

小 脳 の 酵 素 組 織 化 学

— 特にプルキンエ細胞の α -グリセロリン酸脱水酵素と
「固定の問題」をめぐって —

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

徳 永 五 輪 雄

【昭和43年5月20日受稿】

I 緒 言

酵素組織化学の方法論における諸問題については、既に数多くの研究がなされてきたが、いまだ検討すべき問題が多く残されている。検出しようとする酵素の種類や、被検材料の性質等によつて、方法の上で最適な条件を選ばねばならないのは当然なことであり、また結果の判定は、選ばれた条件に従つて慎重になされなければ、有意な結論は得られない。

被検材料の化学的固定は、一般に多くの酵素の活性低下をまねく点では好ましくないとされているが、他方、組織の形態並びに酵素の正確な局在を保つため、ことに可溶性酵素の証明にあつては固定は有益な手段とみなされており、かかる意味で、酵素組織化学における「固定」には、相反するふたつの側面があり、これらの問題について、古くから諸家により論じられてきた¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

tetrazolium 塩を用いての脱水素酵素 (あるいは酸化酵素) 系の活性検出法と、それに関連した諸問題については、1950年代に既に多くの研究がある⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。

Novikoff and Masek²⁾ (1958) は、tetrazolium 塩 (Nitro-BT) を用いての脱水素酵素、ことに乳酸脱水素酵素、NADH₂-diaphorase の活性検出に際して、新鮮組織を冷フォルマリン・カルシウムで固定して (一昼夜) 後に作製した凍結切片、あるいは、新鮮凍結切片を冷フォルマリン・カルシウムで短時間処理したものを用いた方が、固定しない場合よりも良好な結果が得られるとした。

また、Walker and Seligman³⁾ (1961) は、腸上皮等種々組織の mitochondria のコハク酸脱水素酵素

の証明に際して、新鮮凍結切片では形態を完全に保ち難いが、薄い組織片を短時間 (8~16分間) 8% フォルマリンで固定し、滲漬時間を延長することによつて、より良い結果が得られるとしている。

著者は tetrazolium 塩 (Nitro-BT) を用いて、脳組織 (特に小脳) の一連の脱水素酵素系 (コハク酸脱水素酵素; SDH, 乳酸脱水素酵素; LDH, α -グリセロリン酸脱水素酵素*; α -GPDH) の検索をすすめるにあたり、同一材料について、新鮮凍結クリオスタット切片とともに、組織塊をまず10%冷フォルマリン・カルシウムで固定した後に作製した凍結切片をあわせて使用した。その際非固定、固定両切片において、小脳 Purkinje 細胞 (P-細胞) が、特に α -GPDH の活性検出に際して、特異な態度をとることを認めた。すなわち α -GPDH は、他の脱水素酵素と異なり、非固定切片の P-細胞 にてほとんど反応を示さないが、逆に固定切片の P-細胞 には、かなり強い formazan 形成が認められた。一般にフォルマリン固定では、酵素活性が低下するはずであるが、 α -GPDH の検出の場合にはこの様な逆の関係が示された。

酵素組織化学の方法において、材料の「固定」という操作がなされたり、なされなかつたりしている現状の中にあつて、この場合の P-細胞 における様に、固定するかしないかによつて全く逆の反応がみられる、という事実は、結果の判定の困難さを示すとともに、フォルマリン固定の酵素活性に及ぼす影響、使用した tetrazolium 塩すなわち Nitro-BT の性質、使用した intermedator の作用等が、上述の如き結果を生ずるのに如何に関与しているかが解明さ

* α -GPDH には NAD を必要としないもの (不溶性) と、NAD を必要とするもの (可溶性) とがあることが知られている¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾。組織化学的証明法において、 α -GPDH は一般に NAD 依存性脱水素酵素として扱われている⁴⁾²⁴⁾²⁵⁾が、著者は本酵素の証明にあつては NAD を使用しない方法をとつている。

れなければならぬことを示すものである。

ここに酵素組織化学における固定の問題をめぐって、諸種の条件を実験的に設定してしらべたので報告する。

II 実験材料並びに方法

実験材料としては、体重 200g 前後の健康ダイコクネズミ（雌雄）を断頭後直ちに取出した小脳を用い、他にネコ、及び死後 2～12時間の剖検屍体人脳の小脳小塊を用いた。

非固定切片は、取出した材料を出来るだけすみやかにドライアイスで凍結処理した後、 -20°C のクリオスタット (Pearse: SLEE, London) で厚さ 10～20 μ の切片を作製し、載物ガラスに貼附した。

固定切片は、材料を先ず $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ の冷フォルマリン (10%, 中性) に所定時間 (10～15時間) 漬けた後、冷却した蒸留水で洗い、その後クリオスタット切片を作製して載物ガラスに貼附した。

被検酵素は α -GPDH, SDH, LDH とし、それらの組織化学的検出法は Nachlas, Walker and seligman 氏法²³⁾²⁴⁾²⁵⁾ を多少変えて用いたが、NAD を必要としない SDH, 並びに α -GPDH の検出のための反応液には、intermediator として menadione (Vitamin K₃, 2methyl-1, 4-naphthoquinone; 以下 MD と略す) を添加することを原則とした。

それぞれの反応液 (滲漬液) 1 ml の組成は次の如くである。

LDH;

0.5M; 乳酸ナトリウム水溶液	: 0.2 ml
0.1 M; 磷酸緩衝液 (pH; 7.4)	: 0.4 ml
Nitro-BT* 水溶液 (5mg/ml)	: 0.1 ml
0.1 M; 塩化マグネシウム水溶液	: 0.1 ml
NAD**	: 少量 (3～0.5 mg)
蒸留水	: 0.2 ml

SDH;

0.1 M; コハク酸ナトリウム水溶液	: 0.5 ml
0.1 M; 磷酸緩衝液 (pH; 7.4)	: 0.4 ml
Nitro-BT 水溶液 (5mg/ml)	: 0.05 ml
MD*** アセトン溶液 (4mg/ml)	: 0.05 ml

α -GPDH;

0.1M; α -グリセロ磷酸ナトリウム水溶液	: 0.1 ml
0.1 M; 磷酸緩衝液 (pH; 7.4)	: 0.5 ml
Nitro-BT 水溶液 (5mg/ml)	: 0.1 ml
MD アセトン溶液 (4mg/ml)	: 0.05 ml
蒸留水	: 0.25 ml

載物ガラスに貼附した組織切片を、上記反応液に、 37°C にて 30 分間滲漬した後、10% フォルマリンにて約 10 分間固定して反応を止め、水洗後 “エルバノール” † またはグリセリンで封入した。必要に応じ Kernechtrot で核の後染色を施した。

なお、反応液の中から基質のみを除き、その量を緩衝液で補つて、対照実験も行った。(cf: “nothing dehydrogenase” 反応¹⁵⁾²⁶⁾)

また、反応抑制剤の酵素活性に及ぼす影響についてもしらべたが、その実験条件は III 節で述べる。

フォルマリン固定、非固定両切片において、形成された formazan の分布と、Nitro-BT の組織への吸着性との関係をしらべるために、Pearse and Hess²⁷⁾ (1961) の方法を用いた。すなわち切片を先ず Nitro-BT 0.1 mg/ml を含む 0.1M; 磷酸緩衝液 (pH; 7.4) に短時間 (10～30分間) 漬した後、緩衝液で数回洗い (5～10分間) 更に 15～30分間水洗し、その後 0.1M; アスコルビン酸を含んだ 0.12 M; 炭酸ナトリウム液に 2～3 分間漬けて、非酵素的に Nitro-BT を還元させた。

III 実験内容並びに結果

ダイコクネズミ小脳の所見

(イ) 新鮮凍結クリオスタット切片; (表 1)

i) LDH; 顆粒層の “glomeruli cerebellosi” に相当して最も強い青色の反応が見られ、分子層には formazan 顆粒はびまん性に存在し、反応は顆粒層よりやや弱い印象をうける。P-細胞は核を除いて細胞体に強度～中等度の活性を示す。これに反し白質にはほとんど反応は証明されない (図 1)。

ii) SDH; 全体として LDH 反応像に似ており、顆粒層に最も強く、ついで P-細胞層、分子層の順で活性が認められ、白質にはほとんど証明されない

* Nitro Blue Tetrazolium; 和光純薬 (大阪) 製

** β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide; SIGMA (U. S. A.) 製

*** menadione: Vitamin K₃; 半井化学薬品 (京都) 製

† 三光純薬 (東京) 製

成分; ポリビニールアルコール 1 容 0.14 M; NaCl 加 0.01 M; 磷酸緩衝液 4 容

これをよく混和しそれに 1/2 容の最純グリセリンを加え混和精製したもの。(pH; 6～7)

表 1

	反 応 液			反 応 度			
	基 質	MD	NAD	分子層	P-細胞層	顆 粒 層	白 質
非 固 定 切 片	乳 酸 ナ ト リ ウ ム	-	+	4	4 ~ 5	5	0 ~ 1/2
	コ ハ ク 酸 ナ ト リ ウ ム	+	-	3	4	5	0
	α - グ リ セ ロ 磷 酸 ナ ト リ ウ ム	+	-	3 ~ 4	0 ~ 1/2	5	0
	-	-	+	1	1/2 ~ 1	1/2	0 ~ 1/2
		+	-	1 ~ 2	1/2	1/2 ~ 1	0
		-	-	1/2	0 ~ 1/2	0	0
固 定 切 片	乳 酸 ナ ト リ ウ ム	-	+	3	4	4	2
	コ ハ ク 酸 ナ ト リ ウ ム	+	-	2	3	2 ~ 3	1 ~ 2
	α - グ リ セ ロ 磷 酸 ナ ト リ ウ ム	+	-	2	3 ~ 4	3	1 ~ 2
	-	-	+	1/2	0	0	1/2
		+	-	1 ~ 2	2 ~ 3	1	1/2 ~ 1
		-	-	0 ~ 1/2	0	0	0 ~ 1/2

(+: 添加, -: 添加せず, 5: 反応強, 3: 中, 1: 弱, 0: 反応なし)

(図2).

iii) α -GPDH; 顆粒層, 分子層の反応は LDH, SDH にはほぼ同じであるが, P-細胞層には formazan の形成がほとんどなく, あたかも顆粒一, 分子一両層の間に空隙がある様な像を示す. 白質には活性は証明されない(図3, 4).

対照切片; (表1)

LDH 検出のための反応液から基質のみを除いた場合(NAD は添加)わずかに淡紫色の反応が認められるが, 分子層, P-細胞層, 顆粒層の各層の反応の程度に大差はなかつた. ("nothing dehydrogenase" 15*)

SDH, α -GPDH 検出のための反応液から基質のみを除いた場合(MD は添加)の反応は上記 LDH の "nothing dehydrogenase" (NAD の存在)の場合よりやや強く現われたが, 各層間の差はほとんどみられなかつた.

(ロ) フォルマリン固定切片; (表1)

SDH, α GPDH, LDH とともに反応は全般に減弱される. しかし LDH の反応の減弱の度合は, 他の2者にくらべて少ないようである.

LDH, SDH, α -GPDH とともに P-細胞, 顆粒層に反

応が強く, 分子層ではやや弱い. そして白質にも軽度の反応が認められる(図5, 6).

(但し固定時間の比較的長い標本においては, incubation 直後では顆粒層, P-細胞にて formazan 色素の鮮やかな色調が認められず, むしろ分子層の反応の方が強く見える場合がある. しかしその場合でも標本を放置しておけば, 時間の経過に従ってP-細胞及び顆粒層における tetrazolium 塩の還元が更に進行して, 徐々に色彩が強まってくる傾向がみられた.

ここで問題となることは, 緒言で既述した如く, 非固定切片の P-細胞層において, α -GPDH の反応がほとんど認められないのに反し, 固定切片では反応が認められ, formazan 形成は他の部よりもむしろ P-細胞にて強度であり, また非固定切片ではほとんど陰性であつた白質にも, 固定切片では反応がみられたということである. 更に, 固定切片における "nothing dehydrogenase" 反応は, NAD の存在液ではほとんど認められないが, MD を含む場合には反応が出現する. この場合非固定切片における所見と異なる点は, P-細胞の反応が分子層, 顆粒層の反応に比較して, 軽度ではあるがより強い傾向を示すことである.

* Zimmerrann and Pearce (1959) は, NAD (NADP) 依存性脱水素酵素の証明に際し, 基質を加えないで incubate した場合にもアルカリ性 pH レベルにて陽性反応をみとめ, これは NAD (NADP) の還元非酵素的過程があることによるものとみなして, この "nothing DH" (Racker²⁶) という言葉を導入した. 本稿では NAD を使用しない反応においても, 滲漬液から基質のみを除いた場合の反応をすべて "nothing DH" という表現に総括する.

なおヒト、ネコの小脳の非固定、固定両切片においても、ダイコクネズミの場合と同様の結果を得た。

固定、非固定切片の間に上述の様な矛盾する所見を得たので、それを解明するために次の様な諸種の条件を設定してしらべた。

実験1：ホルマリン固定切片における反応の、固定時間の長さによる影響。

i) まずほぼ同一大の小脳塊4個の各々について、冷ホルマリンで2, 4, 6及び8時間の固定を施し、その後作製した切片について α -GPDH, SDH, LDHを検索した。

この場合、固定時間の長さによるホルマリンの組織内浸透度に関連して、反応態度の相違がうかがわれた。すなわち、ホルマリンの浸透に伴い、その部分に反応の低下がみられたが、その部のP-細胞はむしろ強く現われてくる。特に α -グリセロリン酸ナトリウムを基質とした場合には、同一標本においてホルマリンの浸透が不十分な所(切片の中心部)では、P-細胞に反応が認められないが、既にホルマリンが浸透している部のP-細胞は反応を示す、というP-細胞についてのふたつの反応結果が同一切片で現われてくる。

ii) 次に固定を24, 48, 72時間並びに8日間施したものについてみると、当然のことながら全体に反応の低下がみられるが、いずれの場合にもなおformazan形成を認め得る。その染色態度には、固定時間の長さによる著明な差が認められなかった。すなわち8日間固定の切片にても24時間固定のものに比し、染色態度に大差はなかった。

実験2：固定方法を変えて、まず新鮮凍結クリオスタット切片を作製し、ガラスに貼附した後に冷ホルマリンで固定した。

この場合にも固定時間を種々変えて(5分間, 20分間及び3, 6, 10時間)各々の反応態度を比較した。固定後の切片は、反応液に滲漬する前に5~15分間水洗した。

反応は全般に抑制されるが、固定時間による著しい差はなかった。しかし前述の、切片作製前に組織塊を固定した場合は異なり、 α -グリセロリン酸ナトリウムを基質とした時のP-細胞の反応は、特に強くはなくて軽度であり、10時間固定の切片においてさえ、分子層や顆粒層に比してP-細胞層の反応は弱い。この点是非固定切片における α -GPDHの反応態度に類似してはいるが、しかし非固定切片におけるようにP-細胞層が空隙として見えるようなことはない。すなわちこの固定法では、非固定切片にくらべると反応が切片全体に一樣に現われる傾向を示した。従つて実験1の結果と比較して、固定を切片作製前に行うか、後に行うかによつて組織の(特にP-細胞における)反応態度に差異を来すことが認められた。

実験3： α -GPDH及びSDHの証明にあつては原則として、intermediatorとしてMDを添加する方法をとつたが、これを加えない場合についてもしらべた。更に α -GPDHについては、MDを添加しないで、NADを加えた場合の反応をしらべ、MDを使用した場合の反応態度と比較した(表2)。

i) MDを添加しない場合：

非固定切片では、 α -GPDHはMD添加の場合にくらべると全体に反応は弱い。この場合にも顆粒層、分子層に反応がみられるけれどもP-細胞にはほとんど反応がみられない。

SDH反応もやはりMD添加の場合にくらべると全体に弱く、この場合も反応は顆粒層に最も強く、

表 2

	反 応 液			反 応 度			
	基 質	MD	NAD	分 子 層	P-細胞層	顆 粒 層	白 質
非 固 定 切 片	α -グリセロリン酸ナトリウム	-	-	1 ~ 2	0 ~ 1/2	3 ~ 4	0
		-	+	2 ~ 3	1 ~ 2	4	0 ~ 1/2
		+	+	3 ~ 4	1	5	0 ~ 1/2
	コハク酸ナトリウム	-	-	2	2 ~ 3	3 ~ 4	0
固 定 切 片	α -グリセロリン酸ナトリウム	-	-	0 ~ 1/2	0 ~ 1/2	0 ~ 1/2	0 ~ 1/2
		-	+	0 ~ 1/2	0 ~ 1/2	0 ~ 1/2	0 ~ 1/2
		+	+	2	3 ~ 4	3	1 ~ 2
	コハク酸ナトリウム	-	-	0	0	0	0

分子層, P-細胞層ではほぼ同程度であり, その関係は MD 添加の場合と同じであった。すなわち MD は, 非固定切片においては, SDH, α -GPDH 両者の活性を増強させていることがわかる。

固定切片では, MD を添加しなければ α -GPDH, SDH の反応はともにほとんど認められない。従つて MD 添加の場合, フォルマリン固定切片の P-細胞で認められた著明な formazan 色素の形成には, MD が重要な役割を演じているようである。

ii) MD を添加しないで, NAD を加えた場合:

α -GPDH 反応は非固定切片において, MD 添加の場合より全体的に弱く, 固定切片では更に低下し非常に軽度の反応しか認められない。ただ NAD を添加した場合には, 非固定切片の P-細胞にも軽度の反応が認められた, しかしこの反応は MD 添加の場合の様に固定切片で増強されることはなく, むしろ低下した。

実験 4: 非固定, 固定両切片において, α -GPDH, SDH 反応及びその滲漬液から基質を除いた場合, 更に MD を添加しない場合の各々について滲漬液内の緩衝液の pH-level を変えて (pH; 4.8~9.2) 反応をしらべた。

MD を添加しない場合の固定切片の反応は前述の如くであるが, pH の変化により影響を受けることはなかつた。

MD を添加した場合の非固定切片の各反応は, アルカリ性側では pH 9.2 迄大差なく (時によつては pH の高い域でむしろ増強され), 酸性側では, pH が 6.0 以下になるとめだつて低下する。しかし固定切片においては, pH の変化による影響がほとんどみられなかつた。

実験 5: 上述の非固定, 固定両切片について, α -GPDH, SDH 反応に対する反応抑制剤の影響をしらべた。

i) 特に固定切片における formazan 形成が, はたして酵素反応によるものか否かをみるために, まず SDH 反応のマロン酸による抑制をみた。この際あわせて α -GPDH 反応に対する影響についてもしらべ比較検討した。SDH 及び α -GPDH 検出のための滲漬液に, 各々マロン酸ナトリウムを最終濃度が 0.025 M になるように加えた。非固定切片で SDH 反応は, MD を添加した場合も添加しない場合にも明らかに抑制された。ただ固定切片においては, 既述の如く MD 添加にて軽度の反応がみられるが, この反応はマロン酸によつて抑制されなかつた。な

お α -GPDH 反応はすべての条件下でマロン酸の影響をうけなかつた。

ii) 次に, SH-inhibitor すなわち N-ethylmaleimide による抑制作用をしらべた。ガラスに貼附した非固定, 固定両切片を, 0.1 M; N-ethylmaleimide で, 37°C, 1時間 preincubate し, 水洗後基質液 (反応液) に滲漬した。

その結果は非固定, 固定の両者において, MD 添加の場合も添加しない場合も, SDH-, α -GPDH 反応のすべてが陰性となつた。

実験 6: Pearse and Hess²⁷⁾ の方法 (前述) を用いて, Nitro-BT の組織への吸着性 (結合性) と, Nitro-BT formazan の分布様相との関係をしらべた。

固定切片をあらかじめ Nitro-BT 液に浸した後水洗し, これをアスコルビン酸-炭酸ナトリウム液で非酵素的に還元させると, P-細胞には特に強い反応 (formazan 形成) がみられ, この染色態度は, α -GPDH 検出の際の固定切片にみられた染色態度と非常に類似している (図 7)。非固定切片についても同様に, Nitro-BT の組織蛋白との結合性についてしらべたが, Nitro-BT が切片全体にほぼ一様に結合しており, 固定切片にみられたような, P-細胞への特異的な吸着性は認められなかつた。なお実験 5-ii) と同じく, N-ethylmaleimide で preincubate した切片についても同様の結果を得た。すなわち実験 5-ii) の結果は, N-ethylmaleimide が Nitro-BT の組織への吸着性を阻害した結果ではないことを示すものと考えられる。

IV 考 按

脱水素酵素系の中でも SDH 及び LDH はともに, 酵素組織化学の分野で研究の対象とされることが多く, 種々組織におけるこれら酵素活性の分布については, 既に多くの報告がある⁶⁾¹³⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾。

著者はダイコクネズミ小脳の新鮮凍結クリオスタット切片において, 顆粒層, 分子層, P-細胞層の各々に両酵素の活性をみたが, その分布態度はこれまでの諸家の認めている知見にはほぼ一致するものである。

フォルマリン固定切片において SDH 活性が全く失われる, ということは Novikoff²⁾ が指摘しているところでもあり, SDH の検出に際しては一般にフォルマリンによる固定を施さないのが原則のようであるが, LDH の証明にあつては, フォルマリン固定切片が用いられている場合がかなりある³⁶⁾³⁷⁾。

著者は LDH, SDH の検出にあたって、前述の方法によりフォルマリン固定切片においても formazan の形成を認めたが、しかしその標本では非固定切片に比して反応が全般的に減弱して現われ、また部位によつては反応態度に多少の変化がみられた。

α -GPDH についての組織化学的研究¹³⁾²¹⁾²²⁾³⁰⁾³¹⁾³⁸⁾³⁹⁾は、前二者にくらべると比較的少ないが、 α -GPDH は小脳 P-細胞においてその活性が弱い³⁰⁾、ということは既に報告されており、著者もダイコネズミ小脳の新鮮凍結クリオスタット切片の P-細胞においては、 α -GPDH の活性がほとんどみられないことを認めた。

ところがフォルマリン固定切片を用いて α -GPDH 活性の検出を試みたところ、分子層、顆粒層では反応が明らかに減弱して現われ、これは SDH, LDH 検出の際の固定切片にみられた結果と同様であつたが、非固定切片の P-細胞にて α -GPDH の活性がほとんど認められなかつたにもかかわらず、固定切片にては P-細胞に反応が現われ、しかもそれは他の層の反応よりもむしろ強いものであつた。

α -GPDH の検出にあたり、固定するかしないかによつて、P-細胞においてこのように全く逆の関係が示されており、この現象を解明するためにはまずここでフォルマリン固定の影響について検討しなければならない。

酵素組織化学における「固定の問題」については既に多くの研究がある。理論的には酵素活性を低下せしめないために、固定を避け新鮮凍結切片を用いるのが最も好ましい、と考えられるが、一方組織の形態を保ち、酵素ことに可溶性酵素、あるいは反応生成物の拡散を防ぎ、その正確な局在を保つためには固定を施す方が合理的であるとされている。

酵素組織化学において、フォルマリンはアルコール、アセトン等とともに、固定剤として多く用いられており、酵素の種類による固定の適否や固定法については種々の検討と工夫がなされてきた¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾。

Seligman, Chauncey and Nachlas¹⁾は、10%フォルマリン固定後の肝組織の homogenate を用い、数種の酵素について、固定後に残存している活性の、固定時間と固定時温度による影響のちがいをしらべ、固定時間が長い程、また固定時の温度が高い程活性は低下する傾向があること、しかし酵素によつてはフォルマリン固定の影響をあまり受けないで、かなりの活性を保っているものがあることを認めた。

Pearse⁴⁾によると、短時間(2~4時間)の冷フォルマリン固定を施した場合、SDH, cytochrom oxidase 等はその活性を失うが、alkaline phosphatase, acid phosphatase, non-specific esterase 等の活性はかなり高度に保たれており、それらの証明にはフォルマリン固定が適しているとしている。

また Novikoff and Masek²⁾ や Walker and Seligman³⁾ は脱水素酵素の検出に際しても、方法を工夫すればフォルマリン固定が、固定をしない場合よりも良好な結果をもたらすものであるとした(前述)。

Hayashi and Freiman⁴¹⁾ (1966) は、フォルマリンに特に sensitive なものとして知られている myosin ATP-ase や α -GPDH の証明にあたり、「基質」を加えた固定液にて切片を固定することにより、その活性を保たせることが出来ることを報告している。(但し SDH についてはこの方法も有効ではなかつたという。)しかしこの場合にも固定時間を長くして、例えば25時間にした場合には染色されない、という結果を得ている。

著者は脱水素酵素系の活性を証明するにあたり、新鮮凍結クリオスタット切片とともに、冷フォルマリン固定切片もあわせて使用し、特に α -GPDH, SDH の検出に際しては、反応液に menadione(MD) を添加することにより、固定切片においても formazan が形成されることを認めた。この場合の反応は、非固定切片にくらべて明らかに軽度であり、これはまず酵素活性がフォルマリンにより低下した結果と考えられるが、 α -GPDH の検出に際して非固定切片の P-細胞にほとんど陰性であつた反応が、固定切片にて強陽性に現われることは、単に P-細胞内の可溶性の α -GPDH の流出が固定により防がれた結果としてみなすわけにはいかない面があると思われる。

フォルマリン固定切片についての著者の実験結果をみると、まず組織塊を長時間、例えば72時間固定した場合の切片でも、比較的短時間固定のものと同様の反応態度を示し、(α -GPDH, SDH, LDH 検出の際の)固定切片における反応の程度には、固定時間の長さによる著明な差異が認められない(実験1, 2)ということ、次に固定切片の反応では、非固定切片に比し pH の変化による影響がより少ない(実験4)ということ、また非固定切片における SDH 反応はマロン酸によつて抑制をうけるが、固定切片においてはマロン酸による抑制をうけない(実験5-i)ということなどから、著者の方法によるフォ

ルマリン固定切片における Nitro-BT formazan の形成は、もはや酵素反応に基くものとは考え難く、非酵素的還元を表われとみなすべき性質のものと考えざるを得ない。では固定切片に現われた反応は如何なる機序に基くものであろうか。

著者は SDH, α -GPDH の証明にあつては、反応液に MD を添加する方法をとつているが、ここで MD を用いない場合の反応についてもみなければならぬ。実験 3 にて、MD を添加しない場合には、フォルマリン固定切片では α -GPDH, SDH の活性は証明されていない。従つて固定切片における反応の出現に、MD が重要な役割を演じていることには疑いない。一方非固定切片では、活性はみられるけれども SDH, α -GPDH とともに MD を添加した場合よりも反応は弱く、従つて非固定切片において MD は反応を促進させていることになる。

酵素組織化学において、MD が有益な作用を有するということは、最初 Wattenberg and Leong³⁸⁾⁴²⁾ (1960) によつて示された。彼等は肝組織等において SDH, α -GPDH 等の活性が、coenzyme Q₁₀ 及び MD によつて明らかに増強されることを認めている。そしてこれら quinone 誘導体は、単に脱水素酵素系と tetrazolium 塩との間の nonspecific な intermediate electron carriers として作用するのみでなく、その酵素系の何らかの component とのより特異的な相互作用により、酵素活性を増強させるものであろうとの見解を示した (“u enadione-linked” α -GPDH)。

Hess and Pearse²¹⁾ (1961) はダイコクネズミの脳の新鮮凍結切片にて、特に mitochondria 内 α -GPDH の検出に際し、MD が存在すれば (pH; 7.4 にて)、基質がコハク酸の場合よりも tetrazolium 塩 (MTT) の還元が約 50% 高くなることを認めている。そして MD 及び α -グリセロ燐酸を含む組織化学的反應での電子伝達系は、恐らく直接酵素的に tetrazolium 塩の還元がなされる経路とは異つた、別の経路をとるものとみなし、この場合の酵素は “ α -GP-MD reductase” (Wosilait and Nason⁴³⁾: 1954) と称すべき性質のものであるとしている。tetrazolium 塩は、還元型 MD の存在にて、非酵素的に formazan 色素へ還元されるわけである (Slater⁴⁴⁾)。

Hashimoto ら⁴⁵⁾ (1964) は、MD 及び Phenazine methosulfate (PMS) の組織化学的応用における、それらの脱水素酵素活性に及ぼす影響についてしらべている。PMS の応用については、Walker and Seligman³⁾, Hardonk⁴⁶⁾ その他⁴⁷⁾ の報告があり、SDH

のような NAD-or NADP-independent dehydrogenase を強く活性化することで、その electron carrier としての有用性を認めているが、しかし PMS は組織の種類によつて LDH, α -GPDH (NAD-linked DH) の活性を抑制したり、増強させたりし、また glucose-6-phosphate DH (NADP-linked DH) は、ほとんどの組織にて PMS により活性が抑制されるとした (Hardonk⁴⁶⁾)。Hashimoto ら⁴⁵⁾ も、種々組織の新鮮凍結切片を材料とし、水素受容体として Nitro-BT を用いた場合、PMS が incubation condition によつて、染色性を増強させたり抑制させたりして比較的变化し易い作用を及ぼすことを指摘し、更にそれに比すれば MD は抑制作用はなく、tetrazolium 塩還元に安定した作用を示すことを認めている。また MD の存在は “nothing dehydrogenase” 反応をも増強させることを指摘している。

著者も MD が、非固定組織切片にて SDH, α -GPDH-, “nothing DH” 反応を明らかに増強させることを確認した。しかしここで注目すべきことは、小脳皮質の α -GPDH の活性検出にあたり、非固定切片の P-細胞においては、MD を添加してもその影響が認められないということである。すなわち、 α -GPDH は反応液に NAD を添加しない場合にも顆粒層、分子層には活性が認められ、MD の存在はその反応を更に増強させるが、P-細胞では活性が非常に微弱であり、しかも MD 添加によつてもそれが増強されない。また反応液に NAD を添加することによつて、P-細胞に軽度の反応が現われるのであるが (NAD-linked α -GPDH)、この場合にも MD 添加によつて P-細胞反応は増強されない (むしろ減弱する傾向さえみられた)。従つて理論的には、P-細胞には可溶性の NAD-linked α -GPDH の活性がいくらか存在しているとしても、NAD を必要としない不溶性の α -GPDH、あるいはいわゆる “MD-linked” α -GPDH とでも称すべきものの存在を想定するならば、P-細胞はその活性を有しない、と考えられる。

しかるにフォルマリン固定を施した切片においては、反応液に MD を添加した場合に、P細胞に強度の Nitro-BT formazan の形成が認められることは、見逃せない事実であり、このような現象についてその本態や機構を説明することは容易なことではない。

Walker and Seligman³⁾ によれば、PMS はフォルマリン固定切片では SDH 活性を抑制するが、MD

はフォルマリン固定後においても軽度にはあるが SDH の活性を促進するとしている。しかし著者の実験の結果からは、前述の如く P-細胞の反応に限らず SDH, α -GPDH の検出にあたり MD を添加した場合の固定切片に現われる反応は、すべて MD によりその酵素活性が促進された結果であるとは考え難い。

Pearse and Hess²⁷⁾ (1961) は、脱水素酵素の組織化学における色素と組織蛋白との結合性について検討し、tetrazolium 塩の「lipoprotein structures への吸着性」(“substantivity” for protein) を強める要因を指摘している。彼等によると、フォルマリン固定は Nitro-BT の組織蛋白 (lipoprotein structures) への結合性を増強させるとされており、更にダイコクネズミの腎組織において、Nitro-BT を使用しての酵素的還元によつて得られた staining pattern——たとえば基質として NADH₂ を用いて検索した場合の Pattern は、非酵素的還元として Nitro-BT を吸着して得られた pattern と非常に似ていることを指摘している。

著者も実験 6 にて、フォルマリン固定を施した組織切片への Nitro-BT の吸着態度を非酵素的還元によつてしらべたが、その結果は α -GPDH 検出にあたり (MD を添加した場合の) 固定切片にみられた染色態度に非常によく似ており、P-細胞において特に強い反応が認められた。このことは、固定切片においては Nitro-BT の P-細胞への吸着性が強いことを示すものと考えられ、従つて固定切片にみられる反応は、Nitro-BT の組織への吸着性に関連して現われたものであらうと思われる。

ところが SH-inhibitor すなわち N-ethylmaleimide で preincubate した切片では——この場合でも Nitro-BT の組織への吸着性は十分に保たれているにもかかわらず——固定、非固定をとわず反応は抑制されて陰性となる (実験 5-ii)。従つて、この固定切片、特に P-細胞における非酵素的 Nitro-BT 還元反応には組織内の SH-基の関与を考えなければならない。

更に基質の存在しない “nothing DH” 反応が MD により増強され、その場合ことに固定切片においては基質の存在している α -GPDH 反応の場合と同様に (MD 添加によつて)、P-細胞における反応が顆粒層や分子層におけるよりもやや強く現われる傾向が認められるという事実も考えあわせると、実験 5-ii) 及び実験 6 の結果から、MD 添加による固定切片、特にその P-細胞における反応の出現は、

Nitro-BT の組織蛋白との結合性を前提として、SH-group と MD とが関与している非酵素的作用の結果であることを示唆するものと考えられる。その間の具体的な反応機序の決定は、今後の検索にまたなければならない。

なお、この問題に関連したこととして、Thomas⁴⁶⁾ (1963) は、 α -GPDH の活性が lipofuscin の沈着のある周辺に隣接して高度に示されたことから、その分布が lipofuscin の分布と特異的に関連性があるらしいと考えており、更に P-細胞が lipofuscin をほとんど蓄積しない性質のもの、すなわち “lipophobe” cells であることは既にしられている⁴⁵⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾ ところであるが、Thomas and Pearse³⁰⁾ はこれが α -GPDH 活性をほとんど示さないことを報告している。非固定切片にて P-細胞が α -GPDH 活性をほとんど示さなかつたことは彼等の所見に一致するが、P-細胞が固定により Nitro-BT との結合性を増強し、MD の存在下で SH-基の関与した過程において formazan を形成するという事実は、P-細胞の細胞化学的特異性の一面を示すものであらうと考えられる。

V 要 約

(1) ダイコクネズミ及びヒト、ネコの小脳について、乳酸脱水素酵素 (LDH)、コハク酸脱水素酵素 (SDH)、 α -グリセロリン酸脱水素酵素 (α -GPDH) 活性を組織化学的に検索した。

SDH, α -GPDH の検出にあつては intermedator として menadione (MD) を反応液に添加した。

新鮮凍結クリオスタット切片にて、LDH は顆粒層の “glomeruli cerebellosi” に相当して最も強く、分子層では formazan 顆粒はびまん性に形成されて反応は顆粒層よりやや弱く Purkinje 細胞 (P-細胞) は核を除いて細胞体に強度~中等度の活性を示し、白質には活性はほとんど証明されなかつた。

SDH は全体として LDH の反応態度に似た像を示し、顆粒層に最も強く、ついで P-細胞層、分子層の順で活性が認められ、白質にはほとんど証明されなかつた。

α -GPDH 反応は、顆粒層、分子層においては LDH, SDH とほぼ同じであるが、P-細胞層には formazan の形成がほとんどなく、あたかも顆粒層と分子層の間に空隙がある様な像を示した。白質には活性はほとんど証明されなかつた。

これらの所見は、これまでの報告にほぼ一致す

るものである。

(2) 上記酵素活性の検出にあたり、新鮮凍結クリオスタット切片とともに、同一材料について組織塊をまず10%冷フォルマリンで固定した後に作製した凍結切片をあわせて使用した。

SDH, α -GPDH, LDH とともに反応は全般に減弱されるが、LDH の反応の減弱の度合は他の2者に比べて少ないようであった。

ここで注目すべきことは、非固定切片のP-細胞層において、 α -GPDH の活性がほとんど認められなかつたにもかかわらず固定切片のP-細胞には反応が認められ、しかも formazan 形成は他の部よりもむしろ強度であつた点である。この事実は酵素組織化学における方法の選定や結果の判定にあつては常に慎重な配慮が要求されることを示す現象であると思ひなされ、この点に着目し特に固定の問題をめぐつて諸種の条件を実験的に設定してしらべた。

(3) フォルマリン固定切片における反応には、

- i) 固定時間の長さによる著明な差異がみられない。
- ii) pH の変化による影響が少ない。
- iii) 特異的抑制剤による影響がみられない。

iv) MD の存在が不可欠である。

v) SH-基の関与がある。

vi) Nitro-BT の組織への吸着性の増強が関連している。

ということを確認した。

このことからフォルマリン固定切片に見られる反応は、Nitro-BT の組織蛋白との結合性を前提として、SH-group と MD とが関与している非酵素的作用の結果であることを推論した。

(4) 小脳組織でP-細胞が他の細胞要素と異なり、非固定切片において α -GPDH 活性をほとんど示さないこと、およびフォルマリン固定によりP-細胞に非酵素的なNitro-BT 還元が著明にあらわれることは、P-細胞の細胞化学的特異性の一面を示すものであろう。

稿を終るにあたり、御校閲をいただいた恩師奥村教授ならびに終始御指導、御鞭撻下さつた岡山県立岡山病院長那須弘之博士に厚く御礼申し上げます。

(本論文の要旨は第8回日本神経病理学会総会において発表した。)

文

- 1) Seligman, A. M., Chauncey, H. H., and Nachlas, M. M.: *Stain Tech.*, 26: 19, 1951
- 2) Novikoff, A. B., and Masek, B.: *J. Histochem. Cytochem.*, 6: 217, 1958
- 3) Walker, D. G., and Seligman, A. M.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 9: 415, 1961
- 4) Pearse, A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied*. London: Churchill. 1961
- 5) Glenner, G. G., Burtner, H. J., and Brown, G. W.: *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 591, 1957
- 6) Nachlas, M. M., Tsou, K-C., et al: *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 420, 1957
- 7) Pearse, A. G. E.: *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 515, 1957
- 8) Nachlas, M. M., Walker, D. G. and Seligman, A. M.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 4: 29, 1958
- 9) Nachlas, M. M., Walker, D. G., and Seligman, A. M.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 4:

献

- 467, 1958
- 10) Oda, T., Okazaki, H., and Seki, S.: *Acta Med. Okayama*, 12: 302, 1958
- 11) Pearson, B.: *J. Histochem. Cytochem.*, 6: 112, 1958
- 12) Scarpelli, D. G., Hess, R., and Pearse, A. G. E.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 4: 747, 1958
- 13) Hess, R., Scarpelli, D. G., and Pearse, A. G. E.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 4: 753, 1958
- 14) Wattenberg, L. W.: *J. Histochem. Cytochem.*, 6: 225, 1958
- 15) Zimmermann, H., and Pearse, A. G. E.: *J. Histochem. Cytochem.*, 7: 271, 1959
- 16) Glenner, G. G., Weissbach, H., and Redfield, B. G.: *J. Histochem. Cytochem.*, 8: 258, 1960
- 17) Cohen, R. B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106: 309, 1961
- 18) Hess, R., Pearse, A. G. E.: *Experimentia*, 17:

- 317, 1961
- 19) Ringler, R. L., and Singer, T. P.: Arch. Bio-phys. Biochem., 77: 229, 1958
- 20) 赤堀四郎編: 酵素研究法 2, 朝倉書店, 1961
- 21) Hess, R., and Pearse, A. G. E.: Nature, 191: 718, 1961
- 22) Pearse, A. G. E.: Nature, 191: 504, 1961
- 23) 江上, 佐藤他共訳: アーネスト・ボールドウイソン著, 動的生化学: 岩波書店, 1967
- 24) 岡本, 上田, 前田, 水谷: 顕微鏡の組織化学: 医学書院, 1965
- 25) 佐野豊: 組織学研究法: 南山堂, 1965
- 26) Racker, E.: Physiol. Rev., 35: 1, 1955
- 27) Pearse, A. G. E., and Hess, R.: Experimentia, 17: 136, 1961
- 28) Oda, T., Matsuoka, K., et al: Acta Med. Okayama, 13: 31, 1959
- 29) Friede, R. L.: J. Neurochem., 4: 101, 111, 290 (1959), 5: 156 (1960), 6: 190 (1961)
- 30) Thomas, E., and Pearse, A. G. E.: Histochemie, 2: 266, 1961
- 31) Felgenhauer, K., und Stammer, A.: Zeitschr. Zellforsch., 58: 219, 1962
- 32) Lazarus, S. S., Wallace, B. J., et al: J. Neurochem., 9: 227, 1962
- 33) Tewari, H. B., and Bourne, G. H.: J. Histochem. Cytochem., 10: 619, 1962
- 34) Viale, G. L., Nasu, H., und Zaccheo, D.: Acta Neuropath., 1: 335, 1962
- 35) Chason, J. L., Gonzales, J. E., and Landers, J. W.: J. Neuropath. Exp. Neurol., 22: 248, 1963
- 36) Friede, R. L.: J. Neuropath. Exp. Neurol., 24: 477, 1965
- 37) Friede, R. L.: Acta Neuropath., 6: 1, 1966
- 38) Wattenberg, L. W., and Leong, J. L.: J. Histochem. Cytochem., 8: 296, 1960
- 39) Engel, W. K.: Neurology, 12: 778, 1962
- 40) Burstone, M. S.: J. Histochem. Cytochem., 6: 322, 1958
- 41) Hayashi, M., and Freiman, D. G.: J. Histochem. Cytochem., 14: 577, 1966
- 42) Wattenberg, L. W., and Leong J. L.: J. Histochem. Cytochem., 8: 345, 1960
- 43) Wosilait, W. D., and Nason, A.: J. Biol. Chem., 206: 271, 1954
- 44) Slater, T. F.: Nature, 183: 50, 1959
- 45) Hashimoto, T., Kaluza, J. S., and Burstone, M. S.: J. Histochem. Cytochem., 12: 797, 1964
- 46) Hardonk, M. J.: Histochemie, 4: 563, 1965
- 47) Chason, J. L., and Pearse, A. G. E.: J. Neurochem., 6: 259, 1961
- 48) Thomas, E.: Acta Neuropath., 2: 231, 1963
- 49) Sulkin, N. M.: J. Gerontology, 10: 135, 1955
- 50) Friede, R. L.: Acta Neuropath., 2: 113, 1963
- 51) Tchong, K.: J. Hirnforsch., 6: 321, 1964

Enzyme Histochemistry of the Cerebellum
with a special reference to α -glycerophosphate dehydrogenase
in Purkinje cells and the problem of the
fixation of the material

By

Iwao TOKUNAGA

Department of Neuro-Psychiatry Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director : Prof. Nikichi Okumura)

ABSTRACT

With the cerebellum of albino rat, human and cat as the material the activities of lactate dehydrogenase (LDH), succinate dehydrogenase (SDH), and α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPDH) were studied histochemically. For the identification of SDH and α -GPDH, menadione (MD) was added to the incubation medium as an intermedicator. In the freshly-prepared cryostat sections of the cerebellum, the activities of LDH and SDH, as has already been reported, have been found in the granular layer (glomeruli cerebellosi), molecular layer and Purkinje cells (P-cells), but the activity of α -GPDH has hardly been detected in P-cell layer. In contrast to this findings, when the tissue block was first fixed with cold formalin solution and then frozen sections were prepared, in the course of identification of α -GPDH the formation of Nitro-BT formazans was observed in P-cells. This fact indicates that a special precaution is required in the selection of methods and the determination of results in the enzyme histochemistry. From this point of view, the establishment of various experimental conditions optimal for such a study have been tried with a special reference to the problem of the fixation.

The following results have been found with regard to the reaction in the sections fixed with formalin : 1) there is no marked difference due to the length of fixation time : 2) there is little effect due to the change in pH: 3) no specific inhibitory effect can be observed : 4) the presence of MD is prerequisite ; 5) SH-group is involved ; and 6) the enhancement of incorporation (adsorption ; cf : substativity ; Pearse) of Nitro-BT to the tissue is associated with the reaction. From these findings I have postulated that the reaction observable in the formalin-fixed sections results from non-enzymic reaction in which SH-group and MD are involved, on the assumption that Nitro-BT is bound to the tissue protein.

Furthermore, the findings that P-cells do hardly exhibit the activity of α -GPDH in the non-fixed sections different from other cellular components of cerebellar tissue, as well as the fact that the non-enzymic reaction of Nitro-BT appears markedly in P-cells of the formalin-fixed specimen, seem to reflect one aspect of the cytochemical specificity of the P-cells.

徳永論文附图

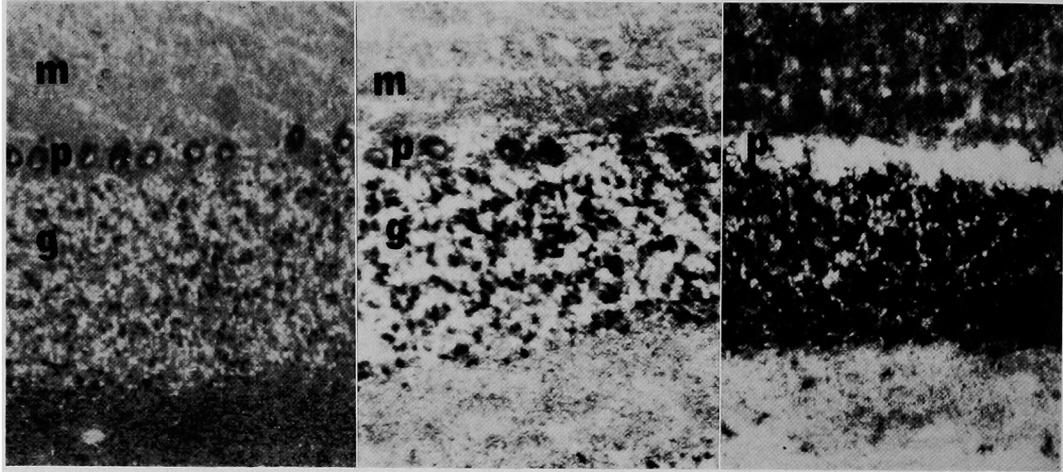


図1 : LDH, ダイコクネズミ小脳, 新鮮クリオスタット切片.

図2 : SDH, ダイコクネズミ小脳, 新鮮クリオスタット切片.

図3 : α -GPDH, ダイコクネズミ小脳, 新鮮クリオスタット切片.

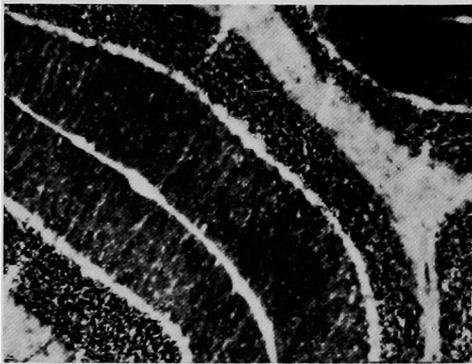


図4 : 図3の弱拡大.

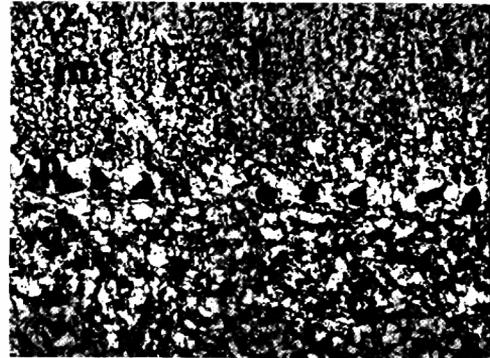


図5 : (α -GPDH), ダイコクネズミ小脳, 冷フォルマリン固定切片.

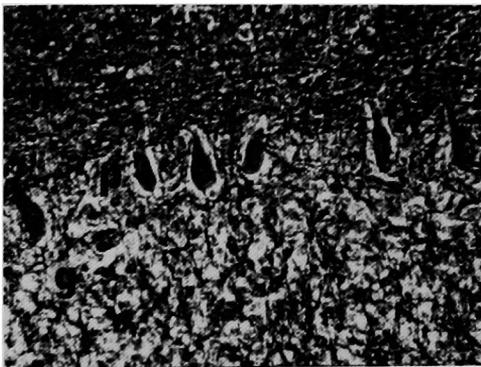


図6 : (α -GPDH), ヒト小脳, 冷フォルマリン固定切片.

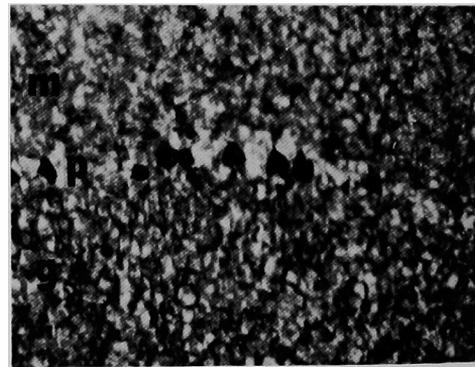


図7 : ダイコクネズミ小脳, 固定切片に吸着(結合)した Nitro-BT の, アスコルビン酸による還元反応.