

血球及び組織細胞の ATP-ase 活性に関する 生化学的並びに組織化学的研究

第 1 編

正常マウス及び家兎に於ける ATP-ase 活性について

岡山大学医学部病理学教室（指導：妹尾左知丸教授）

大 谷 恭 一 郎

〔昭和 32 年 12 月 31 日受稿〕

I. 緒 言

Adenosine Triphosphate (ATP) はその分子内に高エネルギー結合たる無水磷酸結合を有し、生体内の運動・分裂・代謝等に於けるエネルギー源としての重要性は論を俟たない。従つて最近の酵素化学分野に於ては ATP から磷酸を分離する酵素に関する研究と進歩は実に目ざましいものがある。ATP + $H_2O \rightarrow ADP + H_3PO_4$ の過程に働く基質特異的な酵素として分類された ATP-ase に関しては Engelhardt and Ljabinowal¹⁾, Neadham²⁾, Bailey^{3,4)}, Szent-Györgyi 及びその門下等^{5,6,7,8)} によつて Myosin 及び Actomyosin との関係についての多くの仕事が行なされた。又多くの研究者達は、酸化剤、還元剤及び Mercaptide 形成剤の三者が各々 Myosin と ATP-ase の両方に平行的な影響をもたらすかどうかについて研究し、Mercaptide 形成剤 P-chloromercuribenzoic acid (PCMB) は最も著明な Myosin と ATP-ase の阻害剤である事を見出して、ATP-ase 活性というのは Myosin 分子の本質的な性質であり、この性質はその分子内の遊離 SH 基と密接不離の関係にある事を結論した (Barron and Singer^{9,10)}, Singer and Barron¹¹⁾, Binkley, Ward and Hoagland¹²⁾, Ziff¹³⁾, Mehl¹⁴⁾, Bailey and Perry¹⁵⁾, Roche, Thoai and Bernard¹⁶⁾, Weber and Poryehl¹⁷⁾). しかしながら Novikoff 等¹⁸⁾ は SH 酵素たる ATP-ase 以外に Adenylpyrophosphatase, Apyrase 及び Alkaline Phosphatase 等も ATP に働く事を示し、特異的な真の ATP-ase は単に ATP の末端の 1 磷酸のみを分解するもので、その証明には特に慎重を要する事を示唆した。

ATP-ase の組織化学的証明は高松等¹⁹⁾ 及び Glick and Fischer²⁰⁾ によりアセトン固定のパラフィン切片で始めて試みられたが、Moog and Steinbach²¹⁾ はアルカリ域の pH では Phosphomonoesterase も ATP の 3 つの磷酸をすべて分解し得る事及び組織切片製作過程が ATP-ase 活性を低下させる事の二つの理由を挙げてその成績に疑問を表明した。しかし Glick²²⁾ は組織化学的に Phosphomonoesterase で全く反応の表われない場所にも、ATP を基質とした時には反応の表われる事実を述べてその方法の価値を主張し、これは Wang²³⁾ や Naidoo and Pratt²⁴⁾ 等によつて支持されている。その後、Maengwyn-Davies, Friedenwald and White²⁵⁾ は未固定凍結切片に於て ATP-ase 活性の賦活剤、阻害剤を応用してその特異性を追究し、ATP-ase の組織化学に一大進歩をもたらした。彼等によると Myosin ATP-ase の活性はその SH 基と密接に関係し、pH 8.25 で心筋及び骨骼筋に於て組織化学的に証明され、pH 9.9 では ATP は全く別の ATP-ase か又は Pyrophosphatase により分解されるとしている。更に ATP を基質とした時の像と Muscle Adenylic Acid (A-5-P) を基質とした時の像とが長時間の反応後に非常に似て来る事から、ATP 分解の第 2 段階に於ける 5-Nucleotidase の作用を想定している。けれども彼等の方法によると陽性反応を得るまでに数時間の保温を要し、37°C に於ける ATP の不安定性から考えてその方法に疑問を抱いた Padykula and Herman²⁶⁾ は色々の角度から ATP-ase 活性の組織化学的証明法を吟味して、Maengwyn-Davies 等の方法では溶液中の高濃度の醋酸ソーダが活性を強く阻害している事を確め未固

定凍結切片に於て Gomori の Alkaline Phosphatase 証明法²⁷⁾ を模倣した基質液を用いる事により pH 9.4 の時15分乃至30分間の短時間で十分強い反応を得る事を見出した。そして至適 pH は基質溶液の組成により変る事を明らかにした。更に彼等はその方法を用いて心筋、骨髄筋及び腎細尿管上皮細胞のミトコンドリアの染色が、SH 阻 碍 剤 たる PCMB で失われた後 SH 賦活剤たる L-cysteine 又は 2, 3, dimercapto-1-propanol (BAL) により恢復する事を見出して、組織化学的に始めて真の特異的 ATP-ase の存在を実証した。その後極く最近に至つて、Wachstein and Meisel²⁸⁾ は中性冷フォルマリン固定組織での反応の方が未固定組織でのそれよりも色々の点で良好な結果を得る事を発表している。

末梢血及び骨髄塗抹標本の ATP-ase 活性の証明に関しては武内等²⁹⁾の研究があるが、その特異性に関してはなお十分なる吟味がなされていないようである。

私は上述の如く色々な問題を含み未解決な点の多い ATP-ase 活性について、生化学的並びに組織化学的に検索を試み、特に組織化学的特異性その他に関して種々の知見を得たので報告する。

II. 実験材料及び方法

本実験を通じ正常マウスの肝・脾・心・腎・十二指腸の組織及び正常家兎の末梢血・骨髄を使用し、組織化学的目的に於てのみマウス及び家兎の骨髄筋も併せて使用した。

ATP は家兎及び犬の骨髄筋から Lohmann の方法³⁰⁾を用いて抽出精製し、濾紙泳動的に純粋なる事を確かめたものを Na 塩の形にして使用した。

1. 生化学的方法

生化学的研究に於いては ATP-ase を至適 pH 9.1 で Ca イオンにより賦活される Myosin ATP-ase と、至適 pH 7.5 で Mg イオンにより賦活される Mitochondrial ATP-ase とに大別して夫々別々に検索した。Myosin ATP-ase 活性の測定は Perry の方法³¹⁾を用い、Mitochondrial ATP-ase 活性には Kielley の方法³²⁾を用いた。いずれの場合にも動物を撲殺し直ちに上述の各臓器を取り出し、夫々 100mg 宛を 0.5 mol KCl 溶液又は蒸溜水 1 cc と共に硝子ホモゲナイザーで磨り潰したものを粗酵素液として使用した。遊離無機磷 (Pi) の測定には島津の光電比色計を用い、Fiske and Subbarow の方

法³³⁾に従つた。

2. 組織化学的方法

A. 染色前の標本製作

組織切片は冷アセトン固定パラフィン切片、冷アセトン固定凍結切片、冷中性フォルマリン固定凍結切片、未固定凍結切片、凍結乾燥切片の 5 種類につき比較検討した。

冷アセトン固定パラフィン切片製作は一般組織の迅速固定包埋法に準じ、動物撲殺後直ちに取出した前記各臓器、組織を夫々約 1 mm の厚さに切り、予め 0°~3°C に冷却した純アセトン中へ投入してそのまま低温で約 1 時間固定脱水する。その後別に用意した常温のアセトン中へ約 15 分間浸し、完全に脱水硬化した組織片を直接 54°C 位で熔融状態にあるパラフィンに移して約 30 分間浸漬した後に固める。クローム硫酸を通し清浄にした載物硝子に貼つた約 5 μ のパラフィン切片は、室温で約 2 時間乾燥させた後、キシロールで脱パラして直ちに染色操作に移るのであるがここまでの全過程でアルコールは一度も通さないようにする。冷アセトン固定凍結切片は矢張り薄く切つた組織を 0°~3°C に保つた純アセトン中で 1 時間固定した後約 10 μ の凍結切片とする。冷中性フォルマリン固定凍結切片は 10 μ フォルマリン水溶液に N/10 苛性ソーダ水溶液を滴下して pH を 7.0 附近にしたものを 0°~3°C に保ち、この中に 1 mm 位の厚さに切つた組織片を約 4 時間浸漬固定した後蒸溜水で 10 分程洗い凍結切片を作製する。未固定凍結切片はミクロームから載物硝子へ切片を移すのに、新鮮な家兎血清に浮かべて流し落す方法を用いたが、これは技術的に可成りの困難を伴うものである。載物硝子に切片が乗れば直ちに血清を周囲から濾紙で吸いとり、扇風機を用いて 30 分間乾かせば十分でその後の操作でも切片が剥がれるような事はない。

凍結乾燥切片製作には動物から取り出した各臓器を速かに 1 mm 立方程の大きさに切つてサンプルホルダーに乗せ、予め液体窒素でその凝固点 (-160°C) 近くまで冷却したイソペンタン中へ入れて瞬間的に凍結させる。そしてサンプルホルダーを動かしつつ、30 秒程してから、ドライアイス・アセトンの寒剤で -40°C 前後に保つた乾燥室に凍結組織片を移し、10⁻⁴ mm Hg 以上の高真空で約 24 時間乾燥させる。乾燥の終つた組織片は徐々に常温にまで温度を高め、真空中のままパラフィン若しくはメタクリル樹脂に封ずる。切片は載物硝子上にと

つた1滴の純アセトンの上に伸して貼りつけ、室温で約2時間乾かした後キシロールで脱包埋して染色する。

末梢血は塗抹標本とし、骨髓はスタンプ標本を用いた。何れもクローム硫酸及びエーテル・アルコールを通して十分清浄にした載物硝子上に採取直後のものを夫々塗抹又はスタンプする。これ等は、冷アセトンで3分間固定したもの、フォルマリン蒸気で10分間固定し流水で15分間洗つたもの、未固定のまま室温で約20時間乾燥させたものの3通りについて染色を行い比較した。

B. 標準基質液及び染色法

(1) 標準基質液・ATP-ase の組織化学的染色に用いた標準基質液は Padykula and Herman²⁶⁾ の報告を参照し、Gomori の Alkaline Phosphatase 証明法を模倣した。即ち Tab. 1 の如きものを使用した。Myosin ATP-ase の生化学的分析法たる Perry の方法³¹⁾ も併せて考えて緩衝液は pH 9.1 のグリシン緩衝液とし、又 KCl を加えた。ATP 溶

Tab. 1. Standard Substrate-solution

0.2 M Glycine-NaOH buffer (pH9.1)	10 cc
0.18 M CaCl ₂ solution	5 cc
0.05 M ATP solution	5 cc
0.5 M KCl solution	2 cc
H ₂ O	28 cc

液は使用の度毎に新しく作り0.1M NaOHを加えて pH 9.1とし基質液へは一番最後に加えるようにする。これに加えると液が白濁するから直ちに濾過して使用する。

対照として ATP の代りに0.05 M α, β -glycerophosphate (GP) 5 cc を加えた液及び基質を全然加えず蒸留水で代用した液によつても反応を試み、又 90°C 5分間の加熱処理切片を標準基質液中で反応させる事も試みた。

(2) 染色法：前述のようにして作製した各種切片を予め 37°C 附近まで温めた上記の標準基質液及び対照液中へ入れ、凍結切片は15～30分間、パラフィン切片は3時間保温する。末梢血は4～6時間、骨髓は2～3時間の保温を要する。保温終了後標本は2%塩化カルシウム水溶液2つを通して約10分間洗つて不要の附着物を除く。次に2%塩化コバルト水溶液に約5分間浸し、酵素活性により組織に沈着した燐酸カルシウムを燐酸コバルトの形にする。ここで2, 3回蒸留水を取り変えて十分標本を洗つた後、1%の多硫化アンモニウム水溶液に移して約2分間程すると酵素活性部位は黒色の硫化コバルト形成によ

り明かに示される。80%, 90%, 100%のアルコールで可及的速かに脱水しキシロールで透徹してバルサムに封ずる。

C. 賦活剤及び阻害剤の適用；ATP-ase 活性の賦活剤としては L-cysteine, 阻害剤としては PCMB を用い、これ等は何れも Tab. 2, 3 の如く

Tab. 2. Substrate-solution with cysteine

0.2 M Glycine-NaOH buffer (pH9.1)	10 cc
0.18 M CaCl ₂ solution	5 cc
0.05 M ATP solution	5 cc
0.025 M L-cysteine solution	5 cc
0.5 M KCl solution	2 cc
H ₂ O	23 cc

Tab. 3. Substrate-solution with PCMB

0.2 M Glycine-NaOH buffer (pH9.1)	10 cc
0.18 M CaCl ₂ solution	5 cc
0.05 M ATP solution	5 cc
0.025 M PCMB solution	5 cc
0.5 M KCl solution	2 cc
H ₂ O	23 cc

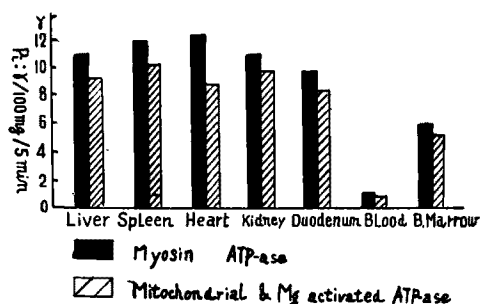
最終濃度 0.0025M となる如く反応基質液に添加して使用した。L-cysteine は使用直前に溶かして加え、事前の自然酸化を防いだ。PCMB は水に難溶であるが弱アルカリ性になると少しづつ溶ける。これは光に敏感なので褐色瓶に容れ遮光紙で包んで貯える。これ等の液中での切片の保温時間は矢張り凍結切片は15～30分間、パラフィン切片は3時間とした。

阻害剤により一度低下した活性が賦活剤により回復するかどうかを見るためには次の如くした。先ず PCMB 添加基質液で15分間保温した後2%の塩化カルシウム水溶液を2回とり代えて約10分間洗い、次いで蒸留水を数回とり代えて十分洗う。その後 L-cysteine 添加基質液中で凍結切片の時は約30分間パラフィン切片の時は約3時間保温するのであるが、勿論対照としてこの L-cysteine 添加基質液での後処理を省いた切片を用意した。保温終了後は前述の染色法の如く取扱いバルサムに封ずる。

III. 結 果

1. 生化学的方法

生化学的に測定した各臓器の ATP-ase 活性を 100 mg 重量当りの遊離無機燐量で表わすと図の如くである。即ち Myosin ATP-ase 活性は心に於て約12.2%の最高値を示し、脾・肝・腎・十二指腸・骨髓・末梢血の順であるが、前5者が何れも10%前後の値を示しているのに比し骨髓は6%, 末梢血は1%程度の基に近い値を示している事は注目に値す



A Comparison of ATP-ase Activity on several Organs

る。Mitochondrial ATP-ase 活性は脾に於て約 10.37 の最高値を占め、腎・肝・心・十二指腸・骨髓・末梢血の順であるが、骨髓及び末梢血はその他のものに比し矢張り甚だ低い値を示している。各臓器共、Myosin ATP-ase 活性は Mitochondrial ATP-ase 活性よりわずかに高い値をとるが、両者の差は心に於て最大 (3.47) で末梢血に於て最少 (0.27) である。

2. 組織化学的方法

A. 各種標本製作法に於ける染色性の比較

一般に冷アセトン固定凍結切片、冷中性ホルマリン固定凍結切片、未固定凍結切片の 3 者は陽性反応の組織学的分布及び賦活剤、阻害剤に対する態度がほぼ同様であり一定の染色度を得る迄の保温時間も未固定凍結切片のみが幾分短かくてすむ程度で大体同様である。しかしアセトン固定には蛋白の凝集によるとと思われる組織の収縮や空胞化等の固定によるアーテファクトが大であるという欠点があり、未固定凍結切片には製作法が技術的に難しく、又陽性反応の組織内での限局性がホルマリン固定のものに比し悪いという難点があるので実際的には以上 3 者の中で冷中性ホルマリン固定凍結切片が最良と考えられる。次に冷アセトン固定パラフィン切片に於ては一定の染色度を得るまでに凍結切片に比し非常に長い保温時間を要するばかりでなく、得られた染色像も相当著しい差異を示す。凍結乾燥切片では、パラフィン包埋によるものは冷アセトン固定パラフィン切片とほぼ同様の染色像を示すが、保温時間は更に長く後者の約 2 倍を要する。凍結乾燥メタクル樹脂包埋のものでは ATP を基質とした場合約 10 時間に亘る反応後でも、我々の検した組織の中では腎細尿管主部及び曲部の上皮細胞の刷子縁のみが陽性反応を示すに過ぎず、他の場所はすべて陰性であつた。

加熱処理切片では、15 時間に亘る保温に於てすら、

各臓器とも殆んど見るべき反応を示さなかつたが、基質を加えない液中で保温した普通の切片では自家基質による Alkaline-phosphatase 反応と思われる極めて軽度の染色が、諸所に認められた。

以上の事実から考えて各臓器について冷アセトン固定パラフィン切片（以下単にパラフィン切片と呼ぶ）と冷中性ホルマリン固定凍結切片（以下単に凍結切片と呼ぶ）の二者に於ける染色性を比較検討すれば十分であると考えられるので、以下この兩種切片で ATP を基質とした時及び GP を基質とした時の反応像を比較して述べる事にする。

肝：パラフィン切片に於て ATP を基質として 3 時間保温した場合、肝細胞は中等度に黒染し特に核及び細胞膜は強く染色される (Plate Fig. 1)。

かかる染色は肝小葉周辺部及び中心部の血管周囲に強くその中間帯にやや弱い傾向がある。

肝静脈洞内皮、門脈及び中心静脈内皮も強く染り、肝動脈内膜及び中膜平滑筋も高度に着色する。毛細胆管の反応は見られない。GP を基質としたパラフィン切片 3 時間後では、肝細胞の黒染は前者に比し著しく弱く瀰漫性で核及び細胞膜の着色も弱い。肝動脈壁平滑筋は殆んど染色されない。所が前者に見られなかつた実質内毛細血管壁に非常に強い反応があらわれこれが多数散在性に認められる (Plate Fig. 2)。

凍結切片では ATP を基質として 15 分間反応させると既に肝細胞には中等度の黒染があらわれ、矢張り血管周辺に強く小葉の中間帯がやや弱い傾向を示すがかかる染色はパラフィン切片に比し、胞体に強く、核及び細胞膜には著しく軽微である。Sinusoid や諸血管内皮及び肝動脈壁平滑筋も中等度の黒染を呈するが、これはパラフィン切片 3 時間のものより弱いようである。更に特異な事は、30 分間の保温後に於ては実質内毛細胆管と思われる像が Plate Fig. 3 の如く明瞭に表われて来る事である。GP を基質にした場合、凍結切片の 30 分間反応後ではパラフィン切片の時に見られたような毛細血管の染色は殆んど見られない (Plate Fig. 4)。肝細胞の染色は ATP に比しずつと弱く Sinusoid 内皮、動脈壁中膜及び毛細胆管等も殆んど染つて来ない。

脾：パラフィン切片に於て ATP を基質として 3 時間保温した場合、脾髄の血球、細網細胞等は赤色髄、白色髄の別なくほぼ一様に中等度の反応を示す。染色は核及び細胞質の両方にあらわれるが核の方が強度である。濾胞中心動脈や英動脈壁は最も強く黒染

し、結合被膜や脾梁にも中度等の染色が見られる (Plate Fig. 5). 同じパラフィン切片で GP を基質として3時間反応させると、ATP の場合と異なりリンパ濾胞を構成する細胞の核及び原形質に強い黒染が表われるが、赤色髄の反応は極めて軽微である。そして中心動脈壁は相当強く黒染されるが莢動脈壁の染色は著しく弱い。結合被膜や脾梁には殆んど着色が見られない (Plate Fig. 6).

凍結切片を用い ATP を基質として15分間反応させたものでは、脾髄の細胞はパラフィン切片で ATP を基質とした時の如くほぼ一様な染色を示すが後者に比し核反応は弱く胞体の反応はづつと強いように思われる (Plate Fig. 7). 濾胞の胚中心のみは他の部分に比しやや染色が弱い。動脈壁の黒染はパラフィン切片3時間の方がむしろ著しいようである。結合被膜や脾梁の染色は軽度に表示されている。GP を基質とした場合、凍結切片の15分保温後では、染色は一般に ATP の時より遙かに弱く、ただリンパ濾胞及び中心動脈壁のみ中等度の反応を示している (Plate Fig. 8).

心筋及び骨格筋：心筋のパラフィン切片に於て ATP を基質に3時間保温すると、心筋線維は中等度に染色され特に核は強く黒染する。筋線維中にはその筋原線維に一致すると思われる縦軸にそつた数条の幾分よく染つた部分が認められ、又筋線維の所々を横断する介在盤が強く染め出されている (Plate Fig. 9). 又場所によつては横紋が比較的良好に染つているのが見られる。心筋間質にある冠動脈壁には非常に強い反応が見られるが、毛細血管は殆んど染色されない。同じ心筋のパラフィン切片で GP を基質とした場合は、筋線維の染色は ATP に比し極めて軽度で核の着色も又弱い。しかし所々横紋並びに介在盤に一致した着色は見られるようである。筋線維の反応が以上の如く軽度なるに反し、間質毛細血管は著しく多数のものがすべて強く黒染して特徴ある像を呈する (Plate Fig. 10).

凍結切片の心筋を ATP の基質で15分間反応させると心筋線維は既に強い活性を表し筋原線維に一致した配列を示し横紋部の着色も認められるが、パラフィン切片と異なり核及び介在盤は殆んど染つていない。心筋間質に於ても冠動脈壁のみは高度の黒染が見られるが毛細血管の着色は全然認められない (Plate Fig. 11). これと同じ心筋凍結切片で GP を基質にした場合、15分間の保温では筋線維はもとより、パラフィン切片で強い反応の見られた間質の

毛細血管も殆んど認むべき染色を顯わさない (Plate Fig. 12). 家兎骨格筋に於ても二、三の点を除いて大体心筋の場合と同様の傾向を示す。即ちパラフィン切片の3時間の保温に於て、ATP 基質では筋線維及び動脈壁に強陽性であるに比し GP 基質ではかかる場所に極めて軽度の反応があらわれるに過ぎない (Plate Fig. 13, 14). 核の染色は心筋のように著明ではない。凍結切片の15分間の保温では、ATP 基質の場合筋原線維に一致した黒染が特に横紋の部に於て強く表われ、これは心筋の凍結切片の場合より一層高度かつ明瞭である。GP 基質では凍結切片に於ても筋線維の染色は非常に弱い。心筋の時の如く全然陰性というような事はなく、筋原線維の横紋に一致する部に軽度の着色が認められる。

腎：パラフィン切片で ATP を基質として3時間反応させた場合、皮質細尿管上皮の主部刷子縁が最も強い黒染を呈し介在部及び Henle 氏係蹄に於ても上皮細胞の頂部に相当強い黒染が表われる。細尿管上皮細胞核は中等度の染色を示し、又糸球体も高度乃至中等度に黒染される (Plate Fig. 15). 腎動脈壁も内膜及び中膜平滑筋に著明な反応が見られるが、髓質の集合管及び乳頭管上皮は核及び細胞質が瀰漫性に極めて軽度に染まるに過ぎない。GP を基質にした場合もパラフィン切片では ATP の時と非常によく似た像を示すが、ただ細尿管主部の刷子縁と介在部及び Henle 氏係蹄上皮の頂部の黒染が ATP の時より一層高度であるに比し、糸球体の染色は却て弱い傾向を示す。又糸球体以外の毛細血管壁は強く黒染するが腎動脈壁は内膜のみ強く染り中膜の反応は殆んど認められない。

扱てここで面白い事に凍結切片で ATP を基質に15分間乃至30分間保温すると、パラフィン切片の時とは全く異なつた染色像を示すのである。即ち反応は糸球体に最も強くあらわれ、これは15分間保温後の切片に於ても既に強く黒染している。細尿管の染色は一般に瀰漫性の感が強く皮質、髓質の別なく共に中等度に染つている。皮質に於ては細尿管上皮の刷子縁や頂部は反応が殆んど陰性で基底部にやや強い傾向を示し、上皮細胞核は15分後のものに於ても既に或程度の着色が認められる (Plate Fig. 16).

腎動脈壁は内膜及び中膜平滑筋に強い反応が見られる。凍結切片で GP を基質にして同一時間保温した場合は ATP の時と異なり皮質、髓質の差が鮮明であり、髓質の集合管は反応殆んど陰性である。皮質では糸球体は極めて軽度の反応を示すに過ぎないが、

細尿管主部上皮の刷子縁及び介在部上皮の基底部では強い黒染が見られる (Plate Fig. 17, 18). このように細尿管の主部と介在部に於て上皮細胞内の活性の局在性が異なるのは興味ある事実である。上皮細胞核の染色は ATP の時に比し遙かに軽微であり、又腎動脈壁中膜の反応も殆んど見られない。

十二指腸：パラフィン切片に於て ATP を基質に 3 時間反応させると十二指腸壁滑平筋層及び粘膜絨毛上皮細胞基底部分や絨毛中心部の乳糜管、血管等が強く黒染され、粘膜上皮細胞核の染色も著明である (Plate Fig. 19). 所が GP を基質にした時はこれと全く反対に滑平筋層は反応殆んど陰性で、粘膜上皮細胞に於ても頂部の線条縁に強い黒染が表われる。粘膜上皮細胞基底部分の細胞核も染るがこれは ATP の時に比し軽微である (Plate Fig. 20). 凍結切片で ATP を基質に 15 分間保温した場合、滑平筋層や粘膜上皮細胞基底部分が強く染り、又 Brunner 氏十二指腸腺上皮細胞の基底部分が黒染する (Plate Fig. 21).

凍結切片で GP を基質にすると滑平筋層は全く染らず、粘膜上皮細胞は基底部分が中度等に染まる程度であるが、Brunner 氏十二指腸腺上皮細胞はその頂部のみが著しく強い黒染を来し、しかも粘膜の表層に近く存するもの程強く、深在の腺上皮は殆んど反応を示さないのは興味ある所見である (Plate Fig. 22).

末梢血及び骨髓：末梢血塗抹標本及び骨髓スタンブ標本に関しては、前述の如く、① 冷アセトン固定、② フォルマリン蒸気固定、③ 未固定の 3 種類につき反応を試みたが、一定度の染色を得るまでに要する保温時間は矢張り未固定のものが最短で末梢血は 4 時間、骨髓は 2 時間で十分である。しかし未固定では特に末梢血の場合、赤血球の溶血が起り、白血球は破壊はまぬがれるが核の状態不分明で細胞種類の区別が付き難い等の欠点があり、骨髓ではかかる事はなく、反応鋭敏で鮮明な像が得られるので骨髓のみに用いるべき方法である。次に冷アセトン固定及びフォルマリン蒸気固定では未固定の時の約 1.5 倍の保温時間を要するが、末梢血の場合にはどうしても固定標本使用の外なく、この 2 者の中では固定が十分に血球の破壊等も全くなく鮮明な像の得られるフォルマリン蒸気固定の方を選び度い。

フォルマリン蒸気固定の家兎末梢血塗抹標本を ATP を基質に 6 時間反応させた場合、偽好酸球の殆んど全てのものが高度、中等度或は軽度の反応を

示し、極めて稀に全く無反応のものを見る。反応は主として胞体に局限したほぼ均等な黒染として表われ、又、核の周辺にミトコンドリアを思わせる類円形乃至短桿状の陽性物質の凝集を示すものが多い。核は殆んど見るべき反応は示さないが、胞体の反応の強いものでは極めて軽度の共染を来している。リンパ球は大多数のものが反応陰性であるが、少数のものは胞体に瀰漫性の極めて弱い染色を示している。単球は多くのものが胞体に軽度の反応を呈する (Plate Fig. 23). 同様の末梢血塗抹標本を GP を基質に 6 時間反応させると、偽好酸球に於ては ATP の時と同様殆んど全てのものが胞体に色々の程度の反応を示すが、一般に ATP の時よりも強い黒染を呈するものが多く核の染色もやや強く表われる。リンパ球は全て反応陰性で ATP の時に見られたような陽性反応を示すものは見られない。単球は多数のものが胞体に極めて弱い染色を来すが、ATP の時に比し明かに軽度のものである。リンパ球、単球共核の反応は殆んど認められない。

未固定の家兎骨髓スタンブ標本を室温で約 20 時間乾燥させて後、ATP を基質に 2 時間反応させると、成熟顆粒球の胞体は殆んどすべてのものが高度に黒染し、核も軽度に共染するものが多い。白血球系幼若細胞もその胞体に種々な程度の染色を来すが、一般に幼若なもの程反応は軽微である。赤血球系の幼若細胞は白血球系のものに比し概して軽微であるが矢張り或程度の反応を認め、核の共染はむしろ白血球系の細胞より強い傾向が認められる。淋巴球及び単球の胞体にも軽度の反応を示すものが多い (Plate Fig. 24).

同様の骨髓スタンブ標本で GP を基質に 2 時間保温したもので、ATP の時と大体同様の反応像を見るが、白血球系及び赤血球系の反応は ATP の時より一層強く、それに反して淋巴球、単球等は反応も弱く、又陽性に出る細胞の数も少いようである。

以上は末梢血及び骨髓について保温時間が最も適当と思われる時の所見であるが、何れの場合でも更にこれ以上の長時間に亘つて保温すると、核の黒染が次第に強くなり、胞体のそれはむしろ弱まつて 20 時間以上も保温した場合遂には核の方が濃く染つたような像を呈するに至る事は興味ある事実である (Plate Fig. 25).

B. 賦活剤及び阻害剤の作用

(1) L-cysteine 又は PCMB の影響。パラフィン切片に於ては凍結切片に比し一般に L-cysteine

又は PCMB による染色性への影響は著しく軽度である。しかしそれでもなお心筋及び骨格筋に於て筋線維の反応は L-Cysteine により軽度に賦活され一定の染色度を得るまでの時間を幾分短縮する事が出来る。又これ等の筋線維の反応は PCMB により可成りの程度に阻害され、3 時間の保温後に明かな差異を認める事が出来る (Plate Fig. 26, 27)。

腎のパラフィン切片に於て細尿管上皮の刷子縁の反応は L-cysteine により却て著しく阻害され、PCMB によつては殆んど影響を受けないのは面白い所見である (Plate Fig. 28, 29)。肝・脾・十二指腸等のパラフィン切片に於ては殆んど何等の影響も認める事が出来ず、又全組織を通じ血管系の反応は全く不変であつた。

次に凍結切片に於ては、心筋及び骨格筋線維の反応は L-cysteine により著明に賦活され筋原線維に一致した高度の黒染を来すが、PCMB によつては反応が著しく減弱せられ殆んど染つて来ないようである。腎凍結切片に於ては ATP を基質とした場合前述の如く細尿管上皮の刷子縁は反応陰性であるため、パラフィン切片で観察されたような cysteine によるこの部の反応阻害は当然認められないが、一般に瀰漫性で細尿管上皮細胞基底部にやや強く表われていた染色は PCMB により明かに減弱され、影響を受けない糸球体のみが黒く散在性に認められるといった像を呈する (Plate Fig. 30)。肝凍結切片では L-cysteine による賦活作用は認められなかつたが、PCMB により実質細胞の反応が軽度に低下するのが認められ、毛細胆管の像が30分の保温によつても表われなかつた。脾の凍結切片では白色髄、赤色髄ともその細胞の染色度がPCMBにより幾分低下する程度で cysteine の影響は見られない。十二指腸凍結切片に於ても腸壁平滑筋の反応が PCMB によりやや抑制されるのが認められる。以上の各組織共血管壁の反応はパラフィン切片の時と同様殆んど影響を受けないのが注目される。末梢血及び骨髓標本についても、L-cysteine 又は PCMB による殆んど何等の影響も認める事が出来なかつた。

(2) 阻害作用の回復・PCMB により阻害された酵素作用が L-cysteine により回復するかどうかを検した多くの標本の中で、私は心筋及び骨格筋の凍結切片に於てのみ満足すべき結果を得た。パラフィン切片に於ても前述の通り心筋及び骨格筋に於ては或程度の L-cysteine による賦活作用と PCMB による阻害作用を認める事が出来たが、一度阻害された

酵素作用を再び強くする事は出来なかつた。

心筋又は骨格筋の凍結切片の同じものを2枚作り、1枚は PCMB 添加基質液中で15分間保温するに止め、他の1枚はその後更に cysteine 添加基質液中で30分間保温する。こうして出来た2枚の標本を比較すると前者は筋線維の反応が殆んど失われ極めて軽度に染つているに過ぎないが後者に於ては筋線維が強い黒染を来し、全然 PCMB の処理をせず始めから普通の標準基質液中で15分間反応させたものと殆んど変わらない位にまで活性が回復しているのをみるのである。兩種切片とも血管壁の反応は同じ強さで影響を受けていないのを知る事が出来る (Plate Fig. 31, 32)。

IV. 総括並びに考按

既に Engelhardt³⁴⁾は各種動物器官について ATP に対する酵素活性を測定し、その存在程度によりこれ等器官を分類しているが、私は正常マウス及び家兎の数種器官並びに血液について、この種酵素活性を Myosin ATP-ase 活性及び Mitochondrial ATP-ase 活性に大別し、夫々 Perry の方法³¹⁾及び Kielly の方法³²⁾によつてその活性度を別々に測定して、各臓器の ATP-ase 活性度を確認すると共に組織化学的証明法遂行への一指針としたのであるが、得られた結果は大体に於て予期した如き満足すべきものであつた。末梢血の活性度の低いのは主として単位体積中の細胞成分の少数によるものであろう。

組織化学的証明法に於ては、ほぼ中性の pH 附近を至適とする Mitochondrial ATP-ase の証明は技術的に非常に困難を伴うので、よりアルカリ域で働く Myosin ATP-ase 証明法に準じて実施した。即ち Padykula and Herman²⁰⁾の推奨する方法に Perry の生化学的証明法の利点を採り入れた標準基質液を調製して使用した。更に切片はパラフィン切片及び凍結切片の両者について夫々平行的に反応を実施し、対照として Alkaline Phosphatase 反応、基質を加えない時の反応、及び加熱処理切片での反応等を試み、又賦活剤、阻害剤を応用する事等により各組織又は細胞について組織化学的反應の特異性を追求したのである。

私の得た結果から考へて、ATP を基質として組織化学的に染め出される反応は決して単一な特異的 ATP-ase 活性のみによるものでない事は確実である。反応前の切片の製作法により酵素活性分布の組織像及び反応出現迄の時間を著しく異にし、又賦活

剤、阻害剤に対する鋭敏性も明かな差異を示す。更に同一種類の切片に於ても組織内活性局在の場所により賦活剤、阻害剤に対する態度が全く違い、ATPを分解する酵素の複雑性が示唆されるのである。

Glick²²⁾ はパラフィン切片を用いて組織化学的に Phosphomonoesterase で全く反応の表われない場所にも ATP を基質にした時には反応が表われる事から、これを ATP-ase 活性によるものと主張し、Wang²³⁾ 及び Naidoo and Prott²⁴⁾ 等もこれを認めている。今回の実験に於てもパラフィン切片のみならず凍結切片を用いた場合でも ATP を基質とした時と GP を基質とした時とでは著しい組織像の差異が表われる事は詳細に前述した通りである。けれども GP-ase 反応の表われない所に出現する反応を直ちに単一の特異的 ATP-ase 活性と見做す訳にはいかない。元来 ATP-ase は ATP の末端の 1 磷酸のみを分解する酵素として分類されたものであり、その作用の SH 基依存性も証明されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。Barron³⁵⁾ は SH 基依存性の酵素作用の確実な証明は PCMB の如き Mercaptide 形成剤で一度不活性化した作用を cysteine や BAL の如き SH 化合物で再び活性化する事であると主張している。Padykula and Herman²⁶⁾ はこの原理を未固定凍結切片に於て始めて組織化学的に応用し一定の成果を得たが、私はこれを各種の切片について試み、冷フオルマリン固定凍結切片に於ても心筋及び骨格筋線維の ATP 分解酵素の活性が Barron³⁵⁾ のいう条件を満たす事を見出した。更に各組織の色々な場所での ATP 分解酵素活性の中には PCMB により阻害されるが cysteine によつては全く影響されないもの、PCMB に無関係だが cysteine により強く阻害されるもの、cysteine 及び PCMB のどちらにも全然影響されないもの等のある事を証明した。従つて ATP に働く酵素系は私の実施した条件下に於ては組織化学的に大体 4 群に大別する事が出来るのである。

第 1 群はいう迄もなく SH 酵素たる特異的 ATP-ase で凍結切片の心筋及び骨格筋線維に於てのみ組織化学的に証明されるものであり、筋原線維に一致して強い反応を示すが、特にその異方性盤と思われる部分に高度の反応を来すため、多くの筋原線維の集りよりなる筋線維に於ては丁度横紋に一致した黒染として表われるのである。かかる所見は筋線維の収縮に際し先ず主として縮み低くなるのは異方性盤であり収縮の強い時に始めて等方性盤も幾分低くなるという従来の観察結果とよく一致する興味深

い所見である。かかる所見は Maengwyn-Davies 等²⁵⁾ 及び Padykula and Herman²⁶⁾ も、横紋と関係した明らかな局在性を示さぬのは疑問であるとしながらも観察し得なかつた所見であり、私の場合よく見出し得たというのは、特に反応基質液の条件を Perry の Myosin ATP-ase の生化学的証明法³¹⁾ に準じて調製した結果かもしれない。パラフィン切片でも心筋及び骨格筋線維の反応は cysteine により軽度賦活され PCMB により可成り阻害されるのを認める事が出来たが、回復作用を見る事が出来なかつたのは矢張りパラフィン切片に残つている特異的 ATP-ase 活性が甚だ低い事に原因するのであろう。Padykula and Herman²⁶⁾ は腎細尿管上皮細胞の Mitochondria に於ても特異的 ATP-ase 反応を証明しているが、私の場合、此处に於てかかるはつきりしたものを掴む事が出来なかつたのは、基質液その他の条件の差によるものであると考えざるを得ない。

第 2 群の PCMB により阻害されるが cysteine により全く影響されぬものは、凍結切片に於ける腎細尿管上皮細胞の基底部にやや強い傾向を示す瀰漫性の染色並びに肝実質細胞及び毛細胆管、十二指腸壁滑平筋等の反応である。この酵素作用が如何なる酵素系に属するものであるかは慎重を要するが、それには PCMB の作用態度を考えなくてはならない。PCMB が SH 基と結合して Mercaptide を形成する事は間違いのない事実であるが、最近 Frieden and Naile³⁶⁾ は ascorbic acid oxidase の PCMB による阻害が SH 化合物以外のもので回復し得る事を示し、PCMB が SH 基以外のものと結合する可能性も考えられている。PCMB を単なる SH 阻害剤と考えればこの第 2 群の酵素作用は第 1 群と同じ SH 酵素たる特異的 ATP-ase 活性の一端の表われと解されるのであるが、PCMB の作用の考え方によつては SH 酵素系以外の全く別の酵素作用とも考えられるのである。しかし本反応の局在場所の 1 つとして、Padykula and Herman²⁶⁾ が SH 酵素としての ATP-ase を証明した腎細尿管上皮細胞基底部を含む事から考えて、矢張り特異的 ATP-ase 反応の一端の表われと見做す方が妥当なのかも知れない。或はこの群の酵素は第 1 群のものと形が異なり PCMB との結合のみが甚だ強いものであるとも考えられる。

第 3 群は cysteine により強く阻害されるが PCMB には無関係のもので、パラフィン切片の腎細尿管上

皮細胞の刷子縁に於て明らかに認められるものである。この場所は GP-ase 反応も強く見られる所であり、Phosphomonoesterase は pH 9.0 附近に於て ATP のすべての磷酸をよく分解し得る事 (Liebknecht³⁷⁾) 及びこの酵素作用は cysteine により強く阻害されるという事実 (Gordon³⁸⁾) から考えて、これは Phosphomonoesterase の ATP 分解による結果と断定して差し支えないと考える。腎凍結切片にて ATP を基質に15分間保温した時、この細尿管上皮刷子縁の反応は全然表われない。従つてこの方法によれば Phosphomonoesterase 反応を除外する事が出来るように思われる。

第4群は SH 賦活剤及び阻害剤に対して全然影響を受けない酵素群であるが、凍結切片、パラフィン切片共、動脈中膜平滑筋及び内膜の反応を始め、第1群から第3群までに述べた以外の場所の反応は全てこの中に加えられるべきものである。又私の結果では血球の反応もこの群に入れざるを得ない。高松¹⁹⁾、Glick^{20,21)} 等がパラフィン切片を用い ATP を基質として Phosphomonoesterase の反応の表われない場所に証明した酵素活性は恒らくこの種のものであつたと考えられる。この種の作用が如何なる酵素活性の表われであるかはわからない。Novikoff 等¹⁸⁾ は ATP の分解に関係する酵素群として真の ATP-ase 及び Phosphomonoesterase の外に Adenylpyrophosphatase と Apyrase を挙げている。この中前2者による作用は前述の如く確実に証明されているので、後2者を此処にいう第4群の中に入れて考えたい所であるが、これを確実に証明する知見は得られていない。Maengwyn-Davies 等²⁵⁾ はその組織化学的知見から横紋筋以外の場所に於ける ATP の分解に2つの酵素的段階を想定し、先ず Adenylpyrophosphatase により ATP が A-5-P にまで分解され、第2段階として 5-Nucleotidase による A-5-P の分解を挙げているが、5-Nucleotidase 活性は cysteine により強く阻害されるものであるから、この反応は第4群の中に加える訳にはいかない。Apyrase については最近 Kielley and Kielley³⁹⁾ によりその存在が疑問視されている。何れにしてもこの第4群に入る酵素作用の本態は多くの疑問につつまれ、今後の詳細な研究にまたねばならない。

以上 ATP を分解する酵素を主として組織化学的特異性の面から分離して述べたが、パラフィン切片に於て証明されるのは殆んどすべて第3及び第4群のものであつて、特異的 ATP-ase 活性は心筋及び

骨筋筋線維に軽度に残存しているのみという事になる。その上パラフィン切片では全般的な酵素活性の低下があるためか陽性反応を得るためには長時間の保温を必要とし、それに伴つて当然反応生成物たる磷酸カルシウムの拡散という問題も大きな意味をもつ事となり、凍結切片との組織像の差を助長する結果となる。実際パラフィン切片に見られる細胞核や細胞膜等の強染は恐らく磷酸カルシウムの拡散に起因するものであろう。メタクリル樹脂包埋切片では、腎細尿管上皮刷子縁の Phosphomonoesterase 活性と思われるもの以外のすべての反応が不活性化される。基質の違いにより組織内の酵素活性の分布が異なるのは当然のことで今更述べる迄もないが、特に目立つ点だけを一括すれば一般に動脈壁平滑筋は ATP を基質とした時強い反応を表わすのに比し、毛細血管は GP-ase 反応の方が強く染色される。但し腎の糸球体に於ては ATP の時がむしろ強いようである。横紋筋線維は ATP-ase 活性が高度であるが GP-ase は殆んど陰性である。脾に於ては GP-ase 反応は白色髄に特に強く出現するが、ATP の時は赤色髄、白色髄がほぼ一様に染る。しかし細胞が幼若と考えられる淋巴細胞の胚中心のみ反応の弱いのは、骨髓幼若細胞の反応軽微なものと一致する所見である。十二指腸に於ける ATP 分解酵素と GP-ase の分布像の違いも注目値する。以上の如き各種臓器に於ける著明な相違は夫々その動的な機能と結びつけて考える時、非常に興味深いのであるが此処では省略する事とする。白血球の Alkalinephosphatase の細胞内分布は広く論議された所で、大部分の人々は核にあると考えており、Wachstien⁴⁰⁾、Kaplow⁴¹⁾ 等は主として原形質に存するとしている。最近 Boivin et Robineaux⁴²⁾ はラットの腹膜滲出液から分離した白血球の塗抹標本について各種の固定法及び保温時間を用いて Alkalinephosphatase 反応を詳細に検索した結果、最初原形質に頭われた黒染が保温時間の長くなるにつれて次第に核に移り、原形質は却つて薄くなつて行くのを見出し、核の染色は保温中の磷酸カルシウムの拡散によるものであり、酵素活性は元来原形質のみにあると結論した。私は今回の実験で、白血球の ATP を基質とした酵素反応に於てもこれと全く同様の実事を観察し得たので、白血球に於ては ATP 分解酵素の少なくとも大部分は原形質に存すると結論するものである。

V. 結 論

兎及び犬の骨筋筋を用い、Lohmann 氏法³⁰⁾により ATP を抽出精製し濾紙泳動的に純粋なものを得た。この Na 塩を基質に用いて正常マウスの肝・脾・心・腎・十二指腸・骨筋筋及び家兎末梢血・骨髓の ATP-ase 活性を検索した。

1) 生化学的方法によれば、一般臓器は 100 mg 重量当りの遊離無機燐量で表わして 10 γ 前後の Myosin ATP-ase 活性を示すが骨髓は 6 γ 、末梢血は 1 γ 程度の甚だ低い値であつた。各臓器共 Mitochondrial ATP-ase の活性は Myosin ATP-ase 活性に比し 0.2~3.4 γ 程度低い値を示し、両者の差は末梢血に於て最小で心に於て最大である。

2) 組織化学的方法では冷中性フォルマリン固定凍結切片が実用的に最も簡便でかつ良好な結果を来す。

3) 組織化学的に pH 9.1 に於ける ATP 分解酵素はその賦活剤、阻害剤に対する態度より 4 群に分類し得る。

第 1 群は SH 酵素としての特異的 ATP-ase で心・筋及び骨筋筋の凍結切片に於てのみ証明され、筋原線維に一致した反応が特にその異方性盤の部に強く表われる。

第 2 群は PCMB により阻害されるが Cysteine により影響されないもので凍結切片に於ける腎細尿管上皮細胞基底部分、肝実質細胞及び毛細胞胆管、十二

指腸壁平滑筋等に見られる。

第 3 群は Cysteine により強く阻害されるが PCMB には無関係で Phosphomonoesterase の ATP 分解活性と考えられるもので、パラフィン切片の腎細尿管上皮細胞刷子縁に強く表われる。

第 4 群は Cysteine、PCMB 共に影響を受けない性質のもので、凍結切片、パラフィン切片共、動脈中膜平滑筋及び内膜を始め、諸臓器の色々な場所に出現する反応である。血球の反応もこの群に入れるべきものである。本酵素系作用の本態については更に研究を要する。

4) パラフィン切片で見られる反応は主として上記第 3、4 群に入る酵素作用であり、長時間保温による磷酸カルシウムの拡散と相俟つて凍結切片の染色像との著明な差異を顕すものと考えられる。

5) メタクリール樹脂包埋切片では腎細尿管上皮細胞刷子縁の反応以外のすべての活性が失われる。

6) 白血球の ATP 分解酵素活性は主として原形質に存し、成熟した細胞ほど、高度に出現する。

稿を終るに当たり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾教授に深謝する。実験に際しては岡山大学第 1 生理学教室村上助手に多大の御援助を受けた事を感謝する。尚本研究は文部省科学研究費の援助を受けた。記して謝意を表す。

(本研究の要旨は日本病理学会第 45 回総会に於て報告した)

参 考 文 献

- 1) Engelhardt, W. A. & Ljabinowa, M. N.: Nature, 144, 1939.
- 2) Needham, D. M.: Biochem. J., 36, 1942.
- 3) Bailey, K.: Biochem. J., 36, 1942.
- 4) Bailey, K.: Advances in proteinchem., 1, 1944.
- 5) Banga, I. & Szent-Gyorgyi: Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, III, 1943.
- 6) Laki, K.: Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, III, 1943.
- 7) Banga, I.: Z. für Vitamin, Hormon u. Fermentforsch, 1, 1947.
- 8) Szent-Gyorgyi, A.: Academic Press, New York City, 1947.
- 9) Barron, E. S. G. & Singer, T. P.: Science, 97, 1943.
- 10) Barron, E. S. G. & Singer, T. P.: J. Biol. Chem., 157, 1945.
- 11) Singer, T. P. & Barron, E. S. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 56, 1944.
- 12) Binkley, F., Ward, S. M. & Hoagland, C. L.: J. Biol. Chem., 155, 1944.
- 13) Ziff, M.: J. Biol. Chem., 153, 1944.
- 14) Mehl, J. W.: Science, 99, 1944.
- 15) Bailey, K. & Perry, S. V.: Biochem. et Biophysic. Acta, 1, 1947.
- 16) Roche, J., Thoai, N. V. & L. de Bernard: Am. Chem. Abst., 43, 1949.
- 17) Weber, H. H. & Portzehl, H.: Adv. Protein Chem., VII, 1952.
- 18) Novikoff, A. B., Hecht, L., Podber, E. & Ryan, J.: J. Biol. Chem., 194, 1952.
- 19) 高松等: 満医誌, 41 (附録号), 1942.
- 20) Glick, D. & Fischer, E. E.: Science, 102,

1945.
 21) Moog, F. & Steinbach, H. B.: Science, 103, 1946.
 22) Glick, D.: Science, 103, 1946.
 23) Wang, K. J.: Chinese. J. Physiol., 17, 1950.
 24) Naidoo, D. & Pratt, O. E.: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 14, 1951.
 25) Maenguy-Davies, G. D., Friedennala, J. S. & White, R. T.: J. Cell. Comp. Physiol., 39, 1952.
 26) Padykula, H. A. & Herman, E.: J. Histochem. Cytochem., 3, 1955.
 27) Gomori, G.: J. Cell. Comp. Physiol., 17, 1941.
 28) Wachstein, M. & Meisel, E.: Am. J. Pathol., XXXII, 1956.
 29) 武内, 大河原 医学と生物学, 24, 1952.
 30) Lohmann, H.: Biochem. Z., 202, 1929.
 31) Perry, S. V.: Methods in Enzymol., 2, 1955.
 32) Kielley, W. W.: Methods in Enzymol., 2, 1955.
 33) Fiske, C. H. & Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 66, 1925.
 34) Engelhardt, V. A.: Adv. in Enzymol., 6, 1946.
 35) Barron, E. S. G.: Adv. in Enzymol., XI, 1951.
 36) Frieden, E. & Naile, B.: Fed. Proc., 13, 1954.
 37) Liebknecht, W. L.: Biochem. Z., 303, 1939.
 38) Gordon, J. J.: Biochem. J., 51, 1952.
 39) Kielley, W. W. & Kielley, R. K.: J. Biol. Chem., 200, 1953.
 40) Wachstein, M.: J. Lab. and Clin. Med., 31, 1946.
 41) Kaplow, L. S.: Blood, 10, 1955.
 42) Boivin, P. & Robineaux, R.: Le Sang, 27, 1956.

写 真 説 明

- Fig. 1. 肝, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3時間,
 肝細胞は中等度に黒染し特に核及び細胞膜に強い反応が表れる。かかる反応は肝小葉周辺部及び中心部血管周囲に強くその中間帯に少々弱い傾向がある。動脈壁の染色は見られるが毛細血管, 毛細胆管等の反応は全く見られない。
- Fig. 2. 肝, 同上切片, Gp, 3時間,
 肝細胞の染色は前者に比し弱く, 動脈壁の反応も見られないが, 毛細血管は多数のものが著しく強い黒染を来す。
- Fig. 3. 肝, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 30分,
 肝細胞の反応はパラフィン切片の時と異り, 胞体に強く核及び細胞膜には軽微である。動脈壁の黒染と共に実質内毛細胆管と思われる像が明瞭に認められる。
- Fig. 4. 肝, 同上切片, Gp, 30分,
 肝細胞の反応極めて軽微で, 血管系及び胆管系の染色も殆ど表れない。
- Fig. 5. 脾, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3時間,
 脾髄の細胞は赤色髄, 白色髄の別なく略々様々の中等度の染色を来し, 特に核が強く黒染する。濾泡中心動脈や莢動脈壁も強い反応を示す。
- Fig. 6. 脾, 同上切片, Gp, 3時間,
 淋巴濾泡を構成する細胞は特にその核に強い反応が表れ, 赤色髄の反応は極めて軽微である。濾泡中心動脈壁は黒染されるが莢動脈壁の染色は著しく弱い。
- Fig. 7. 脾, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 15分,
 脾髄の細胞は略々様々の反応を示すが, パラフィン切片に比し核反応が弱く胞体の反応は遙かに強い。濾泡の胚中心のみは他の部分に比し少々染色が弱い。
- Fig. 8. 脾, 同上切片, Gp, 15分,
 パラフィン切片の如く濾泡及び中心動脈のみ強く反応する。

- Fig. 9. 心, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3 時間,
心筋線維は中等度に染色され核は強く黒染する。筋線維の所々を横断する介在盤がよく染め出されている。心筋間質の冠狀動脈壁も強い反応を示す。
- Fig. 10. 心, 同上切片, Gp, 3 時間,
心筋線維の反応は極めて軽微で、核の染色も弱い。間質の毛細血管壁は多数のものが高度に黒染する。
- Fig. 11. 心, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 15 分,
心筋線維は筋原線維に一致した強い黒染を示すが核及び介在盤は染つて来ない。冠狀動脈壁は強く黒染する。
- Fig. 12. 心, 同上切片, Gp, 15 分,
筋線維はもとより、間質の動脈壁、毛細管壁共殆ど染色されない。
- Fig. 13. 骨格筋, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3 時間,
筋線維及び動脈壁に強い反応が見られる。
- Fig. 14. 骨格筋, 同上切片, Gp, 3 時間,
筋線維及び動脈壁の染色は ATP の時に比し遙かに軽微である。
- Fig. 15. 腎, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3 時間,
皮質細尿管上皮主部刷子縁、介在部及び Henle 氏係蹄上皮細胞頂部が強い反応を示し、上皮細胞核及び糸球体も高度乃至中等度に黒染される。髓質の集合管及び乳頭管上皮は核及び細胞質が瀰漫性に極めて軽度染るに過ぎない。腎動脈壁も内膜及び中膜に著明な反応が表れる。
- Fig. 16. 腎, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 15 分,
反応は糸球体に最も強く表れる。細尿管の染色は瀰漫性の感が強く皮質、髓質の別なく共に中等度に染つている。皮質に於ては細尿管上皮の頂部は反応陰性で基底部に少々強い傾向を示す。
- Fig. 17, 18. 腎, 同上切片, Gp, 15 分,
ATP の時と異り皮質、髓質の差が鮮明で髓質の集合管は反応殆ど陰性である。皮質では糸球体は極めて軽度の反応を示すに過ぎないが、細尿管主部上皮刷子縁及び介在部上皮の基底部では強い黒染が見られる。
- Fig. 19. 十二指腸, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3 時間,
十二指腸壁滑平筋層及び粘膜絨毛上皮細胞基底部や絨毛中心部の乳糜管、血管等が強く黒染され、粘膜上皮細胞核の染色も著明である。
- Fig. 20. 十二指腸, 同上切片, Gp, 3 時間,
滑平筋層は反応殆ど陰性で、粘膜上皮細胞に於ても頂部の線条縁に強い黒染が表われる。
- Fig. 21. 十二指腸, 冷中性フォルマリン固定凍結切片, ATP, 15 分,
滑平筋層や粘膜上皮細胞基底部が強く染り、Brunner 氏十二指腸腺上皮細胞の基底部が黒染する。
- Fig. 22. 十二指腸, 同上切片, Gp, 15 分,
滑平筋層は全く染らず粘膜上皮細胞は基底部が中等度に染る程度であるが、Brunner 氏十二指腸腺上皮細胞はその頂部のみが著しく強い黒染を来し、しかも粘膜の表層に近く存するもの程強く深在の腺上皮は殆ど反応を示さない。
- Fig. 23. 家兎末梢血, フォルマリン蒸気固定塗抹標本, ATP, 6 時間,
偽好酸球の殆ど全てのものが高度、中等度或は軽度の反応を示し、反応は主として胞体に限局した略々均等な黒染として表われ、又核の周囲にミトコンドリアを思わせる類円形乃至短桿状の陽性物質の凝集を示すものが多い。リンパ球は大多数反応陰性で少数のものが胞体に極めて軽微な染色を示し、単球は多くのものが胞体に軽度の反応を示す。
- Fig. 24. 家兎骨髓, 未固定スタンプ標本, ATP, 2 時間,
成熟顆粒球の胞体は殆どすべてのものが高度に黒染し核も軽度に共染するものが多い。白血球系幼若細胞もその胞体に種々な程度の染色を来すが、一般に幼若なもの程反応は軽微である。赤血球系の幼若細胞は白血球系のものに比し概して軽度であるが矢張或程度の反応を認め、核の共染はむしろ白血球系細胞より強い。淋巴球及び単球の胞体にも軽度の反応を示すものが多い。

- Fig. 25. 家兎骨髓, 同上標本, ATP, 20時間,
胞体の反応よりも核の染色の方が強い様な像を呈する。
- Fig. 26. 骨骼筋, 冷アセトン固定パラフィン切片, ATP, 3時間,
横紋に一致した強い反応が見られる。
- Fig. 27. 骨骼筋, 同上切片, ATP+PCMB, 3時間,
前者に比し反応の明らかな低下が認められる。
- Fig. 28. 腎, 凍結乾燥パラフィン切片, ATP+Cysteine, 3時間,
細尿管上皮細胞頂部, 刷子縁の反応は著しく阻害されている。
- Fig. 29. 腎, 同上切片, ATP+PCMB, 3時間,
細尿管上皮細胞頂部刷子縁の反応は殆ど影響されない。
- Fig. 30. 腎, 冷中性フオルマリン固定凍結切片, ATP+PCMB, 15分,
細尿管上皮細胞基底部の反応は明かに阻害されるが, 糸球体の反応は影響されていない。
- Fig. 31. 骨骼筋, 冷中性フオルマリン固定凍結切片, ATP+PCMB, 15分,
筋線維の反応は殆ど失われるが血管壁の反応は不変である。
- Fig. 32. 骨骼筋, 同上切片, ATP+PCMB, 15分後,
ATP+Cysteine 30分,
筋線維の反応が著明に回復している。血管壁は前者同様強く染つている。

Biochemical and Histochemical Studies on ATP-ase Activities of Blood and Tissue Cells

Part 1.

Observations on Normal Mice and Rabbits

By

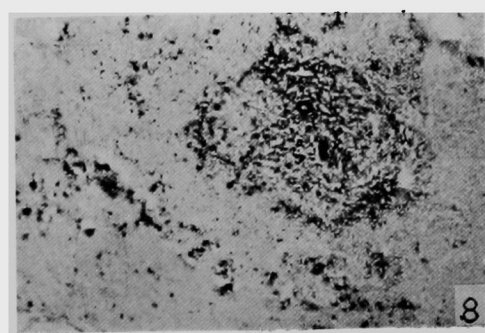
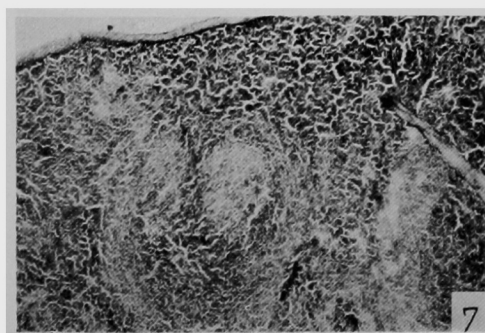
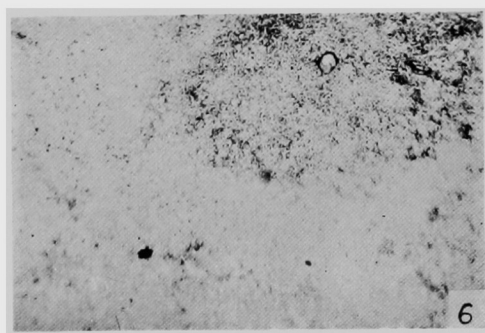
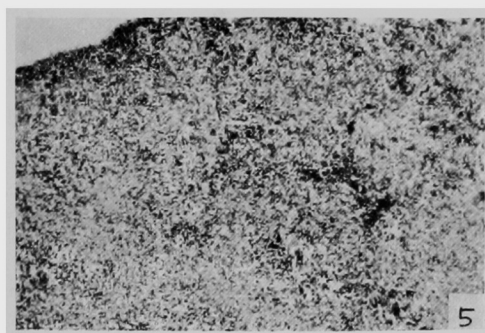
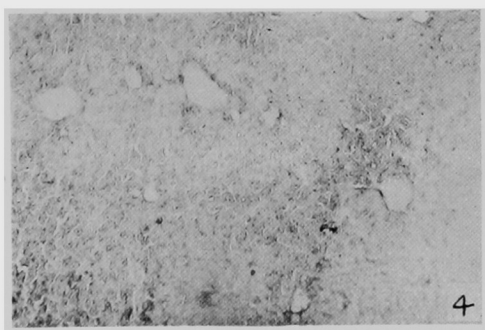
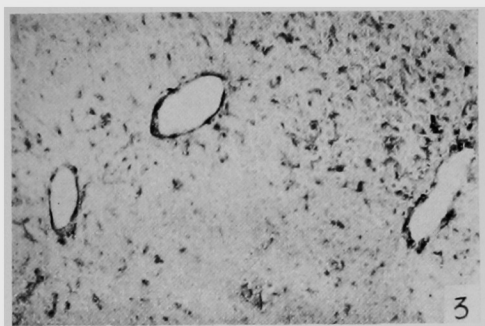
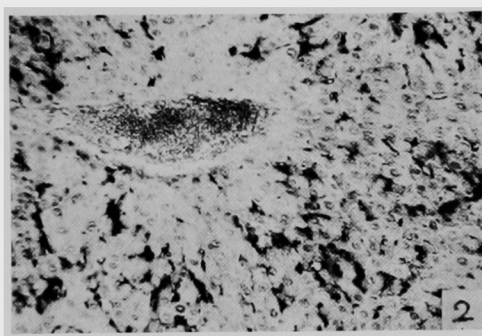
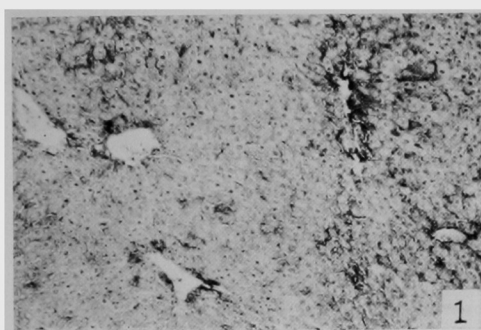
Kyohichiro OHTANI, M.D.

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Satimaru Seno)

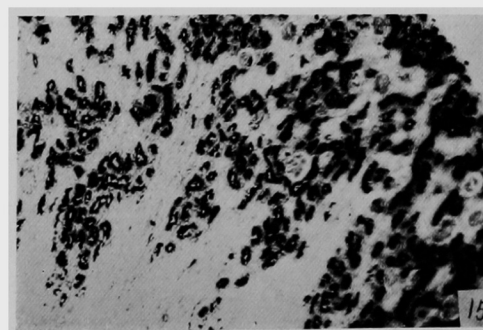
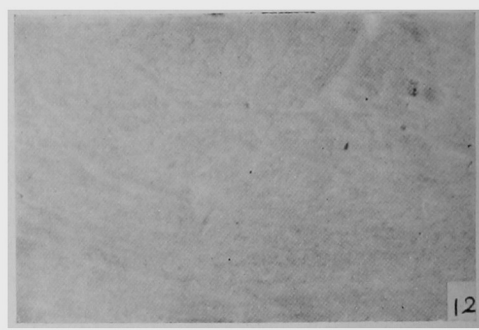
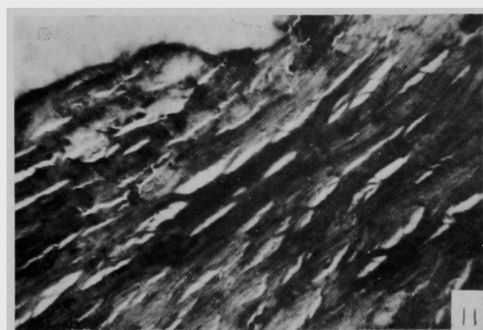
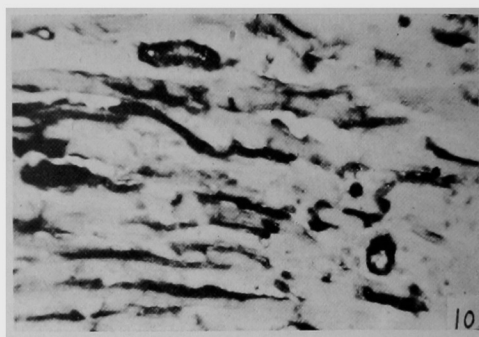
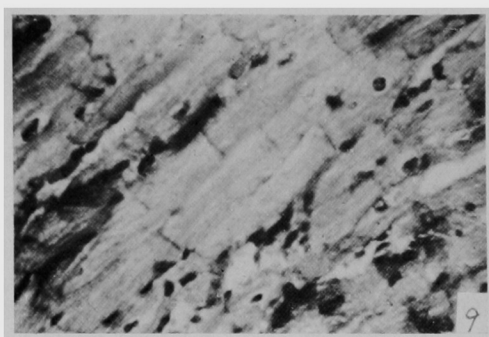
Adenosin-triphosphate (ATP) was obtained from the skeletal muscle of rabbits and dogs with Lohmann's method as Ba-salt. Before use this was changed to Na-salt which was proved to be pure chromatographically. Using this Na-salt as substrate observation on ATP ase activity were carried out in tissues of the liver, spleen, heart, kidney, duodenum and skeletal muscles as well as in blood and bone marrow of rabbits. Chemical analysis proved that various organs and tissues gave myosin ATP-ase activity showing the values specific to each organ, i. e. about 107Pi per 100 mg. of wet tissues of heart muscle, liver, spleen, kidney and duodenum, 67Pi per 100 mg. in bone marrow, quite a low value of about 17Pi per 100 mg. in circulating blood. In every organ the activity of mitochondrial ATP-ase was as low as 0.9—10.37 Pi per 100 mg., quite lower than that of myosin ATP-ase; and as for the differences between the values of myosin and mitochondrial ATP-ases in each organ, it was found that the difference was smallest in peripheral blood and greatest in the heart tissue.

As for the practical application in the histochemical study, frozen slices of formalin fixation are thought to be the simplest and best. According to their reactions against activating agents (cysteine) and inhibitory agents (PCMB), ATP-ase can be divided into four types. The first type is of the typical ATP-ase which is demonstrable only in the frozen slices of cardiac and skeletal muscles, and detected especially in the region of anisotropic disk. This reaction is inhibited by PCMB and reactivated by cysteine. The second type is of those found in frozen slices of basilar part of epithelial cells of renal urinary tubules, liver parenchymal cells and biliary tubules and smooth muscle of duodenal wall. This reaction is inhibited by PCMB but not reactivated by cysteine. The third type is of those appearing at the brush border of epithelial cells of renal urinary tubules of paraffin sections. This reaction is markedly inhibited by cysteine but stands unaffected by PCMB. The fourth type is of those detectable in various portions of tissues such as the smooth muscle of arterial media and intima as well as various viscera. The reaction remains unaffected either by cysteine or PCMB in both the frozen and the paraffin sections. The reaction of blood cells is the one that rightly belongs to this type. Reactions observable in paraffin sections are the enzyme actions mainly belonging to the third and the fourth types; and it is believed the reaction due to phosphomonoesterase (third type) and the unknown enzymes other than true ATP-ase (fourth type). In the case of the slices embedded in methacrylic resin all activities excepting that of the brush border of epithelial cells of renal urinary tubules are lost. The ATP-ase activity of leukocytes is found chiefly in the cytoplasm and it is detected in matured cells to a marked degree.

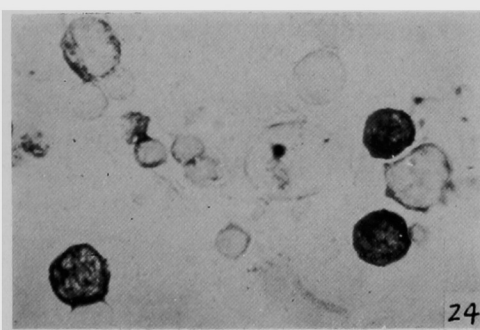
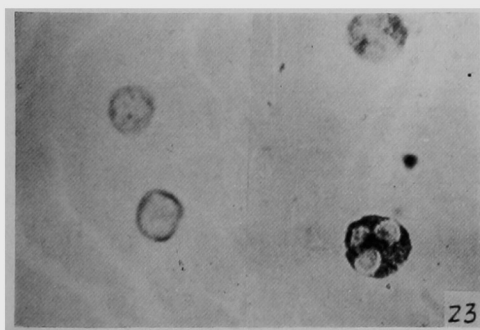
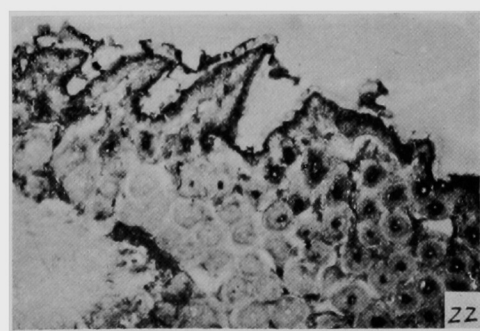
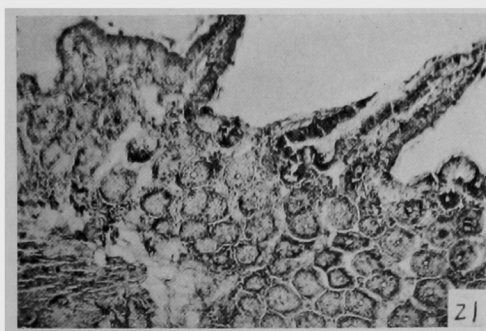
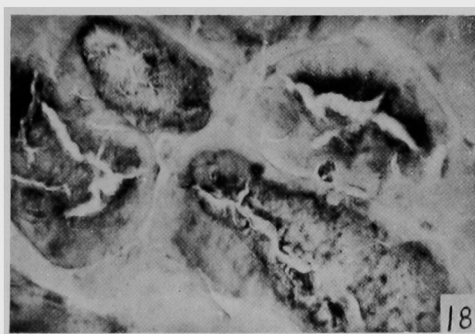
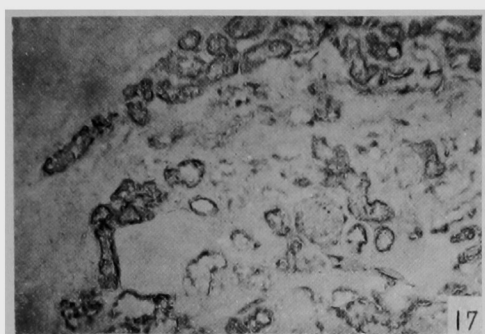
大谷論文附図



大谷論文附図



大谷論文附図



大谷論文附図

