肝障碍時の血中エステラーゼ活性

日本医科大学化学教室

葛 西 一 介

Kazusuke Kasai

肝障碍時の血中の諸種酵素の消長については、従来多くの報告がなされており、肝疾患の化学的診断の一助となつているものも少なくない。

四塩化炭素は肝の中心性壊死を、また蟻酸アリルは肝周辺部の壊死をおこす毒物であることは周知の事実である。四塩化炭素による障碍時には、肝中心部グリコゲンの消失、 α -グルコース-6-リン酸エステラーゼ活性の増強、コハク酸々化酵素活性の低下¹⁾および、肝臓の銅、鉄などの減少²⁾することが知られており、また蟻酸アリルによる肝障碍時には、グリコゲンの減少、コハク酸々化酵素活性の増強などが知られており³⁾、また α -グルコース-6-リン酸エステラーゼ活性は四塩化炭素の場合と異り、活性の増強されないことも知られている⁴⁾。

木村⁵⁾は Huggins⁽¹⁾の方法を改良して、パラニトロフェノール酢酸エステル (PNPA) を基質とした血液中のエステラーゼ活性を定量する方法を考案し、さらに、エステラーゼのなかでも、含窒素アルコールのエステルに高い特異性を示すアセチルコリンエステラーゼ、あるいはコリンエステラーゼが PNPA 水解に関与しないことを報告している。

従来アセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼは臨床的にも種々の疾患時に、しばしば測定の対象となつている酵素である^{6,7)}。したがつて、PNPA を基質とした場合の酵素活性の測定は、一応アセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼの消長とは別に扱うことができる点で便利である。

著者は、PNPA 水解酵素活性の肝障碍時の変動を、四塩化炭素、蟻酸アリルおよび黄燐による中毒家兎を用いて観察したので、以下にその結果を述べる。

実験方法

毒物による肝障碍：市販の四塩化炭素を体重 1 kg 当り 0.05 乃至 0.1 ml をゼンデを用いて家兎に経口的に投与した。二、三の実験では、0.1 ml の四塩化炭素を 1.0 ml のオリーブ油に溶解し、これを家兎背筋および大腿筋に注射した。肝へ直接注射する場合は、開腹して肝を露出せしめて、これに注射した。

蟻酸アリルは市販品を用い、体重 1 kg 当り 2% の蟻酸アリル 0.2 ml を経口的に投与した。筋肉内注射の場合は 0.2 ml を背筋あるいは大腿筋に注射した。

黄燐は市販品を用い、体重 1 kg 当り 6~8 mg を経口的に投与した。

肝の挫滅：家兎を開腹し、肝を露出せしめ、そのおおよそ 1/3 をコソヘルを用いて挫滅した。

酵素材料：家兎の頸静脈から 5 ml の血液を採取し、直ちに脱線維素したのち、血清と血球を遠心分離する。赤血球は生理的食塩水で 3 回洗滌し、最後に生理的食塩水をもつて、もとの血液量として保存する。酵素活性の測定にさいしては、血清、血球とも 20 倍稀釈のもの 1.0 ml を使用した。

毒物処理前の対照酵素材料は、同一家兎から、処理前に血液を採取し上記のような方法で調製した。

基質：パラニトロフェノール酢酸エステルは市販のものを使用した。PNPA 溶液の調製法は木村の方法⁵⁾に準じて次の如く行つた。PNPA 72.4 mg をメタノール 10 ml に溶解する。この溶液 1.0 ml をはげしく振盪しながら蒸留水を加えて全量 100 ml にする。この溶液は使用前に毎日新しく調製した。

酵素活性の測定： 2.0×10^{-4} M PNPA 溶液 10 ml、M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 5.0 ml、蒸留水 4.0 ml を試験管にとり、予め 37°C の恒温槽で加温し、温度平衡に達した後、酵素液 1.0 ml を添加し、一定時間ごとに反応液 5.0 ml をとり、20% 三塩化酢酸 1.0 ml を加え、さらに蒸留水を加えて全量 10.0 ml とする。10~20 分後東洋濾紙 No. 6 で濾過し、その濾液について 315 m μ における吸光度を測定する。

予め濃度既知のパラニトロフェノール溶液と PNPA 溶液の混合液について求めた、315 m μ の吸光度による nomogram を用いて、測定した 315 m μ の吸光度から PNPA の分解量を求めた。

実験結果

(1) 四塩化炭素投与後の血中エステラーゼ活性の変動

(a) 経口投与

第1図に示すように、家兎体重 1 kg 当り 0.1 ml を経口的に投与し、投与 24 時間後の血球および血清のエステラーゼ活性を測定すると、血球では四塩化炭素投与による影響はほとんど認められないが、血清では著明な活性の増大が認められた。

第1図 四塩化炭素の経口的投与後のエステラーゼ活性

- I. 赤血球エステラーゼ活性 (対照)
 II. 四塩化炭素投与 24 時間後の赤血球エステラーゼ活性
 III. 血清エステラーゼ活性 (対照)
 IV. 四塩化炭素投与 24 時間後の血清エステラーゼ活性
 体重 1 kg 当り 0.1 ml 投与

同様の実験を、投与する四塩化炭素の量を変えて行つてみると、体重 1 kg 当り 0.07 ml では 0.1 ml 投与の場合とほぼ等しい効果がみられるが、0.05 ml では全く影響が認められない。0.05 ml および 0.07 ml 投与実験を数回行つてみたが、いずれの場合も、0.05 ml では全く血清エステラーゼ活性の増大は認められなく、これに反し、0.07 ml 投与では著しい活性の増大が認められた。

次に経口投与後各時間ごとに採血し、それらについてエステラーゼ活性を測定してみたところ、第2図に示すように、四塩化炭素投与後、1時間ですでに活性値の増大が認められ、以後時間とともに活性値は増大し、投与後3時間目の活性値は、24時間後の活性値とほぼ同じ値を示した。

四塩化炭素投与後のエステラーゼ活性値の変動を、長時間に亘つて観察してみると、第3図に示すごと

第2図 四塩化炭素経口投与後の各時間における血清エステラーゼ活性

- I. 対 照
 II. 投与後 1 時間
 III. " 2 "
 IV. " 3 "
 V. " 24 "
 体重 1 kg 当り 0.07 ml 投与

第3図 四塩化炭素経口投与による血球および血清エステラーゼ活性の時間的変動

- I. 血清エステラーゼ
 II. 血球エステラーゼ
 矢印は四塩化炭素投与時を示す

く、一旦増大した活性は、24時間以後次第に低下し、およそ2週間で正常値まで回復することが知られた。この間血球のエステラーゼ活性にはほとんど著しい変化は認められない。

エステラーゼ活性が正常値まで充分回復した後に、再び四塩化炭素の経口投与を行うと、エステラーゼ活性は最初の場合と同じ程度に増大する。しかし充分回

第4図 四塩化炭素反復投与による血清エステラーゼ活性の変動

- I. 対 照
- II. 24 時間毎に3回連続投与後24時間目のエステラーゼ活性
- III. 72時間間隔で2回投与後24時間目のエステラーゼ活性
- IV. 1回投与後24時間目のエステラーゼ活性
1回の投与量・体重 1kg 当り 0.1 ml

復しない家兎に追加投与すると、投与に対応した活性の増大は認められない。第4図に示すごとく0.1 mlの四塩化炭素を投与し、24時間後に第4図、IVのような活性を示すことを確めた後に、その同一家兎に第1回投与後72時間目に第2回目の投与を行い、投与後24時間の血清エステラーゼ活性を測定すると第4図、IIIのごとくなり、図中IVで示される活性あるいはそれ以上の活性を示すことはない。第4図、IIは24時間毎に3回連続投与し、第3回目の投与後24時間目に採血して測定した結果である。これは、連続投与が、一旦増大した活性の低下速度を促進することを思わせる結果である。

(b) 肝臓注射

肺実質に対する四塩化炭素の直接の作用をみるために、肝に四塩化炭素を直接注射した後の血中エステラーゼ活性を測定してみた。

この実験では、肝実質に直接四塩化炭素を注射することによる肝実質の機械的な破壊が、エステラーゼ活性に影響する可能性をもふくんでいるので、後述のような、肝臓挫滅による影響をも同時に検討した。しか

第5図 四塩化炭素の肝注射による血清エステラーゼ活性の変動

- I. 対 照
 - II. 注射後1時間
 - III. " 3 "
 - IV. " 96 "
- 注射量: 0.1 ml

し肝挫滅によつては、エステラーゼ活性はほとんど影響されない。

第5図に示すごとく、肝に四塩化炭素を注射し、1, 3, 96時間目の血清エステラーゼ活性を測定したところ、血清では、3時間目でかなり著しい活性の増大が認められた。1時間では活性の増大は認められるが、活性増大の極限には達していない。したがって投与後のエステラーゼ変動の時間的経過は、肝に直接四塩化炭素を注射した場合も、経口投与した場合も、その両者の間には著しい差異は認められない。このことは、四塩化炭素投与によるエステラーゼ活性の増大の機構を考える場合興味ある点と思われる。

肝注射96時間目のエステラーゼ活性は第5図、IVに示すごとく、対照に比して著しい活性の低下が認められる。この点は経口投与の場合と著しく異なる点であり、これはおそらく肝実質の回復不能な機械的破壊による低下ではないと思われる。

(c) 筋肉内注射

大腿筋に四塩化炭素を注射した場合は、経口投与および肝内注射の場合と全く同様に、活性の著しい増大が認められ、エステラーゼ増大の時間的経過も同様である。

第6図 肝挫滅による血清および血球エステラーゼ活性の変動

- I. 血球エステラーゼ (対照)
- II. 肝挫滅後3時間目の血球エステラーゼ活性
- III. 血清エステラーゼ (対照)
- IV. 肝挫滅後3時間目の血清エステラーゼ活性

第7図 黄燐経口投与による血球および血清エステラーゼ活性の変動

- I. 血球エステラーゼ活性 (対照)
- II. 血清エステラーゼ活性 (対照)
- III. 黄燐投与 24 時間後の血球エステラーゼ活性
- IV. " " 血清 " 体重 1 kg 当り 8 mg 経口投与

(2) 肝挫滅によるエステラーゼ活性の変動

肝を約 1/3 挫滅し 1 時間および 3 時間後に血液を採取し、血球および血清エステラーゼ値を測定してみると、第 6 図に示すように、血清、血球いずれの場合も、活性には著しい差異を認めなかつた。

(3) 黄燐経口投与後の血中エステラーゼの変動

黄燐を体重 1 kg 当り 6 乃至 8 mg, ゾンデを用いて経口的に投与し、投与後 24 時間目の血球および血清エステラーゼ活性を測定してみると、四塩化炭素の場合と全く異り、いずれも活性値の変動を示さなかつた (第 7 図)。第 7 図は投与後 24 時間目の活性値と対照との比較であるが、投与後 2, 3, 6 時間目の各エステラーゼ活性も正常値とほとんど差が認められない。

(4) 蟻酸アリル投与後の血中エステラーゼ

蟻酸アリルによる肝障害の場合の肝酵素活性の変動は、四塩化炭素による障害の場合と異なることが知られているので、蟻酸アリルによって肝を障害した場合の血中エステラーゼ活性の変動を検討してみた。第 8 図は蟻酸アリルを経口的に投与した場合の血清エステラーゼの活性であるが、対照に比して活性の増大は認められない。血球についてもエステラーゼ活性の変動は認められなかつた。

第8図 蟻酸アリル投与による血清エステラーゼ活性の変動

- I. 対 照
- II. 投与 2 時間後の活性
体重 1 kg 当り 2% 蟻酸アリル 0.2 ml 投与 (経口的投与)

蟻酸アリルを直接肝へ注射した場合のエステラーゼ活性を第9図に示す。この場合も、四塩化炭素注射による24時間値にくらべるとほとんど活性の増大は認められない。

第9図 蟻酸アリルの肝注射による血清エステラーゼ活性の変動
I. 対 照
II. 蟻酸アリル注射後のエステラーゼ活性
注射量: 0.2 ml

考 察

上記実験で用いた蟻酸アリル、黄燐の量はいずれも肝に障害を与えるに充分な量であることは従来の報告により明らかであるが、それにもかかわらずこれらはいずれも血中エステラーゼ活性に変化を与えない。唯四塩化炭素のみが、経口、注射いずれの投与方法を用いても、投与後数時間で血清エステラーゼ活性は著しく増大することが知られた。

佐藤⁽⁵⁾は犬を用いて四塩化炭素中毒によるコリンエステラーゼ活性の変動を観察したが、その結果によると、四塩化炭素の注射によつては、血清コリンエステラーゼの活性は時間とともに低下するのみで、本実験でみられたような一時的な活性の増大は認められない。しかし経口的に与えた実験では、毒物投与後一時的に活性の増大することを報告している。また、第2回目の投与は活性に著変を与えないことをも報告している。したがって、経口投与に関しては、著者の得たエステラーゼ活性変動についての結果は、佐藤の犬を用いたコリンエステラーゼ活性変動の結果と一致する

が、注射した場合の結果は一致しない。このような両者間の差異が何に基因するかについては結論することはできない。

肝障害時に血清エステラーゼ活性の増大することの機構については従来定説がないが、肝エステラーゼが血中へ移動するとする考えも少なくない。本実験でも肝エステラーゼが血中へ移動するという考えを支持できるだけの結果は得られなかった。この問題はむしろ今後の興味ある問題と思われる。ただここで指摘しておきたい点は、肝障害によつて血球エステラーゼ活性には全く変化の認められないことであり、このことは血液エステラーゼのうちでも、血清エステラーゼが特に肝臓機能と密接な関係をもっている点である。

血清エステラーゼは四塩化炭素中毒のみに増強され、蟻酸アリルおよび黄燐による肝障害では全く影響されない。四塩化炭素の場合は、肝中心部に变化の止めるのは極めて短時間にすぎず、やがては肝小葉全般に変性的変化のおよぶことが知られている。(1) しかもこの中心部の変化は周辺部の細胞が膨潤し、そのために中心部の血行障害をおこし、中心部細胞の機能低下がおこるといわれている。これらのことを著者の実験結果とあわせ考えると、中心部に变化のおこる初期の段階が血清エステラーゼの増強段階に対応するものではないかと考えられる。肝小葉全般に変化がおよべば、四塩化炭素をさらに追加しても、血清エステラーゼの活性は変化しないものと思われる。

一方蟻酸アリルの場合には、最初から肝周辺部の壊死がおこるといわれており、しかも肝中心部への血行は正常と変わらないといわれている。このような組織変化では血清エステラーゼ活性は全く変化しない。

四塩化炭素中毒と蟻酸アリル中毒の間にみられる組織変化のこのような差異がどのような機構で血清エステラーゼ活性に反映しているかは今後に残された大きな問題であろう。

綜 括

(1) パラニトロフェノール酢酸エステルを基質とする血清エステラーゼ活性は四塩化炭素の経口投与、肝注射および筋肉内注射によつて、投与後数時間で著しく増大する。

(2) 増加したエステラーゼ活性は四塩化炭素投与後2週間で正常に回復する。

(3) 肝の挫滅は血清エステラーゼ活性に影響を与えない。

(4) 黄燐および蟻酸アリルはいずれも血清エステ

ラーゼ活性に著しい影響を与えない。

(5) 上記結果から、肝臓障碍と血清、血球エステラーゼとの相互関係について二三の考察を加えた。

(稿を終るに臨み御指導をいただいた上代教授並びに宿谷講師に謝意を表す。また種々御援助いただいた津島博士にあわせて謝意を表す。)

文 献

- 1) 織田敏次：医学のあゆみ，**26**，134 (1958)
 - 2) 松谷 宏：日医大誌，**26**，220 (1959)
 - 3) 木村繁雄：生化学，**29**，351 (1957)
 - 4) Huggins, C., Lopides, J. : J. Biol. Chem., **170**，467 (1947)
 - 5) 佐藤正文：日本消化機病学会誌，**42**，127 (1943)
 - 6) 上代皓三：日医大誌，**16**，99 (1949)
-