3'-Methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-MeDAB)

肝ガン発生過程に見られるラッテ肝実質細胞内諸酵素

活性変動の超微細胞化学的研究

Ⅱ. チアミン・ピロホスファターゼ (TPPase) とゴルジ装置

関西医科大学解剖学教室第Ⅰ講座 (指導 小川和朗教授)

斉 藤 多 久 馬

チアミン・ピロホスファターゼ (thiamine pyrophosphatase, TPPase) はカルボキシラーゼの補酵素である thiamine を分解する酵素である。この酵素の生体内における役割は正確には解っていないが thiamine の分解を通じて thiamine の量を調節しているものと考えられている。この酵素がゴルジ装置に局在することが明らかとなつてから (Allen and Slater, 1961; Allen 1962a, b; Novikoff and Goldfischer, 1961) 多くの研究者の興味を引いて来ている (Essner and Novikoff, 1962; Meek and Bradbury, 1963; Novikoff, 1963; Goldfischer, 1964; Shanthaveerappa and Bourne, 1966; Saito and Ogawa, 1966; Ishikawa et al., 1967)。とくに Novikoff and Goldfischer 法(1961)が、鉛法で、反応最終産物を磷酸鉛の形で捕捉することができるので、そのまま電子顕微鏡のレベルでの組織化学に応用が可能である。電子顕微鏡レベルでは、TPPase活性はゴルジ装置の槽、小胞、空胞内に限局して検出されている (Novikoff and Goldfischer, 1961; Saito and Ogawa, 1967)。ゴルジ装置はマウス大腸の発生過程などではかなりの形態学的変化を示すことが明らかとなつており (Ishikawa et al., 1967), また活性の強さにも変化がありうる事が報告されている (Saito and Ogawa, 1966)。3'-MeDAB 投与時のラッテ肝臓においても、細胞内小器官にかなり激しい変化が起ることが明らかとなつていたので (Porter and Bruni, 1959; 斎藤, 1968), この発ガン過程においてゴルジ装置に局在することの知られている TPPase がどのような変動を示すかに興味をもたれる。本研究では 3'-MeDAB 投与後の肝実質細胞における TPPase 活性および肝細胞ガンにおける TPPase 活性の変化を微細構造レベルで追求した。

材料と方法

実験に使用した動物は Sprague-Dawley 雄ラッテである。0.06%の割合で 3'-MeDAB を混じたオリエンタル半合成固型飼料MFを実験群(40匹)に給飼し、3'-MeDAB を含まないオリエンタル半合成固型飼料のみを対照群(10匹)に給飼した。実験は35週継続したが、3'-MeDAB投与開始日より一週おきに1~2匹のラッテを無麻酔屠殺し、新鮮な肝組織を8%蔗糖を含む冷2%グルタルアルデヒド(0.1Mカコジル酸緩衝液), pH 7.2, 中で30分間固定し (Sabatini et al., 1963), その後8%蔗糖を含む0.1Mカコジル酸緩衝液, pH 7.2, 中で一夜洗い, 40μの凍結切片を作成し, Novikoff and Goldfischer の浸漬液(1961)中で37℃, 15分間浸漬した。反応後, 冷 Caulfield (1957) 固定液中で再固定1時間後, エタノール系列により脱水, プロピレン・オキシドを経て, エポン包埋 (Luft, 1961) を行なつた。超薄切片は LKB ウルトロトームにてガラスナイフを用いて作成, 400 メッシュに支持膜なしのせ, クエン酸鉛 (Reynolds, 1962) 単染, または酢酸ウラン・クエン酸鉛で重染後, JEM-7 で検鏡した。直接倍率は2,500倍より30,000倍である。

浸漬後, 一部の切片は水洗, 1%黄色硫化アンモニウム液中で発色後, 光学顕微鏡による観察を行ない, 電子顕微鏡による観察の補助とした。対照として, 基質を抜いた浸漬液中で反応を行なつた。また, 超薄切片作成に先立ち, 1μの厚いエポン切片を作成, 1%トルイジン靑染色液で染色し, 光学顕微鏡により観察し, 適当な視野を選定・再トリミング後, 超薄切片作成を行なつた。

所 見

正常肝実質細胞のゴルジ装置は毛細胆管の周囲で, リ

ゾゾーム, 粗大リゾゾームと共に位置していることが多く, ゴルジ装置 (G) も何個か近接して存在している (第1図). ゴルジ装置の長さはほぼ糸粒体大で, 3~4層の平行な槽および小胞, 空胞から構成されており, この槽内に対照標本ではみられない TPPase 活性が陽性である (第1, 2図). TPPase 活性を示す磷酸鉛の沈澱は槽を構成する膜に接して局在する場合と, 膜より離れて槽内に認められる場合とがある. ゴルジ小胞, 空胞中にも TPPase 活性が存在しており, 時に近くに位置している粗大リゾゾーム (C) 中に TPPase 活性が認められる (第2図). ゴルジ装置の槽内における TPPase 活性はどの槽にも同等に認められるのではなく, 3~4個の平行に位置している槽の間で活性の強さに差があり, 強陽性の槽より弱陽性ないし陰性の槽へと順に配列し, ゴルジ装置全体としては, TPPase 活性の強さによる極性が認められるようである (第1, 2図). TPPase 活性はさきに述べたゴルジ装置, 粗大リゾゾームの他に, 毛細胆管 (B I) に強陽性で, 時に自由小突起をのこして管腔が磷酸鉛の沈澱でうめられている像が観察される (第1図). この毛細胆管における TPPase 活性は自由小突起の原形質膜に対応して陽性で, それに連続している原形質膜には活性が見られないのが普通である. 毛細胆管, ゴルジ装置などに比較するとはるかに活性は低いが, TPPase 活性は小胞体の槽中 (R E) および核膜の内外膜の間隙にも認められることがある (第2, 3図). この小胞体における TPPase 活性は2%グルタルアルデヒド30分固定の条件で認められることが多く, 1時間固定では活性は認められない. 糸粒体には TPPase 活性はまったく認められない.

正常胆管上皮細胞は内腔側に線毛 (C I) をそなえ, 基底部に基底膜 (B) を有している. 細胞質の核 (N) に対する割合はすくなく, 細胞質内の細胞内小器官は比較的乏しく, 糸粒体は小形でゴルジ装置, 粗面小胞体の発達も悪い. この小型のゴルジ装置 (G) に TPPase 活性が陽性である. 小胞体には TPPase 活性は認められない. 管腔側に生じている線毛 (C I) には TPPase 活性が認められない (第4図).

第5, 6, 7図は 3'-MeDAB 投与開始後に認められる初期変化を示している. 3'-MeDAB 投与後1週間で肝実質細胞にはかなりの細胞内小器官の形態変化が引きこされる. すなわち粗面小胞体は減少し, 滑面小胞体 (S E) の急増が認められる (第5図). ゴルジ装置 (G) は3~4個の平行な槽より構成されており, TPPase 活性がこれらの槽内に認められ, 正常肝実質細胞におけると同様, TPPase 活性の強さによる極性が認められる.

TPPase 活性はゴルジ装置の他にも毛細胆管 (B I) に強陽性である.

3'-MeDAB 投与後4週においても TPPase 活性はゴルジ装置 (G) の槽, 小胞, 空胞に陽性に認められる (第6図). 毛細胆管 (B I) には TPPase 活性が強く認められ, それに連続する原形質膜 (P) には活性は認められない. この時期にはグリコーゲン (G L) のかなりの減少が認められる.

3'-MeDAB 投与後7週の肝実質細胞では (第7図), TPPase 活性はゴルジ装置 (G) および粗大リゾゾーム (C) に陽性で, 他の細胞内小器官, たとえば糸粒体 (M), 粗面小胞体, 滑面小胞体, リゾゾームには陰性である.

3'-MeDAB 摂食開始後24週より35週にかけて胆管ガン, 肝細胞ガンが形成されて来る. 第8図は3'-MeDAB 摂食開始後24週のラッテにみられた胆管ガンよりの標本である. 腺腔 (L) を囲む胆管上皮細胞の集団が出現し, 腺腔側には線毛 (C I) が生じ, 核 (N) には大型の仁 (N U) が認められる. 細胞内小器官の発達は悪く, ゴルジ装置の槽の数はすくない. TPPase 活性はゴルジ装置, 隣接する細胞の原形質膜 (P) 間に陽性である.

3'-MeDAB 摂食開始後35週のラッテにみられる肝細胞ガンでは所により微細構造に差が認められる. 第9図では滑面小胞体が比較的多く存在しており, ゴルジ装置 (G) の発達は悪い. 毛細胆管 (B I) は正常に比較して大きい. TPPase 活性はこれらのゴルジ装置と, 毛細胆管に陽性である. 第10図には肝細胞ガンの中, とくに遊離リボゾームのロゼットが多く, 異形の核 (N) を有し, 粗面小胞体が糸粒体 (M) の周囲を取り巻いて存在している部分を示してある. ゴルジ装置 (G) の発達はかなり良好で TPPase 活性が陽性に認められる. 糸粒体, 小胞体, リボゾームには TPPase の活性は認められない.

考 察

3'-MeDAB 投与による肝ガン発生に際しては, 肝細胞の細胞内小器官に多くの変化が引き起こされることが知られている (Porter and Bruni, 1959; 斎藤, 1968). とくに粗面小胞体より滑面小胞体への変化は特徴的であり, リゾゾームも 3'-MeDAB 投与初期には減少することが報告されている (Wachstein, 1959; Chang, 1960; 斎藤, 1968).

肝実質細胞内ゴルジ装置は 3'-MeDAB 投与時にも持続しており, TPPase はこのゴルジ装置の槽の, 小胞,

空胞中に常に認められるが、一般に 3'-MeDAB 投与初期および中期のラッテ肝実質細胞に存在するゴルジ装置は小型となり、ゴルジ装置を構成している槽の数は 2~3 個が平行して存在し、正常のゴルジ装置が普通 3~4 個より構成されているのに比較すると槽の数が減少している傾向にある。ゴルジ装置を構成する小胞、空胞の数も減少しているといえるようである。また正常肝実質細胞ではゴルジ装置の周囲にリゾソーム、粗大リゾソームが位置していることが多いが、3'-MeDAB 投与後の肝実質細胞ではリゾソーム、粗大リゾソームの減少が明らかである (Wachstein, 1959; Chang, 1960; 斎藤, 1968)。Allison and Mallucci (1964) は発ガン物質はまずリゾソームに作用してこれを不安定化し破壊することにより、リゾソーム中に含まれている水解酵素が放出され、前ガン状態を引き起こすのであると述べている。

Essner and Novikoff (1962) は酸性ホスファターゼ活性がリゾソームに強陽性であり、ゴルジ装置に弱陽性であることからリゾソームがゴルジ装置により形成されることを推定しているが、3'-MeDAB 投与時に肝実質細胞に認められたゴルジ装置の小型化および、それともなう小胞、空胞の減少はゴルジ装置よりのリゾソームの形成が 3'-MeDAB により抑制されていることを暗示しているものかもしれない。3'-MeDAB 投与時の初期に、ラッテ肝実質細胞に引起されるリゾソーム、粗大リゾソーム減少の原因は、主として急激なリゾソーム、粗大リゾソームの破壊によるものであろうが、他方、ゴルジ装置によるリゾソーム供給の不足によるものとも考えられる。しかし、肝実質細胞において 3'-MeDAB 投与時にゴルジ装置がいささか小型化し、小胞、空胞の乏しい構成を示すとしても、常に TPPase 活性が認められるので、ゴルジ装置の基本的作用には変化が生じていないと思われる。Meek and Bradbury (1963) はカタツムリ (*Helix aspersa*) の精子形成時にも高等動物同様ゴルジ装置に TPPase 活性が局在することを明らかにしており、ゴルジ装置が大きな形態変化を示すデイクチオソーム (dictyosome) にも恒常的に TPPase 活性が検出されている。またマウス胎仔大腸に巨大で複雑な網状ゴルジ装置が出現するが、このゴルジ装置にも TPPase 活性が常に観察されている (Ishikawa et al., 1967)。ゴルジ装置に多少の形態学的変化が生じてても基本的な酵素組成にはあまり大きな変化を生じないものかもしれない。

肝細胞ガンにおいてはゴルジ装置がふたたび発達して

来るようである。ゴルジ装置の槽の数は約 4 列となり周囲には小胞が多数出現して来る。肝細胞ガンにおいてはリゾソーム、粗大リゾソームの増加が報告されているが (斎藤, 1968)、ゴルジ装置の発達がリゾソーム増加の基礎を提供しているものとも思われる。すなわち、本研究で認められた、一連の、ゴルジ装置の一時的小型化と復元の変化は、丁度酸性ホスファターゼ活性 (リゾソーム) の一時的減少と再現 (斎藤, 1968) に平行する変化であり、両者の密接な関係を暗示しており、興味深い。

小胞体の槽、核膜の内外膜間隙に時として TPPase 活性が認められたが、これらの活性は常に認められるものではなく、活性もゴルジ装置の TPPase 活性よりはるかに弱い。

小胞体中にはヌクレオシド・ジホスファターゼ活性が存在しているので (Novikoff et al., 1962)、小胞体槽の活性はヌクレオシド・ジホスファターゼによりチアミン・ピロリン酸が分解されている可能性が強い (Allan, 1962a, b)。

要 約

3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-MeDAB) 投与時の肝細胞にみられるゴルジ装置の微細形態上の変化とチアミン・ピロホスファターゼ (TPPase) 活性の変動を追求した。ゴルジ装置は正常実質細胞では毛細胆管の周囲に存在し、TPPase 活性がゴルジ装置を構成する槽、小胞、空胞中に陽性である。

3'-MeDAB 投与ラッテにおいても、TPPase 活性をとみなうゴルジ装置が存在しており、基本的には正常肝実質細胞と差はないといえるが、3'-MeDAB 投与初期および中期のラッテに見られる肝細胞内ゴルジ装置は小型となり槽、小胞、空胞共に乏しくなる。しかし、肝細胞ガンの細胞ではゴルジ装置の発達は再び良好となり、TPPase 活性も陽性である。これらのゴルジ装置の変化は、3'-MeDAB 投与時に引起される肝細胞内リゾソームおよび粗大リゾソームの変動と類似した傾向を示している。

謝 辞

本研究を行なうに際して、常に適切な御指導と御鞭撻をいただいた小川和朗教授に心から感謝を捧げます。教室の古沢、田畑、小林の諸氏の御援助にも感謝の意をあらわします。

文 献

- 1) Allen, J. : J. Histochem. Cytochem., **11**, 529, 1962 a.
- 2) Allen, J. : J. Histochem. Cytochem., **11**, 542, 1962 b.
- 3) Allen, J. and Slater, J. : J. Histochem. Cytochem., **9**, 418, 1961.
- 4) Allison, A. C. and Mallucci, L. : Nature, **203**, 1024, 1964.
- 5) Caulfield, J. B. : J. Biophys. Biochem. Cytol., **3**, 827, 1957.
- 6) Chang, J. P. : In "Cell Physiology of Neoplasia." University of Texas Press, Austin, 1960.
- 7) Essner, E. and Novikoff, A. B. : J. Cell Biol., **15**, 289, 1962.
- 8) Goldfischer, S. : Am. J. Path., **43**, 511, 1964.
- 9) Ishikawa, Y., Saito, T. and Ogawa, K. : J. Electr. Micr., **16**, 344-345, 1967.
- 10) Luft, J. H. : J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**, 409, 1961.
- 11) Meek, G. A. and Bradbury, S. : J. Cell Biol., **18**, 73, 1963.
- 12) Novikoff, A. B. : J. Cell Biol., **19**, 88A, 1963.
- 13) Novikoff, A. B., Essner, E., Goldfischer, S. and Heus, M. : In "The Interpretation of Ultrastructure," ed. by R. J. C. Harris, Symp. Internat. Soc. Cell Biol., **1**, 149, 1962.
- 14) Novikoff, A. B. and Goldfischer, S. : Proc. Nat. Acad. Sci., **47**, 802, 1961.
- 15) Porter, K. R. and Bruni, C. : Can. Res., **19**, 997, 1959.
- 16) Reynolds, E. S. : J. Cell Biol., **17**, 208, 1963.
- 17) Sabatini, D. D., Bensch, K. and Barnett, R. J. : J. Cell Biol., **17**, 19, 1963.
- 18) Saito, T. and Ogawa, K. : Arch. Histol. Jap., **27**, 473, 1966.
- 19) 齊藤多久馬 : 関西医大誌, 印刷中.
- 20) Shanthaveerappa, T. R. and Bourne, G. H. : Science, **154**, 1464, 1966.
- 21) Wachstein, M. : Gastroenterology, **37**, 525, 1959.

附 図 説 明

- 第1図 正常肝実質細胞における TPPase活性. 中央によく発達したゴルジ装置(G)が認められ, TPPase活性が槽内に陽性である. ゴルジ装置の槽の数は3~4個で周囲に小胞, 空胞の発達が良好である. ゴルジ装置の周辺にはリゾソームが存在しており, 全体として位置的には毛細胆管(BI)のまわりにある. 毛細胆管の原形質膜にも TPPase活性が陽性である. 小胞体には弱い磷酸鉛の沈着が認められる. 糸粒体(M)には活性は存在しない. $\times 18,000$
- 第2図 正常肝実質細胞における TPPase活性. TPPase活性はゴルジ装置(G)の槽内, および粗大リゾソーム(C)に陽性である. 小胞体に弱い活性が認められる. N:核 $\times 10,000$
- 第3図 正常肝実質細胞における粗面小胞体(RE)に TPPase活性が弱陽性である. 糸粒体(M), microbody(MI)には活性は認められない. $\times 20,000$
- 第4図 正常胆管上皮細胞における TPPase活性. 左方に管腔が見られ腔に面して線毛(CI)が生えている. 基底部には基底膜(B)が認められる. TPPase活性はゴルジ装置(G)に陽性である. D:デスモソーム. N:核. P:原形質膜. $\times 8,000$
- 第5図 3'-MeDAB 投与開始後1週のラット肝実質細胞における TPPase活性. ゴルジ装置(G)と毛細胆管(B)に TPPase活性が陽性である. 滑面小胞体(SE)の増加が認められる. 滑面小胞体(SE), 糸粒体(M), microbody(MI)などには活性は認められない. $\times 10,000$
- 第6図 3'-MeDAB 投与開始後4週目のラットの肝実質細胞における TPPase活性. TPPase 活性はゴルジ装置の槽, 小胞, 空胞内に陽性である. グリコーゲン(GL)は減少している. TPPase活性は毛細胆管(BI)の原形質膜にも陽性であるが, これに連続する原形質膜(P)では活性は認められない. $\times 10,000$
- 第7図 3'-MeDAB 投与開始後10週目のラットの肝実質細胞における TPPase活性. TPPase 活性はゴルジ装置(G)と粗大リゾソーム(C)に陽性である. ゴルジ装置周囲の小胞, 空胞は不明瞭である. 中央部に滑面小胞体(SE)の増加が認められる. $\times 15,000$
- 第8図 3'-MeDAB 投与開始後24週のラットにみられた胆管ガンにおける TPPase活性. TPPase 活性はゴルジ装置(矢印)と, 隣接する細胞の原形質膜(P)の間隙に陽性である. 核(N)には仁(NU)の発達が良好である. 管腔(L)に面して線毛(CI)が生えている. $\times 8,000$
- 第9図 3'-MeDAB 投与開始後35週のラットにみられた肝細胞ガンにおける TPPase活性. TPPase 活性は拡大した毛細胆管(BI)と比較的小型のゴルジ装置(G)に陽性である. 周囲には滑面小胞体が認められる. $\times 8,000$
- 第10図 3'-MeDAB 投与開始後35週のラットにみられた肝細胞ガンにおける TPPase活性. TPPase 活性はよく発達したゴルジ装置(G)に陽性である. 細胞質中には遊離のリボソームが多数認められ, 粗面小胞体は糸粒体(M)の周囲を取巻いて存在し, 槽内に電子密度の高い物質がまつている. $\times 8,000$

(英 文 抄 録)

Ultracytochemical Study of Enzyme Activities in Rat Hepatic Parenchymal Cells during the Course of Carcinogenesis Induced by 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-MeDAB).

Ⅱ. The Thiamine Pyrophosphatase Activity and the Golgi Apparatus.

by

Takuma Saito

Department of Anatomy (Supervised by Prof. Kazuo Ogawa),
Kansai Medical School, Moriguchi, Osaka, Japan.

As a part of a serial study on changes of the activity of various phosphatases during the azo-dye hepato-carcinogenesis, the activity of thiamine pyrophosphatase (TPPase) was observed in the rat liver cells up to 35 weeks. From 24 weeks and after the hepatocellular hepatomas could be obtained.

The TPPase activity was positive in the Golgi apparatus and membranes covering bile canaliculi in normal hepatic cells. The weak enzymatic activity was also observed occasionally in the endoplasmic reticulum. The TPPase activity within the Golgi apparatus *per se* did not seem to reveal any appreciable changes in morbid cells. However the Golgi apparatus in hepatic cells in the early and intermediate stages of carcinogenesis was rather smaller than the one seen in normal parenchymal cells. The Golgi vesicles and vacuoles were diminished in number also. In some hepatocellular hepatoma, however, the Golgi apparatus was redeveloped approaching to the normal size.

Supported by grants from the Anna Fuller Fund, the Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research (Project # 196) and the Japanese Government (Gann # 94157) administered by Prof. K. Ogawa.