マウス肝腫瘍形成までに引き起こされる酵素活性変動の 栄養学的比較

Comparative studies on the enzyme activities in the mice liver
cells of normal, regenerating and tumor developed

Alkaline phosphatase, Glutamic-oxaloacetic transaminase, Cysteine-
desulfhydrase, β -Glucuronidase の活性度変動に関する研究

On the activity of alkaline phosphatase, glutamic oxaloacetic transaminase,
cysteine-desulfhydrase and β -glucuronidase

国立予防衛生研究所 (National Institute of Health)

食品衛生部

諸 岡 信 一 (Nobuichi Morooka) 中 野 尙 子 (Naoko Nakano)

三 浦 利 之 (Toshiyuki Miura)

病 理 部

内 田 信 之 (Nobuyuki Uchida)

東京大学伝染病研究所 (Institute of Infectious Disease of Tokyo University)

獣 疫 部

奥 木 実 (Minoru Okugi)

1) It was already reported that the tumor formation in the liver of mice fed for a long period on the low protein diet added by Luteoskyrin.

In present paper some histological and enzymological studies were carried out on the mice liver.

2) Any remarkable change on the alkaline phosphatase activity of liver cells was not recognized between the standard diet group mice and the mice tested.

Regarding glutamic oxaloacetic transaminase activity, a little deviation was found only in the early stage of feeding.

3) The cysteine desulfhydrase activity in the liver cells of mice was decreased promptly, when the protein (casein) concentration in the diet was decreased. These phenomenon seemed to be retained for all the feeding period in the liver of mice fed on low protein diet as well as

この研究の研究費の一部は昭和37~38年度、文部省試験研究「わが国で分離育成された NC, KK, dd 各系統マウスの獣医学医学領域における実用化に関する研究」の研究費に依った。

発表：於日本農芸化学会昭和39年度総会。

the liver of mice fed on low protein diet added by Luteoskyrin.

This results suggested that the decreased activity of cysteine desulphydrase was one of the essential factors of the starting point of the abnormal metabolism in mice liver.

4) The β -glucuronidase activity of the mice liver increased in the middle and later period of feeding of low protein diet added by Luteoskyrin and lastly the value of the activity got approximately the same level as that of infancy.

The enzyme activity of the tumor developed mice was shown a rather high value after 180 days feeding.

まえがき

前報告でわれわれは低蛋白飼料に Luteoskyrin を添加した飼料で dd 系マウスを長期飼育した。その結果マウス肝に腫瘍が形成されることを認めその大要を報告した。¹⁾

腫瘍形成に関して、低蛋白飼料に DAB を添加した飼料による Opie,²⁾ Miller,³⁾ Baumann⁴⁾等の報告はわれわれとほぼ似た結果を述べている。

われわれはマウス肝の腫瘍形成までに至る肝の組織変化と並行して、Alkaline-phosphatase,⁵⁾ Glutamic oxaloacetic transaminase,⁵⁾ Cysteine-desulphydrase, β -Glucuronidase 等の活性度を飼料区別、飼育期間別にそれぞれの肝で測定し、標準飼料 (Diet I) 投与群マウスの肝、低蛋白飼料 (Diet II, IV) 群のマウスの肝、標準飼料 Luteoskyrin 添加 (Diet I-L) 群のマウス肝、低蛋白飼料 Luteoskyrin 添加 (Diet II-L, IV-L) 群マウス肝に起こる代謝の状態を比較検討した (飼料の区別は前報参照)。

その結果、低蛋白投与マウス肝細胞の Alkaline-phosphatase, Glutamic-oxaloacetic transaminase 等の活性度は標準飼料投与マウス群の肝細胞の酵素活性との間に顕著な差は認められなかった。

一方 cysteine desulphydrase の活性は、低蛋白飼料投与群では飼育早期 (幼少時) に極度に低下し、飼育全期間を通じてこの状態が続いた。肝腫瘍形成の結果として、cysteine-desulphydrase 活性が低下するのではなく、飼料の蛋白含量の減少によって cysteine-desulphydrase 活性は低下し、Berman,⁹⁾ Sebrell,¹⁰⁾ Garrow,¹¹⁾ Edozien⁸⁾等の蛋白欠乏時に起こる変化にほぼ一致していることが分った。低蛋白飼料に Luteoskyrin を添加することによって肝に腫瘍が形成されなければならない原因の一つが肝細胞中の cysteine-desulphydrase 活性の低下ではないかと思われる。

β -glucuronidase の活性度は標準、低蛋白飼料共に幼少時に高く、飼育中期に至って Luteoskyrin 添加低蛋白飼料ではマウス肝の活性度に、上昇の傾向がある。腫瘍の形成を認めたものでは特に活性度が高くなっている。このことは単に肝の持つ解毒作用の機能を説明するばかりでなく、再生肝の発生、Axelrod¹²⁾等の提唱する蛋白欠乏時の生体内蛋白合成 (nitrogen trap) 等と何らかの関係があるものと思われる。

1. 実験方法

(1)実験動物, (2)飼育条件, (3)飼料条件, (4)湿肝重量, (5)肝の蛋白含量については前報告を参照。¹⁾

(6)肝細胞の酵素活性度変化の測定

(a)酵素の調製: 飼料別 (6群), 飼育期間別 (購入時, 前飼育期間, 飼育15日, 30日, 60日, 90日, 180日) にランダム抽出した dd 系マウスを断首放血後、肝をす速く取り出し、冷 0.25M 蔗糖液で洗い鉢で細切後、9倍容の 0.25M 蔗糖液を加え、氷冷しながら、ポッターホモゲナイザーで摩砕し、均一液を作り、これを酵

素原液とした。以下の各酵素, Alkaline-phosphatase, Glutamic oxaloacetic transaminase, cysteine-desulfhydase, β -glucuronidase 等の活性度を測定した。

(b) 酵素活性度測定 :

① Alkaline phosphatase : 活性度の測定は、大森の方法¹³⁾により、基質 0.5ml, pH 9.0 ベロナール緩衝液 0.5ml ; 上記酵素液 0.2ml, 蒸留水 0.8 ml を混和し、37°C 30分反応させた後、10% 三塩化醋酸液 2.0 ml を加えて除蛋白し、その汨液 2.0 ml に飽和炭酸ナトリウム液 2.0 ml を加え、遊離パラニトロフェノールによる黄色の発色を Coleman 光電比色計を用いて波長 405m μ で測定した。

② G-O-T : 活性度の測定は Cabaud, Leeper, Wróblewski の方法¹⁴⁾に従って、酵素原液の 50 倍希釈液 1.0ml に、pH 7.4 のアスパラギン酸- α ケトグルタル酸液 0.5ml を混和、26°C 20分反応後、100% 飽和 TCA 液 1 滴およびクエン酸アニリン液 1 滴を添加、10分後に 2.4 ジニトロフェニルヒドラジン液 0.5ml を加え、次にトルエン 2.0ml を加え、激しく振とう後遠心し、トルエン層 1.0ml に水酸化カリウム液 3.0ml 加え発色させ、Coleman 比色計を用い 490m μ の波長で比色測定した。

③ Cysteine-desulfhydase : 活性度の測定は、酵素液 1.0ml, pH 6.5 磷酸塩緩衝液 1.0ml, 0.025M システイン塩酸塩液 1.0ml を混和し、窒素ガスを通気しながら 37°C 2時間反応させ、基質システインから遊離する SH を St. Lorant の方法¹⁵⁾¹⁶⁾で硫化水素吸収液に捕捉し、FeNH₄(SO₄)₂ 液およびジメチル P-フェニレンジアミン硫酸液で発色、Coleman 光電比色計を用い 610m μ で比色測定した。

④ β -Glucuronidase : 活性度の測定は Fishmann の方法¹⁷⁾により、上記酵素原液 0.5 ml, pH 5.0 醋酸緩衝液 0.4ml ; 基質液 (phenolphthalein- β -glucuronide 液) 0.1ml を混和、37°C 1時間反応後、5 % 三塩化醋酸液 1.0ml とアルカリ性グリシン液 2.5 ml および蒸留水 1.5 ml を加え発色、遠心上清を Coleman 光電比色計を用い波長 550m μ で測定した。

以上肝の 4 つの酵素活性を飼料群、飼育期間別に比較測定した。

2. 実験結果

① Alkaline-phosphatase : マウスの幼児期に於てその活性度は、標準飼料、低蛋白飼料のいずれの群に於ても比較的变化は少なく、また Fig. 1 に示されるように、飼料の蛋白含量差による影響も少ないようである。飼育期間の延長と共に低蛋白飼料 Luteoskyrin 添加群では活性度にバラツキを生ずる。このことは、肝細胞の壊死、萎縮、再生等の種々の変化が起こる時期と、この酵素のバラツキの発生が一致するように思われる。そして飼育30~60日頃に低蛋白・Luteoskyrin 添加飼料で多少の活性上昇が見られる。しかしまた90日頃になると、標準飼料 (Diet I) 群の活性度の値と殆んど差がない。飼育180日頃の Alkaline phosphatase の活性度は、標準飼料 (Diet I) 群のマウス肝でその活性度の個体差が著しく目立ってくる。また低蛋白飼料 (Diet II, IV) および I-L, II-L, IV-L でも同様に個体差が現われ、標準飼料 (Diet I), 試験飼料 (Diet II, IV, I-L, II-L, IV-L) 間の Alkaline-phosphatase の活性度に有意の差を認めないようになる (Fig 1)。

標準飼料 (Diet I) 群の活性度を 100 として、試験区群 (I-L, II, II-L, IV, IV-L) の活性度を比較検討した (Fig. 2)。その結果、標準飼料 (Diet I) のこの酵素活性の変動は飼育期間を通じて、 100 ± 20 、一方、低蛋白飼料および低蛋白 Luteoskyrin 添加飼料群で飼育30~90日間に多少の活性度低下を示す。しかし、この活性度低下は標準飼料群の活性度の開きから見て有意な差とは考えられない。飼育 180 日に至って低蛋白および、Luteoskyrin 添加による活性低下の傾向が 2~3 の例外を除いて示されるようである。ここで特に、腫瘍の発生を認めた肝の活性度が標準飼料群の活性度と殆んど一致することが認められた。

Fig. 1. Changes of alkaline-phosphatase activity in the liver of mice fed by different diets

Fig. 2. Changes of alkaline-phosphatase activity in the liver of mice fed by different diets

② Glutamic oxaloacetic transaminase=(G-O-T) : Fig. 3 に示されるように、購入直後の G-O-T 活性度は、予備飼育期間中に飼料に含まれる蛋白量によって大きな活性度の開きを生ずる。その後飼育期間のいづれをみても標準飼料 (Diet I) と試験飼料群の間の活性度に有意な差を認めなかった。

標準飼料 (Diet I) 群のマウス肝のこの酵素活性度を 100 とし、試験飼料群 (Diet I-L, II, II-L, IV, IV-L) を比較検討した結果、標準群の活性度は $100 \pm 20\%$ 、購入直後～前飼育期に於いて、低蛋白飼料群で約 50～60% の活性度の低下を示した。

また飼育期間の長短による活性の上昇、下降を比較すれば、マウスの幼児期に起こった低蛋白飼料によるこ

Fig. 3. Changes of G-O-T activity in the liver of mice fed by different diets

Fig. 4. Changes of G-O-T activity in the liver of mice fed by different diets

の酵素の活性度低下 50~60% は飼育期間の延長により低下率は多少縮小するが飼育 180 日に至っても G-O-T の低下傾向は多少残るようである (Fig. 4)。

③ Cysteine desulfhydrase : Fig. 5 に示されるように購入直後のマウス肝のこの酵素は前飼育期間の短時に飼料に含まれる蛋白量に大きく影響され、この酵素の活性は幼児期に特に飼料中の蛋白含量に左右されやすく、また飼育日数の延長によってこの酵素の活性度は標準飼料でも多少低下を示すようである。

特に低蛋白飼料によるこの酵素の低下は Luteoskyrin を添加するしないにかかわらず、飼育期間を通じて大きな活性度の差を示す。飼育 180 日頃で、標準飼料群の活性度に個体差が生じ 1~2 のマウス肝では低蛋白飼料群と同様に、活性度低下を示すものが出現する。

標準飼料(Diet I)群のマウス肝のこの酵素活性を 100 とし、個体間の酵素活性度の差を算出すると 100 ± 30

Fig. 5. Changes of Cysteine-desulphydrase activity in the liver of mice fed by different diets

Fig. 6. Changes of Cysteine-desulphydrase activity in the liver of mice fed by different diets

%, Fig. 6 に示されるように、前飼育期間に低蛋白飼料群で、この酵素の活性度は約 70~80% 低下した。さらに飼育15~90日の期間で殆んどこの状態を維持し、さらに低下するものを見ることができる。飼育180日で、標準飼料群でその活性度に個体差が目立って著しく現われた。試験飼料 II, II-L, IV, IV-L 群の活性度低下は前記と同じく低下し、一方腫瘍発生肝でも、低蛋白飼料 (II, IV) と同程度の酵素活性度を示した

Fig. 7. Changes of β -glucuronidase activity in the liver of mice fed by different diets Fig. 8. Changes of β -glucuronidase activity in the liver of mice fed by different diets

(Fig. 6)。

④ β -Glucuronidase : この酵素は Fig. 7 に示されるように飼料の蛋白含量の如何にかかわらず、幼児期にその活性度は高く、飼育期間が延びるにつれて30, 60, 90日頃に至って、この酵素活性度は、一時多少の低下を示し一定値を示すようである。また飼育180日頃には標準飼料群のこの酵素活性は個体間に大きな差を引き起こす。低蛋白 Luteoskyrin 添加飼料群 (II-L, IV-L) は低蛋白飼料群 (II, IV) よりこの酵素活性度が上昇の傾向を示す。

標準飼料群のマウス肝のこの酵素活性度を100とし、個体間の酵素活性度の変動を算出すると $100 \pm 20\%$ 、飼育初期には標準飼料群と試験飼料群との間に差を認めないが、飼育15日頃より試験飼料群に多少活性度低下の傾向が示され、30日頃に至って II, II-L, IV, IV-L 等の試験飼料群で約20%の活性度上昇を示し、90日でもこの状態が続いているようである (Fig. 8)。

特に II-L, IV-L 試験飼料群で肝に腫瘍の発生を認めたものでは β -Glucuronidase の活性度がさらに上昇することを認めた。

3. 考察

前報に引き続いて dd 系マウスを標準飼料・低蛋白飼料およびそれぞれの飼料に 5mg% の Luteoskyrin 添加飼料で長期飼育した。

各飼料群のマウスの肝細胞の酵素, Alkaline-phosphatase, Glutamic oxaloacetic transaminase, Cysteine desulphhydrase, β -Glucuronidase, 等の活性度を飼料群別、飼育日数別のマウスに関して比較測定した。さらに本報告では肝の腫瘍形成に至る酵素活性の変化に関する知見を報告する。Alkaline phosphatase の活性度は、標準飼料、低蛋白飼料の間で顕著な差は認められなかった。また Luteoskyrin の添加、無添加いずれの飼料でも、その活性度に顕著な差は認められない。また G-O-T は飼育初期 (幼児期) に、短時日に低蛋白飼料と標準飼料間に大きな活性度の差が一時的に認められる、飼育期間の延長によって標準飼料区との間に生じた差は縮小されるようである。

一方、飼料中の蛋白質、アミノ酸量の減少は Cysteine desulphhydrase の活性度を早期に低下させるようである。この酵素活性の低下は飼料中の蛋白量と比例関係にあるようである。また前報の体重増減、湿肝重量の増減、肝の組織変化等と組み合わせて、動物体内に起こる種々の働きに関して総合的に考察をすれば、経口的に与えられる食物中の蛋白含量の低下は急速に肝細胞のこの酵素の働きを遅延させ、その機能に異状を引き起こすものと思われる。かかる状態にある肝細胞に加えられる Luteoskyrin は肝に腫瘍の発生を引き起こさせる原因物質の一つであると思う。

β -Glucuronidase の活性度は幼少時に於いて、いずれの飼料群のマウスでも高く、飼育中期に至っていずれの飼料群に於いても酵素の活性度は一時低下する。一方、低蛋白・Luteoskyrin 添加飼料群のマウスでは、その時期に活性度はやや上昇し、肝細胞の再生が始まる頃より、活潑な代謝が行なわれるようである。腫瘍発生肝ではマウス幼少時期のそれと同様またはそれ以上の活性を示す。このことは単に肝の解毒現象のみならず、飼料中の蛋白含量の不足が生体内で引き起こす生体内蛋白合成機構¹²⁾と深い関係を考えさせられる。また特に腫瘍形成時の β -Glucuronidase 活性の上昇は肝の代謝異状を示す特記すべき現象であると思う。

4. 要約

①前報に於いてわれわれは低蛋白飼料に Luteoskyrin を添加した飼料でマウスを長期飼育することによりマウスの肝に腫瘍の発生することを報告した。

本報告ではこれら腫瘍の発生までに引き起こされる肝の変化を組織学的、生化学的両面から飼料別、飼育期間別に正常肝と比較検討した。

②Alkaline phosphatase は全飼育期間を通じて、標準飼料群のマウス肝細胞の活性度と試験区の肝細胞の活性度との間に顕著な差は認められなかった。また肝の Glutamic-oxaloacetic transaminase の活性度も一時期には多少の変動を認めたが飼育期間が長期になるにつれその差は縮小した。

③飼料に含まれる蛋白量の減少は早期に、マウス肝細胞の cysteine-desulfhydrase の活性度を低下させる。この酵素の低下現象は低蛋白飼料投与群のマウス肝に飼育全期間を通じて維持されるようである。また低蛋白飼料に Luteoskyrin を添加した飼料群のマウス（肝に腫瘍発生）でも同じ傾向を示す。

④ β -Glucuronidase の活性度は低蛋白飼料 Luteoskyrin 添加飼料群マウスで飼育中期以後、その活性度は上昇の傾向を示し、飼育末期に至って幼児期の活性度と近似値を示し、また肝に腫瘍の発生を見たものではさらに β -Glucuronidase の活性度は上昇するようである。

文 献

- 1) N. Morooka, N. Nakano, T. Miura, N. Uchida, M. Okugi: *Jap. J. Nutrition*, Vol. 22, No. 2 (1964)
- 2) E. L. Opie: *J. Exptl. Med.*, 84, 91~106 (1946)
- 3) J. A. Miller, E. C. Miller: *Adv. Cancer Res.*, I, 339~396 (1953)
- 4) A. C. Griffin, Clayton C. C. and C. A. Baumann: *Cancer Res.*, 9, 82 (1949)
- 5) A. Nishimura: *J. Jap. Biochem. Soc.* 33, 300~306 (1961)
- 6) J. P. Greenstein: *J. Nat. Cancer Inst.*, 3, 491 (1943)
- 7) J. A. Stekol, S. Weiss and E. I. Anderson: *J. Biol. Chem.*, 233, 936~938 (1958)
- 8) J. C. Edozien, E. J. Philips, W. R. F. Collis: *Lancet* Vol. 1, 615~618 (1960)
- 9) C. Berman: *Adv. Cancer Res.*, 5, 55~96 (1958)
- 10) W. H. Sebrell, D. B. Hand: *Amino Acid Malnutrition* 47~59 (1957)
- 11) J. S. Garrow: *Amino Acid Malnutrition*, 14~27 (1957) ;
- 12) J. Axelrod, J. K. Inscoe, G. M. Tomkins: *Nature*, Vol. 179, 538~539 (1957)
- 13) Y. Ohmori: *Enzymologia*, 4, 217 (1937)
- 14) P. Cabaud, R. Leeper, F. Wróblewski: *Am. J. Clin. Path.*, 26, 1101 (1956)
- 15) St. Lolant I.: *Z. Physiol. Chem.*, 185, 245 (1929)
- 16) MM. C. Fromageot, E. Wookey, M. P. Chain, M. M. Javillier: *Compt. Rend. S. Acad. Sci.*, No. 1, 1019~1021 (1939)
- 17) P. Bernfeld, W. H. Fishmann: *J. Biol. Chem.*, 202, 757 (1953)

(受付: 昭和39年8月10日)