

各種水素イオン濃度における 組織化学的ペプチダーゼ反応

東京女子医科大学第二解剖学教室 (主任 飯沼守夫教授)

八十田敏男・伊藤 満・浜田ナミ子
ヤソダ トシオ イトウ ミツル ハマダ ナミコ

(受付 昭和34年11月5日)

緒 言

ポリペプチドを基質とする組織化学的ペプチダーゼの証明法が、花房・望月(1956)により報告された。その後花房(1956)はこの証明法の特異性について多くの観察をおこない、生化学的所見ともよく一致することを認めた。花房・望月法は基質液水素イオン濃度が、pH 7.0よりpH 9.0の間において反応を示し、特にpH 7.5が最強であるという。筆者はマウスの2, 3臓器について反応を検索し、同一臓器においても基質液水素イオン濃度が異れば反応は著しく変化することを見たので報告する。

材料および方法

成熟健康雄マウスの肝臓、腎臓および膵臓について花房・望月法によりペプチダーゼを検出した。水素イオン濃度の補正はすべてアンモニア水を用い、生ずる沈澱は濾過した。濾液の水素イオン値はpH 7.0, 7.5, 7.8, 8.0, 8.4, 9.0の6種で、硝子電極pHメーターで測定した。

自家所見

I. 基質液の水素イオン濃度7.0の場合。

肝臓。肝細胞形質は殆んど反応を示さない。肝細胞核に極めて弱い反応を認める以外、反応は陰性である。

腎臓。皮質尿細管では主部の刷子縁にやや強い反応を認める。細胞形質は極めて弱い反応を示し、核は弱い陽性を示す。髄質尿細管の細胞形質は反応を示さないが、核は皮質のそれよりもやや強い。糸球体の核は陽性である。

膵臓。外分泌腺細胞の基底に極めて弱い反応を認める。核は陰性である。内分泌腺細胞は細胞形

質および核ともに殆んど反応を示さない。

II. 基質液の水素イオン濃度7.5の場合。

肝臓(図1)。肝細胞形質は細胞周辺に弱い反応を示す。肝細胞核および星細胞の一部はやや強い反応を示すが、概して反応は弱い。毛細胆管は認められない。小葉間胆管上皮の反応は弱いが、その核は強い反応を示す。

腎臓(図5)。皮質では尿細管主部の近位側に反応は強く、特に刷子縁の反応は著しく強い。この部の細胞形質は中等度の強さを示す。

細胞形質は核の周辺が陰性である。核の反応は強い。基底膜の反応は弱い。主部尿細管の遠位側では刷子縁の反応は弱く、細胞形質も基底側に弱い反応を示すにすぎない。核も近位側に比し弱い。ヘンレの係蹄の下行脚の細胞形質は陰性であるが、核に弱い反応を認める。上行脚の細胞形質は基底側に弱い反応を認める。核の反応はやや弱い。介在部では基底側に反応を認め、強さは主部尿細管の細胞形質におけると殆んど同じである。集合管上皮は陰性であるが、核に弱い反応を認める。

糸球体では殆んど反応を示さないものと、弱い反応を示すものとが認められるが、核の反応は中等度に認める。

膵臓(図9)。外分泌腺細胞は中等度の反応を示す。基底側がやや強い。核の反応は認められない。内分泌腺の細胞形質は極めて弱い反応を示すものと、全く反応を示さぬものとがある。核に弱い反応を認める。小葉間排泄管は極めて弱い反応を示し、核にやや強い反応を認める。

III. 基質液の水素イオン濃度 7.8 の場合。

肝臓(図 2)。肝細胞形質は中等度の強さの反応を示し、原形質内に著しく強い大、小の顆粒を認める。反応の強い顆粒は核周囲にも認められるが、概して細胞の辺縁に多い。核は強い反応を示す。毛細胆管は認められない。

星細胞は中等度以上の反応を示すものが多い。小葉間胆管上皮は著しく弱いが、核の反応は強い。

腎臓(図 6)。皮質尿細管全般に反応は強い。

主部近位側の刷子縁は特に強く、細胞形質の反応も強い、核周囲は反応を示さない明暈でとりまかれるが原形質内は中等度の強さを示す微小顆粒が占める。基底膜の反応は弱い。

主部近位側の核は強い反応を示すが、遠位側の核はやや弱い。主部遠位側の細胞形質の反応は弱く、刷子縁の反応は極めて弱い。ヘンレの係蹄の下行脚は陰性であるが核は中等度陽性を示す。上行脚の細胞形質は基底側に弱い反応を示すが、核はやや強い。介在部は基底側のみに強い反応を示し、核周囲の明暈は大である。核はやや強い反応を示す。集合管上皮は陰性であるが核に中等度の反応を認める。糸球体の多くは中等度の反応を示す。核は強く反応する。各部の反応は概して pH 7.5 の場合よりも強い。

膵臓(図 10)。外分泌腺細胞の基底側にやや強い反応が認められる。内分泌腺細胞形質は極めて弱い反応を示すものと、反応全く陰性のものとが認められるが、核の反応は強い。小葉間排泄管の反応は内分泌腺細胞形質と殆んど同じで極めて弱い。

IV. 基質液の水素イオン濃度 8.0 の場合。

肝臓および膵臓の反応は pH 7.5 の場合と殆んど差異がない。腎臓では各部の反応の強さは、pH 7.8 におけるものより強くあらわれるが、主部尿細管の刷子縁の反応はやや減弱する。

V. 基質液の水素イオン濃度 8.4 の場合。

肝臓(図 3)。肝細胞形質の反応はやや増強し、中心部よりも細胞周辺が強い。星細胞の反応は pH 7.8 におけるよりも強い。肝細胞核の反応は強い。毛細胆管は認められない。小葉間胆管上皮の反応は増強している。特に核の反応は著しく強い。

腎臓(図 7)。皮質では尿細管主部の細胞形質は

pH 7.8 におけるより反応が弱く、特に刷子縁の反応は著しく低下する。核の反応は pH 7.8 におけるよりも弱い。皮質尿細管の細胞形質および核の反応は概して pH 7.8 よりも弱い。髓質では核の反応が著しく強くなる。糸球体の反応は強く、特に核の反応は増強する。

膵臓(図 11)。外分泌腺細胞形質は強い反応を示し基底側が特に強い。腺腔側に顆粒状の強い反応が認められる。核の反応は認められない。小葉間排泄管も強い反応を示し、核の反応が著しく強い。内分泌腺細胞形質にも小顆粒状の強い反応を認める。核の反応は著しく増強する。

VI. 基質液の水素イオン濃度 9.0 の場合。

肝臓(図 4)。肝細胞形質は概して反応が減弱するが、原形質周辺に一部顆粒状の強い反応を示す。核の反応は極めて弱い。星細胞の反応は弱い。小葉間胆管の反応は著しく弱い。

腎臓(図 8)。皮質尿細管の反応は著しく弱まる。尿細管主部の刷子縁の反応は殆んど認められない。皮質各部の核も反応は減弱する。

髓質では下行脚の核の反応が著しく強い。糸球体の反応は著しく弱いが核の反応は強い。

膵臓(図 12)。外分泌腺細胞形質の反応は強く、細胞の基底側が著しい。腺腔側もやや強い反応を示すが、pH 8.4 の場合に比しやや反応は弱い。内分泌腺細胞形質中の反応は低下する。核は pH 8.4 の場合よりも弱いが、かなり強い反応を示す。小葉間排泄管の反応は弱いが、核は中等度の反応を示す。

考 按

Bergmann (1942) が分類した exopeptidases はすべてアルカリ領域で活性を示す。花房・望月法では pH 7.0 より pH 9.0 に至る広いアルカリ性領域で陽性反応を認めた。ペプチダーゼ活性の至適水素イオン濃度は生化学的には、pH 8.0 附近に認められるものが多い。筆者らの観察においても臓器による差異はあるが、pH 8.0 附近で反応が強く認められる。肝臓では pH 7.8 において肝細胞原形質の染色が最も良く、pH 8.0 以上では原形質内の顆粒のみに反応が強い。pH 9.0 では原形質および核ともに反応は著しく低下する。肝細胞核の反応は pH 7.8 乃至 pH 8.0 が最も強い。腎臓では皮質尿細管主部の刷子縁の反応は pH 7.0 においても著明に認められるが、pH 8.4 以上では激

減し、または陰性となる。腎臓の皮質各部の反応は pH7.8 乃至 pH8.0 が最高であり、核の反応は最も強い。pH9.0 では各部の反応は減弱し、髄質の下行脚の核のみ著しく強い反応を示す。膵臓の外分泌腺細胞形質の反応は pH8.4 が最も強く、pH9.0 においてもやや強い反応が認められる。ランゲルハンス島の細胞形質の反応について、花房 (1956) は陽性と思われる場合と陰性を示す場合とがあり、判定については疑陽性であるとした。筆者らも、pH7.8 以下において反応は全く陰性の場合と極めて弱い場合とを認めたが、pH8.4 では小顆粒状の強い反応を認めた。核の反応は常に陽性である。Burstone & Falk (1956) は膵臓のランゲルハンス島にアミノペプチターゼの活性を認め、組織化学的に顆粒状の分布を示すと報告した。花房・望月法では、pH8.4 において小顆粒状の陽性反応が認められた。花房 (1956) は各種の健康動物臓器における組織化学的ペプチターゼ反応を検索し、或る種の細胞では核が陽性であることを認めた。Siebert et al (1953) は或る種の動物臓器の核中にペプチターゼが認められることを生化学的に証明した。Gomori (1951) はアルカリホスファターゼが核に陽性となるのは拡散によるものであると報告した。花房・望月法でマウスの上記臓器を検索すると、肝臓および腎臓において核は陽性を示し、膵臓の外分泌腺細胞の核は常に陰性である。ランゲルハンス島では細胞形質の反応に関係なく常に陽性を示した。ペプトンを除いた基質液を用いてコバルトの非特異的沈着による硫化コバルトの反応を検討したが、いずれも花房・望月法を否定すべき結果を得ることはできなかった。高松ら (1956) は金属の組織親和性について研究をおこない、コバルトは白鼠の肝細胞、腎糸球体および髄質の集合管などに沈着を認めなかった。僅かに腎皮質主部尿管に沈着をみるという。筆者らは、各種水素イオン値のペプトン除去基質液に切片を浸漬し、コバルトの沈着を検索したが花房・望月法で事後処理したものでは全く陰性であることを認めた。花房・望月は Dempsy et al (1946) のアルカリホスファターゼ証明法で処理しても、コバルトの沈着が起らないことを確認した。

Gomori のアルカリホスファターゼ検出法は、従来 pH9~9.8 のアルカリ領域においておこな

われてきたが、Ross et al. (1951) はアルカリホスファターゼ活性の至適 pH は、最初の基質の濃度に関係することを見出し、グリセロリン酸塩を 3γ/ml ふくむ基質液の至適 pH は 7.35 であるのに、グリセロリン酸塩を 10 mg/ml 含有する基質液では至適 pH は 9.13 であるという。これは解離されたリン酸塩の少量が、用いるリン酸塩の多量に相当し、至適 pH と対数的基質濃度とが直接関係するものであると報告した。Wachstein et al (1957) は生理的水素イオン値の基質液を用いて非特異的および基質特異的ホスファターゼの活性を、人間その他 2, 3 の動物の肝臓について検索し、非特異的ホスファターゼの活性は、pH9 におけるよりも著しく強い活性を示すことを認め、これは非特異的ホスファターゼが生理的水素イオン濃度において肝代謝に重要なものであることを示すと結論した。花房・望月法によるペプチターゼ反応は生理的水素イオン値より pH9 に至る範囲のアルカリ性領域で認められるが、ペプチターゼ活性の至適水素イオン値が生化学的に pH8 附近にあり、検索した臓器の反応の強さもこのことを実証したと考える。

結 論

花房・望月法によりペプチターゼの検出を行い、基質液の水素イオン値をかえることにより、各臓器における最強反応が異なることを認めた。

1) 肝臓および腎臓では pH7.8~8.0 が最も強い。膵臓では pH8.0~8.4 が最高であるが、pH9.0 においても反応はかなり強く認められる。

2) 成る種の細胞核は常に反応が陽性である。

擧筆するにあたり御指導ならびに御校閲して頂いた飯沼守夫教授に深謝致します。

文 献

- 1) Bergmann, M.: A Classification of proteolytic enzymes. *Advance. Enzymol.*, 2 49~67 (1942)
- 2) Burstone, M.S., & Folk, J.E.: Histochemical demonstration of aminopeptidase. *J. Histochem. Cytochem.* 4 217-226 (1956)
- 3) Dempsy, E.W., & Deave, H. W.: The cytological localization, substrate specificity, and pH optima of phosphatases in the duodenum of the mouse. *J. Cellul. Compar. Physiol.* 27 159-179 (1946)
- 4) Gomori, G.: Alkaline phosphatase of cell

- nuclei. J. Laborat. Clin. Med **37** 526—531 (1951)
- 5) 花房 厚・望月 昇; Peptidase の組織化学的証明法 総合医学 **13** (6) 687—689 (1956)
- 6) 花房 厚; Peptidase の組織化学的研究 慶応医 **33** 335—342 (1956)
- 7) **Ross, M.H., Ely, J. Q. & Archer, J. G.:** Alkaline phosphatase activity and pH optima. J. Biol. Chem. **192** 561—568 (1951)
- 8) **Siebert, G., Lang, K., Müller, L., Lucius, S., Müller, E., & Kuhl, E.:** Untersuchung über Stoffwechselprozesse in isolierten Zellkernen. Bioch. Zschr. **323** 532—545 (1953)
- 9) 高松英雄・都甲元三・早川吉男・大友保平; 諸金属類の組織細胞親和性についての研究 日体質誌 **21** 214—218 (1956)
- 10) **Wachstein, M. & Meisel, E.:** Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. with special reference to the demonstr-

ation of bile canaliculi. Amer. J. Clin. Path. **27** 13—23 (1957)

附図説明

- 図 1. pH 7.5 における肝臓のヘプタダーゼ反応。
 " 2. pH 7.8 同 上。
 " 3. pH 8.4 同 上。
 " 4. pH 9.0 同 上。
- 図 5. pH 7.5 における腎臓のヘプタダーゼ反応。
 " 6. pH 7.8 同 上。
 " 7. pH 8.4 同 上。
 " 8. pH 9.0 同 上。
- 図 9. pH 7.5 における脾臓のヘプタダーゼ反応。
 " 10. pH 7.8 同 上。
 " 11. pH 8.4 同 上。
 " 12. pH 9.0 同 上。



