによると、クエン酸は酸性域でのみ反応し、アルカリ性域では全く反応を示しておら

第3表 反応至適 pH

組織	pH 基質	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
肺	焦性ブドウ酸	—	—	±	++	+++	+	—
	クエン酸	++	++	+	—	—	—	—
	α -ケトグルタル酸	—	—	±	+	+++	+	—
	コハク酸	+	++	+++	+++	+++	++	±
	リンゴ酸	±	++	++	±	—	—	—
	対照	—	—	—	—	—	—	—
腎	焦性ブドウ酸	±	+	++	+++	+++	++	++
	クエン酸	++	++	+++	++	+	±	—
	α -ケトグルタル酸	+	+	++	+++	+++	++	++
	コハク酸	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	リンゴ酸	+	+++	+++	++	++	±	—
	対照	—	—	—	—	—	—	—

ず、リンゴ酸に於いてもアルカリ性域では反応していない。焦性ブドウ酸及び α -ケトグルタル酸では、中性域からアルカリ性域にかけて良く反応し、コハク酸に於いては最も反応域が広い。対照の腎の場合は、比較的反応域は広く、一般にアルカリ性域の方が良く反応している。

要するに、この反応は基質混液の pH によつて著しく差違があり、各基質によりそれぞれ異なる反応至適 pH のあることを知つた。

即ち、焦性ブドウ酸8.0、クエン酸6.0~6.5、 α -ケトグルタル酸8.0、コハク酸7.0~8.0及びリンゴ酸は6.5~7.0である。

第7節 反応温度並びに反応時間の問題

tetrazole 還元反応と温度並びに時間の関係に就いて、その影響を検討した。

検討成績は第4表の通りである。

脱水素反応の試験管内実験では、通常37°C 1時間30分乃至2時間で最高に達するとされている。肺に於ける場合は、ややその時間が遅れ2時間乃至3時間を要している。表に示す諸成績は、焦性ブドウ酸、クエン酸及びコハク酸を基質とし、4°Cの氷室、24°C前後の室温、37°Cの孵卵器及び40°Cの恒温槽内に於いて反応させ比較したものである。基質混液は、すべて色素濃度0.2%、基質濃度0.2M、pH はそれぞれ至適 pH としたものを用い、反応時間は、30分

第4表 反応温度並びに反応時間

基質	時間 温度	30分	1時間	2時間	3時間	4時間	6時間
焦性ブドウ酸	4°C	—	—	—	—	—	—
	24°C	—	—	—	±	±	+
	37°C	±	++	++	+++	+++	+++
	40°C	+	++	+++	+++	+++	+++
クエン酸	4°C	—	—	—	—	—	—
	24°C	—	—	—	±	±	±
	37°C	±	+	+	++	++	++
	40°C	+	+	++	++	++	++
コハク酸	4°C	—	—	—	—	—	—
	24°C	—	—	—	±	+	+
	37°C	+	++	+++	+++	+++	+++
	40°C	+	+++	+++	+++	+++	+++
対照	37°C	—	—	—	—	—	—

から6時間までの判定成績である。

その結果、4°Cでは反応は起らず、24°Cでは3時間から軽度ながら発色し、37°Cに於いては2時間乃至3時間で何れも最高に達し、40°Cでは1時間乃至2時間で、既に3時間と同程度の発色を示している。

これ等の成績から、通常37°C孵卵器内で反応させ、成績判定は3時間が適当と考える。

尙、4°C 6時間で発色しなかつたものを、そのまま37°C 孵卵器内に移すと明らかに反応が表れてくることを認め、4°C 6時間に於いてはtetrazolium塩に対する還元能力は低下しないことを知った。

第8節 反応時に於ける空気との接触 如何による差違

Rutenberg は²³⁾、水素受容体を用いての脱水素酵素の検索に際しては、嫌氣的に反応せしめた方が成績が良いと述べている。このことは、空気中の酸素と自働的に反応しformazanの形成が妨げられることを避ける為と思われる。

肺に於ける脱水素反応に就いて、反応中空気との接触如何による差違をみる為に、三種の基質に就いてその成績を検討した。何れも色素濃度0.2%、基質濃度0.2M、pHはそれぞれ至適pHとし、37°C 3時間の判定である。反応容器

はThunberg管を用い、水流ポンプで5分間排気し、可及的に無気状態とした。

その成績は第5表の通りであり、腎の場合は若干差違がみられるが、肺に於いては影響がなく、特に嫌氣的に反応を行わしめる必要を認めなかつた。

第5表 空気との接触の如何による差違

組織 基質 条件	肺				腎			
	クエン酸	コハク酸	リンゴ酸	対照	クエン酸	コハク酸	リンゴ酸	対照
好気性	++	+++	++	—	++	+++	+++	—
嫌気性	++	+++	++	—	++	+++	+++	±

尙、この実験で対照に発色が認められたが、このことに関しては第12節で考察する。

第9節 助酵素添加の問題

著者が対象としている基質の中、コハク酸以外の基質の脱水素反応には、すべて助酵素を必要とする。即ち、焦性ブドウ酸、 α -ケトグルタル酸及びリンゴ酸はdiphosphopyridin nucleotide (以後DPNと略す)を、クエン酸はtriphosphopyridin nucleotide (以後TPNと略す)をそれぞれ助酵素としている。

そこで、試験管内実験に於いて、検査に供する肺組織中に反応に要する最少限の助酵素は存在するものとは考えられるが、特に助酵素の添加を必要とするかどうかを比較検討した。

第6表は助酵素を添加した基質混液と助酵素

第6表 助酵素添加による差違

助酵素 基質	DPN	TPN	対照
焦性ブドウ酸	32.0	—	31.5
クエン酸	—	20.8	20.0
α -ケトグルタル酸	31.0	—	30.7
コハク酸	—	—	42.0
リンゴ酸	22.1	—	20.3
対照	5.5	3.8	0

(単位 μg)

を添加しない基質混液とに就いて、組織懸濁液による発色度を比較したものである。これは、10%組織懸濁液 10 cc 中の formazan の量を示したものであり、助酵素は何れも 1mg/cc のもの 0.1cc を基質混液に加えた。色素液は0.2%，基質液は0.2M, pH は何れも至適 pH とし、37°C 3時間で判定した成績である。

その結果は、助酵素の添加を特に必要としない。この成績は組織切片に於いても同様であった。但し、助酵素の添加によると考えられる若干の差は有意と認める。

尙この場合、対照とした組織にも軽度の発色を認めている。

第10節 賦活剤添加の問題

基質混液中に賦活剤として、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化アルミニウム及び重炭酸ソーダ等を入れることにより、好成績を得るという Rutenberg 等²³⁾の方法を追試した結果、組織切片に於いても、又定量成績に於いても明らかに優れていることを認めた。

尙、Rosa 等²²⁾が基質混液の pH を 8.2 とし、この中に微量のチアミン酸ソーダを入れ好結果を得ると報告しているが、前述の反応至適 pH の問題からして不適当と考え追試を行わなかつた。

第11節 各種有機溶媒の比較

組織懸濁液によつて脱水素反応を行わしめた場合、形成された formazan を有機溶媒に溶かし出し、これを比色定量してその活性度を測定しなければならない。従つて、数種の有機溶媒から、用いる tetrazole に適した溶媒を選定する必要がある。

コハク酸を基質として至適条件の下に反応せしめ、アセトン、エタノール、キシロール、エタノール・アセトン (1:3) 及びエタノール・キシロール (1:3) の5種類の有機溶媒に就いてこの問題を比較検討した。

その成績は第7表に示す通りである。即ち、neotetrazolium 塩に比し、2,3,5-triphenyltetrazolium 塩による方が有機溶媒に対して溶

第7表 有機溶媒の比較

色 素 有機溶媒	ネオテトラゾリウム塩	トリフェニールテトラゾリウム塩
アセトン	溶	易溶
エタノール	難	溶
キシロール	難溶	溶
エタノール・アセトン (1:3)	易溶	易溶
エタノール・キシロール (1:3)	難溶	溶

け易く、有機溶媒としては、エタノール・アセトンが最も優れている。

第12節 基質を省いた対照が発色した場合の検討

以上の諸実験はすべて基質を加えない対照において検討している。この基質を省いた対照が時に発色することを経験した。この事実を、Farber 等⁸⁾が述べている DPN diaphorase 及び TPN diaphorase なる観点から考察してみる。これは、検査に供する組織中にも脱水素酵素と共に微量の脱水素酵素基質と、助酵素としての DPN 又は TPN が存在しているものと思われる。脱水素酵素と基質とにより遊離した水素が、DPN diaphorase 又は TPN diaphorase により DPN 又は TPN に渡され、この還元型 DPN 又は TPN の酸化が直接 tetrazole の還元に関係することから formazan の形成が起り、発色するものと考えられる。即ち、基質を省いた対照が発色する場合は、これ等 diaphorase が、基質を脱水素する反応の外に同程度存在することを考慮せねばならない。又若し、対照が陽性であり、基質に対する反応が陰性である場合があるとすれば、これはこれ等 diaphorase によつて、基質に対する脱水素反応が抑制されているものと考えられる。併しながら、基質を省いた対照が全く発色しない場合のことを考えると、これ等 diaphorase は何れの場合に於いても反応量存在するとは限らない。

又、これ等 diaphorase によつて、基質に対する脱水素反応が抑制されるとすれば、我々が

観察し得る範囲内に於いて、成績が陰性の場合、必ずしも脱水素酵素が存在しないとは言いきれないと思うのである。

これ等の事實は、酵素を対象とする諸研究に於いて、何れの場合にも遭遇する不可避な現象ではあり、将来解決せねばならぬ難問題である。

結 論

健常マウスの肺及び人の切除肺に就いて、Seligman の原法を基本方法として応用し、肺に於ける脱水素酵素系の組織化学的並びに生化学的検査法を、その至適反応条件を中心に検討し以下の結論を得た。

- 1) 新鮮肺組織をそのまま30 μ の凍結切片とし、反応せしめた後ホルマリンで固定する。
- 2) 組織懸濁液の作成は、先ず肺組織を細切細挫し、後10%の懸濁液とする。
- 3) 二種の tetrazoles に就いてその還元力を比較した結果は、neotetrazolium 塩が優れており、有機溶媒に対しては 2,3,5-triphenyl-tetrazolium 塩の方が易溶である。
- 4) 発色度に比較的影響するのは、色素濃度よりもむしろ基質濃度であり、0.2%色素液、0.2M基質液が良く、賦活剤を加えた方が発色が優れている。但しコハク酸以外の場合でも特に助酵素を添加する必要は認めない。
- 5) 基質混液 20cc 中に入れる組織量は、組織切片10枚、懸濁液は 10cc とする。
- 6) 基質混液の pH は、最も重要な検査条件であり、Seligman の原法の如く一律に pH を7.6としては反応が表れないものがある。即ち基質混液作成にあたっては、基質の如何によりその都度 pH を修正し、それぞれ至適 pH としなければならない。

7) 反応至適温度は 37°C であり、反応が最高に達する時間は腎の場合よりもやや遅く 37°C で 2 乃至 3 時間である。

8) 反応時空気との接触の如何による差を比較した結果、対照の腎の場合は若干の影響を認めるが、肺の場合は有意の差が認められない。故に Thunberg 管を用い特に嫌気性状態

で検査を行う必要はない。

9) 組織懸濁液による場合、その有機溶媒はエタノール・アセトン (1:3) が最も優れている。

10) formazan は若干脂質に溶ける為、組織像としてみる場合考慮に入れる必要があるが、脂質に溶けた formazan は事実上橙色を帯びてみられるので判別し得る。但し、標本作成後は直ちに検鏡しなければ、時日の経過と共に正確な判定は損われる。

11) 組織切片の成績と、組織懸濁液の成績は略々一致している。前者の場合は、酵素反応の場を肉眼的に認識し、鑑別し得る利点があるが、可溶性の物質が溶媒の方に拡散したり、基質が充分且つ均一に組織内部に侵入せぬことも考えられ、従つて反応のすべてを表現していると認め難い。これに反し、後者の場合は作用表面が広く、充分に反応せしめることが出来、定量的検討が可能である。

両者を併用して始めて妥当な考察が得られるものとする。

12) 著者が行つた検査法の概略は以下の通りである。

I) 組織化学的検査法

A) 薄切した新鮮肺組織凍結切片を充分血液を洗い流した後、第 8 表に示す基質混液中に入れる。

第 8 表 基質混液

0.2%	色素液	10.0cc
0.2M	基質液	10.0cc
0.2M	磷酸緩衝液	10.0cc
0.33M	塩化カルシウム	0.2cc
0.005M	硫酸マグネシウム	0.2cc
0.6M	重炭酸ソーダ	2.0cc
0.01M	塩化アルミニウム	0.8cc
	蒸溜水	6.8cc

B) 孵卵器内で一定時間反応させる。

C) 切片を取り出し、生理的食塩水でよく洗い、10%ホルマリンで30分固定する。

D) スライドガラス上に伸展して自然乾燥させた後、グリセリンで封入する。

E) 直ちに検鏡する。

II) 生化学定量法

A) 新鮮肺組織を充分血液を洗い流した後、懸濁液とし、基質混液に入れてよく振盪する。

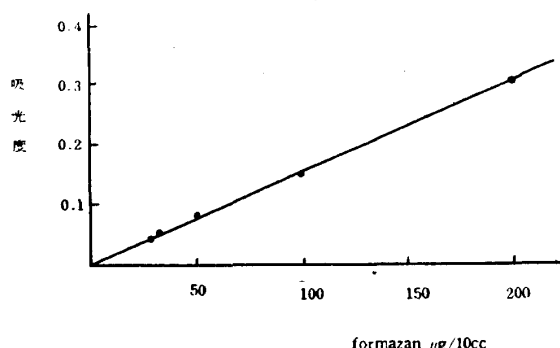
B) 孵卵器内で一定時間反応させる。

C) 軽く遠沈器にかけて管底に残った細胞塊を採る。

D) エタノール・アセトン混液を加え強く振盪し、東洋汙紙 No. 2 を用いて汙過する。

E) 直ちに汙液に就き、光電比色計で以つて 5mm の液槽フィルター S₄₃ を用い、吸光度を読み、予め作成してある第9表に示す標準グラフにより formazan の μg 量を求める。

第9表 標準グラフ



文 献

- 1) Antopol et al: The use of neotetrazolium as a tool in the study of active cell processes, Tr. New York Acad. Sc., 12 : 156, 1950
- 2) 新井恒人他: TCA-サイクルの病理学的研究, 日病理会誌, 43 : 194, 1954
- 3) Bradfield : The localization of enzymes in cells, Biol. Rev., 25: 113, 1950
- 4) Brodie : The effects of an isolated dehydrogenase enzyme and flavoprotein on the reduction of triphenyltetrazolium chloride, Science, 114 : 40, 1952
- 5) Burns et al : The organelle nature of a cell granule from a thermophilic bacterium, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82: 411, 1953
- 6) Davis et al: A cytochemical investigation of the mitochondria of three strains of Salmonella typhosa. J. Histo. Cytochem., 1 : 123, 1953

- 7) Dianzani : Histochemical detection with ditetrazolium chloride of some enzymatic activities in isolated mitochondria, Nature, 172 : 125, 1953
- 8) Farber et al : Cytochemical technique of DPN-, TPN-diaphorase, Proc. Sci. Exp. Biol. & Med., 86 : 534, 1954
- 9) Foraker et al : Neotetrazolium in determination of succinic dehydrogenase activity in the ovary, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80 : 132, 1952
- 10) Gersh : The Altman technique for fixation by drying while freezing, Anat. Rec., 53 : 309, 1932
- 11) Green : Enzymes and trace substances, Adv. Enzymol., 1 : 177, 1941
- 12) Green : The cyclophorase complex of enzymes, Biol. Rev., 26 : 410, 1951
- 13) 服部正次: 肺結核病変の組織発生に関する組織化学的研究, (1~2), 結核, 29 : 70, 1953
- 14) 東茂光: 筋のコハク酸脱水素酵素の活性度に関する実験的研究, 体質医研報告, 1 : 227, 1951
- 15) 星晴隆: 結核病変に於ける酵素の組織学的研究, (1~3), 東京医新誌, 60 : 138, 1952
- 16) 市川収他: 結核病変の組織化学的研究, 医学と生物学, 19 : 217, 1951
- 17) 市川収: 生体内脱水素反応の解析, 細胞化学シンポジウム, 4 : 113, 1956
- 18) Krebs : The intermediary stages in the biological oxidation of carbohydrate, Adv. Enzymol., 3 : 191, 1943
- 19) Kuhn et al : Uber Invertseifen VIII. Reduktion von Tetrazolium durch Bakterien, gärende Here und Keimende Samen, Ber. deut. chem. Ges., 74 : 949, 1941
- 20) 前川暢夫: 結核の病変反応に関する研究, 京大結研紀要, 1 : 29, 1953
- 21) Padykula : The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rats, Am. J. Anat., 91 : 107, 1952
- 22) Rosa et al: Histochemical demonstration of Succinic dehydrogenase activity in

- tissue sections bay a modified technique, J. Histochem. & Cytochem., 2 : 110, 1954
- 23) Rutenberg et al : Comparative distribution of succinic dehydrogenase in six mammals and modification in histochemical technic. J. Histochem. & Cytochem., 1 : 66, 1953
- 24) 笹川泰治 : 結核菌の有機酸代謝に関する研究, 生化学, 26 : 488, 1954
- 25) 沢田芳男他 : Tetrazolium 塩による酵素活性度の比色定量, 医学と生物学, 28 : 255, 1951
- 26) 沢田芳男他 : 脱水素酵素作用の生化学的並びに組織化学的研究, 体質医研報告, 5 : 296, 1954
- 27) 沢田芳男他 : 脱水素酵素作用の測定, 生化学, 26 : 67, 1954
- 28) Seligman et al : The Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase, Science, 113 : 317, 1951
- 29) Semenoff : Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der Succinodehydrase in der Organen der Rana Temporaria, Zeit. f. Zellforschung u. Mikrochem. Anat., 22 : 395, 1935
- 30) Shelton et al : On the usefulness of tetrazolium salts as histochemical indicators of dehydrogenase activity, Anat. Rect., 112 : 61, 1952
- 31) 高松英雄他 : Dehydrogenase 活性の新組織化学的証明法, Acta Tuberkulosea Japonica, 4 : 55, 1954
- 32) Wells & Long : The Chemistory of Tuberculosis, Williams & Wilkins Comp., 1932
- 33) 山村雄一他 : 結核アレルギー反応の酵素化学的研究, 酵素化学シンポジウム, 6 : 34, 1951
- 34) 山村雄一他 : 結核菌の物質代謝, 結核, 27 : 450, 1952
- 35) 山村雄一 : 結核と酵素, 総合医学, 12 : 960, 1955
- 36) 山村雄一 : 物質代謝, 結核菌の生化学, 95, 1955
- 37) Zweifach et al: Histochemical alterations revealed by tetrazolium chloride in hypertensive kidneys in relation to renal VEM mechanisms, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74 : 848. 1950