肝細胞壊死においてまれにみられる血清モノアミン (ベンチルアミン)・オキシダーゼ値上昇の検討

中 野 博 星 加 博 司 伊 藤 憲 一*

I はじめに

血清中に含まれるモノアミンオキシダーゼ(MAO)は銅を含有する酵素であり、その物理化学的性状は肝、脳等のミトコンドリアに局在する MAO とは種々の点で異なることが近年明らかになった¹⁻³⁾。また血清 MAO がコラーゲンの架橋形成を阻害するラシロジェンにより特異的に阻害をうける等の点より、結合組織中に存在する MAO との類似性が論議され、さらに血中 MAO は結合組織に由来との報告もみられる^{11,12)}。もちろん血清の MAO は単一なものではなく、現在一般に行われている血清 MAO の測定は、ベンチルアミンまたはチラミンなどを基質とする数種のモノアミン酸化酵素がその対象となっている。

我々は、1965 年以来諸種肝疾患患者の血清 MAO について検討を加えた結果、これが慢性肝疾患、とくに肝硬変症で著しく上昇することを確認したほか、本酵素の由来、物理化学的性状などについて種々基礎的検討を加えてきた⁸⁾。しかし最近ごく例外的に急激な肝細胞壊死を伴った症例で、血清 MAO が軽度ないし中等度の上昇を示すことがあり、その際上昇した血清 MAO の性状が、種々の点で慢性肝疾患患者で上昇する MAO と異なるものであることを見出したので、ここにその成績を述べてみたい。

II 測定対象および測定方法

a) 測定対象

今回検討の対象となった血清は急性肝炎 5 例、慢性肝炎 5 例、肝硬変症 8 例、亜急性肝炎 1 例、および健康正常人 3 例から得られたものである。このうち血清 MAO の電気泳動像は、亜急性肝炎 1 例、急性肝炎極期の 1 例、肝硬変症 2 例、正常人の 1 例について検討を加えた。また対照として選んだミトコンドリアは剖検時の肝から得

られたものであり、肝ミトコンドリアの調整は Hogeboom-Schneider 法によった⁴⁾。

b) 測定方法

i) モノアミンオキシダーゼ値の測定: McEwen らの方法⁵⁾に一部改良を加えた伊藤らの方法により行った⁶⁾。

ii) ラシロジェンによるモノアミンオキシダーゼ活性の阻害: ラシロジェンとしてはアミノアセトニトリル(AAN)を用い、これを血清 MAO 活性測定に際し、反応液中に $10^{-1}\mu M$ の濃度になるように加えて MAO に対する阻害効果を検討した。

iii) モノアミンオキシダーゼの電気泳動像: デン粉ブロック電気泳動法を用いた。泳動条件は 0.1 M ペロナール緩衝液 (pH 8.4) にて 300 ボルト、5 ミリアンペアにて 18 時間の泳動を行った。泳動終了後直ちに原点を中心に 1 cm ずつの細断を行い、えられたおのおの小デン粉ブロックに 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 3 ml を加えて十分攪拌、遠心の後その上清について MAO 活性を測定した。この際の酵素活性測定には反応温度として 37°C ではなく 42°C を採用した。

III 成 績

i) ラシロジェンによる血清および肝ミトコンドリア中のモノアミンオキシダーゼの阻害: 正常人の血清 MAO 値は 13.0~29.0 単位に分布するが、 $10^{-1}\mu M$ の AAN 添加により完全に阻害される。また慢性肝炎、とくに肝硬変症の血清 MAO 値は高値を示すが、表 1 のごとく $10^{-1}\mu M$ の AAN 添加によりほとんど完全に阻害される。肝硬変症のうち S.M. 例のみは死亡直前急激に黄疸を伴い、肝性昏睡で死亡した症例であるが、死亡直前の血清 MAO 値は完全には阻害されず、3.9% の活性の残存が観察された。

これに反し、急性肝炎では大多数の症例で血清 MAO 値は正常域にある。今回我々が検討した症例 5 例中 2 例において軽度の上昇を認めたにすぎない。しかしラシロジェンによる阻害効果は、肝硬変症などの場合と異な

* H. Nakano, H. Hoshika, K. Ito: 京都大学 第 2 内科。

り、 $10^{-1}\mu M$ の AAN により完全には阻害されず、4.5% から 9.9% の活性残存が観察された。この傾向はいわゆる亜急性肝炎の症例で著明であり、11.2% の活性残存がみられた。一方血清中の MAO とは異なり、肝ミトコンドリアでは $10^{-1}\mu M$ の AAN 添加により、全 MAO 値の 99.4% の活性残存がみられた。

ii) 血清およびミトコンドリア中に存在するモノアミンオキシダーゼの電気泳動像：共同研究者の星加は、正

常健康人および諸種慢性肝疾患患者の多数例につき、血清 MAO の電気泳動像の検討を行い、図 1 に示すように原点より陰極側に一つピーク (I 峰)、また陽極側に二つピーク (II および III 峰) が存在し、肝硬変症の血清では主としてこのうちの I 峰、および時に II 峰が増大していることを報告している⁷⁾。今回我々の検討した肝硬変症の 2 例、正常人の 1 例でも同様の結果が得られた。

表 1. Inhibitory effect of aminoacetonitrile on activity of monoamine oxidase in sera in patients with various liver diseases

Serum MAO activity	Serum MAO activity after treated with AAN at the concentration of $10^{-1}\mu M$	% Inhibition of serum MAO activity by AAN
Normal subjects		
H. N. 23.0	0	100%
H. H. 25.1	0	100
C. M. 21.3	0	100
Acute hepatitis		
T. T. 22.5	1.0	95.5
Y. K. 26.0	1.3	95.0
M. I. 33.5	2.2	93.5
E. N. 28.0	1.7	94.0
Y. M. 27.5	2.5	90.1
Fluminant hepatitis		
H. T. 45.0	4.6	89.8
Chronic hepatitis		
S. I. 18.5	0	100
Y. Y. 34.0	0	100
A. T. 19.5	0	100
T. H. 32.0	0	100
M. K. 26.0	0	100
Cirrhosis of liver		
S. K. 32.5	0	100
K. T. 27.0	0.1	99.6
S. M. 35.5	1.4	96.1
A. S. 52.5	0	100
K. N. 35.0	0	100
A. K. 45.0	0	100
S. H. 43.0	0.5	98.9
K. N. 48.0	0.1	99.8
Liver mitochondria		
69.5	65.4	0.6

図 1. Electrophoretic pattern of serum monoamine oxidase in liver cirrhosis and normal control

図 2. Electrophoretic pattern of monoamine oxidase in serum of acute hepatitis and in liver mitochondria

一方、亜急性肝炎の血清 MAO の電気泳動像は、図 2 に示すようにⅡ峰およびⅢ峰の増大が著明であり、Ⅰ峰の増大は認められなかった。さらに急性肝炎極期の症例の場合もⅡ峰の増加がみられ、Ⅰ峰の増大は観察されなかった。一方肝のミトコンドリア中に存在する MAO は、図 2 に示すごとく電気泳動上 3 種のものが得られた。しかしその泳動パターンは血清の場合とは異なっており、陰極側に一つの小さいピークおよび陽極側に二つの大きなピークが認められ、その電気泳動上の易動度は、血清の場合に比しそれぞれやや異なっているが、亜急性肝炎症例で得られた電気泳動像と類似している傾向が認められた。

IV 考 案

1963 年 McEwen らがベンチルアミンを基質とする鋭敏な血清 MAO の測定法を報告して以来⁹⁾、諸種疾患について本酵素値が上昇することが確認されている。とりわけ我々は慢性肝疾患、とくに肝硬変症において血清 MAO 値の上昇すること、およびその血中値が肝内線維化の程度とよく平行することを、多数の肝生検像との比較検討から確認している⁸⁾。最近 Kirchner らにより諸種肝疾患での血清 MAO 値が追試検討され、我々とはほぼ同様の成績が得られ、血中 MAO 値の変動は肝内線維化の指標となりうると報告されている⁹⁾。

事実コラーゲン線維成熟の過程の最終段階である架橋形成には、MAO の一種である Lysyl-Oxidase の関与することが Martin らにより明らかにされ¹⁰⁾、さらにこの線維生成にあずかる MAO が線維芽細胞外に存在し、しかもその物理化学的性状が血中の MAO と酷似していることから、O'Dell らは血中 MAO の由来をこの線維生成に関係する MAO に求めうると報告している^{11, 12)}。このように、生体内で線維増生のおこる場合に血中 MAO の上昇することは容易に理解しうることである。

以上のように、血中 MAO 値は生体とくに肝での線維増生が盛んな場合に上昇を示すが、すでに我々も指摘したように、亜急性肝炎または急性肝炎の極期でも、一部の症例で血中 MAO 値の軽度上昇をみる場合がある⁸⁾。肝細胞とくにそのミトコンドリア分画には多量の MAO が存在し、かつその種類も多いものと予想されるが、このものは表 1 に示したように、ラシロージェンにより阻害を受けにくいこと、およびフラビン系の酵素であることなどから、血清中の MAO とはまったく異質なものが多く含まれているものと考えられる。急激な肝

細胞の崩壊壊死がおこった際には、血清中にミトコンドリア由来の成分の逸脱がみられることは臨床生化学的にしばしば遭遇する事実であり、これら症例においてみられた血中 MAO 値の上昇は、ミトコンドリア由来の MAO の逸脱に基づくことは容易に予想されるところである。

今回我々のえた成績から、急性肝炎および亜急性肝炎の血清 MAO は、 $10^{-1}\mu M$ の AAN 添加により完全には阻害されず、4.5% から 11.2% の活性の残存がみられた。この点、肝硬変症では血中 MAO 値が著しく上昇しているにもかかわらず、 $10^{-1}\mu M$ の AAN 添加により完全に活性の阻害がみられた事実と対照をなしている。さらに興味のある点は、急性肝炎症例で血中 MAO 値は上昇していない場合でも、AAN 添加による酵素活性阻害は不完全であり、活性の残存がみられたことである。

このような点から、急激な肝細胞崩壊壊死を伴う症例の血中には、一部にミトコンドリア由来の MAO と類似した性質をもつ成分の存在することは明らかである。もちろん血清および肝ミトコンドリア中に存在する MAO は、単一なものではなくそれぞれ複数の成分よりなることについては多くの報告がある^{7, 8, 13, 14)}。著者らの一人星加は、デン粉ブロック電気泳動により血清 MAO は三つの成分よりなり、肝硬変症の血中には主として陰極側にある第 1 峰の成分が増加することを確認している⁷⁾。

一方肝ミトコンドリアの MAO についても、Kim らはラット肝を用い cellulose polyacetate を支持体として電気泳動を行い、二つの成分よりなることを報告し¹³⁾、Sierens らは polyacrylamide を用いて同じく 2 種の MAO が存在すると述べている¹⁴⁾。今回我々はデン粉ブロック電気泳動法によりヒトの肝ミトコンドリア由来の MAO について検討を加えたが、血清とくに肝硬変症の血中でみられたパターンとは著しく異なり、陰極側に小さい一つの成分 (Ⅰ 峰)、および陽極側に二つの大きい成分 (Ⅱ 峰、Ⅲ 峰) の存在することを確認した。

亜急性肝炎の血清 MAO の電気泳動パターンをみるとⅡ峰およびⅢ峰の増加が著明であり、肝ミトコンドリアの泳動パターンときわめて類似している。また急性肝炎では主としてⅡ峰の増大が著明であった。すなわち急激な肝細胞破壊によりミトコンドリア成分の血中流出の結果、正常および肝硬変症の血中にはほとんど増大を示さないⅢ峰およびⅡ峰に属する MAO が増加すること

が示唆される。

V 結 論

血中のモノアミン(ベンチルアミン)オキシダーゼは、肝内線維化の度をよく反映するものであり、肝細胞壊死が存在しても血中値の上昇をきたさない。しかしまれに広範な急性肝細胞壊死を伴う症例で、血中値の軽度ないし中等度の上昇を示す場合がある。この際における血中モノアミン(ベンチルアミン)オキシダーゼについて、ラシローゲンによる阻害効果、電気泳動パターンなどを検討した。その結果、正常および肝硬変症でみられる血中モノアミン(ベンチルアミン)オキシダーゼとは異なり、ラシローゲンにより活性の阻害をうけにくく、しかも電気泳動で陽極に移動する成分の増加を認め、これらの成分は肝ミトコンドリア中に存在するモノアミン・オキシダーゼが血中に流出したものであろうとの結論をえた。

文 献 1) Tabor, C. W., Tabor, H. & Rosenthal, S. M.: Purification of amine oxidase from beef plasma, *J. Biol. Chem.* **208**: 645, 1954. 2) Yamada, H. & Yasunobu, K. T.: Monoamine oxidase. 1. Purification, crystallization, and properties of plasma monoamine oxidase. *J. Biol. Chem.* **237**: 1511, 1962. 3) McEwen, C. M. Jr.: Human plasma monoamine oxidase. 1. Purification and identification. *J. Biol. Chem.* **240**: 2003, 1965. 4) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. & Pallade, G. E.: *J. Biol. Chem.* **173**: 619, 1948. 5) McEwen, C. M. Jr. & Cohen, J. P.: An amine

oxidase in normal human serum, *J. Lab. and Clin. Med.* **62**: 766, 1963.

6) Ito, K., Nakano, H. & Hoshika, H.: An Improved Method for the Determination of Serum Monoamine Oxidase Activity. (in press) 7) Hoshika, H., Ueno, T., Nakano, H. & Ito, K.: Biochemical Studies on Hepatic Fibrosis. (XII) Multiple Forms of Monoamine Oxidase in Serum, Liver Mitochondria and Various Connective Tissues, 57th Annual Meeting of Japan Gastroenterology. (in Tokyo) 8) Ito, K., Nakagawa, J., Minakuchi, C. & Fukuse, M.: A clinical evaluation of serum monoamine oxidase, with special reference to hepatic fibrosis, *Digestion* **4**: 49, 1971. 9) Kirchner, J. P. & Castell, D. O.: Serum Monoamine oxidase: An index of hepatic fibrosis, *Gastroenterology* **62**: 771, 1972. 10) Siegel, R. C., Pinnel, S. R. & Martin, G. R.: Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyloxidase. *Biochemistry* **9**: 4486, 1970.

11) Rucker, R. B. & O'Dell, B. L.: *Biochim. Biophys. Acta.* **235**: 32, 1971. 12) Rucker, R. B. & Goettlich-Riemann, W.: Properties of rabbit aorta amine oxidase, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **139**: 286, 1972. 13) Kim, H. C. & D'lorio, A.: Possible isozymes of monoamine oxidase in rat tissues, *Canad. J. Biochem.* **46**: 295, 1968. 14) Sierens, L. & D'goria, A.: Multiple monoamine oxidases in rat liver mitochondria, *Canad. J. Biochem.* **48**: 660, 1970.

* * * * *