血清 Arylsulfatase の臨床的および実験的研究

若 原 達 男*

緒 言

1955 年 de Duve ら¹⁾がはじめてライソゾームを分離して以来、ライソゾームが内包する多くの水解酵素やライソゾームの形態学的多様性が注目され、細胞機能とライソゾームとの関係について生化学的、形態学的検索が積み重ねられてきたが、ライソゾームの発見当初から細胞の壊死、融解とライソゾーム酵素との関係はもっとも重要視されたものの一つであった。現在ライソゾーム酵素として 20 種類ほどの水解酵素が知られている²⁾が、arylsulfatase もその一つである。今日、血清酵素診断法として用いられているライソゾーム酵素には β -glucuronidase, acid phosphomonoesterase, lysozyme など 2, 3 の酵素に限られており、arylsulfatase についてはほとんど試みられていない。

著者は arylsulfatase を血清酵素診断法の一つとして臨床的に利用することを目的に、測定法について若干の検討を加え、肝疾患を中心として諸種疾患患者の血清 arylsulfatase 活性を測定するとともに、実験的諸種肝障害時の本酵素活性の変動を血清および肝ホモジネートについて追求したので、ここにその成績を報告する。

第 1 章 Arylsulfatase 活性測定に関する基礎的検討

I. 酵素活性測定法の検討

1) 方 法

Dodgson ら³⁾の方法に準じ、基質として Potassium-2-hydroxy-5-nitrophenylsulfate (nitrocatechol sulfate, NCS と略記, Sigma 社製) を、緩衝液には Walpole の酢酸塩緩衝液を、nitrocatechol (NC と略記) の呈色液として 0.4 N 苛性ソーダを使用した。すなわち酵素液に基質緩衝液を混じ、37°C の恒温槽中に一定時間保ち、その後呈色液にて酵素反応を停止させると同時に、酵素作用により遊離した NC を発色せしめ、515 m μ の波長

でその吸光度を測定する。別に基質緩衝液のみを同様に孵置したのち、酵素液および呈色液を加えたものを対照とし、その吸光度を測定し、実験値より対照値を減じた差を測定値とし、あらかじめ作成した検量線から NC の μ mol 量を求めた。

2) 成 績

a) 至適 pH: ヒト血清を酵素液とする場合は血清 0.5 ml に必要とする pH に調整した基質緩衝液 0.5 ml を加え、37°C, 3 時間孵置した。またラット血清およびラット肝 (10% ホモジネート) を酵素液とする場合は、酵素液 0.1 ml に基質緩衝液 0.9 ml を混じ、37°C, 30 分間 (ラット血清の場合は 1 時間) 孵置した。

図 1 のごとく、基質濃度 0.02 M の場合、至適 pH はヒト血清では 5.0, ラット血清で 5.4, ラット肝で 5.4 にみられた。なお基質濃度の差により至適 pH は多少の相異があり、ヒト血清では基質濃度が 0.01 M では 5.2, 0.04 M では 4.5 となり、基質濃度の上昇によりやや酸性側に移動する傾向がみられた。

b) 作用時間: 0.02 M の NCS を含む pH 5.0 の基質緩衝液にヒト血清を混じ、作用時間と酵素活性との関係をしらべた。図 2 のごとく作用時間に比例して、3 時間までは直線的に酵素活性が上昇した。

c) 基質濃度および Km: 基質濃度が 0.0025 M から 0.08 M までの基質緩衝液 (pH 5.0) に酵素液を混じ、基質濃度と酵素活性との関係をしらべた。図 3 のごとく、ヒト血清の場合は至適濃度 0.04 M, Km は 5×10^{-3} M であった。ラット肝の至適濃度は 0.02 M, Km は 2.5×10^{-3} M であった。Km は Lineweaver-Burk の解析法によって求めた。

d) 阻害剤および賦活剤: ヒト血清 arylsulfatase (ARS) に対する阻害あるいは賦活物質を明らかにするため、塩化マグネシウム、硫酸銅、磷酸、クエン酸、EDTA、システイン、フェニールアラニンなどを終末濃度が 10^{-2} ~ 10^{-4} M になるよう反応混液に添加し、その影響をしらべた。賦活率および阻害率は、添加物を加えたときの活性値と添加物と同量の蒸留水を加えたときの活性値の

*T. Wakahara: 岐阜大学 第 1 内科 (主任: 高橋善弥太教授)

図 1. pH と ARS 活性曲線

図 2. 血清 ARS の作用時間活性曲線

図 3. 基質濃度と ARS 活性曲線

差を、後者に対する百分率で表わした。表 1 のごとく、 $10^{-4} M$ の濃度では、硫酸銅で 10% の阻害を認めたのみで、その他のどの物質もほとんど血清 ARS 活性に影響を与えなかった。 $10^{-2} M$ では塩化マグネシウムが 80% の賦活化を示し、硫酸銅 100%、燐酸 85%、クエン酸 50% の阻害率を示した。その他 EDTA、フェニールアラニン、システインは $10^{-2} \sim 10^{-4} M$ の濃度ではなん

表 1. 血清 ARS に対する賦活剤および阻害剤の影響

賦活剤 および阻害剤	終末濃度		
	$10^{-2} M$	$10^{-3} M$	$10^{-4} M$
塩化マグネシウム	+ 80	+25	0
ク エ ン 酸	- 50	-10	0
硫 酸 銅	-100	-65	-10
燐 酸	- 85	-40	0
E D T A	0	0	0
フェニールアラニン	0	0	0
シ ス テ イ ン	0	0	0

単位: %

らの影響も与えなかった。

II. 諸臓器における Arylsulfatase 活性の分布

1) 方法

ラットおよびヒトの諸臓器を材料として、0.25 M 蔗糖液で 10% ホモジネートを作成し、数回凍結、融解をくり返したのち酵素液とした。すなわち上記酵素液 0.1 ml に pH 5.4 の基質緩衝液を加え、37°C、60 分間孵置し、その間に遊離する NC 量を測定した。酵素活性は臓器湿重量 1 g 当たり 1 時間に遊離する NC の mmol 量 (U) で表わした。

2) 成績

表 2 に示したごとく、ラットでは腎、肝、脾、肺の順に高い活性を示し、ヒトでは肝、脾、腎、脾の順に分布し、筋組織はいずれも低い活性を示した。

表 2. 諸臓器と ARS 活性

ラ ッ ト		ヒ ト	
腎	65.5	肝	21.0
肝	64.9	脾	12.6
脾	53.0	腎	10.5
肺	41.2	脾	6.7
辜 丸	21.0	肺	2.1
小腸粘膜	12.2	心 筋	0.4
心 筋	6.1		
横 紋 筋	2.5		

単位 : U

III. Arylsulfatase 活性の肝細胞内分布

1) 方法

肝細胞内における ARS の局在性をしらべる目的で、0.25 M 蔗糖液で 10% ホモジネートを作成し、de Duve の方法により肝ホモジネートを核、ミトコンドリア、ライソゾーム、マイクロゾームおよび上清に分画した。また肝細胞内局在性の年令変化をしらべるため、ラットを生後 10 日前後のもの (A 群)、生後 3 ヶ月前後のもの (B 群) および生後 6 ヶ月前後のもの (C 群) にわけ、各群 3 匹の肝について酵素活性をしらべた。

表 3. ARS 活性の細胞内分布

群	全 活 性	核	ミトコン ドリア	ライソ ゾーム	マイク ロゾーム	上 清	回 収 率
A	142.8±13.3	23.9%	21.2%	43.6%	5.1%	24.1%	117.9%
B	65.1±5.2	21.4%	20.7%	35.1%	5.7%	27.1%	110.0%
C	58.8±5.8	21.8%	22.7%	31.8%	4.5%	32.7%	113.5%

単位 : U

2) 成績

表 3 に示したごとく、肝ホモジネートの全活性は A 群でもっとも高く、年令のすすむにつれて B 群、C 群の順に低下した。また細胞内分布率をみると、どの群もライソゾーム分画にもっとも高い分布率を示すが、A 群においてももっとも高く、ついで B 群、C 群の順であった。また終末上清では C 群の分布率が高く、B 群、A 群の順に低下し、加令とともに終末上清の分布率の上昇がみられた。

IV. Arylsulfatase の電気泳動像

1) 材料および方法

ヒト血清、ラット血清およびラット肝上清 (105,000 × g, 90 分間遠沈した上清) を酵素液とした。

泳動条件および泳動後の酵素液の抽出については青木⁴⁾の方法によった。

酵素活性の測定は、抽出液 0.1 ml (ヒト血清は 0.5 ml) に基質緩衝液を加え、全量 1 ml とし、37°C、4 時間孵置した。

2) 成績

図 4 のごとく 2 本の活性帯がみられ、1 本は原点より陽極側 15 cm を中心にはば 14~16 cm に活性がみられ、他の 1 本は原点より陽極側 5 cm を中心に 4~6 cm の間に活性がみられた。前者を ARS-I および後者を ARS-II とすると、ラット肝上清では ARS-II に強い活性がみられ、ARS-II は ARS-I のほぼ 5~6 倍相当の活性を示し、ラット血清とヒト血清ではラット肝上清とは逆に ARS-I に活性が強く、ラット血清では ARS-I は ARS-II の 5~10 倍に相当する活性を、ヒト血清では 3 倍の活性を示した。ヒト血清蛋白と ARS の電気泳動上の関係は、図 4 のごとく、ARS-I は albumin 位に、ARS-II は α-globulin 位に一致して移動がみられた。

ラット肝上清、ラット血清およびヒト血清の ARS-I と ARS-II の pH 曲線と基質濃度については、ラット肝上清の場合、図 5 のごとく ARS-I と ARS-II の至

適 pH は 4.6 と 5.3 であり、至適濃度はそれぞれ $0.0025 M$ と $0.01 M$ で、 K_m はそれぞれ $8 \times 10^{-4} M$ と $5 \times 10^{-3} M$ であった。ラット血清では図 6 のごとく ARS-I と ARS-II の至適 pH および濃度は両者とも 5.3 と $0.01 M$ であり、 K_m も両者とも $5 \times 10^{-3} M$ であった。ヒト血清の場合、図 7 のごとく、ARS-I と ARS-II の至適 pH は 2 相性を示し、両者とも同じく 4.6 と 5.3 であり、至適濃度はそれぞれ $0.04 M$ と $0.02 M$ であり、 K_m については両者とも $5 \times 10^{-3} M$ であった。

図 4. ARS 電気泳動像と血清蛋白電気泳動像

第 2 章 諸種疾患における 血清 Arylsulfatase 活性

I. 方法および材料

1) 血清 Arylsulfatase 活性測定法

第 1 章において検討したところに従い、血清 $0.5 ml$ に基質緩衝液 (基質として $0.02 M$ の NC を含む pH 5.0 の Walpole 酢酸塩緩衝液) $0.5 ml$ を加え、 $37^\circ C$ 、3 時間孵置後 $0.4 N$ 苛性ソーダ $3 ml$ を加えて、遊離した NC 量を測定した。酵素活性は血清 $1 ml$ 当たり、1 時間に NC の $1 \mu mol$ を遊離する酵素量を 1 単位 (U) とした。

2) 材 料

本学第 1 内科外来および入院患者を対象とし、肘静脈より採血し、血清を分離して用に供した。また正常対照群として本学学生および附属看護学校学生、職員より採血した。

II. 成 績

1) 正常対照群

健康成人男女計 20 名の血清 ARS 活性平均値は $11.40 \pm 3.96 U$ で、男性の平均値は $11.38 \pm 3.93 U$ 、女性のそれは $11.41 \pm 4.02 U$ であり、性別による差は認められなかった。対照群のみ平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差で表わした。

2) 肝疾患および胆道疾患

図 8 のごとく、諸種肝胆道疾患患者 134 例について測定した。急性肝炎 32 例のうち、急性肝炎極期に測定した 11 例の平均値は $10.5 \pm 1.40 U$ 、回復期 15 例の平均値は $29.0 \pm 5.72 U$ 、遷延型 6 例の平均値 $25.1 \pm 3.15 U$ 、慢性肝炎 66 例中、活動型 23 例の平均値 $36.3 \pm 13.30 U$ 、非活動型 43 例の平均値は $28.0 \pm 6.20 U$ であり、活動型に著しい高値を示すものがみられた。肝硬変症では代償期 9 例の平均値は $24.4 \pm 4.66 U$ であるのに対し、末期 9 例の平均値は $13.0 \pm 5.19 U$ と比較的低値を示した。また肝癌 9 例の平均値は $26.7 \pm 11.80 U$ であった。胆石および胆嚢炎 9 例の平均値 $11.7 \pm 3.85 U$ で 9 例中 8 例が正常値を示した。

a) 各種肝機能検査と血清 ARS 活性：諸種肝胆道疾患患者の肝機能検査と血清 ARS 活性との関係についてしらべたところ、血清総蛋白量、血清コレステロール値、ZTT, TTT, 黄疸指数、血清ビリルビン値、血清 GOT, GPT, アルカリフォスファターゼ、LDH のいずれも相関関係を示さなかった。

b) 肝生検組織像と血清 ARS 活性：肝組織所見をグリソン氏鞘内細胞浸潤、結合組織増生、胆管増生、限界板破壊、星細胞賦活、小葉内細胞浸潤、好酸体、肝細胞空胞化および壊死、多核肝細胞、胆浸淫などの項目に分け、その変化の程度を I~III の 5 段階とし、酵素活性との関

図 5. ラット肝上清 ARS の各分画と pH および基質濃度活性曲線

係を検討した。図 9 に示したごとく、結合織の増生 ($r=0.893$), 限界板の破壊 ($r=0.801$), 多核肝細胞 ($r=0.684$), グリソン氏鞘内細胞浸潤 ($r=0.579$) などとかなりの相関を示した。

c) 肝疾患の経過と血清 ARS 活性: 図 10 は、急性肝炎の 2 症例の極期から治癒期に至るまでの血清 ARS, GOT, GPT 活性の消長を示したものである。一般に血清 ARS は極期には低値を示し、回復期にはいと急速に上昇するが、血清 GOT, GPT 活性が正常値に復したのち、30~40 日おくらせて正常化するものが多い。

図 11 は慢性肝炎活動型の 2 症例を、図 12 は肝硬変症の代償期および末期の各 1 例の血清酵素活性の変動を示したものである。慢性肝炎活動型では、肝硬変に比して ARS 活性は高く、その変動域も著しく、ほとんど正常値を示すことはないが、肝硬変症では変動域が狭く、

活性も低く、時に正常値を示す場合がある。

3) その他諸種疾患

図 13 は、肝疾患以外の諸種疾患の血清 ARS 活性を示したものである。

a) 糖尿病: 糖尿病患者 21 例の血清 ARS 活性平均値は、 21.7 ± 4.55 U であった。そのうち 15 例 71.4% が異常値を示した。糖尿病患者における空腹時血糖値と血清 ARS 活性との関係を見ると、図 14 のごとく若干の相関関係 ($r=0.664$) がみられた。

b) 甲状腺疾患: トリオソルブ値 35% 以上の甲状腺機能亢進症 13 例の血清 ARS 活性平均値は 21.9 ± 4.20 U であり、そのうち 11 例 84.6% が異常値を示した。甲状腺機能低下症の 1 例は 9.33 U であった。トリオソルブ値と血清 ARS 活性との関係をしらべたところ、両者の間には密接な相関関係 ($r=0.423$) を認めなかった。

ARS-IのpH活性曲線

ARS-Iの基質濃度活性曲線

ARS-IIのpH活性曲線

ARS-IIの基質濃度活性曲線

図 6. ラット血清 ARS の各分画と pH および基質濃度活性曲線

c) 本態性高血圧症：明らかな合併症を認めない本態性高血圧症 15 例の血清 ARS 活性平均値は 13.3 ± 2.80 U で、ほとんど全例が正常範囲内の活性値を示した。

d) 腎疾患：急性腎炎 14 例の平均値 10.3 ± 2.10 U で全例が正常範囲にあった。慢性腎炎 16 例の平均値は 9.10 ± 3.62 U であり、4 例 25.0% に正常値より低値を示した。キンメルスチールウィルソン症候群の 5 例の平均値 15.2 ± 4.20 U であった。そのうち 3 例 60.0% に異常値がみられた。なお腎疾患における腎機能検査および尿検査所見と血清 ARS 活性との間には、なんらの関係はみられなかった。

e) 胃疾患：胃潰瘍 13 例の平均値は 14.2 ± 3.62 U であり、そのうち 6 例 46.1% に異常値がみられた。胃癌 12 例の平均値 11.4 ± 3.50 U で、11 例が正常範囲内であった。

f) その他の疾患：血液疾患では血清 ARS 活性の上昇を示す例は少なく、白血病 7 例の平均値は 12.3 ± 1.86

U、再生不良性貧血 5 例の平均値は 11.2 ± 2.56 U、鉄欠乏性貧血 6 例の平均値は 11.0 ± 2.78 U であった。

その他肺化膿症 2 例（平均値 21.0 U）およびリウマチ様関節炎 3 例（平均値 23.6 U）で、中等度の活性上昇が認められたが、気管支喘息、髄膜炎などではすべて正常値を示した。

g) 妊娠：妊婦 17 例の血清 ARS 活性平均値は 29.1 U であったが、妊娠月数との関係をしらべたところ、図 15 のごとく、妊娠月数に対応して血清 ARS 活性の上昇するのがみられ、相関係数は $r=0.859$ であった。

第 3 章 実験的肝胆道障害時の血清および肝 ARS 活性の変動

I. 実験方法および材料

1) 実験動物

実験動物として急性四塩化炭素肝障害、肝部分切除および胆管結紮実験には、体重 200 g 前後のウイスター系

図 7. ヒト血清 ARS の各分画と pH および濃度活性曲線

図 8. 各種肝胆道疾患と血清 ARS 活性

雄性ラットを，慢性四塩化炭素障害実験には体重 120 g 前後のものを選んだ。飼料はオリエンタル固型飼料クレア CE-II を用いた。

2) 肝障害ラット作成法

a) 急性四塩化炭素肝障害：50% 四塩化炭素溶液（オリーブ油等量混合）を体重 100 g 当たり 0.4 ml, 1 回筋注し，注射後 3, 6, 12, 24 時間および 2, 3, 7, 14 日のものをそれぞれ実験に供した。対照群にはオリーブ油のみを同量注射した。

b) 慢性四塩化炭素肝障害：前記 50% 四塩化炭素溶液を体重 100 g 当たり 0.2 ml, 1 週に 2 回筋肉内に注射し，注射開始後 1, 3 および 6 ヶ月のものをそれぞれ実験に供した。対照群にはオリーブ油のみを同様に注射した。

c) 肝部分切除：Higgins と Anderson の方法⁵⁾ によりエーテル麻酔下で約 70% の肝部分切除を施し，術後 6, 12, 24 時間および 2, 7, 14 日のものをそれぞれ実験に供した。対照群には単純開腹のみを施した。

図 9. 肝生検組織像と血清 ARS 活性

図 10. 急性肝炎の経過と血清 ARS 活性

図 11. 慢性肝炎活動型の経過と血清 ARS 活性

d) 胆管結紮：エーテル麻酔下で総胆管を露出し，肝管合流部直下を二重結紮し，その間を切断した。術後6，12，24時間および2，3，7，14日のものをそれぞれ実験に供した。対照群には単純開腹のみを施した。

3) 酵素液作成法

上記の実験動物の処置群および対照群はそれぞれ3匹以上とした。肝ホモジネートの作成は，0.25 M の蔗糖

液で灌流した肝をメスで細切し，秤量後テフロン製 Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーを用いて2分間操作し，10% 肝ホモジネートを調製した。肝細胞の分画には，日立 40 P 型冷却超遠心器を使用し，105,000×g，90分間肝ホモジネートを遠心し，上清を可溶画分とし，沈渣を0.25 M 蔗糖液に浮遊させて顆粒画分とした。

4) 酵素活性測定法

図 12. 肝硬変の経過と血清 ARS 活性

(症例 5 58 才 合)
(症例 6 45 才 合)

図 13. 各種疾患と血清 ARS 活性

a) Arylsulfatase 測定法：血清を酵素液とする場合は、血清 0.1 ml に 0.9 ml の基質緩衝液（基質として 0.02 M の NCS を含む pH 5.4 の酢酸塩緩衝液）を加え、37°C、1 時間孵置後 0.4 N 苛性ソーダ 3 ml を加えて、発色する NC 量を測定した。酵素活性は血清 1 ml 当たり、1 時間に NC の 1 μ mol を遊離する酵素量を 1 単

位 (U) とした。

肝ホモジネート、顆粒画分および可溶画分を酵素液とする場合は、酵素液 0.1 ml に 0.9 ml の基質緩衝液を加え、30 分間孵置後、10% トリクロール酢酸 2 ml を加え、4,000 回転、5 分間遠心し、その上清 1 ml に 0.4 N の苛性ソーダ 3 ml を加え、血清と同じように比色定

図 14. 空腹時血糖値と血清 ARS 活性

図 15. 妊娠月数と血清 ARS 活性

量した。ただし肝ホモジネートおよび顆粒画分は、0.25 M 蔗糖液に Triton X-100 を 1% の濃度になるように加えた。単位については全活性は各湿重量 1 g 当たり、1 時間に遊離する NC の 1 mmol を 1 単位 (U) とし、比活性の場合は、蛋白窒素 1 mg 当たり、1 時間に遊離する NC の 1 mmol を 1 単位 (U) とした。

b) β -glucuronidase (β -GI) 測定法: 基質に塚元試薬 (P-nitrophenyl glucuronide) を使用する Kato ら^{6,7)}の方法によった。

5) 蛋白窒素測定法

Kjeldahl-Nessler 法により測定した。

II. 実験成績

1) 急性四塩化炭素肝障害

a) ARS 活性: 血清 ARS 活性は、表 4、図 16 にみられるごとく、四塩化炭素筋注 3 時間後から上昇しはじ

め、12 時間後には 50.1% の増加率を示し、24 時間後にはいったん対照値まで低下し、2 日後より急激に上昇し、3 日後には 95.5% の増加率を示し最高に達したが、7 日後にはやや下降傾向を示したが、14 日後にもなお高い増加率 (71.6%) を持続した。

肝ホモジネート ARS 活性 (全および比活性) は、表 4、図 16 にみられるごとく、3 時間後では変化なく、6 時間後より増加し、12 時間後にいったん初期のピークに達したが、24 時間後には軽度の減少傾向を示し、2 日後から再び増加傾向を示し、全活性では 7 日後 (21.2%) に、比活性では 3 日後 (20.4%) に後期ピークに達したが、14 日後にはほぼ対照値まで減少した。

顆粒画分については、表 4、図 16 に示したごとく、ARS 活性は 12 時間後対照値以下を示したが、24 時間後より増加傾向がみられ、全活性では 7 日後 (16.4%)

表 4. 急性四塩化炭素肝障害ラットにおける ARS 活性の変動

	例数	血 清	肝ホモジネート		顆 粒 画 分		可 溶 画 分	
			全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性
対 照	4	926 $\pm$ 64	62.4 $\pm$ 4.2	2.35 $\pm$ 0.16	37.2 $\pm$ 2.2	2.21 $\pm$ 0.14	19.1 $\pm$ 1.4	2.27 $\pm$ 0.22
3 時 間	5	1166 $\pm$ 123	63.0 $\pm$ 6.6	2.41 $\pm$ 0.31	34.4 $\pm$ 4.1	2.21 $\pm$ 0.21	20.2 $\pm$ 1.2	2.62 $\pm$ 0.16
6 時 間	5	1176 $\pm$ 104	65.1 $\pm$ 5.6	2.76 $\pm$ 0.25	32.8 $\pm$ 3.1	2.23 $\pm$ 0.19	21.6 $\pm$ 2.0	3.09 $\pm$ 0.28
12 時 間	6	1390 $\pm$ 88	69.3 $\pm$ 6.8	3.11 $\pm$ 0.30	29.8 $\pm$ 2.8	2.12 $\pm$ 0.22	31.9 $\pm$ 1.7	3.94 $\pm$ 0.49
24 時 間	5	893 $\pm$ 102	61.7 $\pm$ 8.3	2.57 $\pm$ 0.39	39.9 $\pm$ 6.1	2.71 $\pm$ 0.40	15.8 $\pm$ 1.5	2.25 $\pm$ 0.17
2 日	4	1470 $\pm$ 79	67.2 $\pm$ 2.1	2.71 $\pm$ 0.09	39.6 $\pm$ 3.2	3.04 $\pm$ 0.24	20.6 $\pm$ 2.0	2.57 $\pm$ 0.24
3 日	5	1810 $\pm$ 217	70.1 $\pm$ 4.3	2.83 $\pm$ 0.18	40.0 $\pm$ 4.0	2.80 $\pm$ 0.25	25.2 $\pm$ 2.6	2.71 $\pm$ 0.32
7 日	5	1425 $\pm$ 184	75.6 $\pm$ 3.7	2.74 $\pm$ 0.13	43.3 $\pm$ 3.6	2.67 $\pm$ 0.24	26.3 $\pm$ 4.3	3.20 $\pm$ 0.44
14 日	4	1589 $\pm$ 96	67.6 $\pm$ 8.3	2.40 $\pm$ 0.29	38.2 $\pm$ 7.6	2.55 $\pm$ 0.49	29.8 $\pm$ 2.4	3.01 $\pm$ 0.28

単位: U

図 16. 急性四塩化炭素肝障害ラットにおける ARS 活性の変動

図 17. 急性四塩化炭素肝障害ラットにおける β -G1 活性の変動

に、比活性では2日後(37.7%)に最大活性を示したが、その後減少傾向を示した。

可溶画分 ARS 活性は、表4、図16のように3時間後より増加しはじめ、12時間後には最高の増加率(70%前後)となり、24時間後には対照値以下まで減少したが、2日以後14日後まで漸次増加傾向を示した。

b) β -GI 活性: 血清 β -GI 活性の変動は、図17のごとく、ARS 活性と同様に四塩化炭素筋注3時間後より上昇しはじめ、6時間後に最初のピーク(59.7%)に達し、24時間後にはほぼ対照値に復した。その後再び漸増し、14日後には増加率96.3%を示し、最高の増加率を示した。

肝ホモジネートの β -GI 活性は、図17のごとく ARS の場合に類似するが、ARS に比して活性増加は早期にはじまり、四塩化炭素筋注3時間後より増加しはじめ、6時間後には初期の最高の増加率(全活性29.9%、比活性45.8%)を示したのち、2日後まで減少傾向を示したが、その後軽度の漸増傾向を示し、全活性では14日後(32.5%)に、比活性では3日後(30.4%)に後期のピークを示した。

顆粒画分の β -GI 活性については、3時間後より増加し、6時間後に最高に達し、2日後まではほぼ横ばい状態を示し、その後減少傾向を示し、3日以後14日後までは対照値を維持した。

可溶画分 β -GI 活性は、可溶画分 ARS 活性とはほぼ同じ変動様式を示したが、最初のピークが ARS では12時間後にみられたのに対して、 β -GI 活性では6時間後にみられた。また全般的に β -GI 活性の変動域は ARS のそれに比してやや大であった。

2) 慢性四塩化炭素肝障害

a) ARS 活性: 表5、図18に示したごとく、血清

ARS 活性は筋注開始1ヵ月後から上昇がみられ、3ヵ月後には最高の増加率(110.0%)を示し、6ヵ月後にはやや減少傾向を示したが、なおも対照値以上の活性増加(50.0%)を示した。

肝ホモジネート ARS 活性は、1ヵ月後から6ヵ月後までの全期間を通じ対照値以上の活性増加を示したが、1ヵ月後を頂点として全活性では3ヵ月以後減少傾向を示し、比活性では3ヵ月以降も同様の活性を示した。

顆粒画分では、肝ホモジネートとはほぼ同じ傾向を示し、比活性では1~6ヵ月後を通じ50%以上の増加率を示したが、全活性では1ヵ月後で43%の増加率を示し、3ヵ月以降漸減傾向を示した。

可溶画分 ARS 活性は、1ヵ月後に著増を示したが、その後漸減して6ヵ月後には10%前後の増加率を示した。

b) β -GI 活性: 図19のごとく、血清 β -GI 活性は1ヵ月後にピーク(59.7%)に達し、その後漸減して6ヵ月には25.4%の増加率を示した。肝ホモジネート、顆粒画分および可溶画分の β -GI 活性は ARS の場合とは類似した変動を示した。

3) 肝部分切除

a) ARS 活性: 血清 ARS 活性は、表6、図20のごとく、術後6時間後より14日後まではほぼ直線的に上昇し、14日後には73.1%の増加率を示した。

肝ホモジネート ARS 活性は、表6、図20のごとく、6時間後より増加し、24時間後には35%前後の活性増加率を示し、その後7日後まではほぼ同じ増加率を示し、14日後にはやや減少して、27%前後の増加率となった。

顆粒画分 ARS の活性変動は、表6、図20のごとく、全活性では6時間後から漸増し、7日後では77.4%の

表5. 慢性四塩化炭素肝障害ラットにおける ARS 活性の変動

	例数	血 清	肝ホモジネート		顆 粒 画 分		可 溶 画 分	
			全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性
1ヵ月対照	4	910±71	60.1±3.6	2.26±0.16	37.2±3.3	2.19±0.22	20.0±1.9	2.36±0.24
1ヵ月	6	1435±141	80.2±6.5	3.07±0.27	53.2±5.5	3.57±0.37	33.6±3.8	3.65±0.40
3ヵ月対照	4	900±61	58.8±4.4	2.33±0.22	36.3±4.8	2.08±0.21	21.7±2.1	2.47±0.23
3ヵ月	5	1890±200	72.5±7.0	3.19±0.32	42.3±4.2	3.39±0.33	24.8±2.6	3.06±0.33
6ヵ月対照	4	844±67	56.4±5.0	2.36±0.21	34.8±3.3	2.19±0.22	23.1±2.5	2.78±0.29
6ヵ月	4	1266±254	65.5±7.9	3.22±0.38	40.0±3.6	3.26±0.31	25.3±3.8	3.16±0.42

単位: U

図 18. 慢性四塩化炭素肝障害ラットにおける ARS 活性の変動

図 19. 慢性四塩化炭素肝障害ラットにおける β -Gl 活性の変動

表 6. 肝部分切除ラットにおける ARS 活性の変動

	例数	血 清	肝ホモジネート		顆 粒 画 分		可 溶 画 分	
			全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性
対 照	4	930±51	62.8±3.3	2.37±0.08	38.1±3.1	2.20±0.19	20.4±1.8	2.29±0.20
6 時 間	4	998±36	68.5±2.2	2.57±0.09	41.0±2.5	2.42±0.14	24.6±1.0	3.19±0.12
12 時 間	5	1047±44	77.3±5.2	3.14±0.29	43.3±3.2	3.18±0.29	28.1±1.4	3.39±0.17
24 時 間	5	1110±72	82.5±1.1	3.26±0.41	45.0±9.1	3.36±0.24	18.7±4.3	2.25±0.50
2 日	4	1190±131	81.5±5.7	3.17±0.20	51.9±4.9	3.41±0.31	17.6±3.9	2.29±0.51
7 日	4	1554±55	90.3±7.5	3.46±0.31	67.6±4.2	3.98±0.25	20.6±1.2	2.45±0.14
14 日	4	1610±50	81.7±4.5	2.94±0.20	56.4±6.9	3.55±0.47	19.1±1.3	2.08±0.14

単位：U

図 20. 肝部分切除ラットにおける ARS 活性の変動

増加率を示し、14 日後ではやや減少して、48.0% の増加率となった。比活性では 12 時間後に急増し、44.5% の増加率を示し、その後ひきつづき漸増して、7 日後に 80.9% の増加率を示したが、14 日後にはやや減少して 61.4% の増加率となった。

可溶画分 ARS 活性は、表 6、図 20 のごとく、処置後 6 時間より急増し、12 時間後には 48% 前後の増加率を示した。24 時間以降はほぼ対照値にとどまった。

b) β -Gl 活性：血清 β -Gl 活性は、図 21 のごとく、

6 時間後には対照値よりやや低下し、12 時間後から漸次上昇して 14 日後には 64.1% の増加率を示した。

肝ホモジネート β -Gl 活性は、図 21 のごとく、6 時間後にいったん対照値以下となり、12 時間後軽度の活性増加を示し、24 時間後にはほぼ対照値に復したが、7 日後に再度上昇し、14 日後では 25% 前後の増加率を示した。

顆粒画分 β -Gl 活性は、ほぼ肝ホモジネートのそれと同様の変動を示した。また可溶画分 β -Gl 活性は、可溶

図 21. 肝部分切除ラットにおける β -GI 活性の変動

画分 ARS の場合とはほぼ同様の変動を示した。

4) 胆管結紮

a) ARS 活性: 血清 ARS 活性は, 表 7, 図 22 のごとく, 処置後 6 時間で急上昇し, 24 時間後に 49.6% の活性増加率を示したが, 3 日後にはいったんやや低下し, 7 日後には再び上昇して 66.4% の増加率をきたし, 14 日後にはほぼ対照値まで低下した。

肝ホモジネート ARS 活性は, 処置後 6 時間より増加

しはじめ, 12 時間後に初期のピークに達し, このとき全活性は 32.3%, 比活性は 40.6% の増加率を示した。その後比活性は 14 日後まで横ばい状態をつづけたが, 全活性は 24 時間後に対照値まで減少し, 7 日後にやや増加して 29.6% の増加率を示し, 14 日後にはやや減少した。

顆粒画分 ARS 活性は, 全活性は 12 時間で, 比活性は 24 時間でピークに達し, それ以後はほぼ横ばい状態

表 7. 胆管結紮ラットにおける ARS 活性の変動

	例数	血 清	肝ホモジネート		顆 粒 画 分		可 溶 画 分	
			全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性	全 活 性	比 活 性
対 照	4	921 $\pm$ 88	61.9 $\pm$ 4.6	2.39 $\pm$ 0.22	36.8 $\pm$ 5.5	2.20 $\pm$ 0.34	19.7 $\pm$ 1.3	2.26 $\pm$ 0.20
6 時 間	5	1225 $\pm$ 71	67.6 $\pm$ 4.9	3.05 $\pm$ 0.21	43.7 $\pm$ 4.1	2.62 $\pm$ 0.23	22.9 $\pm$ 1.6	2.72 $\pm$ 0.18
12 時 間	5	1344 $\pm$ 124	81.9 $\pm$ 5.4	3.36 $\pm$ 0.23	51.9 $\pm$ 3.9	3.05 $\pm$ 0.22	19.5 $\pm$ 1.7	2.27 $\pm$ 0.24
24 時 間	4	1376 $\pm$ 141	67.8 $\pm$ 9.8	3.00 $\pm$ 0.41	50.5 $\pm$ 5.5	3.71 $\pm$ 0.33	12.6 $\pm$ 1.2	1.80 $\pm$ 0.14
2 日	4	1411 $\pm$ 134	69.3 $\pm$ 8.4	2.99 $\pm$ 0.37	54.0 $\pm$ 7.5	3.77 $\pm$ 0.42	19.7 $\pm$ 2.1	2.35 $\pm$ 0.22
3 日	5	1211 $\pm$ 105	72.2 $\pm$ 3.2	2.99 $\pm$ 0.14	54.0 $\pm$ 5.0	3.72 $\pm$ 0.37	23.1 $\pm$ 3.0	2.41 $\pm$ 0.33
7 日	4	1533 $\pm$ 90	80.2 $\pm$ 3.7	2.98 $\pm$ 0.14	58.7 $\pm$ 3.2	3.76 $\pm$ 0.22	21.7 $\pm$ 0.8	3.01 $\pm$ 0.10
14 日	3	893 $\pm$ 81	71.4 $\pm$ 3.8	2.88 $\pm$ 0.15	53.3 $\pm$ 2.2	4.01 $\pm$ 0.17	20.6 $\pm$ 1.6	2.54 $\pm$ 0.20

単位: U

図 22. 胆管結紮ラットにおける ARS 活性の変動

図 23. 胆管結紮ラットにおける β -GI 活性の変動

をつづけた。

可溶画分 ARS 活性は、6 時間後に 16.2% の増加率を示したが、12 時間後より減少しはじめ、24 時間後に対照値以下まで低下し、全活性で -36.0%、比活性で -20.4% の減少率を示したが、2 日後より増加しはじめ、7 日後に後期のピークに達し、全活性で 45.1%、比活性で 33.2% の増加率を示し、14 日後に減少して 10% 前後の増加率となった。

b) β -Gl 活性: 図 23 に示されるがごとく、血清、肝ホモジネートおよび顆粒画分 β -Gl 活性は、ARS 活性とはほぼ同じ変動を示した。

可溶画分 β -Gl 活性は、6 時間より増加しはじめ、12 時間後には 75% 前後の増加率を示し、その後減少し、2 日後には -33.3% の減少率を示したが、3 日後より増加して、14 日後には 130% 前後の増加率を示した。

総括および考案

ARS は脊椎動物をはじめ軟体動物、カビ、細菌などに広く見出され⁸⁾、酵素学的性質により A, B, C の 3 種類に分けられ、ARS-A と ARS-B はライソゾーム酵素で可溶化可能であり、基質 NCS によく作用し、ARS-C はミクロゾーム性で可溶化困難な酵素で、基質 nitrophenyl sulfate (NPS) によく作用するとされている^{3,9,10)}。Dodgson ら¹¹⁾によれば人肝の ARS-A の至適 pH は孵置時間に関係し、短時間では 4.4 と 5.0 の二峰性を、長時間では 4.7 で単峰性を示し、酵素量が多いと孵置時間とは関係なく 4.7 であるという。

Roy^{12,13)}は牛肝で ARS-A の至適 pH 4.9、至適濃度 0.003 M, Km 8×10^{-4} M, ARS-B の至適 pH 5.7, Km 7×10^{-2} M とし、他の報告では至適 pH 5.7~6.1, Km 5×10^{-4} M, (pH 5.7 以下), 4×10^{-3} M (pH 6.5) としている¹⁴⁾。これらの報告から推察するとヒト血清、ラット血清と肝ホモジネートは ARS-B に近い性質と思われる。泳動により分画したラット肝上清の ARS-I は pH、基質濃度、Km とも ARS-A とまったく同一の性質を示したが、ラット肝上清 ARS-II、ヒトおよびラット血清 ARS-I, II は至適 pH および基質濃度から推察すると、ARS-B に相当するものと考えられる。

Dodgson ら¹⁵⁾は P-acetyl phenylsulfate を基質として *Pattella Vulgata* の ARS について、2, 3 の物質の賦活作用を検討し、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化バリウムなどに賦活作用があり、酢酸マグネシウムに賦活作用のないことから、 Cl^- が賦活

作用の主役であろうとしている。またタカジヤスターゼ ARS (基質として NCS を使用) についての Robinson ら¹⁶⁾の報告、あるいは牛肝 ARS (基質として NCS を使用) についての Roy¹²⁾の報告によれば、ARS は SO_4^{--} , SO_3^{--} , H_2PO_4^- により阻害されるという。ヒト血清 ARS についての阻害剤あるいは賦活剤の報告はみられないが、著者の成績では塩化マグネシウムで賦活され、硫酸銅、磷酸、クエン酸などにより阻害された。なお、*Aerobacter aerogenes* における ARS の生成はクエン酸により強く阻害されるという。

動物諸臓器における ARS 活性の分布については肝、腎、脾などに広く存在することが知られているが、著者の成績によると、ヒトでは肝>脾>腎>肺の順に、ラットでは腎>肝>脾の順に分布していた。Wynn ら¹⁷⁾はヒトの諸臓器の ARS 活性分布をしらべ、基質として NCS を用いた場合には腎>肝>脾>肺の順であるが、基質に NPS を用いると肝>脾>腎となることを報じている。またラットについては基質として Potassium P-acetyl phenyl sulfate を用いて行った Thomas ら¹⁸⁾の報告があり、それによれば肝>副腎>腎>脾>心筋>肺の順に分布するという。

ARS の細胞内局在性についてはすでに多くの報告があり^{19,20)}、ライソゾーム酵素として知られているが、著者の成績でもライソゾームにもっとも高い分布率がえられた。一般に増殖旺盛な組織細胞では代謝活性が亢進し、種々の酵素活性の増加がみられるが、幼若ラット肝では成熟ラット肝に比して ARS 活性が高いといわれ^{21,22)}、著者も同様の成績を得た。また ARS 活性の肝細胞内分布率は、幼若ラットにおいてライソゾーム分画にもっとも高く、成熟するにつれてライソゾーム分画の分布率が低下し、終末上清に増加する傾向がみられた。

諸種疾患時の血清 ARS 活性について

1947 年 Huggins ら²³⁾は基質に NPS を用いて、はじめて人血清中に ARS 活性が存在することを明らかにしたが、1955 年 Boyland ら²⁴⁾は NCS を基質とするほうがより鋭敏であると報じている。しかし諸種疾患時の血清 ARS 活性の臨床的意義についてはほとんど報告されていない²⁵⁾。著者は健康人および諸種疾患患者合計 286 名について血清 ARS 活性を測定し、肝疾患、甲状腺機能亢進症、糖尿病、妊婦などに血清 ARS 活性の上昇を認めた。

肝疾患のうち急性肝炎極期、肝硬変末期の患者ではほとんど正常限界内にあり、急性肝炎回復期、慢性肝炎活

動型および非活動型、代償期の肝硬変などでは、ほとんど全例が中等度以上の上昇を示した。急性肝炎患者で発症より治癒までの経過を観察できた症例について、血清トランスアミナーゼおよびARS活性との関係を検討したところ、病初トランスアミナーゼが高値を示す時期では、ARS活性の大部分が正常域内にとどまり、極期をすぎ、回復期にはいってトランスアミナーゼが低下傾向を示し始めるとARS活性の上昇が始まり、トランスアミナーゼが正常値に達した後もなお1~2ヵ月異常値を示し、その後正常値に復した。すなわち急性肝炎患者の血清ARS活性は回復期に上昇し、肝病変の修復完了をまって正常化するものと思われる。

この点急性肝炎の治癒判定が肝生検以外の方法がない今日、血清ARS活性の測定はきわめて有意義なものといえる。他方慢性肝炎あるいは肝硬変においては、肝硬変末期の一部症例を除いてほとんど全例が異常値を示し、血清トランスアミナーゼ活性との相関は認めないが、増悪期にはいって血清トランスアミナーゼ活性が急上昇する場合には、それよりもやや遅れて上昇し、トランスアミナーゼ活性の安定化するころに極大値を示す傾向がみられる。

肝疾患における肝生検組織像と血清ARS活性との関係をしらべたところ、結合組織の増生、多核肝細胞の出現、限界板破壊などの程度とかなりの相関がみられ、肝細胞の壊死、好酸体の出現などとは無関係であった。一般に慢性肝炎、肝硬変などでは肝細胞の破壊と再生とが共存し、結合組織代謝も亢進しているものと考えられるが、このような症例では血清ARS活性が高度の上昇を示すものが多く、このことは肝生検組織像と血清ARS活性との関係からも容易に想像できることである。肝硬変の末期には血清ARS活性が高値を示すことはまれであるが、その理由として、肝における酵素蛋白の生成低下、肝細胞再生能の低下などが考えられる。

ARSと同様、ライソゾーム酵素といわれる β -GlやN-acetyl- β -glucosaminidase²⁶⁾も肝疾患で活性上昇をきたすといわれているが、延永^{7,27)}は肝疾患のほか、糖尿病、甲状腺機能亢進症、妊娠時にも血清 β -Gl活性が上昇するという。血清ARS活性もこれらの疾患で上昇し、糖尿病では21例中15例(71.4%)、甲状腺機能亢進症13例中11例(84.6%)が異常を示した。糖尿病における空腹時血糖値と血清ARS活性との間には若干の平行関係がみられた。しかし甲状腺機能亢進症では、トリオソルブその他の機能検査成績と血清ARS活性との間に

は、密接な関係は認められなかった。その他妊娠時にも妊娠月数に対応して血清ARS活性が上昇するが、これらのホルモン環境異常が血清ARS活性をどのような機構により上昇せしめるかについては、今後の検討にまたなければならない。

その他の疾患としては高血圧症、腎疾患、胃潰瘍、胃癌、白血病などについて血清ARS活性を測定したが、少数の例外を除いてすべて正常値を示した。Dzialoszynski²⁸⁾は、30例の悪性腫瘍患者の血清および腫瘍組織のARS活性を測定し、腫瘍組織ではARS活性の増加を認めたが、血清ARS活性は正常範囲内であったと報じている。

実験的肝胆道障害について

肝疾患時に血清ARS活性が上昇する 경우가多く、これは肝生検組織像および臨床経過との対比から、血清ARS活性の上昇は肝細胞壊死による障害肝細胞からの血中逸脱によるものではなく、肝病変の修復機転に伴う酵素の産生増加によるものであろうと推測したが、この点を明らかにする目的で2,3の実験的肝胆道障害時の血清および肝ARS活性を、ライソゾーム酵素である β -Gl活性とともに測定し、比較検討した。

急性四塩化炭素肝障害

四塩化炭素肝障害時に肝細胞内酵素が血中に逸脱する現象については、すでによく知られているところである。四塩化炭素が肝細胞内にとり込まれると、形態的变化に先立って種々の生化学的変化が起こる。すなわち細胞膜の透過性の亢進、ATP合成、酸化的磷酸化あるいはSH酵素の阻害などが知られており²⁹⁾、これらの変化は肝におけるリポ蛋白の生成障害を招き、肝からのトリグリセライドの排泄障害、さらに肝細胞内の脂肪沈着をきたすものと考えられている³⁰⁾。

Dianzanie³¹⁾は四塩化炭素障害ラット肝についてARS-A, ARS-B, β -Gl, Ribonuclease, acid phosphatase活性を測定し、四塩化炭素投与後6~12時間にこれらの酵素活性の初期上昇を、48~72時間後に後期上昇を認めている。また安藤³²⁾は四塩化炭素投与時の肝酸性ホスファターゼ類の活性変動について検討し、acid phosphatase, acid phosphodiesterase, phosphoprotein phosphataseはそれぞれ類似した変動を示し、四塩化炭素投与後3~6時間で初期上昇がみられ、ついでいったん低下し、72時間後に再上昇して、168時間後にはほぼ対照値に復したという。また安藤³²⁾は、このような四塩化炭素投与後の肝酸性ホスファターゼ活性の変動について、その初

期上昇は四塩化炭素による一時的な酵素産生刺激の増大、あるいは酵素の活性化によるものと考え、その後の低下は肝細胞膜あるいは肝細胞内顆粒の損傷破壊によるものであり、後期上昇は肝細胞修復に際しての酵素の過剰産生によるものと推論している。

著者の成績では、四塩化炭素筋注後 12 時間に血清 ARS 活性の初期上昇、72 時間に後期上昇がみられ、肝ホモジネートでは全観察期間を通じて活性減少はほとんど認められず、増加傾向のみを認めた。一般に逸脱酵素といわれるものは、肝障害に際して、血清および肝ホモジネートの酵素活性の変動は、互に鏡像関係を示すものとされているが、この点血清 ARS 活性の上昇は単なる逸脱によるものとは考えがたい。

四塩化炭素筋注後の肝ホモジネート ARS 活性の変動を、顆粒画分および可溶画分のそれとから推測するに、12 時間後では顆粒画分 ARS 全活性が減少し、可溶画分の全活性および比活性が増加していることから、顆粒画分 ARS が可溶画分に移動したことがまず考えられる。そして肝ホモジネート ARS 活性も増加し、血清 ARS 活性も上昇していることから、可溶画分 ARS の一部が血中に移行して血清 ARS 活性の上昇を招くとともに、一方では肝細胞内 ARS の活性化、あるいは一時的酵素産生の増加があるものと推察される。

また四塩化炭素筋注 48 時間以後の血清 ARS 活性の上昇は、肝ホモジネート ARS 全活性の増加があり、顆粒画分 ARS 比活性の増加に比して全活性の増加がほとんどなく、可溶画分 ARS 活性も著しい増加が認められないことなどを考え合わせると、肝細胞修復期における ARS の誘導が行われ、肝細胞の再生、増殖とともに顆粒画分 ARS が可溶化され、これが可溶画分へ移行するとともに血中へも移行ないし漏出してくるものと考えられる。

蟹江³⁹⁾は著者と同様な急性四塩化炭素障害肝の電子顕微鏡的観察を行い、四塩化炭素筋注後 3 時間でライソゾームの数の増加がみられ、12~24 時間でライソゾームの形態的变化を認め、48~72 時間ではライソゾームの巨大化とその数の増加を認めている。

Dianzanie ら³⁴⁾や Slater ら³⁵⁾は肝に四塩化炭素のような肝細胞毒が作用した場合には、まずライソゾーム酵素の可溶化が起こり、ついでそれらの著明な活性増加がみられるという。また de Duve ら³⁶⁾は肝虚血時に、Weissmann ら³⁷⁾は endotoxin 投与後にライソゾーム酵素の可溶化が起こることを報じている。Leevy ら³⁸⁾によれば、四塩化炭素投与後肝細胞の修復機転として起こる

肝細胞の mitosis は 32 時間後より始まり、40 時間後に最高となり、72 時間後までつづき、120 時間後にはほぼ正常に戻るという。

他方 β -Gl について、四塩化炭素筋注後血清および肝ホモジネートの酵素活性の変動はほとんど ARS の場合と同様であるが、ARS に比し血清および肝ホモジネートにおける β -Gl 活性の変動がやや早期に起こること、あるいは四塩化炭素筋注後、3~12 時間にみられた顆粒画分 ARS 全活性の減少に相当する β -Gl 活性の減少がみられないこと、およびこの時期における顆粒画分 β -Gl 活性の増加がみられることなどの点で、ARS とはやや異なった変動を示した。このような両酵素の変動の差は、肝細胞における酵素蛋白の誘導速度、分解速度、膜結合性などの相違あるいは肝細胞内における基質濃度、阻害剤、活性化剤、イオン濃度など種々の因子により影響されることが考えられるが、さらに傷害肝細胞の修復過程における両酵素の産生速度の差も考慮されなければならない。

慢性四塩化炭素肝障害

四塩化炭素の反復投与により肝細胞の壊死、再生がくり返され、次第に間質結合組織の増生をきたし、8~12 週後には肝硬変類似の病変が形成される。蟹江³⁹⁾は四塩化炭素を 15~25 週間にわたり、1 週 1 回筋注したラット肝の電子顕微鏡観察を行い、Rappaport 第 1 層の脂肪滴を有しない肝細胞では粗面小胞体、Golgi complex およびライソゾームの増加がみられ、また Rappaport 第 3 層の脂肪滴を有する肝細胞の一部では滑面小胞体網状構造、粗面小胞体の阻害および糸粒体の軽度の膨化がみられるという。また線維の増生、Kupffer 星細胞の巨大化による Disse 腔の閉塞、sinusoid の閉鎖血管化などの所見も報じている。

著者の成績では、四塩化炭素筋注開始 1 ヶ月後から血清 ARS 活性は上昇し、顆粒画分、可溶画分および肝ホモジネートの全・比活性はすべて増加を示し、 β -Gl 活性もほぼ同様の変動を示した。このような慢性四塩化炭素肝障害におけるライソゾーム酵素活性の増加は、蟹江の電子顕微鏡観察によるライソゾームの増加所見と一致し、酵素誘導が促進されたものと理解される。なお乾ら⁴⁰⁾は同様な実験において、肝ホモジネートで acid phosphatase, acid phosphodiesterase などのライソゾーム酵素活性の増加を認めている。

このような慢性肝障害時の血清および肝ライソゾーム酵素活性の上昇は、急性四塩化炭素肝障害時にみられた

ごとく、壊死肝細胞に由来するものではなく、肝細胞の修復、再生機転に関連するものであろう。肝を構成する各種の細胞のうち、正常肝においては肝細胞が 60% 以上を占めているが、肝に硬変化が起これば次第に肝細胞の占める比率は低くなり、間質細胞の比率が増し、肝硬変症では 50% 以上にも達するといわれる。そしてこれらの間質細胞にもライソゾームが豊富に存在し、慢性肝障害時には間質結合組織細胞のライソゾーム酵素活性も著しく増加することが知られている⁴¹⁾ので、これらの間質細胞に由来するライソゾーム酵素も、血清酵素活性になんらかの影響を与えるものと推測される。

肝部分切除

急性および慢性四塩化炭素肝障害ラットにおける血清 ARS 活性の上昇は、主として肝障害の修復機転に関係するものであろうと推論したが、これをさらに明確にするため、肝部分切除後の肝再生過程における血清 ARS 活性の変動について検討した。肝部分切除後における肝の生化学的变化は、切除した肝の大きさにより多少の相違はあるが、70% 切除の場合、肝における DNA 合成は切除後 12~18 時間で始まり、20 時間で最高に達する。ミトゼはこれより 6~8 時間遅れて開始するといわれる。また胆管上皮細胞などは、肝実質細胞の再生より 20 時間ほど遅れて開始されるものとされている^{42~44)}。

著者の実験成績では、肝部分切除後 6 時間から血清 ARS 活性は上昇し、その後全観察期間を通じて上昇傾向を示し、14 日後に最高値に達した。肝ホモジネート ARS 活性は 7 日以後まで漸増し、その後やや減少傾向を示したが、顆粒画分では 7 日後に最高値となりその後やや減少した。可溶画分では切除後 12 時間までは増加し、その後は対照値に等しい活性を持続した。

このような肝 ARS 活性の変動から、肝におけることに顆粒画分における酵素の産生増加が想像されるが、ライソゾーム酵素は一般に細胞分裂ときわめて密接な関係があり、ミトゼの時期には可溶化され、可溶画分に移行することが知られている。著者の成績でもその様相がうかがわれ、顆粒画分 ARS 活性は部分切除後 24 時間で増加しているが、その全活性は比活性に比して増加率が低く、可溶画分 ARS 活性は対照値まで低下している。これは可溶化された顆粒画分 ARS が、可溶画分からさらに血中へ移行したものと推論することができる。

Matti Klachars ら⁴⁵⁾ は再生肝の acid phosphatase, ARS-B, β -Gl 活性を測定し、それらの酵素活性が最高となる時間は、肝部分切除後 24~48 時間にみられたこ

とから、ライソゾームは細胞分裂後の自己食作用に関係し、ライソゾーム酵素は肝細胞再生の調整に関与するものと推論している。また肝部分切除後の肝 β -Gl 活性については多くの報告がある⁴⁶⁾が、著者の成績によれば、肝部分切除後 6 時間で血清および肝ホモジネート β -Gl 活性が軽度の低下を示したほかは、ARS とほぼ同様の変動を示した。この場合、肝部分切除初期の β -Gl 活性の低下がなにに起因するものであるかは明らかではないが、切除侵襲による肝組織の浮腫、血流障害による酵素の産生低下、可溶化酵素の細胞内貯留などの機転が考えられる。

他方 Woessner ら^{47,48)} はラット皮下にポリビニールスポンジを埋没し、それにはいり込む結合組織の DNA 量と種々の酵素活性との関係を調べているが、DNA 量と ARS 活性とはほぼ平行して増加し、 β -Gl 活性も ARS と同様な変動を示すが、DNA 量が減少傾向を示す時期になっても β -Gl 活性はなお増加傾向をたどることから、ARS は線維芽細胞の増殖およびその代謝に、 β -Gl はコラーゲンの異化に関与するものと考えている。

胆管結紮

諸種肝疾患における血清 ARS 活性と黄疸指数との間には有意の相関は認められず、種々の原因による閉塞性黄疸時にも著しい血清 ARS 活性の上昇はみられなかった。しかし黄疸患者の中には軽度の血清 ARS 活性の上昇を認めるものもあり、この点をさらに追求するため、胆管結紮ラットについて血清および肝ホモジネート ARS 活性の変動をしらべた。

ラット胆管を結紮すると、12 時間後には肝小葉周辺部の肝細胞に原形質の空胞化、核の不染色性が現われ、ついで Kupffer 細胞の動員、細胆管および偽胆管の増生が起こる。5 日以降になるとグリソン氏鞘には線維化がみられるようになり、時間の経過とともに線維化が進展する⁴⁹⁾。正木⁵⁰⁾の電子顕微鏡観察によれば、胆管結紮ラット肝は 24 時間後ライソゾームの数を増し、初期には細胆管周囲に限局するが、時間の経過とともに原形質全体に分布するようになるという。

元来ライソゾームの機能の一つとして、細胞内における物質の転送あるいは排泄作用があげられており、結紮による胆汁分泌障害時にはライソゾームの形成が盛んに行われるものと推察される。著者の成績ではラットの胆道結紮後血清 ARS 活性は二相性の増加を示し、 β -Gl 活性もほとんど類似の変動を示したが、肝ホモジネートにおける両酵素活性の変動もほとんど同様であった。

この実験結果は電子顕微鏡観察で得られた所見と対比すれば容易に納得できるわけであるが、血清 ARS および β -Gl 活性が二相性の上昇を示すことについての説明は困難である。種田も同様な胆道閉塞実験で血清 alkaline phosphatase 活性が二相性の変動を示すことを報じている。従来胆道閉塞時の血清 alkaline phosphatase が血中へ逆流するものとされているが、種田⁴⁹⁾、Kaplan⁵¹⁾は肝における酵素蛋白の合成亢進によるものと考えている。このように実験的胆管閉塞的には alkaline phosphatase と同様に血清および肝 ARS 活性のかんりの上昇がみられるが、臨床上では著しい血清 ARS 活性の上昇がみられなかった理由として、高度黄疸例では血清中のビリルビンが ARS 活性の測定にさいして若干の干渉をすることが考えられるため、閉塞性黄疸患者の血清 ARS 活性の測定にさいしては、この点を留意することが必要と思われる。

結 語

肝疾患を中心とする諸種疾患患者の血清 ARS 活性を測定するとともに、実験的諸種肝障害ラットを作成し、本酵素活性の変動を血清および肝ホモジネートについて経時的に追求して、次の結果を得た。

1. 肝疾患では、急性肝炎回復期、慢性肝炎活動型および非活動型、肝硬変代償期のものに血清 ARS の高活性を示すものが多くみられた。急性肝炎極期および肝硬変末期の症例では正常値を示した。
2. 肝生検像と血清 ARS 活性の関係では、結合組織の増生、肝細胞の多核化、胆管の増生、Kupffer 星細胞の賦活化とかなりの相関関係がみられた。
3. 肝疾患以外の疾患では、糖尿病、甲状腺機能亢進症および妊婦に血清 ARS 活性の高値をみた。妊婦では妊娠月数と血清 ARS 活性と正の相関関係を示した。
4. 急性四塩化炭素肝障害ラットでは、四塩化炭素筋注後 12 時間で血清 ARS の初期上昇、72 時間で後期上昇がみられた。初期上昇は、顆粒画分の損傷による可溶画分への移行と可溶画分からの逸脱によるものであり、後期上昇は修復過程における酵素の過剰産生によるものと考えられる。
5. 慢性四塩化炭素肝障害、胆管結紮および肝部分切除ラットでは、常に血清 ARS 活性は高値を示したが、肝ホモジネートも高活性を示したことから、酵素の産生増加によるものと考えられる。
6. 急性四塩化炭素肝障害ラットと肝部分切除ラット

の ARS、および β -Gl 活性の経時的観察から、 β -Gl は ARS より多少おくれた時点で肝再生に関与するものと推測される。

7. 以上の理由から、血清 ARS 活性の測定は、肝疾患の診断、予後および治療判定に有用である。

稿を終るに当たり、ご指導賜わった乾成美前教授ならびに青山一朗前講師、ご校閲賜わった高橋善弥太教授に深甚なる謝意を表す。

本論文の要旨は第55回および第56回日本消化器病学会総会において発表した。

- 文 献 1) de Duve, C., Pressmann, B. C., Gianetto, R., Wattiaux R. & Appelmans, F.: *Biochem. J.* **60**: 604, 1955. 2) Weissmann, G.: *Ann. Rev. Med.* **18**: 97, 1967. 3) Dodgson, K. S. & Spencer, B.: *Biochem. J.* **65**: 668, 1957. 4) 青木靖: 岐阜医誌 **18**: 201, 1970. 5) Higgins, G. M. & Anderson, R. M.: *A. M. A. Arch. Path.* **12**: 186, 1931.
- 6) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M. Masuya, T. & Sawada, T.: *Chem. Pharmac. Bull.* **8**: 239, 1960. 7) 延永正: 福岡医誌 **52**: 300, 1961. 8) Gregory, J. D. & Robins, P. W.: *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 347, 1960. 9) Dodgson, K. S., Spencer, B. & Thomas, J.: *Biochem. J.* **59**: 29, 1955. 10) Roy, A. B.: *Biochem. J.* **64**: 651, 1956.
- 11) Baum, H., Dodgson, K. S. & Spencer, B.: *Biochem. J.* **69**: 567, 1958. 12) Roy, A. B.: *Biochem. J.* **55**: 653, 1953. 13) Roy, A. B.: *Biochem. J.* **57**: 465, 1954. 14) 赤堀四郎: 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 東京, p. 449, 1966. 15) Dodgson, K. S. & Spencer B.: *Biochem. J.* **51**: XI iii, 1952.
- 16) Robinson, D., Smith, J. N., Spencer, B. & Williams, R. T.: *Biochem. J.* **51**: 202, 1952. 17) Dodgson, K. S., Spencer, B. & Wynn, C. H.: *Biochem. J.* **62**: 500, 1956. 18) Dodgson, K. S., Spencer, B. & Thomas, J.: *Biochem. J.* **53**: 452, 1953. 19) Dodgson, K. S., Spencer, B. & Thomas, J.: *Biochem. J.* **56**: 177, 1954. 20) Roy, A. B.: *Biochem. J.* **68**: 519, 1958.
- 21) Franklin, T. J.: *Biochem. J.* **82**: 118, 1962. 22) Ugazio, G.: *Ital. J. Biochem.* **9**: 92, 1960. 23) Huggins, C. & Smith, D. R.: *J. Biol. Chem.* **170**: 391, 1947. 24) Boyland, E., Wallace, D. M. & Williams,

D. C.: Brit. J. Cancer **9**: 62, 1955. 25) Działoszyński, L. M. & Gniot-Szulczycha, J.: Clin. Chim. Acta **15**: 381, 1967.

26) 杉村巖: 北海道医誌 **42**: 202, 1967. 27) 延永正: 福岡医誌 **51**: 205, 1960. 28) Działoszyński, L. M., Kroll, J. L. & Fröhlich, A.: Clin. Chim. Acta. **14**: 450, 1966. 29) 織田敏次, 大管俊明, 兼子俊男, 久米章司: 代謝 **3**: 93, 1966. 30) 内藤周幸: 診療 **21**: 972, 1968.

31) Dianzani, M. U.: Ciba Found. Symp. Lysosomes, Little, Brown and company, Boston, p. 335, 1963. 32) 安藤成人: 岐阜医紀 **12**: 269, 1964. 33) 蟹江匡: 岐阜医紀 **16**: 1, 1968. 34) Ugazio, G., Artizzu, M., Pani, P. & Dianzani, M. U.: Biochem. J. **90**: 109, 1964. 35) Slater, T. F. & Greenbaum, A. L.: Biochem. J. **96**: 484, 1965.

36) de Duve, C. & Beaufay, H.: Biochem. J. **73**: 610, 1959. 37) Weissman, G.: Fed. Proc. **23**: 1038, 1964. 38) Leevy, C. M., Hollister, R. M., Schmid, R., Mac-

Donald, R. A. & Davidson, C. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **102**: 672, 1959. 39) 蟹江匡: 岐阜医紀 **16**: 19, 1968. 40) 乾成美, 青山一朗, 神田敏英, 塩谷道規, 種田掬也, 安藤成人, 蟹江匡, 説田周利: 日内会誌 **54**: 426, 1965.

41) 織田正也: 肝臓 **10**: 501, 1969. 42) Grisham, J. W.: Cancer Res. **22**: 842, 1962. 43) Leevy, C. M.: A. M. A. Arch. Int. Med. **105**: 188, 1960. 44) Weinbren, K.: Gastroenterology **37**: 657, 1959. 45) Klochas, M. & Wegelius, O.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **131**: 218, 1969.

46) Adams, R. L. P.: Biochem. J. **87**: 532, 1963. 47) Woessner, J. F. & Boucek, R. T.: Arch. Biochem. Biophys. **93**: 85, 1961. 48) Woessner, J. F. & Boucek, R. T.: Arch. Biochem. Biophys. **93**: 95, 1961. 49) 種田掬也: 岐阜医紀 **18**: 23, 1970. 50) 正木昭夫: 山口医学 **13**: 262, 1964.

51) Kaplan, M. M. & Righette, A.: J. Clin. Invest. **49**: 508, 1970.

* * * * *

* * * *