

-112- ドライマウント オートラジオグラフィ
法の改良とその内分泌臓器の Cell Kinetics への応用
獨協医科大 臨床病理（代謝科）
中井 利昭
八王子生体化学研究所
重松 昭世

^3H -thymidine を用いての細胞分裂の研究は広く行われているが、現在までのほとんどの研究は発生初期や出生後の幼若期についてであった。今回われわれは一枚のスライド上にラット胎仔の全身切片をのせるドライマウントオートラジオグラフィを改良したので、この改良法を用いて出生直前の胎仔ラットについて、その内分泌臓器の Cell Kinetics を検索した。
〔方法〕妊娠 22 日目のラットを開腹し、胎仔に直接 $225\mu\text{Ci}$ の ^3H -thymidine を投与した。30 分後胎仔をとり出し、 -20°C のクライオスタット内で滑走型ミクロトームを用いて 1 つのスライドガラス上に胎仔全身の標本切片を作成した。標本切片を真空乾燥にして、暗室内でストリップングタイプの乳剤膜と密着させた（密着を完全に行うために、あらかじめ暗室内で乳剤膜を water bath の中でプラスチックシートで覆ったスライドガラスに載せた。標本切片スライドにこの乳剤膜スライドを載せて、乳剤膜のみを完全に密着させた後、プラスチックシートをはがした）。4 週間後に現像、定着し、核内にとりこまれた銀粒子を観察した。
〔結果及び考察〕各内分泌器官への銀粒子のとりこみを検索すると、1) 胸腺は他の内分泌器官に比べて最も盛んな細胞分裂がみられた。これはラットにおいては胸腺重量や DNA 含量が出生 3 ヶ月まで増大し、その後退化するという Enesco らの報告を支持するもので、胸腺のリンパ球は細胞分裂によりその数がどんどん増大することを示している。2) 副腎皮質においてはその外層に多くの分裂像がみられたが、内層には分裂像は少なかった。副腎皮質の細胞増殖説として外層の細胞より内層へと増殖していくという centripetal 説があるが、われわれの結果はまず ^3H -thymidine が外層にとりこまれ盛んな分裂像を示していることより、この centripetal 説を支持するものである。3) 精巣と卵巣の細胞分裂を比べると、精巣の方が卵巣に比べ銀粒子のとりこみが多くみられた。このことは胎生末期には精巣活動が盛んであるが、卵巣活動はまだ盛んではないというわれわれの既報の結果を Cell Kinetics の知見より支持するものである。以上 ^3H -thymidine を出生直前の胎仔ラットに注射し、その全身オートラジオグラムを作成することにより、内分泌諸臓器の発育過程の Cell Kinetics を明らかにしたが、この知見は単にそれのみにとどまらず、その内分泌器官の形態と機能発育の関連性を明らかにするものである。

-113- ラット肝における hydroxy methylglutaryl CoA reductase の測定（測定法の基礎的検討とラットの性差、日差変動について）
東京都老人総合研究所 第一臨床生理
○笠原美威子、木谷健一

生体内のコレステロール代謝は、生命の維持はもちろん、加齢、各種疾患などにも重要な役割りを演じている。その生体内合成の律速酵素は hydroxy methylglutaryl CoA reductase, (HMG-CoA reductase) とされている。この酵素の活性の測定法は近年いくつかの報告があるが、必ずしも容易でなく、またその活性値は、動物種、系統差、性、年齢などで異なるほか、日差変動も著しいことが報告されている。著者らはラット肝における本酵素活性測定法を基礎的に検討すると共に、性差、日差変動について検討を行なった。
方法：[$3-^{14}\text{C}$] HMG (NEN) を carrier HMG と混じ、Goldfarb の方法により HMG anhydride とし、ベンゼンより再結晶させた。さらに Hilz の方法により還元型 CoA と反応させて HMG CoA とし、ペーパークロマトグラフィ（展開剤、ブタノール：酢酸：水、5：2：3）により分離精製した。6.00-18.00 の 12 時間照明で飼育した SPF, SD 系ラットを用い、昼間 11.00-12.00、夜間（23.00-24.00）に撲殺し脱血後肝をとり出し、 4°C で磷酸バッファーと共にホモゲナイズし、10000xg, 15 分の上清をさらに 100,000xg, 60 分遠沈し、その沈殿としてミクロゾームを得た。 ^{14}C -HMG CoA, NADP, glucose-6-phosphate dehydrogenase をミクロゾームに加え 37°C 20 分インキュベートしたのち、 ^3H mevalonate を internal standard として塩酸と共に加え反応停止と共に mevalonolactone を生成させた。TLC により mevalonolactone の分画を分離し、Bray のシンチレーターを用い液体シンチレーションカウンターにより ^3H , ^{14}C mevalonolactone の放射活性を求め、これより生成した ^{14}C mevalonate 量を求めた。
結果：reductase 活性 (p mole/mg protein/min, mean $\pm$ SD) は昼間で、雄 54.6 ± 8.1 , 雌 81.0 ± 11.4 , 夜間、雄 92.65 ± 77.3 , 雌 132.98 ± 103.4 であり、雌は雄に比し 40-60% 高く、また両性とも夜間値は昼間値の 1.6-1.8 倍と高い日差変動を示した。
断案： ^3H -mevalonate を internal standard に用いることにより ^{14}C -mevalonolactone の回収率を補正し得、酵素活性測定は容易かつ正確となる。ラット肝の日差変動は性差に比しはるかに大であり、基質濃度にも十分の注意が必要である。