

血球ミトコンドリアの細胞化学的研究

第 1 編

血球のコハク酸脱水素酵素系に関する細胞化学的研究

岡山大学医学部病理学教室（指導：妹尾教授）

酒 井 晃

〔昭和 34 年 2 月 5 日受稿〕

緒 言

血球の形態と機能との相関性を究明するためには、その細胞内諸種構成要素の微細構造とそれらの生化学的組成と酵素活性との関係を細胞構造を破壊しない最も自然な而も最も微視的な細胞構造の場に於て直接細胞化学的に追究してゆくことが望ましい。細胞の生命維持に必要なエネルギーの産生は大部分ミトコンドリアに於ける呼吸機能の遂行によつて果されている事は現在の一般的定説であり、ミトコンドリアの形態とその変化は直接細胞の機能と生命に重大な意義を有するものである事は間違いない。その形態的变化は既に細胞分裂或は薬物温度の変化に際しても著明に現われる事が認められているが (Chèvremont¹⁾²⁾³⁾, Frédéric⁴⁾⁵⁾, 島倉⁶⁾⁷⁾, 牧野⁸⁾ ら) 血球や腫瘍細胞或は一定の病的状態に於ける形態の変化、酵素活性の変化等は未だ詳しく追及されていないようである。血球ミトコンドリアの観察には従来 Janus green による超生体染色法が愛用されてきたしその染色機構が Razarow 及び Cooperstein²⁶⁾ のいう如きものであれば之によつて酸化酵素活性の程度、形態の変化等をほぼ知る事が出来るが最近の妹尾その他¹⁷⁾¹⁸⁾ の研究により Razarow の説は誤りであることが示され、又 Janus 緑はミトコンドリアを特異的に染色するが染らないものもあり、その形も染色によつて膨化し変形することが示された。従つて従来血液学者によつて行われてきた Janus 緑超生染による血球のミトコンドリアの研究は再び根底から観察し直す必要に迫られている。又 Janus green 以外にミトコンドリアを特異的に染め出す色素というものは見出されていない。

著者はミトコンドリアに限局して存在する酵素、就中呼吸酵素の活性に基く従来の呈色反

応を改良して血球ミトコンドリアを特異的にかつ細胞化学的に検出する方法を考案し、その分布と活性の程度を正確に把握する方法を確立し、之によつて血球の分化や病的変化に伴うミトコンドリアの形態的变化及び酵素活性の変化を追及し、之を以て諸種細胞機能とミトコンドリアとの相関関係を究明することを企図した。著者らは先ずミトコンドリアの構造に固く結合した諸種呼吸酵素即ちコハク酸脱水素酵素系、チトクローム酸化酵素系、更に DPNH-脱水素酵素系の活性を夫々適当な基質或は阻害剤を使つて検討しミトコンドリアに一致して現われる細胞化学的なミトコンドリア染色法を確立した¹²⁾¹³⁾。即ち之等は顕微分光学的に、又電子顕微鏡的にミトコンドリアに一致して出現する¹²⁾¹³⁾。従つて之等の反応はミトコンドリアの正確な検出に役立つと同時に夫々の反応に特有なミトコンドリアの酵素活性の程度をも示すことが出来る。之等の反応を用いて著者は各種血球の増殖分化に関連して起るミトコンドリア分布の変化その酵素活性の推移を追究した。その一つの成果としてミトコンドリアを有しながら之等が Janus 緑で染まらない事が妹尾その他によつて始めて明らかにされた網赤血球に於ても著者の反応によつてそのミトコンドリアが細胞化学的に検出される事を明かにすると同時に之等が可成り強い酵素活性を有し活動しているものである事も明かにし得た。続いて著者は呈色反応を行つた後にミトコンドリアの超薄切片を電子顕微鏡的に観察¹²⁾¹³⁾ しミトコンドリア内の酵素存在部位を明かにする事を得た。

本編に於ては先ずコハク酸脱水素酵素系反応による血球ミトコンドリアの細胞化学的検出と各種血球内に於けるその分布並びに血球の分化に伴う同酵素活性の変化の検索成績について述べる。

材 料 と 方 法

材料としては人、家兎、ラット、マウスなどの骨髄、リンパ節、末梢血、腹水細胞などを用いた。人の骨髄及びリンパ節は手術的摘出又は切除材料及び死後時間の短い剖検材料から得た。家兎、マウスの骨髄は断頭失血死せしめたものから採取した。末梢血は人及び家兎では耳よりラット、マウスでは尾静脈より得た。酵素反応はそれらの塗抹、スタンプ、未乾燥標本、細胞浮遊液、組織小片について行つた。コハク酸脱水素酵素系の反応はコハク酸ソーダを基質とし、ネオテトラゾリウム塩の他、最近合成され未だ血球には応用されたことのないニトロネオテトラゾリウム塩¹⁴⁾及びニトロブリューテトラゾリウム塩¹⁵⁾などを水素受容体として用いた。即ち反応液の組成はネオテトラゾリウム塩の場合は 0.2M コハク酸ソーダ液、0.2% Neotetrazolium chloride 水溶液、0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) の各々を等量に混じた液又は緩衝液のかわりに 1 M. Sucrose 液の同量を加えたものを用いた¹²⁾¹⁶⁾。反応は血液と基質混液を混合して 37°C で 1~2 時間施行した。なお反応を定量的に行うために基質混液と細胞数とを一定の比率に保つように心掛けた¹²⁾¹⁶⁾。ニトロネオテトラゾリウム塩は B. Pearson 氏から供与されたもので大体その組織化学的原法¹⁴⁾に準じてそれを血球に応用した。即ち Nitroneo-tetrazolium chloride (Nitro-NT) の N,N-dimethyl formamide 溶液 (10 mg 15 ml), 0.1M Sodium succinate 液, 0.1M phosphate buffer (pH 7.6) 三者等容混液を用いた。Nitro-NT は水にやや溶け難いが、N,N-dimethyl formamide は酵素反応に影響を与えないで而も Nitro-NT を溶解する。反応は Neotetrazolium の場合と同様にして 37°C で 30分~1 時間或は 25°C で 30分~1 時間或は 25°C で 1~2 時間反応せしめた。ニトロブリューテトラゾリウム塩は A. M. Seligman 氏から供与されたもので大体その組織化学的原法¹⁵⁾に準じてそれを血球に応用した。即ち反応液としては 0.1% Nitro-blue tetrazolium chloride 水溶液, 0.2M sodium succinate 液, 0.1M phosphate buffer (pH 7.6) 三者等容混液を用いた。反応は前二者の場合と同様血液とこの混液を混合して行つた。Nitro-blue tetrazolium は組織内浸透性が強く反応が極めて鋭敏で而も反応生成物たる diformazan は微細で針状結晶を作らず更に脂質にも溶けず脂溶性溶媒にも溶けない。従つて反応時間

は 30分で充分であり種々な後染色、アルコール脱水、キシロール透徹バルサム封入も可能である。なお何れの場合にも substrate control として succinate 液を除いて同量の phosphate buffer を加えたものを用いた。他方固在基質反応を除去又は減ずるために一部は凍結 (-20°C, 10分) 処理を行つたものについて同様の反応を行いその結果を上記の方法によつて得た結果と比較した。その他反応の特異性を検するために一部加熱 (80°C, 10分) 或は malonate (10⁻²M), cyanide (10⁻³M), antimycin A (0.1~100%) などの酵素活性阻害剤を添加¹²⁾¹³⁾したものについても検討した。塗抹及び捺印標本で反応したものは反応後直ちに、乾燥後ホルマリン蒸気固定 (2~12時間) 又はそのまま 10%ホルマリン固定 (1~2時間) 後無染色のまま又は後染色後主にグリセリン浸及びポリビニールアルコールで封入し、又一部はチェーデル油又は脱水透徹バルサムで封入し検鏡した。

細胞浮遊液及び組織小片で反応せしめたものは反応後直ちに塗抹又はスタンプ標本として同様処理した。組織小片の一部はネオテトラゾリウム塩及びニトロネオテトラゾリウム塩処理の場合は 10%ホルマリン固定後 Carbowax 包埋切片、ニトロブリューテトラゾリウム塩処理の場合はパラフィン切片として観察した。後染色は giemsa 染色では酵素反応顆粒とアズール顆粒との鑑別が困難となるので Safranin O 又は hematoxylin-eosin で軽く後染したものを参考とした。赤芽球、網赤血球及び赤血球は主として顕微分光装置を用いて 4,060 Å に於けるヘムの吸収と 5,200 Å に於ける diformazan (ネオテトラゾリウムの還元生成物) の吸収によつて観察した。又本反応がミトコンドリアに一致して出現することを証明するために溶血未固定及びオスミウム固定塗抹標本及び超薄切片標本について電子顕微鏡的観察を併用した。その他本反応が従来の諸種ミトコンドリア染色より優れかつ特異的であることを証明するために Janus 緑超生体染色, Altmann 氏染色, Sudan black B や Nile blue による脂質染色標本と比較観察した。又本反応陽性顆粒と血球内諸種顆粒との関係を調べるために May-Giemsa 染色及び Neutral red 超生体染色標本と比較した。

成 績

反応の特殊性並に局在性に関する観察と吟味：
反応は何れの ditetrazolium 塩を用いた場合にも

成熟赤血球を除く全血球の細胞質内にその酵素活性の強弱に応じて鮮明な球形顆粒乃至桿状体として出現する。反応生成物 diformazan は neo-tetrazolium 塩及び nitro-neotetrazolium 塩では濃紫色, nitroblue tetrazolium 塩では深青色である。核は全く反応陰性である。反応は血球のミトコンドリアに一致して出現する。反応の鋭敏度は nitro-blue tetrazolium > nitro-neotetrazolium > neotetrazolium の順序で低下し組織内浸透性は nitro-blue tetrazolium > neotetrazolium > nitro-neotetrazolium の順に弱くなるが塗抹或は細胞浮游液での反応の場合は何れも速かに浸透する。反応顆粒の性状は nitro-blue tetrazolium が最も微細で次で nitro-neotetrazolium, neotetrazolium の順である。反応条件と時間が適当であれば何れの場合にもミトコンドリアに一致して反応が出現するが反応時間が長すぎると顆粒が互に融合粗大化する傾向がある。特に neotetrazolium では反応顆粒がやや粗大で屢々 diformazan の結晶を生ずる。然し新鮮細胞では細胞外に反応顆粒の生ずることは殆んどない。neotetrazolium 及び nitro-neotetrazolium の diformazan にはこのような傾向はないが之等は脂質に溶け易く或程度二次的に脂質の共染を伴う。特にそれらの ditetrazolium 塩が不純で monotetrazolium 塩を含有する場合は反応生成物は脂質に溶け易く又結晶を作り易い。又凍結細胞や凍結切片ではその傾向が強し遊離浮游細胞ではその傾向が少い。然し脂質の二次的染色像はその色が淡いので一般に容易に区別出来る。nitro-blue tetrazolium 塩の diformazan は脂質にも脂溶性溶媒にも溶けないので細胞化学的に優れているが反応が極めて鋭敏なためにミトコンドリアに一致したコハク酸脱水素酵素反応の他に固在還元系による反応が出現し易い。又反応中細胞構造が幾分破壊する傾向がある。好氣的条件下に於て特に赤血球が多数混在する場合は neotetrazolium では著しく反応の低下を来すから末梢血の塗抹標本では観察困難であるが nitro-blue tetrazolium はそれらの条件によつて反応の減弱を来すこと少く末梢血の塗抹或は浮游液の状態で充分反応を出現せしめることが出来る。neotetrazolium 塩及び nitro-neotetrazolium 塩の diformazan は脂溶性溶媒就中 ether-acetone (同量混液) で容易に抽出し得るので一定量の細胞を用いて反応を行いその抽出液を用いて比色定量を行う事によつて化学的に酵素活性度の測定¹²⁾¹⁶⁾を行い得る利点があるが、nitro-blue tetrazolium 塩

の diformazan は脂溶性溶媒で抽出出来ないのでは活性度の測定が出来ない。然し或程度の誤差(特に S-V 効果による誤差)を覚悟すれば何れの場合も顕微分光測光装置を用いて 1 ケづつの細胞についての活性を測定する事が出来る。酵素反応の特異性については 80°C, 10 分処理で反応は完全に陰性化しマロン酸ソーダ (10⁻²M) 添加によつて僅かの固在基質反応を除く基質特異的反応は殆んど完全に阻害される。最も問題となるのは固在基質反応であるがこれは極めて軽度なので反応時間を短縮することによつて或は凍結処理によつて殆んど陰性化し得る。然し固在基質反応は反応条件が適当な場合は殆んどミトコンドリアの固在脱水素酵素系によつてミトコンドリアに一致して出現するのでミトコンドリアの特異的細胞化学的検出には支障はない。ただコハク酸脱水素酵素活性の特異的検出乃至特異的活性度の測定を目的とする場合には上記処理によつて固在基質反応を除く必要がある。又本反応標本は長期保存に耐える。

赤血球系細胞の反応と成熟に伴う変化:

赤血球系では明かに幼若赤芽球ほどミトコンドリアが多く活性も強い。屢々検出される分裂中の赤芽球や二核性赤芽球にも多数のミトコンドリアを認め強い活性が現われる。成熟に従つて heme の吸収が増すと逆にミトコンドリアの数や活性が減ずる。更に脱核後の網赤血球にも先に示した如く少数のミトコンドリアが存在し本酵素活性が認められる。成熟赤血球に至るとミトコンドリアが消失し本酵素活性も消失する。なお同一細胞内のミトコンドリアにもその大小活性の強弱が認められる。これらの反応がミトコンドリアのみに特異的に出現することを調べるために後染色しない標本について顕微分光装置を用いて反応顆粒の観察を行つた。先ず 4,060 Å の線で観察すると heme の強い吸収が赤血球系細胞内に認められ白血球系細胞は全然 heme の吸収がないが細胞質内に diformazan 顆粒の弱い吸収が認められる(第13図)。heme の吸収を示す赤芽球の細胞質内にも同様顆粒の弱い吸収が認められ(第14図)。更に脱核後の網赤血球内にも同様顆粒の吸収を認める(第15図)。これは neo-tetrazolium の diformazan は 5,200 Å に極大吸収をもつが 4,060 Å 附近にも吸収をもつためである。これを diformazan の極大吸収波長で観察すると heme の吸収は消えて赤芽球や網赤血球内に強い diformazan 顆粒の吸収が認められる。この顆粒の分布と性状は後に示す電顕像に於

けるミトコンドリアの像と全く一致する。第16図は同様 5, 200 Å に於ける白血球の反応顆粒の吸収像である。

次に更にこれを確認するために酵素反応を施行した網赤血球を0.8%の生理的食塩水に2.5%の割合にフォルマリンを溶かした液で溶血固定⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾し電子顕微鏡的に観察すると diformazan 顆粒の分布と同様にミトコンドリアの存在することがわかる。勿論電顕像で diformazan 自身の吸収は認められないが先に示した diformazan 顆粒がこれらの電顕像に於けるミトコンドリアに一致して現われたということは疑いの余地がない。このことは後編(第4編)に於ける超薄切片による血球ミトコンドリアの細胞化学的電子顕微鏡的観察によつて決定的に確証される。従来網赤血球は種々な超生体色素によつて観察されて来たが之等は ER を染めるものでミトコンドリアを染めるものでない事が明らかにされた¹⁷⁾¹⁸⁾²¹⁾²²⁾。然し本法によれば網赤血球のミトコンドリアが細胞化学的に証明される。Janus 緑に染らなくても充分な酵素活性のある事が明かにされた。

白血球系細胞の反応と成熟に伴う変化

本酵素反応によつて調べた各種血球内に於けるミトコンドリアとその酵素活性の分布は第17図に示す如くである。即ち一般に比較的幼若な血球にはミトコンドリアの数も多く酵素活性も高い。成熟に従つてミトコンドリアの数も減少し活性も低下してゆく。骨髓性幼若白血球就中骨髓芽細胞では細胞質全体にはほぼ平等に散在し核陥凹部のあるものでは多少その部に多い。前骨髓細胞以後成熟顆粒の出現する段階になると好中性、好酸性、好塩基性細胞共にやや反応顆粒は不規則な分布を示す。成熟に従つて核の形の変化、成熟顆粒の増加と共にミトコンドリアの数も減少し散在性となる。単球系では一般に活性が高い。細網細胞では細胞質全体に散在性に多数出現し塗抹細胞ではミトコンドリアは核の上にも重つて現われる。リンパ球系細胞では特に核陥凹部に集つた巨大桿状のミトコンドリアに一致して強く現われる傾向がある。巨核球は最もミトコンドリアの数が多く活性も強い。全体的に瀰漫性に散在し塗抹によつてミトコンドリアが移動し難く核の上にも陥凹部内にも周辺部にも散在して現われる。

考 案

従来ミトコンドリアの特色染色法として愛用されて来た Janus 緑は必ずしも全ての血球のミトコン

ドリアに強い親和性を示さず¹⁷⁾、脂質の共染を伴いその染色機構は確実でなく而も速かに脱色される。そして Janus 緑で染らない網赤血球のミトコンドリアも本反応では鮮明に検出出来る。Altmann 氏染色或は Sudan black B などによる脂質染色ではミトコンドリア以外の物質の共染を伴い又 Nile blue その他の色素による超生体染色では小胞体が凝集してミトコンドリアと共染する¹⁷⁾。然るに本酵素反応は更に好中性、好酸性、好塩基性、偽好酸性顆粒、Azur 顆粒、中性紅顆粒、Golgi 装置などとも関係がなくてミトコンドリアに特異的である。従つて本反応は血球ミトコンドリアの細胞化学的特殊染色法として賞揚される。これらミトコンドリアの数、分布及びその本酵素活性の強弱は血球の呼吸機能状態を反映するものであつて蛋白合成の旺盛な幼若細胞ではその活性が高い。その呼吸によつて產生されたエネルギーは血球の分化乃至成熟に必要な物質の合成に利用されるものと考えられる。

ミトコンドリアの形態と機能に関する初期の研究は専ら光学顕微鏡によつてなされた。即ち Altmann (1890)¹⁰⁾ が細胞の生命に極めて大切な顆粒として見出し bioblasten と名付けて以来それが chondriosome (Benda-Meves) 或は mitochondria (Benda)²³⁾ と称せられるようになったが古くから幾多の細胞学的染色、例えば Aniline-fuchsin (Altmann, 1890)¹⁰⁾、Janus green (Michaelis, 1899)¹¹⁾、Pincyanol (Hetherington, 1936)¹¹⁾、その他の酸化還元色素などによつて観察されてきた。中でも血球については Janus green による超生体染色⁹⁾ がミトコンドリアの特殊染色法 (Cowary, 1924)²⁴⁾ として最も広く利用されて来た。その染色機構については可成り詳しく調べられミトコンドリアの有する酵素呼吸 (Kinsberg, 1912)²⁵⁾、チトクローム系呼吸酵素によつて糸粒体に入つた色素のみ酸化型となり着色し他の部では還元されて色を失うために認められないと説明された (Lazarow and Cooperstein, 1950, 1953)²⁶⁾。然し妹尾等は特殊の方法でこの顆粒を電顕下にとらえた。本色素はミトコンドリアを特異的に染色するものでありその他の細胞質にはその還元型すら存在しない事が明かにされた。然し一方又これで染らないミトコンドリアも存在する事が明かにされた。最近妹尾等は超生体色素の固定法を記載し²⁷⁾、Janus 緑で染められたミトコンドリアをヘマトキシリン染色標本で観察することを可能にしたが之によつて染らないミトコンドリアの検出は

位相差顕微鏡による以外は不可能である。之に反しミトコンドリアに特異な酵素活性を細胞化学的に染める方法は理論的に最も確実にミトコンドリアを検出する方法である。

コハク酸脱水素酵素²⁹⁾は Thunberg (1909)²⁸⁾が Methylen blau を水素受容体として本酵素活性度の測定に応用して以来、主として homogenate について細胞内構成要素と無関係に純生化学的方法で研究が進められて来たが本酵素は組織構造に強く結びついた desmoenzyme であり (Batelli und Stern, 1910)²⁹⁾、その後主として Bensley and Hoerr (1934)³⁰⁾、Claude (1941)³¹⁾、Hogeboom et al. (1946)³²⁾、Schneider (1950)³³⁾ 等によつてコハク酸脱水素酵素はミトコンドリアに局限して存在し終末電子伝達系の一つとして細胞の呼吸に重要な役割を果していることが homogenization 法によつて明かにされた。このような方法は細胞内構成要素の移動を余儀なくされるので、その成績をそのまま細胞の形態と機能に関係づけることは危険である。

一方コハク酸脱水素酵素の組織化学的研究は最初 methylen blau を用いて始められたが (Semenoff, 1935)³⁴⁾ その主な発達は tetrazolium group 化合物の組織化学への導入によるものである。然し最初に用いられた TPT (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride)³⁵⁾⁻³⁹⁾ の還元生成物は粗大結晶を作り易く組織化学的に満足すべき像が得られない。このような短所は Rutenberg and Seligman (1950)⁴¹⁾、Seligman et al. (1951)⁴²⁾ 等の blue tetrazolium 塩の利用、Antopol et al. (1949)⁴³⁾、Wachstein (1950)⁴⁴⁾、Sheton and Schneider (1952)⁴⁵⁾ らの neotetrazolium 塩による方法又 Pearson ら⁴⁶⁾ 等による INT の使用等により諸種脱水素酵素の組織化学的証明法が改善され従来の方法に於ける多くの欠点が除かれた。然しそれらの多くは組織化学的観察のためであつて反応がミトコンドリアに局限するかどうかを知るためには反応は未だ粗大に過ぎる。

著者は小田の援助を得て上記の如く ditetrazolium 塩を用いてのコハク酸脱水素酵素反応を改良して之がはつきり血球のミトコンドリアに一致して出現することを光学顕微鏡的にほぼ確実にし得た。血球のコハク酸脱水素酵素に関する研究報告は極めて少なく Wachstein et al. (1950)⁴⁴⁾ その他の簡単な記載があるが¹²⁾¹³⁾、ミトコンドリアとの関係に於て詳述しているものはなかつた。之等は著者が小田等と報告した如く電顕的にも証明せられる¹³⁾。又コハ

ク酸を基質とした場合に於ける生体組織乃至細胞による ditetrazolium 塩還元反応の共転 step に関し、nito-blue tetrazolium は殆んど全て succinic dehydrogenase の step に共転し、nitro-neotetrazolium は succinic dehydrogenase の step に50%、cyt. b 乃至 C₁ の step 乃至それより高位の step に約50%共転し、neo-tetrazolium は succinic dehydrogenase に約15%、cyt. b 或は c₁ に約35%、cyt. c oxidase に約50%の割合に共転して還元反応が現われることが証明されている¹²⁾¹³⁾。即ちこの場合 neotetrazolium 還元反応は succinoxidase system、nitro-neotetrazolium 還元反応は主に succinic dehydrogenase system、nitro-blue tetrazolium 還元反応は succinic dehydrogenase 活性による反応である¹²⁾¹³⁾。従つてこれらの試薬を用い、コハク酸ソーダを基質として本酵素乃至酵素系の反応によつて血球ミトコンドリアの細胞化学的検出と同時にその活性の強弱を調べることによつて正常の分化や成熟或は病的変化に伴う血球ミトコンドリアの機能状態を知ることが出来る。

赤血球系に於ける観察も白血球系に於ける観察も分化と共にその酵素活性の性格が変化するようなことはなかつたが量的には可成著明な変化を示し一般に未熟な細胞ほど酵素活性が強く現われる。恐らく細胞の分裂に伴う蛋白その他の物質の合成に対して必要とされるエネルギー供給の場としてのミトコンドリアの機能を示すものであろう。赤血球系細胞では Hb 合成の進行と共にミトコンドリアの数が減少し又その活性が低下してくるが脱核後のミトコンドリアも著明な陽性反応を呈する点から見て、又この時期に旺盛な Hb 合成の起る点から見てその活性がヘモグロビンの合成に関係していることは明かである。即ち未分化状態ではミトコンドリアによつて細胞に与えられるエネルギーは主として分裂のために又分化の段階ではそれは Hb の合成に向けられることは明かである。然し産生されるエネルギーは常に ATP の形で蓄えられれば酵素の種類の変化を必要とすることなく、その量的増減によつてその必要量が調節されるものと考えてよいであろう。白血球系に於ても分化と共に数と反応の強度を減じるが赤血球の場合と異り、最後の分化段階までその活性は認められる。赤血球の場合は成熟すると完全な Hb をもつ袋と化しそのエネルギー代謝は解糖系の酵素によつて与えられているが白血球の場合はその高度の運動のためのエネルギー補給のための支えに

ミトコンドリアが活動しているのであろう。即ち分化に伴う細胞内のエネルギー代謝はその方向に於て変換を起すが一細胞蛋白合成へ方向から特殊物質の合成又は運動の方向へミトコンドリアから与えられるエネルギーはその必要に応じて量的に調製され質的な変化はないということである。

結 論

従来の血液学分野に於て血球ミトコンドリアの染色法として広く利用されている Janus 緑染色法は全てのミトコンドリアを正確に検出する事が出来ないで細胞化学的にミトコンドリアにのみ存在する酵素系（呼吸酵素就中コハク酸脱水素系）の反応を利用してミトコンドリアを特異的に検出することを企図し従来の方法を改善し吟味してミトコンドリアにはば確実に現われる呈色反応を考案した。この方法を利用して血球の種類と分化成熟に伴う形態と機能との相関性を追究した。酵素反応はコハク酸を基質とし、水素受容体として neotetrazolium 塩の他、最近合成された nitroneotetrazolium 塩及び nitro-blue tetrazolium 塩を用いた。その結果は次の如く

である。

1) 本酵素反応は血球のミトコンドリアに一致して特異的に出現する。

2) 三種 ditetrazolium 塩による本酵素系反応の条件と方法を吟味し、血球ミトコンドリアの細胞化学的検出に適した条件と方法を定めた。

3) 本酵素の細胞化学的反応は成熟赤血球を除く全血球に陽性に出現する。各種血球に於ては本酵素反応は成熟分化に伴つて酵素活性の程度と陽性顆粒の数を減少する。

4) 網赤血球ミトコンドリアを本酵素反応によつて特異的に細胞化学的に検出した。

5) 本酵素反応は血球ミトコンドリアの検出と同時に各種血球の形態と機能の相関性を知る上に於て極めて貴重な利用価値を有する。

摘筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾左知丸教授並に小田琢三助教授に深甚なる感謝の意を表します。

文

献

- 1) Chèvremont, S., et Federic, J. : Acta Anat. 30, 175, 1957.
- 2) Chèvremont, S., et Frederic, J. : Comptes Rendus de l' Association des Anatomistes 38, 19, 1951.
- 3) Chèvremont, M. et Federic, J. : Comptes rendus des séances de la Société de Biologie 145, 1245, 1951.
- 4) Federic, J. : Comptes rendus des séances de la Société de Biologie 51, 185, 1957.
- 5) Federic, J. : Comptes rendus de l' Association des Anatomistes 50, 1, 1953.
- 6) 島倉亭次郎 : 細胞化学シンポジウム, 5, 201, 1956.
- 7) Shimakura, K. : Proceedings of the International Genetics Symposium 126, 229, 1956.
- 8) Makino, S. : Chromosoma 8, 212, 1956.
- 9) Michaelis, L. : Arch. mikro. Anat. 55, 558 ~575, 1899.
- 10) Altmann, R. : Die Elemental-Organismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, Leipzig, Veit Co., 145, 1890.
- 11) Hetherington, D.C. : Stain Tech. 11, 153~154, 1936.
- 12) 小田琢三 : 細胞化学シンポジウム, 8, 157~172, 173~189, 1958.
- 13) Oda, T. et al. : Acta Med. Okayama 12, 193 ~204, 205~215, 1958; 13, 31~44, 1959.
- 14) Pearson, B. : J. Histochem. Cytochem. 6, 112~121, 1958.
- 15) Nachlas, M.M., Tsou, K.C., Souza, E. De, Cheng, C.S., and Seligman, A.M. : J. Histochem. Cytochem. 5, 420~436, 1957.
- 16) 小田琢三・関周司・柴田高志・酒井晃・岡崎博明 : 岡山医学会雑誌, 70, 123~125, 1958.
- 17) 妹尾左知丸・吉沢浩洋・中本孝・小河博之・羽場喬一・小田琢三 : 日本血液学雑誌, 20, 31~318, 1957.
- 18) Seno, S. et al. : Acta. Haemat. 21, 1958.
- 19) Brunner, A. JR. and Vallejo-Freire, A. : Exper. Cell Res. 10, 55~62, 1956.
- 20) Brunner, A. JR. and Vallejo-Freire, A. : Experimentia, 12, 255, 1956.
- 21) Seno, S. : Acta. Path. Jap. 7, Suppl. 741,

- 1957.
- 22) Seno, S. : Acta. Haem. Jap. 21 (2), Suppl., 351, 1958.
- 23) Benda, C. : Verh. d. Physiol. Ges. 1899, 376~383.
- 24) Cowary, E. V. : General Cytology. Univ. Chicago Press, Chicago, 1924.
- 25) Kinsburg, B. F. : Anat. Rec. 6, 39~52, 1912.
- 26) Lazarow, A. and Cooperstein, S. J. : J. Histochem. Cytochem. 1, 234~241, 1953; Biol. Bull. 99, 321~322, 1950.
- 27) Seno, S., Haba, K., Maki, T., and Nakamoto, T. : Acta. Haem. Jap. 21, 332~336, 1958.
- 28) Thunberg, T. : Skand. Arch. Physiol. 22, 430, 1909.
- 29) Batelli, F. und Stern, L. : Biochem. Z. 30, 172, 1910.
- 30) Bensley, R. R. and Hoerr, N. L. : Anat. Rec. 60, 449~455, 1934.
- 31) Clande, A. : Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 9, 263~270, 1941.
- 32) Hogeboom, G. H., Claude, A., and Hotchkiss, R. D. : J. Biol. Chem. 165, 615~629, 1946.
- 33) Schneider, W. C., and Hogeboom, G. H. : Cancer Res. 11, 1~22, 1950. J. Nat. Cancer Inst. 10, 969~975, 1950.
- 34) Semenoff, W. E. : Zeitschr. f. Zellforsch. 22, 305~309, 1935.
- 35) Kuhn, R. u. Jerchel, D. : Ber. deut. chem. Ges. 77, 941, 949, 1941.
- 36) Lakon, G. : Ber. deut. bot. Ges., 60, 299, 434, 1942.
- 37) Straus, F. H., Cheronis, N. D. and Straus, E. : Science. 108, 113, 1948.
- 38) Doerr, W. und Lüttichau, V. E. : Klin. Woch. 27, 734, 1949.
- 39) Becker, V. : Arch. exper. Path., 207, 109, 1949.
- 40) Kun and Abood : Science, 109, 144~146, 1949.
- 41) Rutenburg, A. M., Gofstein, R., and Seligman, A. M. : Cancer Res. 10, 113~121, 1950.
- 42) Seligman, A. M. and Rutenburg, A. M. : Science, 113, 317~320, 1951.
- 43) Antopol, W., Glaubach, S. and Goldman, L. : Trans. New York Acad. Sci., 112, 156~160, 1949.
- 44) Wachstein, M. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 73, 306~308, 1950.
- 45) Schelton, E. and Schneider, W. : Anat. Rec. 112, 61~82, 1952.
- 46) Pearson, B. and Defendi, V. : J. Histochem. Cytochem. 2, 248~257, 1954.

附 図 説 明

第1~4図は nitro-blue tetrazolium 塩を用いて反応させたものである。第1図はマウスの骨髓細胞を浮游液で反応させ塗抹後後染色しない好中球の標本である。第2図はウサギの生の骨髓小組織片を反応後塗抹し hematoxylin eosin で弱く後染色したものである。第3, 4図はウサギの末梢血を polyvinyl alcohol を加えて遠沈して集めた白血球を塗抹し反応せしめたもので第3図は後染色せず第4図は hematoxylin eosin で弱く後染色したものである。

第5~9図は nitro-neotetrazolium 塩を用いて反応させたものである。第5, 6図はラットの吉田肉腫腹水を細胞浮游液で反応後塗抹後染色しない標本で第5図の中央2ヶは好中球と単球他は吉田肉腫細胞で第6図は第5図の好中球と単球を拡大したものである。酵素反応はミトコンドリアに一致して鮮明に現れている。腹水或は滲出液中の活発に運動する白血球には一般に活性の亢進が見られる。第7, 8図はマウスの骨髓の血球を塗抹(第7図)して反応及び小組織片で反応後塗抹(第8図)したものである。第9図はラットの骨髓小組織片を反応させ塗抹後 hematoxylin-eosin で軽く後染色したもので左は網赤血球のミトコンドリアに於ける反応, 右は成熟赤血球で反応顆粒がない。

第10~12図は neotetrazolium 塩による反応である。第10~11図はマウスの骨髓の小組織片を反応させスタンプして後染色しない標本で第11図は巨核球の反応である。第12図は手術的に摘出された人のリンパ腺の小組織片を反応後スタンプしメタノールで瞬間的に固定後 hematoxylin-eosin で後染色したものである。

第13~17図は本文中に記載した。

Cytochemical Studies on the Mitochondria of Blood Cells

Part 1. Cytochemical Study on the Succinic Dehydrogenase System of Blood Cells

By

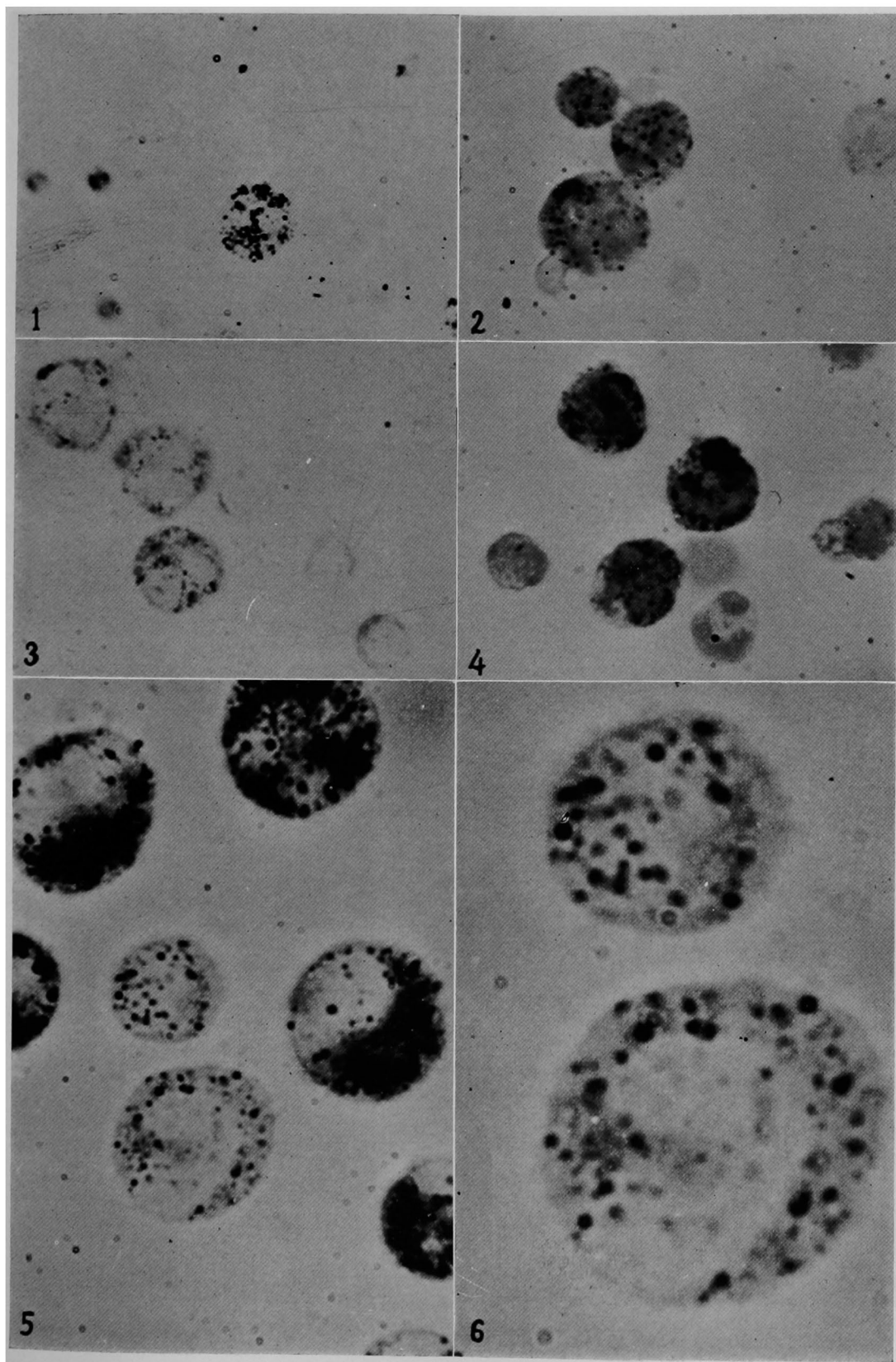
Akira SAKAI

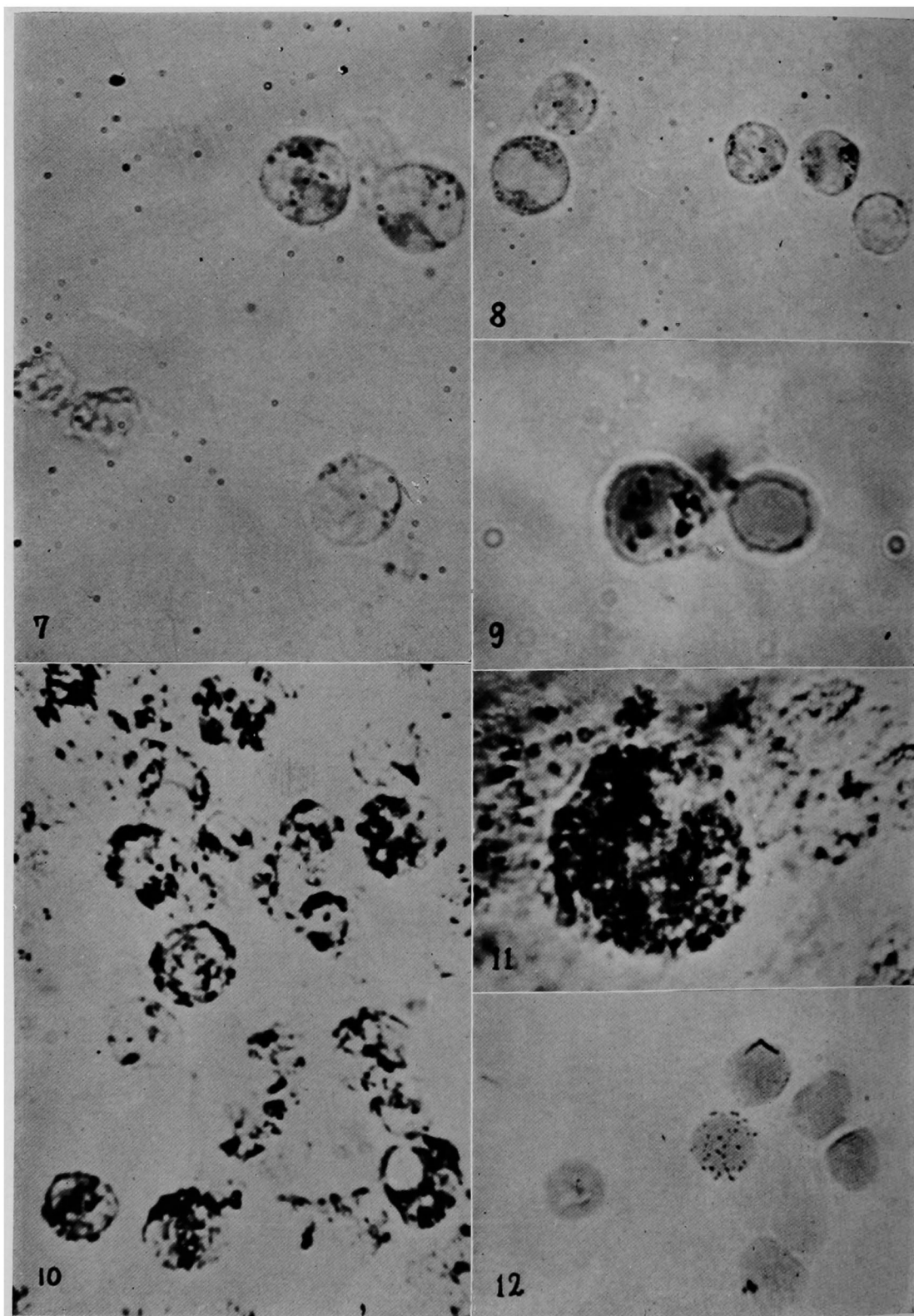
Department of Pathology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director: Prof. Satimaru SENO)

In the field of hematology the supravital staining by Janus green has been used extensively for counting of the number of mitochondria of leucocytes. But it has been clarified that all the mitochondria can not be stained by this method. With the purpose to establish a method to stain all mitochondria the author has scrutinized the histochemical method for the respiratory system, especially the succinic dehydrogenase system, localizing solely in mitochondria and devised the color reaction to appear coinciding fairly exactly at the site of mitochondria improving the past method. For the enzyme reaction sodium succinate was used as the substrate and neotetrazolium chloride, nitro-neotetrazolium chloride or nitro-blue tetrazolium chloride as the hydrogen acceptor. In this paper by the application of this method the author studied the correlation between the site and intensity of the reaction in each cell species with reference to the differentiation and maturation. The results are as follows:

1. The cytochemical reaction of this enzyme appears positive in all blood cells with exception of mature erythrocytes. This enzyme reaction decreases its intensity along with the maturation and differentiation of cells.
 2. The enzyme reaction appears specifically coinciding with the site of mitochondria in cells including reticulocytes.
 3. This enzyme reaction is extremely useful for counting the number of mitochondria in blood cells as well as for ascertaining their enzymatic activity.
-

酒井論文附図





酒井論文附図

