

Neotetrazolium 塩による Succinic Dehydrogenase System の活性度測定法とその吟味

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾教授)

小 田 琢 三
関 周 司
柴 田 高 志
酒 井 晃 晃
岡 崎 博 明

[昭和32年12月20日受稿]

緒 言

1949年 Kun¹⁾ らが初めて組織ホモチネイトについてコハク酸脱水素酵素の測定に TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) を使用して以来, TTC 及びその誘導体が本酵素及び諸種生物学的還元系の組織化学的証明及び活性度測定に愛用されるようになった。TTC¹⁾²⁾³⁾⁴⁾, neotetrazolium chloride (NT) (p, p'-diphenylene-bis-2-(3,5-diphenyltetrazolium chloride)⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾, blue tetrazolium (BT)¹³⁾¹⁴⁾ (dimethoxyneotetrazolium chloride)¹³⁾¹⁴⁾ 及び tetrazolium violet (TV 又は INT) (2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride)¹⁵⁾¹⁶⁾ など4種の tetrazolium 塩の中では NT⁵⁾⁷⁾ 或は INT¹¹⁾¹⁷⁾ の反応が鋭敏であり, 而も NT の還元度を指標とした組織ホモチネイトのコハク酸脱水素酵素活性度は丁度検圧法によって測定した O₂ 消費量と平行する¹¹⁾。従つて NT の使用価値は将来更に益々増大することが予想される。然るに NT の還元生成物には, その反応条件, 組織成分或は抽出溶媒によつて, 青・赤・紫色などが観察され, その原因については同じ NT によつて一つ以上の異なる還元生成物が出来るためか¹⁸⁾, 或は同じ還元生成物が異つた組織成分と複合してくるためか⁷⁾¹⁰⁾, 或は更に市販 NT 自身が他の tetrazolium 塩との混合物であるためか¹²⁾ 諸家の意見必ずしも一致していない。このような点から考えて活性度の定量的測定法に NT を使用するためには更に根本的吟味が必要である¹¹⁾¹²⁾。

私共は先にコハク酸脱水素酵素系 (Succinic de-

hydrogenase complex (Green 1955)¹⁹⁾²⁰⁾ or system (Singer 1956)²¹⁾²²⁾ の組織化学的及び細胞化学的検出に諸種 tetrazolium 塩を使用して NT の優秀性を認めると共に²³⁾²⁴⁾²⁵⁾, NT 及び亜テルル酸カリ (kalium tellurite) を用いた本酵素反応が mitochondria に一致して出現することを顕微分光学的並びに電子顕微鏡的に立証した²⁴⁾²⁶⁾が, 上述のような関係から更に NT による反応の性格を酵素化学的に検討し正確な定量的測定の上に立つて本酵素活性度を正確かつ簡易に測定出来る新しい方法の考案を企図した。この目的のために組織ホモチネイトについて種々な酵素反応停止剤使用後, 種々な溶媒による抽出の難易, 抽出液の透明度及び吸収スペクトルの安定性などを比較し, 又 NT の酵素反応による還元生成物の抽出液と sodium hydrosulphite などの化学的還元剤によつて得たものとの異同を比較検討し, 満足すべき条件を求めた。更にコハク酸ソーダ及び NT の濃度, 組織の量と種類, 緩衝液の水素イオン濃度, 反応時間, 好氣的及び嫌氣的条件, 反応促進及び抑制剤など反応にまつわる種々な因子を絶対的又は相対的に変えて, 各々の還元生成物の吸光度曲線を描き, 本酵素反応の解析, 吟味を行つた。その結果微量な新鮮組織について本酵素活性度を普遍的に正確かつ簡易に測定しうる条件と方法を考案し得たのでここに報告する。

材料及び方法

酵素源としてはマウス, ラット, ネコ及び人体の諸臓器組織, ラットの DAB 肝癌, 同胆癌動物肝及びラット移植腹水肝癌などを用い, homogenate,

slice, cell suspension, mitochondria 分割などについて比較した。活性度測定法の吟味のための酵素反応条件の解析には主として glass homogenizer によるマウス肝 homogenate を使用した。又反応条件解析のために反応にまつわる諸因子の中の或る因子の条件を変化せしめた場合、主として用いた他の因子の濃度及び量などは次の如くである pH 7.6 の 0.1 M 磷酸緩衝液 homogenate (0.2 ml につき肝 10 mg を含む) 0.2 ml, 0.2 M sodium succinate 液 0.2 ml, 0.2% NT 液 0.2 ml, 37°C, 30 分。変化せしめた因子の条件その他については各実験成績の項に於て記す。

方法は先ず基質液と NT 液とを混じたものと組織の磷酸緩衝液 homogenate とを別個に恒温槽に入れ数分後 37°C に達してから全液を混じり反応を開始した。一定時間後諸種反応停止剤を加え、種々な脂溶性溶媒によつて抽出、Beckmann DK-I 型自記光電分光々度計で吸収スペクトルを描き、かつ極大吸収波長を用いて吸光度を測定した。又反応混液中

のコハク酸ソーダ液の代りにコハク酸ソーダを容れない蒸留水を用いて endogenous dehydrogenase 活性度を測定し、これによつて succinic dehydrogenase system 活性値を修正した。その他の条件方法などについては実験成績の項に記載する。

実験及び成績

A. 反応停止剤、還元生成物の抽出溶媒及び抽出液の吸収スペクトルの吟味。

従来本酵素活性度の測定のために推奨された反応停止剤及び抽出液には、acetone¹⁾; n-butanol⁷⁾; ethanol-acetone⁹⁾; 1N hydrochloric acid, alcohol-tetrachloroethylene¹⁰⁾; trichloroacetic acid, ethyl acetate¹¹⁾; acetone-tetrachloroethylene¹²⁾ その他があるが、私共は組織化学的染色標本と対比して活性度を測定したいため及び遠沈分離の煩雑さをさけるために、10% formalin 固定、acetone-ether (等量混液) を使用し、従来の諸家の方法と比較した処、第 1 表に示す如き成績を得た。例えば三塩化醋

Table 1. Comparative observations of the extractability of reduced neotetrazolium (I), separability of solvent from reaction medium (II), transparency of extract (III), stability of the color of extract (with neither decoloration (IV) nor change of color (V)) by various solvents after stopping the enzyme reaction with different agents.

Solvents	Fixatives					Formaline					Sulfuric acid					Hydrochloric acid					Trichloric acid					—				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
n-Butanol	△	△	○			×	△	○			×	△	○																	
Acetone	○	×	△			○	×	×			○	×	×																	
Ether	△	△	○			△	△	○			△	△	○																	
Ether-ethanol	△	×	△	○		×	△	△	△		×	△	×	△																
Ethanol-xylene	△	△	×	○		△	×	×	×		△	×	×	○	△															
Ethanol-acetone	×	×	×	△		×	×	×	△		×	×	×	△		×	△	×						△	×	×				
Ethyl acetate																△	×	×												
Tetrachloroethylene																										△	△	△		
Ethanol-tetrachloroethylene											△	×	△																	
Acetone-tetrachloroethylene																									○	△	△			
Carbon tetrachloride																									△	△	△			
Acetone-ether	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	△	◎	◎	×	×						◎	◎	◎	◎	◎		

酸¹¹⁾で反応を止めると褪色し易く、又前以つて反応停止剤を加えず ethanol-acetone などの抽出液で直接反応停止兼抽出する場合は褪色することがある。又 ethanol-acetone や Glock⁷⁾の推奨した n-butanol では抽出力が極めて悪く、かつ分離が困難で遠沈分離を不可欠とする。更に ethyl acetate や tetrachloroethylene を使用した場合も抽出力が acetone-ether

法に及ばず、溶媒層との分離が悪く、混濁し易い。然るに 10% formalin 固定後、acetone-ether 抽出法は抽出力が最も優れ、遠沈を要せず速やかに分離し透明な抽出液が得られる。反応液量の多い場合は遠沈して上清を捨て沈渣に acetone-ether を加えた方が抽出が速い。若し極く稀に抽出液が微かに混濁した場合は水を加えることによつて直に透明抽出液

が分離する。而も抽出液の吸収スペクトルが常に一定し、極大吸収は常に $520\text{ m}\mu$ に現われ (第 1 図)。

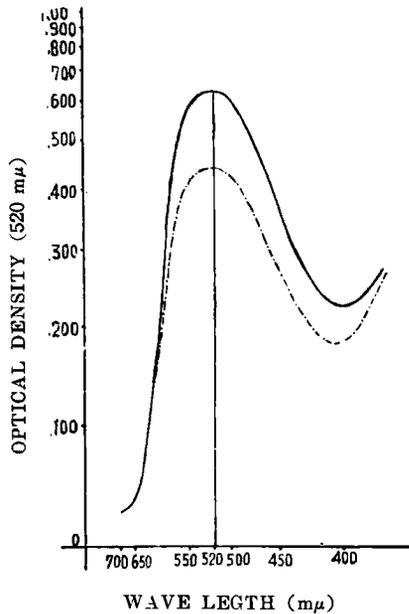


Fig 1. Absorption curves of neotetrazolium diformazans obtained by chemical reduction with sodium hydrosulfite (— line) and by enzymical reductinon (--- line)

可成り長時間抽出液が安定である。塩酸や硫酸で反応を停止後、acetone-ether 抽出液もほぼ同様であるが 2~3 日放置すると褪色、吸光度減少が起る。抽出後水を加えて再分離して保存すると formalin の場合は完全に硫酸の場合は殆んど完全に、塩酸の場合は可成り、長期間吸光度の減少が防がれる。なお直射日光或は強い光線に曝すと光化学的变化で褪色するが室光に置くと再び可逆的に元の色に戻る。従つて殆んど測定誤差を来すようなことはないが、抽出、保存、測定はなるべく強い光を避け普通以下の室光下で行うが望ましい。時間の都合では formalin 固定で保存し、測定前に抽出してもよい。

B. NT の酵素的還元生成物と化学的還元生成物との比較及び標準液の濃度と吸光度との関係

NT の酵素的還元後 formalin 固定、acetone-ether 抽出液と sodium hydrosulfite による化学的還元生成物の acetone-ether 抽出液との吸収スペクトルを比較すると、第 1 図の如く何れも常に $520\text{ m}\mu$ に極大吸収を有する全く同型の曲線を示す。又 NT 還元物の acetone-ether 抽出液はそれを稀釈しても吸収スペクトルの変化を来すことなく、 $520\text{ m}\mu$ に於

ける吸光度は Lamelet-Beer の法則に従つて稀釈液の濃度に比例して直線的に変化する (第 2 図)。

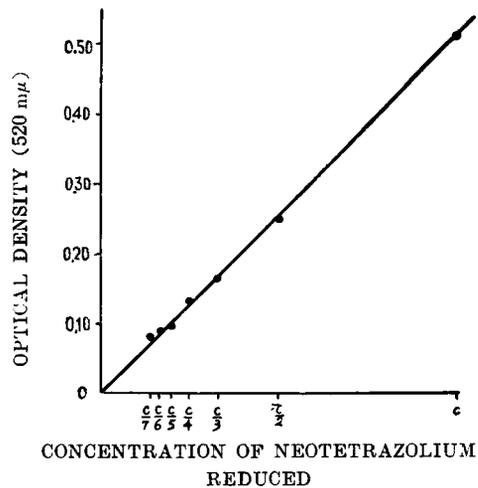


Fig 2. Straight line relationship between the concentration of reduced neotetrazolium chloride and optical density.

更に各種濃度の NT 液を作り、その一定量に充分量の sodium hydrosulfite を加えて還元し、acetone-ether で抽出、 $520\text{ m}\mu$ に於ける吸光度を測定した。使用した光電比色計の cell の光路は 1 cm で容量は

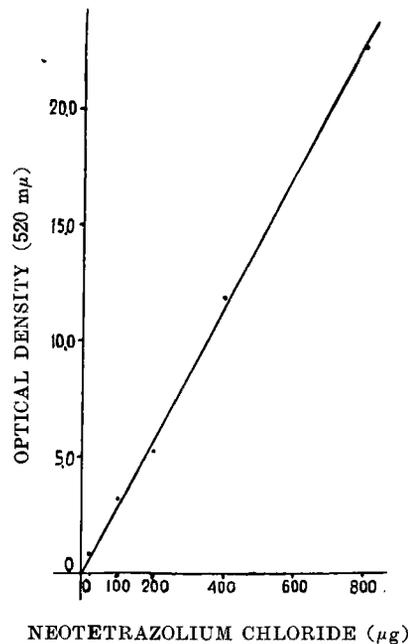


Fig 3. Optical density of diformazan obtained by the reduction of neotetrazolium chloride with sodium hydrosulfite.

3 ml であるので、抽出液量は 3 ml より多くし、又高濃度のもは光電比色計の実用測定濃度になるよう抽出液を多量にして測定し、測定した吸光度に抽出液量を乗ずれば抽出液 1 ml に換算した吸光度が求められる(第 5 表参照)。以下各図に於ける吸光度が一般に高値を示すのはこのように換算した値で示したからである。かくして描いた還元 NT の吸光度は用いた NT 量に比例して直線となる(第 3 図)。

従つてこの標準吸光度グラフより、単位重量の組織による NT の酵素的還元度を NT 量によつて現わすことが出来る。例えば正常マウス肝は 10 mg につき 30 分間で吸光度は大体 3.0~3.5、即ち約 100 γ の NT 還元力がある。酸素消費量に換算すると約 0.170 μ M O₂ である。

C. pH の吸光度に及ぼす影響

pH 5.2より8.4までの色々な pH 値の 0.1M 磷酸緩衝液及び pH 8.9 の 0.1M 第 2 磷酸ソーダ液

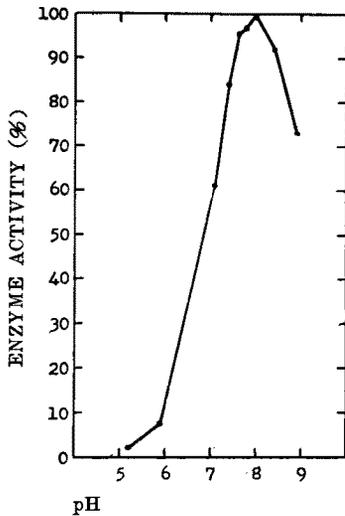


Fig 4. Effect of pH on enzyme activity. (pH curve for neotetrazolium reaction).

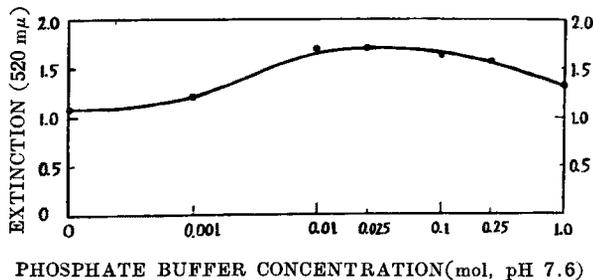


Fig 5. Effect of the concentration of phosphate buffer at pH 7.6 on the enzyme activity.

homogenate について NT の酵素的還元生成物の吸光度グラフを描くと第 4 図の如くなる。即ちおよそ pH 8.0 を peak とし、pH 7.6~8.2 頃では殆んど peak に近い活性が示されている。従つて酵素反応の解析は他の条件をも考慮して pH 7.6 で行うこととした。

D. 緩衝液濃度の吸光度に及ぼす影響

蒸溜水及び 0.001, 0.01, 0.025, 0.1, 0.25, 1.0 M の磷酸緩衝液 (pH 7.6) homogenate について、NT の酵素的還元生成物の吸光度グラフを描くと第 5 図の如くである。即ち 0.01~0.1 M の濃度 (反応混液の終末濃度はその 1/3) の磷酸緩衝液 homogenate が至適である。

E. 反応時間と吸光度との関係

反応時間が 10 分以内では endogenous dehydro-

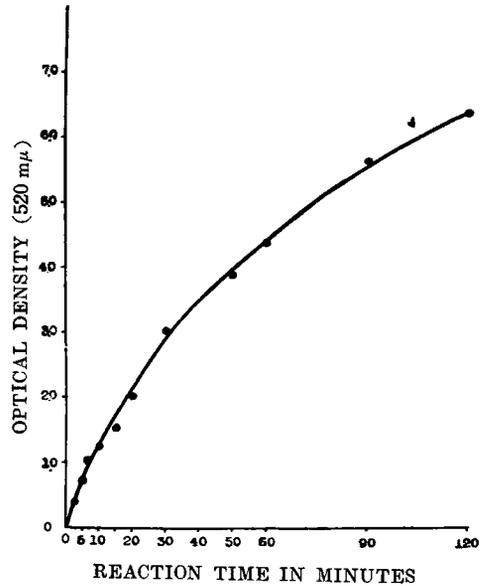


Fig 6. Time curve for the rate of reduction of neotetrazolium chloride.

genase 活性が比較的強い。30分乃至1時間を超えると次第に反応速度が低下して行く。後者の理由は恐らく基質の消費による基質濃度の低下、反応生成物の沈着による反応阻害、酵素蛋白の変性など種々な因子の総合によるものであろう。然し10分乃至30分位の間では反応量はほぼ時間に平行する(第 6 図)。従つて他の反応条件解析のためには反応時間を主に 30分と定めた。

F. NT 濃度と吸光度との関係

マウス肝夫々 10 mg 及び 16 mg 含有 homogenate について、NT 液濃度を 0.01% より 0.8% まで種々に変えた場合、還元 NT の 520 m μ に於ける吸光度を図示すると第 7 図の如くなる。即ちこの反応条件

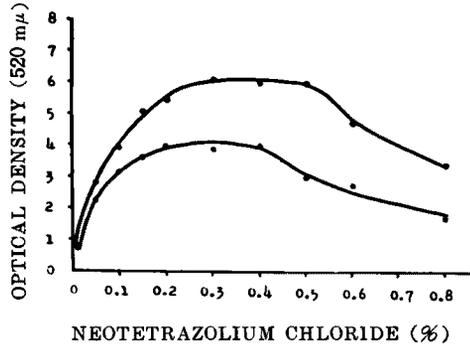


Fig 7. Effect of neotetrazolium chloride concentration on optical density.

Activities are expressed as optical density of reduced neotetrazolium chloride in upper and lower lines on 16 mg and 10 mg of liver tissues, respectively.

下では肝組織 10 mg (下の曲線) 及び 16 mg (上の曲線) の場合、NT 液濃度は夫々 0.2~0.4% 及び 0.3~0.5% に於て最大活性を示し、この両者に共通な plateau をもつ NT 液濃度に於ては活性度はほぼ用いた肝の重量に比例、即ち酵素量に比例する。然しそれより低濃度では最大活性を示すに達せず、又それより高濃度では却つて阻害され、何れも吸光度が組織量に比例しない。従つて酵素活性度を正確に測定するためには、組織の酵素活性度に応じて、NT 液濃度と組織の量との比率を一定の範囲内に定

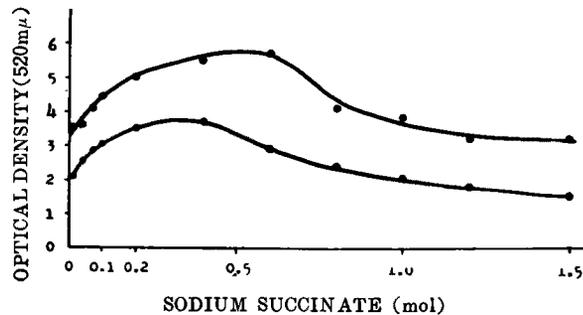


Fig 8. Effect of sodium succinate concentration on optical density.

Activities are expressed as optical density of reduced neotetrazolium chloride in upper and lower lines on 16 mg and 10 mg of liver tissues, respectively.

めなければならない。例えば肝組織では 10 mg に対しては 0.2% が適当である。但しここに示した溶液の濃度は実用的便宜のために組織 homogenate と NT 液とコハク酸ソーダ液とを夫々 0.2 ml 等量ずつ加えた各溶液の混合前の濃度であつて、反応混液についての濃度即ち終末濃度は丁度その 1/3 に相当する (以下各項同様)。

G. 基質液即ちコハク酸ソーダ液の濃度と吸光度との関係

前項と同様な方法で今度は加えられるべきコハク酸ソーダ液の濃度を 0.01 M より 1.5 M の範囲に亘つて変化せしめて吸光度を比較すると第 8 図の如くなる。即ち肝組織 10 mg (下の曲線) 及び 16 mg (上の曲線) について sodium succinate 液の濃度が夫々 0.2~0.6 M に於て最大活性を示す plateau が見られる。何れに於てもそれより高濃度では反応度が著しく阻害され、又逆に低濃度では、活性度比較のための誤差は比較的少いが、活性の低い組織ではその最大活性を示すのに活性の高い組織ではその最大活性に達しないような場合が生じ、両者間の正確な活性値の差異を評価し得ない。従つて正確な測定のためには組織の量或は活性度に応じて sodium succinate との割合をも一定の範囲内の比率にしなければならない。例えば肝組織 10 mg の場合は 0.2 M sodium succinate 液が適当であらう。

H. 酵素量と吸光度との関係

酵素量と吸光度との関係を調べるために肝組織の量と吸光度とを比較した。即ちマウス肝組織 0.4 gr. を 0.1 M, pH 7.6 の燐酸緩衝液 5 ml で homogenize し、その 0.2 ml ずつ取り出し、夫々に種々な量の同緩衝液を加えて肝組織濃度即ち酵素濃度の異なる液を作り、それらから夫々 0.2 ml ずつを取り出して反応に用いた。それに 0.2 M sodium succinate 液 0.2 ml, 0.2% NT 液 0.2 ml を混じて 37°C, 30 分間反応せしめた。肝組織重量 0.2 mg より 16 mg までに於ける還元 NT の吸光度曲線は第 9 図に示す如くである。この反応条件下に於ては凡そ肝 4~12 mg (吸光度約 1.0~5.0) の範囲内で吸光度グラフはほぼ直線を示し、吸光度は組織量即ち酵素量に比例する。即ち活性度の測定に用いることが出来る。実用的には 10 mg 位が便利であらう。

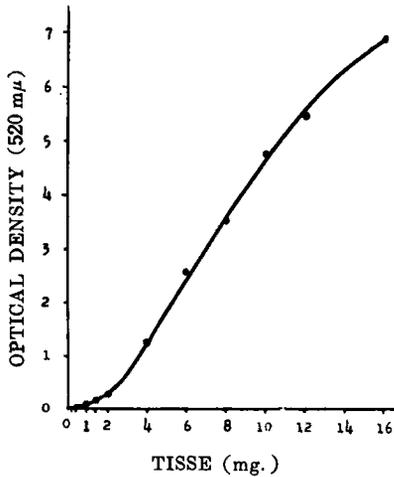


Fig 9. Relationship between the amount of enzyme (mouse liver homogenate) and the amount of reduced neotetrazolium chloride, as measured by optical density.

Duration of incubation, 30 min.; temperature, 37°C.

Straight line correlation are seen between them from 4 to 12 mg of the tissues.

I. 基質及び NT の組織重量に対する相対的至適濃度の決定

上述の実験成績によつて第2表の如く実施すれば、本条件下で抽出液 1 ml に換算した吸光度が凡そ 1.5~4.5位の活性度を有する諸臓器組織については同一組織量で正確かつ簡易に活性度を測定出来るが、更に吸光度 0.01 より 12.0 までの活性を有する組織

Table 2. Colorimetric estimation of the activity of succinic dehydrogenase system with neotetrazolium chloride

Reaction medium:

Substrate.....Sodium succinate (0.2M).....0.2 ml	} 37°C
Hydrogen acceptor.....Neotetrazolium chloride (0.2%).....0.2ml	
Fresh tissue (e. g. liver : 10 mg/0.2ml of	} homoge- nate } 37°C
phosphate buffer solution (0.1M, pH7.6)	

Reaction temperature: 37°C

Reaction time: 30min.

Stopping the reaction with 0.2ml of 10% formalin solution

Extraction of diformazan with etheracetone(1:1)

Measurement of optical density (520mμ)

例えばマウス肝組織で 0.1 mg より 40 mg までの測定に至適な基質の濃度 (mol) 及び NT の濃度 (%) を実験値より計算して表示すれば第3表の如くなる。本表の組織量はマウス肝についてのものであるが表

Table 3. Optimal concentration of sodium succinate and neotetrazolium chloride in comparison with the weight of liver tissues and with optical densities*

Weight of liver tissue (mg)**	Optical density***	Concentration of sodium succinate (mol) and neotetrazolium chloride (%)****
40 —30	12.0—9.5	0.8
30 —22	9.5—7.5	0.6
22 —13	7.5—4.5	0.4
13 — 5	4.5—1.5	0.2
5 — 1.5	1.5—0.5	0.1
1.5— 0.1	0.5—0.01	0.05

*Per 30min., 37°C, ** In 0.2ml. of 0.1M phosphate buffer homogenate. *** Expressed by the value converted into 1 ml. of extract. **** Of 0.2 ml. of the aqueous solutions, respectively.

に示された吸光度と基質及び NT 濃度との関係を基準に用うれば全ての生体組織について普遍的である。本表によると例えば 0.1 mg の如き微量な組織について 0.6 ml の反応液量で活性度を測定しようが、更に反応液量を少なくすれば、例えば capillary を用いて 10⁻¹~10⁻⁵ml 位の量で反応を行えば組織重量は 0.1 mg~0.01 γ の如き微量となり、この抽出液を micro-cubet 又は microcapillary に入れ、顕微分光測光装置で測定すれば極く少数の細胞の活性度でも測定し得るはずである。又血球や滲出液中の細胞或は培養細胞についての活性度測定にも利用出来る。多数の活性度未知な諸臓器組織について測定する場合は組織重量を一定にして反応液濃度を変えることは不便であり、実用的には反応液濃度を一定にして夫々の組織重量を変えて至適酵素量に於て反応を行う方法が便利である。それには次項の諸臓器活性度表(第4表及び第10図)或は第5表を参照して、予め測定すべき未知組織の活性度を予想して、例えばマウス肝(吸光度約3.0~3.5)より活性の著しく低い組織例えば活性度がその 1/5 位の組織を測る場合には組織重量を5倍増して 50 mg について基質及び NT 濃度 0.2M, 0.2%液を用いて反応を行い、単

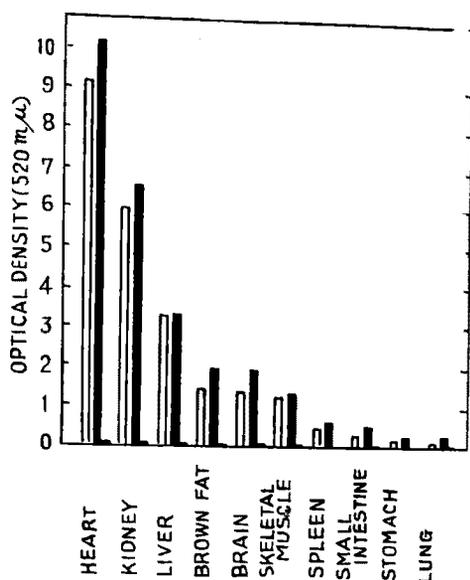


Fig 10. Succinic dehydrogenase system activities expressed in optical densities in various tissues of the mouse.

White columns show the values measured on 10 mg of each tissue. Black columns show the values measured on the optimal weight of each tissue presented in table 4 and converted into those on 10 mg of each tissue. The lowest black columns attaching to the each black columns show the values of endogenous dehydrogenases, respectively.

位重量の活性化に換算すればよい。活性化の予想のつかない場合は先ず同一重量 (例えば 10 mg) について測定し、得られた吸光度がその反応条件下 (基質濃度, NT 濃度例えば 0.2 M, 0.2%) に於て第 3 表の吸光度の範囲 1.5~4.5 より非常に高いか又は低い時はそれぞれの至適組織量について再度測定することが望ましい。或は計算によつて正しい活性化に換算することも出来る。なお反応液の濃度が組織量より濃くなると誤差が大となるが、薄い場合は少いので、多少の誤差を覚悟すれば、至適濃度より多少薄いものを用いて測定することも出来る。

J. 諸臓器組織の活性化

マウスの新鮮諸臓器組織の homogenate (0.1 M, pH 7.6 の緩衝液 0.2 ml 中に組織 10 mg の割合に含むもの) 0.2 ml, 0.2 M sodium succinate 液 0.2 ml, 0.2% NT 液 0.2 ml 混液, 37°C, 30 分反応による還元 NT 吸光度を以て表わした諸臓器組織の活性化は第 4 表及び第 10 図 (white column) に示す如くである。この値に基いて更に第 3 表より求め

Table 4. Optical densities of reduced neotetrazolium measured by the method in text on homogenates containing 10 mg of tissue in each.

Organ	Volume of Extract (ml) (V)	Optical Density* (E)	$E \times V^{**}$
Heart	28.0	0.325	9.10
Kidney	21.1	0.284	5.99
Liver	16.0	0.205	3.28
Brown Fat	11.8	0.121	1.73
Brain	11.0	0.126	1.39
Muscle	12.5	0.098	1.23
Spleen	7.4	0.055	0.41
Intestine	6.5	0.036	0.23
Stomach	6.1	0.024	0.15
Lung	6.9	0.009	0.06

* Measured in 1 cm of light pass at 520m μ of wave length by an electrospectrophotometer.

**Optical densities on the assumption that the volume of extract is 1 ml in each.

Table 5. Optimal weight of various tissues of the mouse for the reaction according to the method presented in the table 2.

Organs	Optimal weight of tissues (mg)
Heart	4
Kidney	6
Liver	10
Brown Fat	18
Brain	20
Muscle	30
Spleen	55
Intestine	60
Lung	90
Stomach	130

たマウス諸臓器組織の至適重量(第 5 表)に従つて組織重量を変えて、同一の基質濃度 (0.2 M) 及び同一の NT 濃度 (0.2%) で反応せしめ、同一重量 (10 mg) に換算して得た修正値は第 10 図 (black column) に示す如くである。本図に於て white column と black column との差は理論的には吸光度約 1.5~4.5 位の活性化を有する組織に於ては殆んどなく、活性化がそれより高い或は低い程両者間の差は大となるはずである。それは活性化の著しく異なる諸臓器組織の活性化を同一重量について測定した場合 (white column) 活性化が可成高いところでは主として NT 及び succinate の相対的低濃度に由来する不足状態を来すためであり、活性化が可成低い

ところでは主として NT 及び succinate の相対的高濃度による反応阻害作用が現われるためである。事実吸光度 3.28 を示した肝では white 及び black column の吸光度が等しく、吸光度 1.23 を示した骨格筋では両者の差が極めて少い。但しそれらの中間の活性度を有する褐色脂肪組織及び脳に於て両者の差が比較的大きく現われたことは理論的には確かな理由が不明であるが、更に別の原因例えば両臓器共脂質が極めて豊富であることも関係しているのかも知れない。

K. 組織 Slice, Homogenate, Mitochondria 分割などについての活性度の比較

肝臓組織については homogenate は slice より常に高い活性を示した。逆に DAB 肝癌組織や腹水肝癌細胞では、homogenate は slice 又は cell suspension より常に低い活性を示した。そして homogenate, slice 或は mitochondria 分割共に胆癌ラットの肝臓組織は正常ラットのそれより活性が高く、癌組織ではそれらの何れよりも更に活性が低い。その差は slice に於て小さく、homogenate に於て大きく、mitochondria 分割に於ては更に大きい。又癌組織では endogenous dehydrogenase 活性が比較的高い²⁵⁾。何れにしても homogenate と slice では活性値が異なるので諸臓器の活性度を比較する場合には出来れば、homogenate 及び slice の両者について測定し、同一条件の測定値同志を比較しなければならない。homogenate に於ける測定値と slice に於ける測定値との比率が或る組織に於てのみ他の一般組織に於けるより異なる大きな相異を示すときは

homogenate についての測定値を以つてその組織の酵素活性度を評価するには充分な吟味が必要である。homogenate では cellular structure の disorganization がり、且可溶性因子の稀釈化が起るので理想的な slice が得られればその方が正常の状態に近いことはいうまでもない。

L. その他

a) Thunberg 法を用いての嫌氣的及び好氣的条件下に於ける反応の強さの比較では嫌氣的条件下に於ける方が強い。その比率は 30 分値で凡そ 1:0.6 の割合であつた。b) 組織塊或は組織 homogenate を氷結溶解すると反応の強さが低下する。c) 緩衝液を用いない homogenate では時間と共に活性低下が著しいが、緩衝液中では低下率が少い。それは磷酸緩衝液による pH 低下の阻止と同時に磷酸イオンの酵素不活性化防止作用が考えられる。d) Ascorbic acid を加えるとフォルマリン固定では反応液の抽出中非酵素的還元作用が現われる。e) NT と TTC との酵素的被還元性を比較すると上記の条件による測定では NT の方が TTC より約 3 倍反応が鋭敏に現われた。f) 基質のみ除いた或は加えた反応液を腹腔内注射或は特定臓器の灌流を行うと、生体内で endogenous 或は succinic dehydrogenase system 反応を行うことが出来る。その染色組織或は細胞を取り出して、抽出定量すれば生体内に於ける活性度を測定することが出来る。

考 案

NT の構造式は第 11 図に示す如く p, p'-diphenyl-

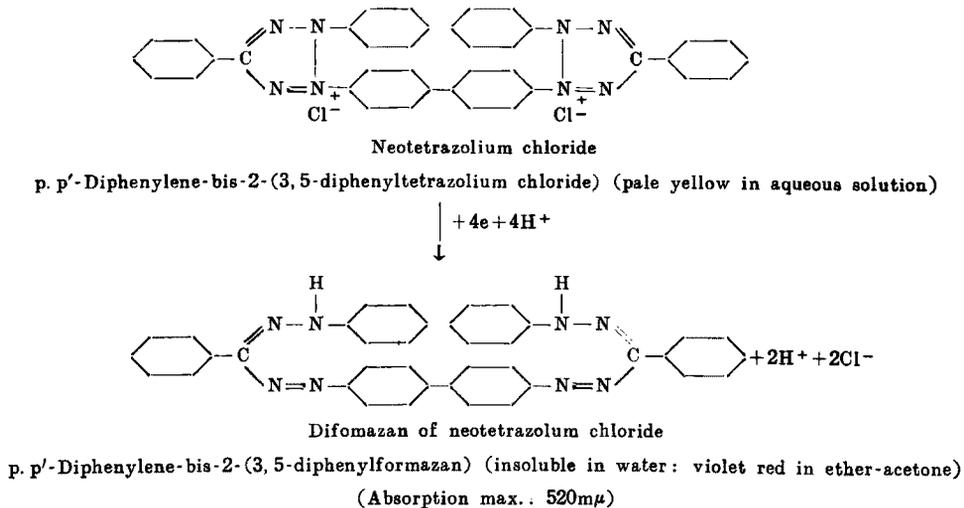


Fig. 11. Structural formulas of neotetrazolium chloride and its reduction product.

lenebis-2- (3, 5-diphenyltetrazolium chloride) であつて、水溶液中では淡黄色、還元されると水に溶けない安定な青紫色の diformazan, (p, p'-diphenylenebis-2-(3, 5-diphenyl formazan)) となり反応部位に沈着する。従つて特別な基質を用いなくても生体内の全還元系の中、NT よりも酸化還元電位が低く而も couple する状態にある総ての還元物質によつて還元されて反応が出現する筈があるが、endogenous dehydrogenase 反応は主として DPN 又は TPN dehydrogenase system {DPN 又は TPN dehydrogenase (flavoprotein) + cyt b + cyt c₁}、一部コハク酸脱水素酵素系 (succinic dehydrogenase + cyt b + cyt c₁) その他の還元系による反応の総和である²⁵⁾。然し固在基質によるそれらの endogenous dehydrogenase 反応は先に記載した反応条件下では第10図に示されたように一般に極めて弱い。然るに

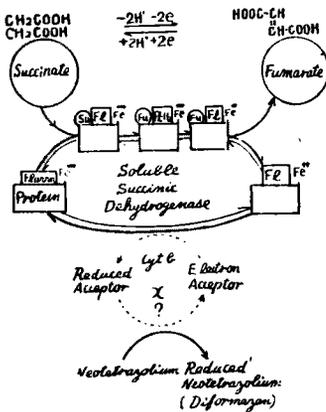


Fig 12. Electron transportation by succinic dehydrogenase. (T. P. Singer²²⁾)

コハク酸ソーダを基質にした場合は主としてコハク酸脱水素酵素系及びチトクローム酸化酵素系に共軛した反応であり、主にコハク酸脱水素酵素系活性によつて支配され、一部が固在基質反応である²⁵⁾。この反応は適当な条件下に於ては極めて鋭敏に生細胞の mitochondria に一致して鮮明な微細顆粒或は桿状体として現われる²⁵⁾。この場合 NT は主に第12図及び第14図に示す如き経路によつてコハク酸脱水素酵素系及びチトクローム酸化酵素系から間接的に電子を受取るものである。そしてその反応は主に Singer(1956)²¹⁾²²⁾ の所謂 "succinic dehydrogenase system" 或は Green (1955)¹⁹⁾²⁰⁾ の所謂 "succinic

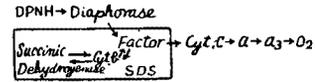


Fig 13. a). Electrontransport system (E. C. Slater. 1950) and succinic dehydrogenase system (T. P. Singer. 1956)

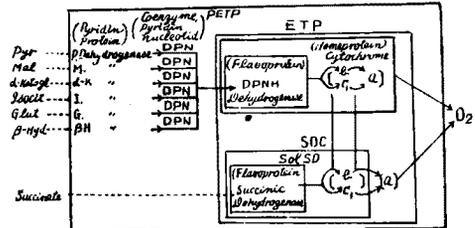


Fig 13. b). Oxidative phosphorylation & electron-transport particle in mitochondria (D. E. Green, 1955)

dehydrogenase complex' 活性によつて支配される。(第13図)。又リンゴ酸ソーダやグルタミン酸ソーダ及び DPN を基質とした場合は主として DPNH dehydrogenase system に共軛した反応であり、主にその系の活性によつて支配される。更にパラフェニレンジアミンやアスコルビン酸を基質とした組織ホモチネイトの NT 還元反応は、主としてチトクローム C・チトクローム酸化酵素系活性によつて、又充分量の還元チトクローム C を基質とした場合は主としてチトクローム C 酸化酵素の活性によつて支配され、何れもチトクローム酸化酵素の step に共軛した反応であり、一部が固在基質反応によるものである²⁵⁾²⁶⁾。(第14図) これらの複合酵素系が mitochondria に限局して存在することは Schneider²⁶⁾, Green¹⁹⁾²⁰⁾ らによつて生化学的に、又私共²⁴⁾²⁵⁾ によつても細胞化学的に確認されている。従つて、先に示した如き適当な反応条件下に於て反応を行い、かつ対照標本を参考とすれば、endogenous reaction や, lipids の二次的染色は容易に鑑別可能で問題とらなず更に Nitro-blue tetrazolium 或は Nitro-neotetrazolium を用うれば lipids の共染を伴わず本反応は mitochondria の特種超生体染色として利用することも出来る²⁴⁾²⁵⁾。

NT を脱水素酵素活性度の測定に使用する上に議論のあつた主な点は、還元生成物が単一な物質でないことがあること¹⁸⁾²⁷⁾¹²⁾、及び化学的還元生成物と酵素的還元生成物が同一の吸収スペクトル及び同一の極大吸収波長を示さないために酵素活性度を定量的に表わすことが出来ないということ¹¹⁾¹²⁾などであつた。即ち NT を組織切片標本に初めて利用した

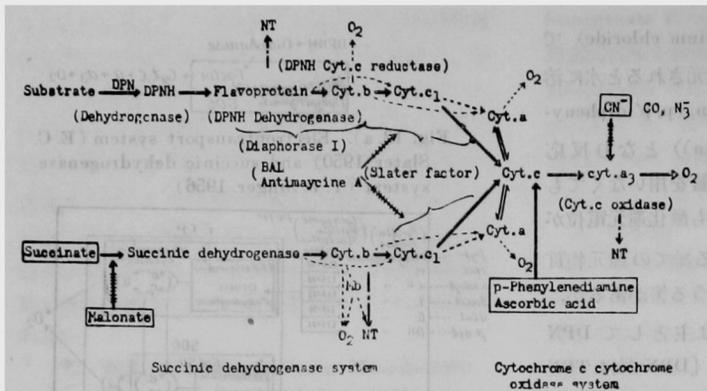


Fig 14. The reduction of neotetrazolium chloride by the terminal electrontransport system

Antopol¹⁸⁾ は切片標本上に於て反応の結果現われた色が種々な溶媒によつて異なる抽出性を示すことに基いて一つ以上の還元生成物が形成されるものと考えた。Seligman and Rutenburg¹³⁾ は blue tetrazolium を組織化学的に使用して同じく赤及び青の2種類の着色が起ることを認めそれらが夫々 BT の mono- 及び diformazan に基因するものと報告した。一方 Glock and Jensen⁷⁾ は NT の還元によつて現われる紫色は diformazan が組織成分と結合することによつて現われるものであつて異つた色の化合物の形成によつて起るものではないとの見解の下に Antopol の説に反ばくした。Jardetsky and Glick¹⁰⁾ も Glock and Jensen の見解を受け入れているように見える。然るに Findlay²⁷⁾ は還元 NT が赤と青の成分に分離出来ることを唱え Burtner et al.¹²⁾ は更にそれが NT の還元中間生成物と完全還元生成物によるものと予想したが、還元物抽出液を paper chromatography で分離抽出し、それらの2種の還元生成物は NT の還元段階を表わすものでなく市販の NT 中に混在する不明な tetrazoles 塩によつて起るものと解し、NT は生体内還元系の活性の尺度としての相対的目安として用いるとしても、活性度の定量のためには使用し得ないと唱えた。Shelton et al.¹¹⁾ も組織 homogenates の succinioxidase activity を用いて NT と INT との還元を比較し、化学的及び酵素的に還元された NT の吸収 peaks の位置が一致しないことを認め、それは夫々赤 (mono) 及び青 (di) の還元 formazan が異なる割合に存在することを示すものであり、NT を用いての正確な絶対的定量は更に検討を加えなければ不可能であろうと述べている。

然し、先に述べた如く、諸家の用いた種々な酵素

反応停止剤及び抽出溶媒によつては抽出が困難であるばかりでなく、吸収スペクトルに変化或は低下を来す場合があり化学的還元生成物のそれとは吸収 peak が一致しないものがある。然るに私共の用いた方法即ち formalin で反応を停止して、acetone-ether で抽出すると、抽出が最も容易でありかつ遠沈処理を要せずして透明な安定な抽出液が得られ、而も sodium hydrosulfite による化学的還元

生成物の抽出液の吸収スペクトルと酵素的還元生成物のそれとが全く一致して共に 520 m μ に極大吸収を示す。又 Burtner et al. の成績を検討するために paper chromatography により抽出液の色の分離を試み、一定の条件下では還元生成物の分離が出来ることを認めた。又 ether-acetone で抽出する際、monoformazan の方が比較的速く、diformazan の方が比較的遅く抽出されることを認めた。それにもかかわらず私共の測定法では、先に示した如き一定の条件下では還元生成物抽出液の 520 m μ に於ける吸光度は常に酵素量に比例し、而もその量を sodium hydrosulfite による化学的還元生成物の 520 m μ に於ける標準吸光度グラフより正確に定量することが出来る。又切片の組織化学的染色、formalin 固定標本と対比してその活性度を評価することが出来る。

結 論

Neotetrazolium chloride を用いて組織 homogenate の succinic dehydrogenase system (or complex) の活性度を測定する方法は、反応の出現が優れているにもかかわらず、多くの難点と疑義があるので、私共はそれらを吟味して更に正確かつ簡易な測定法を見出すために、先ず組織 homogenate について酵素反応施行後種々な反応停止剤を使用し、種々な溶媒による還元生成物の抽出の難易並にそれら各種抽出液の吸収スペクトルと sodium hydrosulfite による化学的還元生成物抽出液のそれとを比較検討した。その結果 10% formalin で反応停止後、acetone-ether (等量混液) で抽出するのが最も優れかつ簡便で、而もその酵素的及び化学的還元生成物抽出液の吸収スペクトルは常に一致して、共に 520 m μ に極大吸収を示すことを見出した。更に sodium

succinate 濃度, NT 濃度組織の量と種類, 緩衝液の pH 及び濃度, 温度, 反応時間, 好氣的及び嫌氣的条件など反応にまつわる種々なる因子を絶対的或は相対的に変えて, 各々の還元生成物の吸光度曲線を描き, 本酵素反応の解析, 吟味を行った。そして微量な新鮮組織についての本酵素活性を組織化学的染色標本と対比して普遍的に正確かつ簡易に測定しう

る条件と方法を確立した。

本論文の要旨は(第475回岡山医学会通常例会1957年9月21日)及び Symposium on the structure and function of cells, sponsored by "The Japanese Society for Cellular Chemistry", Oct. 26 th, 1957, at Kyoto Univ. に於て発表した。

文 献

- 1) Kun, E. and Abood, L.G.: Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Science*, **109**, 144—146, 1949.
- 2) Nordmann, J., Nordmann, R. and Gauchery, O.: Les déshydrogénases des mitochondries dans les hépatomes induits par le m'méthyl-diméthylaminoazobenzène. *Bull. Soc. chim. biol.*, **34**, 77—85, 1952.
- 3) Perry, W.F. and Cumming, G.R.: Adrenal succinic dehydrogenase activity determined by reduction of tetrazolium salt by adrenal homogenate. *Endocrinology*, **50**, 385—387, 1952.
- 4) Sawada, Y., Nakata, K. and Matsuyama, T.: Colorimetric estimation of enzyme activity by tetrazolium salts. I. Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase activity by reduction of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride. *Ikaguto Seibutsugaku*, **28**, 255—257, 1953. *Chem. Abstr.*, **48**, 2809, 1954.
- 5) Shelton, E. and Schneider, W.C.: The usefulness of tetrazolium salts as histochemical indications of dehydrogenase activity. *Anat. Record*, **112**, 61—81, 1952.
- 6) Foraker, A.G., Denkam, S.W.: Neotetrazolium in determination of succinic dehydrogenase activity in the ovary. *Proc. Soc. Exp. Med.*, **80**, 132—134, 1952.
- 7) Glock, E. and Jensen, C.O.: Colorimetric determination of plant succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **201**, 271—278, 1953.
- 8) Foraker, A.G., Celi, P.A. and Denkam, S.W.: Dehydrogenase activity in normal and hyperplastic endometrium. *Cancer*, **7**, 100—105, 1954.
- 9) Itikawa, O.: Mechanism of dehydrogenating reaction in living cells. *Symposia for the Society of Cellular Chemistry*, **4**, 113—146, 1954.
- 10) Jardetzky, C.D. and Glick, D.: Studies in histochemistry. **38**, Determination of succinic dehydrogenase in microgram amounts of tissue and its distribution in rat adrenal. *J. Biol. Chem.*, **218**, 283—292, 1956.
- 11) Shelton, E. and Rice, M.E.: Comparison of the reaction of two tetrazolium salts with succinoxidase activity of tissue homogenates. *J. Nat. Cancer Inst.*, **13**, 117—125, 1957.
- 12) Burtner, H.J., Bahn, R.C. and Longley, J.B.: Observations on the reduction and quantitation of neotetrazolium. *J. Histochem. & Cytochem.*, **5**, 127—134, 1957.
- 13) Seligman, A.M. and Rutenburg, A.M.: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science*, **113**, 317—320, 1951.
- 14) Rutenburg, A.M., Wolman, M. and Seligman, S.M.: Comparative distribution of succinic dehydrogenase in 6 mammals and modification in histochemical technic. *J. Histochem. & Cytochem.*, **1**, 66—81, 1953.
- 15) Defendi, V. and Pearson, B.: Quantitative estimation of succinic dehydrogenase activity in a single microscope section. *J. Histochem. & Cytochem.*, **3**, 61—69, 1955.
- 16) Glick, D. and Nayyar, L.N.: Studies in histochemistry. XLII. Further studies on the determination of succinic dehydrogenase in microamounts of tissue and distribution of the activity in the bovine adrenal. *J. Histochem. & Cytochem.*, **4**, 389—396, 1956.
- 17) Pearson, B. and Defendi, V.: Histochemical

- demonstration of succinic dehydrogenase in thin tissue section by means of 2-(p-iodo phenyl)-3-(p-nitro phenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride under aerobic conditions. *J. Histochem. & Cytochem.*, **2**, 248—257, 1954.
- 18) Antopol, W., Glaubach, S. and Goldman, L.: The use of neotetrazolium as a tool in the study of active cell processes. *Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II*, **12**, 156—160, 1949—50.
- 19) Green, D. E., Mii, S. and Kohout, P. M.: Studies on the terminal electron transport system. I. Succinic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **217**, 551—567, 1955.
- 20) Green, D. E.: Structural principles of electron transport and oxidative phosphorylation. *Seikagaku*, **29**, 65—71, 1957.
- 21) Singer, T. P., Kearney, E. B. and Massey, V.: Succinic dehydrogenase. In *Enzymes: Units of Biological structure and function* (Gaebler, O. H., ed.) Henry Ford Hospital International Symposium. New York, Academic Press, Inc., 1956, pp. 417—438.
- 22) Singer, T. P., Kearney, E. B. and Massey, V.: Newer knowledge of succinic dehydrogenase. *Advance in Enzymology*, **18**, 65—111, 1957.
- 23) Oda, T., Ohtani, K., Awai, M. and Sakai, A.: Histochemical studies on nervous and humoral regulations of lipid and carbohydrate metabolisms. *Acta Medicinæ Okayama*, **11**, 157—178, 1957.
- 24) Oda, T., Yoshizawa, K., Sakai, A. and Seno, S.: Cytochemical observations on the succinic dehydrogenase activity of various blood cells including reticulocytes (Abstract). *Acta Haem. Jap.* **19**, 371—372, 1957.
- 25) Oda, T.: Cytochemical and biochemical studies on the succinic dehydrogenase system. I. Cytochemical and electron-microscopic demonstration of the succinic dehydrogenase system in mitochondria. II. Analytical studies on the colorimetric estimation of the activity of succinic dehydrogenase system with neotetrazolium chloride. III. Some problems relating to the succinic dehydrogenase in pathologic conditions, with special reference to cancer tissues. *Symposia for the Society of Cellular Chemistry*, **7**, 1957. in press.
- 26) Schneider, W. C.: Intracellular distribution of enzymes. I. The distribution of succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, adenosinetriphosphatase and phosphorous compounds in normal rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **165**, 585, 1946.
- 27) Findlay, G. H.: The value of some tetrazolium salts as histochemical reagents for sulphhydryl groups. *J. Histochem. & Cytochem.*, **3**, 331—338, 1955.
- 28) Oda, T., Seki, S., Shibata, T. et al: Studies on the mechanism of the reduction of neotetrazolium chloride by the terminal electron transport system, unpublished.

**Analytical Studies on the Colorimetric Estimation of the Activity
of Succinic Dehydrogenase System with
Neotetrazolium Chloride**

By

**Takuzo ODA, Shuji SEKI, Takashi SHIBATA, Akira SAKAI and
Hiroaki OKAZAKI**

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. S. Seno)

Despite the excellence in bringing about reactions, there are still many difficulties and discrepancies in the use of neotetrazolium chloride for measuring the activity of succinic dehydrogenase system of tissue homogenate. Therefore, with the purpose to find out a measuring method simpler and more accurate, the authors performed some experiments, first on the enzymic reactions of tissue homogenate and then after stopping these reactions by using various agents, tested the ease with which reduction products are extracted with various solvents, and finally compared the absorption spectra of these liquid extracts with those of the products reduced chemically by sodium hydrosulfite. As the results, the extraction of the reduction products with acetone-ether (mixed in equal proportion v/v) after stopping the reaction with 10 per cent formalin solution was found to be the simplest and best method, and moreover, the absorption spectra of extracts of the products obtained by enzymatical or chemical reduction proved to be uniform and the both of which showed the maximum absorption at the wave length of 520 m μ .

In addition, the concentrations of sodium succinate and neotetrazolium chloride, the content and kinds of tissues, pH values and concentration of phosphate buffer solutions, the duration of reaction, aerobic or anaerobic conditions, various factors either enhancing or inhibitory to reaction, were all regulated absolutely or relatively; and by drawing absorption curves of the reduction products, these enzymatic reactions were analyzed and scrutinized. Then the authors established a method which is general, simple and accurate in measuring the enzymatic activities of a small quantity of fresh tissues in contrast with those of histologically chemically stained specimens.
