高温期に於ける冷却装置下の蛙肺による Acetylcholin の定量に就いて

日本医科大学薬理学教室 (指導 西村菊次郎教授 主任 大 橋茂教授)

高 橋 省 一
Syōiti Takahasi

緒 言

従来 Acetylcholin (以下 Ach) の生物学的定量法には温血並び冷血動物の諸種臓器筋肉等の Ach に対する収縮反応を指標として行う方法が多数報告されている。近時蛙の直復筋法に関する研究も多いがこれはその反応の安定度と Ach に対する感受性に難点があり、更に Corsten⁽²⁾ の冬期蛙肺による Ach 定量法はその感受性の鋭敏なことが認められた。又 Corsten の方法は竹田³⁾、寺本⁴⁾、守川⁵⁾等により追試研究され、Ach 最低検出濃度は $Ach 10^{-14} \sim 10^{-15} g/ml$ の微量であることが確認された。然るに現今未だ多くの蛙直復筋による定量法が使われているのはこの蛙肺定量法による測定値の季節的変動が大きいと云う難点があるからである。即ち寒冷期(東京平均 $8^{\circ}C$ 最高 $12^{\circ}C$ 最低 $2^{\circ}C$)に於ては最低検出濃度が $Ach 10^{-14} \sim 10^{-15} g/ml$ であるのに対し高温期(東京平均 $28^{\circ}C$ 最高 $34^{\circ}C$ 最低 $20^{\circ}C$)に於ては $Ach 10^{-5} g/ml$ 程度迄の高い濃度の Ach しか測定出来ないばかりでなく自然収縮運動の頻発する傾向がある。こゝに於て夏期に於ける蛙肺の Ach に対する感度を増強し微量定量を可能ならしむるために竹田³⁾、寺本⁴⁾、守川⁵⁾は温度並び各種薬物を併用して研究を行つたが所期の成果を得るに到つていない。従来蛙肺による Ach 定量法を夏期に実施した場合には 6 月の時期に於ても既に $Ach 10^{-6} g/ml$ で自然収縮との判別が困難になると云われて居る。著者が行つた冷却装置を備えた方法を使用することにより、この時期に於ても Ach の最低検出量を $Ach 10^{-11} g/ml$ 迄に低下せしめることが可能であつたので茲に報告する。

実験材料並び実験方法

A) 実験材料として日本産トノサマ蛙 (*Rana nigro maculata japonica*) 体重 $20 \sim 30 g$ のものを雌雄区別なしに用いた。蛙肺の片肺をを全摘出しそれを標本とした。作製には竹田³⁾の方法に準じて行つた。

B) 夏期に於ける蛙の飼育に就いて

本実験に於ては蛙の飼育は特に温度的条件に留意し

第 1 図

出来るだけ低温期に近い状態に近づける様に飼育環境を設定した。即ちまず飼育箱を土中に埋設し飼育箱の中に上下二本の鉄管を通し絶えず井戸水を流通させて飼育箱の温度を $18^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$ に維持した (第 1 図)。

C) 実験使用薬物

本実験に使用したものは Acetylcholin chloride, Eserin Salicylie, Cryst で使用 Ringer 液 (以下 R-液) は $NaHCO_3$ 欠除の Frosch-Ringer-液は酸素を通じて充分飽和したものを用い、水素イオン濃度試験紙に依る該液の PH は $5.8 \sim 6.2$ である。尚 Ach 稀釈及び Eserin 稀釈液は凡て Frosch-Ringer 液を溶媒とした。

D) 実験方法

i) 保存時間及び保存温度：作製したる標本は一応 R-液中に保存する。保存時間と保存温度は Ach の感受性と自然収縮とに直接関係があるため、肺標本が Ach 感受性の減弱を来さない様に、又適当に多少なりとも自然収縮の消失する様にと注意して行つた。多数の予備実験の結果より摘出したる蛙肺を冷蔵庫内 ($3^{\circ} \pm 5^{\circ}$) に保存し時間を 24 時間とした。この様に処理した蛙肺に於ても各標本の個体差による反応の差を全く除外する事は出来なかつた。

i) 実験装置：竹田により改良された Corster⁽²⁾ の蛙肺灌流法に多少の改良を加えて使用した。

第2図

第2図に示す如く冷却を施した灌流装置によって灌流した。即ち第1冷却槽内の試薬及び灌流液は第2冷却槽内の蛇管を経て第3冷却槽の蛙肺を具吊する装置のある実験槽に導かれることになる。各冷却槽は全部外部から氷にて冷却する方法を採つた。又各槽の温度は外部から挿入した寒暖計によって絶えず調節した。第3冷却槽内の標本具吊瓶は容量約15 cc で約4' 間で内容が置換された後尚引き続き5' 間同液が作用し第3冷却槽に於ける灌流時間を9' 間とした。一回の灌流液量は40 cc となる様に灌流速度を一定に加減した(第2図)

iii) 蛙肺組織の収縮描記法：上記の第3実験槽内に具吊せる蛙肺の運動は全長18 cmのヘーベル(支点位置5:1運動拡大度5倍、組織に対する荷重0.5 g)を経て、煤煙紙上に描記する。煤煙紙上に描かれた曲線に於いてR-液のみを還流した際の一定緊張度を示す線を基準とし薬液の還液によって起つた緊張度の増大が一定値に達した場合の曲線との隔りをmm数で表わし、それをその蛙肺の収縮高とした。

実験成績

1) 夏期に於ける冷却装置下の蛙肺の緊張状態に就いて第2図に示した様に冷却装置下に於て、正常蛙(低温下飼育)肺の緊張状況を煤煙紙に描記すると肺は徐々に伸展し15'~40'後に至つて始めて一定の緊張が高まり完全に一定するまでには1°30'~1°45'を要した。緊張が一定した状態に於てAch 10⁻⁵g/l注入すると30'~1'の間に急激に蛙肺は収縮し1'~2'後にその収縮はゆるやかとなり、その後は略々一定の収縮を維持する。R-液に交換すると蛙肺は再び急速に伸展する。しかし蛙肺の緊張はAchによる実験前よりは高まつている傾向がみられる。即ち煤煙紙上の梃子はやゝ高位にて一定する傾向がみられる。これは著者が測定が可能なAch 10⁻¹¹g/m迄の低濃度の実験

に於ても同様な結果をみる事が出来た。又この事実は冬期に於ても同様であつた。

2) Ach 感受性に就いての季節の影響

蛙肺の感受性が季節によつて影響されることはCorsten⁽²⁾ 寺本³⁾によつて云われ冬期に於ては感受性が高いと云われて居る。著者は低温(1月, 2月)高温期(6月, 7月, 8月)を中心として実験を行つた。冷却を施さない場合Achによる収縮が一定するまでの時間は各期を通じて1°~1°15'であり夏期及び冬期に於ては差を認められなかつた。夏期に於ける蛙肺のAchに対する感受性はAch 10⁻⁶g/mlの濃度に於て収縮を認めたがAch 10⁻⁷g/mlに於ては蛙肺の自然収縮による固有運動との判別が困難であり、此のためAchの定量は不可能であつた。(第3図)低温期に於てはAch 10⁻¹³~10⁻¹⁴g/ml迄は収縮が確実に認められAch 10⁻¹⁶g/mlの低濃度に於ても緊張上昇を認める事が出来た。

以上の如く夏期に於ては蛙肺の感受性が低く又自然収縮も多く認めるが、冬期に於ては感受性が高く又自然収縮も比較的認めがたい。

3) 蛙肺のAch感受性に対する温度的関係につて

米沢⁹⁾は冬期に於て蛙直腹筋のAch反覆投与時の収縮反応は栄養液の温度が高い時には早く一定し低い時は時間を要すると報告して居る。この事実は本実験に於ても認める事が出来た。即ち著者が行つた実験に於ても蛙肺緊張の一定する時間は冷却装置下に於ては1°30'~1°45'である。冷却を行なわない場合は1°~1°15'であつた。この試薬及びR-液の液温が20°C以下に於いて、一定する時間が延長した事実は米沢⁹⁾の報告と一致するものである。

灌流液温度を8°C~19°Cまでに調節した場合の最低検出濃度及びAch 10⁻⁵g/mlに対する収縮高の変化を第I表に示す。これによると夏期に於ける蛙肺法によつてAchを定量する場合の最低検出濃度はAch 10⁻¹¹g/mlであり且つ収縮高も18±8 mmと最も高い結果を得た。

これは夏期に於て本実験を行う場合13°Cが至適温度である事を示すものである。10°Cに於ては収縮高

第3図 夏期蛙肺標本に於けるAch最小有効濃度測定

第1表 Ach 最低検出濃度と 10^{-5}g/ml の収縮高に及ぼす還流液温度の影響

還流液温度 ($^{\circ}\text{C}$)	収 縮 高 (Ach g/ml)	Ach 10^{-5}g/ml の収縮高の 百分率 (m.m.)
19	10^{-8}	4 *
18	10^{-8}	4 **
17	10^{-7}	6
16	10^{-7}	5
15	10^{-8}	10 ± 5
14	10^{-8}	11 ± 4
13	10^{-11}	18 ± 8
10	10^{-10}	17 ± 7
8	10^{-10}	8 ± 5

* 不規則な固有運動 (+)

** 15^{-7} にて固有運動 (+)

は 13°C との間に変化は認められず最低検出濃度も Ach 10^{-10}g/ml 迄は認められるも Ach 10^{-11}g/ml に至つては殆んど作用を認める事が出来なかつた。更に温度を下げ 8°C に於ては収縮高はむしろ低下し最低検出濃度は 10°C と同様 Ach 10^{-10}g/ml に止つて居る。 20°C に於ては不規則な固有運動があらわれ Dijkstra Noyous⁽¹⁾ の云う肋膜軸索反対が強くなり、僅かの温度差にても緊張は変化して一定しない。

$12^{\circ}\text{C} \sim 18^{\circ}\text{C}$ の間では R- 液にて洗滌を行うと蛙肺の緊張は実験前値に復することがなく一般に実験前値より高位に止つて居る。

22°C 以上の場合には蛙肺緊張は洗滌後実験前値へ復するか又実験前値より低下する傾向を示した。

4) 13°C に於ける各濃度の Ach に対する蛙肺収縮
上記操作条件を厳守しつゝ、即ち一定期間以上飼育箱内に飼育した蛙の肺を用い還流液温度 13°C で諸種濃度のに対する反応を検討した。最初にまず所定濃度 Ach の液内に於ける収縮高を測定しその後同一の蛙肺標に就いて Ach 10^{-5}g/ml の Ach に対する収縮高を併せて測定した。(第4図～第10図) はその実験によつて得られた代表的な煤煙紙上の描記曲線を示したものである。そして更にその煤煙紙上の計測値から Ach 10^{-5}g/ml の収縮高に対する各濃度の Ach 収縮高を百分率で表わしそれを収縮高百分率とした。即ち Ach 10^{-5}g/ml の Ach 内に於ける測定結果は第4図に示す如く Ach 10^{-5}g/ml の Ach に於ける収縮高の約80%の収縮高を得ている。これらの操作を各濃度毎に5回づゝ繰返して得られた平均値に就いて、その収縮高百分率を見ると $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}\text{g/ml}$ 各濃度の Ach 液内の成績は、それぞれ82, 72, 64, 54, 45 及び 32%であつた。(第2表 a) しかし Ach

10^{-12}g/ml では充分計し得るだけ蛙肺収縮を認めることが出来なかつた。

第4図 夏期に於ける冷却装置による Ach $10^{-6} \sim 10^{-5}$ 第6図 夏期に於ける冷却装置による Ach $10^{-7} \sim 10^{-5}$ 第6図 夏期に於ける冷却装置による Ach $10^{-8} \sim 10^{-5}$ 第7図 夏期に於ける冷却装置による Ach $10^{-9} \sim 10^{-5}$ 第8図 夏期に於ける冷却装置による Ach $10^{-10} \sim 10^{-5}$ 第9図 夏期に於ける冷却装置による Ach $10^{-11} \sim 10^{-5}$

第10図 夏期に於ける冷却装置による
ACH 10^{-10}

第II表 a Ach 各濃度に対する収縮高百分
率 10^{-5} g/ml に対する収縮高

Concentr of Ach g/ml		-6	-7	-8	-9	10	-11
		10	10	10	10	10	10
group number	mm %	mm %	mm 90	mm %	mm %	mm %	mm %
1	22(25) 88	9(12) 75	14(20) 70	13(21) 62	8(19) 42	9(24) 38	
2	12(21) 86	17(21) 81	7(12) 58	6(12) 50	10(20) 50	8(23) 35	
3	8(11) 73	18(28) 78	12(18) 67	7(13) 54	5(11) 45	5(19) 26	
4	14(17) 82	10(14) 71	13(19) 68	9(20) 45	55(12) 45	6(17) 35	
5	11(14) 79	5(9) 56	9(16) 56	10(17) 58	7(17) 41	5(18) 28	
Average (%)		79	72	64	54	45	32

5) Eserin 併用の場合 Ach の最低検出量

単独では蛙肺に対して影響のない Eserin 5×10^{-5} g/ml を併用し同様の実験を行った。竹田²⁾は Ach に対する収縮を増強するために Eserin-Sen Sitzung を行いその効果が冬期より夏期の方が著明であると報告した。しかし寺本⁵⁾は夏期に於ても Ach と Eserin 5×10^{-6} g/ml 両薬物を用いて実験した時に Eserin 前処置後或い Eserin は併用によつては蛙肺の収縮高の増大が認められたが最低検出濃度の低下は全く認められる事が出来なかつたと報告している。冷却装置を用いた本実験に於ても Eserin 5×10^{-6} g/ml 前処置後に Ach を作用させたが Ach 最低検出濃度の低下を認めることが出来得なかつた。しかしこの場合収縮高の増大は認める事が出来た (第12 : 13図参照)

6) 用量一反応曲線に就いて

著者の行った実験成績を推計学的に処理すると Ach 濃度と収縮高百分率の間に相関関係が証明された。第

第11図 夏期に於ける冷却装置による
Ach 10^{-18} の場合

第12図 夏期に於ける冷却装置による
ACH 10^{-18} 並び Eserin の場合

第13図 夏期に於ける冷却装置による
Eserin 併用 ACH 10^{-12} 並び
Ach 10^{-5} 単独の場合

2表 (b) は収縮高百分率の実数を基礎として行われた分散分析表である。表中第一次回帰項は群内誤差項に対しても第二次以下の回帰項に対しても 1% 以下の回帰項は群内誤差項に対して有意性のないことが認められている。即ち蛙肺の Ach に対する収縮反応に於いて、収縮高百分率の実数の Ach 濃度に対する直線回帰が認められた。この場合の回帰直線の諸性質は次の如くである。(第14図)

回帰係数 (Regression Coefficient)

$$D=0.989$$

標準偏差 (Standard deviation from regression line)

$$S=\pm 0.552$$

Index of Precision (by Bliss⁹⁾) $a=0.558$

(用量間隔10倍)

第II表 b 表収縮高百分率の対数に基く要因分析表

	SS	DF	MS	F	Sig
Regression	8169.9	1	8169.9	186.5	**
Deviation from Reg.	17.6	4	4.4	0.104	
Between dosis	8187.5	5	1637.5	37.3	**
within dosis	1052.37	24	43.8		
Total	9239.87	29			

第II表 c 収縮高百分率の対数に基く要因分析表

	SS	DF	MS	F	Sig
Regression	5277.09	1	5277.09	549.6	**
Dev. from Reg	600.8	4	150.2	17.7	**
Between doses	5877.89	5	1175.6	122.4	**
within doses	230.8	24	9.6		
Total	6108.7	29			

総括及び考按

Ach の生物学的定量法としての蛙肺法は Corsten²⁾ 竹田³⁾ 及び寺本⁴⁾ 等によれば冬期には感度は極めて大であり Ach 10^{-10} g/ml 迄も測定が可能であると報告されている。しかるに夏期に於いては自然収縮が起り易く Ach に依る収縮との判別が非常に困難であり且又敏感度の低下が認められる。これ等の事実より夏期に於いては蛙肺を使用しての Ach の定量は困難だとされて来た。そこで今回は夏期に於ても冬期に於けると同程度に感度を上昇せしめ Ach の定量を可能ならしめるために特に考案された冷却装置を使用して測定を行つて見た。即ち夏期に於ては Corsten⁽²⁾ 竹田³⁾ 等は Ach 最低検出濃度は Ach 10^{-7} ~ 10^{-9} g/ml であると報告している。これに対して寺本⁴⁾ は 6 月下旬の時期に於ては Ach 10^{-6} g/ml でさえも自然収縮との判別が困難であると云つて居る。著者の実験に於ても 6 月 ~ 7 月に於ける最低検出濃度は Ach 10^{-8} ~ 10^{-6} g/ml であり非常に感度の低い事を認めた。又寺本は感度上昇の目的で KCN, CaCl_2 , Chloral-hydrate, Urca, coffeine, Folicacid, Vitamin B 等を併用したが収縮高の上昇のみを認め最低検出濃度を低下せしめる事は出来なかつた。守川⁶⁾ は夏期に於て単独では作用を認めない用量の CaCl_2 , coffeine, 人血清の三者を Ach と併用して蛙肺灌流を行つた所その最低検出濃度の低下を認めたが、それは Ach 10^{-9} ~ Ach 10^{-10} g/ml の Ach 測定を可能にしたに過ぎず、著者の実験の結果 Ach 10^{-11} g/ml まで測定し得たと云う事実は守川⁶⁾ 等の薬物併用の方法にくらべ冷却法が一層秀れた生物学的検定法である事を示すものである。

今回著者が採用した冷却と云う手段が蛙肺組織の Ach に対する感受性が増大せしめた機序に就いては猶不明の点が多い。しかし先ず第一に考慮されることは、温度低下によつて自然収縮を或る程度抑止し得たことである。

これらは恐らく低温期に於ける細胞の全酵素系の活性度の低下、それに引き続いて起る収縮過程に必要なと思われる Energy source の減少に基因する事も考えられる。第二に Acetylcholin-esterase cholinesterase の活性度低下によつて惹起される Ach 作用の増大が採り上げられるべきであろう。(Anfinsen et al)¹⁰⁾ しかし、これのみが最低検出濃度の低下をまねいた主因ではないことは Eserine 併用の場合の今回の成績からも充分に推察される所である。第三には Grenels⁹⁾ の所謂 “Potential. theory” に説かれている如き機序

第14図 収縮高百分率を使用した際に於ける Ach 作用濃度曲線

第15図 収縮高百分率の対数を使用した際の Ach 作用濃度曲線

之に反し第2表(c)は収縮高百分率の対数を定量指標の meta meter とした場合の分散分析表である。この場合、第一次回帰項は群内誤差項に対して1%以下の危険率を以て有意と判定される。しかし第2次以下の回帰項に対しては有意性を証明し得なかつた。第2次以下の回帰項自身も亦群内誤差項に対して1%以下の危険率をもつて有意である。即ち当該 Ach 濃度範囲に於いて、対数計測値は曲線回帰を有することが明らかである(第15図)。したがつて Ach 生物検出法に採用されるべき標準回帰線の meta meter としては蛙肺収縮高百分率の値よりも優れていると判定された。

であろう。即ち Grenels⁹⁾によれば細胞の Ach 感受性を左右する主な要因としては細胞内外 Ach の濃度差と細胞膜透過性であるとされている。したがって低温環境に於いて Ach 感受性が增大するとすれば、それは細胞内濃度の低下によるか、或いは細胞膜透過性の増加いずれかの因子が介在するものと考えられる。しかし低温環境内で特に細胞内 Ach 濃度が低下している確証はなく、又 Ach の細胞膜透過性の増大を来たす事実も認められていない。唯この際問題にすべきは、電解質、特にすでに Hodgkin¹²⁾等によつて証明されている Na^+ K^+ 及び $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ の移動が Ach 透過性に与える二次的影響であつて、低下によつて当然惹起されると思われる膜電位の低下が Ach の透過に促進的に働く可能性を否定出来ない所である。以上の如き観点からすれば Ach の細胞への侵入過程を促進するか或は維持したまま、細胞内分解過程を出来るだけ抑制し、一方組織収縮に関する諸酵素系の機能を發揮せしめ得る様な条件が最適なものといひ得る。13°C 以下に冷却した場合、最低検出濃度に变化がなく、組織収縮高のみが低下した事実は、肺収縮機転を促進する酵素系が 5°C 以下に於いてほとんどその活性を失うとする、Du Bois¹¹⁾等の観察と対比すれば極めて興味深い所であり、定量操作の条件としての温度は 13°C 以下では、13°C 以上の高温域と同様に不適當であることを物語っているものである。前述の如く著者の実験に於て冷却装置及び蛙飼育法の改良によつてその最検出濃度を低下せしめる事に成功し、高温期に於ても Ach 10^{-11}g/ml まで可能である事が明らかになつた。しかし Corsten²⁾の冬期蛙肺を使つての Ach の生物学的定量法による成績の Ach 10^{-15}g/ml には遙かに及ばない。この点更に検討を要するものと思われる。ここに注意すべきは Corsten²⁾等の報告と異り、著者の成績では収縮高百分率の対数値を座標軸にとつた場合には直線回帰を証明し得ず、収縮高百分率の実数そのままを使用して一次回帰を認め得た事である。このことは両者の間に本質的な差異のあることを物語るものでないことは明らかであるが、両対数座標を使用するの誤差率の大なる事実を考え合せると、明らかに著者の方法が Corsten²⁾等の方法より精度の上で優れている事を示すものである。

結 論

高温期に於ても、特殊の冷却装置を施す事によつて蛙肺を使用しての Ach の生物学的定量法を鋭敏ならしめる事が出来た。即ち、

1) 夏期蛙肺に対して冷却装置による Ach の単独有効量は Ach 10^{-11}g/ml 迄認める事が出来た。

2) 5×10^{-6} Eserin 併用による収縮高の増強は認める事が出来たが、最低検出濃度の低下は認めることは出来なかつた。

3) 夏期蛙肺の Ach 感受性に対する温度的關係に於ては収縮高及び敏感度の点より考案して 13°C が最適温度である事が明らかとなつた。15°C 以上及び 20°C 以上は不規則な固有運動が認められ僅かの温度差にても肋膜軸索反射が強くなる傾向が認められ緊張は一定しない。又 10°C 以下に於ては収縮高及び敏感度は低下傾向が認められた。

4) 還流温度 13°C 蛙肺収縮高百分率を meta meter とした場合 Ach 濃度 $10^{-8} \sim 10^{-11}\text{g/ml}$ の範囲内に於ける両者の直線回帰は有意である。その回帰直線の諸性質は次の如くであつた。

最低検出濃度 Ach 10^{-11}g/ml

標準偏差 (Standard deviation from regression line) $S = \pm 0.552$

回帰係数 (Regression Coefficient) $D = 0.989$
Index of Precision (by Bliss)
 $\alpha = 0.558$

又両対数座標上で直線回帰を証明し得なかつた。

主 要 文 献

- 1) Dijkstra, C. Noyous, A.K.M: Arch Internat. Physiol **49**, 257 (1939)
- 2) Corsten, M: Pflüger's Arch **244**, 2 Helt, 281 (1940)
- 3) 竹田橋雄: 日薬理誌, **41**, 291 (1947)
- 4) 寺本雪男: 日薬理誌, **44**, 79 (1949)
- 5) 寺本雪男: 日薬大誌, **17**, 549 (1950)
- 6) 守川 考: 日医大誌, **20**, 1099 (1953)
- 7) 米沢末治: 岡山医会誌, **54**, 861 (1942)
- 8) Grenels, H: Erg. Physiol **42**, 53 (1939)
- 9) Bliss, N: Ann. Rev. Physion **5**, 479 (1943)
- 10) Anfinsen, C.B. Lowry, O.H and Hastings, A.B.: J. Cellular, Comp. Physiol, **20**, 231 (1942)
- 11) Du Bois, K.P and Potter V.R: J. Biol. chem, **150**, 185 (1943)
- 12) Hodgkin, A.L. and Keynes, R. D: J. Physiol **128** 28 (1955)