

## 肝酵素の血中遊出動態に関する臨床的研究

## 第 2 編

肝障害時における肝細胞上清およびミトコンドリア  
局在酵素の血中遊出について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

佐 野 良 英

〔昭和 42 年 11 月 15 日受稿〕

## 緒 言

肝疾患時における血清諸酵素変動が各種肝病態と密接な関係をもつことは明らかであるが、現在なおその詳細は明らかでない。著者は第 1 編において、四塩化炭素投与ラットについて肝細胞上清およびミトコンドリア局在 glutamic oxalacetic transaminase (GOT) を分画測定すると同時に、同血清 GOT の電気泳動分析を行ない、更に各種肝疾患患者血清 GOT について検討した結果、 $\text{CCl}_4$  投与ラットでは肝組織にほとんど光学顕微鏡的变化を認めない早期より GOT, GPT の血中遊出があり、肝細胞障害極期には mitochondrial GOT (mit-GOT) の血中出現を認めた。また急性肝炎患者についても、その極期には上清局在 GOT (sup-GOT) とともに mit-GOT の血中出現を確認したが、一方肝硬変症患者血清については、その GOT 活性の上昇は sup-GOT の血中遊出のみによるものと認められた。これらのことから、肝酵素の血中遊出機構は、肝病態の差異により一様でないことが推定され、とくにその細胞内局在との関係が注目された。

そこで、本研究は、GOT, glutamic pyruvic transaminase (GPT), isocitric dehydrogenase (ICD) および glutamic dehydrogenase (GLD) の 4 種酵素について肝細胞内分布を検討するとともに、各種肝病態におけるこれら酵素の血中活性変動を追求し、酵素の肝細胞内分布の差異にとまなう血中遊出動態に検討を加えた。

## 研究材料及び方法

## 1) 研究材料

実験動物には 150 g 前後のラットを用いた。無処

置ラット 5 匹を対照群とし、実験的肝障害には 25%  $\text{CCl}_4$  オリーブ油を体重毎 100 g 0.2 ml あて経口投与し、以後 3, 6, 12, 24 および 48 時間目にそれぞれ 5 匹ずつ瀉血屠殺し、すみやかに血清および肝組織を採取し、以後の実験材料とした。

臨床例は当教室入院患者で、一部急性肝炎例を除き、すべて腹腔鏡直視下肝生検によつて診断が確認された急性肝炎 9 例、慢性肝炎 24 例、肝硬変 11 例および肝内胆汁うっ滞 5 例であり、それぞれの患者血清が各酵素活性測定に用いられた。なお、肝細胞内酵素分布の測定に用いられたヒト肝は、当大学外科教室の好意により非肝疾患患者の手術時に得たものである。

## 2) 肝細胞分画法

0.25 M sucrose (pH 7.4 に調製) を用い、まずラット肝は 10%、ヒト肝は 1~10% の homogenate を作製し、遠心分離法によつて肝細胞の分画をおこなった。

## 3) 酵素活性測定法

GOT, GPT は Reitman-Frankel 法<sup>1)</sup> により測定したが、DEAE-cellulose column chromatography 溶出液については Karmen 法<sup>2)</sup> を用いて測定した。ICD は Bowers<sup>3)</sup>, GLD は Olson<sup>4)</sup> らの記載にほぼ準じ、表 1 に示す如きそれぞれの反応系によつて測定した。肝ミトコンドリア ATPase 活性の測定は Recknagel らの方法<sup>5)</sup> を用い、2, 4-dinitrophenol (DNP) および  $\text{Mg}^{++}$  でそれぞれ活性化される ATPase 活性を測定し、この両者の活性比の推移をミトコンドリア傷害の指標とした。なお、以上の諸酵素活性の測定はすべて 37°C でおこなった。

表1 Assay Systems

ICD	
Tris · HCl-MnCl <sub>2</sub> solution*	2.2ml
0.1M dl-isocitrate	0.1
2.5mM TPN	0.2
serum or diluted liver homogenate	0.5
total volume	3.0

blank は H<sub>2</sub>O を使用  
(活性: m $\mu$  moles/hr./ml.)

## GLD

serum		liver homogenate	
0.2M potassium phosphate buffer (pH 7.6)	2.0		1.6ml
5.6mM DPNH	0.10		0.10
0.16M $\alpha$ -ketoglutaric acid**	0.15		0.15
2M NH <sub>4</sub> Cl	0.15		0.15
8mM KCN	/		0.20
0.5M nicotinic acid	/		0.20
試料	0.60		0.60
total volume	3.00		3.00

(活性: m $\mu$  moles/hr./ml.)

\* 0.01M MnCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 0.1M Tris · HCl (pH7.5) を 5:2:15 の割合に混ず

\*\* blank には  $\alpha$ -Ketoglutaric acid を除いたものを用いた

## 4) 蛋白定量法

Folin-Ciocalteu の Lowry 変法<sup>6)</sup> を用いた。

## 5) ミトコンドリア破壊法

試料を凍結融解した後に、さらに音波処理 (10 K C7分) をおこなった。

## 6) GOT-isozyme の分画法

DEAE-cellulose column chromatography を用いて肝および血清 GOT の分画をおこなった。2×20cm の DEAE-cellulose column を作製し、0.005 M, pH 7.0 phosphate buffer でカラム平衡をおこなった。試料としての肝 homogenate あるいは血清は、予め sephadex (G-25) によりゲル濾過したものを使用した。溶出は氷室で、ほぼ勝沼らの記載<sup>7)</sup> に準じ、それぞれ 0.005 M, 0.1 M, および 0.3 M phosphate buffer による段階式が用いられ、1時間約 30~50 ml の流速で溶出し 5 ml ずつ分取した。血清中 mit-GOT の同定は chromatography 分画後、さらにその酵素学的特性の検討により、すなわち肝上清およびミトコンドリア GOT それぞれの km の差を利用して確認した。

## 成績

## 1) 各酵素の肝細胞内分布

非肝疾患患者の手術時に得たヒト肝および無処置ラット肝の homogenate を遠心分離法により分画し、細胞各分画中の各酵素活性を測定した結果を一括して表 2 に示した。活性分布は各分画活性値の総和に

表 2 酵素の肝細胞内分布 (5例平均値)

ヒト	ラット			
	上清	マイクロゾーム	ミトコンドリア	核
ICD	92%	3%	3%	2%
GPT	93	3	3	1
GOT	77	6	9	8
GLD	12	10	48	30

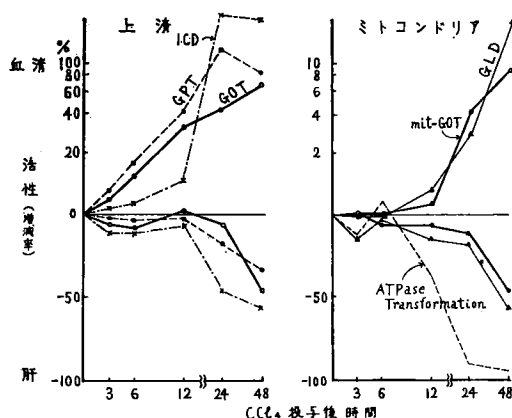
ラット	ヒト			
	上清	マイクロゾーム	ミトコンドリア	核
ICD	87%	2%	8%	3%
GPT	95	3	0.5	1.5
GOT	68	4	17	11
GLD	10	10	68	12

対する百分比で、かつそれぞれ 5 例の平均値として示されている。ヒト肝およびラット肝ともに、その主要分布が細胞上清にみられるものは ICD, GPT, 次いで GOT であり、ミトコンドリア分画にみられるものは GLD および GOT の一部である。この成績は従来<sup>8)</sup>の報告ともほぼ一致する。

2) CCl<sub>4</sub> 急性肝障害ラットにおける血清および肝内各酵素活性の経時的変動

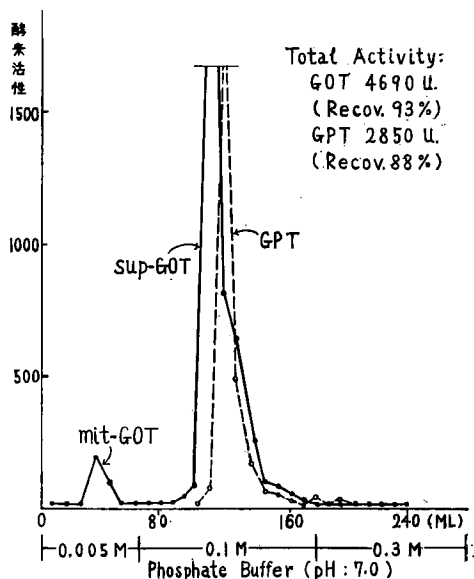
肝細胞内局在を異にするこれら酵素の血中遊出動態をまず実験動物を用いて検討するために、CCl<sub>4</sub> 経口投与による急性肝障害ラットの血清および肝について各酵素活性を経時的に測定し、肝の光学顕微鏡的变化と対比した。図 1 にみる如く、光学顕微鏡的に細胞壊死を認めない早期の 3~6 時間目に既に ICD, GPT, GOT などの上清局在酵素の一種の活性上昇傾向がみられるが、ミトコンドリア局在酵素 GLD, mit-GOT の血中出現は全く認められず、またミトコンドリア障害の一指標とみなしうるミトコンドリアの DNP-ATPase 活性の Mg<sup>++</sup>ATPase 活性に対する比率も無処置対照肝のそれと有意の変動をみない。12~48 時間目の著明な肝小葉中心性壊死を示す時期には、上清分布酵素およびミトコンドリア

図1 急性 CCl<sub>4</sub> 障害ラットの肝および血清酵素活性の経時的変動



分布酵素ともに肝での活性低下に対応して、血中に顕著な活性上昇 peak を示し、それと平行してミトコンドリアの ATPase 活性比は対照肝のそれに比し顕著な推移 (比率の逆転) をみており、明らかなミトコンドリアの障害が推定された。48時間目の血清 GOT の DEAE-cellulose カラムクロマトグラムは図2に示す如くで、mit-GOT の出現をみる。

図2 DEAE-Cellulose カラムクロマトグラム (ラット血清: CCl<sub>4</sub> 投与後48時間目)



3) 肝疾患各病態における各酵素の血中パターン  
各酵素活性は同一患者血清についてはできる限り同時に測定したが、各酵素活性値相互の比較を容易にするために、図3、図4に示す如くトランスアミ

図3 肝疾患各病態における血清酵素パターン(1)

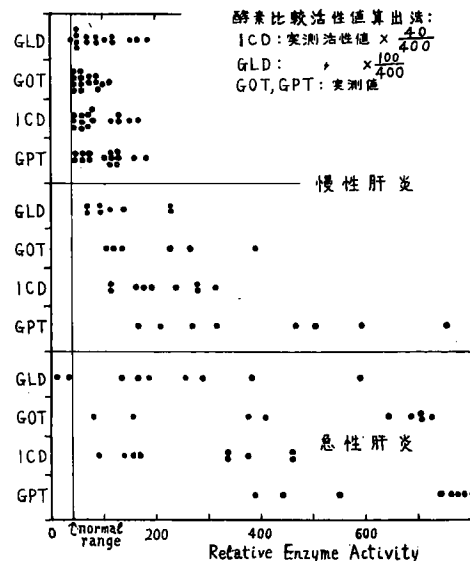
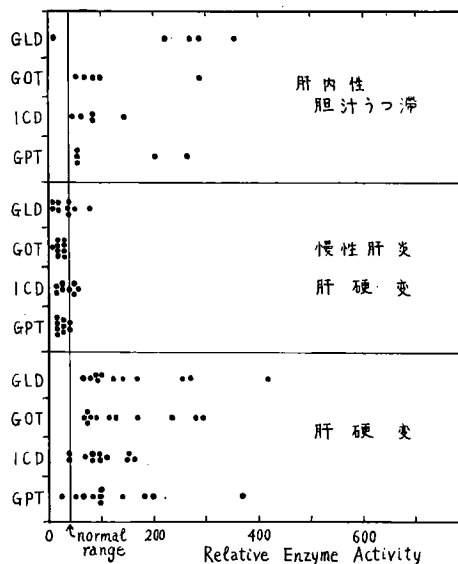


図4 肝疾患各病態における血清酵素パターン(2)



ナーゼ活性正常上限値を基準に ICD, GLD 活性をそれぞれ換算し、すべて比較的な活性値として表現した。急性肝炎時の酵素パターン (図3, 下端) は概して上清局在酵素の顕著な血中上昇が特徴的であるが、同時にミトコンドリア局在酵素の血中上昇をも伴う傾向にあり、とくに極期には各局在酵素の様な上昇傾向が特異的であった。これは CCl<sub>4</sub> 投与ラットの12~48時間目の血清のそれとほぼ類似した。慢性肝炎でトランスアミナーゼ活性の波状的変

動を繰返す場合の顕著な上昇期では(図3, 中央), GLDの上昇は上清局在酵素の上昇度に比し比較的軽度にとどまつた。

慢性肝炎例で血清トランスアミナーゼ活性100単位前後の上昇をかなり長期に持続する症例では(図3, 上端), 他の上清分布酵素1CD活性も同程度に軽度上昇がみられ, さらに症例の多くは軽微ながらGLD活性の上昇をともなつた。

肝硬変症で血清トランスアミナーゼ活性が軽度ないし中等度に上昇を持續している症例では, 肝炎の場合にみられるGPT>GOTとは逆に, GOT>GPTが特徴的であるが(図4, 下端), 他の酵素パターンでも肝炎のそれとは全く対称的であつた。すなわち, 上清分布酵素の血中上昇程度に比しミトコンドリア局在GLDの上昇が顕著であることが注目される。

また, 中毒性肝炎および原発性胆汁性肝硬変を含む肝内胆汁うづ滞例も(図4, 上端)肝硬変症と類似のパターンを示し, 上清局在酵素の上昇度に比しGLD活性の上昇が顕著であつた。

血清トランスアミナーゼ活性が正常範囲にある慢性肝炎および肝硬変症では(図4, 中央)他の各酵素活性もほとんど正常範囲にあつた。

#### 4) 肝ミトコンドリア局在酵素の血中遊出

肝ミトコンドリア局在酵素としてはmit-GOT, GLDを測定したが, ヒト血清中のmit-GOTについては前述のCCl<sub>4</sub>投与ラット血清の場合と同様に, DEAE-

cellulose column chromatographyを用いて分離同定した。各種肝疾患患者血清についてGOT, mit-GOT, GLDを同時に測定した結果は表3に示す如くである。mit-GOTは, 肝炎例でGOT活性801, 890, 940単位を示す顕著な上昇期にのみ, それぞれ総活性の4.8%, 6.1%, 3.5%の割合で血中に検出された。この時, GLD活性はそれぞれ244, 120, 250単位で, その上昇度は軽微であつた。これに反し, mit-GOT血中出現を全例に認めなかつた肝硬変, 肝内胆汁うづ滞例において, GLDの血中上昇が顕著であつた。

#### 総括ならびに考案

肝疾患時における血清酵素活性の変動機序の詳細は現在必ずしも明らかではないが, 一般には1) 障害肝細胞よりの酵素の血中遊出, 2) 酵素の胆汁中への排出障害, 3) 肝細胞での酵素の生成異常などの機序が重要視されている。本研究で選定した4種の肝分布酵素はどれも肝障害時肝臓に減じて血中に増加することが知られており, 上述1)に属する逸脱酵素<sup>9)</sup>とも呼ばれているものである。

同じく逸脱酵素群に属しても, 各酵素の血中上昇度やその変動様式が一様でないことは従来より指摘されており, 細胞内酵素含量の多少, 酵素の細胞内局在の相違, 酵素の細胞膜透過性の難易, および血中クリアランスの相違などが酵素の血中活性変動を支配する因子と考えられている<sup>10)</sup>。

ところで, 最近Henley<sup>11)</sup>らは肝切片を浮遊あるいは肝細胞を分散すると特異的にGPTが細胞外に漏出することを認め, 引続き市原<sup>12)</sup>らも同様に肝細胞浮遊実験をおこない, 肝細胞内種々の酵素活性を分散前後で比較した結果, 漏出しやすいのは上清分布の酵素で, ミクロゾームやミトコンドリアに局在する酵素はほとんど細胞内に残存することを見出した。このように酵素の漏出にはその種類あるいはその局在によつて選択性のあること, さらに実験条件下の肝細胞が形態学的に破壊されていないことから, この際の酵素漏出はもつぱら細胞膜透過性の亢進によることが実証された。他方, 勝沼<sup>7)</sup>, 和田<sup>13)</sup>, Massarat<sup>14)</sup>らはGOT-isozymeの立場から, 電気泳動, クロマトグラフィーあるいは免疫化学的方法を用いて肝炎患者の血清GOTの分離同定を試みた結果, 肝炎時の血清GOTの上昇は肝細胞上清成分のGOTのみの血中遊出によるものであることを指摘した。

表3 肝疾患時におけるミトコンドリア局在酵素の血清レベル

症例 No.	診 断	血清 GOT		血清GLD
		全活性値	mit-GOT %	
1	輸 血 後 肝 炎	810	4.8	244
		890	6.1	120
		180	0	
2	輸 血 後 肝 炎	380	0	400
		225	0	240
3	輸 血 後 肝 炎	185	0	50
		940	3.5	250
4	慢 性 肝 炎	185	0	140
5	慢 性 肝 炎	410	0	250
6	肝 硬 変	240	0	530
7	肝 硬 変	54	0	210
8	肝内性胆汁うづ滞	145	0	650
9	肝内性胆汁うづ滞	280	0	390
10	肝 性 昏 睡 (悪急性肝萎縮)	99	0	0

さて、CCl<sub>4</sub>投与後肝細胞の生化学的および形態学的変化は従来の研究からは明らかにされており、まず endoplasmic reticulum あるいは原形質膜より障害が始まり、かなりおくれでミトコンドリア障害ないし細胞呼吸障害を随伴してくるという。著者が観察した各酵素の血中遊出についてみると、早期に血中上昇をみたのは上清分布の諸酵素であり、光学顕微鏡的に肝細胞壊死の現れる12時間目に至り、ミトコンドリア ATPase 活性比の変化とともにミトコンドリア局在の GLD および mit-GOT の血中上昇が確認された。以上の成績は肝細胞内分布各酵素がそれぞれ該当する障害の局在を鋭敏に反映して血中に遊出することを示唆している。

臨床例についてみるに、まず前述の CCl<sub>4</sub> 中毒ラットの細胞壊死出現期に相当する各局在酵素の血中上昇がみられたのは急性肝炎極期の患者血清である。急性肝炎時の肝細胞内小器管の微細構造の変化を調べた谷川<sup>10)</sup>によると、病初期には小胞体の変化がもつとも顕著であるが、同時に Disse 氏腔に面する細胞膜にも変化のみられることを指摘している。さらに小坂<sup>16)</sup>は同じく急性肝炎時の肝実質壊死巣の電顕的検索から、細胞膜破壊にともなう肝細胞内各顆粒成分の Disse 氏腔および静脈洞への遊出を確認している。これらの所見を併わせ考えると、本症の極期における酵素の遊出は膜透過性の亢進だけでなく、肝細胞の崩壊自体も酵素遊出に関与することが考えられる。

上清分布酵素の血中遊出がミトコンドリア局在酵素のそれに優位する傾向は慢性活動性肝炎で顕著であり、急性肝炎でも極期以外はほぼ同様の傾向がみられた。GLD/GPT 活性比を求めると慢性活動性肝炎で最も小さく約 0.55、急性肝炎で約 0.7、肝硬変で約 2.5、肝内性胆汁うっ滞で約 6.5 である。

ミトコンドリア局在酵素 GLD の血中遊出が上清分布酵素のそれに優位する傾向を示すのは肝硬変および肝内性胆汁うっ滞例である。上述の肝炎群と全く対称的なこの酵素パターンの変動は、それぞれの病態にもとずく撰択的な肝細胞障害の反映と考えられる。肝硬変の場合肝循環障害にもとずく histologic hypoxia による肝ミトコンドリア障害の存在は当然考えられることであり、また cholestasis における肝実質細胞の病像に関しても、その成因はなお明らかでないが、撰択的なミトコンドリアの形態学的異常が電顕的に確認されている<sup>17)</sup>。他方、同じくミトコンドリアに局在する mit-GOT はこれら患者血清中

には認められなかった。

肝細胞上清分布酵素 GOT, GPT, ICD は、肝病態の如何を問わずほぼ並行して血中に増減したのに反し、肝ミトコンドリアに局在する GLD と mit-GOT の血中遊出は、肝病態の相違により対称的な態度を示した。勝沼<sup>18)</sup>によれば、ミトコンドリアを超音波で破壊するときもつとも容易に可溶化されるのは、GLD, mit-GPT であり、mit-GOT は可溶化され難く、顆粒との結合の強弱によつても酵素遊出に難易のあることが想定されるという。著者の臨床観察の結果では、mit-GOT の血中出現は肝炎極期の GOT 活性の顕著な上昇期に限って認められ、一方 GLD の上昇はむしろ肝硬変、cholestasis の場合に顕著にみられた。従つて、mit-GOT の血中出現はかなり広範囲な肝細胞崩壊に由来することが推定され、一方 GLD の血中上昇はむしろ撰択的な肝ミトコンドリア障害を反映しているものと考えられる。

## 結 論

肝疾患時における血清酵素活性変動の臨床的意義を解明する研究の一環として、GOT, GPT, ICD, GLD の4種酵素の肝細胞内局在の差違にともなう血中遊出動態を明らかにするべく、CCl<sub>4</sub>投与ラットと各種肝疾患患者血清について検討を行ない以下の成績を得た。

- 1) ヒト肝およびラット肝について遠心分離法により各酵素の細胞内分布を調べた結果、ICD, GOT, GOT の主要分布はともに細胞上清にあり、GOT の一部および GLD はミトコンドリアに局在していることを確認した。
- 2) CCl<sub>4</sub>急性中毒ラットについて、早期に血中上昇をみたのは上清分布の諸酵素であり、光学顕微鏡的に明らかな細胞壊死の出現をみる極期に至り、ミトコンドリアの障害と並行して同局在の GLD および mit-GOT の血中出現を認めた。
- 3) 急性肝炎患者の血清酵素パターンはこれに類似し、その極期には各局在酵素の血中上昇がみられたが、慢性活動性肝炎の血清トランスアミナーゼの急峻な上昇例では上清分布酵素の血中遊出が比較的顕著であつた。
- 4) 肝硬変症と肝内性胆汁うっ滞例はともに、肝炎群とは対称的にミトコンドリア局在の GLD の血中上昇が上清分布諸酵素のそれに優位する傾向がみられた。
- 5) 肝細胞上清分布の GOT, GPT, ICD は肝病態

の如何を問わず、ほぼ平行的な血中消長を示した。

6) 肝ミトコンドリア局在の GLD と mit-GOT の血中遊出動態には、肝病態の差違により解離がみられ、mit-GOT の血中出現は急性肝炎および慢性活動性肝炎の GOT 活性の顕著な上昇極期に限って認め

られ、一方 GLD の上昇はむしろ肝硬変および肝内性胆汁うづ滞例に特異的にみられた。

(摺筆するに当り御指導を頂いた小坂淳夫教授、川口正光講師に深謝する)。

## 文 献

- 1) Reitman, S., Frankel, S.: *Amer. J. Clin. Path.*, **28**: 56, 1957.
- 2) Karmen, A.: *J. Clin. Invest.*, **34**: 131, 1955.
- 3) Bowers, G. N.: *Clinical Chemistry*, **75**: 260, 1958.
- 4) Olson, J. A., Anfinsen, C. B.: *J. Biol. Chem.*, **197**: 67, 1952.
- 5) Recknagel, R. O., Anthony, D. D.: *J. Biol. Chem.*, **234**: 1952, 1959.
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- 7) 勝沼信彦, 松沢健夫, 吉田翼, 三雲和子: *Proc. Symp. Chem. Physiol. Path.*, **2**: 186, 1962.
- 8) 小川和朗: *生体の科学*, **12**: 106, 1961.
- 9) 高杉年雄: *日内会誌*, **59**: 527, 1962.
- 10) Hess, B.: *Enzymes in Blood Plasma*, New York, Academic Press/uc., 1963.
- 11) Henley, K. S., Pollard, H. M.: *Gastroenterology*, **36**: 1, 1959.
- 12) Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H., Inoue, H.: *J. Biol. Chem.*, **239**: 3590, 1964.
- 13) 和田 博: *総合臨床*, **13**: 758, 1964.
- 14) Massrath, S., Lang, N.: *Klin. Wschr.*, **43**: 510, 1965.
- 15) 谷川久一: *肝臓*, **7**: 35, 1966.
- 16) Kosaka, K.: *The sixth international Congress, International Academy of Pathology, Kyoto, October, 1966, Abstract, p. 19.*
- 17) Carruthers, J. S., Steiner, J. W.: *Gastroenterology*, **42**: 419, 19, 1962.
- 18) 勝沼信彦, 松沢健夫: *総合臨床*, **13**: 751, 1964.

## Clinical Studies on Plasma Levels of Liver Enzymes

### Part. II Plasma Levels of Cytoplasmic and Mitochondrial Enzymes in Rats with Acute Liver Injury and Patients with Various Liver Diseases

By

Yoshihide SANO

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

The plasma levels of isocitric dehydrogenase (ICD), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic dehydrogenase (GLD) were studied in rats with per oral doses of 0.2 ml/100g B. W. of carbon tetrachloride in a 25% mixture with olive oil and in patients with various liver diseases. Mitochondrial GOT in serum was separated by DEAE-cellulose column chromatography.

1) The elevation in the serum levels of GOT, GPT and ICD from cytoplasm occurred before the onset of parenchymal cell necrosis of the liver in a histologic sense in rats with CCl<sub>4</sub>

poisoning. Uniform elevation in the serum levels of the enzymes from both fractions of cytoplasm and mitochondria of liver cell was found in acute icteric period of viral hepatitis as well as in rats in 12 hours to 48 hours with  $\text{CCl}_4$  poisoning.

In the case of active chronic hepatitis the elevation in serum levels of GOT, GPT and ICD from cytoplasm was predominant as compared with relatively low elevation of mitochondrial GLD.

2) The distinct elevation in serum level of mitochondrial GLD in liver cirrhosis and intrahepatic cholestasis were characteristic as compared with relatively low elevation of the cytoplasmic enzymes in these cases. It is noteworthy that these results reflect sensitively the intracellular lesions in liver diseases.

3) Mitochondrial GOT could be demonstrated only in a remarkable increase of serum GOT levels in the initial stage of acute hepatitis as well as in the exacerbating stage of active chronic hepatitis. On the other hand, in cases of cholestatic liver diseases and cirrhosis no mitochondrial GOT was detected in serum, while another mitochondrial enzyme GLD showed a high plasma level.

---