

Glutamic Oxalacetic Transaminase の Isozyme に関する研究

金沢大学大学院医学研究科第一内科学講座(主任 武内重五郎教授)

金山 隆 一

(昭和39年2月15日受付)

Isozyme とは同じ基質特異性をもちながら、物理化学的または免疫学的に異なつた態度をとる酵素のことであり、1959年に Markert & Møller¹⁾ が最初に **lactic dehydrogenase** (以下 **LDH** と略す) に対して与えた名称であるが、最近ではすべての酵素のそれに適用されている。わが国では宮木²⁾ が **isozyme** を異性酵素とよぼうと提唱している。

現在までに **LDH**³⁾⁴⁾, **leucine aminopeptidase**⁵⁾, **amilase**⁶⁾, **alkaline phosphatase**⁷⁾, **malic dehydrogenase**¹⁰⁾, **isocitric dehydrogenase**¹⁰⁾, **glutamic oxalacetic transaminase** などの **isozyme** の存在が知られており、とくに **LDH** の **isozyme** についての研究は著しい進歩をとげ、臨床的にも充分利用できるまでにいたつている。

一方、**glutamic oxalacetic transaminase** (以下 **GOT** と略す) は Karmen および Wróblewski¹¹⁾ 以来、臨床的に最もよくその活性値測定が行なわれている酵素の一つであり、その **isozyme** に関する研究も最近かなり活発となり、多くのすぐれた報告がみられるようになったが¹²⁾⁻¹⁸⁾、諸種障害時における臓器内 **GOT** の電気泳動的研究はほとんどなされておらず、なお不明の点が少ない。この点を解明するために著者はウィスター系ダイコクネズミ (以下単にラットと記す) を使用し、正常時および種々の病的状態において各臓器ホモジネートの **starch zone electrophoresis** を行ない、2, 3の知見をえたので報告する。なお、あわせて若干の肝疾患患者血清についての検索も行なつた。

実験材料と方法

I. 実験材料

実験材料としてはラット(雌)の諸臓器および血清、ならびに肝疾患患者血清を使用した。

a) ラット臓器の処理

i) 正常ラット臓器の処理: 100~120g のラットを軽くエーテルで麻酔し開胸・開腹し、すみやかに心臓・肝・腎・骨格筋をとり出し、ついで冷却した生理食塩水(4°C)の中で数回反復洗浄し血球成分を洗いおとす。後、これらの臓器を0°Cの氷室内に24時間保存する。完全に凍結したらとり出し、小豆大ぐらいまでに細く切り、余分の結合織などを充分にとり取り、9倍容の冷生理食塩水(4°C)を加え、Waring blenderで5分間水で冷やしながらかホモジナイズする。ついでそれぞれのホモジネートを4,000~5,000 r.p.m.で30分間遠心分離し沈渣を捨て上清を使用した。この上清は泳動開始前に4~10°Cの氷室内で緩衝液中にVisking膜をもちい5~24時間透析した。

ii) 四塩化炭素障害ラット: 食餌(オリエンタル酵母工業社製固型飼料)および水を自由に与えている120g前後のラットの腹腔内に四塩化炭素の20%オリーブ油溶液を0.16 ml/kg注入する。その後も食餌と水の摂取を自由とし、注入後24時間、48時間、96時間、168時間で正常ラットの場合と同じくエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より全採血を行なつて殺し、直ちに開胸し心臓を、ついで肝・腎・骨格筋をとり出す。これらの臓器は正常臓器の場合と同じように処理する。血液は凝固してから遠心し、血清を分離し氷室に保存する。

iii) 再生肝: 16~12時間絶食した160~170gのラットを軽くエーテルで麻酔し開腹し、肝の外側左右葉および内側右葉を基部で結紮切断し、切断面からの出血のないことを確かめてから腹壁を縫合し保温に留意しながら24時間放置する¹⁹⁾。24時間後にラットを殺す。この時期にはすでに肝の再生が起つているが、この再生肝をとり出し、正常肝の場合と同じように処理し実験に供した。

Studies on the Isozymes of Glutamic Oxalacetic Transaminase. **Ryuichi Kanayama**, Department of Internal Medicine (I) (Director: Prof. J. Takeuchi), School of Medicine, Kanazawa University.

iv) DAB 肝癌: 成熟ラットに *p*-Dimethylamino-azobenzene (DAB) を 150 日間以上続けて投与すると肝に癌が発生する²⁰⁾. この DAB 肝癌についても実験を行なった. DAB 投与を 180 日間続けたラットを殺し, 肝をとり出すと, 肝は著明に腫大し, 表面からも癌の結節が認められる. この肝の癌化した部をとり, 一部で組織学的な検索を行ない, 残りの部で, 正常肝の場合と同じように処理し実験した.

b) ヒトの血清

当教室に入院した患者血清を使用した. 症例は急性肝炎 1 例, 慢性肝炎 3 例, 輸血後肝炎 3 例, 胃痛の肝転移 1 例, 溶血性黄疸 1 例の計 9 例である.

ヒト血清は泳動前に **Visking** 膜に入れ, 氷室内につるし濃縮し, 血清蛋白量が 10.0g/dl になってから **Visking** 膜より出し, 臓器ホモジネーとの場合と同様にして電気泳動を行なった.

II. 電気泳動の支持体のデンブンの精製

電気泳動の支持体としてはデンブンを使用した. デンブンは和光純薬製の馬鈴薯デンブンをを用いた.

デンブンは使用前に蒸留水で数回にわたり洗浄し, そのつど沈降させて不純物と沈降しにくい微細な粒子を傾斜によつて除き, 80°C 以下の温度で乾燥し保存する. ついで使用直前に緩衝液で洗い, 洗液の pH ともとの緩衝液の pH が一致するまで 2~3 回繰り返した²¹⁾.

III. 細胞内 GOT 活性の分布

諸臓器細胞内の GOT 活性の分布をみるために **Hageboom-Schneider** 法²²⁾ にしたがって超遠心法を行ない観察した. すなわち 24 時間絶食させたラットを殺し, ラットの臓器を 0.25 Mol で 4°C の冷シヨ糖溶液 (以下単にシヨ糖溶液と略す) で十分に洗い, 血球成分を洗い流したのち, その 5g をとり, 小豆大ぐらいまでに細く切り, 9 倍容の 0.25 Mol シヨ糖溶液を加えて, **Potter-Elvehjem** 型のガラス製 **homogenizer** で氷で冷やししながら均一化する. ついでこの均一液を 700×g で 10 分間遠心し, 沈渣に 0.25 Mol シヨ糖溶液を加え, 軽く均一化し上清と合せる. つぎにこれを 500×g, 10 分間遠心し, 上清をとり, 沈渣に 0.25 Mol シヨ糖溶液を加え再び洗い 13,000×g, 10 分間遠心, 上清をとり沈渣に 0.25 Mol シヨ糖溶液を加え軽く混濁させ, 13,000×g, 10 分間遠心し沈渣をミトコンドリア分画, 残りを上清分画とした.

IV. 電気泳動の装置および電気泳動の実施

緩衝液で洗い泥状になったデンブンをかろうじてねれるくらいの状態でごとき 20×1×1cm のプラスチック製の容器内に流しこむ. ついで両端に濾紙束

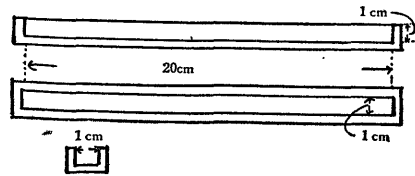


図 1 プラスチック製の泳動容器

をつけるとデンブンに含まれている余分の水分はこの濾紙束をつたつて滴下する.

約 20 分間水平に放置した後, ブロックの表面を濾紙で軽くおさえ, 残った水分を吸いとると, 表面のなめらかなデンブンブロックが完成する. これを図にしめすように濾紙束で緩衝液槽に, 緩衝液槽から寒天の U 字橋で 3% KCl 溶液に接続, 銀電極を用い小林式濾紙電気泳動装置につなぐ. ついでデンブンブロックの陰極端より 9 cm の部に, スーパーテルで 0.5 cm の幅にデンブンを掘りおこし溝をつくり, ここにデンブンで適当にねつた試料を添加し, ブロックの表面をなめらかにし, 泳動を開始する. 電気泳動は 4~10°C の氷室内で行ない, 15~20 Volt/cm で 4~20 mA, 24 時間行なった.

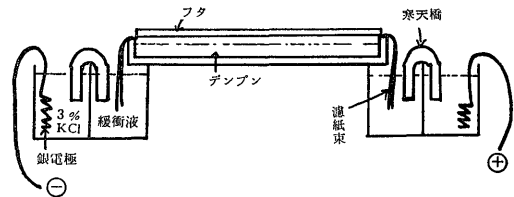


図 2 使用した泳動装置

電気泳動終了後ブロックを幅 0.5 cm で切り出し, 蒸留水 1.5 ml で抽出し, 東洋濾紙 No. 5 B で濾別し, 各々の濾液についてそれぞれ GOT 活性値を測定した.

GOT 活性値の測定は **Reitman-Frankel** 法²³⁾ によつて行なった. すなわち 2m Mol α -ケトグルタル酸, 200 mMol L-アスパラギン酸の pH 7.4 溶液を基質とし, 被検液と incubate し, 1 mMol 2, 4-ジニトロフェニールヒドラジン塩酸溶液を加え, つぎに 0.4N NaOH 溶液で発色させ, 蒸留水を対照とし **Coleman** 分光光度計の波長 505 m μ で比色し, 吸光度から活性値を出した.

一部の例には測定のさいに 10⁻³ Mol の pyridoxal phosphate 溶液を 0.02 ml 加えて行なった.

V. 使用した緩衝液

緩衝液は pH が 7.4, 8.0 のリン酸緩衝液 (イオン強

度はともに0.06), および pH 8.6 のペロナール緩衝液 (イオン強度0.1) を使用した.

VI. 活性値の recovery

以上のように実験し, 泳動開始前の活性値と, 泳動終了後の各 Fraction の活性値の総計とを比較すると, 終了後の活性値は開始前の活性値の70~75%の値をしめしている. すなわち活性値の recovery は70~75%であった.

実験成績

I. 正常臓器

a) 肝: 肝ホモジネートの GOT 活性は starch zone electrophoresis で二つの活性部分に分けられた. 一つは原点より陽極側へ 1cm の部に, もう一つは原点より陰極側へ 3cm の部である. 著者は陽極側のものを Fraction I (以下 FI と略す), 陰極側のものを Fraction II (以下 FII と略す) とした. この二つの活性値の peak は常に FI が FII より高い活性値をしめしている. FI/FII はリン酸緩衝液の場合には pH 7.4 で 17 例の平均が 1.18 ± 0.12 (危険率 $\alpha = 0.05$, 以下同様とする), pH 8.0 では 6 例の平均で 1.45 ± 0.30 , pH 8.6 のペロナール緩衝液の場合には 8 例で行なつた平均が 1.12 ± 0.12 であつた (図3). いずれの場合にも透析を行なわない場合には活性の分離が非常に悪くなり, 分離されない場合もあつた.

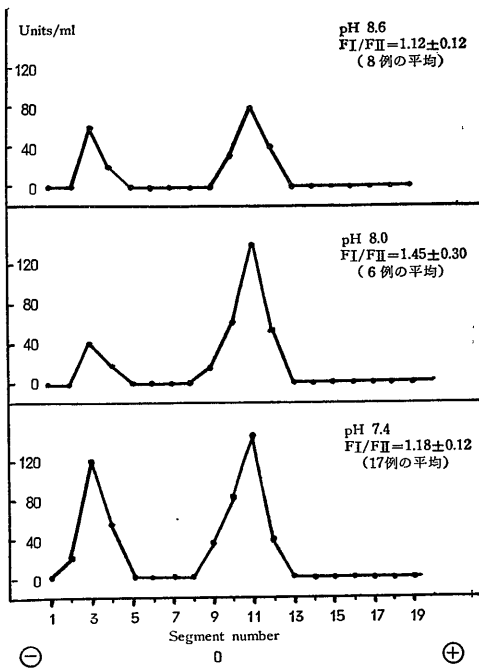


図3 肝ホモジネート

b) 心筋: 心筋ホモジネートの GOT 活性も二つの部分に分けられ, 一つは原点より陽極側へ 1cm の部に (FI), 他の一つは陰極側 3cm の部にあつた (FII). 心筋ホモジネートでも正常な場合には FI の方が常に FII より高い活性値をしめしていた.

FI/FII は pH 7.4 の場合は, 6 例行なつた実験の平均で 1.71 ± 0.16 , pH 8.0 のときは 5 例の平均が 1.36 ± 0.15 , pH 8.6 のときは 5 例の平均で 1.26 ± 0.21 であつた (図4). この心筋ホモジネートも透析を行なわない場合には分離が悪く, 特に pH 8.0 のリン酸緩衝液を使用したとき透析を行なわなかつた例ではいずれも活性部分の分離ができなかつた.

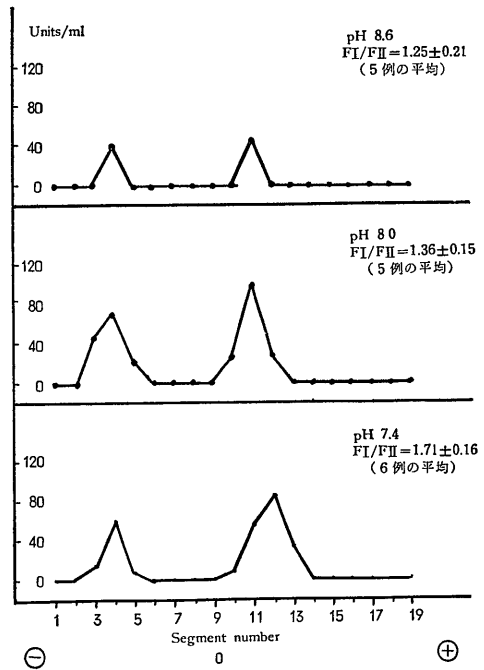


図4 心筋ホモジネート

c) 腎: 腎ホモジネートでも二つの活性の peak がみられる. 一つは原点より陽極側へ 1cm の部に (FI), 他は原点より陰極側へ 2cm の部である (FII). この場合にも FI の方が FII より常に高い活性値をしめしている. FI/FII は pH 7.4 の場合には 12 例の平均で 1.30 ± 0.16 , pH 8.6 の場合は 5 例の平均で 1.16 ± 0.12 であつた (図5). 腎ホモジネートでは全例に透析を行なつた.

d) 骨格筋: 骨格筋ホモジネートも GOT 活性部分が二つにきれいに分けられた. 一つは原点より陽極側へ 1.5cm の部に (FI), 他の一つは原点より陰極側へ 2cm の部にみられた (FII). FI/FII は pH 7.4 の

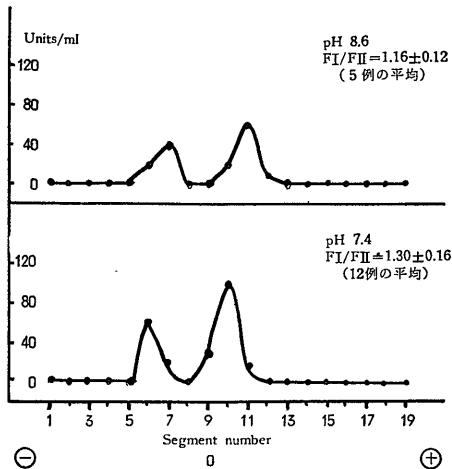


図5 腎ホモジネート

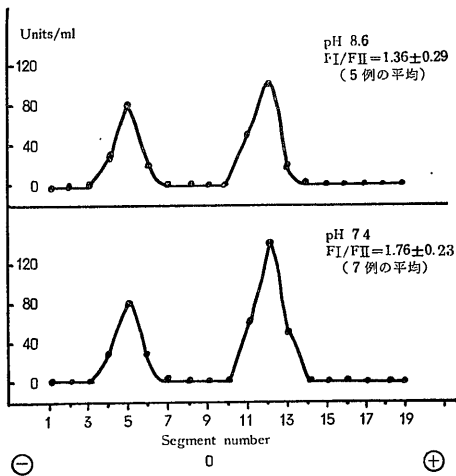


図6 骨格筋ホモジネート

場合が 1.76 ± 0.23 (7例の平均), pH 8.6 のときが 1.36 ± 0.29 (5例の平均) であった。この場合も全例で FI の活性値が FII より高い値をしめている (図6)。全例で透析が行なわれている。

e) 脾: 一部のラットでは脾ホモジネートについても実験を行なった。脾では pH 7.4 のリン酸緩衝液のみを使用した, この場合にも明らかに二つの活性の peak をつくった。一つは原点より陽極側に 1 cm (FI), 他は陰極側へ 2cm の部にみられた (FII)。FI/FII は 1.35 ± 0.21 であった (5例の平均) (図7)。

II. 異常臓器

a) 四塩化炭素腹腔内注入による障害実験の場合
四塩化炭素障害ラットの臓器を正常臓器と同様に処理し, pH 8.6 のペロナール緩衝液を使用し正常臓器の場合と同じようにして実験を行なったが, この場合

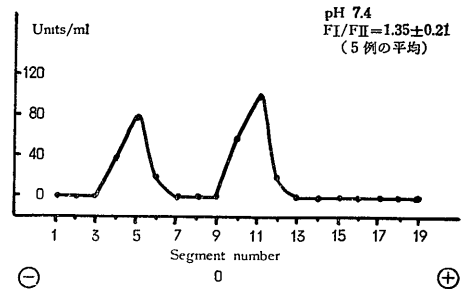


図7 脾ホモジネート

にも肝・心筋・腎・骨格筋といずれの臓器ホモジネートでも二つの活性値の peak をえた。この場合は血清についても実験を行なった。

i) 24時間後: 四塩化炭素腹腔内注入後24時間で殺し, 実験に供したのは3例である。まず肝ホモジネートでは3例いずれも FI, つまり陽極側に泳動する部分の活性が著明に減少してくる。FI/FII は 0.80, 0.85, 0.88でその算術平均は 0.81となり, FI の活性値が FII の活性値より低い値をしめている。FI/FII は心筋では同じく算術平均で 0.82 (0.89, 0.80, 0.87), 腎では 0.72 (0.67, 0.70, 0.81), 骨格筋では 0.78 (0.76, 0.80, 0.78) となつている。血清では FI の部位に一つの活性値の peak がみられる (図8)。

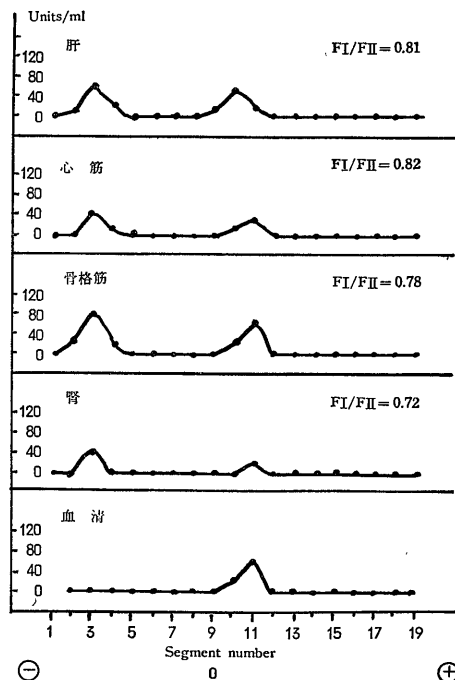


図8 四塩化投与後24時間, 各臓器と血清; 3例の平均

ii) 48時間後: 48時間後も3例で実験したが, 24時間後と同様に全例で FI 活性値低下がみられた. すなわちその傾向は FI/FII では骨格筋が3例の算術平均で 0.74 (0.70, 0.77, 0.76), 腎では 0.75 (0.90, 0.82, 0.67) と24時間後のものにくらべて大きな変化はみられないが, 肝では 0.70 (0.80, 0.62, 0.68), 心筋では 0.67 (0.72, 0.68, 0.61) と著明に低下していく. 血清は3例でいずれも FI の部位に活性部分をみたが (図9), 3例の中で1例に FII に相当する陰極側にも軽度の活性をみた (図10).

iii) 96時間後: 96時間後も腎・骨格筋では24時間後とほとんど差はみられない. すなわち FI/FII は4例の算術平均で腎では0.74 (0.86, 0.80, 0.67, 0.65), 骨格筋では0.82 (0.99, 0.83, 0.62, 0.86) である.

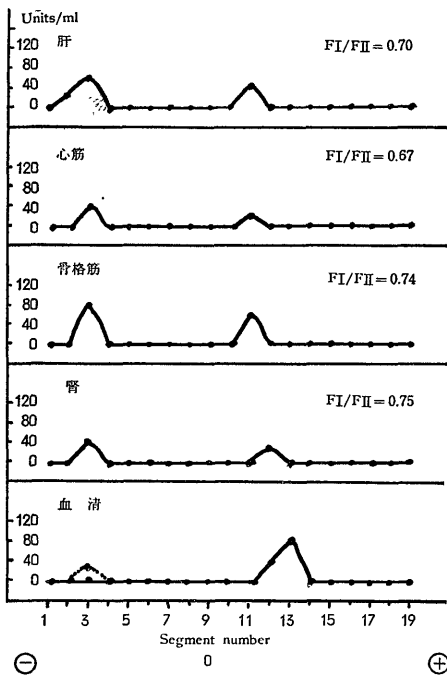


図9 四塩化炭素投与後48時間, 各臓器と血清; 3例の平均

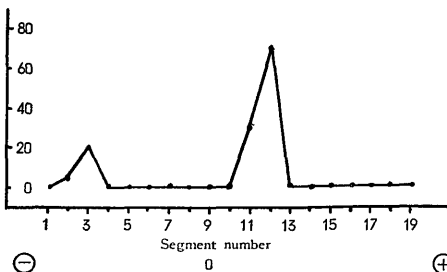


図10 四塩化炭素投与後48時間で Fraction II の出現をみた血清の例

しかし肝・心筋では4例いずれも FI の減少が続き, FI/FII は肝では0.56 (0.70, 0.69, 0.51, 0.47), 心筋では 0.59 (0.60, 0.57, 0.64, 0.55) となっている. 血清では FI に相当する部分に活性値の peak を一つ作るだけで, 陰極側にはみられなかった (図11).

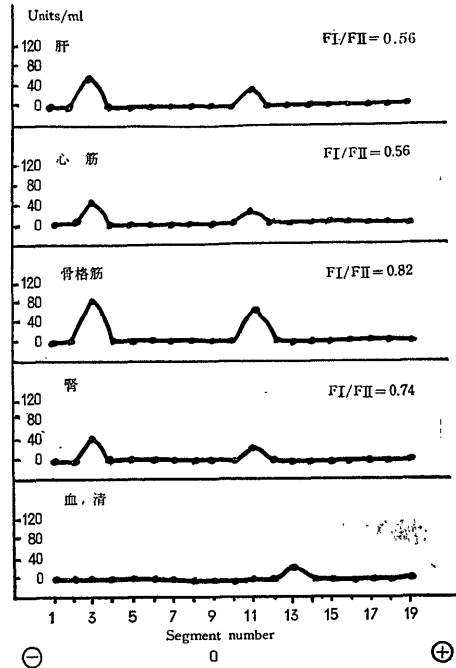


図11 四塩化炭素投与後96時間, 各臓器と血清; 4例の平均

iv) 168時間後: 肝・心筋では96時間後に比して FI の活性値の回復の傾向がみられる. FI/FII は3例の算術平均で, 肝では0.78 (0.75, 0.78, 0.81), 心筋では0.62 (0.70, 0.64, 0.53) である. 腎・骨格筋では依然としてほとんど同じ傾向であり, 腎では 0.68 (0.87, 0.64, 0.55), 骨格筋は 0.68 (0.75, 0.69, 0.61) である. 血清では FI の部位に低い活性値をしめしている (図12).

v) 組織学的所見: 組織学的には肝のみを検討したが, 全時期を通じて小葉中心部の壊死像がみられる (附图 1, 2, 3, 4).

b) 再生肝

再生肝ホモジネートの GOT 活性の分離は pH 8.6 のペロナル緩衝液を使用して行なつた. この場合も原点より 1cm の陽極側と (FI), 陰極側へ 4cm の部に活性がみられた (FII).

再生肝でのこの二つの活性部分は正常肝の場合と同じ型であり, FI/FII は 1.20, 1.22, 1.24 で算術平均

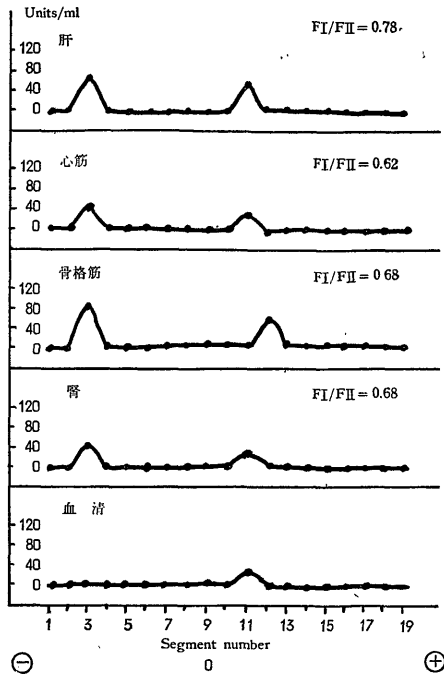


図12 四塩化炭素投与後168時間、各臓器と血清；3例の平均

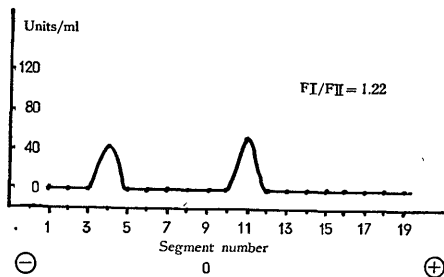


図13 再生肝ホモジネート；3例の平均

が1.22であり、陽極側の FI の活性値が FII より常に高い値をしめしている (図13)。組織学的にも附図6にしめすように肝に再生像がみられる。

c) DAB 肝癌

DAB 肝癌の肝 (癌性部) ホモジネートを pH 8.6 のペロナール緩衝液を使い分離すると GOT 活性は原点より陽極側 1cm の部にと (FI), 陰極側 3cm の部に分けられる (FII)。

FI/FII はこの場合も正常な肝ホモジネートと同様に1以上の値をしめしている。DAB 肝癌では一つの肝より三つの試料をとり、それぞれ1.20, 1.08, 1.32の値をえた (図14)。組織像は附図5にしめすように明らかな癌の発生がみられる。

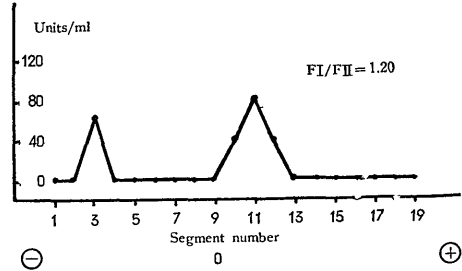


図14 DAB 肝癌の肝ホモジネート

III. 諸臓器 GOT の細胞内局在

pH 8.6 のペロナール緩衝液を使用して行なつた各臓器 Fraction の starch zone electrophoresis では、各臓器でいずれも上清分画は原点より陽極側 1cm の部に、ミトコンドリア分画は陰極側 3.5 cm の部にそれぞれ活性値の peak を一つずつ作つた。

IV. 肝疾患患者血清

図15に2, 3の例をしめしたが、患者血清の GOT 活性は pH 7.4 のリン酸緩衝液を使用して行なつた実験で、いずれも原点より陽極側 1~2cm の部に一つの活性部分を作るだけで、陰極側に活性部分をみなかつた。

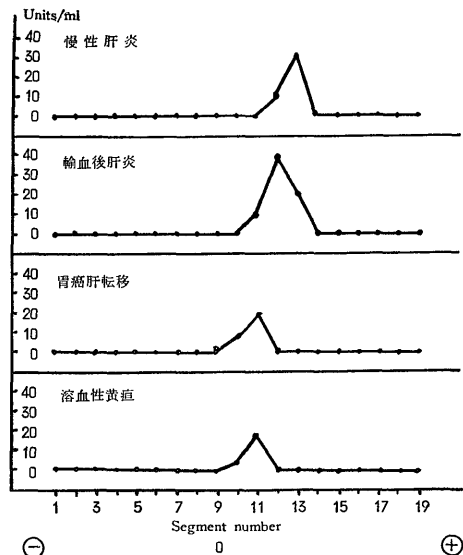


図15 患者血清

考 察

GOT の isozyme に関する研究は1958年の Sevela²⁴⁾の実験に始まる。Sevela は流行性肝炎・心筋硬塞の患者血清を用い濾紙電気泳動で血清 GOT 活性の90

%が α_2 -グロブリンおよび β -グロブリン分画にあることを報告している。電気泳動を用いて GOT の isozyme に関する実験を行なったのは、ついで Fleisher ら²⁵⁾である。すなわち、彼らは Sevela と同じように濾紙電気泳動でイヌ・ヒト・ブタの筋肉、イヌ・ヒトの肝の GOT には陽極側に泳動するものと、陰極側に泳動するものの2種類が存在することを認め、陰極側に出現する GOT が血清のものとは異なることに気づいている。Fleisher ら²⁶⁾はその後、陽極側の GOT を GOT I、陰極側のものを GOT II と名づけており、イヌの四塩化炭素投与による肝障害実験では、ほとんど GOT I のみが血清中に出現するが、四塩化炭素投与後20時間からは血中に GOT II が血清の総 GOT 活性値の16%以下で出現する場合もあることを指摘している。

Boyd²⁷⁾は1961年に濾紙電気泳動でラットの肝の GOT が二つの活性部分に分離されることを認め、その各々を詳細に検討するとともに、超遠心法を利用し、陽極側に出現するものは上清分画の GOT であり、陰極側のものはミトコンドリア分画のものであるとし、Fleisher らと同様にその各々を GOT I、GOT II とよんでいる。

上述のごとく Boyd および Fleisher らの研究で動物臓器の GOT は電気泳動で二つの活性部分に分離されることが解明されたが、その他カラムクロマトグラフィを利用した Fleisher²⁸⁾ および Borst ら²⁹⁾の研究もみられる。またわが国でも勝沼¹²⁾、山田¹⁵⁾、森川¹⁷⁾、松沢¹⁸⁾らのすぐれた研究がなされており、いずれも臓器の GOT は二つの活性部分に分けられるとのべている。

著者もデンプンを支持体とした zone electrophoresis でラット臓器の GOT は二つの活性部分に分けられ、一つは陽極側、他の一つは陰極側にあり、陽極側のものは上清分画のものであり、陰極側に出現するものはミトコンドリア分画のものであることを超遠心法を用いて確認した。

著者の実験では正常臓器はいずれの場合にもミトコンドリア由来の陰極側の活性値が上清分画のものである陽極側のものより常に低値をしめしている。

電気泳動の試料である臓器ホモジネート作成のさいにミトコンドリアから完全に GOT を抽出しえたかどうかには問題があり、著者は被検材料臓器を1昼夜氷室内で完全に凍らせ、細胞を破壊してから Waring blender 処理を行なったのであるが、Boyd³⁰⁾はこの点に関して5分間の Waring blender 処理だけでも充分であるとのべている。

しかしまた一方 Eichel ら³¹⁾がミトコンドリアの GOT 分離抽出の目的で、ラットの肝ホモジネートに sonic oscillation 処理、界面活性剤 Triton x-100, 0.25 Mol ショ糖溶液中での浮遊などの処理でミトコンドリアの GOT を有効に抽出し、肝ホモジネートの GOT 活性はミトコンドリアに50~70%、上清分画に20~40%であるとのべている。もちろん Eichel らは電気泳動を行なったのではなく、単に肝ホモジネートからの活性値の測定を行なったのみであるので著者の実験成績と同一に論ずることのできないのはもちろんである。しかし、ミトコンドリアからの GOT の抽出には非常に問題のあるところであろう。

著者の実験では正常ラット臓器 GOT の FI/FII 比は上述のように1以上の値を示しているが、四塩化炭素を投与すると FI/FII 比は検討した四つの臓器でいずれも1以下となってくる。これは上清分画である Fraction I が臓器の障害により血中に逸脱したためであると考えられるが、このことは同時に施行した電気泳動で血清の GOT が Fraction I と同じ泳動度をしめすことから充分にうなずけることであろう。肝では FI/FII 比は24時間後からしだいに低下し、96時間後に最低値をしめし、その後しだいに上昇しているが、著者の観察した168時間後までには正常な値までには復さなかつた。四塩化炭素をラットに与えると肝内の GOT は肝障害のために血中へ逸脱されるのは当然であろうが、四塩化炭素を動物に与えて肝ホモジネートの GOT 活性値を測定した報告をみると、イエウサギを使用した高杉³²⁾は14日間経過しても正常値にもどらず正常よりなお24%の減少がみられるとのべ、ラットを使用した Asada³³⁾は7日後には正常に近くもどるといつている。著者の成績では7日後でもまだかなりの上清分画の GOT 活性値の低下をみた。

心筋や腎・骨格筋でも FI/FII 比は1より小さな値をしめしており、これらの臓器へも四塩化炭素は障害を惹起したと考えられるが、GOT の electrophoretic pattern からみると、肝の障害と異なり一度の四塩化炭素の投与によりある一定の変化を起した後は時間的に追求してもあまり大きな変化をみなかつた。

著者の実験のごとく、四塩化炭素は従来から実験的肝障害実験によく使用されている³⁴⁾、³⁵⁾、³⁶⁾、³⁷⁾。しかし肝以外の臓器にどのような障害を与えるかについてはほとんどのべられていない。上述のように著者の実験成績では、肝以外の臓器 GOT にも明らかに影響を及ぼしているが、この点について、誤って四塩化炭素を吸入したヒトの例をみると、重篤な肝障害とともに、高度の腎障害およびうづ血性心不全の発生をみており³⁸⁾

39), 四塩化炭素が肝以外の臓器にも大きな障害を与えることは十分に考えられることである。

四塩化炭素障害時のラット血清の GOT 活性値の増加は48時間後に最高に達しているが, 48時間後の1例で陽極側の Fraction I の出現と同時にわずかの Fraction II の出現をみた。ミトコンドリアの GOT が血中に出現したものであると考えられる。このミトコンドリア由来の GOT が血中へ出現することについて松沢⁶⁾ はほとんどの場合に起らないと述べているが, 上述のように Fleisher ら²⁰⁾ はイヌで GOT II での血中への出現をみており, また Boyd³⁰⁾ もイヌに四塩化炭素を投与すると3例の中1例で GOT II が血中に出現するのを認めているごとく, かなり激しい, 急激な肝障害では GOT の Fraction II の血中への逸脱も十分に起りうると考えたい。

ラットの肝の一部を切除すると24時間後にはすでに肝に再生が起ってくるが, この再生肝の GOT electrophoretic pattern は正常な肝の場合と同じ形をしめしている。また DAB 肝癌の肝でも FI/FII は1以上の値をしめしており, この場合も GOT の electrophoretic pattern に関しては正常肝と同じ傾向をしめしている。

このように再生肝でも DAB 肝癌でも FI/FII 比が1以上の値をしめしており, 四塩化炭素障害肝のみが1以上の値をしめすことは興味あることであり, 肝に加わる急激な noxe のみが FI/FII 比を1以下の値にすることを知った。徐々に加わる肝への障害ももちろん, Fraction I の血中への逸脱を起すことは当然である。しかし急激な障害と異なり FI/FII 比を逆転さすほどの変化を与えないのであろう。この事実は臨床的にも, 急激な肝障害, たとえば急性肝炎が血中に多量の GOT を放出するのに対し, その他の慢性肝炎・肝硬変・肝癌などの疾患では急性肝炎に比して血清 GOT 活性値が著しく低いことから十分に考えられる現象である。

著者の行なったヒトの血清での実験では陽極側への一つの活性部分をみたにすぎず, Sevela 以来の諸家の報告と一致した結果をえたにすぎなかつた。

以上のようにデンプンを支持体とした zone electrophoresis で, 著者は緩衝液中で被検材料の透析を行なったが, これは活性部分の分離によい結果をもたらした。これは透析によつて分離を阻害する物質が透析液に出るためと思われる。この種の実験には透析処理が充分になされる必要を認めた。

著者は zone electrophoresis で分けられる二つの GOT について, その詳細な性質については検討しな

かつたが, 勝沼¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ らはこの二つの GOT をそれぞれ GOT_s (supernant), GOT_M (mitochondria) とよび, それぞれの性質を詳細に検討し, GOT_s と GOT_M とは生物学に異なつた役割を演ずるものであり, とくに GOT_M は TCA cycle 内で重要な役割をもつと述べているのは興味あることであろう。

以上のようにラットの心筋・肝・腎・骨格筋・脾のホモジネートはデンプンを支持体とした zone electrophoresis で二つの活性部分に分けられ, とくに臓器による特異性をみながつたが, 透析を行なわない場合には特定臓器で活性の分離が悪いことがある。著者は以前に透析を行なわないで実施した実験では肝ホモジネートの GOT のみが電気泳動で二つの peak に分離され, 他の臓器ホモジネートは分離されないことから, GOT の臓器特異性の存在を考えたが⁴⁰⁾, これは臓器特異性というよりも, むしろ酵素蛋白に附着する臓器に特異な蛋白によるものと考えたほうがよいようである。しかしまた一方では GOT も単に細胞内局在のみによる差異でなく, 臓器間にも何か小さな特異性の存在の可能性も完全に捨てざるわけにはゆかないと思われる。このことは Decker ら⁴¹⁾ が starch gel electrophoresis による zymogram の研究からその可能性を示唆しているからである。しかしいずれにしても LDH にみられるようなはつきりした臓器による特異性がみられないことは事実であろう。

結 論

1) デンプンを支持体とした zone electrophoresis でラット臓器(肝・心筋・腎・骨格筋・脾)内の glutamic oxaloacetic transaminase は諸家の報告のごとく二つの活性部分に分けられることを確認した。またとくに臓器による特異性は認めえなかつた。

2) 実験的にラットに四塩化炭素を投与すると上清分画の GOT の血中への逸脱が起り, 臓器内 GOT の pattern に変化をきたし, 電気泳動で陽極側に泳動する Fraction I の減少をみた。Fraction I/Fraction II 比は正常臓器が常に1以上であるのに反し, 四塩化炭素障害臓器では常に1以下の値をしめた。

3) しかし肝部分切除後に生ずる再生肝および DAB 肝癌ではこの Fraction I/Fraction II 比が1以上であり正常臓器の場合と同じであつた。

4) 諸種肝疾患患者血清の GOT 活性は Fraction I の部にみられた。

終りに終始ご指導とご校閲を賜つた恩師武内重五郎教授に深く感謝します。またご指導をいただいた教室高田助教授および本学第二病理学教室倉田助教授, ご教示, ご協力をいただいた教室高沢講師に感謝します。

文 献

- 1) Markert, C. L. & Möller, F. : Proc. Nalt. Acael. Sci., 45, 753 (1959). 2) 宮木高明 : Medical Culture Library No1/1963 page 4.
- 3) Vesell, E. S. & Bearn, A. G. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 96 (1957).
- 4) Vesell, E. S. & Bearn, A. G. : J. Clin. Invest., 37, 672 (1958). 5) Vesell, E. S. & Bearn, A. G. : J. Clin. Invest., 40, 586 (1961). 6) Kowlessar, O. D., Haeffner, L. J. & Slesinger, M. H. : J. Clin. Invest., 39, 671 (1960). 7) Smith, E. E., Pineda, E. P. & Rutenberg, A. M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110, 683 (1962). 8) Dreiling, D. A., Janowitz, H. D. & Josephberg, L. J. : Ann. Int. Med., 58, 235 (1963). 9) Rosenberg, I. N. : J. Clin. Invest., 38, 630 (1959).
- 10) Schmidt, E., Schmidt, F. W. & Herfarth, CH. : Klin. Wschr., 40, 80 (1962). 11) Karmen, A., Wróblewski, F. & LaDue, J. S. : J. Clin. Invest., 34, 126 (1955). 12) 勝沼信彦・藤野明男・油谷友三・木村博行・泉 勝美・谷本 進 : ビタミン, 27, 236 (1963).
- 13) 勝沼信彦・藤野明男・小西真知子・吉田 翼 : ビタミン, 27, 148 (1963). 14) 勝沼信彦・松沢健夫・藤野明男 : ビタミン, 25, 205 (1962).
- 16) 山田弘三・沢木僖二・福村 亮・林 優 : 生化学, 33, 646 (1961). 16) 山田弘三・沢木僖二・辻 稔・林 優・福村 亮 : 日消誌, 60, 106 (1963). 17) 森川訓行・沢木僖二 : 臨床病理, 11, 314 (1963). 18) 松沢健夫 : 総合医学, 20, 341 (1963). 19) 岩田卓造 : 十全医会誌, 67, 470 (1961). 20) 原田三樹男・水谷太郎・丸谷八郎 : 大阪医会誌, 36, 783 (1937). 21) 建部守昭 : 十全医会誌, 66, 249 (1960). 22) Hageboom, G. H. & Schneider, W. C. : J. Biol. Chem., 194, 513 (1952). 23) Reitman, S. & Frankel, S. : Am. J. Clin. Path., 28, 56 (1957). 24) Sevela, M. : Nature, 181, 915 (1958). 25) Fleisher, G. A., Potter, C. S. & Wakim, K. G. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130, 229 (1960). 26) Fleisher, G. A. & Wakim, K. G. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106, 283 (1961). 27) Boyd, J. W. : Biochem. J., 81, 434 (1961). 28) Fleisher, G. A. : Fed. Proc., 19, 6 (1960). 29) Borst, P. & Peeters, E. M. : Biochim. Biophys. Acta, 54, 188 (1961). 30) Boyd, J. W. : Clin. chim. Acta, 7, 424 (1962). 31) Eichel, H. J. & Bukovsky, J. : Nature, 191, 243 (1961). 32) 高杉年雄 : 日内会誌, 50, 9 (1961). 33) Asada, M. : Med. J. Osaka Univ., 9, 45 (1958). 34) Koch-Weser, D., Farber, E. & Popper, H. : A.M.A. Arch. Path., 51, 498 (1951). 35) McCloskey, J. F. & McGehee, E. H. : A.M.A. Arch. Path., 49, 200 (1950). 36) Stowell, R. E. & Lee, C. S. : A.M.A. Arch. Path., 50, 519 (1950). 37) Stowell, R. E., Lee, C. S., Tsuboi, K. K. & Vilasana, A. : Cancer Research, 11, 349 (1951). 38) Guild, W. R., Young, J. V. & Merrill, J. P. : Ann. Int. Med., 48, 1221 (1958). 39) Jennings, R. B. : A.M.A. Arch. Path., 59, 269 (1955). 40) 金山隆一・高沢嘉人・武内重五郎 : 日消誌, 60, 817 (1963). 41) Decker, L. E. & Rau, E. M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112, 144 (1963).

Abstract

Isozymes are defined as different molecular forms in which proteins may exist with the same enzymatic specificity.

In recent years, isozymes of *glutamic oxalacetic transaminase* (GOT) were studied using the starch zone electrophoresis. Normal rats were sacrificed under ether anesthesia. The liver, heart, kidneys and skeletal muscles were immediately removed. These organs were washed thoroughly in cold normal saline to remove the red cells, and then placed in an ice box at 0°C to freeze. After freezing, they were homogenized in cold normal saline with a Waring blender for five minutes. The homogenates were centrifuged for 30 minutes at 4,000-5,000 r. p. m., and supernatant fluids were applied to the electrophoresis.

After electrophoresis at 4°C for 24 hours at 15-20 V/cm and 4-20mA, the starch block

was cut into small segments. Each segment was eluted with distilled water respectively. GOT activity in each elute was estimated by the method of Reitman-Frankel.

According to the same procedure, the following pathological rat organs were studied: the above-mentioned four organs in experimental liver damage due to intraperitoneal injection of carbontetrachloride (CCl_4); regenerative liver 24 hours after partial hepatectomy; and, liver of experimental hepatic cancer produced by the feeding of *p*-dimethylaminoazobenzen.

The rat sera in CCl_4 poisoning and the human sera in some hepatic diseases were also studied in the same way.

In all the organs of the normal and pathological rats, GOT activities were found in two separate parts; one in the anodal zone (Fraction I) and the other in the cathodal zone (Fraction II). GOT activities in the anodal zone always showed a higher level of activity than those in the cathodal zone, in all normal organs. The ratio of Fraction I to Fraction II (F_I/F_{II}) was always calculated higher than in 1.

In the four organs of rats poisoned by CCl_4 , GOT activities in the anodal zone significantly decreased, F_I/F_{II} ratio being less than in 1. This finding was seen 24 hours after the injection of CCl_4 and continued for 168 hours in all the organs.

This decrease of GOT activity in the anodal zone was not seen in the regenerative liver, nor in the experimental hepatic cancer. The F_I/F_{II} ratio was higher than in 1, as seen in the normal rats. GOT activities in the rat sera poisoned by CCl_4 localized in the anodal zone and no activity was seen in the cathodal zone, except in one case, which was sacrificed 48 hours after the injection of CCl_4 . GOT activities of human sera, in some hepatic diseases, were found only in the anodal zone and not detectable in the cathodal zone.

附 図 説 明

1. 四塩化炭素投与後 24時間. 肝細胞脂肪変性および小葉中心部の壊死像. $\times 250$ (H.E.)
2. 四塩化炭素投与後 48時間. 24時間後とほとんど同じ像. $\times 250$ (H.E.)
3. 四塩化炭素投与後 96時間. 細胞浸潤をともなう壊死巣が多発している. $\times 250$ (H.E.)

4. 四塩化炭素投与後 168時間. 小葉中心部の壊死像. $\times 250$ (H.E.)
5. DAB 肝癌. 定期的肝癌型の部. $\times 250$ (H.E.)
6. 再生肝 (一部肝切除後 24時間の残存肝). 濃染核をもつ好エオジン性肝細胞とクロマチンに乏しい大きな核をもつ淡染性肝細胞がいりまじっている再生肝の像. $\times 250$ (H.E.)

