

肝胆道疾患におけるグルタミン酸脱水素酵素に関する研究

第 二 編

グルタミン酸脱水素酵素の血中上昇に関する実験的研究

岡山大学医学部小坂内科

北 田 信 吾

(昭和46年6月28日受稿)

緒 言

肝疾患時における肝内諸酵素の血中への逸脱は、その病態によりかなり特徴的な酵素パターンを示し、臨床診断にも広く応用されているが、酵素活性の血中上昇の機序については今日なお十分明らかにされておらず、細胞の損傷による酵素の遊出、細胞膜透過性の亢進、酵素の過剰形成などが考えられている。

著者はこれらの点を実験的に解明する目的で、ラットの肝浮遊細胞を用いた *in vitro* の実験を行ない、諸種条件下における肝細胞内酵素の遊出態度を検討し、さらにラット肝動脈結紮による肝 Hypoxia 時における肝内酵素の遊出態度と、その状態での肝ミトコンドリアの呼吸調節能や酸化的磷酸化能について検討した。また四塩化炭素による肝硬変ラットの血中および肝内酵素の変動についても検討し、臨床的に観察された肝の病態における酵素遊出の意義づけについて若干の考察を加えた。

方 法

1) 肝遊離細胞浮遊実験

I) 材料および方法

12時間絶食にした体重 200 g 前後の Sprague-Dawley 系雄性ラットをエーテル麻酔下に開腹し、門脈より挿入したポリエチレン管を通して約60mlの Ca-free EDTA Locke氏溶液 (pH 7.4に調整) を注入し、腹部大動脈および下大静脈を切断して肝臓を灌流し以下の実験に供した。

II) 肝ホモジネートの作製

灌流後直ちに肝の一部をとり、これに肝湿重量の 9 倍容の 0.25M 蔗糖液 (pH 7.4に調整) を加えてテフロンホジナイザーにて900回転/分の回転速度で

1 分間磨砕した後、50G、7 分間遠沈して得られた上清分画を肝ホモジネートとして使用した。

III) 肝遊離細胞の分離法

灌流後の肝の一部をあらかじめ鉗で細片とし、肝湿重量の 5 倍容の 0.25M 蔗糖液 (pH 7.4) とともにゆるい磨り合わせのテフロンホジナイザーを用いて用手法により10回上下して磨砕した後、4つ折りテロンガーゼで濾過し、その濾液を80G、3分間遠沈して沈渣を分離した。さらにこの細胞沈渣を0.25 M 蔗糖液 (pH 7.4) で2回、Krebs-Ringer phosphate (KRP) 緩衝液 (pH 7.4) で1回、80G、3分間遠沈洗滌して肝遊離細胞を分離した。なお肝灌流後の分離過程はすべて氷水中で行ない、遠沈処理は0℃に調節した冷凍遠心機を使用した。

IV) 実験方法

浮遊実験に用いた Incubation medium は、1) pH 7.4に調整した KRP 緩衝液、2) 10^{-7} mmHg にて7分間吸引後、窒素ガスにて充填した低酸素 KRP 緩衝液、3) 10^{-4} M 濃度の 2,4-Dinitrophenol (DNP) 添加 KRP 緩衝液である。肝から分離された肝遊離細胞の約 400×10^3 個を 2 ml の上記溶液中に 37℃、1 時間、70回/分の速度で振盪孵置した後、7000G、10 分間冷凍遠沈して得られた上清分画中の酵素活性を測定し、これを孵置前の肝細胞内酵素活性と比較して medium 中への遊出率を次式により算出した。

$$\text{遊出率} = \frac{\text{medium 内酵素活性}}{\text{孵置前肝細胞内酵素活性}} \times 100\%$$

2) 肝動脈結紮実験

I) 材料および方法

200 g 前後の Sprague-Dawley 系雄性ラットを 5 群に分け、エーテル麻酔下に無菌的に開腹して肝動脈を結紮後、1日、2日、3日、5日および9日目

に再び開腹し、腹部大動脈より採血するとともに、脱血後の肝の一部を採取した。別の5群は開腹のみ行なって対照とした。なお実験に供する前12時間は絶食とした。

採取した肝の一部を肝湿重量の9倍容の0.25M蔗糖液(pH 7.4)に入れ、テフロンホモジナイザーにて900回転/分にて1分間磨砕し、80G、10分間遠沈して上清分画をとりこれを肝ホモジネートとした。ミトコンドリア分画は肝ホモジネートを700G、10分間遠沈後の上清をさらに7000G、10分間遠沈分離して用いた。

II) 呼吸調節能とADP/O比の測定

肝ミトコンドリア呼吸調節能とADP/O比の測定は、閉鎖式回転白金電極を用いたオキシグラフ法によった。反応液は0.1M蔗糖溶液、20mM KCl溶液、10mM Tris緩衝液(pH 7.4)、10mM K_2HPO_4 溶液、2mM $MgCl_2$ 溶液、0.2mM EDTA液からなり、本溶液1.9mlに0.1mlのミトコンドリア液(3mg蛋白質に相当)を加えて25°Cで反応させた。添加基質としてはいずれも0.2MのSuccinate, Glutamate, α -Ketoglutarate液の0.03mlずつを用い、さらに100mM ADP液0.02mlを添加して消費された酸素量より呼吸調節率およびADP/O比を算出した。

肝の組織学的検索には、結紮群および非結紮群の肝の一部をとり、ヘマトキシリン、エオジン染色を行なった。

3) 肝硬変ラット

100g ~ 150gのSprague-Dawley系雄性ラットにオリブ油で溶解した四塩化炭素の20%液を1週間に2回、4ヶ月間にわたって皮下注射し、最後の注射から1週間後に実験的肝硬変の成立を組織学的に確認して実験に供した(写真1)。すなわち12時間絶食後エーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血した後肝の一部をとり、肝湿重量の9倍容の0.25M蔗糖液(pH 7.4)を入れ、テフロンホモジナイザーにて1分間磨砕した後、80G、10分間冷凍遠沈後上清分画をとり肝ホモジネートとした。

上記実験における酵素の測定は、GOT, GPTはReitman-Frankel法¹⁾、TPN系Isocitrate dehydrogenase(ICD)はBowers²⁾、Glutamate dehydrogenase(GLD)はOlson³⁾、Glucose-6-Phosphatase(G-6-Pase)は小出ら⁴⁾の方法に準じた。また酵素測定に際して、肝ホモジネート、肝ミトコンドリア、肝浮遊細胞はすべて凍結融解後、10K C、7分間の音波処理を行なった。蛋白定量はFolin-CiocalteuのLowry変法⁵⁾を用い、肝の酵素量は蛋白1mg当りの酵素活性で表わした。

成 績

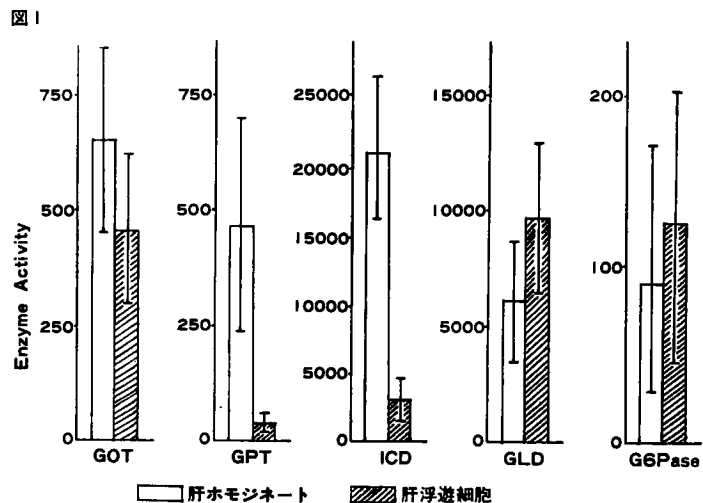
1) 肝浮遊細胞実験

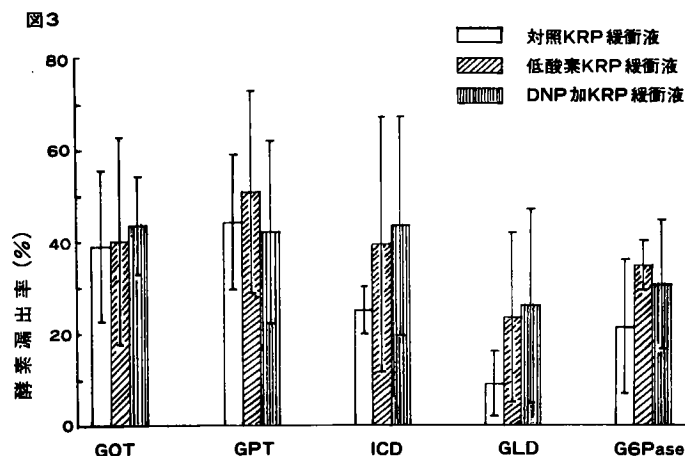
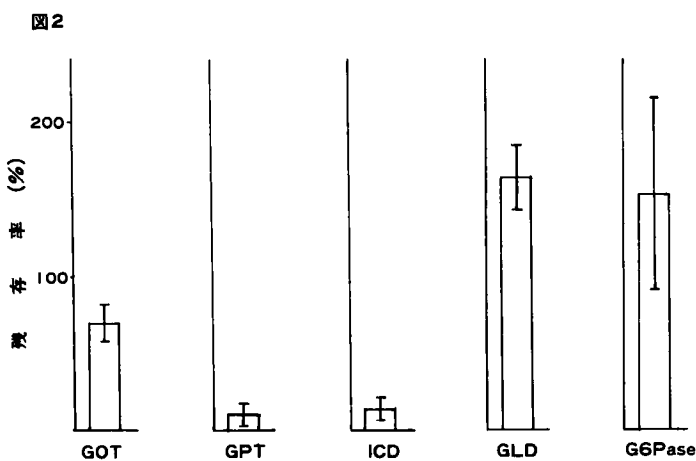
I) 肝細胞遊離に伴う細胞内酵素の遊出

正常ラットの肝臓を用いて単離した肝細胞内酵素活性と肝ホモジネート酵素活性を比較すると、図1に示すように各酵素により異なった遊離態度を示す。すなわち肝細胞を単離した後の酵素活性の低下はGPT, ICDが最も強く、次いでGOTであった。図2は肝細胞単離後の細胞内酵素の残存率を示したもので、GPT, ICDは各々10.0±7.0、13.7±6.7%であったのに対して、GOTの残存率は69.7±12.2%であった。他方、GLD, G-6-Paseはまったく漏出を示さなかった。

II) 肝浮遊細胞内酵素の各種条件下におけるmedium内への遊出

対照 KRP 緩衝液中に37°C、1時間孵置した後の





medium 内への各酵素の遊出率は、図3に示すように GOT, GPT は各々38.7%, 44.2%と最も高く、次いで ICD, G-6-Pase の25.2%および21.3%で、最も低かったのは GLD の9.0%であった。

低酸素 KRP 緩衝液を用いた場合の肝浮遊細胞内酵素の medium 内への遊出は、GOT は40.1%と対照に比してあまり差はなかったが、GPT, ICD, G-6-Pase は各々50.1%, 39.6%, 35.1%と軽度の増加を認め、特に GLD は23.5%と対照に比して約2.6倍の増加をみた。

次に酸化的磷酸化の uncoupler の1つである DNP を 10^{-4} M濃度で KRP 緩衝液に添加した場合の各酵素の遊出率は Hypoxia の時とほぼ同じ傾向がみられ、GOT, GPT は各々43.6%, 42.2%と対照に比してほとんど差はなかったが、ICD, G-6-Pase は43.5%, 30.7%と軽度増加を認め、特に GLD は9.0

%より26.2%に増加した。Hypoxia と DNP 添加実験の間には遊出率の差はあまり認められなかった。

2) ラット肝動脈結紮実験

I) 肝動脈結紮後の血清および肝組織内酵素活性の変動

肝動脈結紮後の血清中の各酵素の経時的変動は図4に示した。血清 GOT は術後第1日目は結紮群、対照群ともに正常ラットの平均 GOT 活性、 115 ± 37 単位に比して上昇の傾向を示したが、両群の間には明らかな差はなかった。第2日目で両群共に活性は正常値域まで下ったが、第3日目で結紮群では 171 ± 34 単位と再び活性上昇がみられた。他方、対照群では 89 ± 24 単位と正常値域にとどまり、2群の GOT 活性の間には有意の差が認められた。第5日目には結紮群の GOT 活性は正常値域まで低下し、以後第9日目も対照群、結紮群ともに正常範囲にとどまり差は認めなかった。

GPT も GOT と同様、第1日目は両群共に軽度活性上昇を示したが第2日目には正常化し、

以後両群ともほとんど変動を示さなかった。

GLD は対照群では全経過を通じて著明な変動はみられなかったが、結紮群では、第1日目にすでに 270 ± 131 単位と対照群 (107 ± 29 単位)に比して活性の上昇があり、第2日目には結紮群では 657 ± 254 単位とさらに増加し、対照群 (138 ± 37 単位)の約4.8倍に達し、以後活性は減少して対照群と同様の経過を示した。

ICD, G-6-Pase の血中の活性変動は2群の間で明らかな差を示さなかった。

肝動脈結紮後の肝ホモジネートおよびミトコンドリア分画内における各酵素活性は対照群、結紮群とも差を認めず同様の経時変化を示した。

II) 肝ミトコンドリアの呼吸調節と酸化的磷酸化
肝動脈結紮後最も高い血清 GLD 活性を示した第2日目における肝ミトコンドリアの、3基質に対す

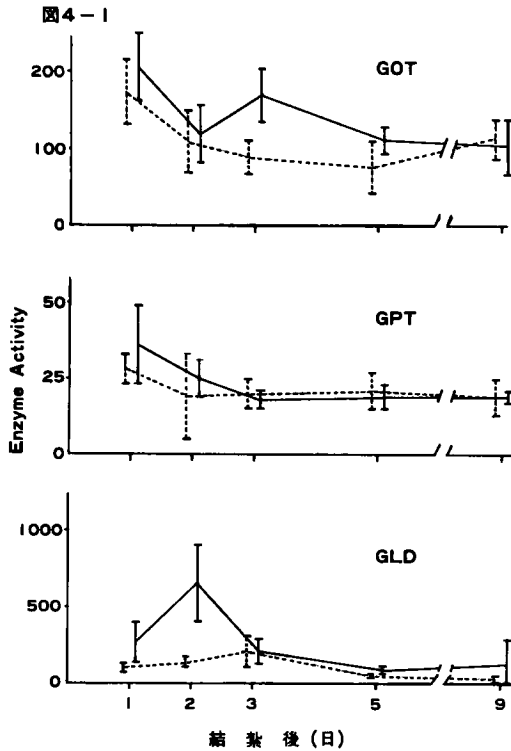
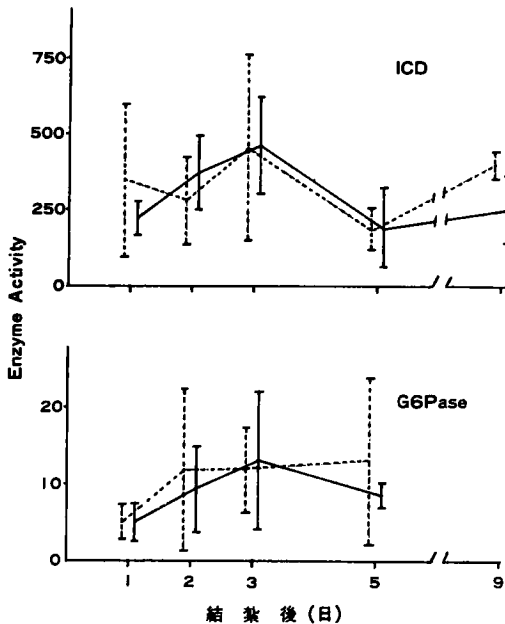


図4-2



る呼吸調節および ADP/O 比は、対照群に比してほとんど差を認めなかった (表 1)。

表1 ラット肝ミトコンドリアの呼吸調節率とADP/O比

基 質	対 照 群		結紮群(第2日目)	
	呼 吸 調 節 率	ADP/O	呼 吸 調 節 率	ADP/O
0.2MSuccinate	4.1	1.4	3.7	1.2
0.2MGlutamate	4.4	1.9	4.2	2.0
0.2M α -Ketoglutarate	1.8	1.8	2.0	1.9

Ⅲ) 肝組織像

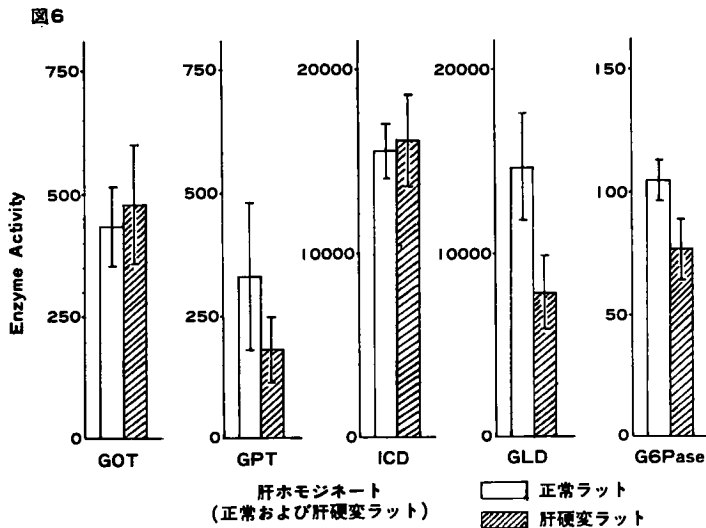
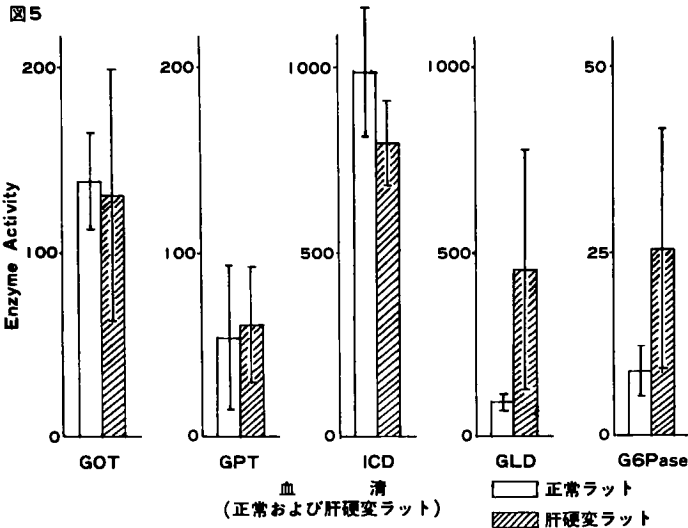
結紮後第2日目の光学顕微鏡的肝組織像は、肝実質細胞の混濁腫脹を主とした軽度の変性所見を認めるにすぎなかった (写真2)。

3) 肝硬変ラットの血清および肝内酵素の変動

正常および実験的肝硬変ラットの血清の酵素活性は、図5に示すように肝硬変群の GLD, G-6-Pase 活性は対照群に比して明らかに上昇していたが、GOT, GPT, ICD 活性は対照群との間に有意の差を認めなかった。他方、肝内酵素の変動は図6に示すように、肝硬変群では正常群に比して GLD, G-6-Pase 活性の減少が著明であった。すなわち肝硬変群では、細胞質分画の酵素の減少に比してミトコンドリア、ミクロゾーム局在の酵素の減少が顕著であった。

考按並びに総括

肝障害時における血清諸酵素活性は、酵素の肝組織から血中への逸脱、血中での酵素の変化(活性化, 変性, 阻害等), 血液から胆汁, 尿中への排泄などによって変動するが、最も重要な因子は肝内酵素の血中への遊出であり、その要因としては、肝細胞の破壊や細胞膜透過性の亢進などがあげられる。前者については、Wroblewski ら⁹⁾ が血清 GOT, GPT 上昇度と組織学的に検索した肝細胞壊死率との間に密接な関係があることを認め、Hauss ら^{11), 12)} は肝細胞の広範な脱落破壊が肝内酵素の減少と対応して、血中の酵素活性が上昇していることを指摘している。また川口¹⁾ によれば、肝疾患患者について肝生検直前に測定した血清 GPT と生検所見との関係を見ると、GPT の上昇と肝細胞壊死とは明瞭な相関があることを認めている。しかし細胞膜透過性の亢進による酵素の遊出に関しては直接的な証明はまだなく、その本態に関しては不明な点が多い。



Henley ら^{10), 11)} は形態学的に変化のないラット肝細胞を分離すると、その分離過程で GPT, ICD, グルコース 6 磷酸脱水素酵素 (G6PDH), 乳酸脱水素酵素 (LDH) が特異的に細胞外に漏出することを認めている。また市原ら¹²⁾ もラット肝浮遊細胞実験を行ない、各細胞分画にある種々の酵素について肝細胞分離前と分離後における酵素活性を比較した結果、可容分画に分布する LDH, GPT などは細胞外に漏出し易く、ミトコンドリアやミクロゾームに分布する GOT, ウリカーゼ, G-6-Pase などはほとんど細胞内に残存していることを報告している。著者は位相差顕微鏡で形態学的変化を認めない肝浮

遊細胞を用いて、酵素の遊出に関する実験を行なった結果、肝細胞単離過程に伴う細胞内酵素の遊出は、上清分画酵素である GPT, ICD が最も強く、逆に細胞顆粒分画局在の GLD, G-6-Pase はほとんど完全に肝細胞内に残存することを認めた。この成績は、細胞内酵素の局在部位が酵素遊出の態度と密接に関係していることを示唆している。GOT の残存率が上清分画にある酵素と細胞質分画にある酵素の中間的な値を示したのは、ラット肝細胞内 GOT が細胞質およびミトコンドリアの両分画に局在しているため¹³⁾ と考えられる。そしてこれらの上清分画酵素は、肝細胞の形態学的変化の殆んど認められないにもかかわらず遊出されている事実は、肝細胞の破壊による細胞内酵素の逸脱というよりはむしろ、肝細胞分離の過程で生じた細胞膜透過性の亢進によるものと解釈されよう。

川口ら¹⁴⁾ は四塩化炭素肝障害ラットを用いて、GLD の血中上昇の時期と肝の形態学的変化との関連について検討した結果、最も早期に血中上昇をみるのは G-6-Pase, ついで上清分画にある GOT, GPT 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なり初めて、GLD およびミトコンドリア局在 GOT の血中出現を認めている。また Neumayr¹⁷⁾, Schmidt ら¹⁸⁾ によれば、GLD が血中に上昇するのは重症の肝細胞壊死をおこした時であるとのべており、肝細胞壊死と GLD 活性の上昇との密接な関連を重視している。著者の肝浮遊細胞を低酸素 medium, あるいは DNP 添加 medium に入れて孵置した実験では、各分画の酵素の漏出率は GOT, GPT では対照に比して殆んど変化なく、ICD, G-6-Pase, GLD では増加が認められ、特に GLD の漏出が著明で対照の約 2.5~3 倍であった。この成績は、低酸素状態

あるいは uncoupler としての DNP が、ミトコンドリア内における電子伝達系や酸化的磷酸化などへの影響を介して、2次的にミトコンドリア膜の透過性に変化をおこさせた結果と解される。Bruns ら^{14), 15)} も Monoiodoacetate, 水銀化合物, Fluoroacetate, Dinitrophenol などの代謝阻害物質を動物の腹腔内に注射後、血中の LDH, Aldolase, GOT, Malate dehydrogenase, Phosphoglucomutase 活性の上昇を認めており、エネルギー産生反応の阻害ないし減弱が細胞膜の透過性に重要な影響をおよぼすものと考えられる。

先に肝遊離細胞を用いた低酸素 medium 孵置実験で、Hypoxia によってかなり特異的に GLD が medium 内に漏出する成績を報告したが、さらにラット肝動脈の結紮を行なった *in vivo* の実験では、肝動脈結紮後 2 日目にミトコンドリア局在の GLD が他の酵素に比して著明に血中に増加し、ついで結紮後第 3 日目に血清 GOT の上昇を認めたが、上清分面に局在する GPT, ICD やミクロゾーム局在の G-6-Pase はほとんど変化を示さなかった。すなわち肝の Hypoxia における肝内酵素の血中遊出は、肝遊離細胞を用いた *in vitro* の実験結果と同様で、特に GLD の血中上昇が特徴的であった。肝動脈結紮実験における肝の組織学的変化は軽度の変性所見を認めたのみで、肝ミトコンドリアの *in vitro* の呼吸調節率と酸化的磷酸化能は対照群と差を認めなかった。これらの実験成績は、GLD の遊出は必ずしもミトコンドリアの非可逆的機能障害を意味するものでないことを示唆している。肝ホモジネートおよびミトコンドリアの GLD 活性が、血清 GLD の上昇と関係なくほとんど変化を示さなかった原因に関しては、血清 GLD に比して肝内 GLD の濃度が非常に高いために直接細胞内酵素レベルに反映しなかったこと、肝動脈結紮後の *in vivo* におけるミトコンドリアの機能障害が可逆的であったために、GLD 自体の合成能の抑制や変性、失活が起らなかったことなどが考えられる。また、肝動脈結紮後 3 日、5 日目の血清 GOT, GPT の変動は、GOT 活性の上昇に対して GPT 活性はほとんど増加せず、明らかに両酵素の遊出態度に差が認められた。一般にラット肝の GPT は約 85% が上清分面にあるのに対して、肝 GOT の約 80% はミトコンドリアに分布するといわれており¹⁶⁾ 両酵素の局在性の相違が両酵素の解離と関連していると考えられる。

次に実験的肝硬変ラットの各酵素の変動を正常ラ

ットと比較すると、ICD, GOT, GPT では肝および血清のいずれにおいても酵素活性にさほど著明な差がなかったのに対して、ミトコンドリア局在 GLD は肝硬変群の肝では正常群に比して明らかに減少し、血清 GLD は逆に正常群に比して上昇を示している。同様の成績は G-6-Pase についても観察され、肝硬変における肝細胞障害が特にミトコンドリアおよびミクロゾームに対して強く影響をおよぼしていることを示している。

結 論

ラットの肝浮遊細胞孵置実験、肝動脈結紮実験を行ない、肝細胞内酵素の遊出を検討するとともに、実験的肝硬変を用いて肝、血清酵素の変動を検討し以下の結論をえた。

1) ラット肝浮遊細胞からの酵素の遊出は、上清分面に局在する GPT, ICD で高く、ミトコンドリア局在の酵素である GLD が最も低かった。

2) 低酸素 medium を用いた孵置実験では、肝浮遊細胞からの GLD の遊出が最も顕著であり、DNP 添加孵置実験でも同様の結果をえた。

3) ラット肝動脈結紮後の血中測定酵素のうち、GLD が最も早期にかつ著明に増加し、ついで GOT の上昇がみられたが、GPT, ICD, G-6-Pase の血中上昇はほとんど認められなかった。

4) 肝動脈結紮後の肝内 GOT, GPT, ICD, G-6-Pase, GLD は全経過を通じて正常に維持された。

5) 肝動脈結紮後、血清 GLD 活性は著明に上昇したにもかかわらず、肝ミトコンドリアの呼吸調節能、ADP/O 比は正常に維持されており、GLD の増加は必ずしも肝ミトコンドリアの非可逆的な障害を意味しないと思われる。

6) 肝硬変ラットでは、ミトコンドリア局在の GLD, ミクロゾーム局在の G-6-Pase がそれぞれ肝内で著明に減少し、逆に血清中では有意の増加を示した。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った小坂淳夫教授、林慎一郎博士に深く感謝いたします。また協力いただきました西崎哲一医学士に感謝いたします。

文 献

- 1) Reitman, S. & Frankel, S. : Amer. J. Clin. Path. **28**: 56, 1957
- 2) Bowers, G. N. Clin. Chem. **75**: 260, 1958
- 3) Olson, J. A. & Anfinsen, C. B. : J. Biol. Chem. **197**: 67, 1952
- 4) Koide, H. & Oda, T. : Clin. Chim. Acta **4**: 554, 1959
- 5) Lowry, O. H. , Rosebrough, N. J. : J. Biol. Chem. **193**: 265, 1951
- 6) Wroblewski, F. & La Due, J. S. : Ann. Int. Med. **43**: 345, 1955
- 7) Hauss, W. H. , Gerlach, U. & Schuermeyer, E. : Deut. Med. Wochschr. **83**: 1310, 1958
- 8) Gerlach, U. : Med. Welt. **16**: 880, 1961
- 9) 川口正光 : 臨床症理 **14** : 397, 1966
- 10) Henley, K. S. , Pollard, H. M. : Gastroenterology. **36**: 1, 1959
- 11) Henley, K. S. , : Nature **184**: 1400, 1959
- 12) Takeda, Y. , Ichihara, A. , Tanioka, H. , Inoue, H. : J. Biol. Chem. , **239**: 3590, 1964
- 13) Bengmark, S. , Ekholm, R. , & Olsson, R. : Acta Hepatosplen. **14**: 80, 1967 (Stuttgart)
- 14) Bruns, F. H. : in " Erstes Europaisches Symposium für medizinische Enzymologie" Milano, 1960 (N. Dioguardi, ed.), p. 71 Karger Basel, 1961 (Academic Press, New-York)
- 15) Bruns, F. H. , Brosswitz, E. , Dannemann, H. , Horn, H. D. & Noltmann, E. : Klin. Wschr. **39**: 342, 1961
- 16) 川口正光, 武田和久, 林慎一郎他 : 日内会誌 **57** : 70, 1968
- 17) Neumayr, A. : Wien Med. Wschr. **114**: 157, 1964
- 18) Schmidt, E. & Schmidt, F. W. : Hippokrates. **31**: 1, 1960

Glutamate Dehydrogenase in Hepatobiliary Diseases
Part 2. Experimental Study on an Increase of Serum Glutamate
Dehydrogenase
Shingo Kitada

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

The isolated rat liver cells were dispersed in the medium under various conditions to observe the behavior of the leakage of the enzymes from liver cells. Furthermore, the hepatic artery of rat was ligated to examine the effect of hypoxia on the enzyme leakages from liver into the circulation. The alterations of the enzymes in serum and liver tissue were also examined using rats with liver cirrhosis induced by CCl_4 . The enzymes assayed were Glutamate dehydrogenase (GLD), Transaminases (GOT and GPT), Isocitrate dehydrogenase (ICD) and Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) .

The following results were obtained.

1. When the liver cells were dispersed in the medium, there was a marked leakage of such activities as GOT and ICD, whereas GLD almost completely retained within the cells.

2. After incubating the isolated cells in the medium under hypoxia, an extremely increased leakage of GLD was observed. The leakage of other enzymes measured, however, was little influenced by hypoxia. Similar results were obtained with dinitrophenol.

3. The ligation of hepatic artery of rat caused the earliest and most remarkable increase of the serum GLD, whereas the rise of GOT was moderate. The serum levels of GPT, ICD and G-6-Pase did not changed essentially compared with control.

4. Despite of the marked elevation of the serum GLD, ADP/O ratio of the mitochondria of the hepatic cells was not effected by the ligation of the hepatic artery. This result suggests that the increase of the serum GLD does not always imply the irreversible damages of the hepatic mitochondria.

5. The activities of GLD and G-6-Pase within the experimentally induced cirrhotic liver of rat showed a remarkable diminution, whereas these activities in serum increased markedly.

北田論文附図

写真1

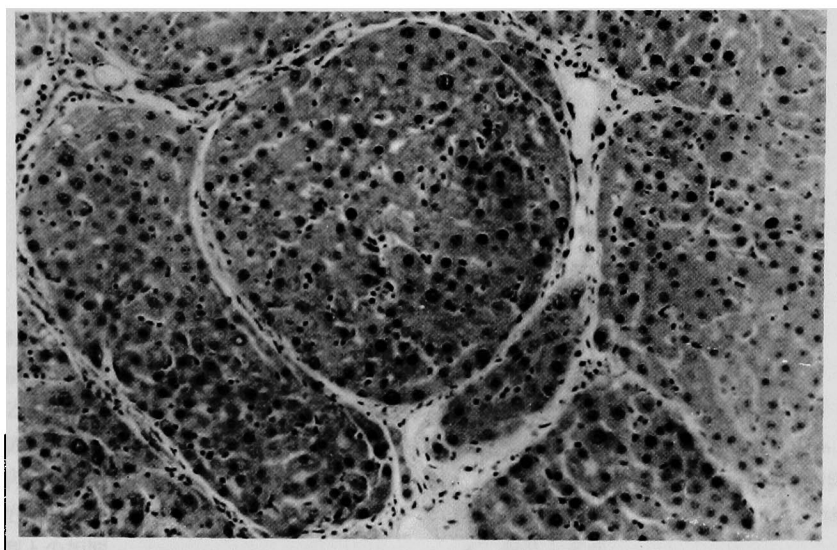


写真2

