Cholinesterase の臨床的研究

第一篇 各種疾患に於ける血清、赤血球 Cholinesterase 活性度の動搖に就いて

The Clinical Studies On the Activity of the Blood Cholinesterase

1. Cholinesterase Activities of Serum and Erythrocyte in Diseases

日本醫科大學整形外科教室 (主任 齋藤一男教授)

研究生 春 日 豊 和

Kasuga Toyokazu

Cholinesterase については、神経生理學的立場と酵素化學的立場とから、今までに多くの研究が報告されている。この酵素は、特異的 Cholinesterase と非特異的 Cholinesterase との二型に區別され、人間の血液では前者は主に赤血球に、後者は主として血清に配分されている。この二型の酵素のいずれが生理學的により本質的なものであるかといふことに一つの問題が残されている。現在一般には、Sawyer¹⁾ Mendel and Rudney²⁾ Mazur and Bodansky³⁾ Nachmansohn and Feld⁴⁾ 等の結果から、Acetylcholine 水解に關するかぎり、特異的 Cholinesterase の方が本質的なものと考へられて居るが、生理學的には非特異的 Cholinesterase について古くから多くの現象が注目されている。特に臨牀的には、佐藤⁵⁾ Faber⁶⁾ の報告以來、肝臓機能の低下と血液の此の酵素の活性度とが平行することが注目され、これをもつて一つの肝臓機能検査法とすることが提唱された。又此の事實に基き、一部では血清中のこの酵素は肝臓を起源として供給されるとする意見も行われている。(Mazur, Bodansky³⁾ 上代⁷⁾ Brauer and Root⁸⁾) しかし此の二型の酵素の相互の間の生理學的な關連については殆んど知られていない。

Mendel⁹⁾ (1948) は鼠について、血清中の特異的ならびに非特異的 Cholinesterase の種々の条件下での動搖およびこれらと組織内 Chol-

inestrace との間の關係をしらべた結果、それぞれの酵素の間には平行した關係が無いことを述べて居る。

著者がここで報告しようとするのは、人間について此の二型の酵素として赤血球、および血清の酵素を對象として、各種疾患時におけるこれらの酵素の活性度の變動を検討した成績である。特に赤血球の態度については若干の新しい事實が確められた。

方 法

1) 酵素液

玉井¹⁰⁾ に従つて患者肘靜脈より採血した血液から赤血球浮遊液並に血清稀釋液を調製した。尚活性値計算の必要から赤血球にあつては血球數及びヘマトクリット値をも併せ測定した。

2) 基質溶液

活性値は各酵素の至適基質濃度で測定するのが適當と考へられるから Acetylcholine 終濃度を夫々赤血球にあつては $2.5 \times 10^{-3} M$ 、血清にあつては $2.5 \times 10^{-2} M$ とした。

3) 測定條件

Ammon¹¹⁾ の測壓法により玉井¹⁰⁾ の實施法に従つた。

4) 活性値の表示法

實驗結果中 Acetylcholine 分解値とあるのは、赤血球にあつては 0.1 cc 血液中に含まれる赤血球により、血清にあつては 0.1 cc の血

清によつて 30 分間に分解遊離する醋酸に相當する CO_2 の cmm 數である Cholinesterase-Index, 及び Cholinesterase-Quotient はそれぞれ玉井¹²⁾の方式に従つて求められたものである。

實 驗 結 果

1) 健康者 18 例について測定した結果は第 1 表に示す如くである。尙この測定は 3 月下旬より 7 月中旬にわたつて測定されたもので、これは上代、佐藤¹³⁾の指摘するやうに血清 Cholinesterase 値が季節的に動搖することを考慮したためである。

血清にあつても赤血球にあつても佐藤⁹⁾、玉井¹⁰⁾が指摘して居る如くに或程度の個體差がある。

2) 肝臓疾患

血清 Cholinesterase と肝臓機能との関係についてはすでに非常に多くの記載があることは前にも述べた。(Harrison¹⁴⁾ 等参照) これらの事から血清酵素が肝臓から供給されるものである事が推論され、例へば、Brauer and Root⁵⁾、等は肝臓が全血中の Cholinesterase の 5～7 倍量の Cholinesterase を含有する事、その他から血中 Cholinesterase は肝臓より補給されると考へ、又は Mazur and Bodansky¹⁵⁾ は Diisopropylfluorophosphate (DFP) による阻害實驗から、血清 Cholinesterase は肝臓内で形成されると推定して居る。しかし未だ血清 Cholinesterase が肝臓内で形成されることを最終的に結論する段階にはない。

第 2 表 (A-E) に示す結果は明らかに肝臓に疾患を有し肝臓機能低下を示した患者から得られたものであるが、佐藤⁹⁾の報告と一致して血清 Cholinesterase 値は著明に減少し、著しいものは健康者の 1/3 程度迄減少してゐるものも見られる。この様に血清 Cholinesterase に著明な變動を見るにも拘はらず、赤血球 Cholinesterase 値が殆んど動搖してゐないことは注目される。赤血球實測値にはやゝ低下したとみられるものもあるが ChE-Index, ChE-Quotient とともに低下してゐないことから赤血球數 Ht

値の減少によるものと考へられ、特異的値 ChE の本質的低下とは考へられない。この所見は、血清 Cholinesterase が肝臓機能と密接に関連しているのに對し、赤血球 Cholinesterase が一應肝臓機能と無關係であることを示すものであり、同時に血清酵素と赤血球酵素とが互に相關連するものでない事を指嗟していると言ふ點で注目される、發生的にもこの兩酵素が其起源を異にして居る事は充分想像される。

3) 甲状腺腫

人血清 Cholinesterase は甲状腺機能亢進に際して増強し、粘液水腫では低下すると言はれてゐる。又 Mendel¹⁶⁾の實驗によれば、甲状腺剔除鼠では非特異的 Cholinesterase が増加し、特異的 Cholinesterase は變化してゐない。

甲状腺腫 4 例についての結果を第 3 表に示すが、これによると兩型酵素共に殆んど動搖を示して居ないことが分る。

4) 貧 血

貧血患者の血清 Cholinesterase 値については已に佐藤⁵⁾は平均値に於て健康値より僅かに低下することを認めてゐる。第 4 表にあげた例は大部分二次性貧血であるが、血清 Cholinesterase 値は極く僅かに低下を示してゐるにすぎない。赤血球 Cholinesterase にあつては Acetylcholine 分解値は可成り低下を見るが、これは貧血による赤血球數の減少の爲と考へられる。ここで特徴的なことは Index, Quotient の値が健康値のそれらに比し可成り増加してゐることである。この結果だけからすれば酵素量の減少は赤血球數及容積の減少だけに相應するものでないといへるのであつて、むしろ單位赤血球内の酵素量は増加してさへゐる。これが如何なる意味をもつかは直ちに判定し難い。Sawitsky¹⁷⁾等は貧血を詳細に分類して、そのおのおのについて兩型酵素の動搖を調べた結果赤血球 Cholinesterase は Sick cell anaemia, hypochromic normocytic anaemia, に於て増強し、急性白血病, myelophoboc anaemia では減少することを述べてゐるが、測定に際し基質濃度を 0.021 M とし、方法も異なる

ので、結果をそのまま比較することは出来ない。

5) 癌

癌患者から得られた結果は第5表及び第2表Bにあげた。肝臓癌に於ては血清Cholinesterase 値が著明に減少してゐるが、胃及び子宮癌に於ては僅かに減少が見られるにすぎない。赤血球Cholinesterase にあつては、可成り減少してゐるものもあるが、これは Index, Quotient を見れば解るごとく二次的貧血の影響と考へられる。H. W. Schmidt¹⁶⁾ は多くの癌患者のCholinesterase 活性度を調査し、健康體より、可成り低下するが、これは、癌とCholinesterase とに本質的な相關關係があることを意味しないと述べてゐるが、ここに得られた結果からも、何れの酵素も癌と本質的關係があるとは考へられない。むしろ二次的な肝臓機能の低下を伴つてゐるためであろう。

總 括

諸種疾患時に於ける特異的並に非特異的Cholinesterase の動搖を比較検討した結果

1) 肝臓機能低下患者の血清Cholinesterase 値は著明に減少することを再確認し、

2) これに反し赤血球Cholinesterase 値は何れの場合にも變動しないことをまとめた。

3) 貧血時には赤血球Cholinesterase 値の僅少的減少が認められるが單位赤血球中の値はむしろ上昇してゐる。

文 献

- 1) C. H. Sawyer and W. H. Hollinshead: J. Neurophysiol, 8, 139, 1945.
- 2) B. Mendel and H. Rudney: Biochem, J.: 37, 473, 1943,
- 3) A. Mazur and O. Bodansky: J. Biol. Chem. 163, 261, 1946.
- 4) D. Nachmansohn and E. A. Feld: J. Biol. Chem. 171, 715, 1947
- 5) 佐藤正文: 日本消化器, 42, 127, 1948
- 6) M. Faber: Acta. med. Scand. 114, 59, 72, 1943
- 7) 上代皓三: 日醫大誌, 16, 99, 1949
- 8) R. W. Brauer and M. A. Root: Am. J. Physiol. 149, 611, 1947
- 9) B. Mendel and R. D. Hawkins: Am. J. Physiol. 154, 495, 1948
- 10) 玉井明: 日生化, 22, 32, 1950,
- 11) R. Ammon: Pflug Arch. d. ges. Physiol. 233, 486, 1934
- 12) 玉井明: 日生化, 22, 37, 1949
- 13) 上代, 佐藤: 醫學と生物學, 2, 76, 1942
- 14) M. F. Harrison and L. m. Brown: Bioc-hem. J. 48, 151, 1951
- 15) Sawitsky: J. Lab, Clin, Med, 33, 203, 1948
- 16) H. W. Schmidt: Klin, Wochensch, 818, 1947, Chem. Zeitschr. 396, 1948

第 1 表

日	姓 名	病名	性	年 令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血清値 30° CO ₂ mm ³	血球値 30° CO ₂ mm ³	Index 血球値 赤血球數	Quotient 血球値 Ht	Ht 赤血球數
20/Ⅱ		健康	女	22	458	44	132	394	0.86	8.9	0.095
20/Ⅱ		健康	男	30	521	49	135	412	0.78	8.0	0.094
25/Ⅱ		健康	男	29	488	49	149	389	0.79	7.8	0.100
25/Ⅱ		健康	男	36	508	49	164	392	0.77	8.0	0.090
26/Ⅱ		健康	男	34	512	48.5	139	398	0.79	8.2	0.094
26/Ⅱ		健康	男	35	506	47.5	122	398	0.79	8.2	0.094
2/Ⅳ		健康	女	21	438	43	148	348	0.78	8.0	0.093
2/Ⅳ		健康	男	25	498	48.5	126	389	0.78	8.0	0.094
10/Ⅴ		健康	男	22	485	47	118	401	0.87	8.5	0.096
10/Ⅴ		健康	男	22	456	46.5	136	392	0.85	8.4	0.101
8/Ⅵ		健康	男	22	424	43	143	394	0.92	9.1	0.101
8/Ⅵ		健康	男	22	511	51	118	412	0.80	8.0	0.099
11/Ⅶ		健康	男	23	441	43.5	136	384	0.87	8.8	0.090
11/Ⅶ		健康	男	29	478	48	158	399	0.83	8.3	0.102

12/Ⅶ		健康	男	23	438	46	126	368	0.88	8.0	0.105
12/Ⅶ		健康	男	22	446	46.5	160	402	0.90	8.6	0.104
15/Ⅶ		健康	男	22	515	51	129	410	0.79	8.0	0.099
15/Ⅶ		健康	男	30	468	48	140	392	0.83	8.1	0.102
					477.4 ± 31.4	47.2 ± 2.96	135.6 ± 13.40	393 ± 76.4	0.823 ± 0.0509	8.27 ± 0.406	0.0968 ± 0.00469

第 2 表 A

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血清値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤血球數
14/Ⅴ		流行性肝炎	女	27	193	22	45	258	1.3	11.7	0.11
5/Ⅵ		流行性肝炎	男	22	446	43.5	68	391	0.87	8.9	0.097
19/Ⅵ		流行性肝炎	男	19	467	44.5	88	359	0.76	8.0	0.095
10/Ⅶ		流行性肝炎	男	22	508	48.5	64	412	0.81	8.6	0.095
31/Ⅶ		流行性肝炎	男	23	514	48.5	58	372	0.72	7.6	0.094
					425.6 ± 119.0	41.4 ± 9.91	64.6 ± 14.05	358.4 ± 53.3	0.892 ± 0.210	8.96 ± 4.45	0.0792 ± 0.0583

第 2 表 B

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血清値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤血球數
25/Ⅴ		肝 癌	男	44	346	32	55	375	1.08	11.7	0.092
10/Ⅴ		肝 癌	男	66	303	33	61	288	0.95	8.7	0.100
10/Ⅴ		肝 癌	男	44	333	30.5	65	334	1.06	11.7	0.091
12/Ⅴ		肝 癌	男	60	359	36	98	324	0.87	8.1	0.100
20/Ⅴ		肝 癌	男	56	337	32.5	54	326	0.84	8.8	0.093
22/Ⅶ		肝 癌	男	42	223	18	61	248	1.11	13.7	0.080
17/Ⅸ		肝 癌	男	49	365	37	101	346	0.94	9.3	0.101
					323.7 ± 45.4	31.2 ± 23.13	70.7 ± 18.22	320.1 ± 38.6	0.978 ± 0.103	10.28 ± 1.96	0.0924 ± 0.0178

第 2 表 C

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血清値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤血球數
16/Ⅶ		肝 硬 變	男	48	329	31	83	288	0.87	9.2	0.094
5/Ⅴ		肝 硬 變	女	42	203	18	61	281	1.3	15.0	0.088
12/Ⅴ		肝 硬 變	男	54	362	33.5	81	290	0.80	8.1	0.092
					298 ± 68.5	27.5 ± 6.79	73 ± 19.86	286.3 ± 5.82	0.99 ± 0.221	10.76 ± 3.05	0.0913 ± 0.0035

第 2 表 D

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血 清 値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤血球値
8/V		ワイル氏病	男	31	326	34	36	382	1.1	11.2	0.104
25/V		ワイル氏病	男	37	424	40.5	97	371	0.87	9.1	0.095
14/VI		ワイル氏病	男	22	351	33	46	335	0.95	10.1	0.094
					367 ± 41.6	35.83 ± 3.36	59.6 ± 26.7	362.6 ± 21.24	0.97 ± 0.04	10.1 ± 0.5	0.0976 ± 0.0005

第 2 表 E

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血 清 値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotieu 血 球 値 Ht	Ht 赤血球數
21/II		膽 囊 炎	男	28	404	40.5	81	339	0.83	8.3	0.100
20/V		膽 囊 炎	女	66	353	32	114	330	0.93	10.3	0.090
15/VI		膽囊腫瘍	男	36	235	20.5	54	315	1.3	10.4	0.087
31/VI		肝 臓 瘍	女	56	215	21.5	92	388	1.6	18.1	0.100
					301.7 ± 79.2	28.6 ± 8.22	85.2 ± 74.3	343 ± 27.3	1.16 ± 0.306	11.7 ± 3.75	0.094 ± 0.283

第3表 甲 狀 腺 腫

氏 名	性別	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値 %	血 清 値	血 球 値	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤血球數
	女	33	373	40	156	248	0.77	7.2	0.017
	女	28	315	32	135	310	0.98	9.0	0.102
	女	29	466	44	153	357	0.76	8.0	0.094
	女	33	435	43	143	365	0.83	8.4	0.098
			397 ± 58.4	39.7 ± 6.01	146.7 ± 9.17	320 ± 46.6	0.83 ± 0.126	8.1 ± 1.12	0.0777 ± 0.0594

第 4 表

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血 清 値	血 球 値	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤 血 球
13/II		胃潰瘍吐血	女	43	226	18	151	340	0.94	9.3	0.101
18/II		外 妊 破 裂	女	27	334	28.5	168	301	0.90	10.3	0.085
7/VI		骨 肉 腫	男	18	181	16	74	341	1.32	15.0	0.088
7/IV		熱傷(續貧)	女	25	203	18	61	265	1.33	14.2	0.088
15/VI		痔核(續貧)	女	26	143	22.5	141	283	1.8	12.5	0.150
18/VI		胃潰瘍貧血	女	33	123	10.5	129	224	1.8	21.9	0.085
22/VI		痔核(續貧)	男	32	157	13	124	180	1.1	13.8	0.082
25/VI		再生不能性 貧血	女	38	116	9	102	292	2.5	31.3	0.077
8/V		胃潰瘍(續 貧)	男	35	213	18.5	144	285	1.3	15.6	0.086
22/V		十二指腸虫 症	女	34	223	16.5	145	301	1.4	17.9	0.073

28/V		痔核(續貧)	男	39	169	15	146	252	1.4	10.1	0.088
8/VII		十二指腸虫症	女	34	223	16.5	124	261	1.3	12.4	0.103
19/VII		肺 肉 腫	女	23	123	22	108	213	1.73	9.6	0.107
7/VIII		痔核(續貧)	男	38	176	17	123	286	1.62	16.8	0.095
14/VIII		肺 壞 疽	男	46	125	16.5	92	264	2.1	10.5	0.132
					± 181 ± 51.6	± 17.46 ± 9.43	± 122.06 ± 16.4	± 299.2 ± 123.7	± 1.53 ± 0.247	± 15.38 ± 3.47	± 0.085 ± 0.0978

第5表A 胃 癌

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血清 値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 値 Ht	Ht 赤血球數
13/II		胃 癌	男	56	113	12.5	104	246	1.55	18.8	0.079
17/IV		胃 癌	男	36	141	12	57	154	1.09	12.9	0.085
26/IV		胃 癌	男	49	119	12.5	161	195	1.8	15.2	0.105
					± 124.3 ± 12.36	± 12.3 ± 0.932	± 107.3 ± 42.6	± 198.3 ± 37.8	± 1.48 ± 0.294	± 15.63 ± 2.45	± 0.0896 ± 0.01134

第5表B 子 宮 癌

日	姓名	病 名	性	年令	赤血球數 萬	ヘマトクリ ット値(Ht) %	血清 値 30'~ CO ₂ mm ³	血 球 値 30'~ CO ₂ mm ³	Index 血 球 値 赤血球數	Quotient 血 球 數 Ht	Ht 赤血球數
7/VII		子 宮 癌	女	32	117	18	108	315	2.0	13.6	0.105
7/VII		子 宮 癌	女	45	305	29.5	142	339	0.94	9.7	0.097
14/IX		子 宮 癌	女	42	129	19.5	103	279	2.1	14.2	0.100
					± 183.6 ± 86.1	± 22.3 ± 5.25	± 117.6 ± 17.77	± 310.6 ± 25.9	± 1.68 ± 0.525	± 12.5 ± 1.99	± 0.1006 ± 0.00556

第 1 圖

檢量曲線

S50.Cuv 5mm, 38°C, 30' 温浴
呈色后 15' 后測定

[Ach] 2.5 × 10⁻² M — 0

S50, Cuv. 5mm, 38°C,
[Ach] 0.025M

第 2 圖A

S50, Cuv. 10mm, 38°C
[Ach] 0.0025M

第 2 圖B

第3圖 硫酸，三塩化醋酸濃度の影響
 S_{53} , Cuv 5 mm, 38°C 30' 作用後呈色 15' 后測定 [Ach] 0.025 M

—— 実線 H_2SO_4
 点線 CCl_3COOH

第4圖 呈色後色調安定に至る時間
 1. 0.025 M
 2. 0.020 M
 S_{53} , Cuv 5 mm, 38°C 30'

3. 0.015 M
 4. 0.010 M
 5. 0.005 M

Cholinesterase の臨床的研究

第二篇 脳性麻痺患者の血清、脳脊髄液 Cholinesterase の活性値に就いて

The Clinical Studies on the Activity of the Blood Cholinesterase

2. Cholinesterase Activity of serum and Spinal Fluid in Cerebral palsy.

日本醫科大學整形外科教室 (主任 齋藤一男教授指導)

研究生 春日 豊 和

Kasuga Toyokazu

第一章 序 言

Acetylcholine の分解酵素たる Cholinesterase が (以下 ChE と略す) 其の神経生理學的意味で其の重要性を認められ既に久しい、而もその重要性は常に Acetylcholine (以下 Ach と略す) の生理學的又は生物學的解明と共にその研究がなされて來た。即ち古くは 1937 年既に Roseonblüth, Morrison¹⁾ 等は神経諸臓器の Ach の量と ChE の量的關係を研究し、又 Loewi, Mitarbeiter²⁾, Frethwie³⁾ 等は脊椎動物の神経物質に於る遊離の Ach, 又 Ach-Komplex の存在を實驗的に示し、その ChE との關係を論議し、又 von Muralt⁴⁾, Druckerey⁵⁾ 等は Choline 値による動物の神経末端に於る Ach 生成と ChE の關係を示し、Bauchmann, Marker⁶⁾ 等は副交感刺激による Kreatinin の増量と Choline, ChE との關係を示して居る。又 Marney, Nachmansohn⁷⁾, Martini, Toda⁸⁾ 等は蛙の變性運動神経とその支配筋肉の ChE の Ach の分解能に就いて論じ、又 Stedmann⁹⁾, Hicks, Mac Kay¹⁰⁾, Goodman, Carlson, Gilman¹¹⁾ 等は Myasthenia gravis に於る ChE 活性度の低下と運動神経末端の ChE 生成能との關係を示して居る。又 Tod¹²⁾, Jones¹³⁾ 等は Angstneurose, Stupor, Epilepsie, 又自律神経系の過敏狀態の見られる時 ChE 値が高いことを示して居る (尙之

等については Guggenheim¹⁴⁾ が精細に述べて居る。) かくて之等の諸學者の研究の繼承により次第に Cholinesterase の神経生理學的な解明がなされて來た、最近では平井¹⁵⁾ は熱帶性迷走神経緊張症、妊娠迷走神経緊張症に於て血清型 ChE の活性度の減弱を認めて居り、上代、佐藤¹⁶⁾ も夏季に於る血清型 ChE の活性度の減弱を認めて居る。著者は偶々齋藤一男教授が“脳疾患と整形外科”なる宿題報告を擔當されるに當り、各種脳疾患、とりわけ脳性麻痺患者の血清型 ChE, 脳脊髄液 ChE 値を測定しその動態を觀察し得たので報告する。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

研究對象とせる材料は廣義の脳性麻痺患者の各型を對象とした。従つて癲癇、先天梅毒兒、低智能兒童等も對象として取り上げた。

實驗材料としては玉井¹⁷⁾ の方法により患者より新鮮血清を求めリンゲル液にて 2 倍稀釋の上用に供した。脳脊髄液の場合は腰椎穿刺を行ひ得た新鮮リコールを用ひ、何れも溶血を嚴に防ぎ、溶血、又は血球を含んで居る時は用ひなかつたのは當然である。

第二節 研究裝置並びに方法

裝置並びに方法は Warburg の恒温槽を用ひ Ammon¹⁸⁾ の測壓法によつた。即ち Cholinesterase の作用により Acetylcholin の分

解により生ずる醋酸が、豫め反應系に加へられた重曹と作用して生ずる炭酸ガスをマンメーターに導きその $\text{[CO}_2\text{]}$ のガス壓によつて求めた。

第三節 酵素液の調製

玉井、宿谷¹⁾の方法により、血清は2×稀釋リコールは原液を使用した。リコールは元より Ammon 法では測定限界外にあると言はれる程低濃度なるため原液を使用した。

第四節 測定條件並びに實驗過程

第一項 基質濃度

玉井¹⁾に従つて血清型は 0.025 M. 腦脊髄液 ChE 測定には 0.0025 M. を使用した。

至適温度、作用時間は何れも第一篇に述べた通り玉井¹⁾の方法によつた。

實驗過程、之も第一篇と全く同様玉井¹⁾の方法によつた。

第五節 活性度の表示法

玉井¹⁾によつた。即ち第一篇に示せる如く、マンメーターの30'間の讀より、Acetylcholine 自家分解値、温度補正を出納したものの2倍が血清値であり、腦脊髄液 ChE の場合は如上の如く出納した値そのものである。

第三章 成 績

第四章 考 按

著者は茲に腦性麻痺患者 52 例に就いてその血清型 ChE を測定したのであるが表(1)に見られる如く各型共夫々取り立てての變化は見られなかつた。即ち第Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型共に表の説明に示す如く腦性麻痺患者を、その症候上より分類したのであるが、健康者に比べ各型共著明な變化はなく、又各型相互間にも何等の差異、聯關を求め得ない。之は腦性麻痺患者の血清型 ChE は何等の特異性がないと言ふことで之は後藤¹⁹⁾の既に指摘せる所と同様な結果と見て良い。

尙本教室に於ける腦性麻痺患者の自律神經機能の研究²⁰⁾に於て自律神經正常型 58%, 副交感神經緊張型 27%, 全自律神經緊張型 15%, 交感神經緊張型 0% となつて居り、その成績と本研究との間に容易に一致點を見出し難く思はれるのである。

但て各種迷走神經緊張状態に於て血清型 ChE の活性度が減弱することは、平井¹⁷⁾、上代¹⁸⁾等によりある程度迄確認されて居る所であるが、一方佐藤²¹⁾、Faber²²⁾等の報告以來肝臟機能低下と本酵素の活性度の減弱が平行することが注目され、尙 Mazur, Bodansky²³⁾、上代²⁴⁾、Brauer, Root²⁵⁾等により肝臟を起源として一部の血清型 ChE が補給され、且つ又肝臟機能不全の時、極めて血清型 ChE の活性度の減弱して居ることが認められて居る。されば稍々論旨を離れるのであるが迷走神經緊張の際の血清型活性度の減弱と、肝機不全の際のそれとの間に何等かの相關的な關聯を考へても差支へない様に思はれる。但し此の點は言ふ迄もなく輕々に推論すべきでもなく、又本研究の論旨とする所でもない。

但て次に腦脊髄液の ChE であるが、Stedmann²⁶⁾は既に 1933 年に滴定法により測定不能なることを示し、Altenberger は生物學的測定法により腦脊髄液 ChE の活性度は血清 ChE の 1/250 の活性度しかないことを認めて居る。又松原²⁷⁾は腦疾患患者 41 例については生物學的方法により(臺灣房標本を用ひ)之を求めその活性度は血清型 ChE の 1/240 なることを證明して居る。著者は前述の如く髄液 ChE は True 型なる所より玉井¹⁾の法により基質濃度 0.0025 M. を使用したが、腦性麻痺患者のみならず、結核性腦膜炎、流行性腦脊髄膜炎等に於ても何れも Ammon 法では検出し得なかつた。

尙 1948 年 monomesric に Reiss, Hemphill²⁸⁾等が、その微量測定を行ひ得たと報告し井林²⁹⁾もその方法により極めて微量の髄液 ChE の測定を行つて居ることを附加して置く。従つて西澤^{30), 31)}、松原²⁷⁾等の生物學的測定法に依つて得た値 Reiss, Hemphill²⁸⁾、井林²⁹⁾等に依つて得た値と本研究との間に比較の基準が無いことは申す迄もないことである。玉井、佐藤の條件による Ammon の測壓法では腦性麻痺患者の髄液 ChE の活性度はその測定限界外であると斷じて差支へない。

第五章 結 び

(1) 著者は玉井、佐藤の法に倣ひ検査法により脳性麻痺患者の血清型 ChE の測定を行ひその活性度に健康者に較べ大差を認めなかつた。

(2) 脳性麻痺患者症候上の分類よりⅠ型よりⅣ型に分ち其の各型相互の値も検討したが、とり立てて申し述べる變化は認められない。

(3) 脳脊髄液 ChE の活性度を本法により行つたが何れも活性値を認めて居ない。之は結核性脳膜炎、流行性脳脊髄膜炎の患者の場合も然りである。

(4) 従つて血清型 ChE は脳性麻痺患者、とりわけ臨牀的に神経疾患、神経機能との間には直接の關聯はない様である。

(5) 脳脊髄液 ChE は少くとも本法に関する限りではその活性度を求め得なかつた。Reiss, Hemphill, 井林等の報告より考ふれば、本法では測定限界外にあるものと斷じられる。

本研究に當つて多大の御指導、御鞭撻を頂い

文 献

- 1) Rosenblüth, Morrison.: Am. Jp. 119, 77, 1937,
- 2) Loewi, Mitarbeiger: Arch. ges. Phy. 239, 430, 1937.
- 3) Frethowie, J. Phy. 11, 94, 1938.
- 4) von Muralt: Naturwissenschaft 27, 265, 1939
- 5) Druckrey, Harken, u. Brock: Naturwiss. 27, 418, 1939.
- 6) Bauchmann, Marker.: J. Biol. Chem. 22, 49, 1915.
- 7) Marnay, Nachmansohn: C, r. d. B. 124.942,

- 1937,
- 8) Martini, Toda,: Klinkik. Wochs. 1937/J 824
- 9) Stedmann: Jp 84.56 1935.
- 10) Hicks, Mc Kay,: Austr. J. Exp. Biol. and med. Sci. 14, 275, 1936.
- 11) Goodman, Carlson, Gilman; J. Phar. e, ext. Ther. 66, 15, 1939.
- (12) Tod and Jones; Quart. J. Med. 6, 1, 1936
- 13) Tod and Jones; Edinbrgh med. J. 44, 46, 1937.
- 14) Guggenheinn; die biogene Amnine 1940.
- 15) 平井: 醫學のあゆみ, 昭23年6月號, 309, 319 1948
- 16) 上代, 佐藤: 醫學と生物學 3, 360, 1943
- 17) 玉井, 明: 日生化, 22, 32, 1950
- 18) R. Ammon,: Pflüg. Arch, f. d. ges. physiol. 233, 486, 1934,
- 19) 後藤(重): 日新医学, 37: 434(1950), 38: 465 (1951)
- 20) 齋藤一男, 伊藤忠厚: 臨牀外科, 第5卷, 4號 1950.
- 21) 佐藤正文: 日本消化器, 42, 127, 1943.
- 22) Faber; Acta. Med. Scand. 114, 59. 72, 1943
- 23) Mazur and Bodansky: J. Biol. Chem. 163, 261, 1946.
- 24) 上代皓三: 日本醫大誌 16, 99, 1949
- 25) R.W. Brauer and M.A. Root: Am. J. physiol. 149, 611, 1947,
- 26) Stedmann, F. et al: Biochem. J. 29: 2107 (1935)
- 27) 松原(太): 精神神経學雜誌, 53(5): 234 (1951)
- 28) Reiss, M. & R.E. Hemphill: Nature. Jan, 3: 18 (1948)
- 29) 井林博: 日本臨牀, (10卷, 9號) 78. 107, 802. (1952)
- 30) 西澤義人: ハイネメヂン氏病の治療について, (1948)
- 31) 西澤義人: ハイネメヂン氏病の治療について, 第二編 (1950)

Cholinesterase の臨床的研究

第三篇 人血 Cholinesterase の比定色量法に就いて

The Clinical Studies on the Activity of the Blood Cholinesterase

3. Colorimetric Determination of Cholinesterase in Human Blood

日本醫科大學整形外科數室 (主任 齋藤一男教授)

研究生 春 日 豊 和

Kasuga Toyokazu

Cholinesterase 作用の化學的測定には、Warburg の檢壓計を用いた Ammon¹⁾ の測壓法と、電氣的滴定法の二種があるが、前者によるものが多い。何れも其の裝置と操作の點で容易に行ひ得るものとは言ひ難い。已に述べた如く Cholinesterase の生理學的重要性から最近臨牀的にもしばしばその測定の必要を生ずることが多く、従つて更に容易な且つ正確な方法が要請されてゐる。已に宮崎等²⁾は Hestrin³⁾ の Acetylcholine の比色定量法にもついた組織 Cholinesterase の定量法を考案した。著者は宮崎等の方法を光電管比色計を以て追試すると共に、人間の血清、赤血球 Cholinesterase の定量に用ひ、各種條件の吟味を行つた結果適當な條件を設定し得たのでここに報告する。

この方法により二、三の疾患について測定した結果もあわせ記載した。又一般組織 Cholinesterase については上代⁴⁾が既に指摘したように、可溶性のものとな溶性のものがあるため、酵素材料そのものの扱ひ方に注意を要するので、この問題についてはここでは扱はない。

實驗方法

原理並に試薬は宮崎等の方法に準じた。

酵素液は玉井⁵⁾に従つて赤血球、血清を採取し、それぞれ蒸留水を以つて前者は 60 倍、後者は 4 倍に稀釋した。この稀釋倍數は Ammon の測壓法によつて得られる値から理論的に求めたものである。基質濃度は終濃度を赤血球の場合 0.0025 M、血清は 0.025 M とした。この濃度は夫々の酵素の至適基質濃度に當ることが報告されて居る⁶⁾。又緩衝液は M/15 磷酸緩衝液を

使用した。従つて赤血球及血清酵素の活性値測定に於ける反應液の組成は夫々次の如くである

血清の場合：稀釋血清 (4×) 1.0 cc + 0.1 M Ach 液 1.0 cc + 緩衝液 2.0 cc

赤血球の場合：溶血液 (60×) 1.0 cc + 0.01 MAch 液 1.0 cc + 緩衝液 2.0 cc

この反應液を一定時間、38°C で反應させた後殘存する Acetylcholine を比色定量した。發色の操作については後段に述べる。

比色は光電管比色計により、フィルター S₅₀、液槽は赤血球の場合は 5 mm、血清にあつては 10 mm を使用した。

A) 條件の吟味

1) 濃度吸收曲線

この方法の原理が Acetylcholine に酵素を一定時間、一定温度で作用せしめ、次いで殘る Acetylcholine を比色定量することにあるから Acetylcholine の濃度變化による色調の度合が、Lambert-Beer の法則に従ふものでなければならぬ。

この關係は第 1 圖に示すところによつて充分満足される。

2) 反應時間

第 2 圖は前項に示した反應液を恆溫槽に入れ反應時間と分解量との關係を示したものである。第 30 分迄は毎 10 分の分解量が恆常であり、直線關係が見られるが、第 4 分に到り急激に分解量が減少する。酵素の活性値を観察するには、この直線部分を扱ふのが適當であるから、反應時間は凡て 30 分間とした。

3) 除蛋白

宮崎等²⁾は組織抽出液についての實驗から除蛋白の必要がない事を記載してゐるが、赤血球血清を對象とする場合は、蛋白質含有量が多く除蛋白の必要を認めた。除蛋白劑としてこゝでは三鹽化醋酸を用いたが、その濃度は第3圖に示すやうに Extinction 0.5~0.6 を示す所即ち 10%~7% のものが適當であるが、赤血球、血清の蛋白含量の多いことから 10% を用ひるのが適當と考へられる。尙これによる除蛋白は硫酸添加後に行つた。

4) 硫酸の濃度

呈色反應に於て加へる酸として、Hestrin³⁾は鹽酸を使用した。宮崎等²⁾は硫酸によるものと差がなく、硫酸濃度として 10 倍濃度が適當であるとして居る。赤血球、血清を酵素とした場合は、その蛋白含有量多く、硫酸濃度により透明度が異なることを認め、8 倍濃度が適當であることが解つた。第3圖は此の關係を示したものである。

5) 呈色後放置時間と色調安定度

第4圖に示すごとく、呈色 15 分にして色調安定し、90 分後に始めて褪色するのを認めた。此の關係から測定は呈色 15 分後が適當である。

6) 活性度の表示

血清の場合、Acetylcholine 對照、實測、血清對照の吸光度を夫々 E_A , E_B , E_C とすれば求むる酵素活性値 E は $E = E_A - (E_B - E_C)$ により求められる。而して用ひた血清は 4 倍稀釋のものであるから、原血清値として表はせば $E = 4(E_A - E_B + E_C)$ で求められる。

赤血球の場合は 60 倍稀釋のものを使用したのであるから $E = 60(E_A - E_B + E_C)$ であるが、單位容積中の赤血球による活性度を求めるにはヘマトクリット値を以てこの値を除したものを用ひるのが適當と考へられる。次項に示す實測例の赤血球値はヘマトクリット値を以て除した値である。

7) 赤血球、血清 Cholinesterase の定量法

血清、赤血球 Cholinesterase 比色定量法に於ける條件を吟味したが、その過程を一括すれば次の如くなる。

- A. 酵素液 1.0 cc + Acetylcholine 溶液 (0.1 M 又は 0.01 M) 1.0 cc + 磷酸緩衝液 2.0 cc
- B. 蒸溜水 1.0 cc + Acetylcholine 溶液 (0.1 M 又は 0.01 M) 1.0 cc + 磷酸緩衝液 2.0 cc
- C. 酵素液 1.0 cc + 蒸溜水 1.0 cc + 磷酸緩衝液 2.0 cc

以上三本の試験管を 38°C に 30 分間反應せしめ、次いで各試験管より 1.0 cc 宛を取り出し、それぞれに次の試薬を順次加へる。

- ① 2M Hydroxylamin hydrochloride 1.0 cc
- ② 3.5 M NaOH 1.0 cc
- ③ 蒸溜水 1.0 cc
- ④ $8 \times H_2SO_4$ 1.0 cc
- ⑤ 10% 三鹽化醋酸 1.0 cc
- ⑥ 0.37 M $FeCl_3$ 加 N/10 H_2SO_4 溶液 1.0 cc

次いで 3000 回轉 10 分間遠心沈澱し、上清を比色する。

B) 實測例

前項に於て述べた方法により、健康者及び肝臓疾患について測定した結果を第1表に示す。

血清 Cholinesterase は肝臓疾患に於て著明に減少し、赤血球 Cholinesterase の値は殆んど動搖が見られない。これ等の關係については第1篇に於て已に述べたところである。

結 び

Hestrin の Acetylcholine 比色定量法を利用し、宮崎等に倣つて、人血の血清及び赤血球の Cholinesterase 活性度の測定のための方法を考按工夫し第1篇の所見を再確認した。

(擧筆するに當り終始御指導いただいた恩師 齋藤一男教授を始め水谷、伊藤兩講師、並びに實際面に於て特に御懇篤な御指導、御鞭撻を頂いた生化學教室上代教授始め菊地助教授、宿谷講師に對し心より御禮申し上げると共に、快く材料を提供して下さいた本學臨床各教室並びに國立第一病院整形外科、菊地病院に對し深甚の謝意を表する)

文 献

- 1) R. Ammon : Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 233, 486, (1934)

- 2) 宮崎：札幌醫大紀要 2 卷，7，(1951)
- 4) 上代：日醫大誌 16，99 (1949)
- 3) S.Hestrin：Biol. Chem, 180, 249 (1949)
- 5) 玉井：日生化：22，32，(1950)

第1表 健康者 實測 値

血			清		血			球	
E _B	E _A	E _C	4×(E _A —E _B +E _C)	Ht	E _B	E _A	E _C	$\frac{60}{Ht} \times (E_A - E_B + E_C)$	
0.310	0.609	0.016	1.132	48%	0.076	0.158	0.009	0.0914	
0.323	0.609	0.018	1.060	46%	0.095	0.161	0.018	0.062	
0.377	0.602	0.015	0.84	32%	0.083	0.158	0.011	0.120	
0.319	0.602	0.018	1.100	49%	0.082	0.155	0.022	0.062	
0.319	0.602	0.020	1.052	52%	0.064	0.155	0.018	0.087	

第2表 患者 實測 値

	血			清		血			球
	E _B	E _A	E _C	$4 \times (E_A - E_B + E_C)$	Ht	E _B	E _A	E _C	$\frac{60}{Ht} \times (E_A - E_B + E_C)$
肝 炎	0.529	0.609	0.103	0.366	30%	0.097	0.158	0.016	0.09
肝 癌	0.577	0.620	0.119	0.324	28%	0.086	0.161	0.009	0.141
肝 炎	0.552	0.609	0.119	0.352	42%	0.119	0.158	0.009	0.042

第一型

57	女	133
2	男	116
8	男	132
2	女	138
2	女	122
5	男	138
2	女	132
8	女	138
5	男	144
27	女	104
25	女	126
10	男	114
4	女	116
26	男	108
4	男	124
4	男	118

125.12
±28.5

第二型

3	男	108
3	男	118
6	女	132
4	男	128
9	女	122

121.6
±8.33

第三型

8	女	142
3	男	125
3	男	128
16	男	138
12	男	146
11	女	118
10	男	128
5	男	146
2	男	142
21	女	122
4	男	132
4	男	116
8	女	134

134.68
±9.84

第四型

11	男	136
6	男	104
18	女	104
18	女	138
13	女	108
24	男	128

119.66
±11.77

第五型

5	男	128
9	男	108
6	男	122
4	女	136
5	女	128

124.4
±9.35

第六型

11	女	118
7	男	138
7	男	116
3	男	126
4	女	114
3	女	128
5	男	108

121.14
±9.41

※
第Ⅰ型…主として癰疽症狀を呈するもの
第Ⅱ型…主として強剛症狀を呈するもの
第Ⅲ型…主として第Ⅰ，Ⅱ型を併有するもの
第Ⅳ型…主として不隨意運動を呈するもの
第Ⅴ型…弛緩症狀を呈するもの
第Ⅵ型…神經症