リアルタイム画像解析システムによる *in situ* 酵素反応の速度論的解析

徳島大学歯学部口腔解剖学第1講座 中江良子

Department of Anatomy and Physiology, University of Dundee Peter J. Stoward

Many enzymes diffuse out of sections of unfixed tissue when they are incubated in conventional aqueous media. This invalidates their quantitative assay by microdensitometry. The quantitative effectiveness of three methods for overcoming this problem are reviewed. The methods utilise semipermeable membranes, polyvinyl alcohol-containing media, and agarose gel films. Unfortunately, most applications of these techniques reported to date have given data that do not meet criteria of validity. A new approach based on the gel film technique for the kinetic analysis of a soluble enzyme *in situ* by computer-assisted image analysis is described in detail.

kinetics/dehydrogenases/quantitative histochemistry/image analysis/microdensitometry/gel film technique

1. はじめに

組織細胞の形態構造を生体になるべく近い状態に保ち、酵素活性をその局在位置において (*in situ*) 検出するのが酵素組織化学であり、一般化学と同様に定性的酵素組織化学と定量的酵素組織化学に大別される。後者は組織細胞内の最終反応生成物 (FRP) を機器にて測定するため、その組織化学反応は定量化の条件を満足するものでなければならない。顕微吸光測光装置の開発と共に、1970年代より *in situ* での酵素反応測定も盛んに行われるようになった。その過程で開発された組織化学法について定量化の条件を検討してみると、さまざまな問題点に遭遇する。最近、筆者らはリアルタイム画像解析システムを用いて *in situ* 酵素反応解析のための新しい方法を考案し、それらの問題点のいくつかを克服できることを見出した。本稿では、*in situ* 酵素反応測定の歴史と背景、および筆者らの解析方法とその結果について述べたい。

2. 方法の概略

定量的酵素組織化学¹⁾の研究においては固定剤によ

Kinetic analysis of enzymes *in situ* determined with a real-time image analysis system

Yoshiko NAKAE¹ and Peter J. STOWARD²

¹Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Tokushima University and ²Department of Anatomy and Physiology, University of Dundee

る酵素の変性を避けるため、通常新鮮未固定組織の凍結切片²⁾が酵素試料として使用される。凍結切片をガラス面に貼付、風乾後、基質液に浸漬して酵素反応を開始させるという一般法では、浸漬中にかなりの酵素が反応液へと拡散することが知られている。例えば、主に細胞質ゾルに存在する lactate dehydrogenase (LDH) では、5分間浸漬により約60³⁾～80⁴⁾%, ミトコンドリアの膜結合酵素 succinate dehydrogenase (SDH) は5⁴⁾～30⁵⁾%が拡散する。このような拡散は当然、組織細胞における酵素の局在変化やいつわりのFRP定量を来す。この難問を解決するため、1960年代よりいくつかの技法が開発されてきた。それらの中で現在でも活用されている方法は polyvinyl alcohol (PVA) 法⁶⁾、半透膜法⁷⁾⁻⁹⁾、ゲルフィルム法^{3), 10)-12)}である。PVA法は、高濃度のPVAを添加した基質液に組織切片を浸漬し、反応を行わせる方法である。半透膜法は、次に述べるような Meijer の方法⁹⁾が現在用いられている。円筒形の支持体の片方の底を、湿らせた半透膜で覆い、膜の風乾後、アガロースを含む基質液をその中に注ぎ、ゲル化させる。この半透膜の遊離面に組織切片を貼付して酵素反応を開始させる。一定時間反応後、半透膜をゲルから遊離させ、切片付着部分を切り取り、固定し封入する。ゲルフィルム法は、アガロースを含む基質ゲルフィルムを組織切片上に載せて酵素反応を行わせる方法である。

以上の3つの方法で利用される酵素組織化学反応は、

共役反応により沈澱性の可視化 FRP を生成するよう工夫されている。そして、その FRP は顕微吸光測光、すなわち組織標本の微小部分の吸光度測定により定量される。顕微吸光測光装置¹³⁾は原理的には分光光度計と同様であるが、受光部が光電子増倍管であるものと、テレビカメラであるものとに分類される。前者は Vickers M85, Leitz MPV, Zeiss UMSP30 など。後者はいわゆる光学顕微鏡用画像解析装置である。画像解析装置による *in situ* 酵素反応測定は Blanco ら¹⁴⁾, Lawrence ら¹⁵⁾, および筆者ら¹⁶⁾によって報告されている。

3. 定量化の条件と実際上の問題点

In situ 酵素反応の定量化の条件¹⁷⁾は次のようにまとめられる。①特異的 FRP が、組織細胞内の真の局在位置に再現性よく沈着すること。②目標酵素が局在位置から拡散しないこと。拡散するならば、その量が既知であること。③可視化 FRP と、酵素反応本来の反応生成物が化学量論的であること。④FRP が Lambert-Beer の法則を満足すること。すなわち、吸光度 $\bar{A}$ が特異的 FRP 濃度と組織切片の厚さ l に比例すること。⑤ $\bar{A}$ が反応時間 t に比例すること。⑥酵素反応速度 ($\Delta \bar{A}/t$) が l に比例すること。⑦ $\Delta \bar{A}/t$ が基質濃度 s の関数であり、 $s=0$ のとき $\Delta \bar{A}/t=0$ であること。⑧ $\Delta \bar{A}/t \neq 0$ のときは非特異的反応を補正しなければならない。⑨ *in situ* K_m 値と *in vitro* K_m 値のオーダーがほぼ一致すること。⑩阻害剤などの影響が生化学的方法による実験結果と類似すること。⑪反応の特異性があること (FRP の同定, 対照実験, 阻害剤の効果などで確認する)。

これらの定量化の条件が成立しない場合、それは何に起因するのだろうか。顕微測光上の問題点として、FRP の不均等な分布や光散乱などによる測定誤差があげられるが、これらは適正な測定条件下では無視できるほど小さい。したがって、定量的の問題点は顕微測光ではなく組織化学法にあるように思われる。

PVA 法では、PVA の良質グレードを選択すれば FRP の局在性について良好な結果が得られることが示されている¹⁸⁾。組織切片から反応液への可溶性酵素の拡散については完全に防止できるという報告⁶⁾があるが、一方ではこれを否定する報告¹⁹⁾⁻²¹⁾もみられる。FRP 量と反応時間の比例関係は肝臓²²⁾, 気管上皮²²⁾および海馬²³⁾の SDH については成立するが、心筋 SDH²²⁾および肝臓^{22), 24)}, 気管上皮²²⁾, 心筋²²⁾の LDH では成立しない。FRP 量と切片の厚さの比例関係は肝

切片のみにについて示されている²⁵⁾。他のいくつかの酵素についても、FRP 量が時間や切片の厚さに比例しないことが報告されている^{15), 26)-29)}。PVA 法で測定された酵素の *in situ* K_m 値は、PVA 非存在下での溶液中の値と比較すれば一般に 1 オーダー大きい³⁰⁾。しかし、PVA により酵素の *in situ* 反応速度が減少することが知られており^{28), 31), 32)}, K_m 値の比較は PVA 存在下での溶液中の値と比較すべきであろう。

半透膜法で検出した FRP についての局在性の検討は脱水素酵素で行われ、比較的高濃度の基質やテトラゾリウム塩 (最終電子受容体) の存在下で明瞭な局在性が示されている^{7), 33)}。数種の酵素に半透膜法が応用されているが^{7), 34)-38)}, FRP 量とそれぞれ時間および切片の厚さが比例関係を示すのは D-amino acid oxidase³⁸⁾のみである。半透膜の透過性を変えると酵素反応速度 (活性) が変化することが報告されている^{7), 8)}。このことは、基質やその他の反応物の膜透過性が FRP 生成の律速段階に影響することを示唆しているので、半透膜法で得られた速度論的データの解釈は注意を要するであろう。

ゲルフィルム法では、反応中に細胞内酵素が基質ゲルフィルムへ拡散することが示されている^{39, 40)}。また、反応終了後ゲルフィルムを切片より剥がすと可溶性酵素の FRP 量が約 20⁴¹⁾~60⁴²⁾% 減少する。そのため、顕微測光法による FRP の吸光度測定は切片の上にゲルフィルムを載せたまま行われる。この方法で測定された SDH^{5), 10), 11), 16), 32), 42), 43)} および LDH^{10), 11), 40), 42), 44)-46)} の FRP 量と反応時間の関係は SDH の 1 例¹⁰⁾を除いてはすべて比例関係でなく、非直線的であるかあるいは原点を通らない直線で表わされる。つまり、反応開始直後に反応速度の急激な減少が観察される。一方、SDH 反応の初速度は切片の厚さに比例することが示されている^{10), 16)}。初速度から求められた SDH の *in situ* K_m 値は *in vitro* K_m 値と似ている¹⁶⁾。PVA 法や半透膜法とは違って、ゲルフィルム法では反応速度は媒体 (ゲル) の影響をほとんど受けないので^{5), 16), 43)}, この方法は速度論的研究に有用であると思われる。

以上、多くの測定例を紹介したが、この中で FRP 量と、反応時間および切片の厚さとの比例関係が示されているのはごくわずかであることに気付く。筆者らは、酵素反応の初速度が測定されていないことがこれらの原因ではないかと考え、次に述べるような初速度測定のための新しい解析方法を見出した。

4. 新しいアプローチ^{40), 44)~46)}

ゲルフィルム法による *in situ* 酵素反応をリアルタイム ARGUS-100画像解析システム (浜松ホトニクス製) を用いて解析する過程を図1に示す。これから述べる反応はマウス肝切片における LDH 反応であり、基質ゲルフィルムの組成は L-乳酸, NAD^+ , Nitro BT, phenazine methosulphate, NaN_3 , EDTA, Tris-HCl, アガロースである。この反応の FRP はモノおびジホルマザンで 585nm に等吸収点をもつ⁴⁷⁾。584nm の単色光の吸収にもとづく組織画像を図1の方法で取り込ませ、ゲルフィルムをのみの画像をこれより差し引いて (shading correction), 記憶させる。

次に画像中の単一肝細胞細胞質内 FRP の吸光度 (A_{584}) が時間の関数として計算され、その結果を図2に示す。未補正 LDH 反応, 対照反応 ($s=0$)²⁴⁾, および対照反応を補正した LDH 固有の反応, これらすべてに対し共通の現象が認められる。すなわち, 1分以内に反応速度が急激に減少し, その後少なくとも2分間は一定の反応速度が保たれる。この1~3分における A_{584} の時間に対する回帰直線を求め, その勾配を v ($\Delta A/\text{min}$), A 切片を $^{\circ}A$ とおく, 実測初速度 v_i ($\Delta A/\text{min}$) は最も早い時間 0~10秒における吸光度変化とみなされるが, この実測値は誤差が大きい。そのため, 測定しやすい 1~3分のデータから v_i を算出することを考え, 実測値 v_i と $(v_i - v)$ の $^{\circ}A$ 対

図1. ゲルフィルム法を用いた *in situ* 酵素反応の ARGUS-100画像解析システムによる解析。

図2. 小葉間静脈周辺の単一肝細胞細胞質内 FRP の 584nm における吸光度の経時変化⁴⁰⁾. $4 \mu\text{m}$ 切片, pH7.5, 37°C . $\bullet$ = 未補正 LDH 反応 ($s=70\text{mM}$), $\triangle$ = 対照反応 ($s=0\text{M}$), $+$ = LDH 固有の反応. 実線は 1~3 分における吸光度の時間に対する回帰直線. 鎖線の勾配は実測初速度.

するプロットを試みた (図3). 後者のプロットを思いついたのは図2の $A_{584} = vt + ^{\circ}A$ と $A_{584} = v_i t$ が約 0.5分で交差することを経験的に見つけたからである. 図3の両プロットはほぼ原点を通る直線で近似される. マウス肝細胞のみならず7種類の異なったタイプの細胞についても同様の結果が得られた. したがって, 初速度は次の2式で近似される.

$$v_i = a_1 ^{\circ}A \quad (1)$$

$$v_i = v + a_2 ^{\circ}A \quad (2)$$

a_1, a_2 は両プロットの回帰直線の勾配に相当し, 肝細胞では $a_1 = 2.7, a_2 = 2.2$, 他の7種類の細胞については a_1 は 2.2~3.0, a_2 は 1.2~2.2の範囲にある⁴⁵⁾. (1)および(2)式を用いて v と $^{\circ}A$ から算出された初速度の値 v_{i1} および v_{i2} と実測値 v_i の差 (%) をそれぞれ d_1, d_2 とおくと8種類の細胞に対する両値の平均値は $\bar{d}_1 = 16\%$, $\bar{d}_2 = 11\%$ である⁴⁵⁾.

図4aには肝切片の厚さと, v および $^{\circ}A$ との関係を示す. $^{\circ}A$ は切片の厚さに比例するが v は比例しない. この図のような切片の厚さと v の関係は, 既述のごとくしばしば報告されているものである. 一方, 初速度の計算値 v_{i1} および v_{i2} と肝切片の厚さは比例関係を示す (図4b). また, 実測値 v_i は初速度であるから反応時間に比例することは言うまでもなく, v_{i1}, v_{i2} , も v_i と同様とみなされる. 以上の結果より, v ではなく初速度が定量化の2条件を満足することがわかる. 既報の *in situ* 酵素反応のほとんどでは, 1分以

図3. 肝細胞細胞質内未補正LDH反応の実測初速度 v_i (図a)と $v_i - v$ (図b)の A に対する回帰直線. 実線は $v_i = 2.71^\circ A + 0.0230$ (図a)および $v_i - v = 2.16^\circ A + 0.00127$ (図b). 鎖線は95%信頼限界. 各実験点は10個の細胞の平均値. $\times$ = 対照反応, $\circ$ = $4 \mu\text{m}$ 切片 ($s = 0.07 - 70\text{mM}$), $\bullet$ = $7 \mu\text{m}$ 切片 ($s = 0.0175 - 14\text{mM}$), $\bullet$ = $14 \mu\text{m}$ 切片 ($s = 0.0175 - 14\text{mM}$). pH7.5, 37°C .

内の反応が追跡されていないため、初速度が測定されていないという可能性がある。定量化の2条件が成立しないのはこのためかもしれない。

図4. 小葉間静脈周辺の肝細胞細胞質内未補正LDH反応の v_i と A (図a), 初速度の計算値 v_{i1} ($\circ$)および v_{i2} ($\bullet$) (図b)と, microtome setting (=切片の厚さ, と仮定)の関係⁴⁰⁾. $s = 70\text{mM}$, pH7.5, 37°C Vickers M85 scanning microdensitometerにて吸光度測定.

v_{i1} , v_{i2} のL-乳酸濃度依存性をHanesプロットで解析すると、 K_m および V_{max} が求まる。プロットの回帰係数は、 v_{i1} より v_{i2} を用いた場合の方が大きい値を示すことが8種類の細胞において確認され、前述の $d_1 > d_2$ の結果と考え合わせると、(1)よりも(2)式が正確な値を与えることが明らかとなった⁴⁶⁾。表1に筆者らの v_{i2} を用いて算出した K_m 値と、生化学的方法で求められた K_m の報告値を示す。マウス肝細胞LDHの*in situ* K_m 値は、ヒト肝LDHの*in vitro* K_m 値とよく似ているが、マウスおよびウサギ肝LDHの*in vitro*値のそれぞれ2.2~2.5倍、0.6~0.7倍である。

表1. 肝LDHのL-乳酸に対するミカエリス定数⁴⁴⁾

生物種	pH	温度 (°C)	NAD ⁺ (mM)	K _m (mM)	方 法	報 告 者
マウス	7.5	37	1.5	12 ^{a)} , 14 ^{b)}	<i>In situ</i>	Nakae & Stoward(1993)
マウス	9.0	20	0.9	5.5	<i>In vitro</i>	Battellino & Blanco(1970)
ウサギ	9.0	20	0.9	20	<i>In vitro</i>	Battellino <i>et al.</i> (1968)
ヒト	8.7	37	0.48	15	<i>In vitro</i>	Nisselbaum & Bodansky(1963)
			0.96	15.5		
ヒト	8.7	37	0.48	14.3	<i>In vitro</i>	Nisselbaum <i>et al.</i> (1964)

^{a)} 中心静脈周辺の肝細胞^{b)} 小葉間静脈周辺の肝細胞

5. おわりに

溶液中と同様に *in situ* においても酵素反応速度論が通用するのだろうかという筆者らの10年前の疑問は今や解決されつつある。本稿で紹介した新しいアプローチの概念はLDH以外の酵素にも応用できるだろう。リアルタイム画像解析システムのおかげで、膨大な数の細胞についての酵素反応解析が短時間で容易にできるようになった。今後のこのような利点が生かされ、定量的酵素組織化学法が種々の分野に応用されていくことを期待したい。

文 献

- 1) Van Noorden, C. J. F., Butcher, R. G. (1991) *Histochemistry: Theoretical and Applied* (Stoward, P. J., Pearse, A. G. E., eds.), 3, 4th edn., 355-432, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- 2) Pearse, A. G. E. (1980) *Histochemistry: Theoretical and Applied*, 1, 4th edn., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- 3) Fahimi, H. D., Amarasingham, C. R. (1964) *J. Cell Biol.*, 22, 29-48.
- 4) Kalina, M., Gahan, P. B. (1965) *Histochemie*, 5, 430-436.
- 5) Nakae, Y., Stoward, P. J. (1988) *Proc. R. Microsc. Soc.*, 23, 45.
- 6) Altman, F. P. (1980) *Trends in Enzyme Histochemistry and Cytochemistry: Ciba Foundation Symposium*, 73 (new series) (Evered, D., O'Connor, M., eds.), 81-101, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 7) McMillan, P. J. (1967) *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 21-31.
- 8) Meijer, A. E. F. H. (1972) *Histochemie*, 30, 31-39.
- 9) Meijer, A. E. F. H. (1980) *Trends in Enzyme Histochemistry and Cytochemistry: Ciba Foundation Symposium*, 73 (new series) (Evered, D., O'Connor, M., eds.), 103-120, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 10) Nolte, J., Pette, D. (1972) *J. Histochem. Cytochem.*, 20, 567-576.
- 11) Nolte, J., Pette, D. (1972) *J. Histochem. Cytochem.*, 20, 577-582.
- 12) Pette, D., Wasmund, H., Wimmer, M. (1979) *Histochemistry*, 64, 1-10.
- 13) Altman, F. P. (1982) *Acta Histochem.*, suppl. 26, 145-155.
- 14) Blanco, C. E., Sieck, G. C., Edgerton, V. R. (1988) *Histochem. J.*, 20, 230-243.
- 15) Lawrence, G. M., Beesley, A. C. H., Matthews, J. B. (1989) *Histochem. J.*, 21, 557-564.
- 16) Nakae, Y., Stoward, P. J. (1992) *Histochemistry*, 98, 7-12.
- 17) Stoward, P. J. (1980) *Trends in Enzyme Histochemistry and Cytochemistry: Ciba Foundation Symposium*, 73 (new series) (Evered, D., O'Connor, M., eds.), 11-31, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 18) Van Noorden, C. J. F., Vogels, I. M. C. (1989) *Histochem. J.*, 21, 373-379.
- 19) Arnold, F., Kunze, K. D., Grossmann, H. (1968) *Histochemie*, 13, 196-202.
- 20) Wenk, H., Ritter, J., Meyer, U. (1970) *Acta Histochem.*, 37, 379-396.
- 21) Ritter, J., Wenk, H., Gerth, CH. (1971) *Acta Histochem.*, 40, 51-63.
- 22) Van Noorden, C. J. F., Vogels, I. M. C. (1989) *Histochem. J.*, 21, 575-583.
- 23) Kugler, P., Vogel, S., Gehm, M. (1988) *Histochemistry*, 88, 299-307.
- 24) Van Noorden, C. J. F., Kooij, A., Vogels, I. M. C., Frederiks, W. M. (1985) *Histochem. J.*, 17, 1111-1118.
- 25) Butcher, R. G. (1972) *Histochemie*, 32, 171-190.
- 26) Robertson, W. R. (1980) *Histochem. J.*, 12, 87-96.
- 27) Van Noorden, C. J. F., Butcher, R. G. (1987) *J. Histochem. Cytochem.*, 35, 1401-1404.

- 28) Frederiks, W. M., Marx, F., Van Noorden, C. J. F. (1988) *Histochem. J.*, **20**, 624-628.
- 29) Lomax, R. B., Daglish, A., Taylor, R. J., Gordon, M. T., Robertson, W. R. (1989) *Histochem. J.*, **21**, 595-599.
- 30) Van Noorden, C. J. F. (1988) *Proc. R. Microsc. Soc.*, **23**, 93-97.
- 31) Dahl, H. A., From, S. HJ. (1971) *Histochemie*, **25**, 182-190.
- 32) Pette, D., Wimmer, M. (1979) *Histochemistry*, **64**, 11-22.
- 33) Rieder, H., Teutsch, H. F., Sasse, D. (1978) *Histochemistry*, **56**, 283-298.
- 34) Stoward, P. J., Al-Sarraj, B. (1981) *Histochemistry*, **71**, 405-431.
- 35) Frederiks, W. M., Marx, F., Jonges, G. N., Van Noorden, C. J. F. (1987) *J. Histochem. Cytochem.*, **35**, 175-180.
- 36) Frederiks, W. M., Marx, F., Van Noorden, C. J. F. (1987) *Histochem. J.*, **19**, 150-156.
- 37) Stoward, P. J., Christie, K. N., Thomson, C. (1988) *Histochemistry*, **89**, 11-24.
- 38) Patel, H. R. H., Frederiks, W. M., Marx, F., Best, A. J., Van Noorden, C. J. F. (1991) *J. Histochem., Cytochem.*, **39**, 81-86.
- 39) Lehrer, G. M., Silides, D., Farmer, M. F. (1965) *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, 700-701.
- 40) Nakae, Y., Stoward, P. J. (1993) *Histochem. J.*, **25**, 199-205.
- 41) Butcher, R. G., Dawson, A. L., Knaab, S. A., Gahan, P. B. (1980) *Histochem. J.*, **12**, 591-598.
- 42) Stoward, P. J., Nakae, Y. (1988) *Histochem. J.*, **20**, 610-616.
- 43) Pette, D. (1981) *Histochem. J.*, **13**, 319-327.
- 44) Nakae, Y., Stoward, P. J. (1993) *Histochem. J.*, **25**, 206-212.
- 45) Nakae, Y., Stoward, P. J. (1994) *Histochem. J.*, **26**(ms. accepted for publication).
- 46) Nakae, Y., Stoward, P. J. (1994) *Histochem. J.*, **26**(ms. accepted for publication).
- 47) Butcher, R. G. (1978) *Histochem. J.*, **10**, 739-744.

なかえ よしこ

大阪大学大学院理学研究科博士課程修了。理学博士。徳島大学歯学部勤務と同時に蛋白質の物理化学から定量的組織化学へと研究分野を転じ、現在に至っています。その間、1986年より2年半、英国 Dundee 大学にて Peter J. Stoward 教授と共同研究。趣味はさまざまな土地の風物にふれ、新しい発見をすることです。

連絡先 〒770 徳島市蔵本町3-18-15

徳島大学歯学部口腔解剖学第1講座

TEL 0886-31-3111 内線5202 FAX 0886-31-4215

Peter J Stoward

Dr Peter John Stoward graduated from the University of Oxford in Chemistry and Microbiology and obtained his doctorate there in histochemistry. After post-doctoral studies with Dr S S Spicer at the National Institute of Health in Bethesda in the U.S. and research posts at Oxford, Dr Stoward was appointed Senior Lecturer in Histology at the University of Dundee, Scotland. Later he was promoted Reader and then Professor of Histochemistry and Head (Chairman) of the Department of Anatomy and Physiology in Dundee. His research interests include the development of quantitative histochemistry and its applications to cell toxicology and neoplasia. Editor of the *Histochemical Journal* since its foundation in 1967. A widower with one daughter, Dr Stoward's hobbies are sailing, the visual arts and theology.