＜原 著＞

ヒト肝 guanase の組織化学的証明法について

伊東 進 林 紀美子* Yuhui XU**

Anthony J. KEYSER, Robert L. PETERS**

要 旨：基質調整に bicine buffer を用いるヒト肝 guanase (GU) のより優れた組織化学的証明法を考案した。本法を用い、正常、原発性胆汁性肝硬変およびアルコール性肝硬変例の肝における GU 活性の分布について検討した。GU 活性は肝細胞に特異的に認められ、類洞側および門脈域周辺の肝細胞により強い活性が認められた。門脈域の構成成分である胆管、血管および線維、浸潤細胞には GU 活性は認められず、また肝細胞核にもほとんど GU 活性は認められなかった。

本法は、従来の方法よりも優れた GU の組織化学的証明法であり、肝細胞の詳細な観察が可能である。本法は、比較的新鮮な剖検材料でも良好な成績を得ることが出来るため、今後、この方面の研究に有用であると思われる。

索引用語： guanase bicine nitro tetrazolium blue (NBT)

緒 言

ヒト guanase (GU) は、肝、脳、腎に多く含まれ、GOT および GPT が比較的多い骨格筋、心筋、脾などにはほとんど存在せず、血清 GU 活性の上昇は肝疾患に特異性が強いと考えられている¹⁻³⁾。

Passanenti⁴⁾が、肝障害時に血中 GU 活性が上昇することを報告して以来、多くの研究者が血清 GU 活性の測定が肝機能検査法の 1 つとして有用であることを報告している^{1,5-8)}。しかし、血清 GU 活性測定は未だ一般肝機能検査法として利用されるまでに至っていない。

その最大の理由は、従来の GU 活性測定法は繁雑で、再現性に乏しいためと考えられる。著者らは、簡便で、かつ再現性に優れた GU 活性測定法を開発するとともに⁹⁻¹¹⁾、本法により測定した GU 活性は、GOT、GPT よりも肝に特異的であることを明らかにした^{12,13)}。

最近、山崎ら¹⁴⁾は、輸血血液中の GU 活性と術後肝炎（特に non A-non B 型）の発生率との間に有意な相関があることを指摘しており、血清 GU 活性の動態のみならず、肝組織における GU の動態も注目されてい

る。したがって、GU の組織化学的検討は、臨床的に極めて有意義であると考えられるが、その方面の研究は未だ行われていない。

Norstrand ら¹⁵⁾は、GU の作用により生じた xanthine が xanthine oxidase (XOD) により酸化される際に発生した水素が、nitro tetrazolium blue (NBT) に受容され、diformazan を形成することを応用し、中枢神経組織における GU 活性の証明に成功している。しかし、この方法は、基質調整に phosphate buffer を用いているため、基質である guanine が析出し易い。

著者ら¹⁰⁻¹²⁾は、すでに GU 測定のための基質調整には、phosphate buffer よりも bicine buffer が優れていることを報告した。したがって、GU の組織化学的証明法においても、phosphate buffer よりも bicine buffer を用いた方が良好な成績を示すことが期待される。そのため、基質調整に bicine buffer を用いる Norstrand らの変法を考案し、原法と比較するとともに、ヒト肝における GU 活性の分布について検討した。

材料および方法

材料

1. 試薬：guanine, N-bis (2-hydroxyethyl) glycine (bicine), xanthine oxidase (XOD) (grade III, 19.8 U/ml), nitro tetrazolium blue (NBT) および 5 (4)-aminoimidazole-4 (5)-carboxamide は、Sigma chemical Co. (USA) 製のものを用いた。

* 徳島大学医学部第 2 内科

** Department of Pathology, University of Southern California

＜受付日 58 年 10 月 6 日＞

0.1M bicine buffer: bicine 1.63g を水100ml に溶解し, 0.1N NaOH にて pH 7.8に調整する.

NBT 溶液: 0.1M bicine buffer に NBT (1mg/ml) を溶解する.

基質保存液: guanine 250 μ mol を1N NaOH 0.75 ml に溶解した後, 水19.25ml を加える.

基質液: 基質保存液4ml に0.1M bicine buffer 24 ml を加えて基質液とする.

基質混液: 基質液3.0ml, XOD 0.4ml, 0.1M bicine buffer 8.8ml, NBT 溶液 (1mg/ml) 1.2mg を加える.

2. 組織: 下記の5剖検例から, 肝および骨格筋を採取した. 肝炎例では生検組織を用いた.

Case 1: 45歳, 女, 原発性胆汁性肝硬変

Case 2: 28歳, 男, 交通事故死

Case 3: 64歳, 男, アルコール性肝硬変

Case 4: 29歳, 男, non A-non B 型肝炎

Case 5: 54歳, 男, 原発性肝腫瘍

Case 6: 62歳, 男, 転移性肝腫瘍 (大腸癌)

死後, 凍結するまでの時間は, Case 1 5時間, Case 2 12時間, Case 3 8時間, Case 5 8時間, Case 6 10時間であった. 生検例は採取後ただちに凍結した.

方法

1. Guanase の組織化学的証明法

すべての組織は, 採取後ただちに液体窒素あるいは -80°C isopentane で凍結した. クリオスタットにて8~10 μm の切片を作成し, スライドガラスにはりつけた. 0.2M, pH 7.4 cacodylate buffer の2.5% glutaraldehyde 溶液で, 1時間室温で固定した後, 0.1M bicine buffer で洗浄した. 洗浄後, 内因性 xanthine および hypoxanthine を分解するため, XOD 溶液 (1:10) に 37°C 15分間浸漬した. bicine buffer で洗浄後, 37°C 1~2時間基質混液中に浸漬した. 洗浄後, アルコールで脱水し, xylene に浸漬した後, 包埋した.

対照試験として, 下記の場合について検討した.

- 基質混液より guanine を除いた場合
- 基質混液より XOD を除いた場合
- 100°C で10分間煮沸した組織を用いた場合
- 10% formalin で1時間固定した組織を用いた場合
- acetone で1時間固定した組織を用いた場合
- GU が含まれていないと思われる骨格筋を用いた場合
- 基質液に GU の inhibitor である0.001M 5 (4)

aminoimidazole-4 (5) carboxamide を加えた場合 (Korn ら)¹⁶⁾

2. Norstrand らの方法との比較

Case 1について, Norstrand らの方法¹⁵⁾ (原法) と基質調整に bicine buffer を用いた著者らの変法を用い, GU の組織化学的染色を行い, 両法による成績を比較した.

成 績

1. 対照試験

Table 1 に対照試験の結果を示す. すべての対照試験で diformazan の青色の発色は認めなかった.

2. Norstrand らの方法 (原法) と変法との比較

原法および変法により GU を組織化学的に染色した Case 1の低倍率の肝組織像を Fig. 1A, B に示す. 低倍率 ($\times 60$) では diformazan の発色はほぼ同程度に認められ, 両者間に差は認められなかった. しかし, 高倍率 ($\times 300$) で観察すると (Fig. 2), 原法 (Fig. 2B) では針状の guanine の結晶や大きい顆粒状の diformazan を認めたが, 変法 (Fig. 2A) では diformazan は均一で, 針状の guanine の結晶は認めず, より鮮明に肝細胞を描出することができた.

3. ヒト肝における guanase の分布

Case 1は原発性胆汁性肝硬変例で, 浸潤細胞と線維により門脈域は拡大しているが, diformazan 生成は

Table 1 Control studies of the histochemical demonstration of guanase

Tissue Fixation	Contents of the substrate mixture			
	Gu(+) XOD(+) Inh(-)	Gu(+) XOD(-) Inh(-)	Gu(-) XOD(+) Inh(-)	Gu(+) XOD(+) Inh(+)
Liver				
Glu	+	-	-	-
Acetone	-	-	-	-
Formalin	-	-	-	-
100 degrees C	-	-	-	-
Skeletal muscle				
Glu	-	-	-	-
Acetone	-	-	-	-
Formalin	-	-	-	-
100 degrees C	-	-	-	-

Gu: Guanine XOD: Xanthine oxidase

Inh: Inhibitor (5(4)-aminoimidazole-4(5)-carboxamide)

Glu: Glutaraldehyde

(+) or (-): with or without in substrate mixture

+ or - : with or without diformazan products

Fig. 1A. Guanase stain with modified procedure ($\times 60$), Case 1.

1B. Guanase stain with original procedure of Norstrand et al. ($\times 60$), Case 1.

At this magnification there is no appreciable difference between the methods, and an intensely blue formazan reaction product can be seen in the cytoplasm of hepatocytes. The reaction is strongest in the periportal zone, and portal components, fibrous tissue and inflammatory cells do not react.

肝細胞のみでみられ、門脈構成成分である浸潤細胞、線維、血管、胆管などにみられなかった。また、血管周辺よりも門脈周辺の肝細胞に diformazan 生成を強く認め、さらに類洞側の肝細胞の方が内部の細胞に比べて強い反応を認めた (Fig. 1)。

Case 2は交通事故死例で、正常に近い肝組織像を示す。Case 1と同様に、肝細胞には著明な diformazan 生成を認めたが、門脈構成成分である浸潤細胞、線維、血管、胆管などには認めなかった (Fig. 3)。核内には

Fig. 2A. Guanase stain with modified procedure ($\times 300$), Case 1.

2B. Guanase stain with original procedure of Norstrand et al. ($\times 300$), Case 1.

Large granules of formazan and crystals of substrate may be seen deposited non-specifically throughout the section in 2B. The tissue stained by the modified procedure (2A) shows no background and areas of enzyme activity may be distinguished with ease. Guanase is confined to the cytoplasm of hepatocytes.

わずかの diformazan 生成を認めたが、肝細胞質のそれに比べて軽微であった (Fig. 3B)。

Case 3はアルコール性肝硬変例である。HE染色 (Fig. 4B)で著明な線維増生、細胞浸潤、血管および再生胆管を結節周辺に認めたが、この部位には diformazan 生成はみられず、主として肝細胞に認め (Fig. 4A)、ごく淡い diformazan 生成を再生胆管の1つに認めた (Fig. 4, 矢印)。

Case 4は non A-non B 型肝炎例である。HE染色 (Fig. 5A)で浸潤細胞で拡大された門脈域と

Fig. 3 Guanase stain with modified procedure, Case 2.

A. ($\times 150$). Portal tracts are surrounded by an area of high guanase activity which diminishes to a weak reaction in the perivenular zone. Portal components are not reactive.

B. ($\times 300$). Hepatocyte nuclei and membranes show no activity, while cytoplasmic guanase content is high.

piecemeal necrosis を認める。guanase stain では門脈域のみならず傷害を受けたと思われる肝細胞で diformazan の生成がみられなかった (Fig. 5B)。強拡大では一部の核に diformazan 生成が認められた (Fig. 5C)。

Case 5は原発性肝腫瘍例である。HE 染色では腫瘍組織と被膜がみられる (Fig. 6A)。guanase stain では、腫瘍組織に明らかな diformazan 生成を認めるが、被膜にはみられなかった (Fig. 6B)。

Case 6は大腸癌の肝転移例である。HE 染色では腫瘍組織と周辺の肝組織がみられる (Fig. 7A)。guanase stain では、周辺の肝細胞には diformazan 生成を認め

Fig. 4 Case 3. ($\times 60$).

A. Guanase stain with modified procedure. Fibrous tissue, inflammatory cells and portal veins are non-reactive. An occasional bile duct shows a faint blue color (see arrow). The regenerating nodule shows strong guanase activity which appears to be more intense at the periphery.

B. Hematoxylin and eosin stain showing well defined regenerative nodules containing hydropic hepatocytes, and broad bands of fibrous tissue.

るが、腫瘍細胞には認められなかった (Fig. 7B)。

考 案

GU は guanine を脱アミンして xanthine に分解する酵素である。xanthine は XOD により尿酸にまで分解される (Fig. 8)。Sackler¹⁷⁾は xanthine が XOD により酸化される際、発生した水素が NBT に受容され、diformazan が形成され発色することを利用して、XOD を組織化学的に証明することに成功している。この原理を応用し、Norstrand らはヒトの中枢神経組織における GU の組織化学的証明法を報告している。

Fig. 5 Case 4

A : ($\times 30$) Hematoxyline and eosin stain showing the wide portal area with inflammatory cells and piecemeal necrosis.

B : ($\times 30$) Guanase stain with modified procedure. Portal components are not reactive. In some area, hepatocytes show faint color or no color.

C : ($\times 300$) Guanase stain with modified procedure.

Some hepatocyte nuclei show guanase activity. \ shows nuclei with diformazan reaction. * shows nuclei without diformazan reaction.

しかし、この方法は基質調整に phosphate buffer を用いているため、良い方法とは言えない。著者らは、すでに GU 活性の測定の際に基質液の調整には phosphate buffer よりも bicine buffer が優れていることを明らかにしており¹⁰⁻¹²⁾、GU 活性の組織化学的証明法においても、bicine buffer を用いた方がより良好な結果を得ることが期待された。

そこで、原法と著者らの変法を比較し、GU の組織化学的証明法について検討した。低倍率での観察では、両法でほぼ同程度の diformazan 生成を認め、明らかな差は認めなかった。しかし、高倍率では、原法にお

Fig. 6 Case 5

A : ($\times 30$) Hematoxyline and eosin stain showing tumor cells and capsul.

B : ($\times 30$) Guanase stain with modified procedure. The diformazan reaction can be seen in tumor cells.

Fig. 7 Case 6

A : ($\times 30$) Hematoxyline eosine stain showing the metastatic tumor cells and peripheral hepatocytes.

B : ($\times 30$) Guanase stain with modified procedure. The diformazan reaction cannot be seen in the metastatic tumor.

いて針状の結晶や大小不揃いの diformazan 顆粒の析出を認めるが、変法ではこれらの変化はみられず、diformazan 顆粒は均一で、後者が前者よりも優れていると思われた。

ヒト肝における diformazan 生成は、肝細胞質に著明にみられ、門脈構成成分である血管、胆管、浸潤細胞、線維などにはほとんど認めなかった。また、門脈域周辺の肝細胞で、血管周辺の肝細胞よりも diformazan 生成が強くみられた。さらに、類洞側の肝細胞に

Fig. 8 Synthesis of formazan linked to the hydrolytic deamination of guanine by guanase.

において内部の肝細胞よりも強い diformazan 生成を認めた。

diformazan は、種々の酸化反応に共役して NBT が還元されて生成される (Fig. 8)。したがって、diformazan 生成がみられても、他の酸化反応に共役して生じた可能性があり、必ずしも GU 作用によると断言出来ない。そこで、著者らは種々の対照試験を行った。すなわち、基質混液から guanine および XOD を除いた場合、GU 活性が無いと考えられる骨格筋を用いた場合、GU 活性を阻害する acetone および formaline で固定した場合、inhibitor を加えた場合などについて検討した。これらのいずれの対照試験においても diformazan 生成は認められなかったことから、肝細胞に特異的にみられた diformazan 生成は GU の作用により生じたものと考えられた。

原発性肝腫瘍では diformazan 生成を認めたが、転移性肝腫瘍では認めなかった。guanase 活性は原発性肝腫瘍に特異性が強いと考えられ、転移性肝腫瘍との鑑別に本法が利用出来る可能性があるものと思われた。

肝細胞内の GU の分布については、LaMirande ら¹⁸⁾ および Bovikiewicz & Krowczynski¹⁹⁾ の報告がある。前者は、ほとんどの GU 活性は上清にあり、核、mitochondria, microsome などにはほとんど活性が無いと述べている。一方、後者は、上清73%、核15%、mitochondria 12%に GU 活性を認めると述べている。著者らの正常例における組織化学的な成績では、GU 活性は肝細胞質に著明で、核にはわずかしき認めず、LaMirande らに近い成績を得た。

non A-non B型肝炎例では GU 活性を認めない核と GU 活性を認める核が確認された。この核における GU 活性の解離現象の原因については未だ不明であるが、この現象は non A-non B型肝炎に特異的でなく、

B型肝炎の1部の例でもみられるが、今後、肝炎の病態と GU 活性の関連を究明する上で興味ある現象と思われる。

本法は、比較的新鮮な剖検材料においても安定した良い成績が得られ、Norstrand らの方法よりも高倍率での観察に優れており、今後 GU の組織化学的証明法として広く利用出来るものと思われる。

御校閲を賜った徳島大学第2内科森 博愛教授および南カリフォルニア大学病理学教室において、本研究に御協力いただいた Mr. Koval, B., Mrs. Charlotte, Mr. Lim, B に深謝する。

文 献

- Knights C: Serum guanase determination: A liver function test. *J Lab Clin Med* 65: 355-360, 1965
- 伊東 進, 高岡 猛, 岸清一郎, 他: Ammonia 直接比色定量法を応用した guanase 測定法の臨床的意義について. *肝臓* 16: 11-17, 1975
- Ito S, Takaoka T, Kishi S, et al: Clinical and experimental studies on the determination of serum guanase activity in acute myocardial infarction. *Jpn Circul J* 45: 525-531, 1981
- Passanenti G: Enzyme tests identify specific diseases. *Med World News* 4: 84-88, 1963
- McLeod S: Evaluation of serum guanase as a liver function test. *Can J Med Technol* 29: 60-68, 1965
- Mandel E, Macalincage L, Tingson T, et al: Evaluation of serum guanase in clinical diagnosis. *Am J Gastroenterol* 54: 253-266, 1970
- Kontinen A, Hupli V and Salmenkivi K: The diagnosis of hepatobiliary diseases by serum enzyme analysis. *Acta Med Scand* 189: 529-535, 1971
- 伊東 進, 高岡 猛, 岸清一郎, 他: 急性心筋梗塞症における血清 guanase 活性測定法の臨床的意義. *心臓* 10: 1038-1042, 1978
- 伊東 進, 香川正博, 神原 勤, 他: アンモニア直接比色定量法を応用した guanase 測定法の検討. *臨床病理* 23: 733-736, 1975
- Ito S, Takaoka T, Mori H, et al: A sensitive new method for measurement of guanase with 8-azaguanine in bicine (bis-hydroxy ethyl

- glycine) buffer as substrate. Clin Chim Acta 115 : 135—144, 1981
- 11) Ito S, Takaoka T, Kishi S, et al: Trial diagnostic test kit for the determination of guanase activity using 8-azaguanine solution in dotite bicine buffer as substrate. ASEAN J Clin Scien 2 : 283—289, 1981
 - 12) 伊東 進, 高岡 猛, 岸清一郎, 他 : Ammonia 直接比色定量法を応用した guanase 測定法の改良法とその臨床的意義. 肝臓 20 : 919—925, 1979
 - 13) Ito S, Takaoka T, Nakaya Y, et al: The clinical value of the determination of serum guanase activity: Studies on patients and experimental data from mongrel dogs and cultured rat hepatocytes. Gastroenterology 83 : 1102—1108, 1982
 - 14) Yamasaki S, Egashira S, Koga M, et al: Studies on the clinical importance of guanase assayed by a direct colorimetric method. Kurume Med J 29 : 127—140, 1982
 - 15) Norstrand I, Libbin R, Druck P, et al: The histochemical demonstration of guanase: Observation in the human central nervous system. Acta Histochem 64 : 187—193, 1979
 - 16) Korn ED, Remy CN, Wasilejko HC, et al: Biosynthesis of the puriness. VII. Synthesis of nucleotides from bases by partially purified enzymes. J Biol Chem 217 : 875—883, 1955
 - 17) Sackler ML: Xanthine oxidase from liver and duodenum of the rat: Histochemical localization and electrophoretic heterogeneity. J Histochem Cytochem 14 : 326—333, 1966
 - 18) LaMirande GD, Allard C and Cantero A: Purine-metabolizing enzyme in normal rat liver and Nandovikoff hepatoma. Cancer Res 18 : 952—958, 1958
 - 19) Bowkiewicz-suruma E and Krawczynski J: Determination of guanase activity in serum and tissue of normal rats and of rats intoxicated with carbon tetrachloride. Clin Chim Acta 16 : 29—31, 1967

Histochemical demonstration of guanase in human liver

Susumu ITO*, Kimiko HAYASHI*, Yuhui XU, Anthony J. KEYSER
and Robert L. PETERS**

Histochemical studies of human guanase have seldom been undertaken, in part because of technical difficulties which result in heavy background staining. In the report, we describe a modified procedure in which the methodological inadequacies have been overcome. The modified technique has been applied to determine the intracellular and lobular distribution of guanase in normal human liver and in cases of primary biliary cirrhosis and alcoholic cirrhosis,

Guanase was present within the cytoplasm of hepatocytes throughout the entire lobule. Enzyme activity was stronger on the sinusoidal side of the hepatocytes and in the periportal area. The reaction was weaker in perivenular hepatocytes. Portal components (bile ducts and veins), fibrous tissue and inflammatory cells were non-reactive, and the enzyme was absent from hepatocyte nuclei. Sections of skeletal muscle contained no guanase. The specificity of the reaction was confirmed by control tests on liver tissue and by the use of a specific inhibitor of guanase.

It is concluded that the modified procedure overcomes the disadvantages inherent in the original method for guanase demonstration, allows the examination of fine cellular detail and should become a valuable histochemical tool with which to study diseases of the liver.

* 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima (Tokushima)

** Department of Pathology, The University of Southern California