加齢と肝ライソソーム酵素の変動

玉熊 正悦 石山 賢 小泉 澄彦
高野 達哉 後藤佐多良*

最近, Lysosome 酵素の膜外遊出と各種の代謝異常やショックの重症化などとの関連性が注目され, とくに細胞の老化, 臓器の加齢に伴う変化などにも Lysosome 膜の透過性亢進ないし膜外に遊出した Lysosome 酵素の影響している可能性が指摘されている. 果して動物やヒトの肝臓で, Lysosome 顆粒の膜透過性ないし解裂の度合に老若の間で差があるか否か検討した.

肝組織を 0.25 M Sucrose を含む Tris Buffer で homogenize し, 超遠沈でえた上清分画と Lysosome 顆粒分画について, それぞれ従来から Lysosome に局在することの知られている酵素活性を測定し, 上清分画の活性 S と顆粒分画の活性の比で Lysosome 酵素膜外遊出の程度とした. その結果 acid RNase を指標とする限り, マウスやハムスター肝では上述の S:P 比が加齢とともに増加し, 6 週目の値に比較して 2 年目ではほぼ倍に達していた. これに反しモルモットでは加齢とともに幾分 S:P の増加傾向を認めるが, 個体間のバラツキが大きく一定の相関を認めがたかった.

次に上腹部疾患で開腹術が行われ, 術前肝機能に異常がない 25 才より 85 才までの 23 例について, 術中の生検材料から同様の検討を行った. この際ヒト肝の acid RNase 活性 Peak は pH 6.0 にあり動物の Peak (pH 4.5) より中性例にあるため緩衝液として動物の際の Acetate Buffer の代りに phosphate Buffer を用いた. その結果 acid RNase はヒトでもやはり加齢とともに S:P 比の増加することを確認したが, β -glucuronidase には年令との相関を認めなかった. Lysosome 膜透過性ないし S:P 比の加齢による影響が, 指標とする酵素の種類や動物の種により異なる理由は必しも明らかでないが, RNA 分解酵素の Lysosome 膜外活性が年令とともに増加する上述の成績は, 著者らがすでに報告したヒト肝含量の加齢による減少傾向と合わせ興味ある所見と考える.

1. はじめに

加齢とともに臓器や細胞の機能が次第に減退し, 老化・老衰によって死にいたることは, 生物学的に興味あるばかりでなく, 近年ますます重要性を増してきた成人病や代謝病の本質を理解するためにも必要な研究課題である¹⁾. とくに組織や細胞レベルでの蛋白, 核酸代謝や酵素活性が, 年令とともにどのように変動するかが注目され, これに関連する研究報告が多数認められる²⁻⁵⁾. 筆者らも外科的侵襲に伴う代謝反応と, これに対する加齢の影響という立場からこの問題を取りあげ, ハツカネズ

ミに熱傷を作ったさいの, 肝・筋肉核酸に対する P³² とりこみの老若による差, さらに手術時にえた肝生検材料についてヒトの肝 RNA や総窒素量が年令とともにどのように変動するか, などを報告してきた⁶⁾.

さて 1955 年, de Duve⁷⁾ らは細胞内小器官で電子顕微鏡的に一重膜で囲まれた円形ないし楕円形の電子密度の高い小顆粒を確認し, これを Lysosome に命名した. 赤血球をのぞくほとんどすべての哺乳動物の細胞に認められるこの小顆粒は, 組織化学的に酸性 Phosphatase Cathepsin, Acid Ribonuclease, など多数の加水分解酵素を有しており, とくに肝細胞の毛細胆管周辺にみられる肝 Lysosome には 22 種を越える加水分解酵素が報告されている⁸⁻¹⁰⁾. 本来, 細胞外から侵入したり細胞内に出現したりした物質の消化を営むものとされていたが⁹⁾, 最近では細胞の自己融解¹¹⁾, 組織の障害¹¹⁾, 外科

* S' Tamakuma, M. Ishiyama, S. Koizumi: 東京大学第 1 外科文京区本郷 7 の 3 の 1: T. Takano, S. Goto: 東京大学薬学部微生物薬品化学.
受付: 1969 年 9 月 12 日.

的ショックの重症化^{12,13})との関係などが注目されている。肝細胞にグリコーゲンが蓄積する代謝疾患である Glycogenosis, Type 2 は, Lysosome に局在する酸性 α -1,4 Glucosidase の先天性欠除による Inborn Lysosomal Disease であることが知られている⁸⁾、痛風患者の疼痛発作と滑液中の白血球 Lysosome による尿酸塩貪食ないしそれにつづく Lysosome 酵素の放出との関係も重視されている^{14,15)}。このように de Duve らに始まる Lysosome の概念は、細胞レベルでの組織化学、電子顕微鏡学の進歩につれ、従来いわゆる特殊な細胞内顆粒とされていたもののの中に、この Lysosome の範疇に入るものが少なくないことや、酵素の先天性欠陥、膜の安定性の変化、遊離した酵素の生体に対する作用などに基づいて、これまで不明であったいくつかの病態を解明しつつある。

最近になって、臓器や組織が加齢とともに変性してゆく過程に、細胞内での Lysosome 酵素の活性亢進が積極的に関与している可能性が注目され、Franklin ら (1962)⁵⁾ はラットの腎臓についてある程度これを確認している。果して動物やヒトの肝臓について老若の間で Lysosome 膜の透過性ないし解裂に差があるか否か、筆者らがこれまでに検討した成績を報告する。

2. 実験方法

2. 肝 Lysosome 酵素の測定法

a) 動物実験：図1のように、0.5 g 前後の肝切片を 0.25 モルの Sucrose を含む Tris-Buffer で hoogenize し、3,000 G の遠沈による上清分画をさらに 27,000 G の超遠沈で Lysosome 顆粒分画と上清分画に分離した。つづいてこれに Lysosome 解裂剤として 10 % Triton-X-100 を加え、両分画について従来から Lysosome に局在することが知られている酵素群のうち、とくに Acid Ribonuclease, β -Glucuronidase をそれぞれ測定した。 β -Glucuronidase は 0.01 M. Phenolphthalein glucuronate (Sigma 社) を基質とし、0.2 M. Acetate buffer (pH 10.5) 液中で 37°C 30 分後遠沈、0.5 M Glycine buffer (pH 10.5) を加え波長 550 m μ での吸光度で測定した。また Acid ribonuclease は精製した酵母リボ核酸を基質とし、0.2 M Acetate buffer (pH 5.0) 中で 37°C, 30 分後 0.75% Uranyl acetate in 25% PCA を加え遠沈、上清成分の波長 260 m μ における紫外外部吸収で測定した。

b) ヒト肝切片での測定：ヒトの肝切片における β -

図 1. 肝 lysosome 酵素の測定法

Glucuronidase, Acid ribonuclease 活性と pH との関係を、0.2 M. Acetate buffer, 0.2 M Phosphate buffer, 0.05 M. Tris buffer をもちいて pH 3 から 9 にわたって検討すると、 β -Glucuronidase の活性ピークは図2のように pH 4.5 前後にあって、これまでに報告されている動物肝での活性域と差はなかった。しかし Acid ribonuclease は図3のように、pH 6 の近辺に活性ピークが認められ先にあげた動物での pH 4.5 をピークとする活性域より明らかに中性側に傾いているため、a)の

図 2. pH-activity curve of β -glucuronidase in human liver

図 3. pH activity curve of acid ribonuclease in human liver

Acetate buffer のかわりに pH 6.0 の Phosphate buffer を用いた. この点を除けば測定法の詳細は a) と同様である.

II) Lysosome 膜の透過性乃至解裂度の比較

以上のようにしてえられた上清分画の活性 (S) と Lysosome 顆粒分画の活性 (P) との比 (S : P) を比較した. 先にものべたように, 細胞内では β -Glucuronidase, Acid ribonuclease 両酵素とも本来 Lysosome に局在していることが知られているため, 上清分画でのこれらの酵素活性は, Lysosome 膜が変化して膜外に遊出した酵素分画によるものと考えられる. つまり沈澱分画の活性 P に対する上清分画の活性 S の割合 (S : P) 比が大きいくほど, Lysosome 膜の安定性が減じてその透過性ないし解裂の亢進していることがうかがわれる.

3. 結 果

I) 動物の実験成績

生後月数と S : P 比の関係を, まず Acid ribonuclease

図 4. S/P ratio of the activity of acid RNase

図 5. S/P ratio of the activity of acid RNase

図 6. S/P ratio of the activity of acid RNase

を指標としてマウス (図 4, 黒丸は ICR 純系, 白丸は JPC 系) や, ハムスター (図 5) で検討すると, いずれも生後月数の増加につれて S : P 比は増しており, とくに生後 2 年経過した群の S : P 比は生後 6 週の群に比較して約 3 倍にも達している. しかしモルモットについては図 6 のように加齢と S : P 比の相関は認められなかった.

II) 臨床例での成績

胃, 十二指腸, 胆道疾患などで開腹術が行われた症例について, 術中の肝生検材料から 3 : 1 と同様の検討をした. 症例は表 1 のように 26 才から 85 才までの 23 例で, いずれも術前の肝機能検査 (血漿総蛋白, 黄疸指数, T. T. T, Kunkel, GOT, GPT) の異常や, 術中大量出血ないし血圧低下の認められなかったものである. その結果 β -Glucuronidase の S : P 比は図 7 のように, 各年令層とも 0.5 前後でとくに加齢とともに増加してゆく傾向を示さなかった. しかし Acid ribonuclease は図 8 のように, S : P 比 (Y) と年令 (X) との間に $Y =$

表 1.

病 歴 番 号	年 性	病 名	血 漿 総 蛋 白	GM	TTT	Kunkel	GOT	GPT
680011	26♂	十二指腸潰瘍	8.0	4	5	11	23	9
680050	26♂	胃 潰 瘍	8.1		2	7	17	8
680046	29♂	十二指腸潰瘍	6.9	9	1	5	40	11
680015	34♂	胃 潰 瘍	7.9	5	6	7	31	33
680084	36♀	胃 癌	6.4	3	2	8	35	25
680280	38♂	胃 潰 瘍	7.0	4	3	7	15	5
680312	39♂	十二指腸潰瘍	7.0				30	9
680309	40♂	胃 潰 瘍	7.0	4	1	9	13	10
680059	48♀	胃 癌	7.0	3	3	8	13	10
670811	49♂	胃 潰 瘍	6.9	4	1	5	8	7
680079	52♂	胃 癌	6.6	7	2	6	13	7
680051	54♀	胃 潰 瘍	6.9	4	3	9	18	11
680052	55♂	肝 癌	8.0	6	2	10	47	34
680194	58♀	肝 癌	6.9	4			70	62
680238	59♂	胃 癌	6.8	5	3	8	8	5
670806	60♂	胃 癌	7.0	4	2	7	16	9
680064	60♀	胃 癌	6.8				24	18
680054	62♀	胃 癌	5.9	4	1	5	5	5
680215	64♂	胃 癌	6.2	4	2	10	35	14
680204	72♀	胆 石 症	7.4			13		5
670802	73♀	胃 癌	7.0	4	6	13	7	5
680309	78♀	結 腸 癌	6.3	5	6	5	25	3
養育院	85♀	胃 癌	7.9	2	3	7.2	21	14

図 7. S/P ratio of β -glucuronidase and aging in human liver

0.0024X+0.1 の Regression Line で示される相関が認められ、年令とともに S:P 比の増加してゆく傾向がうかがわれた。これらの酵素の肝 1g 当りの総活性は次の図 9 のように Acid ribonuclease, β -Glucuronidase ずれも老若の間でとくに著明な差がないため、このさいの Acid ribonuclease の S:P 比に対する加齢の影響は

Lysosome 顆粒分画の上清分画に対する相対的減少によるものである。

4. 考 案

細胞成分を酵素学的に研究していた de Duve⁷⁾ は、ミトコンドリア分画に正常状態では非活性な酵素が存在すること、しかもこれに物理的、化学的処理を加えていると酵素が賦活されて酸性水解酵素の性質を示すことを知り、活性に潜在性のある酵素が細胞内顆粒に結合していると考えてこれを Lysosome と名づけた。これに含まれる酵素の Cathepsin, Acid Phosphatase,

Acid ribonuclease, Acid Desoxyribonuclease などは、Ribosome の蛋白や核酸を分解したり、ミトコンドリアの呼吸機能を障害するといった一連の有害な作用を潜在的に所有しているといわれる¹⁶⁾。通常はこれらの酵素を他の細胞成分から非活性の状態に隔絶しているのが、脂質蛋白性の膜構造である。この Lysosome 膜を解裂ない

図 8. S/P ratio of acid ribonuclease and aging in human liver

し透過性を亢進させるいわゆる Labilyser として洗浄剤線照射, 蛋白融解剤, エンドトキシン, 閉塞性黄疸^{12,13,17)}などの影響が指摘されている。また水野¹⁸⁾らは Dimethylaminoazobenzen による発癌の過程で, Allison¹⁹⁾らは Virus 性肝炎の際に, それぞれ Lysosome 膜の同様の变化を報告している。

この Lysosome の年令による変化として, まず顆粒に局在する酵素の総活性の増減が比較的早くから注目されていた。Bjoerkerud²⁰⁾はラット肝の Acid phosphatase が, また Barrows³⁾はラット肝の Cathepsin が, Mijs³⁾は同様に Aryl-sulphatase がそれぞれ年令とともにその総活性が増加することをのべている。しかし一方では, 肝臓には加令による変化が来にくいとの立場に立つ Barrow,³⁾ Franklin⁵⁾らのようにラット肝の Acid phosphatase は年令によって変らないとの報告もあるし, 逆に Zorzoli は老マウスの Acid phosphatase は減少するとのべている。また Bjoerkerud²⁾は Aryl-sulphatase, Cathepsin いずれも加令によって変化しないと主張する具合で諸説紛々である。最近になりこの Lysosome の膜自体の加令による変化が, 上述の多数の Lysosome 膜 Labilyser と並んで注目されるようになった。1962 年 Franklin は肝, 腎の総 Acid phosphatase 活性と上清分画の活性を比較し, 幼若ラットから生後 6 ヶ月まではこの上清分画活性の総活性に対する比が増加すること, しかし生後 6 ないし 7 ヶ月と 12 ヶ月のラットの間では差がないこと, さらに 23 ないし 25 ヶ月のラットになると腎組織ではこの比が再び著しく増加するのに肝臓では不変であること, などを指摘した。筆者らは 2: I, 2: II の方法に従って, 上清分画と顆粒分画に分け, マウス, ハムスター, ヒト肝の Acid ribonuclease が年令とともに

に顆粒分画に比較して上清分画の活性が増加してゆくことを確めた。本法で Lysosome 膜の透過性を論ずる場合, ①加令とともに Lysosome 顆粒の大きさが小さくなり同じ回転速度の遠沈では沈澱しない可能性, ② Homogenize から遠沈までの操作中に膜が機械的刺激で毀れる可能性, ③ Acid phosphatase,^{12,13)} Aryl-sulphatase⁵⁾が他の酵素に比較して膜外に容易に遊出しやすいことがすでに指摘されているが, このように指標とする酵素によって違った結果が生じる可能性などを考慮しなければならない。これらの点を斟酌しても, 実験条件の一定,

その他の情况から考えて上述の成績は, 加令の影響が膜におよんだ結果としてほぼ間違いないように思われる。Bjoerkerud²⁾はヒト肝について Arylsulphatase を指標としほぼ同様の結論を報告している。ただ著者らのモルモットの実験では, 加令による上述の Lysosome 膜の変化を証明できなかった。このように動物の種による差も否定できない。

加令による肝の形態学的変化としてこれまでに細胞数の減少, 多核細胞や Intracellular Inclusions の出現, ミトコンドリアの Cristae, Endoplasmic Reticulum の変化などがあげられているが²⁰⁾, 組織化学的にもっとも著しい特徴は Age Pigment つまり Lipofuscin の増加であろう¹⁰⁾。従来この色素の或因として, ミトコンドリアや Golgi 体の関与, 脂肪の自動酸化などがいわれてきた²²⁾が詳細は不明のままであり, またこの色素沈着と細胞の機能障害との関係も脳を除けばほとんど解っていない¹⁰⁾。しかし最近になってこの Lipofuscin が RNA に富み Acid phosphatase, Cathepsin など上述の Lysosome に局在する多数の酵素をその色素顆粒に含むことなど, Lipofuscin と Lysosome の関連性が注目されている¹⁰⁾。de Duve²³⁾は Lipofuscin 自身が Lysosome の構成要素の一つであること, また Strehler²⁴⁾は Lipofuscin の微細構造が Lysosome に非常に似ていることをのべている。Samorajski²⁵⁾は神経系の Lipofuscin を組織化学的に調べて, Lipofuscin の形成に Lysosome が重要な役割をなうことを, また Bjoerkerud²⁾は Lipofuscin が Lysosome 膜にある脂質成分の酸化されたものと報告していることなど, いずれも年令とともに増加する Lipofuscin と, Lysosome の密接な関係を示しており, Lysosome の加令による変化を裏づける興味ある

図 9. Total activity of β -glucuronidase

見解と申せよう。

われわれはすでにヒト肝 1 g 当りの総窒素量が年齢によってあまり変らないのに、リボ核酸量は加齢とともに減少することを報告した⁶⁾、RNA 分解酵素である Acid ribonuclease の上清分画における活性が年齢とともに増加するという上述の著者らの結論は、肝細胞の加齢に伴う蛋白、核酸代謝などの変化を理解する上にも役立つ所見と考える。

5. 結 論

肝 Lysosome 膜の透過性ないし解裂と加齢の問題を動物やヒト肝の 27,000 G 超速沈による上清分画と沈澱分画との比 (S:P) で比較した。その結果 Acid ribonuclease に関する限りヒト、マウス、ハムスターでは明

らかに年齢とともに S:P 比が増加して Lysosome 膜外に遊出した酵素分画が増えること、モルモットではそれが認められなかったことを報告した。

最後にご校閲を賜わった恩師石川浩一教授に深甚の謝意を表する。また実験にあたり終始ご指導を賜った薬学部水野伝一教授に心から感謝致します。

- 文 献 1) 早石修: 代謝, 2: 422, 1965. 2) Zorzoli, A.: J. Gerontol. 10: 156, 1955. 3) Barrows, C. H. et Roeder, L. M.: J. Gerontol. 16: 321, 1961. 4) Mukundan, M. A. et al.: Exptl. Celll Res. 32: 251, 1963. 5) Franklin, T. J.: Biochem. J., 82: 118, 1962. 6) 林四郎, 玉熊正悦ほか。日本老年医学最雑誌 2: 194, 1965. 7) de Duve, C. et al.: Biochem. J. 60: 604, 1955. 8) Hers, H. G.: Gastroenterology 48: 625, 1965. 9) 谷川久一: 医学のあゆみ 55: 146, 1965. 10) Allison, A. C.: The Biological Basis of Medicine. edited by Bitter, E. E., et Bitter, N., Academic Press, London and New York, 1968. 11) 仁井谷久暢ほか: 医学のあゆみ 62: 130, 1967. 12) Janoff, A. et al.: J. Exptl. Med. 116: 451, 1962. 13) Weissmann, G. et al.: J. Exptl. Med. 116: 433, 1962. 14) Rajan, K. T.: Nature 210: 959, 1966. 15) 吉村隆: 医学のあゆみ 59: 513, 1966. 16) Sawant, P. L. et al.: 85: 82, 1964. 17) 玉熊正悦, 石山賢ほか: 外科治療 21: 141, 1969. 18) Mizuno, D. et al.: J. Biol. Chem. 1969 (in press). 19) Allison, A. C. et Mallucci, L.: J. Exptl. Med. 121: 463, 1965. 20) Bjoerkerud, S. et al.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 20: 224, 1967. 21) Miks, B.: 20) より引用. 22) Sullivan, F. J. et al.: J. Amer. Geriat. Soc. 11: 923, 1963. 23), 24), 25), : 10) より引用.

Abstract

Aging and Change in Location of Hepatic Lysosomal Enzymes

Shoetsu Tamakuma, Masaru Ishiyama, Sumihiko Koizumi*

Tatsuya Takano, Sataro Goto**

de Duve and his collaborators have presented the evidence that a number of previously-inactive enzymes become activated probably due to release from the intracellular particles called "lysosome". Thereafter, attention has been made to the apparent correlation between the disruption or increased permeability of lysosomal membrane and several pathological states such as metabolic disorders, refractory shock, or aging. The purpose of this communication is to describe whether there is any cogent relationship between lysosomal enzyme activity and aging process of liver in human beings or some animals, or not.

Quickly-excised liver samples of mouse, hamster, or guinea-pig were homogenized with a Teflon glass homogenizer in cold 0.25 M. sucrose solution containing 0.01 M. tris buffer (pH 7.5). The acid RNase activity of both supernatant (S) and precipitate (P) fractions obtained by 27,000 G centrifugation were measured. The liver tissue samples were also obtained from twenty-three surgical patients who were operated

for uncomplicated gastro-duodenal or gall bladder diseases. The age distribution of these patients were from 26 to 85 years old, and no patients showed any abnormal liver function preoperatively. The acid RNase and beta-glucuronidase activities of human liver samples were also measured by almost the same procedures with animal experiment. The change in the location of lysosomal enzymes was shown by changes in ratio of activity of (S) to (P) fraction (S : P Ratio).

As a result, the remarkable increase of acid RNase activity in supernatant fraction compared to that in the particulate fraction of liver, was recognized in mouse, hamster, and human being with advancing age, whereas the change of total activity of the enzyme was almost negligible. S : P ratio of both beta-glucuronidase in human liver and acid RNase in guinea-pig did not show any cogent increase with aging. The foregoing results were discussed with special reference to our previous communication presenting that the RNA contents in human liver decrease with aging.

*

*

*

* First Department of Surgery (Ishikawa-Geka), Tokyo University

** Faculty of Pharmacological Sciences, Tokyo University.