

II-C-7

セリウム塩を用いた phosphatase の検出法
——鉛法との比較

勝又 修, 山科 正平
(北里大・医・解剖)

各種の phosphatase 活性の局在を検出するために、これまで鉛塩が捕捉因子として用いられてきた。鉛法は最終反応産物が微細な上にコントラストも高いが、反応液の白濁傾向がつよく、それ故に非特異染色が生じやすいという欠点もある。最近、鉛塩にかえて、セリウム (Ce) 塩を用いる試みがなされているため、本研究では種々の phosphatase を対象に、両者の方法について比較検討を加えた。その結果、Ce法により、5'-AMPase, TPPase, acidCMPase, G6Paseの活性は核染などの非特異染色がなく検出できることが半明した。反応液の調製も容易で、長時間放置しても白濁が生ずることはない。反応産物の粒状性も良く鉛法の場合と変わらないが、コントラストはやや低い傾向がある。alkaline phosphatase の場合、反応液はやや白濁するが、充分使用に耐える。しかしATP, NPP, Fructose 1, 6, diphosphate を基質にした場合には反応液の白沈がつよく使用できない。Ceは硝酸塩でも、塩化物でも大差はない。Ce法による最大の難点は、発色できないため光顕下に可視化されないことである。

II-C-8

p-NPPを基質とした、 H^+ , K^+ -ATPaseの電顕細胞化学的検出法について

小川和重, 藤本 和, 小川和朗
(京都大・医・解剖)

H^+ -translocatingATPaseの一種である H^+ , K^+ -ATPaseの細胞化学的検出法は未だ確立されていない。今回、p-NPPを基質とし、 H^+ , K^+ -ATPase活性をその部分反応である K^+ -NPPase活性として検出する方法を生化学的、細胞化学的に検討した。材料としては、モルモット胃底腺を用いた。

NN'-dicyclohexylcarbodiimide (0.1 mM) (H^+ , K^+ -ATPaseの阻害剤)感受性 K^+ -NPPaseの至適pHはpH 7.4 ($1 \mu\text{M}$ p-NP / 100 cells/min)であるが、DMSOによりpH 9.0に移行し、20% DMSOと100 mM MK^+ 存在下で $2.5 \mu\text{M}$ p-NPの活性値を示した。固定による失活は、2% PFA 60分間では10%であるが、0.5%以上のGLAでは、ほぼ完全に失活した。細胞化学的検出には、2% PFAと0.25% GLA混液で60分間固定後、浸漬液(1.0 M グリシン-0.1 M KOH緩衝液, pH 9.0, 2.5 ml; 10 mM ぐえん酸鉛, 50 mM KOHに溶解, 4 ml; 3.1% p-NPP, Mg塩, 1 ml; 1.1 M KCl, 0.5 ml; DMSO, 2 ml; レバミソール, 6 mg; ウワバイン, 73 mg)にて、30分間室温で反応させた。活性は、壁細胞の頂上膜、分泌細管膜、小管状滑面小胞体膜、ミトコンドリア内膜に認められた。