

肝疾患における肝 Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase および Citrate cleavage enzyme 活性と肝の脂肪沈着について

第 1 編

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

大学院学生 古 元 裕

[昭和42年3月29日受稿]

緒 言

肝疾患時に現われる肝の脂肪沈着の問題は、脂質代謝に関する知識の増大と共に次第に解明されて来ているが、尚不明の分野を残している。現在一般的な脂肪肝の発生機序として、

- 1) 血中非エステル型脂肪酸 (non-esterified fatty acid) の肝への流入の増加
- 2) 肝内での内因性の脂肪酸合成の亢進
- 3) 肝の脂肪酸酸化能の低下
- 4) リポ蛋白として肝より中性脂肪を分泌する機構の障害

が考えられている。

これらのうち、中性脂肪分泌機構の障害が脂肪肝発生の最も基本的な要因とされ、四塩化炭素障害ラット肝の脂肪沈着を説明する上にも重要な部分を占める¹⁾。一方、脂肪酸合成の亢進が脂肪肝の発生に関与している可能性も、高橋らのオロット酸脂肪肝における脂肪酸合成に関連した肝酵素の活性上昇から示されている²⁾。ヒトの肝疾患経過時に現われる肝の脂肪沈着にも³⁾、上記の4つの要因が関与すると考えられるが、肝病態の多様性からみても明らかのように、どの要因がより重要であるかを知りその障害の機序を解明するにはなお多くの困難を伴っている。

著者は肝疾患時に現われる肝の脂肪沈着の機序を解明する一段階として、脂肪酸合成の亢進と共に増加し、脂肪酸合成に TPNH₂ 供給の面でも関与している⁴⁾ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (以下G6-PDH) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (以下6-PGDH) 更に、脂肪酸合成の場であるミトコンドリア外での合成に用いられる Acetyl-CoA を生

成し、脂肪酸合成の亢進を反映して増加するといわれている⁵⁾⁶⁾⁷⁾ Citrate cleavage enzyme (以下CCE) をヒトの肝組織で測定し、肝における脂肪沈着との関連において検討を加えた。

研究対象および方法

1) 研究対象

当内科入院の肝疾患患者52例である。これらの対象例については、各種肝機能検査、腹腔鏡検査および病理組織学的検索を行なつて診断を確定⁸⁾した急性肝炎(回復期)6名、活動性慢性肝炎18名、非活動性慢性肝炎11名、肝硬変14名、アルコール性脂肪肝2名および原因不明の脂肪肝1名を対象とした。

正常対照例は、肝、胆道疾患を除外した当大学病院入院患者で、十二指腸潰瘍2例、胃癌3例である。

2) 研究方法

a) 肝上清液の作成

肝諸酵素活性の測定は、当内科入院患者については腹腔鏡検査時に直視下生検によつて得られた肝組織30~50mgについて、また外科入院患者については、手術時に得られた肝組織の一部(30~50mg)について行なつた。即ち、得られた肝組織に氷冷等張アルカリ性 KCl 溶液⁹⁾ を40倍稀釈となるように加え、Potter-Elvehjem型 teflon homogenerizer を用い毎分600回転の速度で1分間(途中15秒間休止)homogenizeした。上記の操作はすべて氷冷下で行なつた。次いで、得られた homogenate を0~4°Cで60分間30,000gで遠沈後上清液を分離し、直ちに酵素活性の測定を行なつた。

b) 肝酵素活性の測定

肝 G6-PDH, 6-PGDH 活性の測定は表1に示す反応液を用い、37°CでTPNの還元を spectrophotometric に経時的に測定し、最初の5分以内の直線部分から

Table 1
Assay System of Liver G6-PDH and
6-PGDH Activities

	Blank.	Control.	Test.
H ₂ O	0.55ml	0.40ml	0.30ml
0.2M Glycylglycine Buffer (pH 7.5)	0.25	0.25	0.25
0.1M MgCl ₂	0.20	0.20	0.20
3mM TPN	—	0.05	0.05
Liver Supernatant	—	0.10	0.10
25mM G6-P* or 6-PG**	—	—	0.10
Final Volume	1.00	1.00	1.00

*: Glucose-6-phosphate ** : 6-Phosphogluconate

反応速度を求めた(注1).

(注1) 肝 G6-PDH 活性の測定には, Glock および Mclean の¹⁰⁾ Glucose-6-phosphate (以下G6-P) と 6-phosphogluconate (以下6-PG) の両基質を含む反応系で G6-PDH および 6-PGDH 活性の和を求めた後, 6-PGDH 活性との差を求め真の G6-PDH 活性を求

Table 2
Assay System of Liver CCE Activity

	Control	Test
H ₂ O	0.46ml	0.41ml
1.0M Tris-HCl (pH 7.5)	0.10	0.10
0.4M Potassium Citrate	0.05	0.05
0.2M MgCl ₂	0.05	0.05
0.2M 2-mercapto-ethanol	0.05	0.05
0.01M CoA	—	0.05
7.5mM DPNH ₂	0.02	0.02
0.1mg/ml MDH*	0.02	0.02
Liver Supernatant	0.20	0.20
0.1M ATP	0.05	0.05
Final Volume	1.00	1.00

* : malic dehydrogenase
Water is used as a blank.

Table 3
Activities of G6-PDH, 6-PGDH and CCE of Normal
Human Liver

	G6-PDH	6-PGDH	CCE
Unit	m μ moles/min. /mg. protein		
Mean Values	11.6	49.7	1.28
Standard Deviation	3.53	7.27	0.42

める方法があるが, 著者の成績では, 彼等の記すそれぞれの基質濃度5mMあるいはそれ以上において, 両基質を混合した際の活性が 6-PG 単独の場合の活性に近いかむしろ低くなる結果を得ている. 著者の用いた 2.5mM の基質濃度では G6-P 単独で得られた活性の 80~90%が, それぞれの基質濃度 2.5mM において差で求めた G6-PDH 活性に相当し, G6-P 単独で得られた値を G6-PDH 活性として取扱うことは妥当と考えられた¹¹⁾.

酵素活性は肝上清蛋白 mg 当りの 1 時間に生じた TPNH₂ の m μ mole で表わした.

肝 CCE 活性の測定は Srere¹²⁾ の方法を人肝について検討し表 2 の反応組成で 37°C において spectrophotometric に行なった. 酵素活性は 12 分間の吸光度の変化から求め, 肝上清蛋白 mg 当りの 1 時間に減少した DPNH₂ の m μ mole で表わした.

肝上清 GPT 活性の測定は Reitman-Frankel 法¹³⁾ に従って 37°C で行ない, 肝上清蛋白 mg 当りの Karmen 単位で表わした,

肝上清の蛋白量測定には, Lowry 等¹⁴⁾ の方法を用いた.

測定に用いた G6-P (Na塩), 6-PG (Ba塩) (注 2), TPN (Na塩), Co-enzyme A, DPNH₂ (Na塩) および ATP (Na塩) は Sigma の製品である. 又, malic dehydrogenase は Boehringer の製品を用いた.
(注 2) Na塩に変えて使用.

成 績

1) 正常者の肝 G6-PDH, 6-PGDH および CCE 活性

肝機能検査で異常を示さず, 且つ病理組織学的にも異常を認めず健常とみなされる 5 名の平均値および標準偏差は表 3 の通りである.

G6-PDH および 6-PGDH 活性に関しては, 人肝で測定された報告があり著者の得た値とはほぼ一致している¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾. 人肝 CCE 活性は食餌摂取ラット肝の約 1/10 で野本等も同様な値を得ている¹⁸⁾.

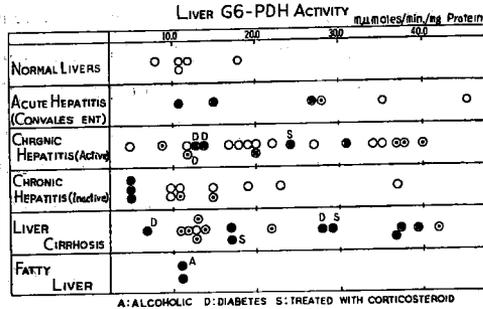
2) 肝疾患時の肝酵素活性の変化

各病態時酵素活性の測定値は図 1, および 2 に示す通りで, これらの値について有意水準 $\alpha = 0.05$ において検定を行なった結果, 急性肝炎(回復期)では G6-PDH, 6-PGDH

および CCE の有意の活性上昇を認めた。対照として用いた GPT 活性には有意の上昇を認めなかった。他の病態時では、いずれの酵素について有意の差が認められなかった。

Fig. 1

Liver Fatty Infiltration and G6-PDH Activity.



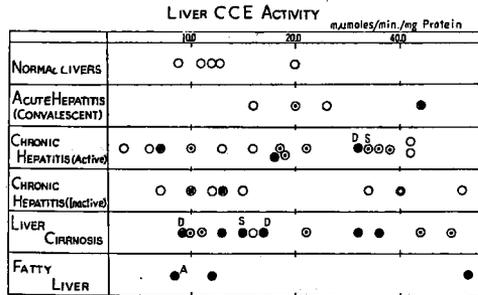
A: ALCOHOLIC D: DIABETES S: TREATED WITH CORTICOSTEROID

The extent of fatty infiltration, as revealed by microscopic examination, is divided into the following four groups.

- : No fatty infiltration
- ◐ : Slight fatty infiltration
- ◑ : Moderate fatty infiltration
- : Marked fatty infiltration

Fig. 2

Liver Fatty Infiltration and CCE Activity



○, ◐, ◑ and ● : See the legend to Fig. 1

3) 肝 G6-PDH と 6-PGDH 活性の関連性

各病態時における G6-PDH と 6-PGDH との相関係数を求めると、急性肝炎（回復期） $\gamma = 0.63$ 、慢性肝炎（活動性） $\gamma = 0.66$ 、慢性肝炎（非活動性） $\gamma = 0.53$ 、肝硬変 $\gamma = 0.47$ であった。これらの相関係数のうち、活動性慢性肝炎においてのみ有意性がみられた。

4) 肝 G6-PDH と CCE 活性の関連性

各病態時における G6-PDH と CCE 活性の相関係数を求めると、急性肝炎（回復期） $\gamma = 0.40$ 、慢性

肝炎（活動性） $\gamma = 0.09$ 、慢性肝炎（非活動性） $\gamma = 0.43$ 、肝硬変 $\gamma = 0.23$ であったが、これらの相関係数には有意性はみられなかった。

5) 肝の脂肪沈着の程度と G6-PDH および CCE 活性

肝の各病態時における脂肪沈着の程度と肝 G6-PDH および CCE 活性の分布をみると図 1、および図 2 の如くで、いずれの酵素活性との間にも一定の傾向を認めなかった。

考 按

肝は脂質代謝の中心的役割を果しており、肝を中心とする脂質代謝異常は各方面より追求されて来た。特に脂肪肝においてその機序がある程度明らかにされて来たが¹⁹⁾、ヒトの肝疾患経過中に現われる肝の脂肪沈着²⁰⁾についての機序の分析についてはかなりの業績があるにしても、実際の因果関係は複雑で、その解明には非常な困難に遭遇している。

そこで著者はこの問題の解決の一助として、肝の脂酸合成をとりあげ、脂酸合成亢進を反映して増加するといわれている肝の諸酵素活性を測定し、病理組織学的所見との関連において検討を行なった。

まず肝疾患時の肝 G6-PDH および 6-PGDH 活性の動態は既に報告されている如く²⁰⁾、急性肝炎では有意の活性上昇を示したが、活動性慢性肝炎では、活性の上昇が窺えるが有意の上昇はみられなかった。また、非活動性慢性肝炎、肝硬変、脂肪肝では、有意の活性上昇あるいは低下を認めなかった。

肝 CCE 活性は急性肝炎（回復期）に有意の上昇を示しているが、他の病態時には有意の活性上昇も低下も認めなかった。

更に、これらの肝酵素活性と各病態時の脂肪沈着の程度との関係を検討したが、一定の傾向はみとめなかった。このことは、各病態時における高度の脂肪沈着例の頻度はほぼ同程度であるのに反し、G6-PDH および CCE 活性は急性期にのみ有意の上昇を示していることから明らかである。

肝 G6-PDH および 6-PGDH は五炭糖磷酸回路に属し補酵素 $TPNH_2$ を産生する。内因性の脂肪合成には $TPNH_2$ が必要であり、これら酵素と脂肪合成の間には密接な関連があることが報告され⁴⁾、脂肪合成の亢進時に G6-PDH、6-PGDH の活性の増加がみられることが示されている²¹⁾。しかし、この回路によつて生成される $TPNH_2$ は、量および生成速度において充分ではなく²¹⁾、他の酵素系（例え

ば, malic enzyme) も関与しているものとも考えられ²²⁾, 肝ではむしろ後者の方が重要視されている²³⁾.

一方, CCE はミトコンドリア外での Acetyl-CoA を生成することにより, 肝の脂肪酸合成に関与していると考えられ, 脂肪酸合成亢進と共に増加すると報告されている⁵⁾⁶⁾⁷⁾.

著者の成績では, 内因性脂肪酸合成を反映するこれらの肝酵素活性は肝の脂肪沈着の程度とは無関係であり, 肝疾患時の肝の脂肪沈着においては, 肝の脂肪酸合成の亢進が主要因をなしているとは考えられない結果を得た. 或は, ヒト肝ではこれらの酵素活性の変動は, 脂肪酸合成の状態を反映していないのかも知れず, また, 急性肝炎(恢復期)に認められた肝 G6-PDH, 6-PGDH 活性の上昇は, 他の機序(例えば肝の再成等²⁰⁾)に関連しているのかもしれない. この点は今後の解明を必要とすることであろう.

結 語

肝疾患経過中に現われる肝の脂肪沈着を解明する

文

- 1) Recknagel, R. O., Lombardi, B. and Schotz, M. C.: Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 104 : 608, 1960.
- 2) 高橋忠雄, 坪井栄一;
日消誌, 61 : 437, 1964.
- 3) Lieber, C. S. ;
Gastroenterology, 45 : 760, 1963.
- 4) Tepperman, H. M. and Tepperman, J. ;
Diabetes, 7 : 438, 1958.
- 5) Bhaduri, A. and Srere, P. A. ;
Biochim. Biophys. Acta, 70: 221, 1963.
- 6) Kornacker, M. S. and Lowenstein, J. M. ;
Science, 144 : 1027, 1964.
- 7) Lardy, H. A., Shrago, E., Young, J. W. and Paetkau, V.; Science, 144 : 564, 1964.
- 8) 小坂淳夫, 太田康幸 ;
現代内科学大系, 消化器疾患, 第5巻, 1頁,
中山書店, 東京, 1960.
- 9) Lepage, G. A. ;
J. Biol. Chem. 176 : 1009, 1948.
- 10) Glock, J. E. and Mclean, P. ;
Biochem. J. 55 : 400, 1953.
- 11) Horecker, B. L. ;

目的で, 肝の脂肪酸合成を反映して活性変化を示すといわれる Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase, および Citrate cleavage enzyme 活性を生検肝組織で測定し次の成績を得た.

- 1) 健常者のこれらの酵素活性は次の通りである.
G6-PDH : 11.6 ± 3.53 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg protein}$
6-PGDH : 49.7 ± 7.27 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg protein}$
C C E : 1.28 ± 0.42 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg protein}$

2) 肝G6-PDH, 6-PGDH および CCE 活性は急性肝炎(恢復期)において有意な上昇を認めた. 対象として用いた GPT 活性は, 急性期において有意の上昇を認めなかつた. 他の病態時においては, これらの酵素活性の有意の変化を認めなかつた.

3) 肝疾患時の脂肪沈着の程度と, これらの酵素活性の間に一定の傾向を認めなかつた.

稿を終るに臨み, 御指導および御校閲を賜わつた武田和久博士に深甚なる謝意を表します.

(本論文の要旨は, 日本消化器病学会第52回総会において発表した.)

献

- In "Methods in Medical Research", Vol. 9,
Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago
(1961), p. 35.
- 12) Srere, P. A. ;
J. Biol. Chem. 243 : 2544, 1959.
- 13) Reitman, S. ; and Frankel, S. ;
Amer. J. Clin. Path. 28 : 56, 1957.
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L.
and Randall, R. J. ; J. Biol. Chem. 193 : 265,
1951.
- 15) Glock, J. E. and Mclean, P. ;
Biochem. J. 56 : 171, 1954.
- 16) Schmidt, E., Schmidt, F. W. and Wildhirt, E. ;
Klin. Wschr. 36 : 280, 1958.
- 17) Boxer, G. E. and Shonk, C. F. ;
In "Advances in Enzyme Regulation", Vol. V,
Pergamon Press Ltd., Oxford, (1966) p. 707.
- 18) 野本拓 ;
Personal communication. (1966)
- 19) Farber, E. ;
Gastroenterology, 50 : 137, 1966.
- 20) Schmidt, E. Schmidt, F. W. and Wildhirt, E. ;

- | | |
|---|---|
| Klin. Wschr. 36 : 227, 1958. | Biochemistry, 3 : 1687, 1964. |
| 21) Flatt, J. P. and Ball, E. G. ;
J. Biol. Chem. 239 : 675, 1964. | 23) Lowenstein, J. M. ;
In "The Enzyme of Lipid Metabolism"
Pergamon Press Ltd., (1961) p. 272. |
| 22) Young, J. W., Shrago, E. and Lardy, H. A. : | |

The Activities of Hepatic Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase,
6-Phosphogluconate Dehydrogenase and Citrate Cleavage Enzyme in
Liver Diseases in Relation to Fatty Infiltration in the Liver.

By

Yutaka KOMOTO

The 1st Department of Internal Medicine
Okayama University Medical School
(Director: Prof. K. Kosaka)

Summary

The activities of Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase and Citrate cleavage enzyme, of which increase is known to be associated with an enhanced lipogenesis in experimental animals, were measured in the liver tissues from the patients with liver diseases.

1) The activities of these enzymes were significantly increased in the convalescent stage of acute hepatitis, while no significant changes were found in chronic hepatitis (active or inactive), liver cirrhosis and fatty liver.

2) No apparent correlation was found between the activities of these enzymes and the degree of hepatic fatty infiltration in these liver diseases, suggesting that hepatic lipogenesis might not play a major role in fatty change of liver encountered in the course of the liver diseases. Alternatively, the increased enzyme activities might reflect some other metabolic alterations associated with hepatic injury.
