612 357.1 : 612.35

胆汁成分と肝臓組織

第2編

胆汁に作用させた肝組織中の乳酸脱水素酵素の消長

岡山大学医学部第一内科教室（主　任：小坂教授）
九州大学医学部第一内科教室（分担指導：山岡教授）
真田篤

〔昭和33年2月25日受稿〕

緒言

前編において家兎胆汁に海濵肝切片を作用させると，網内系機能の健全な限り胆汁中の biliverdin は漸次 bilirubin に還元され，それと共に肝切片の表層はこの胆汁の変化に一致した色調に染まり，その一部には haematoidin が沈着することを明かにした．この際乳酸曹達を胆汁に加えると還元が幾分促進されることから，Lemberg, R. & Wyndham. R. A., 教室山本及び堀尾等が推定した様に，肝切片の還元能は肝組織内脱水素酵素系に負うものではないかと考えられた．処で教室堀尾に依れば，基質に乳酸，alcohol，琥珀酸，枸櫞酸及び葡萄糖を用いる場合，肝臓の脱水素酵素系の活性は alcohol 以外乳酸脱水素酵素系に最も大であり，乳酸脱水素酵素活性は，肝細胞障碍処置時に軽度にまた肝網内系填塞時に著明に減少するという．従つて本系の活性は，網内系機能と密接な関係があると考えられる．

そこで肝切片を胆汁に作用させた場合，肝切片の脱水素酵素系特に乳酸脱水素酵素系の活性が如何に変化していくかを組織化学的に追及して，肝切片の胆汁に及ぼす作用機序の一端を明らかにしようと試みた．

実験方法

1. 実験材料

肝切片は第1編と同様健康，四塩化炭素投与による肝障碍及び膠状銀による網内系填塞海濵のものを用い，胆汁は健康成熟家兎に胆管瘻を設置して採取した．

2. 肝切片の調製法

第1編と同様の方法に依つた．

3. 実験操作

第1編に準じて行つた．即ち底の広い30 cc 容り flask 4個を用意し，各々に家兎胆汁20 cc を分注し，次いで各々に海濵肝切片の厚いもの1片と薄いもの1片を夫々容れ，38°C の恒温槽中で空気を遮断せずそのまゝ1分間120回の割合に振盪した．振盪1，2，3及び4時間目毎に各 flask から肝切片を取出し，これを別に用意した Ringer-Lock の液に移して一寸洗い，これらの肝切片から第1編と同様，直に厚さ20～40 μ の縦横連続凍結切片を作製した．肝切片の培養は出来得る限り無菌的に行つた．

4. 組織中乳酸脱水素酵素の検出法

Semenoff, W. E. の方法に倣い検出した．本法には試薬として0.05% methylene 青2 cc，10%乳酸曹達水溶液2 cc 及び燐酸塩緩衝液6 cc の混合液を用い，0.05% methylene 青 2 cc と燐酸塩緩衝液8 cc の混合を対照液とした．先ず凍結切片の同一層のものを3分して夫々を載物硝子上にのせ，1つはそのまゝにおき1つには試験液を残りの1つには対照液を夫々1滴加え，被覆硝子を載せて封蠟して直ちに鏡検した．この際比較顕微鏡と普通顕微鏡とを用い，methylene 青の褪色度を比較して脱水素酵素の活性度を判定することとした．尚肝組織は胆汁のため着色して methylene 青の識別が困難になり易いから，試薬乃至対照液を加えないものを対照にして判別に便ならしめた．

実験成績並に考按

1. 健康海濵切片を用いた場合

摘出のままの肝切片の組織片について酵素活性を検出すると，対照液を用いた場合でも methylene 青の色彩は幾分減少したが，試薬を加えると褪色は可

成り著明であつた．この際の methylene 青による着色は，肝細胞の胞体と核とを問わず瀰漫性で淡く，組織学的に部位の詳細な識別は困難であつた．

胆汁に作用させた肝切片の直前，1，2，3 及び 4 時間目のものゝ表面1層の組織片に就いて酵素活性を検出するに当り，試薬を滴下した後の methyle 青の着色状態を時間毎に比較すると，着色の度合は時間の経過と共に強くなつて乳酸脱水素酵素系活性の低下を来し，直前と1時間目との間の差が最も著明であつた．同一切片で面を異にする表面第1層に対照液を滴下してその時間毎の色調を比較すると，培養時間の経過と共に methylene 青の色調は増加し，試験液を滴下したものとの間では各時間共対照液の場合の方が濃く，その差は可成り著明であつた．又対照液を滴下した組織に更に試薬を滴下すると，methylene 青に依る染色は褪色した．

以上に依り肝組織自身 methylene 青を褪色させる能力即ち脱水素酵素系の活性を示すが，この際基質として乳酸曹達を附加して乳酸脱水素酵素の活性をみると，更にその働きが著明である事がわかる．この際胆汁に作用させた肝切片の表層では，時間の経過と共にその酵素の活性が低下し，特に胆汁を作用せしめる事で急激に減少する．

このことは第1編で述べた様に胆汁に肝切片を作用させると biliverdin より bilirubin への還元が1時間後には明瞭に，2時間後においては最も著明となり，その後は殆んどその状態を維持するとの成績と略一致する．即ち肝組織表面の乳酸脱水素酵素は本還元に利用され，その活性度を低下するものであろう．

肝切片の表面より深部に向つて組織片を作り層を追つて同様の検索を行つてみると，試薬への反応は摘出のまゝの肝切片では勿論各層ともに同じであり，胆汁に作用させたものでは各時間共表層より肝細胞にして3～5層迄は乳酸脱水素酵素系の活性は低下し，その程度は表面第1層に比べるとやゝ劣つていたが，更に深部になると急速に低下が少なくなつて7～8層では殆ど正常と異る所がなかつた．対照液を用いても試験液を用いた時ほどではないが同様のことが認められ，従つて胆汁色素に着色されている部位迄の肝組織の乳酸脱水素酵素は，組織の内外を問わず biliverdin の bilirubin への還元に関与し，それ以下は殆どこれにあずからない様に思われる．斯様に臓器片を以てする実験でその反応が表層に止ることは，Deans, N. W., Nesbet, F. B., Buchanen, J. M. & Hastings, A. B. 等が Warburg 法により肝切片の glycogen 生成能を検討した時，肝切片の辺縁細胞のみがこれに関与することを述べ，また Opie, E. L. も組織片を用いての酵素作用を検討する際，同様の欠点が起ることを述べていること等その例が多い．

以上胆汁に作用する肝臓内乳酸脱水素酵素は，胆汁色素に染色する程度の部分つまり表層より僅に肝細胞で3～5層の夫れが主で，これを第1編の成績と考え併せると，肝切片表層の乳酸脱水素酵素の多くが胆汁中に脱出して biliverdin を bilirubin に還元させ，一部は染着する biliverdin を組織中で還元し吸収された bilirubin と共にこれを濃縮して，haematoidin 結晶乃至顆粒として包含するのではないかと思われる．

2. 四塩化炭素投与海猿肝切片を用いた場合

摘出のまゝの肝切片の表面組織の乳酸脱水素酵素活性は，健康例の夫れに比して可成り低下していて，対照液を用いた場合と試験液を用いた場合との差も健康例に比し可成り少なかつた．胆汁に作用させた肝切片表面第1層の乳酸曹達脱水素酵素活性は，作用時間の経過と共に低下したがその低下の程度は健康例程でなく，摘出のままのものと1時間目のものとの間に於ても軽度であつた．また試験液を用いた場合と対照液を用いた場合とでも，methylene 青の色調の差は僅かであつた．尚これ等活性度の低下は略肝細胞にして4～5層程度迄で，それ以下になると正常の場合に等しかつた．

以上に依り四塩化炭素を投与して肝障碍を起さしめた時の肝切片では，そのまゝで既に乳酸脱水素酵素系の活性は可成り低下しており，ために胆汁に作用させた後も著明な低下は見られない．このことは第1編において四塩化炭素投与海猿肝切片を胆汁に作用せしめた場合，胆汁並に肝組織中の biliverdin より bilirubin への還元能が低下している事実と略平行しており，これらの還元には乳酸脱水素酵素系が関与するとの考えを裏付けるものである．

3. 網内系填塞海猿肝切片を用いた場合

膠状銀注射に依り網内系を填塞した場合，摘出したままの肝切片の組織片に於ける乳酸脱水素酵素系の活性は，健康例の夫れに比して可成り低下しており，四塩化炭素投与の夫れよりも尚些か低下していた．而して対照液を用いた場合と試験液を用いた場合との差は，四塩化炭素投与海猿肝切片使用時と同様僅かであつた．胆汁に作用させた肝切片表面第1

層の乳酸脱水素酵素活性は，1時間後において些かの低下を見た後は殆ど変りがなく，試験液と対照液とを用いた場合の差も僅少に過ぎなかつた．また表面より深部に向つてその低下の境界を追求してみたが，低下の度合が少い為かこれを求めるのは困難で，せいぜい肝細胞にして4～5層の処にあるかの様であつた．

以上に依り網内系填塞海猿肝切片では，既に摘出のままで乳酸脱水素酵素系の活性は低下して四塩化炭素投与時を凌ぎ，ために膽汁に作用させた後も1時間目に些か低下したのみでその後は余り明瞭でない．このことは第1編で述べた様に網内系填塞海猿の肝切片が，組織の内外で biliverdin より bilirubin への還元能を低下せしめるのと良く平行していると言える．

結　　論

健康と四塩化炭素投与及び網内系填塞海猿肝切片をそのまま家兎膽汁に作用させたのち，組織片中の乳酸脱水素酵素活性の消長を追求し次の結果をえた．

1. 健康海猿の肝組織は methylene 青を褪色せしめるが，これに乳酸曹達を加えるとその過程は更に促進された．

2. 膽汁に作用させた健康海猿肝切片の表層は，作用させぬまゝのものよりは著しく低下しながらも尚 methylene 青還元能を有し，乳酸曹達の添加で更に促進されたが，膽汁に作用させる時間の経過に伴つて還元能は低下して行つた．この際肝切片表層の methylene 青還元能の低下は，深さにしてせいぜい細胞の3～5層程度迄であつた．

3. 四塩化炭素投与や網内系填塞海猿の肝切片でも同様の状態であつたが，methylene 青還元能は健康例に比すると著しく弱く，四塩化炭素投与と網内系填塞との間では後者に更に弱かつた．従つて膽汁に作用させたことに依る methylene 青還元能への影響も著明ではなかつた．

4. 網内系機能障碍時乳酸脱水素酵素系の活性が減少を来すとの教室堀尾の成績は妥当と言える．

5. 肝切片を膽汁に作用させた場合，肝切片の表層にある乳酸脱水素酵素系活性の減少過程は，膽汁及び組織中の biliverdin より bilirubin への還元過程と平行し，これに関与する乳酸脱水素酵素は肝切片の表層部位にあるもののみであつた．

主　要　文　献

1) Lemberg, R. & Wyndham, R. A.: Biochem. J., **30**, (1936) 1147

2) 山本：医学研究，**21**巻，12号，1406，（昭26）1423

3) 堀尾：医学研究，**23**巻，3号，（昭28）470，486，506

4) Semenoff, W. E.: Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. **22**, 305 (1935), Tit. Glick, D.: Techniques of Histo-and Cytochemistry, Interscience Publishers, Inc., New York (1949)

5) Deane, H. W., Nesbet, F. B., Buchanan, J. M. & Hastings, A. B.: J. Cellul. Comp. Phys., **30**, (1949) 255

6) Opie, E. L.: J. Exp. Med., **87**, (1948) 425

Studies on the Bile Composition and the Liver Tissue

Part II

Studies on the Prosperity and Decay of the Dehydrating Enzyme of Lactic Acid in the Liver Tissue Effected With the Bile

By

Atsushi Sanada

From the First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Chief: Prof. Dr. K. Kosaka)
(Director: Prof. Dr. K. Yamaoka, Kyushu University Medical School)

Conclusion

I have observed the prosperity and decay of the dehydrating enzyme of lactic acid in the liver tissues of the healthy guinea pigs, the guinea pigs with the use of carbon tetrachloride and the guinea pigs with the obstruction of the retieuloendothelial system without any preparation and with the effection of the rabbits' bile.

The results are as follws:

1) The liver tissue of the healthy guinea pig works to fade methylene blue and the process of the discoloration is more promoted by the addition of Sodium lactic acid.

2) Even though it's action become markedly decreased, the surface of the liver tissue of healthy guinea pig effected with the bile has the reducting action of methylene blue and it's action become promoted by the addition of sodium lactic acid, but the reducting action become low by the process of the times which the liver tissue was effected with the bile. At that time, the decline of the methylene blue reducting action at the surface of the liver tissue, it comes up to the 3 or 5 layers of the cells in depth.

3) The same condition is observed on the liver tissue of the guinea pig with the use of carbon tetrachloride and the obstruction of the reticuloendothelial system, but comparing with the healthy case, the reducting action of methylene blue become markedly weak. And comparing between the above two cases, the reducting action of the later is more weak than the former.

Therefore, the effect to the reducting action of methylene blue by the effection of the bile is not shown clearly.

4) The report of Dr. Horio in our department that the activity of the dehydrating enzyme of lactic acid become decreased in the cases with the function impediment of the reticuloendothelial system, is adequate.

5) In the cases of the liver tissues effected with the bile, the decreased process of the dehydrating enzyme of lactic acid at the surface of the cutting tissue of the liver is in parallel with the reduction's process of biliverpin to bilirubin in the bile and the tissue and the dehydrating enzyme of lactic acid working on it is only the enzyme on the surface of the cutting tissue of the liver.