

血球ミトコンドリアの細胞化学的研究

第 2 編

血球のチトクローム酸化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

血球のチトクローム酸化酵素の細胞化学的検出には従来 Nadi 反応¹⁾が屢々用いられてきた。本反応はチメチールパラフェニレンジアミンと α -ナフトールとの分子混合体を酸化することによつて、可成り安定なインドフェノールブリュー、或はナフトールブリューのような青色の色素を形成する反応である。そして本反応を触媒する酵素は広く生体組織内に存在し生化学の分野ではインドフェノール酸化酵素²⁾と称されてきたが、Keilin and Hartree (1938)³⁾によつてそれはチトクローム酸化酵素と同定された。然しながら組織化学及び血液学の分野では古くから Nadi 反応を用いて検出される酵素に 2 種類の酵素が知られていた。即ちその一つは M-Nadi 酸化酵素 (Gräff, 1922)⁴⁾ 或は安定酸化酵素 (von Gierke, 1911)⁵⁾ と名付けられたもので他の一つは G-Nadi 酸化酵素 (Gräff, 1922)⁴⁾ 或は不安定酸化酵素 (von Gierke, 1911)⁵⁾ と名付けられているもので大部分の新鮮組織細胞に検出される。前者はフォルマリンその他で固定された骨髄性白血球⁶⁾ やその他少数の組織細胞⁷⁾ に検出される。ところがいまでもなく酸化酵素は極めて不安定な酵素であつて固定操作によつて速かに不活性化されるものであるから、このように固定された細胞に検出されるものは酸化酵素でないことは明かであつて、今日それは一般に *verdo-peroxidase*⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ であると看做されている¹¹⁾。ともあれ本反応は骨髄性白血球には陽性で、リンパ球には陰性であるから血球の分類鑑別上貴重な価値をもっている。然し反応は極めて鋭敏であるが、非特異的反応を伴い血球ミトコンドリアとの関係は明かでない。一方後者に関しては Lison (1936)¹²⁾ は G-Nadi 酸化酵素はインドフェノール酸化酵素と同

じものに違いないと述べたが¹³⁾, Brachet (1944)¹⁴⁾ は又 Nadi 反応はチトクローム酸化酵素の作用によつて起るであろうけれども同時にその反応生成物は共存する脱水酵素系の作用によつてその白色誘導体に還元されるであろうから、本反応によつては酵素の正確な分布像は得られないことを指摘した。更に周知の如く本反応は酸化酵素が存在しなくても空气中の酸素或は溶液中の分子状酸素によつて容易に自動酸化されて反応が起る。その Nadi の自然酸化の結果生じたインドフェノールブリューは容易に脂質その他細胞内外の諸種要素の二次的染色を起す¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。斯かる理由から本反応をチトクローム酸化酵素の組織化学的証明に用うることには多くの疑義がある¹⁵⁾¹⁶⁾。その上血球の如き遊離浮游細胞についての不安定酸化酵素反応は一般に塗抹未乾燥標本について速かに行うこととされているがこのような条件は技術的に又理論的に問題がある。即ち全く未乾燥な部分或は浮游状態では細胞が流出し而も反応は殆んど現われないか現われても極めて弱い。周辺の固着乃至生乾きの部分では可成り強い反応が現われるがこのような空気乾燥固定細胞に現われる Nadi 反応は純粹に酸化酵素によるものかどうか疑問である。

ところが最近小田等¹⁷⁾²¹⁾ は終末電子伝達酵素系によるテトラゾリウム塩の還元機構を解析し¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、パラフェニレンジアミンを基質としネオテトラゾリウム塩を水素受容体としてチトクローム C を添加し或は添加せずして組織細胞及びホモジネイドに於けるチトクローム C 酸化酵素及びチトクローム C-チトクローム酸化酵素系の組織乃至細胞化学的検出¹⁸⁾²¹⁾ 並にそれらの定量法¹⁷⁾²⁰⁾ を記載した。そこで著者は前編に於ける血球ミトコンドリアのコハク酸脱水酵素系の研究に引続きこれらの方法を用い

て血球ミトコンドリアに於けるチトクローム酸化酵素の細胞化学的研究を行った。

材料及び方法

材料として白鼠・家兎・マウスなどの骨髄・脾及び末梢血を用いた。チトクロームC酸化酵素及びチトクロームC-チトクローム酸化酵素系の細胞化学的反応は小田の考案した方法¹⁸⁾²¹⁾に従つて反応液の組成は夫々0.1M p-phenylenediamine 液, 0.2% neotetrazolium 液, 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) 又は 1M Sucrose 液, 10⁻⁴M cytochrome C 液の四者等量混液及び cytochrome c の代りに同量の磷酸緩衝液を添加したものを用いた。然し浮游細胞や組織塊での反応は固在チトクロームCの影響が大で添加チトクロームの影響は少いので共にチトクロームC-チトクローム酸化酵素系活性を表現するものと考えられる²¹⁾。対照としてパラフェニレンジアミン或はパラフェニレンジアミンとチトクロームCとを共に除き同量の磷酸緩衝液を添加して反応を行わせた。細胞の量と反応液との割合は活性の強弱に従つて調整した。固在基質反応は一般に軽度であるがそれを更に減ずるために一部の細胞は凍結処理後反応を施行した。反応は組織小片及び細胞浮游液状態で小試験管内又はスライドグラス上で及び塗抹未乾燥状態で 37°C, 30分乃至1時間半施行した。反応後細胞浮游液及び組織小片は塗抹或はスタンプしてホルマリン蒸気固定後 0.1M 硫酸水で洗つてパラフェニレンジアミンの酸化物を除き後染色なしに又は水洗後後染色してグリセリン浸で観察した。一部の小組織片は反応後生理的食塩水で洗い10%ホルマリン固定後カーボワックス包埋切片をスライドに貼り 0.1M 硫酸で洗い同様処理した。後染色はヘマトキシリン・エオジンで軽く或はサフラニンOで核染色した。標本は少くとも1年以上保存出来る。冷暗所保存が望ましい。

成績並びに考案

本酵素乃至酵素系の細胞化学的反応は血球のミトコンドリアに一致して暗紫色の微細な球形乃至一部桿状体として出現する。その顆粒像は極めて明確である。反応は成熟赤血球を除く全血球に陽性で核は全く陰性である(第1, 2図)。細胞質内に於ける陽性顆粒の数と分布並に反応の強弱は血球の種類と分化度によつて異なる。その分布は前編に記載したコハク酸脱水素酵素系のそれにはほぼ類似しているが活性の強弱は必ずしも平行しない。概して幼若な血球は

ミトコンドリアの数が多く活性も強い。分裂中の二核性の赤芽球内にも可成り強陽性顆粒が多数存在する(第6図)。赤芽球の分化に従いミトコンドリアの数と活性は少くなつてゆくが脱核後の網赤血球にも陽性顆粒が見出される(第4図)。未熟な白血球は可成り多数の陽性顆粒を有するが成熟白血球ではその数は減少し散在性に現われる。M-Nadi 酸化酵素はリンパ球系細胞には陰性であるが、本チトクロームC酸化酵素系反応はリンパ球にも陽性である。単球系では可成り活性が強く巨核球は陽性顆粒が非常に多く活性が強い。

反応の特異性については既に小田等¹⁷⁾²¹⁾が記載した通り、10⁻³M シアンカリ (0.1M 第2磷酸ソーダで pH 7.6に調整) の添加によつて本酵素反応は殆んど完全に抑制される。但し生細胞に於ては軽度ながら固在基質反応が出現することがある。これは反応前凍結処理することによつて更に減弱乃至消失せしめうる。組織乃至細胞を反応前 80°C, 5分間保つと反応は完全に陰性となる。嫌氣的条件下で反応せしめると反応は増強する。マロン酸ソーダやアンチマイシンAの添加によつて本酵素反応は全然阻害されない。従つてパラフェニレンジアミンを基質とし、チトクロームCを添加せずして反応を行つた場合はパラフェニレンジアミンが固在のチトクロームCを還元し、チトクロームC酸化酵素の作用によつてNTの還元が起つたものであり本反応はチトクロームC・チトクローム酸化酵素系の反応と見做される¹⁷⁾²¹⁾。更に充分量のチトクロームCを添加した場合にはチトクロームC酸化酵素活性が表現されるはずであるが、生の組織片で反応する場合にはチトクロームCが生細胞膜を通過し難いので細胞内のチトクロームC・チトクローム酸化酵素系の活性を示すものと解される。

結 論

従来の Nadi 反応では血球ミトコンドリアに於けるチトクローム酸化酵素の正確な細胞化学的証明を行い難い。著者は小田の方法に従つてパラフェニレンジアミンを基質としネオテトラゾリウム塩を水素受容体としてチトクロームCを添加或は添加せずして血球ミトコンドリアに於けるチトクロームC酸化酵素乃至チトクロームC-チトクローム酸化酵素系の細胞化学的検出に成功した。本反応は成熟赤血球を除く全血球の細胞質内にミトコンドリアに一致して明確な紫色の球形乃至桿状顆粒として出現する。

反応顆粒の数、分布及び活性の強弱は血球の種類並に分化度によつて一定の法則性を示す。

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。

撰筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を

文 献

- 1) Ehrlich, P. : Das Sauerstoff bedürfnis der Organismen. Hirschwald, Berlin, 1885.
- 2) Keilin, D. : Proc. Roy. Soc. Biol. **121**, 165~172, 1936.
- 3) Keilin, D. and Hartree, E. F. : Proc. Roy. Soc. Biol. **125**, 171~186, 1938.
- 4) Gräff, S. : in Abderhalden Handb. Abt. IV, Teil 1, Heft 1, Methoden der Fermentforschung, 93~142, 1922.
- 5) Gierke, E. V. : Münch. med. Wochschr. **58**, 2315~2317, 1911.
- 6) Winkler, F. : Fol. Haem. **4**, 323~328, 1907.
- 7) Schultze, W. H. : Zieler Beiträge, **45**, 127~153, 1909.
- 8) Agner, K. : Acta. Physiol. Scand., II. Supple. **8**, I, 1941.
- 9) Agner, K. : Advances in Enzymology, **3**, 137, 1943.
- 10) Agner, K. : Nature. **159**, 271, 1947.
- 11) Shinizu, M. : Acta. Haem. Jap. **21**(2), Suppl. 381~385, 1958.
- 12) Lison, L. : Soc. Chim. biol. **18**, 185, 1936.
- 13) Lison, L. : Histochemie et cytochemie animales, principes et méthodes. 2ad. ed. Guathier-Villars, Paris, 1953.
- 14) Brachet, J. : Embryologie chimique. Masson, Paris, 1944.
- 15) Dietrich, A. : Zbl. Path, **19**, 3~6, 1908.
- 16) Brenner, S. : South African J. M. Soc. **14**, 13~19, 1949.
- 17) 小田琢三 : 細胞化学シンポジウム, **8**, 157~172, 1958.
- 18) 小田琢三 : 細胞化学シンポジウム, **8**, 173~189, 1958.
- 19) Oda, T. and Okazaki H. : Acta. med. Okayama, **112**, 193~204, 1958.
- 20) Oda, T., Seki, S., and Okazaki, H. : Acta. med. Okayama, **12**, 293~301, 1958.
- 21) Oda, T., Okazaki, H., and Seki, S. : Acta. med. Okayama, **12**, 302~309, 1958.

附 図 説 明

第1図。ラットの骨髓中の多分葉核好中球のチトクロームC・チトクローム酸化酵素系の細胞化学的反應。反應後スタンプし後染色を施さない標本。細胞質内にミトコンドリアに一致して球形乃至短桿状の反應顆粒の出現を認める。核は全く反應陰性。

第2図。第1図と同様、多核分葉核好中球の反應。第3図。第1, 2図と同様反應後スタンプし、フォルマリン蒸気固定してヘマトキシリン・エオジンで極く軽く後染色した好中球。

第4図。反應後スタンプ標本。ヘマトキシリン・エオジンで極く淡く後染。左の細胞はラットの多分葉核好中球、中央の淡い細胞は赤血球、右の細胞は網赤血球である。網赤血球のミトコンドリアが活性を示し反應顆粒が出現している。

第5図。ラットの骨髓巨核細胞の反應。核自身は反應陰性であるが本細胞では塗抹に際し細胞質内顆粒が移動し難く核の上にもおいかぶさつて細胞質内全体に可成り密に陽性顆粒が出現する特徴がある。活性も強い。

第6図。ラット骨髓の小組織片で反應せしめ10%フォルマリン固定后、0.1M 硫酸水で洗つてパラフェニレンチアミンの酸化物を除き、カーボワックス包埋切片としヘマトキシリン・エオジンで淡く後染色したもの。各種血球の細胞質内に陽性顆粒の出現を認める。ギムザ染色ではアズール顆粒が染色されるので酵素反應顆粒との鑑別が困難となる。図の中央に分裂後期の2核性の赤芽球が見られその細胞質内にも多数のミトコンドリアに一致して可成強いチトクロームC・チトクローム酸化酵素系反應顆粒の出現が認められる。

Cytochemical Studies on the Mitochondria of Blood Cells
Part 2. Cytochemical Study on the Cytochrome Oxidase System

By

Akira SAKAI

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

It is difficult to make an accurate cytochemical demonstration of the cytochrome oxidase system in the mitochondria of blood cells by the conventional Nadi reaction. By applying the Oda's method for the cytochemical detection of cytochrome c-cytochrome oxidase system and cytochrome c oxidase the author succeeded in demonstrating cytochemically the cytochrome c oxidase or the cytochrome c-cytochrome oxidase system in the mitochondria of blood cells by using p-phenylenediamine as substrate and neotetrazolium salt as hydrogen acceptor with or without the addition of cytochrome c. This reaction appears in the cytoplasm of all blood cells with an exception of mature erythrocytes in the form of distinct violet-colored round or rod-like granules coinciding with mitochondria. The number, distribution and the grades of the enzyme activity of mitochondria can be seen. whose pictures are specific to each cell species. Maturation and differentiation of cells generally proceed with the decrease both in number and enzyme activity.

酒井論文附图

