

Title	リパーゼ及びエステラーゼ類の組織化学的研究：新法の考案及び本酵素類の基質特異性に関する一考察
Author(s)	高松, 英雄; 大川, 欣一; 熊沢, 清; 永井, 隆男
Citation	京都大學結核研究所紀要 (1963), 11(2): 98-110
Issue Date	1963-03
URL	http://hdl.handle.net/2433/51894
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

リパーゼ及びエステラーゼ類の組織化学的研究

新法の考案及び本酵素類の基質特異性に関する一考察

高松 英雄, 大川 欣一, 熊沢 清, 永井 隆男

京都大学結核研究所病理学部 (指導 高松英雄教授)

生体内で行われている物質代謝に於ける酵素の役割が極めて重要であることは周知のことである。酵素作用の関与しない化学反応は生体内では、先ずあり得ない。『酵素の存在なしには、生命はあり得ない』と云う言葉は蓋し、誠に至言と言うべきである。

近年に於ける酵素化学の急速な進展により、生体内物質代謝の諸過程が漸次解明されつつあるが、他面、酵素の組織化学も亦、近年長足の進歩を遂げつつある。

扱て、生体内脂質代謝を動的に追求するためには、本物質の生体内物質代謝に関与している諸酵素について、その性状及び臓器組織のどの細胞にこれらが存在し、またどのように働いているかと云うことについて、即ち、組織化学的に研究を行うことが必要であり、著者等は、長年、これに関して研究を重ねて来た。

脂質代謝に関与している酵素として、先ず第一に所謂狭義のエステラーゼ及びリパーゼが挙げられる。水酸基を有する2個の物質が脱水縮合して、酸素橋で連結した形の物質をエステルと云い、この結合をエステル結合と云う。この結合の部分に水が加わり、分離して元の各々の水酸基をもつ2個の物質に解離することを加水分解と云い、この反応を触媒する酵素があったとすると、これはエステル加水分解酵素、即ち、エステラーゼ (広義) と名付けられなければならない。しかし乍ら、今日の成書は、古い時代の用語を盲目的に踏襲し、言語内容は甚しく混乱している。即ちエステラーゼ (狭義) の名は通常一価アルコール類と低級脂肪酸とのエステルを加水分解するものを指し、リパーゼは三価アルコールであるグリセリンと3個の高級

脂肪酸とのエステル、即ち、中性脂肪を加水分解する酵素を指している場合が多い。しかしながら、これら両酵素の基質特異性は可成り曖昧なものであり、現在のところ、一般生化学的な立場からは明確な区別はつけられていない。所謂エステラーゼは中性脂肪を或る程度加水分解しうるし、また、リパーゼも一価アルコール類の低級脂肪酸エステルを或る程度加水分解しうる。然して、この両者については、いずれの基質をより速かに分解しうるかと云う点を重要な相違点としているものがあるが、しかし、両者の基質はともに脂肪酸のエステルであり、基質の化学構造と酵素の酵素作用との関連性は合理的に解決されなければならない。エステラーゼ (狭義) 及びリパーゼに関する組織化学的研究は、今日までに、国の内外に於いて数多く報告せられていて、全く枚挙に遑がない。しかし乍ら、これら内外からの多くの報告を検討してみると、特に、今上に述べた酵素の基質特異性の面からみると、誠に奇怪至極な研究が多い。生体内に於ける物質代謝機転を自然現象として追求するためには、広範な基礎的研究が必要である。

著者等は多年エステラーゼ類一般の基礎的研究のための新しい組織化学的証明方法を求めて来たが、先づ、脂肪酸の炭素鎖に関する問題を解くための新法を考案した。

本研究に於いて用いた基質類は後述のごとく水には極めて難溶であるとする大きな欠点をもっているのであるが、この困難は優れた乳化剤であるステロックス SK を使用することによって克服された。

この新法によって、著者等の目標としていた

ところの、酵素作用と基質の化学構造との関連性を総合的に観察することが可能となった。

実験材料及び実験方法

実験に使用した臓器組織は成熟雄ラットの肝、腎、胃及び脾の四種類である。今回は新鮮未固定組織切片に於ける組織化学的反応を観察するのが主目的であるので、大多数の組織切片標本の作製は通常の如く行った。即ち、断頭屠殺直後、各臓器の小組織片を作り、直ちに -20°C に保ってあるクリオスタット中にて厚さ $10\sim 15\mu$ の切片標本とした。一部の組織切片標本は次のようにして作製した。屠殺直後、各臓器の小組織片を作り、これを冷アセトン中で24時間（アセトンを3回交換）脱水し固定、通常の如く、融点 50°C 前後の軟パラフィンに包埋して作製した。

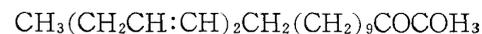
酵素反応の基質としては比較的短鎖の一価アルコールであるメチルアルコール、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、ノルマルブチルアルコール等と比較的炭素数の多い飽和及び不飽和脂肪酸であるラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸及びオレイン酸その他のエステル類十数種類を用いた。即ち、それらの基質名を以下に一括すると、

- ① ラウリン酸メチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}_3$
- ② ラウリン酸エチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOC}_2\text{H}_5$
- ③ ミリスチン酸メチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOCH}_3$
- ④ ミリスチン酸エチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOC}_2\text{H}_5$
- ⑤ ミリスチン酸イソプロピル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$
- ⑥ ミリスチン酸ノルマルブチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOC}_4\text{H}_9$
- ⑦ パルミチン酸メチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_3$
- ⑧ パルミチン酸エチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOC}_2\text{H}_5$
- ⑨ パルミチン酸イソプロピル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$
- ⑩ ステアリン酸メチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOCH}_3$
- ⑪ ステアリン酸エチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOC}_2\text{H}_5$
- ⑫ ステアリン酸ノルマルブチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOC}_4\text{H}_9$
- ⑬ オレイン酸メチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}:\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$
- ⑭ オレイン酸エチル
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}:\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$

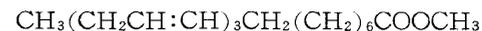
- ⑮ オレイン酸ノルマルブチル



- ⑯ リノール酸メチル



- ⑰ リノレイン酸メチル



以上列挙した脂肪酸エステル類は水には極めて難溶であるため、これらを酵素反応の基質として使用するためには、充分良好な乳化液とされなければならない。このために、乳化剤として種々の物質を探索した結果、非イオン性界面活性剤であるステロックス Sk が最も良好な乳化剤であることを見出し、これを使用した。

緩衝液としては pH7.4~pH8.0 に調整した M/10 トリシュー塩酸緩衝液又は M/10 ベロナール緩衝液を使用した。

酵素活性証明のための基質液は下記の如くして作製する。即ち、

- (1) アセトン 5cc に基質を 1cc 溶解する。
(基質の中には常温では固状を呈しているものがある。これらは $50^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ の孵卵器中で加温し、液状となったものを使用する)。
- (2) M/10 トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.4~pH8.0)
〔又は M/10 ベロナール緩衝液〕 20cc
2%塩化カルシウム水溶液 3cc
3%ステロックス SK 水溶液 1.5~2.0cc
蒸溜水 17.5cc

(2)液を 37°C に加温しておく。この(2)液を充分振盪しつつ、これに(1)液を1滴ずつ、滴下しながら加える。(2)液に加える(1)液の総量は約 3cc である。(1)液を加え終えてから、数分間(2)液を充分振盪し、乳濁化しなければならない。充分乳濁化されたものは稀薄な乳白色を呈するに至る。この充分良好な乳化液となったものを酵素反応の基質液として使用する。ただし、この際、基質液の上部表面に余分の基質が滓状に浮遊することがある。その場合にはガーゼ数枚を重ねたもので濾過するか又は目のあらい濾紙で濾過したものを使用する。滓状物があると酵素反応にも悪影響を及ぼし、又、出来上りの標本もきたないものとなるからである。

各種基質について、組織切片標本を浸漬して、酵素反応を行わせた時間は下記の如くである。

基質名	浸漬時間
ラウリン酸エステル	45分, 1時間15分, 2時間3時間
ミリスチン酸エステル	1時間, 1時間30分, 2時間20分, 3時間30分
パルミチン酸エステル	1時間30分, 2時間15分, 3時間, 4時間
ステアリン酸エステル	2時間, 2時間30分, 3時間20分, 4時間30分
オレイン酸エステル	2時間, 2時間30分, 3時間20分, 4時間30分
リノール酸エステル	2時間15分, 2時間45分, 3時間30分, 4時間50分
リノレイン酸エステル	2時間30分, 3時間30分, 4時間30分, 5時間30分

以上の浸漬時間は新鮮未固定組織のクリオスタット切片について酵素反応を行う場合である。冷アセトン軟パラフィン包埋組織切片について酵素反応を行う場合には、浸漬時間は当然延長せられ、基質の種類によって異なるが大約12時間～48時間である。尚、冷アセトン固定、軟パラフィン包埋組織切片で酵素反応を行う場合の詳細は他の機会にゆずる。

酵素反応はすべて 37°C に保ってある孵卵器中で行われた。

これらの酵素作用に対する阻害剤及び賦活剤はこれまでに種々報告されて来ており、それらの中には或る程度酵素に対する特異的阻害作用または賦活作用の認められているものもあるが、今回の実験では胆汁酸塩であるコール酸ソーダ及びタウロコール酸ソーダの2種類についてだけ観察を行った。

対照標本は前述した基質液から基質だけを除いた液に浸漬し、他は同様に操作して作製された。

酵素反応の証明術式は以下の如くである。

- (1) 組織切片標本を 37°C の孵卵器中で基質液に浸漬する（浸漬時間は各々使用する基質の種類によって異なるのは当然である）。
- (2) 蒸留水を数回交換して、組織切片標本を充分水洗し、余分の基質液を除去する。
- (3) 1～2%硝酸鉛水溶液に5～10分間切片標本を浸漬する。
- (4) 蒸留水を5回交換して、充分水洗し、余分の硝酸鉛水溶液を除去する。
- (5) 稀釈黄色硫化アンモニウム溶液中に3～5分間浸漬する。
- (6) 蒸留水（又は水道水）で充分水洗する。
- (7) グリセリンゼリー又はアパチー氏ゴムシロップにて封入する（封入の前にホルマリン固定を行っ

てもよい。又、冷アセトン固定標本では脱水、透徹してカナダバルサムで封入するとより）。

結果として、酵素反応陽性部位は茶褐色の着色を呈する。

結 果

- (1) 各種基質類を使用した場合の酵素反応の局在分布について。

① ラウリン酸メチルエステル及びラウリン酸エチルエステルを夫々基質とした場合の終末反応産物は少々粗大な針状結晶であるため、微細にわたる細胞学的単位での正確な局在を知ることには困難であるが、しかし、組織学的単位では良好な局在性を知ることには極めて容易である。冷アセトン、軟パラフィン包埋切片では、終末反応産物の粗大な針状結晶の性状は更に著しく、新鮮未固定組織クリオスタット切片と比較すると結果はよくない。

扱て、これらを基質とした時に、酵素作用陽性を示す反応部位は以下の如くである。即ち、肝に於いては肝実質細胞に強陽性であり、この際、一見困難であるが詳細に検索すれば核は陰性であって、強陽性反応を呈するのは細胞質であることが判明する。一個の肝小葉について観察すると、余り明らかではないが、中心帯に於いて多少反応が強いことがわかる。小葉間胆管、血管系及び小葉間結合組織等には陽性反応は認めない。

腎では、糸絨体及び糸絨体囊には陽性反応は認められず、尿細管に於いては主部の曲部及び直部・中間部の曲部及び直部の上皮細胞に於いては酵素作用は肝より多少劣るがほぼ強陽性反応を呈する。ただし、この場合にも核には酵素反応は陰性であった。同様に、血管系及び結合組織には陽性反応は認められなかった。

胃では粘膜上皮細胞及び腺細胞で中等度の陽性反応が認められるが、核では陰性である。粘膜下層及び筋層に於いても反応は全く陰性である。

膵に於いては全般に反応は弱く、外分泌部膵細胞が弱陽性反応を示し（核は陰性）、内分泌部即ち、ランゲルハンス氏島細胞では明確な陽性反応は認められない。また、膵管上皮細胞及

び小葉間結合組織には陽性反応を認めない。

以上、実験に供した四臓器組織における酵素反応を比較してみると、肝及び腎に於ける反応が最も強く、強陽性と云うことが出来る（ただし、腎では肝に比較すると少々弱い）。胃粘膜に於ける反応は少々弱く、中等度の陽性反応と云える。

膵では最も弱く、弱陽性反応と云うことができる。

㊸ ミリスチン酸メチル、ミリスチン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル及びミリスチン酸ノルマルブチルの四種類のエステルを基質として使用した場合には、その終末反応産物の形態は矢張り針状の結晶であるが、その大きさが少々微細であるために、ラウリン酸エステルを基質として使用した場合と比較すると多少微細な局在性の判定も可能である。

この場合も、新鮮未固定標本の方が冷アセトン固定標本より良好な結果を与える。

各臓器組織に於ける酵素反応の分布は前者、即ち、ラウリン酸エステルを基質とした場合と殆んど同様である。しかし、終末反応産物が前者より微細であるので、得られる標本の組織学的構造はよく保たれ、組織化学的検索には良い結果を与える。

㊹ パルミチン酸メチル、パルミチン酸エチル及びパルミチン酸イソプロピルを基質とした場合には、陽性反応終末産物は少々阻大ではあるが、その形態が顆粒状の結晶であるため、組織化学的検索では、前二者に比較して良好な局在性を示している。

この場合には、新鮮未固定組織標本より冷アセトン固定標本が極めて優れた結果を与える。即ち、写真に見られる如く、組織構造が充分保たれており、終末反応産物の形態・大きさも顕微鏡的検索に適している。核が陰性であることは一目瞭然である。

各臓器組織に於ける酵素反応の分布は前二者と殆んど同様であるので省略する。

㊺ ステアリン酸メチル、ステアリン酸エチル及びステアリン酸ノルマルブチルの各エステルを基質として使用した場合の終末反応産物は

微細な顆粒状結晶であるため、微細な細胞学的単位まで良好な酵素活性の局在を得ることができる。

前三者と比較すると最も正確に酵素の局在性が判る。

肝、腎、胃及び膵の各臓器組織に於ける酵素反応陽性の局在部位は前三者と殆んど同様である。

㊻ オレイン酸メチル、オレイン酸エチル及びオレイン酸ノルマルブチルの各種エステルを基質として使用した場合には陽性反応終末産物は前者、即ち、ステアリン酸エステルの場合と同様に微細な顆粒状結晶であるため、得られる酵素反応の局在部位の所見は極めて良好である。不飽和脂肪酸であるオレイン酸のエステルを基質とした場合の各種臓器組織内における酵素反応部位の分布は前者、即ち、ラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル及びステアリン酸エステル等の飽和脂肪酸のエステル類を基質として使用した場合の酵素反応分布とは著しい相違を示している、極めて特異的である。即ち、肝、腎及び胃に於ける酵素作用は極めて弱く、肝、腎に於いては中等度の陽性反応を認めるが、胃に於いては更に弱い反応を認めるにすぎない。これに反して、膵外分泌部の膵細胞に於ける酵素作用は著しく強く、強陽性反応を認める。この場合にも核は陰性である。

以上の如く、オレイン酸エステルを基質とした場合と飽和脂肪酸エステルを基質とした場合とを比較すると、各臓器組織の酵素作用の強さには著しい相違が認められるが、酵素反応の各組織内分布には殆んど相違は認められない。

このことは、基質となる物質の脂肪酸部分の化学構造と関連して、極めて特異な所見である。

㊼ 二重結合を二個有しているリノール酸メチル及び二重結合を三個有しているリノレイン酸メチルの各不飽和脂肪酸を基質とした場合には、今回の実験で行われた浸漬時間の範囲内では、いずれの臓器組織においても認めうる程の陽性反応は得られなかった。これも基質の脂肪

酸部分の化学構造即ち、脂肪酸部分の不飽和度と関連して興味ある問題であり、今後解決されるべきものである。

① 以上は各種基質類の脂肪酸部分に注目して観察した所見であるが、エステルのもう一方の構成々分であるアルコール部分の分子構造の点から観察するとアルコール部分の炭素数が増加して、鎖が長くなると、それに従って、酵素反応の強さが減弱する傾向が認められる。即ち、エステルの脂肪酸部分を構成する脂肪酸が同種類のものであっても、一方のアルコール部分を構成しているアルコールがメタノール、エタノールと炭素数が増加して、鎖が長くなると酵素反応が漸次減弱していく傾向が認められる。このことは極めて重要な所見であって、著者等の新法によって、始めて明らかになったものである。

表 I 各種基質類を使用した場合の各臓器組織に於ける組織化学的反應の比較一覧表

F	A 使用名 臓	メタノール	エタノール	イソプロパノール	ブタノール
		ラウリン酸	++++	+++	
	腎	+++	++		
	胃	+++	++		
	膵	+++	++		
ミリスチン酸	肝	++++	+++	+++	++
	腎	+++	++	++	+
	胃	++	+	-	-
	膵	++	+	-	-
パルミチン酸	肝	++++	+++	++	
	腎	+++	+++	++	
	胃	++	+	+	
	膵	++	+	+	
ステアリン酸	肝	++++	+++	++	
	腎	+++	++	+	
	胃	++	+	+	
	膵	++	+	+	
オレイン酸	肝	++	++		+
	腎	++	+		+
	胃	++	+		+
	膵	++++	+++		++

++++: 強陽性, +++: 中等度陽性, ++: 弱陽性, +: 痕跡的陽性, -: 陰性,
A: エステルのアルコール成分
F: エステルの脂肪酸成分

のである。

以上の①—①までの成績を一括して表 I に概略する。

以上の何れの場合にもコントロールでは反応はすべて陰性であった。

(2) 各種基質類を使用した場合の切片標本の浸漬時間について。

① ラウリン酸メチルを基質とする場合には浸漬時間は45分から1時間15分までで充分良好な反応をうることができ、これ以上浸漬して酵素反応を行わせると逆に反応が強すぎて、組織化学的検索には不適當である。この傾向は特に肝、腎に於いて著明である。従って、この場合の浸漬時間は（勿論、使用する臓器組織の種類によっても異なるが）大約1時間と見ておいて大過はない。

ラウリン酸エチルでは浸漬時間を幾分長くする必要があり、大体1時間30分とみて差支はない。しかし、2時間、3時間と浸漬時間を長くしてもメチルエステルを基質とした場合に匹敵する程強い反応は得られなかった。

尚、この場合でも組織化学的検索には充分良好な結果を挙げることができる。

② ミリスチン酸メチルエステルを基質とした場合には、浸漬時間は1時間30分位が適當であり、2時間20分では反応が少々強すぎる。この場合にも、この傾向は肝、腎で著明であり、これらの臓器組織を扱う場合には特に浸漬時間が長すぎないように注意しなければならない。浸漬時間はおおよそ1時間30分から2時間とみて差支はない。

ミリスチン酸エチルを基質とした場合には浸漬時間が多少延長され、2時間30分から3時間位が適當であり、良い結果を納めることができる。

ミリスチン酸イソプロピル及びミリスチン酸ノルマルブチルエステルを基質とする場合は浸漬時間を3時間30分位にしても肝、腎では適當な強さの反応が得られるが、胃及び膵では殆んど認める程の陽性反応は見られない。

③ パルミチン酸メチルを基質として使用する場合の浸漬時間は大体において、2時間15分

表Ⅱ 組織化学的反應の至適浸漬時間一覧

基 質 名	浸 漬 時 間
ラウリン酸メチル	45分～1時間15分
ラウリン酸エチル	1時間30分
ミリスチン酸メチル	1時間30分～2時間
ミリスチン酸エチル	2時間30分～3時間
ミリスチン酸イソプロピル	3時間30分～4時間
ミリスチン酸ノルマルブチル	3時間30分～4時間
パルミチン酸メチル	2時間30分～3時間
パルミチン酸エチル	3時間30分
パルミチン酸イソプロピル	4時間
ステアリン酸メチル	3時間20分～4時間
ステアリン酸エチル	4時間30分
ステアリン酸ノルマルブチル	4時間30分～5時間
オレイン酸メチル	3時間～3時間30分
オレイン酸エチル	4時間～4時間30分
オレイン酸ノルマルブチル	4時間30分
リノール酸メチル	
リノレイン酸メチル	

※上の浸漬時間は本文で触れてあるごとく、使用する臓器組織の種類によって多少ことなる。リノール酸メチル、リノレイン酸メチルについては今後明らかになることが解るであろう。

で良好な結果が得られるが、おおよそ2時間30分から3時間の見当で行うのがよい。3時間以上になると、特に肝において過染の傾向が著明である。パルミチン酸エチルを基質とする時には、ほぼ3時間30分位の浸漬時間が適當である。パルミチン酸イソプロピルを基質とする場合には浸漬時間は4時間位でよいが、この際には、胃及び脾では極めて微弱な反応しか認められない。

㊦ ステアリン酸メチルを基質とする場合には、浸漬時間は3時間20分から4時間程度で適當な陽性反応をうることができる。ステアリン酸エチルを基質とする場合には、4時間30分位の浸漬時間で充分である。ステアリン酸ノルマルブチルエステルの場合には4時間30分から5時

間浸漬すると肝、腎では適當な反応が得られるが、胃及び脾では極めて微弱な反応を認めるにすぎない。

㊧ オレイン酸メチルを基質とする場合は浸漬時間を3時間から3時間30分位とすると良好な結果が得られる。オレイン酸エチルを基質とする場合には4時間から4時間30分位の浸漬時間で充分である。オレイン酸ノルマルブチルでは4時間30分の浸漬時間で、脾を除く肝、腎及び胃においては極めて微弱な反応を見るにすぎない。

㊨ リノール酸メチル及びリノレイン酸メチルを基質とした場合には各浸漬時間に於いても殆んど認めるほどの陽性反応は見られない。しかし、本物質は比較的酵素作用をうけにくいものであるから、浸漬時間を更に延長する等の色々の事項について今後つづいて検討する必要がある。

各種基質類を使用する場合の適當な浸漬時間は表Ⅱに要約してある。上述の浸漬時間はすべてクリオスタット切片を用いるときのものである。冷アセトン固定、軟パラ切片のときについては別の機会にまとめることにする。

以上述べた所を要約すると、浸漬時間は基質となるエステルの構成々分である脂肪酸部分の炭素数が増加して、鎖が長くなるに従って、延長するが、同様に、脂肪酸部分が同じであっても、一方の構成々分であるアルコール部分の炭素数が増加するに従って、浸漬時間は矢張り延長されるのである。

(3) 酵素作用に及ぼす胆汁酸塩の影響について。

コール酸ソーダもタウロコール酸ソーダもその化学的性質は殆んど差がないので、胆汁酸塩として一括して述べる。

胆汁酸塩類は本酵素類の研究に以前からよく使用せられている物質であり、エステラーゼ(狭義)に対しては抑制的作用を有し、(阻害剤)、リパーゼに対しては促進的作用を及ぼす(賦活剤)として、一般に認められているので、胆汁酸塩類に対する作用態度によって、その酵素の種別を推測できるはずである。

飽和脂肪酸であるラウリン酸, ミリスチン酸, パルミチン酸及びステアリン酸等の各エステルを基質として用い, 胆汁酸塩を基質液に含ませない場合には, 酵素反応は肝及び腎においては強陽性であり, 胃においては中等度陽性であるが, 膵においては弱陽性である。しかし, これらの基質液に胆汁酸塩類を加えると, 肝, 腎及び胃における酵素作用は著明に減弱し, 反対に膵に於いては酵素作用は著明に増強される。

表 III

胆汁酸塩の作用。
各エステルを基質とし, 各臓器組織について組織化学的反応を行った際の

基質名	使用臓器名	胆汁酸塩作用
ラウリン酸 エステル	肝	—
	腎	—
	胃	—
	膵	+
ミリスチン酸 エステル	肝	—
	腎	—
	胃	—
	膵	+
パルミチン酸 エステル	肝	—
	腎	—
	胃	—
	膵	+
ステアリン酸 エステル	肝	—
	腎	—
	胃	—
	膵	+
オレイン酸 エステル	肝	—
	腎	—
	胃	—
	膵	+

—: 阻害作用のあることを示す。
+: 賦活作用のあることを示す。

亦, 不飽和脂肪酸であるオレイン酸エステルを基質とした場合には, 膵における酵素作用は肝, 腎及び胃におけるよりもはるかに強いのであるが, この基質液に胆汁酸塩を加えると, 膵に於ける酵素作用は著明に増強されるが, 逆に肝, 腎及び胃に於ける反応は著しく減弱される。この際, 基質液に加える胆汁酸塩類の最終濃度は 0.005% である。

この胆汁酸塩類の酵素作用に及ぼす影響は基質分子の化学構造と関連

して極めて重要な所見である。

考 按

現在, エステラーゼ類の組織化学的証明に使用可能な基質としては, アゾ色素法の際の特殊基質には別種の問題があり, この問題は別個に扱うことにするが, Gomori 氏により紹介された Tween 類及び Sorbitan 類 (この中には水に難溶のものがある) が水溶性であるので, 実

用に供せられているが, 基礎的問題としての酵素作用と基質の化学構造との関連性を研究するには多くの不適当な性状を有している。

著者等は多年この問題の解決に努力し, 系統的に種々の化学構造の基質を使用して実験する方法を求め, 略々目的地に到達したと言われよう。

著者等が基質として使用した各種エステル類は極めて水に難溶性であるため, そのままでは組織化学的研究のための基質として使用できない重大な欠点を持っている。著者等はこの困難を乗り越えるべく努力を重ね, 非イオン性界面活性剤であるステロックス Sk を用いた。即ち, これらの基質類は極めて水に難溶であるために, 充分良好な乳化液とされなければならない。そのためには, 強力であって, しかも酵素作用に対しては有害作用のない乳化剤が必要であり, この目的にはステロックス Sk が極めて優れていることが証明された。

著者等の成功の第一の要因はステロックス SK と云う優れた乳化剤を用いた点にある。水溶性でない基質を用いたものとして, 倉田・細氏のオリーブ油を基質とした研究があるが, Gomori 氏が指摘している様に, この方法では, 水溶性ないしは十分に乳濁化できないので, 極めて不満足な結果に終るにすぎない。

著者等の新組織化学的方法による研究結果から明白である如く, 各臓器組織内に於ける酵素作用は基質の脂肪酸成分の化学構造上の変化に従って, 極めて特異的な変動を行うものである。しかし, 基質の他方の構成々分であるアルコール部分の化学構造上の変化, 即ち, 炭素数の増減に従って, 明らかに特徴的变化を営むものである。脂肪酸部分が同一であっても, アルコール部分の炭素数が増加して, 鎖が長くなると酵素作用は漸次減弱し, 酵素反応時間を延長しなければ, 充分な反応が得られなくなる。かくのごとく, アルコール部分の化学構造上の変化による, 特異な酵素作用の変動は, 従来, 用いられて来た Tween 類を基質とする方法では判明し得なかつたことであって, 本法によって始めて可能となった。また, Tween 類は純粋

に化学的に合成せられたものであるが、著者等が使用したエステル類は自然界に存在しているものとの関連性が濃厚で、この点においても従来使用された Gomori 氏の方法では解決できなかった多くの問題を解決しうる可能性がある。

かくの如く、各種のエステル類を基質として組織化学的研究を行うことが可能になったので、従来、ややもすると曖昧であった本酵素類の基質特異性の問題を解決するために、今後広範な系統的観察が企画できるようになった。これは極めて大きい進歩であろう。

エステラーゼ類に対する阻害剤及び賦活剤として以前から報告されているものには色々のものがあるが、今回は胆汁酸塩類であるコール酸ソーダ及びタウロコール酸ソーダを使用した。胆汁酸塩類はエステラーゼ（狭義）作用を阻害し、リパーゼ作用を賦活せしめるとされているので、これらの酵素識別に或る程度役立てよう。即ち、表Ⅲに示しているごとく、明らかに特異的な所見が得られている。

勿論、胆汁酸塩に対する態度のみから決定的な結論を導きだすことは早計であるが、飽和脂肪酸エステルを基質とした場合の陽性反応部位はエステラーゼ（狭義）反応の局在部位に近似し、又、不飽和脂肪酸エステルを基質とした時の陽性反応部位は所謂リパーゼの局在を示し、更に不飽和脂肪酸エステルを基質とし、胆汁酸塩を用いる場合の陽性反応は略々所謂リパーゼの局在に該当するごとくである。

浸漬時間に関してこれをみると、要点はすでに述べつくされているが、ただ二重結合を二個有するリノール酸メチル及び三個有しているリノレイン酸メチルの使用実験は更に長時間の浸漬時間について観察する必要があると思われる。これは今後の問題である。

結 論

(1) 飽和及び不飽和高級脂肪酸と比較的短鎖の一価アルコールとのエステル類十数種を基質

として用い、エステラーゼ類のための組織化
(2) 以上用いた基質類は水には極めて難溶性で学的証明方法を考案した。即ち、

あるので、非イオン性界面活性剤であるステロックス SK を用いることによって、略々完全な乳濁液とすることができた。

(3) 酵素作用は、基質の脂肪酸部分の化学構造上の変化にしたがって、特異的変動を行うが、同様にアルコール部分の化学構造上の変化によっても、特徴的な変化を受けることを明らかにし得た。

(4) 著者等の用いた基質類を用い、更に阻害剤及び賦活剤等を応用し、これらに働く酵素類を総合的、かつ、系統的に観察することが可能となった。

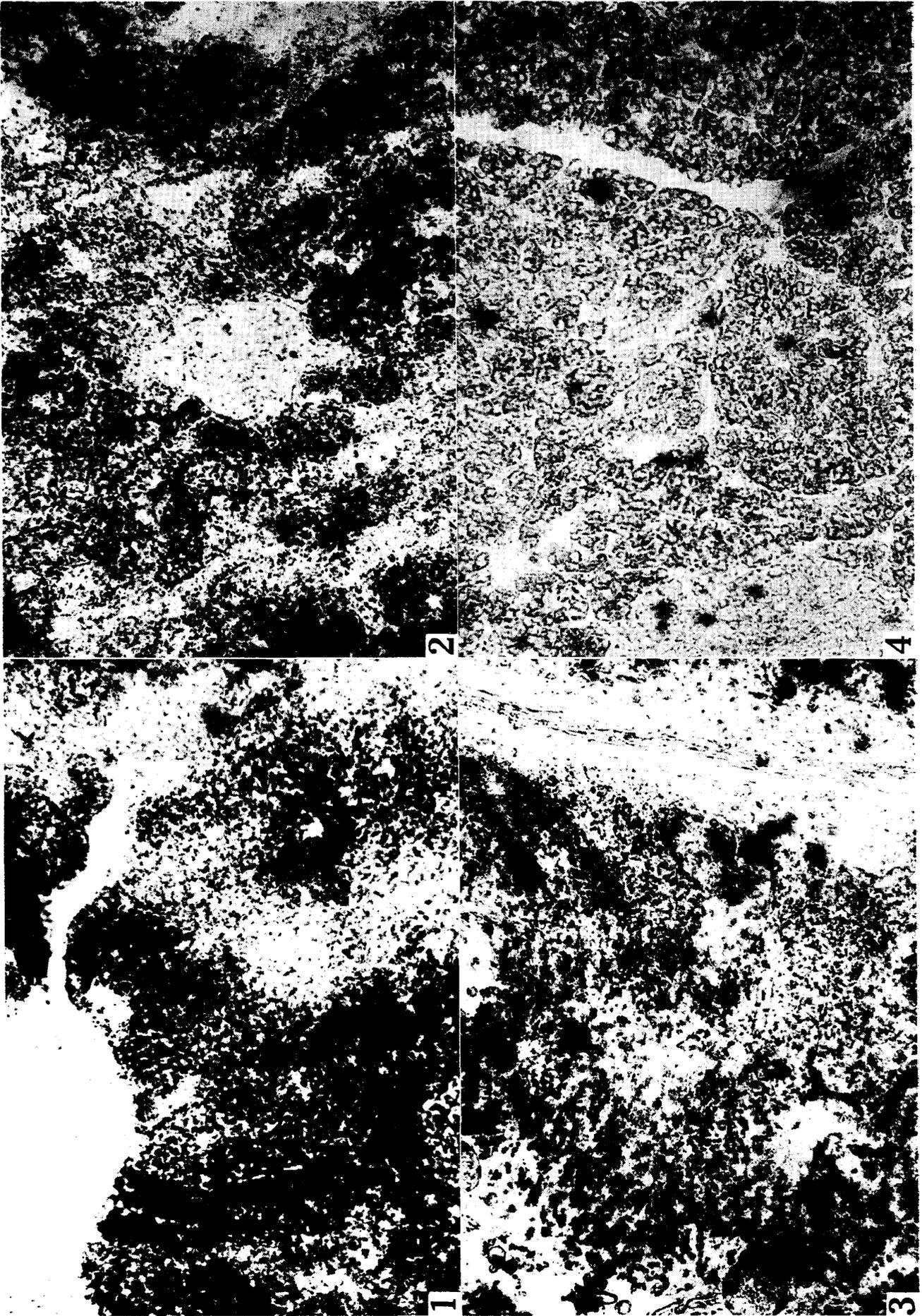
※ステロックス SK は米国 Monsanto Chemical Company の好意によって提供させたものである。ここに深甚なる謝意を表す。

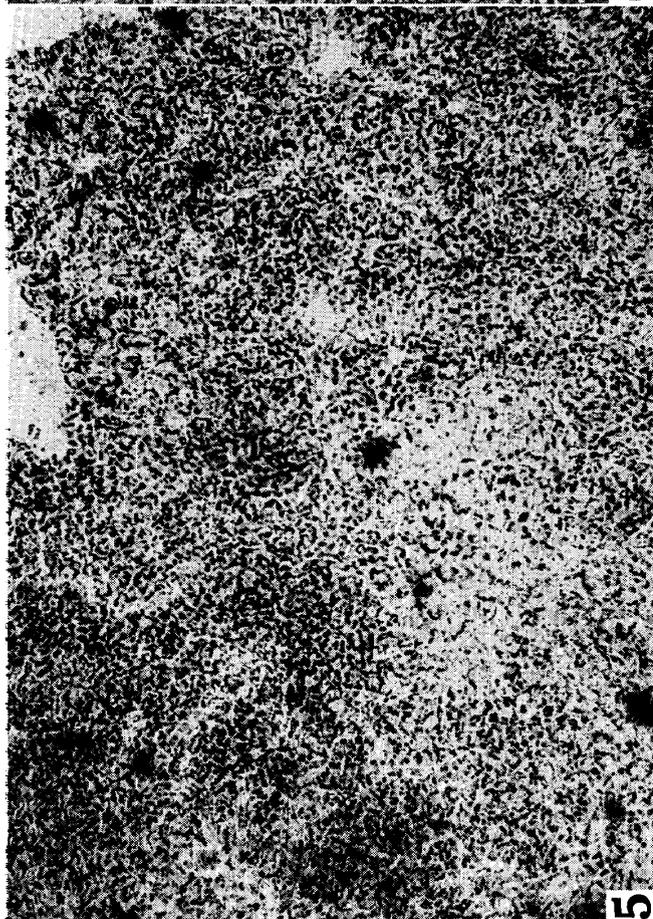
文 献

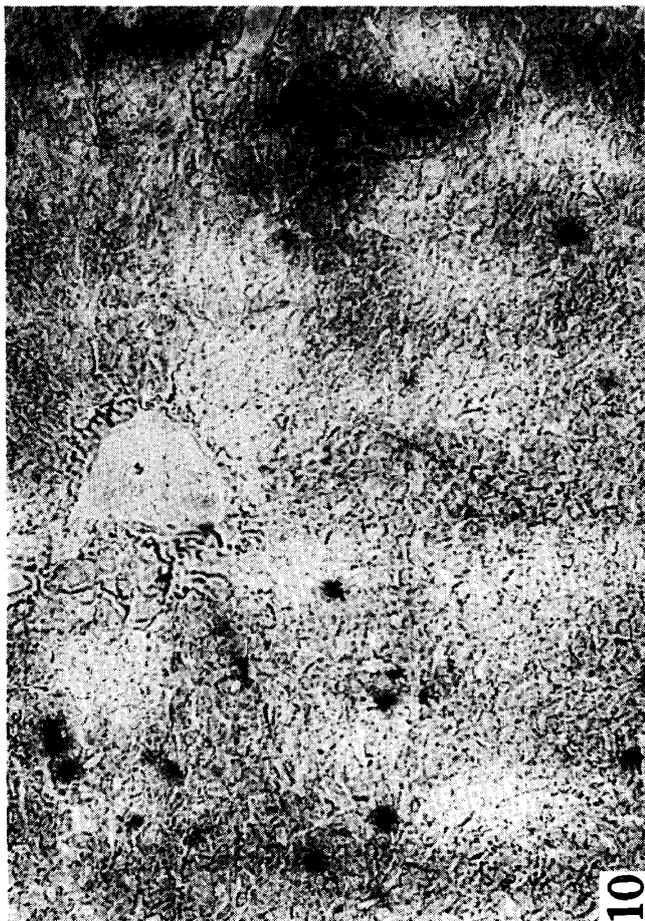
- 1) Willstätter, R. and Memmen, F. : Ztschr. f. physiol. Chem., 138: 216, 1924.
- 2) Gomori, G. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 58:362, 1945.
- 3) Nachlas, M.M., and Seligman, A.M. : J. Biol. Chem., 181: 343, 1949.
- 4) Seligman, A.M., Nachlas, M.M., and Molloms, M.C. : Am. J. Physiol., 159: 337, 1949.
- 5) Gomori, G. : Arch. path., 41 (2) ; 121, 1946.
- 6) Gomori, G. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 67: 697, 1949.
- 7) 倉田, 細 : リパーゼの組織化学的証明法, 医学と生物学, 18(2), 103, 昭26
- 8) Gomori, G. : Microscopic Histochemistry, Principles and Practice, Chicago University Press, 1952.
- 9) Gomori, G. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 67: 4, 1948.
- 10) Pearse, A.G.E. : Histochemistry, Theoretical and Applied, 1961.

写真版説明

- (1) ラウリン酸メチルエステルを基質とし、45分間 incubation を行ったラット肝である。左上の酵素反応の認められない部分は中心静脈である。中心帯に反応が強い。反応終末産物は粗大で微細な細胞学的単位での酵素局在は明らかでない。100×。
- (2) ラウリン酸メチルエステルを基質とし、45分間 incubation を行ったラット腎である。略々中央に円形の酵素反応陰性部があるが、これは腎小体であって糸球体及び糸球体嚢には酵素反応は認められない。微細な酵素局在は明らかでない。100×。
- (3) ミリスチン酸メチルエステルを基質とし1時間30分間 incubation を行ったラット胃粘膜である。粘膜下層及び粘膜筋板には酵素反応は認められない。胃粘膜細胞には酵素反応中等度。100×。
- (4) パルミチン酸メチルエステルを基質とし、2時間40分間 incubation を行ったラット脾である。酵素反応は弱い。核に於ける反応は陰性である。100×。
- (5) パルミチン酸メチルエステルを基質とし、2時間40分間 incubation を行ったラット肝である。酵素反応は強く、中心帯において強いようである。100×。
- (6) 冷アセトン固定軟パラフィン包埋切片。パルミチン酸メチルエステルを基質とし、19時間 incubation を行ったラット肝である。クリオスタート切片に較べて組織構造の保存がよく、優れた標本である。核における反応は陰性であることがよく判る。100×。
- (7) (6)と同じ標本。400×。
- (8) (6)と同じ標本。200×。
- (9) ステアリン酸メチルエステルを基質とし、3時間30分間 incubation を行ったラット肝である。100×。
- (10) ステアリン酸ノルマルブチルエステルを基質とし、4時間30分間 incubation したラット肝である。前者より反応は弱い。100×。
- (11) オレイン酸メチルエステルを基質とし、3時間20分間 incubation したラット脾であり、強陽性反応である。核は陰性である。100×。
- (12) オレイン酸メチルエステルを基質とし、3時間20分間 incubation を行ったラット胃粘膜であり、反応は弱い。100×。
- (13) オレイン酸メチルエステルを基質とし、3時間20分間 incubation を行ったラット肝で、酵素反応は弱い。100×。



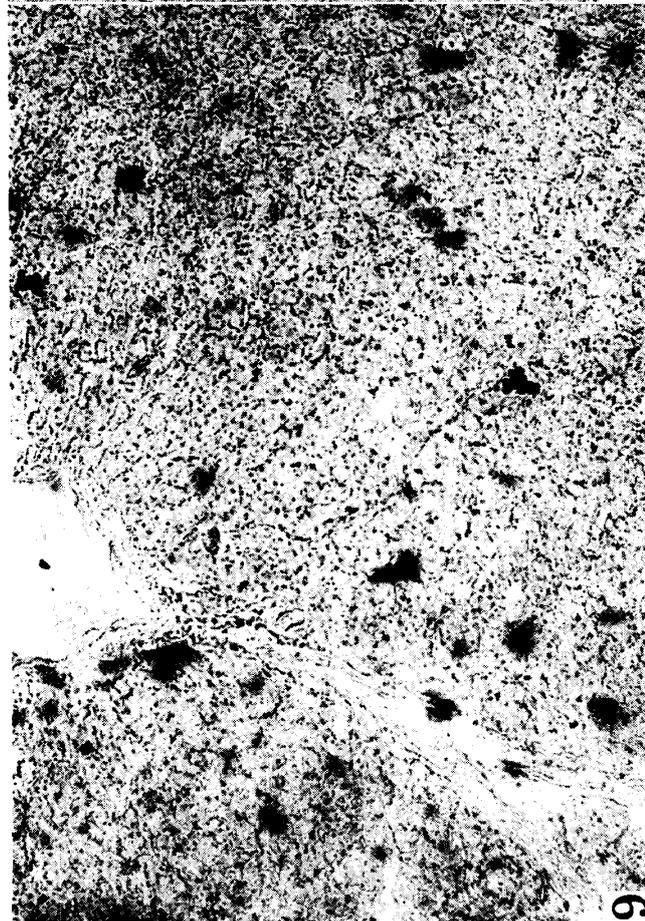




10



12



9



11

