

肝障害時の血清酵素とその動態に関する研究

第 2 編

トランスアミナーゼ (GOT, GPT) の血中寿命と その体液分布ならびに胆汁排洩に関する実験的研究

岡山大学医学部第一内科教室 (主任 小坂淳夫教授)

近 藤 洋 一

[昭和46年3月31日受稿]

I 緒 言

肝障害時に glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), が血中に増加することは、すでに1955年, Wroblewski ら¹⁻⁴⁾ によって報告されて以来, 本酵素の測定は肝疾患の診断, 病態, 経過, 予後の判定にかぐことの出来ないものとして脚光をあびているが, これらの酵素が肝の各種の病態に際して血中に上昇してくるメカニズムに関しては未だ十分知られていない. 一般に肝障害時における血清酵素の血中レベルの変動に関与する要因としては, 1) 肝実質細胞の変性, 壊死等による肝細胞内酵素の血中への逸脱, 2) 血中遊出酵素の毛細血管壁から組織間液への拡散, 3) 血中酵素自体の失活あるいは阻害物質や賦活物質による酵素活性の変化⁵⁾, 4) さらには体内諸臓器による血中酵素の取り込み, 5) 胆道・腎・腸管等を介しての血管外への排泄等が考えられるが血清酵素の消失機構について詳細な証拠は殆んど得られていない. 従来 GOT, GPT の血中上昇に関しては, 主として細胞内酵素の血中への遊出という立場から研究されているが, 臨床的に把握される血中酵素レベルを正しく理解するためには, 血液中における酵素活動の変動要因についても十分検討する必要がある.

本研究は GOT, GPT が血中から消失する機序を検討する目的で, 犬の肝より精製した GOT, および GPT を静脈内に注射して, その後のリンパおよび胆汁中への酵素へ移行を経時的に追及して流血中からの本酵素の消失動態を検討したものである.

II 実験方法

1. 実験材料

実験材料は10~20kgの成犬の肝臓を使用した.

2. GOT, GPT の測定法

GOT, GPT は Reitman-Frankel 法⁶⁾ で測定し Karmen 単位で表わした.

3. 肝 GOT, GPT の精製

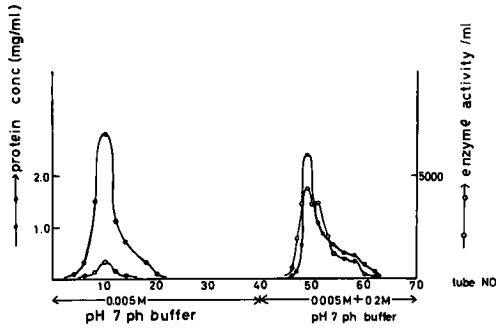
GOT は Jenkyns ら,⁷⁾ 松沢ら⁸⁾ の方法, GPT は勝沼ら⁹⁾ の方法に準じて精製した. すなわち犬の肝をドライアイス凍結後, Waring blender により破砕し, さらにテフロン・ホモジナイザーを用いて 0.05M 磷酸緩衝液 pH7.0 により30% ホモジネートを作り 0℃ 1時間攪拌後 8000G, 40分遠沈し上清をとる. 沈渣に前記同様, 磷酸緩衝液を加えて攪拌および遠沈処理を行い, 上清分画を採取し, はじめにえた上清と合せて GOT, GPT の粗酵素材料とした.

GOT の精製は GOT 粗酵素材料に硫酸を 25 g/dl から 50 g/dl を加えた分画をとり, これに malate 0.05M, pyridoxal phosphate 0.0001M, α -ketoglutarate 0.002M を加え, 70℃, 5分間加熱後 7000G, 30分遠沈して上清をとり前と同じく硫酸, 25 g/dl から 50 g/dl までの分画をとる. 次に 0.01M 磷酸加里緩衝液 pH7.0 中で 8時間透析し DEAE-cellulose による Column chromatography を行った.

まず, 0.005M 磷酸緩衝液 pH7.0 を用いて, 展開し, 少量の非吸着部 GOT を溶出した後, 0.2M NaCl による gradient elution を行って吸着部 GOT を溶出採取した. 吸着部 GOT は上清分画局在のもので, その活性は約 4300 単位 (蛋白質 2.4mg/ml) で以後の

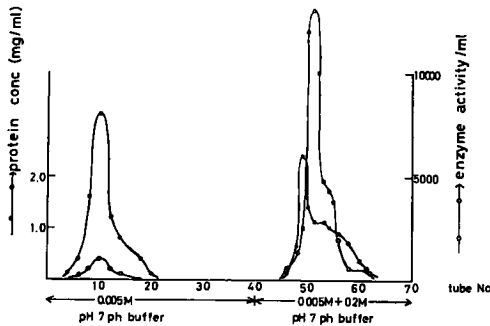
実験に用いた。(図1)

図1 犬肝臓GOTのDEAE
cellulose column chromatogram



GPTの精製はGOTと殆んど同様の方法で行なった。先ず硫酸0~25g/dlの分画をとり上清にL-alanine および glutathion をそれぞれ0.05M, 0.001Mとなるように添加した後, 37℃10分, 次いで60℃, 5分の加熱を行ない, 7000G, 30分遠沈後の上清を前回同様硫酸分画し, protamin処理後(50mg/100g)硫酸10~20g/dl分画をとり, 0.001M磷酸緩衝液PH7.0で透析の後DEAE-cellulose column chromatographyによる分離を行なった。展開液および溶出方法はGOTの場合と同様である。GPTは比較的活性の低い第一のpeakと第2の主peakに分かれ主peakのGPT活性は13000単位(蛋白量2.4mg/ml)であり, この部を以後の実験に使用した。(図2)

図2 犬肝臓GPTのDEAE cellulose
column chromatogram



4. 検索方法

1) 血清の採取

体重10~20kgの絶食犬に総活性30万単位の精製GOTおよびGPTを別々に10 μ curieのradioiod-

inated serum albumin (RISA)と共に静注し, 注射後1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20時間目に反対側の前肢静脈より採血し血清中のGOT, GPT活性およびGISAの放射能を測定した。

2) 胸管リンパ液の採取

12時間絶食後の犬にネプタール麻酔(25mg/kg)を施し, 胸管内にビニール・チューブを挿入して経時的にリンパ液を分画採取し, リンパ中のGOT, GPT活性を測定した。

3) 胆汁の採取

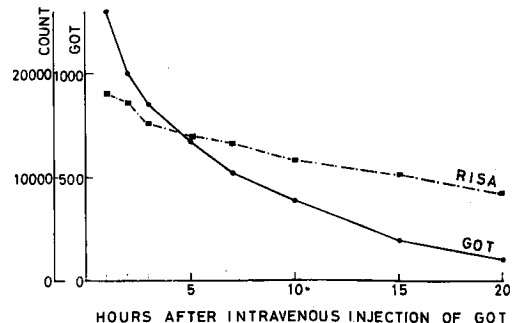
絶食麻酔犬の総胆管内にビニール・チューブを挿入後, 胆汁を分画採取して胆汁中GOT, GPT活性および予め静注したRISAの胆汁内放射能を測定した。

III 成 績

1. 精製GOTの血中からの消失

硫酸沈澱処理後DEAE-cellulose column chromatographyを用いて精製した総活性約30万単位のGOT10 μ curieのRISAと混合して犬の前肢静脈内に注射し, 以後経時的に反対側の前肢静脈より採血して血中GOT活性およびRISAの放射能を測定した。その成績は図3の如くである。すなわち静注後1時間目の血中GOT活性は約1300単位迄上昇し, 最初の3時間は比較的急速にGOT活性の低下がみとめられたがそれ以後はゆるやかな減衰曲線を描いて減少し20時間後には約100単位まで低下した。注射1時間後の血中GOT活性を100%として, その後の活性変動を百分率で表わすと, 2時間後約76%, 3時間後65%, 5時間後で約52%となり, 10時間で約30%, 15時間で15%, 20時間後には約7%に減少した。また, 本酵素の血中からの消失半減期は約6時間であった。

図3 精製GOTおよびRISAの血中からの消失



血中 R I S A の放射能の経時的変化は注射 1 時間後の放射能を 100% とすると 5 時間後で約 80%, 10 時間で約 65%, 15 時間で約 57%, 20 時間で 47% と G O T の消失曲線に比べて, はるかに緩除であった。

2. 精製 G P T の血中からの消失

総活性約 30 万単位の精製 G P T を R I S A 10 μ curie と共に混合静注した後の血中 G P T 活性の変動は, 図 4 の如くである。すなわち全経過を通じてなだらかな消失曲線を描き, 注射 1 時間後の G P T 活性値に対する百分率で表わすと注射後 2 時間では約 95% 3 時間では約 90%, 5 時間では約 82% に減少し, 10 時間後では約 65% 15 時間後で 55% 20 時間後で約 50%

図 4 精製 G P T および R I S A の血中からの消失

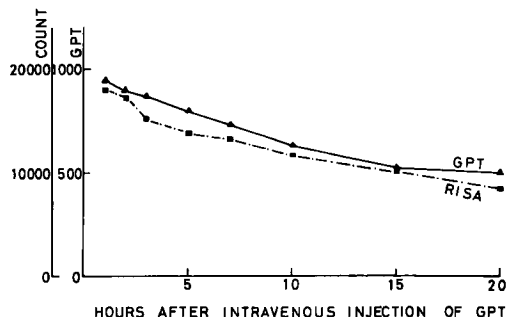
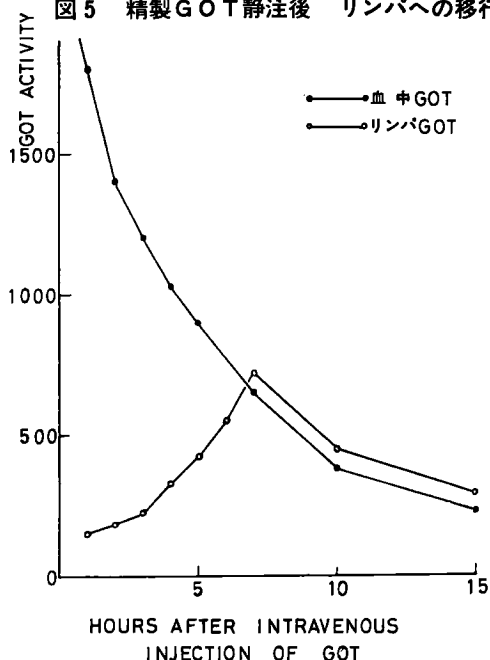


図 5 精製 G O T 静注後 リンパへの移行



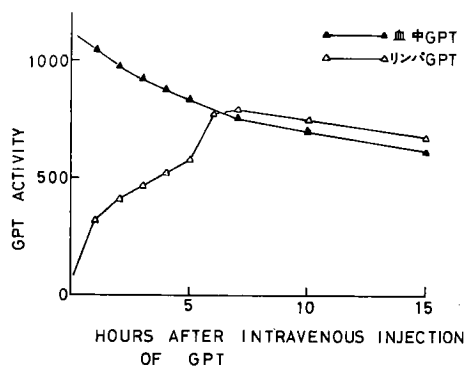
で, 時間に対する減少率は G O T に比して極めて緩除で R I S A の消失曲線にほぼ一致した変動を示した。(図 4)

3. 精製 G O T, G P T のリンパへの移行

精製 G O T の総活性 30 万単位を犬の静脈内に注射後胸骨リンパ液中の G O T 活性を経時的に測定し, 同時に血中のそれも測定すると, 図 5 の如くなる。すなわち G O T 活性は直ちに上昇し, 初め約 7 時間後に最高値に達し, 血中 G O T 活性とはほぼ同値となり以後血清 G O T よりやや高い値を示しながら平行した減少曲線を示した。血清およびリンパ活性の平衡時における血清 G O T の消失率は約 62% であった。

総活性 30 万単位の G P T を静注した後同様にリンパ液および血中の活性の変動を追及すると図 6 の如くなる。すなわちリンパ液中の酵素活性の変動は G O T のそれと類似したパターンを示し, 注射後約 7 時間で平衡に達し以後漸減した。血清 G P T の平衡到達点における消失率は約 79% で, G O T のそれに比して僅少であった。

図 6 精製 G P T 静注後 リンパへの移行



4. 精製 G O T, G P T の胆汁への排泄

総活性 20 万単位の精製 G O T, 総活性 25 万単位の G P T を同時に 10 μ curie の R I S A と共に静注して, 分画採取した胆汁内の酵素活性および R I S A の放射能を経時的に観察すると図 7 および 8 の如くなる。すなわち胆汁 G O T 活性は, G O T 注射前では 20 単位であったが静注後, 軽度の上昇傾向を示し約 5 時間後には上昇度はやや高くなり 120~150 単位迄上昇した。又全経過を通じて胆汁 G O T 活性は血清 G O T よりも常に低値であった。胆汁 G P T の変動も胆汁 G O T と殆んど同様の変動曲線を描いて経

図7 精製GOTおよびRISA静注後
胆汁への移行

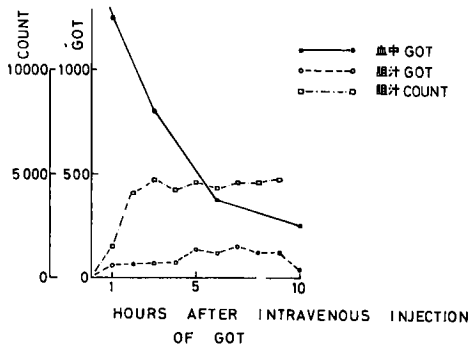
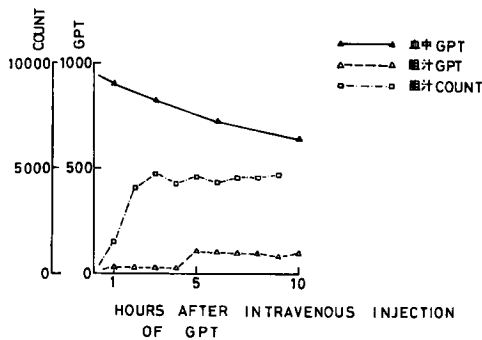


図8 精製GPTおよびRISA静注後



過し、静注前の12単位から最高110単位迄増加した。GPT静注5時間以後の血清GPTに対する胆汁GPTの活性比は、GOTのそれに比べて一般に低い値を示した。他方、RISAの注射後の胆汁内放射能の変動は、注射後直ちに上昇し初め、3時間後に最高値に達しその後も高値を持続した。

IV 総括および考案

種々の肝障害時に、肝の各種病態によって血清GOT、GPTが異った割合で上昇し、従ってGOT/GPT比が変化すること¹⁰⁻¹²⁾は広く知られており臨床診断にも意義がある。例えば急性肝炎患者血清ではGPT>GOTとなることが多いのに対して、肝硬変例ではGOT>GPTの関係を示す場合が多いがこの変動機序についてはまだ不明の点が多い。

一般に、血中GOT、GPTレベルの変動要因は、細胞内酵素の相対的量的変化、特定酵素に対する選択的な細胞膜の透過性の亢進¹³⁻¹⁶⁾、あるいは細胞内

酵素の局在様式等肝細胞自体の側にある場合と、一旦遊出した血中酵素レベルの動態に関する要因とに分けて考えられる。後者については勝沼らはヒト血清中にGPTを活性化する物質を発見したと報告したが、教室の高木¹⁵⁾は臨床的には有意なGOT、GPT活性のinhibiterあるいはactivaterは存在せず、血清GPT、GOT活性の変動にさいして、その影響を考慮する指要はないと論じている。著者らは実験的に精製GOT、GPTを静注して血中GOT、GPTの消失動態を体液への分布、および胆汁中への排泄との関係において検討を試みた。

GOTの血中からの消失は、指数函数的曲線を描き最初の約3時間迄は比較的急速に、以後ゆるやかに減少を示しており、RISAの減少曲線とは明らかに異った態度を示している。すなわちBeekenら¹⁶⁾によればRISAの代謝相における半減期は約17.5日であるのに対してわれわれの成績では、GOTのそれは約6時間であり、酵素蛋白の代謝回転が極めて速いことを物語っている。

GPTの血中より消失する割合はRISAの減少する割合と殆んど一致しており、血中GPTは、少くとも静注後20時間後はGOTの消失速度に比べて明らかに緩徐である。これは、GOTの血管内の消失速度がGPTより大きいためと解される。臨床的に急性肝炎患者でTransaminaseの最高期から減少期にかけてGOT、GPTの血中レベルがGPT>GOTとなる場合が多いが、その原因の一つとして、以上の動物実験結果が示す様にGOTの血中からの消失速度がGPTに比して速いことと考える。

次に血中トランスアミナーゼの消失と本酵素の組織間液への移行との関係を検討する目的でGOTおよびGPT静注後の胸管リンパ液内酵素活性を測定した。精製GOT、GPTの静注後、リンパ中のGOT、GPTは直ちに増加し初め、約7時間後に血液中の両酵素の活性はリンパ中の活性と平衡状態に達し、それ以後は血液およびリンパ中の活性は共にほぼ等しい割合で減少している。即ちGOT、GPT共に拡散平衡に達する迄の時間は約7時間で酵素蛋白はすみやかに血管外へclearされることを示唆している。GOT、GPTの分子量はそれぞれ約120,000および140,000といふ、RISAの約69,000に比べてはるかに大きいにもかかわらず、酵素蛋白の半減期がアルブミンに比べて短い理由については、未だ確証はない。平山ら¹⁷⁾によると血漿蛋白の分散速度は分子量の大きさに反比例するといふ、Beekenら¹⁸⁾

は大分子蛋白の半減期が比較的短いのは、血管外プールが少いためと主張している。事実、GOT, GPTの血管外プールが、アルブミンのそれより少ないことが明らかにされており、従って両酵素の分散期における血中クリアランスがアルブミンより速やかであったと考えられる。

平衡到達後のリンパ中のGOT, GPTの活性は血中の活性よりやや高い値を保ちながら減少しているが、これはリンパ中におけるGOT, GPTの失活度が血中のそれよりも少ないという可能性も考えられる。

次に、GOT, GPTの血中レベルに影響をおよぼす肝細胞外要因として酵素の胆汁中への排泄を考慮しなければならない。精製GOT, GPT静注後の胆汁内GOT, GPTは、静注1時間後より軽度の増加傾向を示し、約5時間後にそれぞれ約140単位および110単位迄上昇した。この実験結果は血中GOT, GPTは幾分胆汁中に排泄されることを示唆している。しかし血中GOT, GPTが最初急速に低下し胆汁中のRISA放射能が急上昇する時期に一致して胆汁中に排泄されるGOT, GPT活性はごくわずかであり、むしろややおくれで増加する傾向にあることから胆汁を介してのGOT, GPTの排泄が酵素の血中消失に大きな役割を演じているとは考えがたい。たゞ、GOT, GPTの血中濃度

に対する胆汁内酵素活性比は、GOT>GPTであり、従ってGOTの方がGPTに比べて幾分排泄され易いと思われる。

血管外排泄経路の1つとして腎が考えられるが、腎糸球体を通過しうる蛋白分子の大きさは分子量70,000迄といわれており従って血中GOT, GPTが尿中に排泄されうる可能は極めて少ないと考えられる。

V 結 論

犬の肝より精製したGOT, GPTを犬に静注し、両酵素の血中からの消失およびリンパ並びに胆汁中への移行を観察し次の結果を得た。

- 1) 静注されたGOTの血中寿命はGPTに比べてはるかに短く、その半減期は約6時間であった。
- 2) リンパ中のGOT, GPTは静注後直ちに増加し初め、約7時間後に血中酵素活性と平衡に達した。その後はGOT, GPT共に平行した減少を示したが、リンパ中の酵素活性は血中酵素レベルよりやや高い。
- 3) 胆汁中のGOT, GPTは静注後、軽度の上昇を示したにすぎず胆汁中への排泄はごく僅かであるが両酵素の排泄を比較するとGOTの方がGPTに比べて排泄され易い傾向がある。

文 献

- 1) LaDue, J. S, Wroblewski, F, & Karmen, A: Science **120**: 477, 1954.
- 2) Karmen, A, Wroblewski, F, & LaDue, J. S.: J. Clinical. Invest. **34**: 126, 1955.
- 3) Wroblewski, F, & LaDue, J. S: Snn. Intern. Med. **43**: 345, 1955.
- 4) Wroblewski, F, Jerris, G. & LaDue, J. S.: Ann. Intern. Med. **45**: 782, 1956.
- 5) 勝沼信彦, 松沢健夫, : Proc. Symp. Chem. Physiol. Path. **2**: 186, 1962.
- 6) Reitmann, S. & Frankel, S.: Amer. J. Clin Path. **28**: 56, 1957.
- 7) Jenkyns, W. T., Yaphantis, D. A.: J. Biol. Chem.
- 8) 松沢健夫, 藤野明男: ビタミン **25**: 205, 1961.
- 9) 勝沼信彦, 松田誠: 酵素化学シムポジウム **16**: 70, 1962.
- 10) 原田尚: 日消会誌 **55**: 591, 1958.
- 11) Schmidte, E, Schmidt, F, W.: Klin. W-schr. **36**: 172, 1958.
- 12) 鹿島洋: 日消会誌 **60**: 641, 1963.
- 13) Henley, K. S, Wivgins, H. S,: Gastroenterology. **36**: 1, 1959
- 14) 山村雄一: 最新医学 **20**: 354, 1965.
- 15) 高木新: 肝臓 **9**: 363, 1968.
- 16) Beeken. W. L, Volwier, W.: J. Cllin. Invest. **41**: 131
- 17) 平山千里: 内科, **15**: 1004, 1965.

Serum Enzymes in Liver Impairment
Experimental and Clinical Studies on Serum
Enzymes in Obstructive Jaundice

By

Yoichi Kondo

The First Department of Internal Medicine
 Okayama University Medical School
 (Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

Alkaline phosphatase (ALP), glutamic oxaloacetic trans-aminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), isocitrate dehydrogenase (ICDH), glutamate dehydrogenase (GDH), glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) and bilirubin were assayed using the sera obtained from the dogs with bile duct ligation as well as the patients obstructive Jaundice.

The influence of bile acid on enzyme release from the liver tissue was examined. Following perfusion of the dog liver with a solution containing bile acid, the liver slices were prepared. The sliced materials were incubated into Krebs-Ringer's solution for a certain period, and the enzymatic activities in the medium as well as the oxygen consumption in the slices were measured.

1. The serum bilirubin level started to increase 2 days after the ligation and reached to a maximum level 4 days after the operation, which was followed by gradual decrease.
2. The activities of all the serum enzymes estimated in the dog risen 6 to 12 hours before the elevation of serum bilirubin, especially the increase in activities of GDH, ICDH and GOT appeared to be earlier than those in G-6-Pase and GOT. Out of all the enzymes mitochondrial GDH and cyto-plasmic GPT showed the most remarkable increase.
3. The histological changes of the ligated liver such as degeneration or necrosis remained to a minimum extent over the period of increase in the serum enzyme activities.
4. In the serum obtained from the patients with obstructive jaundice the increase in activities of mitochondrial GDH and microsomal G-6-Pase was prominent.
5. When the liver slices perfused with bile acid solution were incubated into Krebs-Ringer's solution, the release of GDH and G-6-Pase into the medium was accelerated selectively, accompanying the diminished oxygen consumption in the liver tissue. This result seems to suggest that bile acid may influence the elevation of the serum enzymes in the case of obstructive jaundice.

Part 2

Clearance of Transaminases (GOT, GPT) - With
 Special Reference to Their Distribution in The
 Body Fluids and Excretion into The Bile

Transaminases (GOT, GPT) purified partially from the dog liver were separately injected into the vein of normal dogs.

Following the injection the enzyme levels in the blood and bile were measured.

1. The disappearance of the exogenous serum GOT was more rapid than that of GPT after the administration, and the half-life of GOT in the circulation was estimated to be approximately 6 hours.

2. In the lymphatic fluid the activities of the exogenous GOT and GPT increased immediately after the injection and reached to the similar levels with the serum activities 7 hours after the injection, then both activities decreased in a parallel manner, showing a little higher levels in the lymphatic fluid than those in the bile.

3. In the bile the activities of GOT and GPT elevated very slightly following the injection and GOT appeared to be excreted more easily than GPT.