大阪大学医学部, 第1解剖学教室 (指導: 清水信夫教授).
1st Dept. of Anat., Osaka Univ. Med. School (Head: Prof. N. SHIMIZU).

生後発育におけるラッテ肝臓の組織化学的研究.

I. コハク酸脱水素酵素とチトクロームオキシダーゼ.*

Histochemical Studies of the Liver of Rats during Postnatal Growth. I. Succinic Dehydrogenase and Cytochrome Oxidase.

玉 田 善 久 Yoshihisa TAMADA.

(Received December 17, 1957.)

生体の表わす各種機能はそれに含まれる複雑な酵素系により営為され, 実に生命は酵素中に宿ると云っても過言ではないであろう. 扱完成した高等動物の組織, 細胞の表わす代謝, 機能およびそれらに關与する酵素系を完全に理解するためには, 系統発生上又は個体発生上, より低級未分化の状態よりいかに変化して来たかの過程を追及することが重要である. 比較的初期の発生に就ては Brachet (1950), Needham (1950) 等の広範な発生生化学的研究があり, 哺乳類の胎生より生後発育に就いては Flexner 一派の主として生化学的な研究 (1955), Rossi 一派 (1954, 1957) の組織化学的研究の他少数の研究があるが未だ残された問題が多い. 一方清水等は主として糖代謝に關与する酵素を組織化学的に検索し, 脳の生後発育に伴い如何なる変化を示すかを見た (清水, 久保, 森川, 石井, 岡田, 堀之内 1957). 著者はこれらの研究に平行し, 肝臓に於ける生後変化を酵素の組織化学の面より研究せんと志した.

肝臓は古くより複雑且旺盛な物質代謝の中心と見做されているだけに, ここに含有せられる酵素は誠に多種多様に互り, 夫々に就て Schneider (1953), Hogeboom 等 (1953) 等を始め多数の詳細な生化学的研究がある. 一方組織化学に於ても幾多の困難を克服して種々新しいテクニックが試みられているものの尚その方法に多くの制約を受けるためその成績に一致を見ない点多々生じて来る. ここに於て著者は胎生末期より成熟に至るまでの各時期にラッテ肝臓の新鮮凍結切片について, 各種酵素 (succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, nonspecific esterase, lipase, cholinesterase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, glucose-6-phosphatase 及び phosphorylase) を同時に組織化学的に検索し, 進んで肝臓機能発現との關係を追求し, 興味ある成績を得たのでここに報告する. 本篇においては succinic dehydrogenase と cytochrome oxidase について述べることにする.

Succinic dehydrogenase 及び cytochrome oxidase は共に好氣的代謝に關与する酵素の内の代表的なもので主として細胞の mitochondria に含まれている事が

* 本論文の要旨は昭和32年4月, 第62回日本解剖学会総会に於て発表した.

Schneider, Hogeboom 等の精細な生化学的研究に依り明らかにされている (Schneider と Potter 1943, Schneider 1946, Hogeboom, Claude と Hotchkiss 1946, Bourne 1951, Hogeboom と Schneider 1952, Schneider 1953).

1945 年 Potter, Schneider と Liebl は胎生末期より生後 1 ケ月までのラッテ肝臓及び脳について、之等酵素を生化学的に追求し、脳と肝臓では酵素活性の消長に差がある点を指摘した。又 Flexner, Belknap 及び Flexner (1953) はモルモット胎生期のこれ等酵素を肝臓と大脳皮質について生化学的検索を行い、その定量的成績を報告している。しかし乍ら生化学成績では当然組織学的分布は望まれず、此の点より組織化学的検索が重要且不可欠なものとなった。

さて組織化学の面より succinic dehydrogenase については 1935 年 methylen blue の脱色を応用した Semenoff の方法が最初に報告されたが、最近 Seligman と Rutenburg (1951) に依り tetrazolium 塩を用いる方法が発表され、以来多くの研究者に依り各臓器について夫々詳細な報告がなされている (Seligman と Rutenburg 1951, Goddard と Seligman 1952, Shelton と Schneider 1952, Foraker 等 1952, 1953, 1954, Padykula 1952, Malaty と Bourne 1953, Rutenburg, Wolman と Seligman 1953, Rosa と Velardo 1954, Wachstein と Meisel 1954, Cooper 1955, 清水と森川 1957, 葉室 1957, 清水, 森川と石井 1957)。

一方 cytochrome oxidase に関しては、古く Ehrlich (1885) に端を発し、その後 Nadi 反応として知られて来たが von Gierke (1911) に依り stable 及び labile nadi 反応に分類され、更に 1922 年 Gräff が前者を M, 後者を G-nadi 反応と名付けた (Lison 1953)。後者の反応を与える物質は、現在では Lison (1953) が 1936 年に指摘した様に Keilin 及び Hartree の云う cytochrome oxidase 或いは Warburg の‘呼吸酵素’と同一のものと見做されている。1943 年に至り Moog は厳密な対照実験を含む新しい方法を発表しこれにより cytochrome oxidase の組織化学的研究は決定的な進歩を示した。最近 Roizin (1955) は人の中枢神経系における本酵素の詳細な系統的研究を発表し、教室においても清水, 森川と石井 (1957) に依り家兎脳における成績を報告したが未だ肝臓における生後発育に伴う検索はなされていない現状である。幸い教室において新鮮凍結切片の作製に大体満足すべき結果を得たので、生化学的には常に略々共存せるこの両酵素を Rosa と Velardo 法 (1954) 及び Gomori (1952) の記載せる G-Nadi 反応に依り夫々組織化学的に検索し、更に一步を進めて生後における肝臓機能発現との関係を検討せんとした次第である。

II. 材料と方法.

ラッテは表 1 の如き各時期について 78 匹を使用した。胎生時期の決定は腔脂膏検査に依り、発情期に交配させ翌朝精子を検出したものについて妊娠第 1 日として計算した。動物は断頭法に依り屠殺し可及的速かに肝臓を取り出し、胎生及び

生後初期のものではその全部を, 成熟せるものでは一定葉より所定の大きさを取り, 直ちに Adamstone-Taylor 法変法 (Shimizu, Kubo と Morikawa 1956) により 10—20 μ の新鮮凍結切片としてスライドに貼り, 室温にて乾燥後速かに以下記す incubating mixture に投入した.

1. Succinic dehydrogenase.

Rosa と Velardo 法 1954.

4 ml 0.5 M sodium succinate,

4 ml 0.4% aqueous neotetrazolium chloride,

30 ml 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.1% sodium cyanide (pH 8.2).

37°C に於て 2 時間 incubate し, 簡単に水洗し, 次いで 10% 中性ホルマリンで 1—24 時間固定し, グリセリンで封入する. 尚対照は基質たる sodium succinate を抜いて同様に行う.

2. Endogenous dehydrogenase.

1. Neotetrazolium chloride を夫々 0.25%, 0.5% 及び 1% の割合に含む 0.05 M phosphate buffer (pH 7.6) に厚さ 1—2mm

の新鮮組織片を投じ, 37°C で 15—20 時間作用させる. 次に 10% 中性ホルマリンで 5 時間以上固定後 20 μ の凍結切片としてスライドに貼り, グリセリンにて封入する.

2. Potassium tellurite を 0.1% に含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) を用い, 前者同様に処理する.

3. Cytochrome oxidase. labile nadi reaction. Gomori (1952) の記載せる方法に依る.

1 ml 1% α -naphthol の alcohol (40%) 溶液,

1 ml 1% aqueous dimethylparaphenylene diamine,

25 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2).

37°C において 30 分 incubate した後軽く水洗し, 直ちにグリセリンで封入する.

4. Stable nadi reaction (Gomori, 1952).

切片をホルマリンで固定後, アルカリ域にて nadi 試薬を作用させる.

5. Inhibitor に依る対照試験. Lison (1953) の記載せる Moog の方法による.

Natrium azide を 0.05 M の割合に含む pH 6.0 以下の酸性生理的食塩水中に切片を浸し, 3 分間処理の後 0.05 M の natrium azide を加えた nadi 試薬で同様反応させる.

6. 固定材料による染色.

肝臓は旺盛且複雑な物質代謝の場であり, ここに含有される glycogen, lipids 等は種々の条件下に絶えず変動する. これらの成績が各種酵素分布とどの様な関聯

表 1.

		例数	平均体重 (g)	平均 肝重 (g)
胎生	20日	2	—	—
	22日	7	—	—
生後	生直後	11	5.1	0.2
	1日	8	4.6	0.2
	3日	6	6.0	0.2
	5日	5	6.1	0.2
	7日	5	6.8	0.2
	10日	6	9.0	0.3
	14日	6	14.1	0.4
	21日	5	17.4	0.7
	1ヶ月	5	34.0	1.4
	2ヶ月	4	67.7	3.1
	3ヶ月	4	109.0	5.1
	4ヶ月	1	125.0	6.4

を有するかについて見るため以下述べる方法を併用した。

1. 多糖類.

Rossmann 氏液固定, lead-tetraacetate-Schiff 法 (清水と熊本 1952).

2. 脂肪.

10% 中性 formalin, Baker's formalincalcium, Danielli's acetic acid-formalin 固定, 又は未固定のまま.

Sudan IV, sudan black B, nileblue sulfate 染色並びに Baker's acidhematin test, Schultz 法及びその変法による cholesterol test, Lison (1953) の記載せる Feulgen と Voit 法を用いた plasmal 反応, Danielli (1953) による pseudoplasmal 反応.

3. mitochondria.

Kolster 氏液固定, Altmann 染色及び Heidenhein 染色.

III. 所 見.

A. コハク酸脱水素酵素.

本酵素の肝臓に於ける活性は、非常に活潑なものである。反応部は形成された mono- 或いは di-formazan を以てその活性を表わしている。即ち酵素活性の強い部分 (小葉周辺部) は暗紫色の顆粒として表われ、その分布が密であり、比較的弱い部分 (小葉中心部) は、びまん性に赤色を呈し diformazan の顆粒は少い。

a) 胎生末期 (胎生 20—22 日).

小葉全域に粗大な diformazan 顆粒が少数散在性に認められるのみで、その酵素活性は全く弱いものと思われる。この時期においてはすべての例に小脂肪粒が広く散在性に見られるが (脂肪染色)、これと一致して赤く染った小粒が広く分布する。

b) 生直後.

生後 10 分以内の未だ授乳していない 3 例では、小葉全域に亘って活性が増強し、大きな紫色の顆粒が増数し、部位によっては集合して見られる。そして顆粒の大きさも中心部のものに比して周辺部では幾分大きい (図 1)。生後 6 時間では脂肪粒が淡紅色を呈して多く認められる例もあるが、略々生後 10 分以内のものと同様の反応を呈する。この時期では脱水素酵素標本によっては未だ個々の肝細胞は不明瞭であり、唯核のみ白く抜けて認められる。

c) 生後 1 日.

一般にこの時期には全例共著明な脂肪浸潤が認められ、大小種々の脂肪粒が淡紅色乃至赤色に染って小葉全域に無数に認められる。Diformazan 顆粒は極めて減少し、その大きさも小さい。

d) 生後 3 日.

この時期も尚強い脂肪浸潤が認められ、前者同様紫色顆粒は小葉全域に極めて少い (図 2)。しかし脂肪を認めないか又は少い例では明らかに活性の増強が見ら

れ、殊に小葉全域に均等に増加の傾向が認められる。

e) 生後 5—7日.

生後 5 日より 10 日までは殆んど例に脂肪を認めず、濃紫色大顆粒が密に小葉全域を充埋し、極めて活潑な酵素活性を証明する。小葉では中心静脈に接する部まで多量の紫色顆粒が認められ、周辺部では更に多く集合する(図 3)。個々の肝細胞は diformazan 顆粒によりやや不明瞭で、核も正常所見の如く判然としない(図 9)。

f) 生後 10—14日.

この時期になると diformazan 顆粒は少々縮小し、而も肝細胞原形質内に幾分局限して見られる様になる。肝細胞の核は反応せず白く抜けて見え、原形質は紫色顆粒で充満して認められる(図 10)。又小葉に於ては中心部の活性が減弱し、周辺部との差が前者に比して明らかとなる。大体正常所見に似るが尚中心部の反応が強い(図 4)。

g) 生後 21日.

反応は大体 10 日のものと似るが、幾分周辺部に増強、中心部に減弱が認められその差が一段と著明となる。

h) 生後 1 ヶ月以後.

全く正常所見に一致し、小葉周辺部では極めて強い活性が認められ中心部では弱い。肝細胞では核は陰性で原形質内に diformazan 顆粒が中心部のものは少数、周辺部のものは充満して認められる。小葉間間質組織、動静脈壁及び小葉間胆管壁は本反応では殆んど陰性である。又星細胞における反応は切片が厚いため不明瞭ではあるが、全期を通じ少くとも肝細胞より強いとは思われない。尚基質を抜いて行った対照試験では全例共殆んど反応を示さなかった。

B. Endogenous dehydrogenase.

成熟正常マウス、ラッテ及び家兎の肝臓において in vitro に行った成績では、potassium tellurite を用いた場合極めて著明に中心静脈を真中にして放線状に拡がる sinusoid の内皮細胞が、黒褐色の陽性反応を呈した(図 12)。又部位に依っては星細胞が黒褐色の小顆粒で充満されて認められる。しかしグリソン氏鞘内の大血管壁には本反応は極めて軽微で、略々陰性と考えられる。小葉間の間質組織は陰性、組織片の外側及び血管周囲の肝細胞はびまん性に青黒色に着色する。

Neotetrazolium を用いた場合は反応液の浸透が不良で、組織片の比較的表面のみ強い反応を呈する。即ちこの部の肝細胞は紫色の顆粒が原形質内に充満し極めて活潑な反応を呈する。又中心静脈壁及びグリソン氏鞘の動静脈壁並びにこれらに接する数層の肝細胞にも極めて強い反応が見られる。しかし反応液に直接接しない部の肝細胞では、一般にびまん性に赤色を呈し微細な紫色顆粒の少量を有するものが多い。星細胞及び sinusoid の内皮細胞における反応は非常に不明瞭であ

る。

これら両反応において、組織片をあらかじめ 80°C. 20分加熱するか、或いは10%ホルマリンで24時間以上固定せる場合には、すべて陰性の結果を得た。

C. Cytochrome oxidase.

本酵素も肝臓に於ける活性は極めて活潑なものであり、前述せる succinic dehydrogenase の分布に極めて酷似する。

a) 胎生末期.

酵素活性は全く認められない。唯散在性に明るい青色に染った小脂肪粒が小葉全域に認められるのみ。

b) 生直後.

生後 10 分以内の未だ授乳していない例では小葉全域に弱い反応が認められ、indophenol blue 顆粒が全域に播種状に見られるが、グリソン氏鞘に接する部では幾分集合して多い(図 5)。生後 6 時間を経た例では略々前者に類似するが全般に軽度の増強が認められる。しかし脂肪粒の集合して見られる部では indophenol blue 顆粒は極めて少く、組織は明るく見える。

c) 生後 1 日.

前述せる如くこの時期には極めて著明な脂肪浸潤が見られ、青紫色に染った脂肪粒が小葉全域に多量に認められるが、indophenol blue の微細顆粒は極めて少く、組織は非常に明るく見える(図 6)。しかし乍ら脂肪粒の少い部位においては組織はびまん性に淡青色を呈し、indophenol blue 顆粒の形成も幾分盛んである。

d) 生後 3 日.

前者同様脂肪浸潤が著明で indophenol blue 顆粒の形成は悪い。しかし脂肪粒の少い小葉中心部では明らかに活性の増強が認められる。

e) 生後 5 日.

この時期には脂肪は全く影をひそめ、極めて著明な酵素活性の増強が認められる。即ち肝小葉は強く着色し、indophenol blue 顆粒は小葉中心部においても多量に形成され、周辺部では尚一層著明である。

f) 生後 7 日.

この頃が全期を通じて最も強い反応を呈し、周辺部は勿論、中心部においても最も活潑な活性を示す。従って小葉内に於て略々均等な強い反応が見られる(図 7)。

g) 生後 10 日.

反応は前者に比し僅かに減弱し、小葉では中心部と周辺部の差も余り著明でない。しかしこの時期以後では indophenol blue 顆粒は肝細胞原形質内に主として見られる様になり、核は反応陰性なるため白く抜けて見える(図 11)。

h) 生後 14—21 日.

反応は次第に周辺部に強く, 中心部は減弱して行きその差が明瞭となる(図8). 脂肪出現部では同様 indophenol blue 顆粒は少い. 大約この頃より成熟所見に一致する様になる.

i) 生後1ヶ月以後,

全く正常成熟所見と一致し, 肝小葉全域に反応が認められ, 殊に周辺部細胞では中心部のものに比して原形質中に indophenol blue 顆粒が多く, 核は常に陰性である. 小葉間間質組織, 動静脈壁及び胆管壁の反応は全く見られない. 又星細胞の反応は切片が厚いため不明瞭であるが, 少くとも肝細胞よりは強くない. 又脂肪出現部ではやはり反応が弱く表われる.

j) 対照として行ったホルマリソ及び natrium azide 処理の例では, 脂肪粒のみ青色に染り indophenol blue 顆粒の形成は殆んど完全に阻止された.

IV. 考 察

生体内に於ける有機酸の酸化機構に関しては, Wieland の脱水素理論と, Thunberg に依る脱水素酵素の発見, 次いで Warburg, Keilin, Melnick 等の研究によって次第にその全貌が明らかとなり, 現在 Succinic dehydrogenase と cytochrome oxidase の関係が次の如きシエーマで表わされている (Baldwin 1952).

先に Potter, Schneider と Liebl (1945) はラッテを用い胎生末期より生後30日までの之等両酵素を生化学的に検索し, 肝臓ではこの両酵素の消長は全く一致し, 10日乃至15日を最高として, 以後僅かに減弱しつつ正常値に一致すると述べている. 一方組織化学の面よりは, 1950年 Seligman, Gofstein と Rutenburg に依り tetrazolium 塩がコハク酸脱水素酵素の新しい組織化学的方法として満足すべき指標である事が見出され, 以来各動物, 各臓器における分布, 各種 tetrazolium 塩の比較或いは実験条件下における成績が緒言において述べた如く種々報告されている.

肝臓に於ける本酵素の活性は極めて活潑なものであり, その正常所見は Seligman (1951), Padykula (1952) 及び Rutenburg, Wolman と Seligman (1953) により記載された所見と殆んど一致するものと思われる. 即ち彼等は肝細胞原形質に限局して反応顆粒が認められ核は反応しない, 又小葉では周辺部に暗紫色の diformazan 顆粒が多く, 中心部はびまん性に赤色を呈し diformazan 顆粒は少い. 間質組織, 動静脈壁及び胆管壁は反応を示さない. 且肝細胞原形質内の脂肪粒は赤染すると述べている. 拙著者の成績を要約すると, 胎生末期では本酵素の活性

は極めて弱いものであるが生直後より急激に増強し、先ず周辺部に著明となる。生後1—3日は広汎な脂肪浸潤が起り反応は一見減弱したかに見えるが、5日に至ると明瞭に小葉全域に互る著明な活性の増強が認められ、7日で最高となる。この時期には肝小葉は周辺部は勿論中心部に至るまで極めて強い活性を示し遙かに正常を凌駕するが、10日以後次第に中心部が減弱を示し、周辺部との差が明瞭となり、成熟像に一致する様になる。

しかしこれらの方法はすべて基質たる sodium succinate と indicator となる tetrazolium 塩とを組織切片に作用せしめ、その内に含有せられるコハク酸脱水素酵素の所在を明らかにしたものであるが、組織はこの外種々の自家基質を有しており基質を加えることなくとも indicator と作用して発色する。之が endogenous の脱水素酵素である。先に tetrazolium 塩を用いて本反応の基礎を築いた Rutenburg, Gofstein 及び Seligman (1950) は ditetrazolium 塩 (B. T.) を用いてラッテ及びマウスの各臓器における endogenous dehydrogenase を in vivo 及び in vitro において組織化学的及び生化学的に検索し、Shelton と Schneider (1952) はマウス腎臓について4種の tetrazolium 塩を用い、幾通りもの endogenous dehydrogenase に関する実験を行った。Wachstein (1949) は主として potassium tellurite を用い、之に neotetrazolium を併用して in vivo 及び in vitro における家兎とラッテ腎臓の本酵素を検出している。一方 Bajusz (1956) は 2-3-5-triphenyl tetrazolium chloride (T. T. C.) を用いて人各種臓器の毛細血管壁に本反応を証明し、Fried と Zweifach (1955) 及び Zweifach (1955) も in vitro において neotetrazolium chloride (N. T.) に依る腸間膜の血管壁における endogenous dehydrogenase を組織化学的に検索した。最近 Ellis (1957) は N. T. を用いて supravital perfusion に依る endogenous dehydrogenase system の観察を行い、又 Wolf 等 (1956) は N. T. を猿の皮下に連続注射し、脊髄神経節細胞の satellite cells に強い反応が認められたと報告している。更に Barnett (1957) はこれら DPN 及び TPN を補酵素とする処の endogenous dehydrogenase system は13%蔗糖液に数時間浸置するか、又は凍結の後融解させる事によって全く不活性化されると述べている。著者の行った実験では、ラッテ肝臓の自家基質による endogenous dehydrogenase の活性は可成り活潑なもので、先人の成績に略々一致して中心静脈壁及び sinusoid の内皮細胞や Kupffer の星細胞に強く、又肝細胞原形質にも可成りの反応が認められる。然し乍らこの成績は slice を用いて行ったもので、Shelton と Schneider (1952) がすでに指摘している通り新鮮凍結切片を用いた場合全く反応を呈さない。それ故著者の用いたコハク酸脱水素酵素反応には殆んど影響を及ぼさないものと考えるが、この様に可成り活潑な endogenous dehydrogenase の存在は更に脱水素酵素系を基質、補酵素の面より組織化学的に深く分析追及するの要を痛感せしめられる。

一方 cytochrome oxidase に関しては、古くより G-nadi 反応として知られたものが本酵素の証明法に他ならぬことが明らかにされた (Lison 1953 参照)。Moog

(1943) は始め新鮮鶏胎の伸展標本について本反応を行ったが, Pearse (1953) は新鮮凍結切片にも応用出来ると述べている. 著者は Adamstone 及び Taylor の変法 (Shimizu, Kubo と Morikawa 1956) を用いて切片を作製し, Gomori (1952) の記載せる labile nadi 反応を行い, 又別にホルマリン及び natrium azide で前処理せる切片を対照とした. その結果所見において述べた如くその消長及び組織内分布は全く前述せるコハク酸脱水素酵素に一致するものと思われ, 先の Potter, Schneider と Liebl (1945) の生化学的成績に平行する様である. Flexner, Belknap と Flexner (1953) のモルモット胎児による之等両酵素の生化学的定量成績では, コハク酸脱水素酵素の活性は胎生60日頃までは殆んど変動せず, これより出生に至る時期に急激に増強している. しかし cytochrome oxidase はこれと多少異り胎生30日頃より次第に増強して行き, 胎生末期には約2倍となると記載している. 然し乍らモルモットは殊に胎生期間が長く充分に発育してから出産されるので, ラッテとは比較出来ないが, 之等両酵素が胎生末期より出生にかけて著明に増強する事は疑う余地もない.

さて著者の生後の成績ではラッテ肝臓の好氣的エネルギー代謝は恐らく生後10日までに略々成熟のレベルに達し, 主として小葉周辺部の肝細胞により強く営まれ, ここに肝機能の一端が完成されるものと推察される. 一方中心部細胞では, 生後5—7日が最も強い反応を呈するが, 以後次第に減弱して成熟に至る. Rossi 一派の人胎児の組織化学的研究 (1957) によると, コハク酸脱水素酵素の増強は胎生末期に発現し, 夫々の器官の機能完成に関係ありとし, 又 Flexner (1955) も呼吸酵素の急激な増加は必要なエネルギーの能率的取得を可能とし, 夫々の細胞の機能的完成の本質をなすと云っている. 上記の如く生後10日を肝機能の一応の完成期と見る著者の見解は合理的であろう. 又肝臓には数多くの星細胞が存在するが, 切片が幾分厚い為極めて不明瞭であり, その反応は明らかではないが, しかし実験の全期を通じて少くとも肝細胞より強いとは思えない. 星細胞における各種酵素の検索がその機能を解く重要な鍵となり得るものと信ずるが, 今後切片作製法の改良や新しい染色方法の創案に期待したい.

Schneider, Hogeboom 等により之等両酵素は細胞内では主として mitochondria に含有されている事が化学的に明らかとなり, mitochondria の占める酵素学的役割について現在華々しい研究が続けられているが, 組織化学の面からも Goddard と Seligman (1952) はコハク酸脱水素酵素の甲状腺細胞における分布を B. T. を用いて検出し, その像はあたかも mitochondria の形態に一致するが如き所見を報告しており, 又 Malaty と Bourne (1953) も diformazan 顆粒の形及び分布が mitochondria に一致する様に思われると述べ, 更に Shelton と Schneider (1952) も NT, TV, 及び BT を用いて mitochondria を染色したと述べている. 著者も cytochrome oxidase の活性に依り生じた indophenol blue の顆粒が原形質内に見られたが, その像は sudan black B 染色或いは Heidenhein 氏鉄ヘマトキシリン染色標本のもの

のと極めて良く似る様に思われる。因に sudan black B は mitochondria のもつ phospholipin を特異的に強く染める事が知られている (Baker, 1946).

一方固定材料に於ける mitochondria の形態学的所見では、胎生末期は桿状のものが殆んどを占め、繊細で数も少いが、生直後より著明に増数し、3日までは太い短桿状を主として之に顆粒状を混じる。5日では大顆粒がその殆んどを占め、細胞原形質に均等に分布する。1週では尚顆粒状を主とし、この頃までは中心部周辺部細胞の差は少いが、10日頃より稍々成熟像に一致して周辺部細胞では短桿、連珠及び顆粒状が多く、中心部細胞では細い桿状乃至糸状がその大部分を占めるようになる。この様に著明な顆粒化の見られる生後5—7日頃には、これら両酵素の活性は急激に高まっており、mitochondria の形態変化と酸化還元酵素系の消長とは深いつながりを有するものと思われるが、mitochondria には尚幾多の酵素や補酵素などが含まれており、直接これらを結びつけて考える事は危険である。現在のところ mitochondria の形態変化と細胞機能との関連については諸説乱立し一致を見ないが、Golgi 装置と共に今後に残された興味ある問題であろう。

最後に本篇に述べた2つの酵素反応と脂肪との関係について述べると、生後発育の各時期において授乳や食餌又はその他の条件によってしばしば肝臓に脂肪の出現を見る。その形は小葉全域に亙る強度の脂肪浸潤から、中心部或いは周辺部に限局せるものや又は小葉全域に散在性に見られるものまで多種多様にわたり、脂肪粒の形状及び大きさにも夫々特徴がある。これらの脂肪の組成を組織化学的に追及した処、一般に sudan black B に良く染って青黒色を呈し、scalet red に赤染し、nile blue sulfate で淡紅色に metachromasie を呈するものが多く、一部濃青色に染るものも含まれる。Schultz 或いは Romieu の cholesterol test では陰性であるが、生後初期の例にコレステリン脂肪の反応が若干陽性を示した。その他一般に重屈折を認めず、plasmal 反応及び pseudo plasmal 反応はすべての例に陰性で、Baker の acid hematin test によりその脂肪の一部は殆んどの例に陽性を示すが、その程度は軽く、そして pyridin 抽出試験によりすべて消失した。その他固定材料による Ciaccio 法では不規則に陽性のものが見られた。以上を総合すると、これらの脂肪は一般に中性脂肪がその主体をなし、一部 phospholipin を含んでいるものと思われ、又生後初期のものでは僅かのコレステリン脂肪が含まれているものと考えられる。扱コハク酸脱水素酵素に依り、neotetrazolium を還元して形成された formazan は Seligman と Rutenburg (1951), Padykula (1952), Rutenburg, Wolman と Seligman (1953) 及び Rosa と Velardo (1954) 等がすでに指摘せる如く脂溶性であり、脂肪粒又は脂肪含有組織に溶け入って、之を赤く染める。Rosa と Velardo (1954) はこれらの脂肪は本酵素活性に関して何の価値もないものと述べている。著者の行った実験では生後1—3日の著明な脂肪浸潤の見られる時期には、肝小葉は全く淡紅色の大小脂肪粒で充満され、diformazan の顆粒は非常に少い。この脂肪は Rosa 等の云う様に本反応を助長することはないが、逆

に形成された diformazan 顆粒を溶解し、為に一見反応が減弱したかに見え、実際本酵素活性が低下しているのか或いは活性は正常であるが形成された diformazan が溶け去ったものか判断に苦しむ処である。試みに Seligman と Rutenburg (1951) に従ってホルマリン固定後の切片について本反応を行った処、formazan の形成は完全に抑制され、従って脂肪粒の着色も見られなかった。因に彼等はホルマリン固定により、その活性は 100% 阻害されると記載している。生化学的方法では形成された formazan を抽出して定量するのであるから、例えば脂肪に溶解していてもその値は変わらないが、組織化学的に diformazan 顆粒の多少によりその活性を判別する場合、脂肪粒が多い時にはその成績に大きく影響するものと考える。

又一方 nadi 反応は古くより脂肪を染める事が知られているが、その機構については現在尚明らかでない。即ち Dietrich 一派は nadi 試薬が空気中の酸素の働きで容易に酸化され、反応液中に形成された indophenol blue が二次的に脂肪を染めると主張した。そしてその機構は恐らく sudan III や, scalet red が脂肪を染めるのと同様であろうと考えた (Pighini 1912, Lison 1953)。しかし 1936 年 Lison は或る種の脂肪自身がこの反応を触媒し得る事を発表し、この脂肪即ち脂肪性過酸化物は、不飽和脂肪が二重結合の部で酸化された結果生ずると述べている。Bayley (1945) に依ればその反応は次の如く表わされる。

その後 Glanvind, Granades, Hartmann と Dam (1949) もヘミン及びロイコ 2・6 シクロロフェノールインドフェノールを用い過酸化脂肪の証明を行っている。又 Gomori (1952) は stable nadi 反応陽性物質を脂肪性過酸化物と見做し、Pearse (1953) も Glanvind 等の方法で染色される脂肪と同種類の過酸化脂肪であろうとの見解をとっているが、最近でも Brenner (1947) 等は依然 Dietrich の二次的染色説を保持している。今著者の成績を検討すると sudan black B による脂肪染色標本に全く一致して、nadi 反応による脂肪青染が認められ、この部の組織細胞は indophenol blue 顆粒に乏しく、一见その活性が減弱したかに見える。脂肪は明るい青色を呈しその形、大きさ、分布共に sudan 標本に一致し全期を通じてその染色性に著変を認めない。勿論著者は上記の混乱を避ける為、試薬は毎回新調し pH や、時間を厳守した事は云うまでもない。

次にホルマリン固定後同反応を行ったものや、アルカリ域において stable nadi 反応を行ったものでは、組織の indophenol blue 顆粒の形成は全く認められず、更に natrium azide により本反応は全く抑制された。にもかかわらずこれらの対照試験においてすべて脂肪粒のみ染った。この点が前述のコハク酸脱水素酵素に依る diformazan の形成がホルマリン固定に依り抑制された時に脂肪の赤染を認めなかった成績と明らかに異なる処である。この事より今回の脂肪青染は少くとも組織

のもつ酵素活性とは無関係であろうと思われる。然りとすれば Lison 等の提唱する如く、この脂肪が過酸化物の性質を有している為であるだろうか。然し著者の行った組織化学的検索の結果、これらの脂肪粒は略々中性脂肪である事が判明しており、又不飽和脂肪体が過酸化物を経て、アルデヒドを形成する処の過程を証明する pseudo plasmal 反応は、Danielli の方法で全く証明されなかった。その上多くの共軛二重結合を有し酸化力の極めて強い phospholipin も Baker の test で若干証明されたが、その像と nadi 反応に見られる脂肪像との間には可成りのへだたりがある。結局空気中の酸素の触媒により反応液中に形成された indophenol blue が脂肪に溶け込んで之を染めたものと解釈せざるを得ない。

V. 結 語.

胎生末期より成熟期に至る发育の各時期に於て、ラッテ肝臓のコハク酸脱水素酵素と cytochrome oxidase を組織化学的に検索し、併せて脂肪及び mitochondria に関する染色を行い、次の結果を得た。

1. 生後发育に伴うコハク酸脱水素酵素及び cytochrome oxidase の消長は殆んど一致する。即ち両者共、胎生末期では極めてその活性は弱いが、生直後より小葉全域に活性の増強が見られ、生後5日乃至7日で最も強い活性が略々小葉全域に均等に認められる。その後中心部細胞の活性が次第に減弱して行き、周辺部との差が明瞭となり、生後10日乃至14日頃より正常成熟所見に一致する様になる。但し生後1日及び3日に強い脂肪浸潤が認められ、これらの時期では両反応共極めて弱く表われる。

2. 肝細胞においては出生初期のものでは酵素活性により生じた diformazan 並びに indophenol blue 顆粒が稍々粗大で、密に見られるため個々の細胞及び核が幾分不明瞭であるのに反し、生後10日以後のものでは主として原形質内に限局して認められ、僅かに細小となる。又核は常に反応陰性なる為白く抜けて見える。小葉間間質組織、動静脈壁及び胆管壁の反応は両者共全期間中殆んど認められなかった。更に星細胞における反応は両者共不明瞭ではあるが、全期を通じ少くとも肝細胞より強いとは思われない。

3. 固定材料による mitochondria の形態学的検索において、これら両酵素の活性が最も強い時期に一致して小葉全域の肝細胞に著明な mitochondria の顆粒化が認められた。

4. 生後发育の各時期において脂肪が証明されたが、この脂肪出現部は他の部に比し両反応とも弱く表われ、一見その部の酵素活性は減弱したかに見える。脂肪粒は夫々着色して認められるが、この脂肪は全期を通じおおむね中性脂肪と考えられ、結局酵素活性により生じた反応顆粒が、共に脂肪溶性であることに起因するものと思われる。

擧筆するに臨み、終始御懇切なる御指導御校閲を賜った恩師清水信夫教授に厚く感謝の意を捧げます。

Author's Abstract.

The author has studied histochemically the alteration of succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase and lipids in the liver of rats from late fetal life to adult and has added the morphological researches of mitochondria. The results were as followed.

1. Succinic dehydrogenase of late fetal or newborn rats was generally slight in activity. The activity in the hepatic cells increased rapidly in the whole hepatic lobules and attained the maximal intensity at 7 days after birth. The activity around the central vein showed a subsequent gradual decrease to reach normal reaction at 14 days of age. Negative reactions were observed in the wall of blood vessels, bile ducts and connective tissues throughout the development.

2. The activity of cytochrome oxidase exhibited the similar change to that of succinic dehydrogenase.

3. Lipids were examined histochemically by several tests, and were confirmed to be mainly composed of neutral fat.

4. Mitochondria exhibited a distinctive granular shape in the time, when the activities of both succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase revealed the maximal activity.

文 献.

- Adamstone, F. B.** and **A. B. Taylor**: The rapid preparation of fresh frozen tissue sections. *Stain Technol.* 23 (1948). P. 109—116. — **Bajusz, E.**: Über die Dehydrogenase-Aktivität der menschlichen Kapillaren. *Z. Vit. Hor. Fer.* 8 (1956). S. 81—85. — **Baker, J. R.**: *Quart. J. microsc. Sci.* 87 (1946). P. 441. (Cited from Lison, L.: *Histochemie et Cytochemie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 1953.) — **Barnett, R. J.**: Histochemical demonstration of dehydrogenase system requiring pyridine nucleotide co-enzymes, with the electron microscope. A. A. A. Seventieth Annual Meeting. Baltimore, 1957. — **Bayley, A. E.**: Industrial oil and fat products. Interscience Publishers, New York, 1945. (Cited from Lison, L.: *Histochemie et Cytochemie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 1953.) — **Baldwin, E.**: Dynamic aspects of biochemistry. Cambridge Univ. Press. (日本語版) 岩波書店, 1955. P. 399. — **Bourne, G.**: Mitochondria and Golgi apparatus. in 'Cytology and Cell Physiology'. Oxford Univ. Press, London, 1951. — **Brachet, J.**: Chemical embryology. Interscience Publishers, New York, 1950. — **Brenner, S.**: *Afric. J. Sc.* 43 (1947). P. 320. (Cited from Lison, L.: *Histochemie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 1953.) — **Cooper, W. C.**: Succinic dehydrogenase activity in the prenatal and postnatal rat heart. *Anat. Rec.* 123 (1955). P. 102—123. — **Danielli, J. F.**: *Cytochemistry*. 'The critical study of the cytochemistry of aldehydes'. John Wiley & Sons, Inc., 1953. — **Ellis, R. A.**: Histochemical demonstration of endogenous dehydrogenase systems by supravital perfusion. *Stain Technol.* 32 (1957). P. 191—194. — **Flexner, L. B.**: Events associated with the development of nerve and hepatic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 60 (1955). P. 986—1002. — Enzymatic and functional patterns of the developing mammalian brain. *Biochemistry of the developing nervous system* (ed. by H. Waelsch). Academic Press, New York, 1955. — **Flexner, L. B., E. L. Belknap** and **J. B. Flexner**: Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. XVI. Cytochrome oxidase, succinic dehydrogenase and succinoxidase in the developing cerebral cortex and liver of the fetal guinea pig. *J. Cell. comp. Physiol.*

- 42 (1953). P. 151—161. — **Foraker, A. G.** and **S. W. Denham**: Neotetrazolium in determination of succinic dehydrogenase activity in the ovary. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 80 (1952). P. 132—134. — **Foraker, A. G., S. W. Denham** and **D. D. Mitchell**: Formation of a labile pigment in rabbit ova during histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science* 117 (1953). P. 449—451. — **Foraker, A. G., P. A. Celi** and **S. W. Denham**: Dehydrogenase activity in normal, hyperplastic endometrium. *Cancer* 7 (1954). P. 100—105. — **Fried, G. H.** and **B. W. Zweifach**: Neotetrazolium studies of blood vessels. *Anat. Rec.* 121 (1955). P. 97—107. — **Giercke, E. V.**: Die Oxydierenden Zellfermente. *Münch. Med. Wschr.* 58 (1911). S. 2315—2318. — **Glavind, I., H. Granados, S. Hartmann** and **J. Dam**: *Experimentia* 5 (1949). P. 84. (Cited from Lison, L.: *Histochemie et cytochemie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 1953.) — **Goddard, J. W.** and **A. M. Seligman**: Intracellular topography of succinic dehydrogenase in the thyroid of the albino rat. *Anat. Rec.* 112 (1952). P. 543—560. — **Gomori, G.**: *Microscopic histochemistry*. Univ. Chicago Press, 1952. — **Hack, M. H.**: A new histochemical technique for lipides applied to plasmal. *Anat. Rec.* 112 (1952). P. 275—302. — **葉室頼昭**: 脳損傷回復に於ける glycogen 並びに各種酵素の組織化学的研究. I—II. 日組録, 3 (1957). 頁 58—100. — **Hogeboom, G. H., A. Claude** and **R. D. Hotchkiss**: The distribution of cytochrome oxidase and succinoxidase in the cytoplasm of mammalian liver cell. *J. biol. Chem.* 165 (1946). P. 615. — **Hogeboom, G. H.** and **W. C. Schneider**: Physical state of certain respiratory enzymes in mitochondria. *J. biol. Chem.* 194 (1952). P. 513. — **Hogeboom, G. H., W. C. Schneider** and **M. J. Striebig**: Localization and integration of cellular function. *Cancer Res.* 13 (1953). P. 617—632. — **Keilin, D.**: Cytochrome and intracellular respiratory enzymes. *Erg. Enzymforsch.* 2 (1933). P. 239—271. — **Lison, L.**: *Histochemie et Cytochemie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 1953. — **Malaty, H. A.** and **G. H. Bourne**: Histochemistry of succinic dehydrogenase. *Nature* 171 (1953). P. 295—297. — **Meath, J. A.** and **A. Pope**: Histochemical distribution of indophenol oxidase and acid phosphatase in rat cortex. *Fed. Proc.* 9 (1950). P. 204. — **Mellors, R. C.**: *Analytical cytology*. McGraw-Hill Book Co. Inc., 1955. — **Moog, F.**: Cytochrome oxidase in early chick embryos. *J. Cell. comp. Physiol.* 22 (1943). P. 223. — **Needham, J.**: *Biochemistry and Morphogenesis*. Cambridge Univ. Press, 1950. — **岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英**: 顕微鏡の組織化学. 医学書院, 昭30. — **Padykula, H. A.**: The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections. *Amer. J. Anat.* 19 (1952). P. 107—132. — **Palade, G. E.**: An electron microscopic study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1 (1953). P. 188—211. — **Pearse, A. G. E.**: *Histochemistry*. J. & A. Churchill Ltd., 1954. — **Pighini, G.**: Über die Indophenoloxydase im Zentralnervensystem, in der Tela Chorides und in der Cerebrospinaler Flüssigkeit. *Biochem. Z.* 42 (1912). S. 124—136. — **Potter, V. R., W. C. Schneider** and **G. J. Liebl**: Enzyme changes during growth and differentiation in the tissue of the newborn rat. *Cancer Res.* 5 (1945). P. 21—24. — **Roizin, L.**: Oxidases and peroxidases of the central nervous system. *J. Neuropathol. exper. Neurol.* 14 (1955). P. 47. — **Rosa, C. G.** and **J. T. Velardo**: Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase activity in tissue sections by a modified technique. *J. Histochem. Cytochem.* 2 (1954). P. 110—114. — **Rossi, F.**: Histochemie enzymatique pendant l'organogénèse et la différenciation embryonnaire de l'homme. *C. r. Ass. Anat.* 12 (1954). — **Rossi, F., G. Pescetto** and **E. Reale**: Enzymatic activity in human ontogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 5 (1957). P. 221—235. — **Rutenburg, A. M., R. Gofstein** and **A. M. Seligman**: Preparation of a new tetrazolium salt which yields a blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 10 (1950). P. 113—121. — **Rutenburg, A. M., M. Wolman** and **A. M. Seligman**: Comparative distribution of succinic dehydrogenase in six mammals and modification in the histochemical technic. *J. Histochem. Cytochem.* 1 (1953). P. 66—81. — **Shimizu, N., Z. Kubo** and **N. Morikawa**: Some improvement in

the preparation of fresh frozen sections. *Stain Technol.* 31 (1956). P. 105—109. — **Shimizu, N. and N. Morikawa**: Histochemical studies of succinic dehydrogenase of the brain of mice, rats, guinea pigs and rabbits. *J. Histochem. Cytochem.* 5 (1957). P. 334—345. — **Shimizu, N., N. Morikawa and Y. Ishii**: Histochemical studies of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase of the rabbit brain, with special reference to the results in the paraventricular structures. *J. comp. Neurol.* (in Press.) — 清水, 久保, 森川, 石井, 岡田, 堀之内: ラッテ脳の phosphatases, succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, phosphorylase 及び cholinesterase の生後変化について. 第62回日本解剖学会総会, 1957. — **Schneider, W. C.**: Biochemical constitution of mammalian mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.* 1 (1953). P. 212—233. — Intracellular distribution of enzymes. II. The distribution of succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, adenosine triphosphatase and phosphorus compounds in normal rat liver and in rat hepatomas. *Cancer Res.* 6 (1946). P. 685—690. — **Schneider, W. C. and V. R. Potter**: The assay of animal tissues for respiratory enzymes. II. Succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. *J. biol. Chem.* 149 (1943). P. 217—227. — 関 正次: 組織検査法と物化学. 杏林書院, 1954. — **Seligman, A. M. and A. M. Rutenburg**: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science* 113 (1951). P. 317—320. — **Semenoff, W. E.**: *Z. Zellforsch.* 22 (1935). P. 305. (Cited from Lison, L.: *Histochemie et Cytochemie animales*. Gauthier-Villars, Paris, 1953.) — **Shelton, E. and W. C. Schneider**: On the usefulness of tetrazolium salts as histochemical indicators of dehydrogenase activity. *Anat. Rec.* 112 (1952). P. 61—82. — **Wachstein, M.**: Reduction of potassium tellurite by living tissues. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 76 (1949). P. 175—178. — **Wachstein, M. and E. Meisel**: Influence of experimental renal damage on histochemically demonstrable succinic dehydrogenase activity in the rat. *Amer. J. Pathol.* 30 (1954). P. 147—165. — **Wolf, A. W., D. Cowen and W. Antopol**: Reduction of neotetrazolium in the satellite cells of the cerebrospinal and sympathetic ganglia. *J. Neuropath. exper. Neurol.* 15 (1956). P. 384—399. — **Wolman, M. and J. Greco**: The effect of formaldehyde on tissue lipids and histochemical reaction for carbonyl groups. *Stain Technol.* 27 (1952). P. 317—324. — **Zweifach, B. W.**: Structural makeup of capillary wall. *Ann. New York Acad. Sc.* 61 (1955). P. 670—677.

附 図 説 明

Adamstone-Taylor 変法によりラットの肝臓より新鮮凍結切片を作製し、夫々の incubating-mixture に入れて染色する。尚核は染めていない。

Explanation of Plate-figures.

Fresh frozen sections were prepared from the liver of rats by the modified ADAMS-TONE-TAYLOR method and incubated in the respective incubating mixture. No counter-stain was used.

コハク酸脱水素酵素反応、Rosa-Velardo 法。

図 1. 出生直後、一般に軽微であるが、小葉周辺部に中等度の反応が見られる。×100.

図 2. 生後 3 日、著明な脂肪浸潤と、少量の diformazan 顆粒が小葉全域に認められる。×100.

図 3. 生後 7 日、極めて強い活性が小葉全域の肝細胞に認められ、周辺部では更に著明である。×100.

図 4. 生後 14 日、小葉中心部では中等度の活性が見られるが、周辺部に限局して極めて強い活性が認められる。×100.

Succinic dehydrogenase reaction. ROSA-VELARDO's method.

Fig. 1. Newborn. The enzyme action is generally slight in intensity, but the peripheral parts of the lobules present a moderate activity. ×100.

Fig. 2. 3 days after birth. Evident fat infiltration and small amounts of granules of diformazan are exhibited in the whole lobules. ×100.

Fig. 3. 7 days of age. Maximal activity is seen in the whole lobules and especially in the peripheral region. ×100.

Fig. 4. 14 days of age. A moderate reaction is exhibited in the central part of lobules, while a markedly intense activity is localized in the peripheral region. ×100.

玉田 善久 (1)

Cytochrome oxidase 反応 (Nadi 反応).

図 5. 生直後, 反応は小葉全域に極めて軽微である. $\times 100$.

図 6. 生後 1 日, 小葉全域に亘って高度の脂肪浸潤が認められる. 肝細胞では固有の indo-phenol blue 反応は強く抑制されている. $\times 100$.

図 7. 生後 7 日, 極めて強い活性が小葉全域に認められる. $\times 100$.

図 8. 生後 21 日, 小葉中心部に弱い反応及び周辺部に極めて強い活性が示されている. $\times 100$.

Cytochrome oxidase reaction (NADI-reaction).

Fig. 5. Newborn. A very weak activity is observed in the whole lobules. $\times 100$.

Fig. 6. 1 day after birth. Evident fat infiltration is shown in the whole lobules, and the true indophenol blue reaction is markedly inhibited. $\times 100$.

Fig. 7. 7 days of age. Maximal reaction is demonstrated in the whole lobules. $\times 100$.

Fig. 8. 21 days of age. Observe a slight activity in the central part of lobules and very strong staining in the peripheral region. $\times 100$.

玉田善久(2)

図 9. 生後 1 週に於けるコハク酸脱水素酵素反応. 稍大きな diformazan 顆粒が密に認められ, 肝細胞の核も不明瞭である. $\times 500$.

図 10. 生後 2 週に於けるコハク酸脱水素酵素反応. diformazan 顆粒は主として肝細胞原形質の中に認められる. $\times 500$.

図 11. 生後 3 週における cytochrome oxidase 反応. indophenol blue 顆粒は主として肝細胞原形質に見られ, 核には存在しない. $\times 600$.

図 12. 正常マウス肝臓に於ける endogenous dehydrogenase 反応. Potassium-tellurite 法. 中心静脈及び sinusoid の内皮に陽性を示す. $\times 55$.

Fig. 9. Succinic dehydrogenase reaction at age of 1 week. Numerous diformazan granules of moderate size are observed abundantly in the lobules. Nuclei of the hepatic cells are not observed distinctly. $\times 500$.

Fig. 10. Succinic dehydrogenase reaction at age of 3 weeks. The granules are chiefly presented in the cytoplasm of the hepatic cells. $\times 500$.

Fig. 11. Cytochrome oxidase reaction at age of 3 weeks. The granules of indophenol blue are presented in the cytoplasm of the hepatic cells and are absent from the nuclei. $\times 600$.

Fig. 12. Endogenous dehydrogenase reaction in the liver of the adult mouse using potassium tellurite as indicator. Positive reactions are observed in the endothelial walls of the central vein and of the sinusoids. $\times 55$.

玉田善久(3)