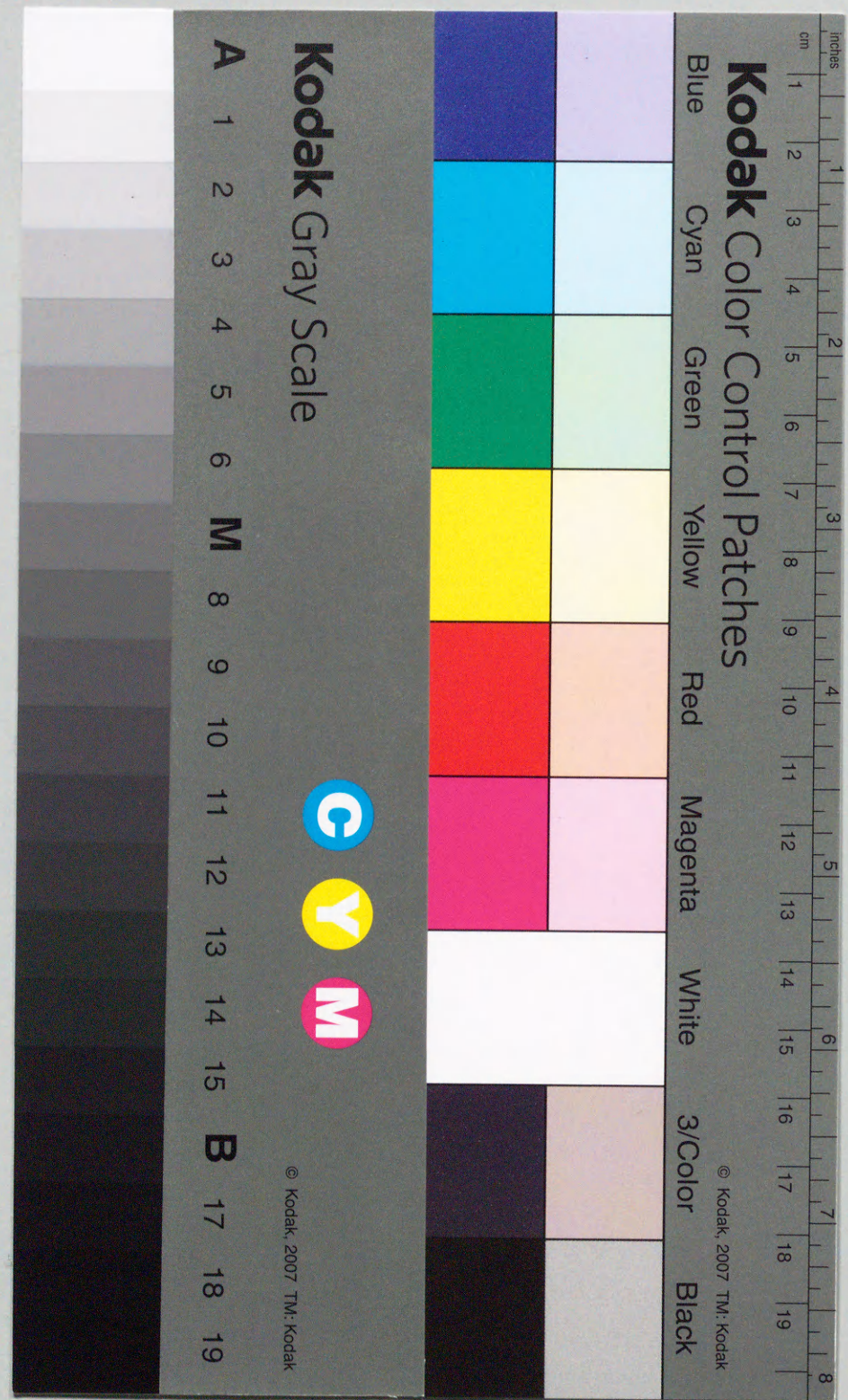


博士論文

ラットを用いた老化過程及びアゾ色素による発癌過程の各組織での
グリオキサラーゼ系活性とその補酵素GSH含量の変動について

平成8年9月
(1996年)

河瀬美知



博士論文

ラットを用いた老化過程及びアゾ色素による発癌過程の各組織での
グリオキサラーゼ系活性とその補酵素GSH含量の変動について

平成8年9月
(1996年)

河瀬美知

文 士 社

日 本 学 会
(1991)

伊 藤 隆 博

目 次

略語表	1
序論	1
第1章 老化過程でのラットの肝臓、筋肉、血漿中のグリオキサラーゼ系について	7
【緒言】	7
【実験方法の部】	7
1. 試薬	7
2. 動物	8
3. 採血と一般的臨床化学検査	8
4. 生体組織試料の調製	8
5. MGとD-乳酸及び関連代謝物の定量	9
6. 関連酵素活性測定	9
【結果の部】	9
1. 動物と一般的臨床化学検査	9
2. 肝臓と骨格筋の蛋白量	11
3. 加齢によるラット組織中のD-乳酸とその関連代謝物 (MDA, MDA-B) の変化	11
4. 加齢によるグリオキサラーゼI、II活性と補酵素GSHレベル	14
【考察の部】	15
【小括】	17
1. MDAとMDA-Bの測定法	17
2. グリオキサラーゼ活性の測定法	17

第2章 老化過程でのラットの肝臓中グルタチオン生成系に

ついて 20

【緒言】 20

【実験方法の部】 21

1. 試薬 21

2. 動物 21

3. グルタチオン、システイン及び関連代

謝物の定量とシステイン合成酵素活性

測定 21

【結果の部】 21

1. 加齢による体重と肝重量の変化 21

2. ラットの加齢による肝臓中GSH、

GSSG、Cys及びCys-Cys 21

3. ラット肝臓中のCTTaseとCBS

活性への加齢による影響 22

【考察の部】 24

【小括】 26

第3章 アゾ色素(MDAB)投与によるラット肝癌発生過

程でのグリオキサラーゼ系について 27

【緒言】 27

【実験方法の部】 27

1. 実験動物 27

2. 試薬 27

3. 血液試料 28

4. MGとD-乳酸及び関連代謝物の定量 28

5. 関連酵素活性測定と蛋白定量 28

【結果の部】 28

1. 肝癌発生過程のラット体重と肝重量 28

2. ラット血漿中の一般的臨床化学検査項目 29

3. 肝癌発生過程での血漿中 γ -GTP、

GOP及びGPT活性 31

4. MDABによる肝癌発生過程での肝臓

中及び血漿中メチルグリオキサールと

D-乳酸及びその関連代謝物と酵素活性 31

【考察の部】 37

【小括】 41

第4章 アゾ色素(MDAB)投与によるラット肝癌発生過程

でのグルタチオン生成系について 44

【緒言】 44

【実験方法の部】 44

1. 試薬 44

2. 実験動物 44

3. グルタチオン及びシステインの関連酵素

活性測定 44

4. グルタチオン及びシステインの定量 45

【結果の部】 45

1. MDAB肝癌発生過程でのグルタチオン

生合成酵素活性 45

2. MDA B肝癌発生過程でのCys及び	
Cys-Cys	47
3. MDA B肝癌発生過程でのシステイン生	
合成酵素活性	48
【考察の部】	50
【小括】	51
総括	52
引用文献	55
謝辞	66

略語表

ADP	adenosine 5' -diphosphate
ATP	adenosine 5' -triphosphate
CBS	cystathionine β -synthase
CS	cysteine synthase
CTTase	cystathionase, cystathionine γ -lyase
Cys	L-cysteine
Cys-Cys	cystine
DAB	4-dimethylaminoazobenzene
DHAP	dihydroxyacetone phosphate
ECD-GC	gas chromatography with electron-capture detector
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
F-1,6-P	fructose 1,6-bisphosphate
GAP	glyceraldehyde 3-phosphate
γ -GCS	γ -glutamylcysteine synthetase
GOT (AST)	glutamic oxaloacetic transaminase (aspartate aminotransferase)
GPT (ALT)	glutamic pyruvic transaminase (alanine aminotransferase)
GSH	reduced form glutathione
GSHS	glutathione synthetase
GSSG	glutathione disulfide, glutathione, oxidized

γ -GTP	γ -glutamyl transpeptidase
HPLC	high performance liquid chromatography
L-LDH	L-lactate dehydrogenase
MDAB	3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene
MG	methylglyoxal
β -NAD ⁺	β -nicotinamide-adenine dinucleotide
β -NADPH	β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form
PK	pyruvate kinase

序論

【本研究の背景】

— 特にメチルグリオキサールの生成系について —

メチルグリオキサール (MG) はピルブアルデヒドとも呼ばれていた α -ケトアルデヒドで反応性に富む。この化合物は生物学の歴史上でも、その注目のされ方は変化に富んだものであった。1913年に Neuberg また、Dakin と Dudley の両グループはMGをD-乳酸に転換する酵素、グリオキサラーゼ I と II の混合物を動物組織中と酵母で発見した [1, 2]。Neuberg らはMGが動植物や微生物中の糖代謝の重要な中間体であろうと提唱し [3, 4, 5]、以後、この考えが約20年間広く受け入れられていた。1932年、Lohmann は還元型グルタチオン

(GSH) はメチルグリオキサラーゼの補酵素であることを報告した [6]。しかし、この報告の中で筋肉抽出液ではGSHがなくても、グリコーゲンからL-乳酸が出来ることを報告した [6]。更に、1934年に Meyerhof と Lohmann や、またドイツの他のグループ、Embden らは筋肉組織を用いてフルクトース-1,6-二リン酸 (F-1,6-P) より2つの三炭糖が出来ることを示した [7, 8]。これらの報告より後、解糖系は三炭糖リン酸よりL-乳酸が出来る過程 Embden-Meyerhof 経路が一般的に証明されたために、MGは解糖系での重要な中間体という考えは否定された。また、1934年に Meyerhof と Lohmann は酸性下、非酵素的に三炭糖リン酸がMGに転換しているのかも知れないことを示唆し、その後、この見解は1950年代まで支持された。そして、MGは解糖中間体からの非酵素的生成物であるとみなされ注目されなくなった。

1951年 Racker は、MGからD-乳酸にするグリオキサラーゼ酵素がグリオキサラーゼ I と II により系として構成されていることを明らかにした [9]。その後、報告されたMGの生成ルートを図1-1に示した。

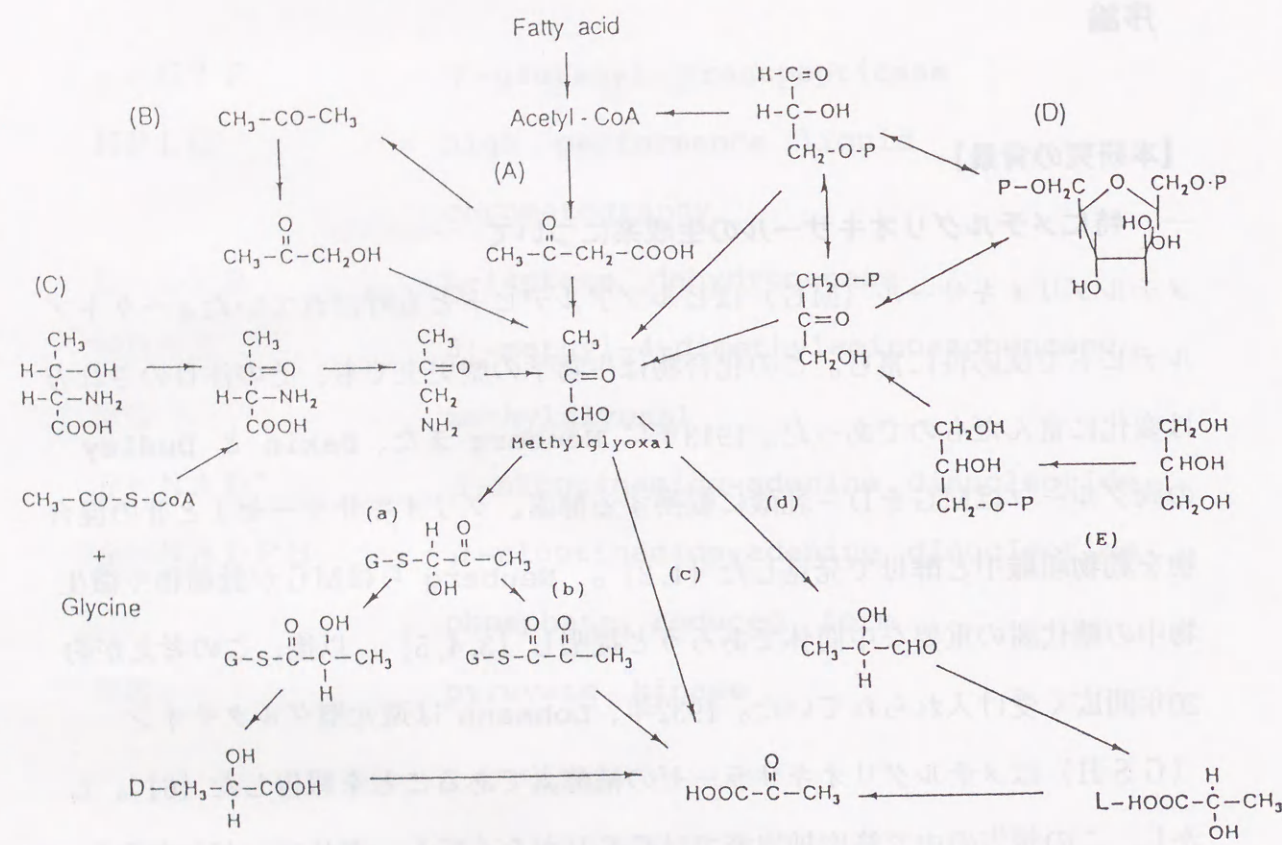


図1-1 Biosynthesis and metabolism of methylglyoxal.

著者らはラットを用いて、また、MGの新定量法 [10, 11] を用いてこの生成ルートを検討した。まず、上記の図Aのルートである。Aのルートは1967年 Milligan と Baldwin [12] によって羊心臓抽出物、その後それはミオグロビンと解るのだが、を触媒として、酸素と Mn^{2+} の存在下、アセト酢酸より酸化脱炭酸されてMGが出来るルートである。我々はラット肝、骨格筋、心筋のホモジネートを用いた追試の結果、*in vitro* で起きる反応では高濃度の Mn^{2+} を必要とし、さらにpH6.5以下で起きるのでこの反応は *in vivo* では生成されるとは考えにくいと結論した [13]。Bのルートはアセト酢酸からアセトンになり、アセトンモノオキシゲナーゼによりアセトールとなり、アセトールモノオキ

シゲナーゼによりMGを生成する経路で、ラット等を用いて Casazza らによって報告された [14, 15, 16]。ラット肝臓と骨格筋ホモジネートを酵素源として、また、アセトールを基質として用いた著者らの検討の結果、MG生成はみられたが、量的には少なく重要な経路とは考えられないと結論した [13]。Cのルートは、スレオニンやグリシンのアミノ酸からアミノアセトンを経由してMGが生成する経路である。1958年 Gibson らはニワトリの赤血球ではアミノアセトンがアセチルCoAとグリシンより生成すること [17] を報告した。また、1984年 Bird らと更に1985年 Ray らは動物ではL-スレオニンからできること

[18, 19]、また、Elliott や Neuberger は微生物でもL-スレオニンからできること [20, 21] を報告した。そして、Green らは微生物を用いてアミノアセトンの酸化的脱アミノ化によりMGになるという報告をした [22]。Ray らは動物でもこの経路を報告している [23, 24]。著者らはこのルートを検討するためにビタミンB6欠乏食ラットで実験をおこなった。その結果L-スレオニンからのMG生成経路は存在するとしても量的には期待されたほどでなく、また、正常ラット肝臓のL-スレオニン脱水素酵素活性も殆どみられず、これらのことよりこの経路は主たるものとは考えられないと結論した [13]。しかし、最近、当教室では軟体動物タコの足の筋肉においてはこの経路が主なものであり、新しいエネルギー獲得経路の存在を確認しているので生物を限定して論議をする必要がある。Dのルートは前述した様に1913年に Dakin と Dudley [2]、及び Neuberger [1] が報告した解糖系からの生成ルートである。論外とされたこの経路を、それから約50年後、Cooper と Anderson は *E.coli.* にはジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) からMGを経由してピルビン酸にする酵素類が含まれていることを報告し、メチルグリオキサールバイパスと命名した [25]。Grazi と Trombetta は1978年に、ウサギの筋肉 F-1,6-P アルドラーゼは

DHAPをMGと無機リン酸にすると報告した [26]。Bonsignore らは1973年、グリセルアルデヒド3-リン酸 (GAP) からMGへの非酵素的な転換がリジンによってより触媒されると報告した [27]。著者らの検討により、ラット肝臓ではこのルートがMGの生成する一番のルートであることが明らかとなった。すなわち、解糖系の中間体である三炭糖リン酸から非酵素的にMGが出来ることが解った [13]。Eのルートについては、その後の著者らの実験で、ラット肝臓ではグリセロールからもグリセロールカイネースにより三炭糖リン酸となり更にMGが効率良く生成することが解った [28]。

水溶液または緩衝液中で三炭糖からはMGが非酵素的には生成しないことも解った [13]。

こうして生成量の多少はあるが、MGはA、B、C、D、Eのルートを経由して生成する。

生成したMGは(a) (b) (c) (d)のルートを経由して代謝される。(a)の経路がグリオキサラーゼ系で、MGはGSHを補酵素としてグリオキサラーゼIとIIによりD-乳酸を生成する。ラット肝臓、筋肉では主にこの経路によって代謝されることが解っている。前述したように、MGやグリオキサラーゼの発見が古い割にはその作用機構については不明な点が多く、また、真の生理的役割は殆ど知られていない。著者らはこの系が解糖系と連動し、エネルギー代謝や、エネルギーを損失しても緊急時の無機リン酸の供給に寄与しているのではないかと考えている。

この考えのもとに生理的役割を解明するため研究を展開した。まず、ヒトの運動前後の血中濃度を定量したり、糖尿病・飢餓状態のラットを用いて各種臓器内のグリオキサラーゼ系の関連代謝物や酵素活性の変動を測定した。その結果、運動した直後の血漿中では、L-乳酸やピルビン酸の増加と同じく、D-乳酸が5分以内に数倍増加すること、すなわち、血漿中のD-乳酸は普通のヒトの5分間の

運動で46 μ Mから140 μ Mに、ピルビン酸25 μ Mから40 μ Mに変動することが解った。また、血漿中MGは変化なかったが、赤血球中MGが5分以内で著しく減少し、この減少は運動中にD-乳酸に転換することによるものであることが示唆された [30]。次に、糖尿病や飢餓状態のラットの実験結果では、血漿、肝臓、筋肉中のD-乳酸が有意に増加し、また、L-乳酸、ピルビン酸の減少、特にピルビン酸の減少が顕著であった。グリオキサラーゼI活性は変化なかったが、pyruvate kinase (PK) 活性が低下していた。そのため、三炭糖リン酸からD-乳酸へ流れることが明らかとなった。しかし、中間体のMGは飢餓ラットでは肝臓、筋肉中とも減少していた。また、糖尿病ラットでは17日目の肝中で50%に減少していた。他は変化なかった。このMGの結果については説明ができなかった [28,30]。Thornalley らは、糖尿病とこの系について、ヒトでの合併症との比較検討などの詳しい報告や、糖尿ラットで報告している [31,32]。しかし、この系の役割は依然としてはっきりと説明できず現在に至っている。

【本論文の構成について】

著者等はMGの生物学的及び生理学的役割に興味を持ち、MGの生合成と代謝について研究してきた。著者はMGとD-乳酸及びグリオキサラーゼ系の意義を解明する一助として生物個体の異常時にこれらがどう変動するのか、変動の事実を理論的に解釈できるかどうかを検討することにした。異常時として第1章では、ラットを用いて、加齢老化過程で、肝臓、骨格筋及び血漿中のMGとD-乳酸及びそれらの関連代謝物や関連酵素活性の変動について検討したことを記述する。第2章は、加齢老化ラットでのグリオキサラーゼ系の補酵素GSHの変動とともに、その構成アミノ酸のシステイン (Cys) とその合成系の変動を測定した結果を記述したものである。次に第3章では別の異常時のモデルとして、選択

的に肝臓に癌を発生させるアゾ色素を投与したラットを用いて肝臓と血漿中でのMGとD-乳酸及びそれらの関連代謝物や関連酵素活性の変動について検討したことを記述する。細胞分裂の異常状態であり盛んに分裂生長する肝発癌過程ではこの系はどう変動するのかを調べたものである。第4章では第3章のラットを用いて、GSHとCysの合成系について第2章と同様に測定した結果を記述する。

第1章 老化過程でのラットの肝臓、筋肉、血漿中のグリオキサラーゼ系について

【緒言】

一般的には、ラットではL-乳酸は解糖経路より生成し、一方D-乳酸は三炭糖リン酸からMGとなり、生成することが解っている [13]。また、著者らの今までの研究より、ラットの飢餓・糖尿状態ではD-乳酸レベルが上昇すること、ラット肝臓ではグリセロールやグルコースを主な基質としてD-乳酸が生成されること、ヒトの運動前後の血漿中ではD-乳酸が上昇することが解った [28, 29, 30]。さらに、哺乳動物でのMGやD-乳酸の生理的意義を解明するために、この章はラットを用いてMGやD-乳酸代謝と老化との関係を記述する。ラット組織中のMGやD-乳酸、また、それらに関連する代謝物レベル及び酵素活性が年齢と共にどう変動するのかを記述する。これらの実験には5週令から30カ月令までのラットを用いた。

【実験方法の部】

1. 試薬

硫酸ヒドラジンとo-フェニレンジアミンは和光純薬工業(株)より購入した。乳酸脱水素酵素(ブタ心臓、EC1.1.1.27)、フォスホエノールピルビン酸、NAD⁺はオリエンタル酵母(株)より購入した。D-乳酸リチウムとS-ラクチルグルタチオンはシグマ社より、DL-6,8-チオクタミドは東京化成工業(株)よりそれぞれ購入した。MGは使用の都度、アルドリッチ社(株)のジメチルアセタールを加水分解して用意した [33]。4,5-ジクロロ-1,2-フェニレンジアミンはアルドリッチ社(株)より購入した。D-乳酸脱水素酵素(*Staphylococcus* sp., EC1.1.1.28)とジアホラーゼ(*Clostridium*

Kluiver, EC 1.6.4.3) は天野製薬 (株) より、また、グルタチオンは千寿製薬 (株) より、それぞれ寄贈された。

2. 動物

Fischer (F344/Du Crj; SPF/VAF) 系統のオス、アルビノラットを用いた。18カ月令までのこれらの動物は大鵬薬品 (株) の研究所で飼育していただいた。その後、研究に使用するまでは我々の動物飼育実験室 (室温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$) で飼育した。飼料はオリエンタル酵母 (株) 製のMF飼料を与え、水は自由に摂取させた。24カ月令は2月に、27カ月令は5月に、30カ月令は8月に、それぞれ処理した。対照用としての若いラットも上記と同様な条件で飼育した。そして、5週令を2月と8月に、9週令を5月に、同様に処理した。

3. 採血と一般的臨床化学検査

ラットに5%ペントバルビタールを0.2から0.5ml腹腔内投与した。約5分後、開腹し、腹部大動脈より採血 (6~10ml) を行ない、 $1,700 \times g$, 15分間遠心し、血漿を得た。採血は朝の9から10時に行った。血漿2mlを一般的臨床化学検査のために使用した。岡山血液検査センターで、オリンパスAU5000、AU700、AS-300の分析機器を用いて測定された。

4. 生体組織試料の調製

採血後、直ちに肝臓と骨格筋を摘出し、氷冷した生理食塩水で洗浄した。肝臓は氷冷した生理食塩水を用いて、脱血後、5倍容の氷冷した10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を加えガラステフロンホモジナイザーを用いて、 4°C 、30秒間ホモジナイズした。筋肉は細かく切断した後、4倍容の上記緩衝液を加え、ワーリングブレンダーを用い、 $10,000 \text{ rev. /min}$ で、5分間ホモジナイズした。ホモジネイトを $6,000 \times g$, 4°C で15分間遠心後、上清を中間代謝物の分析やPK活性測定以外の酵素活性測定に使用した。PK活性測定用には、肝臓と骨格筋は0.1M KCl, 5mM MgSO_4 , 1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl (pH7.4) の緩衝液でホモジナイズしたものを同様に

遠心後、上清を使用した。

5. MGとD-乳酸及び関連代謝物の定量

D-乳酸とピルビン酸の定量はキノキサノール誘導体とした後HPLCを用いて測定する当研究室の開発した定量法を用いた [34]。MGの定量は6,7-ジクロロ-2-メチルキノキサリンに誘導してECD-GCを用いて測定する我々の開発した定量法を用いた [11]。L-乳酸とグリセロールの定量はベーリンガーマンハイム (株) 製のF-キットを用いたUVによる方法により定量した。GSHとGSSGの定量はグリフィスの方法を基にした、5,5'-ジチオビス (2-ニトロベンゾイックアシッド) を用いて測定した。特にGSSGの測定は我々の研究室が開発したGSHのチオールをアクリロニトリルでブロックした後定量するという方法を用いて定量した [35]。

6. 関連酵素活性測定

グリオキサラーゼI (EC 4.4.1.5) とグリオキサラーゼII (EC 3.1.2.6) 活性は文献 [36] に記載されているS-ラクトイルグルタチオンの240nmの増減を測定する方法を用い、PK活性は常法により [37] 測定した。

【結果の部】

1. 動物と一般的臨床化学検査

24カ月令まではラットは動きが敏捷で毛の色艶が良かった。しかし、27カ月令後は動きが緩慢になり、毛は茶色がかり、色艶がなくなってきた。著者らはラットの行動や外見の観察から27カ月令、30カ月令を老化ラットと定義した。ラットの体重と肝重量を図2-1Aに示した。ラットの体重と肝重量は24カ月令までは非常に増加し、体重は9週令では5週令の約2倍に増加し、24カ月令は9週令の約2倍に増加した。しかし、24カ月令以後には増加はみられなかった。

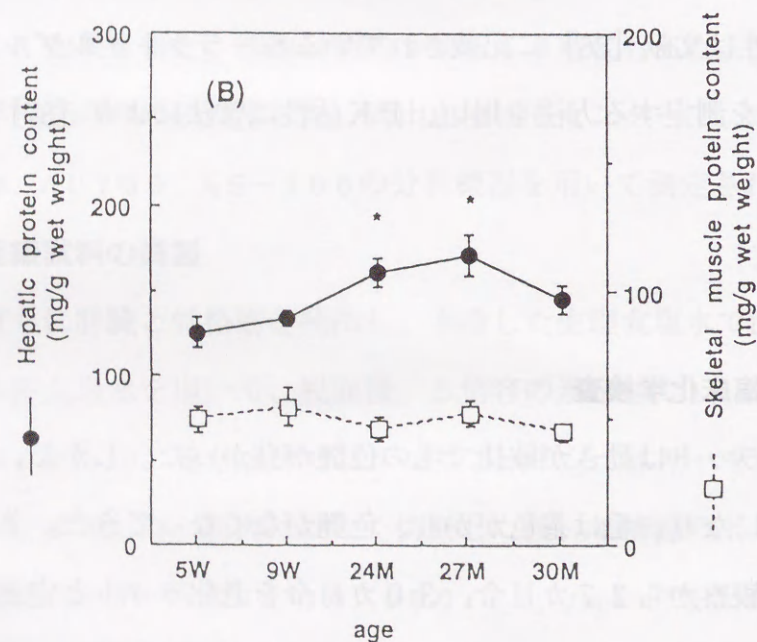
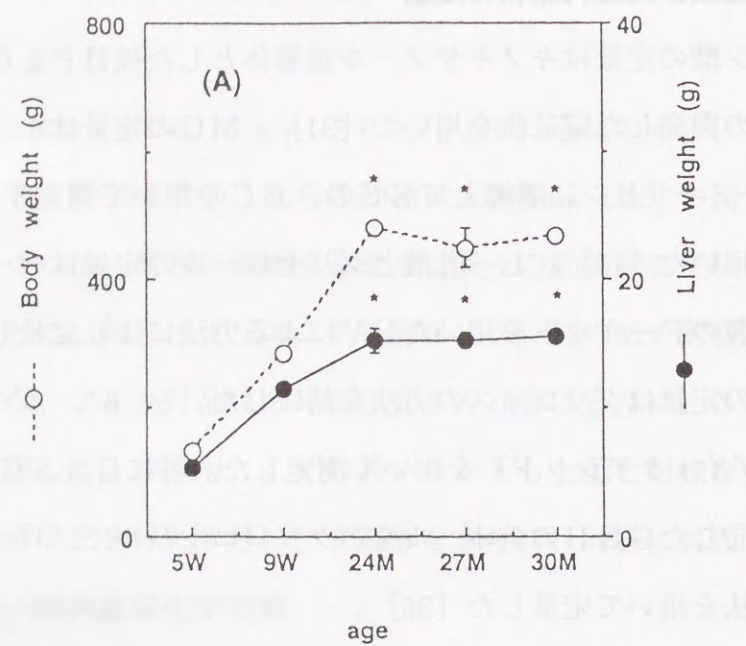


図2-1 (A) Changes in weights of body and liver of rats during aging process ($n = 4-7$). (B) Changes in protein contents of rat liver and skeletal muscle during aging process ($n = 4-7$). * Denotes a significant difference ($P < 0.05$) from the values of both 5 and 9 week-old rats.

ラットの血漿を用いて一般的臨床化学検査を24の項目について行なった。その結果を表2-1に示す。若いラットと老化ラットでは、血糖値、HDL-コレステロール、尿素窒素、クレアチニン及びクレアチニンホスホカイネース活性、アミラーゼ活性に差はみられなかった。一方、5週令ラットと30カ月令ラットを比較したとき、A/G値は56%に、以下同様に、アルブミン(86%)及びアルカリフォスファターゼ活性(25%)、ロイシンアミノペプチダーゼ活性(71%)が減少した。他の血漿パラメータは老化により上昇した。以下()内に5週令と比較したときの30カ月令の上昇倍率を示す。トータルビリルビン(x2.3)、直接ビリルビン(x3.3)、トータルコレステロール(x1.3)、総蛋白(x1.1)、 α_1 -グロブリン(x5.4)、中性脂質(x5.3)、尿酸(x2.0)及び酵素活性ではコリンエステラーゼ(x5.0)、GOT(x1.6)、GPT(x1.9)、 γ -GTP(x2.0)、L-LDH(x2.0)であった。

2. 肝臓と骨格筋の蛋白量

図2-1Bにラット肝臓と骨格筋の蛋白量の変化を示す。肝臓の蛋白濃度は5週令から27カ月令まで徐々に上昇し、それから減少して、30カ月令では5週令や9週令と同じレベルになった。しかし、骨格筋では加齢による変化はなかった。

3. 加齢によるラット組織中のD-乳酸とその関連代謝物

表2-2と表2-3に示すようにラットでは加齢に伴って血漿、肝臓、骨格筋中のD-乳酸は低下した。低下が最も顕著だったのは30カ月令の肝臓で、5週令の時のD-乳酸含量の10%に減少していた。一方、血漿中L-乳酸値は加齢による変化がなかった。ビリルビン酸も血漿中では変化がみられなかったが、肝臓中では有意に減少していた。また、骨格筋中では30カ月令で逆に増加した。血漿中のMGレベルは有意の変化がみられなかったが、肝臓及び骨格筋では加齢により減少していた。

表2-1 Medical parameters in plasma of young and aging rats

	5 weeks (n=5)	9 weeks (n=5)	24 months (n=4)	30 months (n=7)	30 M/5 W
Total bilirubin*	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.01#	0.23 ± 0.02#	2.3
Chole bilirubin*	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.13 ± 0.03#	0.10 ± 0.02#	3.3
GOT**	62 ± 2	57 ± 2	110 ± 14#	102 ± 17#	1.6
GPT**	34 ± 3	36 ± 2	53 ± 8	65 ± 14#	1.9
Ch-E**	1 ± 0	1 ± 0	4 ± 0#	5 ± 0#	5.0
ALP**	1018 ± 61	672 ± 35	315 ± 36#	252 ± 23#	0.248
LDH**	141 ± 10	200 ± 15	295 ± 24#	286 ± 40#	2.0
LAP**	58 ± 1	51 ± 2	42 ± 1#	41 ± 1#	0.707
γ-GTP**	4.0 ± 0.0	1.8 ± 0.5	6.0 ± 2.0	8.0 ± 1.0#	2.0
CPK**	163 ± 36	163 ± 32	165 ± 54	167 ± 53	
Amylase**	4859 ± 332	4356 ± 202	4839 ± 285	3705 ± 138	
Total protein***	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1	6.1 (n=1)	5.9 ± 0.1#	1.1
Albumin***	3.0 ± 0.0	2.6 ± 0.0	2.8 (n=1)	2.5 ± 0.0	
A/G ratio	1.32 ± 0.03	1.03 ± 0.02	0.85 (n=1)	0.74 ± 0.01#	0.561
protein fr. A/G ratio	4.21 ± 0.50	3.56 ± 0.24	2.25 ± 0.40#	2.22 ± 0.10#	0.527
Albumin (%)	80.2 ± 1.6	77.8 ± 1.3	67.0 ± 4.5#	68.7 ± 1.1#	0.857
α ₁ -Globulin (%)	5.8 ± 2.1	22.2 ± 1.3	11.7 ± 3.4#	31.3 ± 1.1#	5.4
Total cholesterol*	88 ± 5	61 ± 4	108 ± 15	112 ± 9#	1.3
Neutral lipid*	25 ± 3	80 ± 8	109 ± 19#	132 ± 28#	5.3
HDL-C*	37 ± 2	32 ± 2	36 ± 2	41 ± 4	
Urea nitrogen*	24.5 ± 2.9	17.8 ± 0.5	20.9 ± 0.9	16.6 ± 1.0	
Uric acid*	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1#	1.0 ± 0.1#	2.0
Creatinine*	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	
Blood glucose	160 ± 7	154 ± 7	124 ± 16	157 ± 6	

*: mg/dl, **: IU, ***: g/dl, #: P < 0.05

表2-2

Plasma levels of D-lactate and its related metabolites in young and aging rats

age	D-Lactate (nmol/ml)	Methylglyoxal (nmol/ml)	L-Lactate (μmol/ml)	Pyruvate (nmol/ml)	Pi (mg/dl)
5 W (n=5)	74.8 ± 8.6	0.28 ± 0.04	2.77 ± 0.31	88.4 ± 1.3	7.5 ± 0.2
9 W (n=5)	72.6 ± 9.0	0.25 ± 0.04	3.44 ± 0.08	80.5 ± 4.4	6.2 ± 0.3
24 M (n=5)	72.7 ± 7.8	0.28 ± 0.05	3.00 ± 0.52	78.5 ± 7.8	3.0 ± 0.3↓
27 M (n=4)	68.5 ± 7.0	0.23 ± 0.04	3.21 ± 0.44	80.9 ± 13.0	4.6 ± 0.3↓
30 M (n=7)	54.4 ± 8.6↓	0.45 ± 0.13	3.27 ± 0.18	97.4 ± 8.8	3.6 ± 0.1↓

Arrow shows significant difference from 5 week-old rats (P < 0.05).

表2-3

Contents of D-lactate and its related metabolites in the liver and skeletal muscle of young and aging rats

Liver	D-Lactate (nmol/mg ^W)	Methylglyoxal (pmol/mg ^W)	Pyruvate (nmol/mg ^W)	Glycerol (nmol/mg ^W)
5 W (n=6)	0.75 ± 0.20	88.8 ± 10.6	0.49 ± 0.10	0.02 ± 0.00
9 W (n=5)	0.43 ± 0.07	51.1 ± 6.4	0.38 ± 0.03	N.D. ^b
24 M (n=5)	0.24 ± 0.05↓	28.4 ± 5.5↓	0.26 ± 0.02↓	0.02 ± 0.00
27 M (n=4)	0.19 ± 0.05↓	29.9 ± 3.6↓	0.24 ± 0.04↓	N.D. ^b
30 M (n=7)	0.079 ± 0.023↓	24.7 ± 3.6↓	0.21 ± 0.02↓	0.03 ± 0.00↑
Skeletal muscle	D-Lactate (nmol/mg ^W)	Methylglyoxal (pmol/mg ^W)	Pyruvate (nmol/mg ^W)	
5 W (n=6)	0.98 ± 0.30	27.5 ± 4.6	0.63 ± 0.04	
9 W (n=5)	0.71 ± 0.35	26.7 ± 5.6	0.61 ± 0.06	
24 M (n=5)	0.83 ± 0.06	24.5 ± 3.3	0.64 ± 0.01	
27 M (n=4)	0.90 ± 0.25	21.0 ± 3.8	0.68 ± 0.12	
30 M (n=7)	0.54 ± 0.081↓	12.7 ± 2.4↓	0.81 ± 0.05↑	

^amg: mg protein.

^bN.D.: not determined.

Arrow shows significant difference from 5 week-old rats (P < 0.05).

4. 加齢によるグリオキサラーゼ I、II 活性と補酵素 GSH レベル

加齢によるラット肝臓中のグリオキサラーゼ I と II 活性及び補酵素 GSH また、PK 活性を表 2-4 に示した。グリオキサラーゼ I と II 活性は加齢とともに、はっきりと低下した。補酵素 GSH の濃度は肝臓中で変化なかった。解糖系の律速酵

表2-4

Changes in activities of glyoxalases and pyruvate kinase and GSH concentration in liver of young and aging rats

Age	Glyoxalase I ($\mu\text{mol}/\text{min}, \text{mg}^{\text{a}}$)	Glyoxalase II ($\text{nmol}/\text{min}, \text{mg}^{\text{a}}$)	GSH ($\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$)	PK ($\mu\text{mol}/\text{min mg}^{\text{a}}$)
5 W (n = 6)	0.134 \pm 0.013	76.2 \pm 7.7	4.92 \pm 0.68	0.130 \pm 0.016
9 W (n = 5)	0.103 \pm 0.006	66.7 \pm 8.0	5.71 \pm 0.28	N.D. ^b
24 M (n = 5)	0.098 \pm 0.015	16.1 \pm 1.1↓	4.96 \pm 0.59	N.D. ^b
27 M (n = 4)	0.055 \pm 0.009↓	15.3 \pm 8.3↓	5.76 \pm 0.76	N.D. ^b
30 M (n = 7)	0.079 \pm 0.008↓	18.6 \pm 1.5↓	4.08 \pm 0.47	0.125 \pm 0.012

^amg: mg protein.

^bN.D.: not determined.

Arrow shows significant difference from 5 week-old rats ($P < 0.05$).

表2-5

Changes in activities of glyoxalases and pyruvate kinase in the skeletal muscle of young and aging rats

Age	Glyoxalase I ($\mu\text{mol}/\text{min}, \text{mg}^{\text{a}}$)	Glyoxalase II ($\text{nmol}/\text{min}, \text{mg}^{\text{a}}$)	GSH ($\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$)	PK ($\mu\text{mol}/\text{min mg}^{\text{a}}$)
5 W (n = 6)	0.405 \pm 0.055	2.79 \pm 0.37	0.96 \pm 0.10	1.79 \pm 0.38
9 W (n = 5)	0.533 \pm 0.063	2.17 \pm 0.48	N.D. ^b	N.D. ^b
24 M (n = 5)	0.406 \pm 0.047	3.91 \pm 0.54	0.68 \pm 0.11	N.D. ^b
27 M (n = 4)	0.464 \pm 0.087	4.42 \pm 1.29	N.D. ^b	N.D. ^b
30 M (n = 7)	0.407 \pm 0.075	7.99 \pm 1.63↑	0.57 \pm 0.05↓	4.87 \pm 0.68↑

^amg: mg protein.

^bN.D.: not determined.

Arrow shows significant difference from 5 week-old rats ($P < 0.05$).

素である PK 活性は 5 週令と 30 カ月令のラット肝臓では変化がなかったが、骨格筋では 5 週令に比べて 30 カ月令で 2.7 倍に活性の上昇がみられた。表 2-5 に加齢によるラット骨格筋中のグリオキサラーゼ I と II 活性及び補酵素 GSH また、PK 活性を示した。

【考察の部】

ラットを用いた加齢と代謝との関連を報告した論文が多く書かれているが、これらの論文は 2 年までで老化と考えているものがある [38, 39, 40, 41]。しかしながら、著者はラットの行動や外見観察や図 2-1 に示した体重、肝重量や肝蛋白濃度を参考にすると 27 カ月令以上でないと老化ラットでないと考えた。

一般に、動物は加齢により血糖値の恒常性維持の機能が低下し、また酸化酵素類の活性が低下すると報告されている [42, 43, 44, 45]。表 2-2 に示すように、老化ラットの血漿中 L-乳酸レベルは変化なかった。他の文献報告でも、ラットの血清中における L-乳酸は 6 カ月令と 26 カ月令とでは変化がないと報告している [46]。また、6 カ月令と 26 カ月令のラット脳中 L-乳酸レベルも変化がないと報告している [40]。

この論文はラットの血漿、肝臓、骨格筋中 D-乳酸レベルと加齢との関係を報告した最初の論文である。これらの体液や組織中の D-乳酸レベルは表 2-2 と表 2-3 に示すように 30 カ月令ラットで低下していた。特に肝臓では老化による D-乳酸レベルの減少が顕著であった。

また、ラットの老化過程の MG レベルの報告もこの論文が最初である。血漿中の MG レベルは表 2-2 に示すように、一定であったが、一方、肝臓と骨格筋では表 2-3 に示すように加齢による減少がみられた。

血漿中のピルビン酸レベルの変化は表 2-2 に示すように有意の差はなかった。しかし、表 2-3 に示すように肝臓中では加齢とともに減少した。また、30 カ月令の骨格筋では増加していた。組織中のピルビン酸レベルと加齢との関係を報

告した文献は少ない。Ferrannini らは若いラット肝臓中では 58 nmol/g 湿重量、年老いたラットでは 109 nmol/g 湿重量と報告している [47]。これらの報告値は我々の値より低い。彼らの報告ではビルビン酸は加齢とともに増加しているが、本論文の報告では減少している。この結果の相違は Ferrannini らは1年齢までのラットで加齢実験を報告しているからである。

PKは解糖系の律速酵素である。もしこの酵素が負の調節を受けるならば三炭糖リン酸はメチルグリオキサールバイパスを通して代謝利用されるかもしれない。この考えから、PK活性の測定を行なった。肝臓中のPK活性は表2-4に示すようにラットの加齢による変化はなかった。しかし、表2-5に示すように骨格筋では30カ月令で上昇していた。Feuers らは2から22カ月までの加齢で、ラット肝臓中PK活性レベルは有意に上昇すると報告している [48]。この報告に対して、Chen らは、制限摂食か、自由な食餌かに関係なく、30カ月令までに、肝臓中のPK活性は有意に低下したと報告している [49]。このように、肝臓中のPK活性の加齢による変動ははっきりしていない。PK活性についてのその他の報告をあげると、Pastoris らは24カ月令ラットの 緋腹筋のPK活性は4カ月令時の29%に減少するが、膝窩筋（ヒラメ筋）では変化がみられなかったと報告している [50]。Chainy と Kanungo は 大脳半球中のPK活性は7週令ラットで最も高く、それから78週令まで減少すると報告している [51]。組織中のGSHレベルの加齢による影響については多くの報告がある。生物学的老化にはフリーラジカルが関与していること、そして、GSHは抗酸化的な防御の働きをもち細胞のラジカルスカベンジャーであることは一般的によく知られている。それ故、一般的にはラット細胞の加齢によってGSHの生産が減少し、結果的に組織のフリーラジカルスカベンジャーとしての働きが低下すると考えられている。肝臓中GSHレベルの加齢による変化については、変化がないと報告した論文 [41, 52, 53]、増加するとした論文 [38]、減少するとした論文 [54] がある。このように組織中のGSHへの加齢の影響はまだ明確ではない。しかしな

がら、ラット肝臓中GSSGレベルは若いラットよりも老化ラットのほうが増加している傾向がある [41, 54]。今回の実験では表2-4に示すように、ラット肝臓中GSHレベルは若い動物と老化動物との間で相違はみられなかった。グリオキサラーゼIはMGのグルタチオンチオヘミアセタールをS-D-ラクタイルグリタチオンへと転換する酵素であり、グリオキサラーゼIIはその産物をD-乳酸とグルタチオンに加水分解する酵素である。これらの酵素は生物に広く分布している。表2-4に示すように両酵素は肝臓中では若いラットに比べて加齢とともに低下していた。

肝臓中のMGレベルとグリオキサラーゼIとII活性はラットの加齢とともに減少し、その結果、肝臓中D-乳酸レベルも減少したと考えられる。マウスを用いたグリオキサラーゼIとII活性の加齢による変化を臓器別（肝臓、脾臓、腎臓）に測定した報告がある [55]。

骨格筋ではMG、D-乳酸及びGSHレベルは30カ月令ラットで有意に減少していたが、ビルビン酸は逆に増加していた。このビルビン酸レベルの増加は骨格筋中PK活性の上昇のためと思われる。

【小括】

加齢によるMG、D-乳酸及び関連代謝物と関連酵素活性の変動のまとめを表2-6に示す。

ラット肝臓及び骨格筋中では加齢によりMG及びD-乳酸含量が減少することが解った。

ラット肝臓中では加齢とともにグリオキサラーゼ系活性の低下がみられ、このためにD-乳酸含量が減少することが解った。

ラット骨格筋中では加齢によりGSH含量が低下し、このためD-乳酸含量が減少することが解った。

これらのことより、ラット肝臓及び骨格筋中では加齢によりMG生合成の低下す

ることが示唆された。

(第1章の研究の一部を、主として Contents of D-lactate and its related metabolites as well as enzyme activities in the liver, muscle and blood plasma of aging rats. Michi Kawase, Chie Kondoh, Shuji Matsumoto, Masaya Teshigawara, Yuki Chisaka, Mitsunori Higashiura, Kunihiko Nakata, Shinji Ohmori *Mech. Ageing Dev.*, 84, 55-63 (1995) に報告した。)

表2-6 加齢によるMG、D-乳酸及び関連代謝物と関連酵素活性の変動

	血漿	肝臓	骨格筋
MG	±	↓ (28%)	↓ (46%)
D-乳酸	↓ (73%)	↓ (10%)	↓ (55%)
グリオキサラーゼI	N. D.	↓ (60%)	±
グリオキサラーゼII	N. D.	↓ (24%)	↑ (x 3)
GSH	N. D.	±	↓ (59%)
L-乳酸	±	↓ (67%)	±
ピルビン酸	±	↓ (43%)	↑ (x 1.3)
PK	N. D.	±	↑ (x 3)
Pi	↓ (50%)	↓ (65%)	±

N. D. : not done, () : 30M vs 5W

第2章 老化過程でのラットの肝臓中グルタチオン生成系について

【緒言】

グルタチオンは細胞に比較的高濃度に存在し、抗酸化の働き、補酵素の働きを持ち、また、解毒の作用も担っている。第1章で述べたグリオキサラーゼ系でも補酵素としてMGからD-乳酸への生成に利用されている。この重要な働きを持つグルタチオンについて、加齢に伴うその生成や代謝の変化については多くの論文で論じられてきた。肝臓はグルタチオン生成や代謝の中心的役割を演じているので、多くの研究は加齢による肝臓のグルタチオンレベルの変化があるかどうかを実験されてきた。しかしながら、ラットに関しては加齢と肝臓グルタチオンレベルの変動に関しては結論がでていない。ある研究者は肝臓GSHレベルは加齢と共に下降したと報告している [54, 56, 57]。一方、ラットではGSHレベルは変化しなかったという報告もある [41, 52, 53]。また、他には加齢の過程でGSHレベルは上昇したと報告したものもある [38]。これらの報告は加齢ラットとして2年令より若いラットを用いている。著者は2年令より若いラットを老化とすることには同意できない。第1章でも示したように2年令のラットは老化ラットではない。この老化の定義の違いが上記の論文結果の混乱のもとになっているのかもしれない。この理由から、ここに報告する実験は30カ月令ラットを用いた。著者は加齢ラットの肝臓中GSHとその構成アミノ酸であり、制限アミノ酸であると思われるシステインの生合成と代謝の関係を新しい定量法と新しい酵素活性測定法を用いて、ここに記述する。

【実験方法の部】

1. 試薬

5, 5'-ジチオビス(2-ニトロベンゾイックアシッド)とN-アセチル-L-システインは和光純薬工業(株)より購入した。酵母の β -NADPHとグルタチオンリダクテースはオリエンタル酵母(株)より購入した。アクリロニトリルは東京化成工業(株)より購入した。GSHは千寿製薬(株)より供与していただいた。パソフェナンスロリンバイスルフォニックアシッドの2Na塩とEDTAは同人化学(株)より購入した。

2. 動物

Fischer (F344/DuCrji SPF/VAF) 系統のアルビノ雄ラットを用い第1章と同様。

3. グルタチオン、システイン及び関連代謝物の定量とシステイン合成酵素活性測定

肝臓中グルタチオンレベルの定量は第1章と同様。システイン(Cys)とシスタチオン(Cys-Cys)はGaitondeの方法によって測定した [58]。シスタチオナーゼ(CTTase)とシスタチオニン β -シンテース(CBS)活性測定は、シスタチオニンが分解されてできる2-ケトブチリックアシッドを2-エチル-2-ヒドロキシ-6, 7-ジメトキシキノキサリンに誘導体化してHPLCにより定量する、著者らの開発した方法により行なった [59]。

【結果の部】

1. 加齢による体重と肝重量の変化

表3-1に各年齢におけるラットの体重と肝重量を示す。ラットの体重は5週令から24カ月令まで増加し、24カ月令から30カ月令までは最高重量のままであった。

2. ラットの加齢による肝臓中GSH、GSSG、Cys及びCys-Cys

ラット肝臓中のGSHとGSSGと加齢の関係を図3-1に示した。肝サイトゾール中のGSHとGSSG濃度は変化がみられなかった。

表3-1

Weight of the body and liver during aging process of rats

age	5w(1.2M)	9w(2.1M)	18M	24M	27M	30M
body weight(g)	126 ± 2	279 ± 8	410 ± 27	474 ± 11	443 ± 30	460 ± 8
liver weight(g)	5.0 ± 0.3	11.2 ± 0.3	14.3 ± 1.3	14.8 ± 1.0	14.9 ± 0.6	15.2 ± 0.5

また、ラット肝臓中のCysとCys-Cys濃度も4日令ラットのCys量を除けば、0.1-0.4 μmol/g肝湿重量の値であり、有意な変化はなかった。

4日令ラットについては後で述べる。

3. ラット肝臓中のCTTaseとCBS活性への加齢による影響

図3-2に示したように、CTTaseとCBS活性は24カ月令まで上昇し、その後減少した。CTTase活性は30カ月令では5週令の時の活性と同じレベルになったが、CBS活性は30カ月令では5週令の時の活性の22%に低下した。

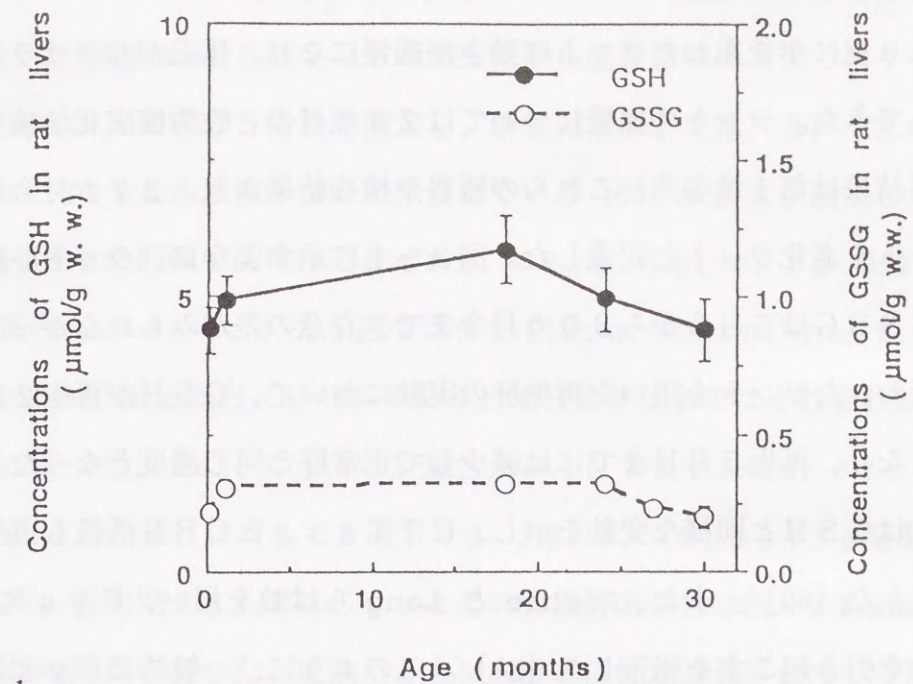


図3-1

Contents of GSH and GSSG of liver during the life span of rat. Concentration of GSH and GSSG in liver were determined as described in the text. Each point and bar are the mean ± S.E.M. of 4-6 F344 rats.

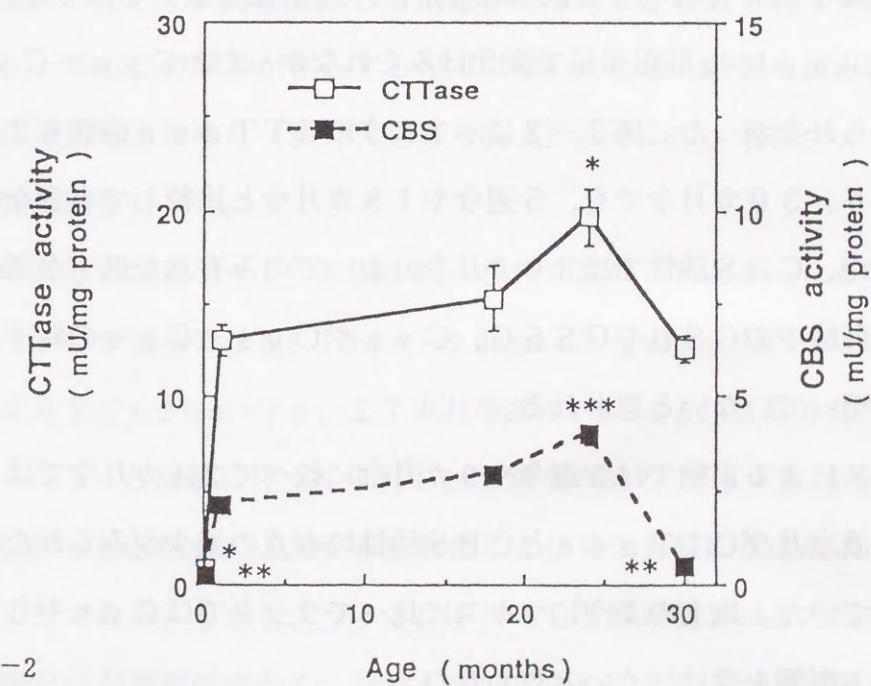


図3-2

Activities of cystathionine γ -lyase and cystathionine β -synthase of rat liver during the life span of rats. Data represent the mean ± S.E.M. (n=4-6) * Indicates values significantly different from those of the 5 week old, 18 month old and 30 month old rats ($P < 0.001$). ** Indicates values significantly different from those of the 5 week old, 18 month old and 24 month old rats ($P < 0.001$). *** Indicates values different from those of the 5 week and 18 month old rats ($P < 0.01$).

【考察の部】

27カ月令より更に年を重ねたラットは動きが緩慢になり、体毛がザラザラして赤茶色がかってきた。ラットの血漿については24項目の一般的臨床化学検査を行なった。(結果は第1章参照)これらの観察や検査結果より、27カ月令以上の年齢のラットを老化ラットと定義した。図3-1に示すように、ラット肝臓中のGSHとGSSGは5日令から30カ月令まで、有意の差がみられなかった。当研究室で行われたラットを用いた再生肝の実験において、GSHが再生2日目に最高濃度となり、再生5日目までには減少して正常肝と同じ濃度となった。この時、CysはGSHと同様な変動を示し、CTTaseとCBS活性も再生肝5日間で上昇した[60]。また、RichieとLangらは蚊を用い、Cys欠乏はGSH欠乏を引き起こすを報告した[61]。このように、一般的にCysはグルタチオン合成の制限アミノ酸であるので、Cysはグルタチオン生成及び含量と関係があると考え、Cys含量やシステイン合成酵素の活性を調べた。Cys含量は生後4日令($0.07 \pm 0.03 \mu\text{mol/g}$ 肝湿重量)を除くと、 $0.31 - 0.41 \mu\text{mol/g}$ 肝湿重量で変化はみられなかった。Cys-Cys含量も変化はみられなかった。図3-2に示すようにCTTase活性も24カ月令で最高となり、30カ月令でも、5週令や18カ月令と比較して有意な低下はなかった。また、CBS活性では30カ月令においてのみ有意な低下が認められたが、まだ、肝臓中のGSHやGSSG、CysやCys-Cysの低下を惹起するまでには至っていないと思われる。

われわれのマウスによる実験では5週令や9カ月令に較べて24カ月令ではGSHとCys濃度及びCTTaseとCBS活性に有意の減少がみられたことと様子が相違していた。以上のようにマウスに比べてラットではCysやGSH含量は老化による影響を受けにくいと思われた。

胎児と新生児のシステイン合成系については、Gaul1らは、CTTase活性はヒトの胎児では肝臓中では活性がみられず、一方CBS活性は存在するので、

この結果として、胎児肝臓中のシスタチオニンが高濃度であると報告している[62]。Kodamaらはラットの新生児から成長までの過程で様々な組織中のCTTaseとCBS活性を測定し、新生児ラットでは、それぞれ成熟ラットの20%と30%しか活性がないと報告している[63]。著者が測定した結果は、4日令ラットの肝臓中活性はそれぞれ 0.79 ± 0.16 、 $0.22 \pm 0.15 \text{mU/mg}$ 蛋白質($n=5$)で、一方5週令ラットでは 13.0 ± 30.57 、 $2.12 \pm 0.24 \text{mU/mg}$ 蛋白質($n=5$)であり、4日令ラットではそれぞれ6%、10%の活性であった。また、Cysの肝臓含量は4日令ラットの $0.07 \pm 0.03 \mu\text{mol/g}$ 湿重量、に対して5週令で $0.39 \pm 0.07 \mu\text{mol/g}$ 湿重量($n=6$)であり、新生児ラットではCysとその合成酵素活性は低く、Kodamaらの報告と同様の結果であった。成熟とともに両酵素活性が誘導されてくる現象は興味深い。

o-アセチル-L-セリンと硫化水素よりCysを合成するシステイン合成酵素(CS)について、酵母ではCS活性があることが報告されている。当研究室ではラットでもこの酵素が存在するのではないかと考え精製を試み、その部分精製とその性質をまとめた(荻野真也修士論文)。そこで、老化ラットについてもその活性測定を行った。

これによると幼若ラットの肝臓中には活性が認められなかったと報告している。5週令から9週令では $380 \pm 50 - 390 \pm 42 \text{pmol/min. mg}$ 蛋白質であり、24カ月令で 620 ± 110 、27カ月令で 710 ± 66 、30カ月令で 1040 ± 30 ($n=5$)と加齢に伴って上昇し、5週令の時の1.6-2.7倍であった。老化に伴うCS活性の上昇がみられたことは発生過程の逆走のようにも思え興味深いことである。しかし、ラットにおけるCS酵素精製はまだ部分精製であり、活性測定法が選択的でなく、活性も非常に弱いことなどから明確な結論は先になるとと思われる。

【小括】
ラット肝臓中ではGSHとGSSG濃度の加齢による変動はないことが解った。
また、CysとCys-Cys濃度についても4日令ラットを除けば、変動がないことが解った。

ラット肝臓中C T T a s e活性は24カ月令で活性が最高となり、その後下降するが30カ月令でも5週令のレベルと同じであった。

CBS活性も24カ月令で活性が最高となり、その後下降して30カ月令では5週令の時より有意に低下した。

(第2章の研究の一部を、主として *Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine-prodrugs*. Kunihiro Nakata, Michi Kawase, Shinya Ogino, Chieko Kinoshita, Hideaki Murata, Takahiro Sakaue, Kazumi Ogata, Shinji Ohmori *Mech. Ageing Dev.*, in press(1996)に報告した。)

第3章 アゾ色素 (MDAB) 投与によるラット肝癌発生過程でのグリオキサラーゼ系について

【緒言】

MGは細胞中の核酸や蛋白質と反応し細胞毒性や変異原性を有している。また反面、それ故に細胞分裂や増殖時の調節の働きをしているともいわれている

[64]。また、MGは腫瘍細胞の呼吸を阻害することが報告されている [65]。これらのことより、グリオキサラーゼIの阻害物質を加えることにより、MGを蓄積させて、癌細胞の増殖を阻止することが検討されている。しかし、癌組織や癌細胞でグリオキサラーゼI、II活性を報告した論文はあるが、MGやD-乳酸の含量や変動を報告したものはない。そこで、ラットの肝臓の発癌物質であるアゾ色素を用いて、*in vivo*で、肝癌組織でのMGやD-乳酸含量を測定し、グリオキサラーゼ系の発癌過程での変動について検討した。

【実験方法の部】

1. 実験動物

ドンリュウ (SPF/VAF) 雄性アルビノラット (5週令) はチャールズリバー日本 (株) より購入した。1週間、研究室の動物室で飼育した後、50匹のラットを2群に分けた。1群は0.064%MDABを含むMF飼料で、もう1群は対照群として、MF飼料のみで飼育した。25℃に室温は保ち、水は自由に摂取させ、MDAB投与後4、8、15及び21週間後の午前9時から10時の間に処理した。

2. 試薬

MGとD-乳酸の定量のための必要な試薬は、第1章を参照。MDABは Giese らの方法 [66] に従って、著者が合成した。それを用いて、0.064%

MDAB含有のMF飼料はオリエンタル酵母（株）が生産した飼料を購入した。

3. 血液試料

ラットからの血液の採取や血漿分離は第1章と同様に行い、血漿中臨床化学的検査も同様に岡山血液検査センターに依頼した。さらに、それらの血漿はMG、D-乳酸、ピルビン酸及びL-乳酸の定量に、また、 γ -GTP活性測定に用いた。

4. MGとD-乳酸及び関連代謝物の定量

第1章に示した方法により、MG、D-乳酸、ピルビン酸、L-乳酸、GSH及びGSSGを定量した。

5. 関連酵素活性測定と蛋白定量

第1章に示した方法により、グリオキサラーゼI及びII活性、PK活性を測定した。蛋白定量はビュレット法により行なった [67]。

【結果の部】

1. 肝癌発生過程のラット体重と肝重量

図4-1に示すようにラットの体重は21週間後で、MDAB群で5週令の時の2.7倍、対照群で3.3倍に、それぞれ増加した。肝重量は21週間後MDAB群で5週令の時の4.3倍、対照群で2.0倍に、それぞれ増加した。この図にみられるように0.064%MDAB含有飼料で飼育したラットの成長は対照群と比べて遅かった。21週間後、MDAB群ラットの肝癌部位は、正常肝から目視により容易に識別できた。しかし、15週間後では肝癌部位は見た目には正常肝と変わらず、識別できなかった。

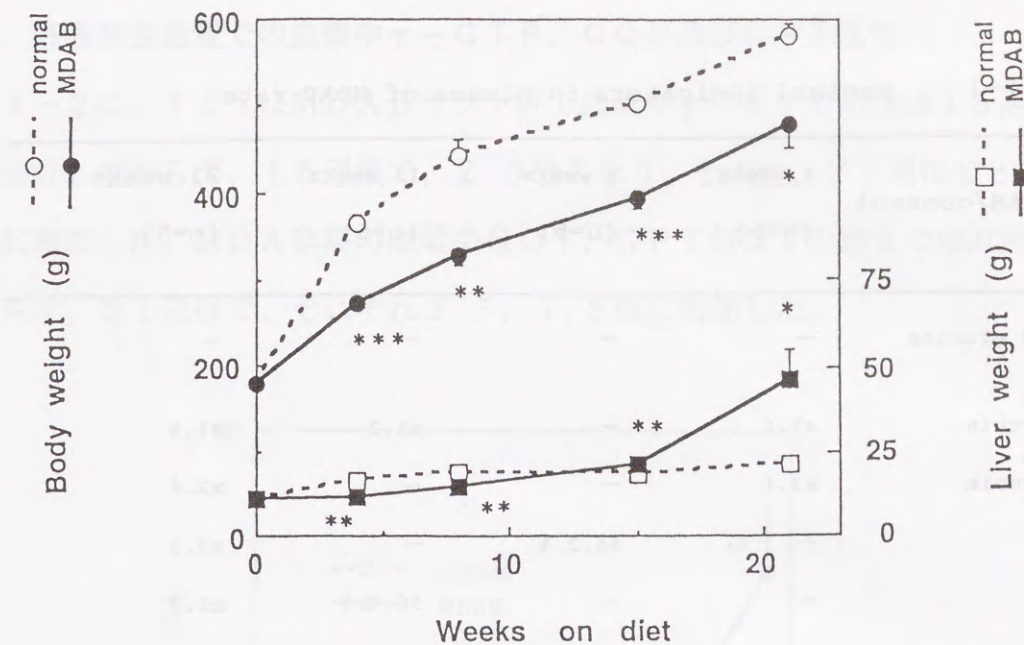


図4-1 Weights of body and liver of male rats fed 0.064% MDAB. Each value represents the mean \pm SE. *, **, *** Means value is different from that of the control group (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, T-test was used).

2. ラット血漿中の一般的臨床化学検査項目

表4-1に示したように、ラット血漿中の一般的臨床化学検査は21項目について検査した。MDAB群と対照群との間に特別な相違のなかった項目は、血糖値、クレアチニン、尿酸及びA/G値であり、酵素類としてはコリンエステラーゼ活性、ロイシンアミノペプチダーゼ、クレアチニンホスホカイネーゼであった。MDAB群で減少した項目はアルカリホスファターゼ活性で、10週後76%、21週後52%に減少していた。尿素窒素も15週後で73%、21週後85%に減少していた。増加していた項目は次の通りで（ ）内に対照群との比率を示す。総コレステロール、15週後（1.7倍）、21週後（2.6倍）；中性脂質、8週後（1.4倍）、21週後（2.2倍）；総ビリルビン、4週後（1.6倍）、15週後（1.2倍）、21週後（1.4倍）；HDL-コレステロール、15週後（1.6倍）、21週後（3.2倍）。また、早い時期に下降して、後の段階で上昇したものは、アミレーゼ活性、総蛋白、アルブミン、L-LDH活性であった。

表4-1 Medical indicators in plasma of MDAB rats

MDAB/control	4 weeks (n=5)	8 weeks (n=5)	15 weeks (n=5)	21 weeks (n=5)
Blood glucose	—	—	—	—
Total bilirubin	x1.6	—	x1.2	x1.4
Chole bilirubin	x3.1	—	—	x2.6
GOT	—	66.2 %	—	x3.5
GPT	—	—	58.7 %	x1.8
γ-GTP	—	—	x2.3	x8.8
Ch-E	—	—	—	—
ALP	—	—	76.3 %	52.0 %
LDH	—	18.9 %	—	x1.8
LAP	—	—	—	—
CPK	—	—	—	—
Amylase	83.6 %	82.3 %	—	x1.4
Total protein	83.0 %	79.7 %	—	x1.2
Albumin	82.5 %	83.3 %	—	x1.3
A/G ratio	—	—	—	—
α ₁ -Globulin	—	—	x1.3	—
Total cholesterol	—	—	x1.7	x2.6
Neutral lipid	—	x1.4	—	x2.2
HDL-C	—	—	x1.6	x3.2
Urea nitrogen	—	—	72.8 %	84.5 %
Uric acid	—	—	—	—
Creatinine	—	—	—	—

T-Test was used: P < 0.05. —: No distinct differences were observed between the MDAB and the control groups.

3. 肝癌発生過程での血漿中γ-GTP、GOP及びGPT活性

図4-2に示すようにMDABラット群で血漿中γ-GTP活性は15週以前は対照群と変わらず、15週後で、2.3倍となり、その後、21週後で8.8倍と急に増加した。MDAB群の血漿中GOT、GPT値は15週までは対照群と変わらず、21週後で、それぞれ3.5、1.8倍に増加した。

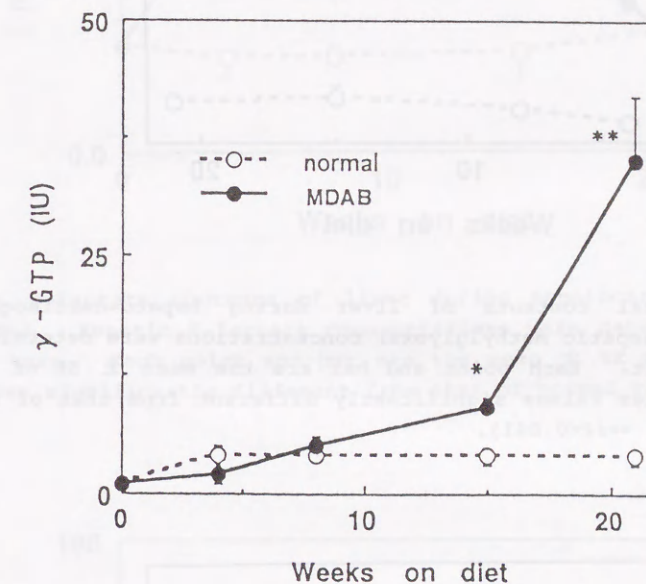


図4-2 The activity of plasma γ-GTP in animals fed MDAB. Each value represents the mean ± SE. *,** Indicates values different from that of the control group (*: P < 0.05, **: P < 0.01).

4. MDABによる肝癌発生過程での肝臓中及び血漿中MGとD-乳酸及びその関連代謝物と酵素活性

図4-3は非常に興味深い結果を示している。MDABラット群の肝臓中のMGレベルは肝癌発生の非常に早い段階からドラマチックに増加していた。肝臓中MGレベルは対照群の7倍であった。一方、図4-4に示すように血漿中MG濃度は対照群と有意の差がなかった。図4-5には肝臓中D-乳酸の変動を示した。最初の15週間はMDAB群で対照群の3倍に増加していた。しかし、21週後には2群で有意の差がみられなくなった。図4-6には血漿中のD-乳酸濃度を示

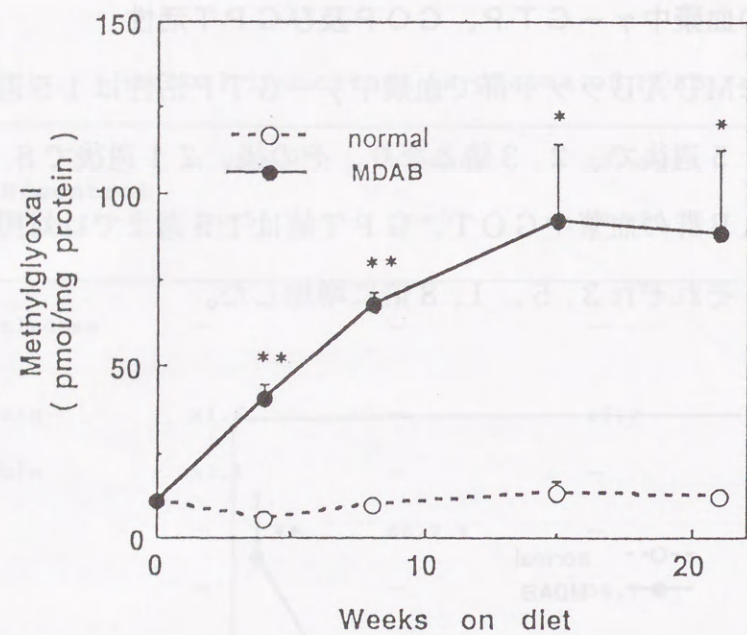


图4-3 Methylglyoxal contents of liver during hepato-carcinogenesis induced with MDAB. Hepatic methylglyoxal concentrations were determined as described in the text. Each point and bar are the mean \pm SE of 5 rat livers. *,** Indicates values significantly different from that of normal rat livers (**: $P<0.01$, **: $P<0.001$).

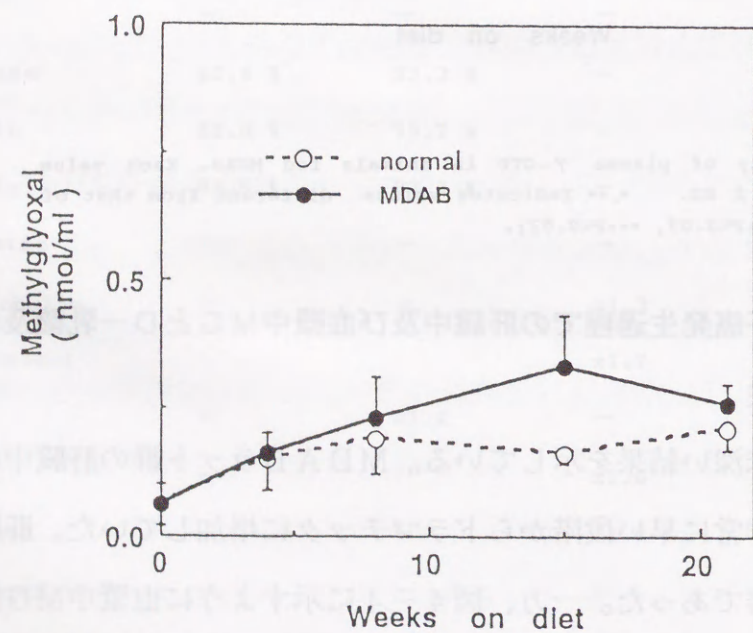


图4-4 Methylglyoxal concentrations in blood plasma during hepatocarcinogenesis induced with MDAB. Methylglyoxal concentrations in blood plasma were determined as described in the text. Each point and bar are the mean \pm SE of 5 rat.

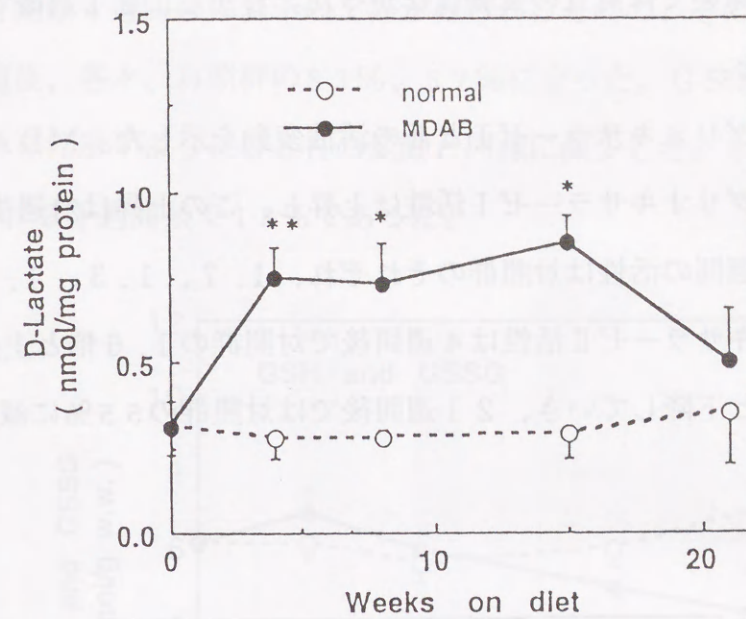


图4-5 D-Lactate contents of liver during hepatocarcinogenesis induced with MDAB. Hepatic D-lactate concentrations were determined as described in the text. Each point and bar are the mean \pm SE of 5 rat livers. * Indicates significantly different from that of normal rats ($P<0.01$).

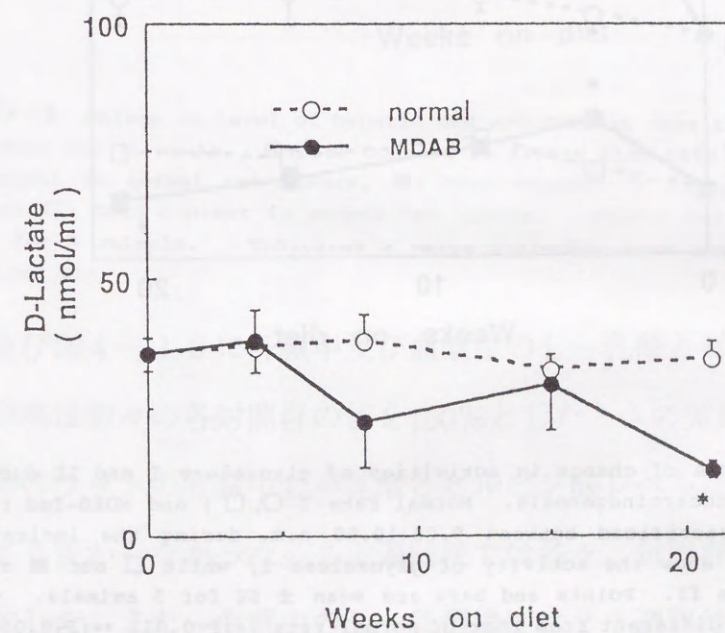


图4-6 D-Lactate concentrations in blood plasma during hepatocarcinogenesis induced with MDAB. D-Lactate concentrations in the blood plasma were determined as described in the text. Each point and bar are the mean \pm SE from 5 rat. * Means different from normal rats ($P<0.001$).

した。21週間後を除いては有意の変動はなかった。しかし、21週間後では対照群の37%に減少した。

図4-7に肝臓中のグリオキサラーゼIとIIの活性変動を示した。MDAB群ラットの4週間後に肝臓グリオキサラーゼI活性は上昇し、この上昇は21週間後まで続いた。4、8、21週間の活性は対照群のそれぞれ、1.7、1.3、1.5倍であった。肝臓グリオキサラーゼII活性は4週間後で対照群の1.6倍と上昇したが、その後だんだんと下降していき、21週間後では対照群の55%に減少した。

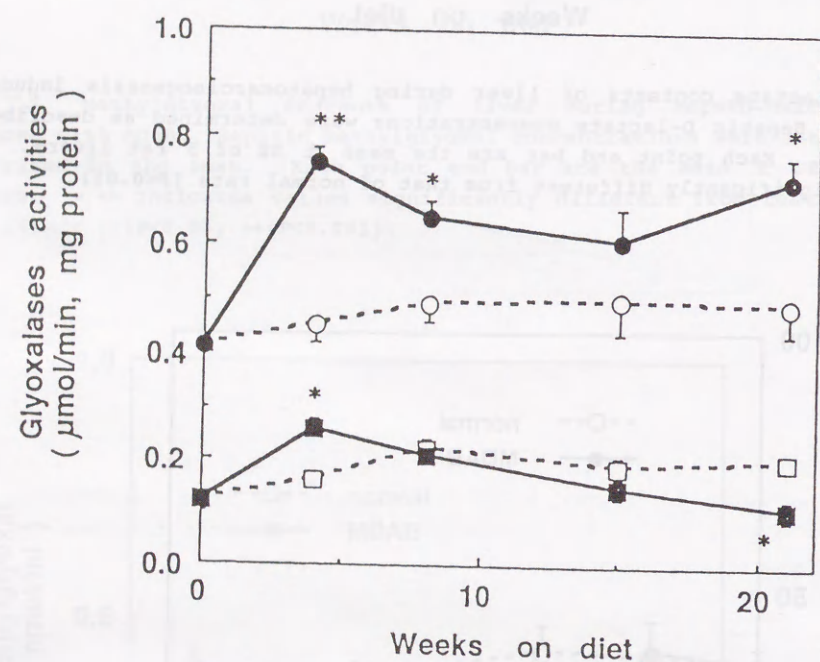


図4-7 Time course of change in activities of glyoxalase I and II during MDAB induced hepatocarcinogenesis. Normal rats (○, □) and MDAB-fed rats (●, ■) were sacrificed between 9.00-10.00 a.m. during the indicated weeks. ○ and ● show the activity of glyoxalase I, while □ and ■ show that of glyoxalase II. Points and bars are mean ± SE for 5 animals. *, ** Indicates values different from that of normal rats (*: P<0.01, **: P<0.001).

MDAB群の肝臓中グルタチオンの変動を図4-8に示す。MDAB群の肝臓中

GSH含量は4週間後に若干の上昇がみられるものの、その後減少し、15週及び21週間後、各々、対照群の83%、57%になった。GSSGの肝臓中レベルは図4-8に示すようにGSHの変動と同様に減少した。15週間後で、対照群の57%、21週間後で13%であった。

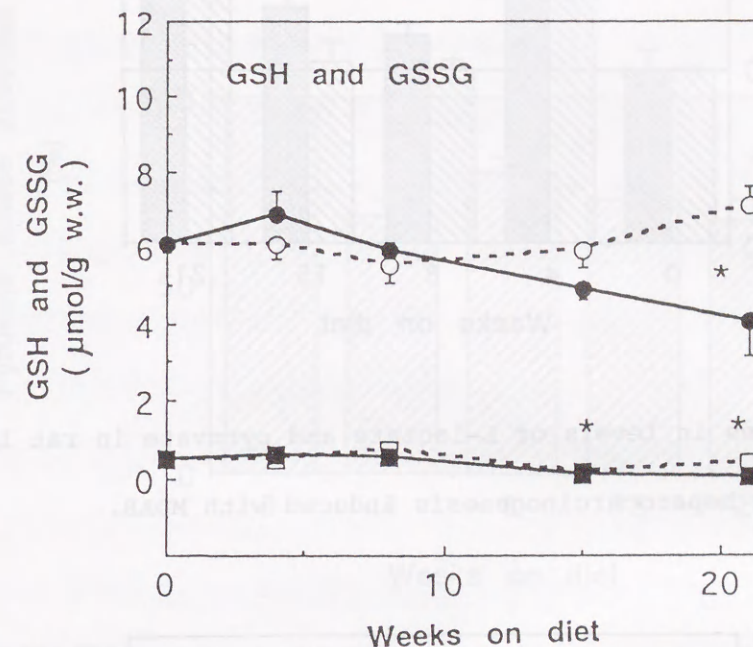


図4-8 Change in level of hepatic GSH and GSSG in rats treated with 0.064% MDAB for 21 weeks. ●: GSH content in livers from rats fed MDAB, ○: GSH content in normal rat livers, ■: GSSG content in livers from rats fed MDAB, □: GSSG content in normal rat livers. Points and bars are mean ± SE for 5 animals. * Indicates a value different from that of normal rats (*: P<0.01).

図4-9及び図4-10に肝臓中及び血漿中のL-乳酸とピルビン酸の変動を示す。各々の図は個々の各対照群の値を100%としたときの%比で表している。

MDAB群のラットの肝臓中L-乳酸とピルビン酸レベルは15週間後までは対照群とあまり変わらなかった。21週間後では各々、対照群の1.8、2.9倍と有意に増加した。また、血漿中のL-乳酸濃度は21週間後、対照群の1.7倍となった。血漿中ピルビン酸濃度は、15週、21週間後に各々2.0、2.2倍に増加した。

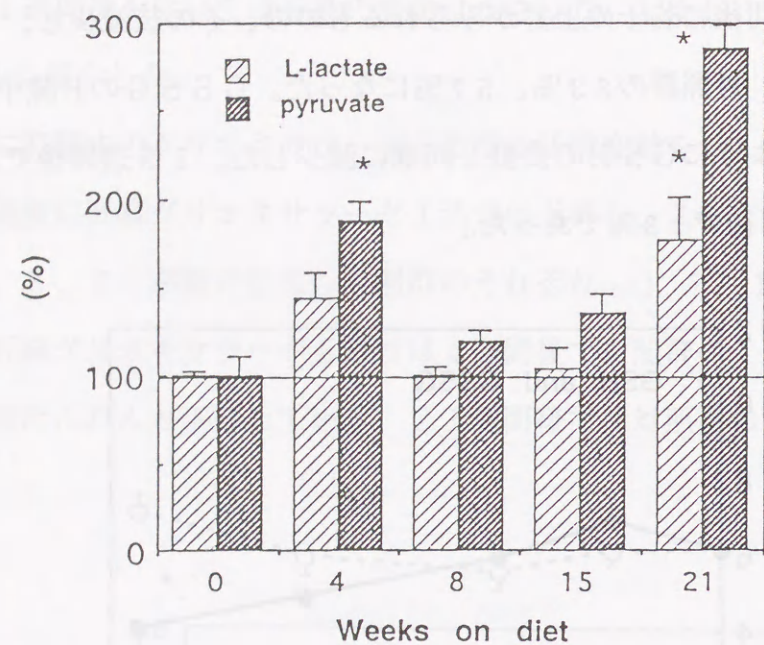


図4-9 Changes in levels of L-lactate and pyruvate in rat liver during hepatocarcinogenesis induced with MDAB.

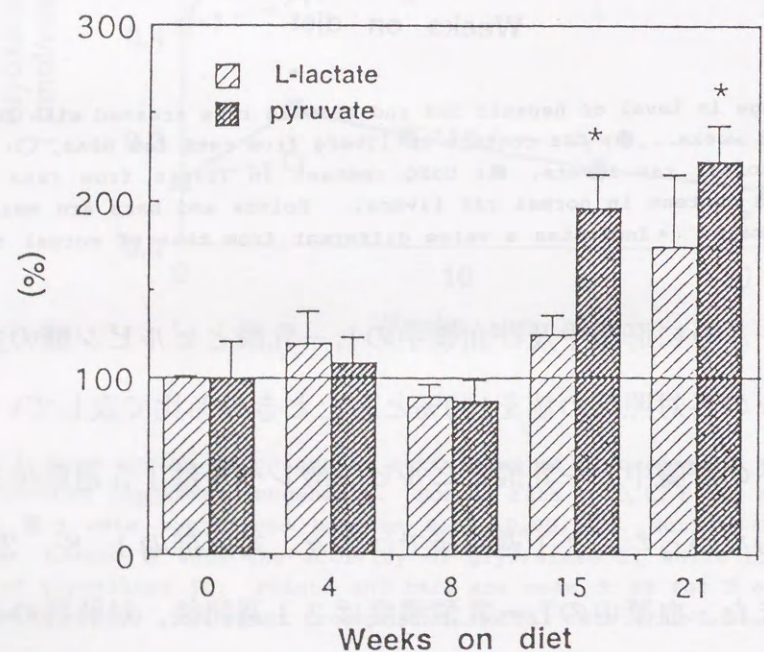


図4-10 Changes in levels of L-lactate and pyruvate in rat blood plasma during hepatocarcinogenesis induced with MDAB.

図4-11に肝臓中PK活性の変動を示す。図4-11に示したように肝臓中PK活性は4から21週間後の全期間で個々の対照群の約70%に活性が低下していた。

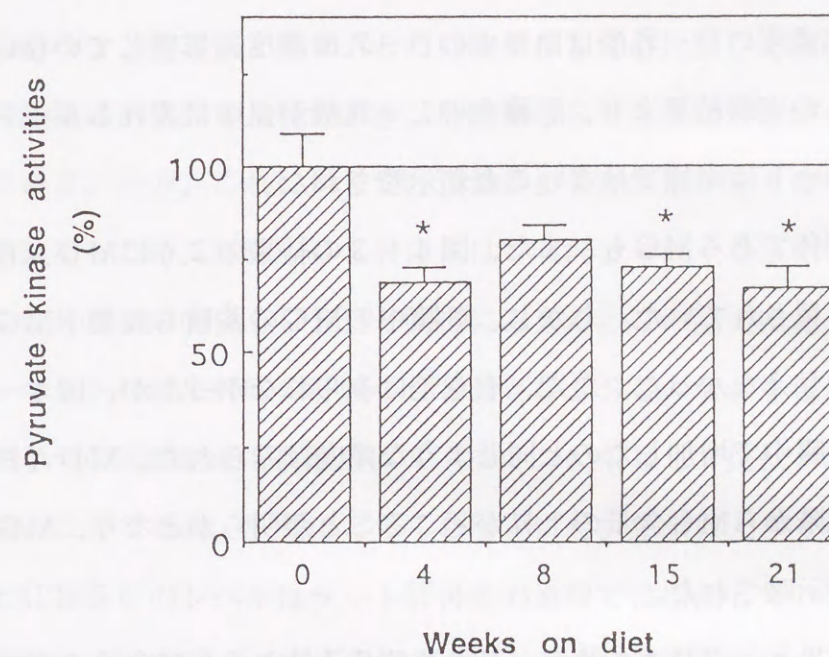


図4-11 Changes in levels of pyruvate kinase activity in rat liver during hepatocarcinogenesis induced with MDAB.

【考察の部】

一般に、癌細胞は細胞成長、増殖と細胞分裂の制御を失っていて、正常細胞よりもグルコースの利用が盛んになり、また、血管系の発達が進まず嫌気的狀態となり、L-乳酸の生成量が高くなる。それ故、今回の実験において肝臓中、血漿中L-乳酸とピルビン酸のレベルを測定した。図4-9及び図4-10に示すように、肝癌が明瞭に形成されてきた時、肝臓中や血漿中のL-乳酸とピルビン酸のレベルは上昇した。

癌組織でのL-乳酸の研究がよくなされている一方で、発癌でのD-乳酸の代謝

研究は行われていない。図4-5に示すようにMDABによるラット肝癌発生過程の肝臓中にはD-乳酸は正常群の約3倍になっていた。血液中のD-乳酸の少なくとも一部は肝臓中D-乳酸から由来するものと思われるが、図4-6に示すようにMDAB処理ラットの血漿中D-乳酸は有意差がなかった。MDABラットの肝臓中の高濃度のD-乳酸は血漿中のD-乳酸濃度に影響していないようにみえる。これらの実験結果より、肝臓中のL-乳酸が血中に流れるルートと、D-乳酸が流れるルートは同様ではないことが示唆された。

D-乳酸の前駆体であるMGも、また、図4-3の結果のようにMDAB群ラットの肝臓中で蓄積されていた。しかし、肝臓中のMGの蓄積も血漿中MGレベルにあまり影響を与えなかった。ただ、有意差はみられなかったが、図4-4の結果のように、肝臓中で増加したのと同じような傾向はみられた。MDABラット肝臓では初期段階からMG含量の上昇が起こることが明らかとなり、MGの生合成系の活性化が示唆された。

さらに、この結果と、グリオキサラーゼI及びII活性とGSH含量の変動を示した図4-7と図4-8の結果より、なぜ、発癌以前の早い時期から、MDAB処理ラットの肝臓中のD-乳酸が上昇するか説明できる。図4-8に示すように肝臓中GSH量が充分存在する状態で、図4-7に示すようにグリオキサラーゼI及びII活性は前癌段階で上昇しているため、D-乳酸の生産が増長された。そして、肝臓が癌であると容易に認識できる時（今回の実験では肝実質細胞と肝癌細胞とを厳密明瞭には分画せずに肝癌組織として用いた）、グリオキサラーゼI活性は上昇したままであったが、GSHレベルやグリオキサラーゼII活性が下降し、従って、肝臓中のMG含量は増加のままで、一方、D-乳酸量は減少した。しかし、その時でもD-乳酸は対照群と同じ含量であった。

ここで、MDABの直接毒性の結果としてMGやD-乳酸の生成が上昇するのかが問題となってくる。図4-2に示すように、4週間後の血漿中 γ -GTP活性は正常群と同じのままであり、8週間後でも同様であった。MDAB

群ラットの血漿中GOTとGPT活性も15週間後まで正常群と同じかむしろ低いぐらいであった。これらの結果より、通常の飼料中に含有の0.064%のMDABは早い段階では肝機能に大きな影響は与えてなく、この時の肝臓は肝障害状態ではないと思われる。

図4-1のラット肝重量と図4-8の肝臓中GSHを比較したとき、MDAB群ラットの肝臓は正常群より軽いとき、肝臓中GSH含量は対照群より増加しているようである。一方、これに対して、正常群より肝重量が重くなってきた、いわゆる肝癌になった時、肝臓中GSH含量は対照群より低くなっている。肝重量と肝臓中GSSG量の関係もGSHと同様にみえる。この論文に先立って、当研究室では、ラットの再生肝時の肝臓中GSHとGSSGの変動を報告した[60]。これらの2つの実験結果を肝臓中グルタチオンに着目して比較することは、非常に興味深いことである。肝臓はどちらの場合にも、急激に大きくなっているが、GSHとGSSGのレベルはラット肝再生の過程では増加している。一方、MDAB群ラット肝臓中では肝重量の増加とともに減少している。21週間後の肝臓中GSHレベルが減少していた時、 γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)活性は明確に下降していた。次の章でMDABによるラットの肝癌発生過程中的グルタチオンとシステインの代謝について述べることにする。肝臓中GSHに対するMDAB投与の影響については3つの論文報告がある。成熟雄性アルビノラットにMDABを1回腹腔内投与した後、24時間後に殺し、肝臓中のGSHレベルを測定すると、対照群と比べ、これらのラットは肝臓中のGSHレベルが高くなっていたと報告している[68]。また、MDABより弱い発癌作用である4'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼンの投与では肝臓中GSHレベルの増加はあまり多くなかったと報告し、更に発癌作用のないアゾ色素である、2-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼンでは正常群より肝臓中GSHレベルは低くなってくると報告している[69]。GSH増加を誘導するMDABの量はラット体重100g当り8.25mg色素量までは投与量に依存すると報告し

ている [70]。これらの測定は1回の腹腔内投与の後でなされている。従って、これらの実験結果は、著者の今回の報告の図4-8における4週間後までと同じような状態であると思われる。

次にメチルグリオキサール経路と腫瘍細胞の成長との関係について述べてみる。MGは、化学的に反応性に富んでいて [71, 72, 73, 74]、それ故、細胞毒性があり [75, 76] また、変異原性物質である [77, 78]。それにもかかわらず、常に殆どの生体中の細胞内で産生される。しかしながら、MGは常に毒性であるばかりとは限らず、細胞分裂を制御している [64, 79]、また、その働きのために、抗腫瘍の役割を持っている [80, 81] と、報告されている。

特にグリオキサラーゼ I と II 活性について報告が多い。Jerzykowski らは4-ジメチルアミノアゾベンゼン (DAB) を与えて飼育したラット肝臓中のグリオキサラーゼ I と II 活性は初期段階 (5週間まで) は上昇し、それから、対照群の約60%に下降すると報告している [81]。これらの結果は著者の結果とよく似ている。しかし、著者の実験ではグリオキサラーゼ I 活性は発癌過程の間ずっと対照群より高いままであった。1975年、彼らのグループは2-3の動物腫瘍でグリオキサラーゼ II 活性が全くないか、あるいは低いと報告した [82]。Winter らは肉腫や白血病を患っているマウスの肝臓中グリオキサラーゼ I と II 活性は腫瘍が大きくなるのと平行して、強く低下すると報告した [83]。Ayoub らはヒトの普通細胞3種類と腫瘍細胞28種類でグリオキサラーゼ I と II 活性を測定した。この2つの細胞種間ではグリオキサラーゼ I と II 活性の有意な相違はみられなかったと報告している [84]。メチルグリオキサール経路と腫瘍形成の間の関連についての研究は多く報告されている。1993年Thornalley もこの問題について研究報告している [31] が、メチルグリオキサール経路を全ての発癌で説明し評価することはまだ行われていない。

最後にMGやD-乳酸等の肝臓中上昇がみられるのはMDAB発癌過程だけなのかどうか、他の肝癌では、また、肝炎ではどうなのか、興味のあるところである。

この問題を検討するため、著者は、現在、可逆的急性肝障害ラットのモデルとして、四塩化炭素を投与したラットを用いてグリオキサラーゼ系の変動を調べている。2回行った実験では、四塩化炭素1回腹腔内投与後24時間後の肝臓中MGは3-10倍に上昇した。肝臓中D-乳酸は上昇傾向であったが、有意差がなかった。肝臓中グリオキサラーゼ I と II 活性はそれぞれ75、35%に低下していた。血漿中MGは上昇傾向がみられたが、有意差はなかった。血漿中D-乳酸も有意差がなかった。以上、更に肝炎において時間的変化を加味した実験を検討した上で比較したいと考えている。また、最近の肝炎実験の際、肝臓試料の前処理調製に液体窒素を用いた場合、肝臓中MGは、同一試料にもかかわらず、四塩化炭素群で約66%に逆に減少しているという結果が得られた。つまり、MGの含量の増加蓄積ではなくて、MGの生成速度の増大している可能性を示している。しかし、逆に液体窒素処理によるMG生成に関係した酵素等の失活も考えられる。このことは、MDABの実験も含めて検討しなければならなくなってくるかもしれない。

また、反応性の高いMGが肝臓中に多く生成しているにもかかわらず、血漿中には反映されていないならば、更に、MGと蛋白やアミノ酸などの反応生成物を血漿中あるいは尿中に同定定量し、確認する事も今後の課題となる。

【小括】

発癌過程でのMG、D-乳酸及び関連代謝物と関連酵素活性の変動のまとめを表4-2に示す。

前癌状態より肝臓中MGとD-乳酸含量が増加することが解った。

また、前癌状態ではグリオキサラーゼ系が活性化することが解った。

これらのことから、前癌状態からMGの生合成が活性化していることが示唆された。

表4-2 発癌過程でのMG、D-乳酸及び関連代謝物と関連酵素活性の変動

	前癌		発癌	
	肝臓	血漿	肝臓	血漿
肝重量	↓ (80%)	N.D.	↑ (x2)	N.D.
GOT	N.D.	±	N.D.	↑ (x3.5)
GPT	N.D.	±	N.D.	↑ (x1.8)
γ-GTP	N.D.	±	N.D.	↑ (x8.8)
MG	↑ (x7)	±	↑ (x7)	±
D-乳酸	↑ (x3)	±	±	↓ (37%)
グリオキサラーゼI	↑ (x1.7)	N.D.	↑ (x1.7)	N.D.
グリオキサラーゼII	↑ (x1.6)	N.D.	↓ (55%)	N.D.
GSH	±	N.D.	↓ (57%)	N.D.
L-乳酸	±	±	↑ (x1.8)	↑ (x1.7)
ビルビン酸	±	±	↑ (x2.9)	↑ (x2.2)
PK	↓ (70%)	N.D.	↓ (70%)	N.D.

N.D. : not done, () : MDAB vs control

(第3章の研究の一部を、主として Changes in concentrations of methylglyoxal and D-lactate, as well as glyoxalase activities in livers and plasma of rats fed a 3'-methyl-4-dimethylaminoazo-benzene-rich diet. Michi Kawase, Midori Tada, Shinsuke Akagi, Shinji Ohmori *Res. Exp. Med.*, in press(1996).に報告した。)

【図の表式解読】

第4章 アゾ色素 (MDAB) 投与によるラット肝癌発生過程でのグルタチオン生成系について

【緒言】

生物細胞はいつも、外部からの毒性物質や酸素ラジカルや放射線に曝されているが、グルタチオンはそれらからの保護を担っている。また、グリオキサラーゼ系の補酵素でもあることから、今回は、アゾ色素 (MDAB) 投与による、その中間代謝物等による蛋白質やDNAのアルキル化やヒドロキシラジカル化反応等により、肝臓がダメージを受ける過程での、GSHの生合成系及びGSHの構成アミノ酸の1つであるCysの生合成系について検討した。この章ではアゾ色素 (MDAB) 投与によるラット肝癌発生過程でのGSHとCys含量、及び γ -GCS、グルタチオン合成酵素 (GSHS) 活性とCBS、CTTase活性の変動について報告する。

【実験方法の部】

1. 試薬

グルタチオン (GSH、GSSG) の定量のための試薬は第1章を参照されたい。Cys、Cys-Cysの定量のための試薬及びCTTase、CBS活性測定のための試薬は第2章を参照されたい。CS活性測定のため、*o*-アセチル-L-セリン、酸性ニンヒドリン、ピリドキサル-5'-リン酸は和光純薬工業から、また、 γ -GCS、GSHS活性測定に用いる為のATPはSigma Chemical- (株) から購入した。

2. 実験動物

第3章で述べたMDAB処理のドンリュウラットを実験動物として用いた。

3. グルタチオン及びシステインの関連酵素活性測定

GSH生合成酵素である γ -GCSとGSHSの活性測定を行なった。 γ -

GCSの酵素活性測定は、基質には、L-グルタミン酸とL-システインは酸化しやすい為、代わりに、 α -アミノブチリックアシッドを用い、反応の結果生じるADPを定量するFouréとMeisterの方法にて行った [85]。また、GSHSの酵素活性は基質にL-グルタミル-L-システインとグリシンを用いて反応の結果生じるADPを定量するMeisterの方法にて行った [86]。CS活性測定はYamagataらの方法 [87] を一部改良して行った。すなわち、反応溶液が含量1mlになるように、*o*-アセチル-L-セリン (終濃度5mM)、ピリドキサル-5'-リン酸 (0.2mM)、リン酸カリウム緩衝液pH8.0 (100mM) 及び酵素調製液 (9,000xg, 上清) を加えて、30℃で5分間ブレインキュベーションした。次に1mMになるようにH₂S溶液を加え、30℃で10分間インキュベーションした後、生成するL-システインをGaitondeの方法により、酸性ニンヒドリン試薬を用いて定量した [58]。

4. グルタチオン及びシステインの定量

第1章に示した方法によりGSH及びGSSGを測定した。Cys及びCys-Cysは第2章に示した方法により測定した。

【結果の部】

1. MDAB肝癌発生過程でのグルタチオン生合成酵素活性

第3章でMDAB肝癌発生過程でのGSHとGSSGの変動を検討したが、その生合成酵素である γ -GCSとGSHS活性を測定した。ラット肝臓中GSHSの活性は図5-1に示すようにMDAB投与後、初期4週間後では対照群と有意差はなかった。しかし、8週後3倍に、15週後4倍に活性が上昇した。そして、21週後には対照群と変わらないか、むしろ低くなっていた。GSHSの活性は対照群で、 $1.07 \pm 0.50 \sim 3.04 \pm 0.81 \text{ nmol/min/mg 蛋白}$ であったが、MDAB投与15週後では、 $10.40 \pm 2.03 \text{ nmol/min/mg 蛋白}$ で最高値であった。

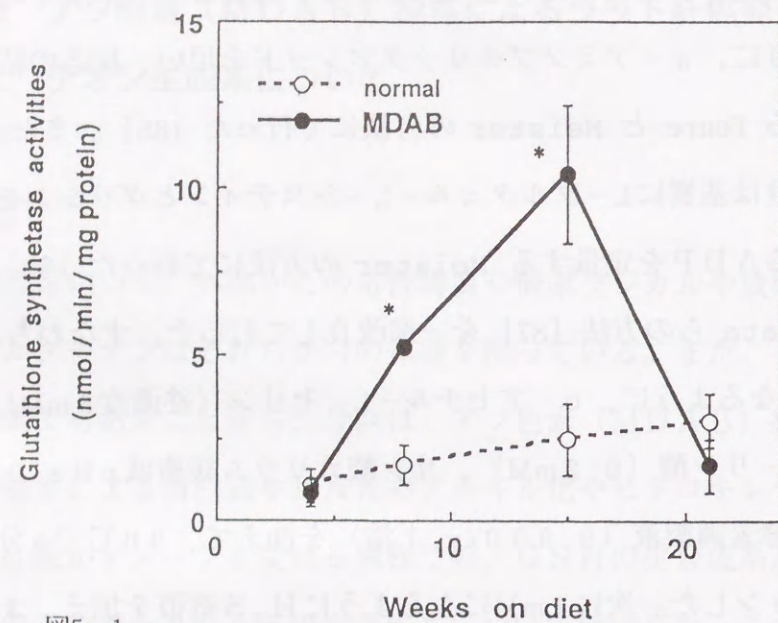


図5-1 GSHS activity in liver from rat fed MDAB.

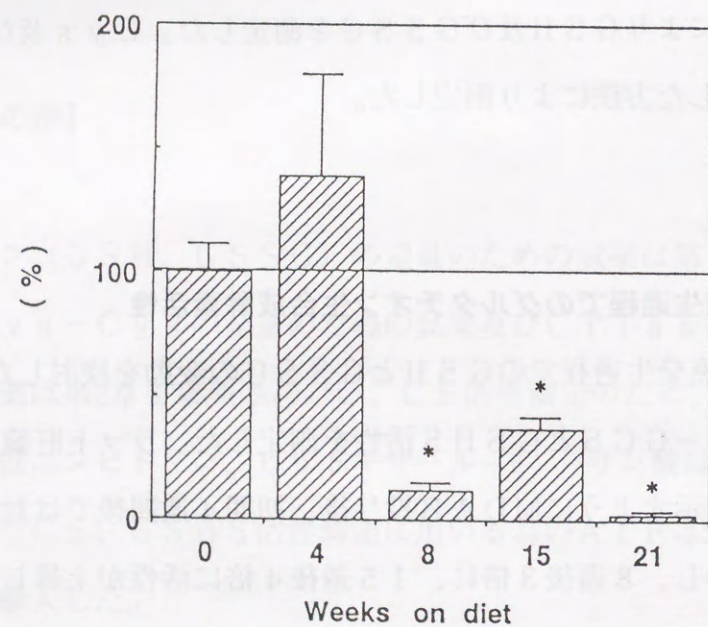


図5-2 gamma-GCS activity in liver from rat fed MDAB.

図5-2には対照群の肝臓中 γ -GCS活性を100%とした時のMDAB投与群の活性比を示している。初期4週間後は、有意差はなかったが、上昇傾向(1.4倍)がみられた。しかし8週目以後は有意な活性低下がみられ、それぞれ対照群の、8週後12.3%、15週後36.9%、21週後2.2%であった。対照群の γ -GCS活性は約3.08~9.66 nmol/min/mg蛋白であった。

2. MDAB肝癌発生過程でのCys及びCys-Cys
 グルタチオンの構成アミノ酸であるCysとその酸化型ジスルフィドであるCys-Cysの測定を行なった。MDAB投与ラットと対照ラットの肝臓中Cys及びCys-Cys含量の変化を図5-3に示した。前癌状態の4週間後から対照群のそれぞれ2.4倍、8週間後2.8倍、15週間後3.7倍、21週間後4倍とMDAB群でCys量の増加がみられた。15週が最高値で $1.96 \pm 0.06 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であった。Cys-Cysは15週間後まで有意差がなく、対照群では $0.02 \sim 0.05 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であった。

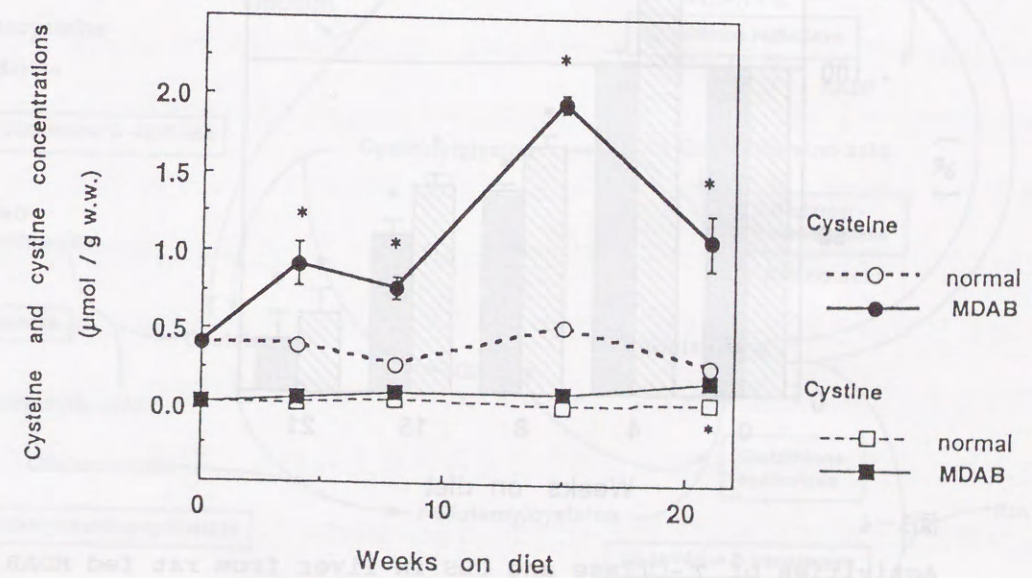


図5-3 Contents of Cys and Cys-Cys in liver from rat fed MDAB.

3. MDAB肝癌発生過程でのシステイン生成酵素活性

CBS、CTTase及びCS活性を測定した。図5-4にCBS及びCTTase活性の変動を示した。CBS活性は対照群と比べて8週間後より有意に減少し、21週間後では対照群 $2.12 \pm 0.24 \text{ nmol/min/mg}$ 蛋白の16.5%になった。CTTase活性は4週間後に有意に1.3倍に上昇し、その後、8週間以降はCBS活性と同じように減少し、21週間後では対照群 $30.2 \pm 2.4 \text{ nmol/min/mg}$ 蛋白の24.0%になった。

図5-5にo-アセチル-L-セリンと H_2S を基質にしてCysを生成するCS活性の変動の結果を示した。対照群で $64 \sim 140 \text{ pmol/min/mg}$ 蛋白の活性がみられた。MDAB群では図5-5に示されたように8週で軽い有意な活性の低下がみられたが、21週間後では対照群に比べて3.8倍に活性上昇した。

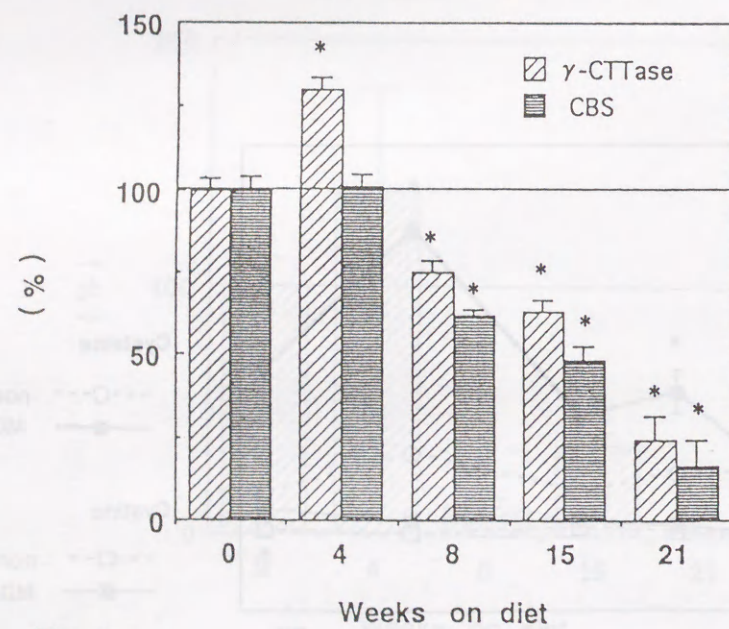


図5-4 Activities of γ -CTTase and CBS in liver from rat fed MDAB.

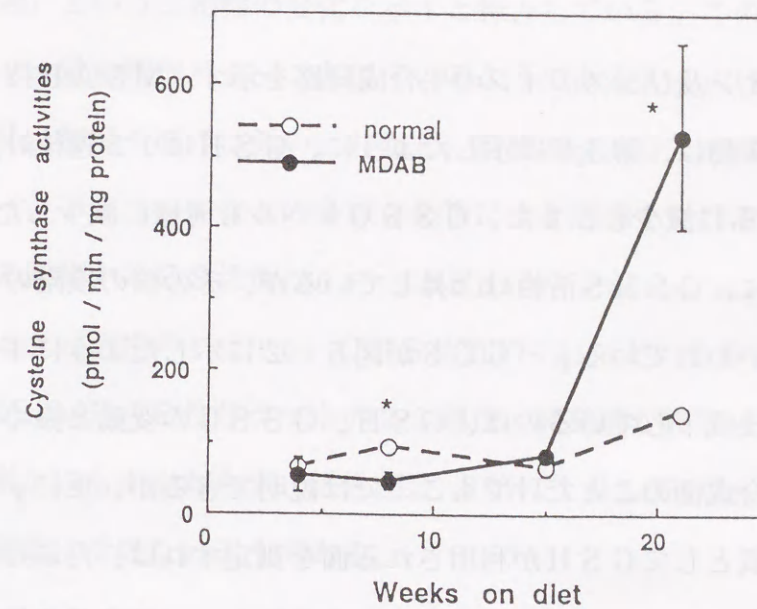


図5-5 CS activity in liver from rat fed MDAB.

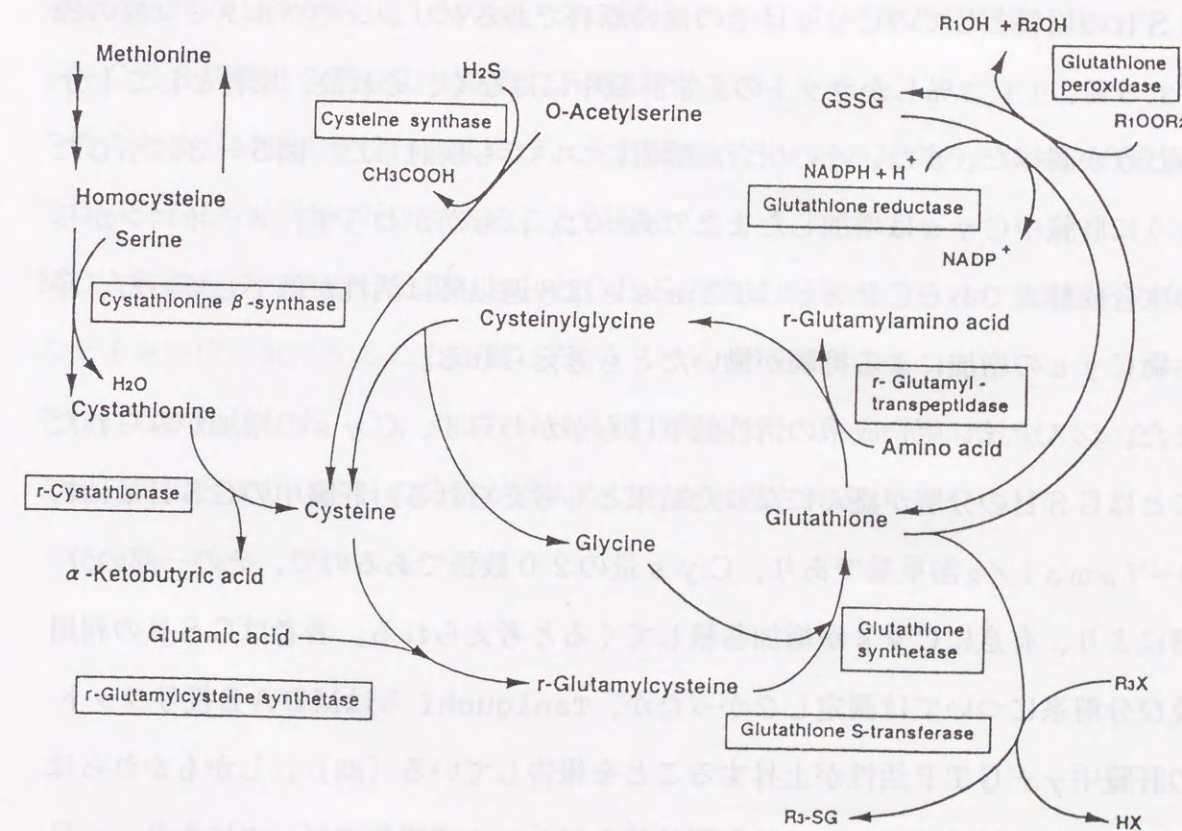


図5-6 Biosynthesis and metabolism of cysteine and glutathione

【考察の部】

図5-6にグルタチオン及びシステインの生合成経路を示す。MDAB投与ラットの肝臓中GSHの変動は、第3章に示したように、GSHは15週後対照群の83%、21週後57%に減少し、また、GSSGレベルも同様に減少した。図5-1に示したように、GSHS活性は上昇しているが、その前の段階のGSH生合成の律速酵素といわれている γ -GCSが図5-2に示したように4週後に少し高くなり、その後低下しているのは、GSH、GSSGの変動と良く一致している。GSHの生合成面のことだけでもここでは説明できるが、更に γ -GTPやGSTの基質としてGSHが利用される面を測定すれば、たぶん、盛んに解毒の為に利用され、消費されていると思われるので、 γ -GCS活性が殆どみられない21週後でも、GSHが57%に保たれていることは恒常性の面で興味深い。

GSHの原料としてのCysはその他の原料であるグリシンやグルタミン酸の約13.5%、11.3%しかラットの正常肝臓中にはなく、それ故、原料として十分かどうか調べた。また、その生合成酵素についても検討した。図5-3に示したように肝臓中Cysは増加したままであった。にもかかわらず、メチオニンからの生合成酵素であるCBSとCTTaseは8週以降は活性が低下していた。産生物Cysの増加による抑制が働いたとも考えられる。

また、システイン生合成系の活性低下にもかかわらず、Cysの増加がみられたことはGSHの分解が盛んになった結果とも考えられる。肝臓中のGSH量は約 $6\sim 7\mu\text{mol/g}$ 湿重量であり、Cys量の20数倍であるので、その一部の分解により、有意にCysが増加蓄積してくると思われる。著者はGSHの利用及び分解系については測定しなかったが、TaniguchiらはMDAB投与ラットの肝臓中 γ -GTP活性が上昇することを報告している[88]。しかもかれらは肝 γ -GTP活性はMDAB投与開始後上昇し、4週間後でピークになり、一旦下降し、それでも対照群より高く活性が保たれて、再びさらに上昇する(10か

ら18週)という二相性の変化を示すと報告している。このことは著者の今回報告のCys量の増加パターンと似ているようである。 γ -GTP活性は腎臓、膵臓で高く、肝臓や脳では低い。しかし、肝臓の γ -GTPは癌原物質、発癌プロモーター、アルコールなどの多様な薬物により誘導を受ける。

対照群の肝臓中のCS活性は $64\sim 140\text{pmol/min/mg}$ 蛋白の活性とCTTase活性の $1/216$ 、CBS活性の $1/15$ という非常に弱い活性の酵素であるが、MDAB投与ラットの21週後、肝発癌が顕著のとき、産生物のCys増加にもかかわらず、活性が3.8倍に上昇していた。この酵素はCysによる調節は受けにくいようである。

【小括】

MDAB投与ラットの肝臓中GSHS活性は投与後4週後は変化なく、8、15週後で活性の上昇があり、その後、21週後では再び対照群と差がなくなった。 γ -GCS活性は8週後より顕著に下降した。

このことよりMDAB投与によるラット肝臓中GSH量の減少の一因は、合成面では γ -GCS活性の低下であることが解った。

MDAB投与ラットのCTTaseとCBS活性は下降し、メチオニンからのシステイン合成が低下することが解った。

それにもかかわらず、Cysは投与後4週以降ずっと2~4倍に増加していた。これらのことよりGSHの分解が盛んなことが示唆される。

総括

【I】 老化過程：加齢・老化を、長い間有毒物質や外部物質に曝されることによる修復不可能な現象としてとらえた場合、グリオキサラーゼ系活性とGSH含量の変動について、ラットを用いて生化学的研究を行なった。5、9週令、24、27、30カ月令のラット血漿、肝臓及び骨格筋中の関連酵素活性と関連代謝物を測定し、以下のことが解った。(1) 老化ラットの肝臓中MG、D-乳酸が非常に低下した。30カ月令のMGは5週令の28%、D-乳酸は10%であった。(2) 肝臓中グリオキサラーゼIとII活性は非常に低下した。30カ月令では5週令の時の活性の60%と24%であった。(3) 肝臓中のGSH含量は変化なかった。(4) 血漿中D-乳酸レベルは低下した。30カ月令では5週令の時の73%であった。一方、L-乳酸とピルビン酸レベルは変化なかった。(5) 30カ月令の骨格筋中MG、D-乳酸含量は5週令の時の1/2に低下した。(6) しかし、骨格筋中グリオキサラーゼI活性は変化なくII活性は3倍に上昇した。(7) 肝臓中ピルビン酸含量は43%に低下したが、骨格筋中では1.3倍に上昇した。(8) 肝臓中PK活性は変化なく、骨格筋中では逆に3倍に上昇した。

以上、老化ラットの肝臓中ではグリオキサラーゼIとII酵素活性低下のためにMGの代謝とD-乳酸の生成が低下することが解った。しかし、MGの代謝低下にもかかわらず、MGの蓄積はなく、逆に低下していることからMG生成も低下していることが示唆される。骨格筋ではグリオキサラーゼIとII酵素活性の低下していないにもかかわらずMG、D-乳酸量が低下したことは、更にMG生成の低下が起こっていることが示唆される。

老化ラットのGSH合成についての結果は(a) 肝臓中GSH含量と同様に、GSSG、Cys及びCys-Cysは有意の変化はみられなかった。

(b) CTTaseとCBSの両酵素活性は、ラットが成熟するにつれて増加していき、24カ月令で最高となった。そして、30カ月令まで両酵素活性は低下

していき、それでも5週令のレベルと同じであった。

【II】 発癌過程：グリオキサラーゼ系の生理的意義を細胞分裂・増殖の調節に積極的に関与しているという考えのもとに、癌細胞のような細胞分裂・増殖の異常な状態となる肝癌発生過程のこの系について検討した。ドンリュウ雄性ラットを0.064%のアゾ色素(MDAB)を含有するMF飼料で飼育した。対照群はMF飼料で飼育した。4、8、15及び21週間後にそれぞれ血漿、肝臓中のMGとD-乳酸及びその関連酵素活性と関連代謝物を測定した。その結果以下のことが解った。

(1) MDAB群の肝重量は15週間後までは対照群より低いか同じであったが、21週間後で2倍になり、この時全ラットに肉眼で肝癌が認められた。(2) 血漿中GOT、GPT活性は15週間後までは対照群より低いか同じであったが、21週間後で3.5と1.8倍になった。 γ -GTP活性は4及び8週間後は変化なく15週間後で2.3倍、21週間後で8.8倍になった。(3) 4週間後、肝臓中MGとD-乳酸含量は対照群の約7倍と3倍に増加した。その後も増加したままであった。(4) 肝臓中グリオキサラーゼI活性は肝癌発生過程中对照群の1.2-1.7倍と上昇したままであった。一方グリオキサラーゼII活性は前癌状態の4週間後では対照群の1.6倍に上昇したが、21週間後では55%に下降した。(5) 肝臓中GSH含量は4-15週まで変化がみられなかったが、21週間後には57%に減少した。(6) 肝癌が確認されるようになった時ピルビン酸とL-乳酸レベルは肝臓中と血漿中で増加した。

以上、注目すべきはMDAB投与ラットで、前癌状態より肝臓中のMGとD-乳酸含量が増加する現象である。肝グリオキサラーゼI及びII活性が上昇しGSH含量も充分存在する状態で、MGとD-乳酸含量が早期より増加したままであるということは、MGの生合成が非常に上昇していることを示唆する。癌の生化学的特徴である、解糖系のピルビン酸とL-乳酸含量の増加は肝癌で認められるが、それらがまだ増加していない時期にMGの生合成の上昇及び蓄積がみられることは、MGが癌の増殖阻止をしているのではないと思われる。MGは細胞呼吸の

阻害や細胞増殖の抑制を起こすといわれている。この研究からグリオキサラーゼ I の阻害剤を投与すれば、前癌状態の細胞を制御することが期待できる。次にMDABラットのGSH生合成系について検討した結果、以下のことが解った。(a) GSHS活性は8週間後で3倍、15週間後で4倍に上昇した。 γ -GCS活性は逆に8-21週間後で36.9-2.2%に下降した。(b) 肝中Cysは4-21週間後の全てで2-4倍に増加した。(c) しかしCTTaseもCBSも8-21週間後で75-17%に活性が低下した。(d) CS活性は、CBSの約1/4と活性は弱いだが、21週間後で対照群の4倍に上昇した。以上、MDAB投与によるラット肝中GSH量減少の一因は γ -GCS活性の低下であることが解った。

引用文献

- [1] C. Neuberg, Weitere Untersuchungen über die biochemische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure nebst Bemerkungen über die Entstehung der verschiedenen Milchsäuren in der Natur. *Biochem. Z.*, 51(1913)484-508.
- [2] H.D. Dakin, H.W. Dudley, On glyoxalase. *J. Biol. Chem.*, 14(1913)423-431.
- [3] C. Neuberg and M. Kobel, Die desmolytische Bildung von Methylglyoxal durch Hefenzym. *Biochem. Z.*, 203(1928)463-468.
- [4] C. Neuberg and M. Kobel, Über den Kohlenhydratstoffwechsel der höheren Pflanzen. *Biochem. Z.*, 229(1930)433-442.
- [5] M. Vogt, Bildung und Isolierung von Methylglyoxal bei der Glykolyse durch tierisches Enzym. *Biochem. Z.*, 211(1929)17-39.
- [6] K. Lohmann, Beitrag zur enzymatischen Umwandlung von synthetischem Methylglyoxal in Milchsäure. *Biochem. Z.*, 332(1932)333-354.
- [7] O. Meyerhof and K. Lohmann, Über die enzymatische Gleichgewichtsreaktion zwischen Hexosediphosphorsäure und Dioxyacetonphosphorsäure. *Biochem. Z.*, 271(1934)89-110.
- [8] G. Embden, H. Deuticke and G. Kraft, Über die intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. *Klin. Wochenschn.*, 12(1933)213-215.
- [9] E. Racker, The mechanism of action of glyoxalase. *J. Biol. Chem.*, 190(1951)685-696.

- [10] S. Ohmori, M. Mori, M. Kawase and S. Tsuboi, Determination of methylglyoxal as 2-methylquinoxaline by high-performance liquid chromatography and its application to biological samples. *J. Chromatogr.*, 414(1987)149-155.
- [11] S. Ohmori, M. Kawase, M. Mori and T. Hirota, Simple and sensitive determination of methylglyoxal in biological samples by gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr.*, 415(1987)221-229.
- [12] L.P. Milligan and R.L. Baldwin, The conversion of acetoacetate to pyruvaldehyde. *J. Biol. Chem.*, 242(1967)1095-1101.
- [13] S. Ohmori, M. Mori, K. Shiraha and M. Kawase, Biosynthesis and degradation of methylglyoxal in animals. In: Weiner H, and Flynn T.G. (eds.), *Progress in clinical and biological research*, vol. 290. *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism*, 2, Alan R Liss, New York pp. 397-412(1989).
- [14] J.P. Casazza, M.E. Felver and R.L. Veech, The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.*, 259(1984)231-236.
- [15] J.M. Argilés, Has acetone a role in the conversion of fat to carbohydrate in mammals? *Trends Biochem. Sci.*, 11(1986) 61-63.
- [16] B.R. Landau and H. Brunengraber, The role of acetone in the conversion of fat to carbohydrate. *Trends Biochem. Sci.*, 12(1987)113-114.
- [17] K.D. Gibson, W.G. Laver and A. Neuberger, Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. *Biochem. J.*, 70(1958)71-80.

- [18] M.I. Bird, P.B. Nunn and L.A.J. Lord, Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 802(1984)229-236.
- [19] M. Ray and S. Ray, L-Threonine dehydrogenase from goat liver. *J. Biol. Chem.*, 260(1985)5913-5918.
- [20] W.H. Elliott, Aminoacetone: its isolation and role in metabolism. *Nature*, 183(1959)1051-1052.
- [21] A. Neuberger and G.H. Tait, Production of aminoacetone by *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem. J.*, 84(1962)317-328.
- [22] M.L. Green and J.B. Lewis, The oxidation of aminoacetone by a species of *Arthrobacter*. *Biochem. J.*, 106(1968)267-270.
- [23] S. Ray and M. Ray, Formation of methylglyoxal from aminoacetone by amine oxidase from goat plasma. *J. Biol. Chem.*, 258(1983) 3461-3462.
- [24] M. Ray and S. Ray, Aminoacetone oxidase from goat liver. *J. Biol. Chem.*, 262(1987)5974-5977.
- [25] R.A. Cooper and A. Anderson, The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 11(1970)273-276.
- [26] E. Grazi and G. Trombetta, A new intermediate of the aldolase reaction, the pyruvaldehyde-aldolase-orthophosphate complex. *Biochem. J.*, 175(1978)361-365.
- [27] A. Bonsignore, G. Leoncini, A. Siri and D. Ricci, Kinetic behavior of glyceraldehyde 3-phosphate conversion into methylglyoxal. *Ital. J. Biochem.*, 22(1973)131-140.
- [28] Y. Kondoh, M. Kawase, M. Hirata and S. Ohmori, Carbon

- sources for D-lactate formation in rat liver. *J. Biochem.*, 115(1994)590-595.
- [29] Y. Kondoh, M. Kawase and S. Ohmori, D-Lactate concentrations in blood, urine and sweat before and after exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 65(1992)88-93.
- [30] Y. Kondoh, M. Kawase, Y. Kawakami and S. Ohmori, Concentration of D-lactate and its related metabolic intermediates in liver, blood and muscle of diabetic and starved rats. *Res. Exp. Med.*, 192(1992)407-414.
- [31] P.J. Thornalley, The glyoxalase system in health and disease. *Molec. Aspects. Med.*, 14(1993)288-371.
- [32] S.A. Phillips, D. Mirrlees and P.J. Thornalley, Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Pharmacol.*, 46(1993)805-811.
- [33] M.W. Kellum, B. Oray and S.J. Norton, A convenient quantitative synthesis of methylglyoxal for glyoxalase I assays. *Anal. Biochem.*, 85(1978):586-590.
- [34] S. Ohmori and T. Iwamoto, Sensitive determination of D-lactic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 431(1988)239-247.
- [35] S. Matsumoto, S. Tesigawara S. Tsuboi, S. Ohmori, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples using acrylonitrile as a thiol-blocking reagent. *Anal. Scie.*, 12(1996)91-95.
- [36] E. Racker, Glyoxalases. In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 1, Academic Press, New York, 1955, pp. 454-460.
- [37] W.N. Valentine and K.R. Tanaka, Pyruvate kinase, clinical aspects. In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, vol.9. Academic Press, New York, 1966. pp. 468-473.
- [38] A. Fischer-Nielsen, H.E. Poulsen, B.A. Hansen, N. Tygstrup and S. Keiding, Age dependence of rat liver function measurements. *J. Hepatol.*, 9(1989)190-197.
- [39] T. Jullien, F. Cand, C. Fargier, and J. Verdetti, Age-dependent differences in energetic status electrical and mechanical performance of rat myocardium. *Mech. Ageing Dev.*, 48(1989) 243-254.
- [40] T. Aureli, A. Miccheli, R. Ricciolini, M.E.D. Cocco, M.T. Ramacci, L. Angelucci, O. Ghirardi and F. Conti, Aging brain: Effect of acetyl-L-carnitine treatment on rat brain energy and phospholipid metabolism. A study by ^{31}P and ^1H NMR spectroscopy. *Brain Res.*, 526(1990)108-112.
- [41] J. Sastre, J.V. Rodriguez, F.V. Pallardo, E. Gasco, M. Asensi, J.V. Ferrer, J. Miquel and J. Vina, Effect of aging on metabolic zonation in rat liver: Acinar distribution of GSH metabolism. *Mech. Ageing Dev.*, 62(1992)181-190.
- [42] M. Ermini, I. Szélenyi, P. Moser and F. Verzár, The ageing of skeletal (striated) muscle by changes of recovery metabolism. *Gerontologia*, 17(1971)300-311.
- [43] A. Bass, E. Gutmann and V. Hanzlíková, Biochemical and histochemical changes in energy supply — enzyme pattern of

- muscles of the rat during old age. *Gerontologia*, 21(1975):31-45.
- [44] R.A. Defronzo, Glucose intolerance and aging. *Diabetes*, 28(1979)1095-1101.
- [45] M.B. Davidson, The effect of aging on carbohydrate metabolism: A review of the english literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. *Metab. Clin. Exp.*, 28(1979)688-705.
- [46] L.M. Larkin, B.A. Horwitz and R.B. McDonald, Effect of cold on serum substrate and glycogen concentration in young and old Fischer 344 rats. *Exp. Gerontol.*, 27(1992)179-190.
- [47] E. Ferrannini, A. Lanfranchi, F. Rohner-Jeanrenaud, G. Manfredini and G. Van de Werve, Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metab. Clin. Exp.*, 39(1990)1082-1088.
- [48] R.J. Feuers, P.H. Duffy, J.A. Leakey, A. Turturro, R.A. Mittelstaedt and R.W. Hart, Effect of chronic caloric restriction on hepatic enzymes of intermediary metabolism in the male fischer 344 rat. *Mech. Ageing Dev.*, 48(1989)179-189.
- [49] L.H. Chen, T.L. Huang and D.L. Synder, Effects of moderate dietary restriction and age on blood parameters and metabolic enzymes in Lobund-Wistar rats. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 16(1993)69-80.
- [50] O. Pastoris, L. Vercesi and M. Dossena, Effects of

- hypoxia and pharmacological treatment of enzyme activities in skeletal muscle of rats of different ages. *Exp. Gerontol.*, 26(1991)77-87.
- [51] G.B.N. Chainy and M.S. Kanungo, Sex and age dependent response of pyruvate kinase of the brain of the rat to estradiol and testosterone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 72(1976)777-781.
- [52] G. Barja de Quiroga, R. Pérez-Campo and M. López Torres, Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem. J.*, 272(1990)247-250.
- [53] L.E. Rikans and Y. Cai, Diquat-induced oxidative damage in BCNU-pretreated hepatocytes of mature and old rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118 (1993)263-270.
- [54] L.A. Videla, V. Fernandez and A. Valenzuela, Age-dependent changes in rat liver lipid peroxidation and glutathione content induced by acute ethanol ingestion. *Cell Biochem. Funct.*, 5(1987)273-280.
- [55] R. Sharma-Luthra and R.K. Kale, Age related changes in the activity of the glyoxalase system. *Mech. Ageing Dev.*, 73 (1994)39-45.
- [56] G.A. Hazelton and C.A. Lang, Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem. J.*, 188(1980)25-30.
- [57] S. Laganier and B.P. Yu, Effect of chronic food restriction in aging rats II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes. *Mech. Ageing Dev.*, 48(1989)221-230.
- [58] M.K. Gaitonde, A spectrophotometric method for the direct

- determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.*, 104(1967)627-633.
- [59] S. Ohmori, K. Nakata, K. Nishihara, S. Yamamoto, M. Kawase and S. Tsuboi, Sensitive determination of cystathionine and assays for cystathionine β - and γ -lyase, as well as cystathionine β -synthase, using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 574(1992)35-40.
- [60] M. Teshigawara, S. Matsumoto, S. Tsuboi and S. Ohmori, Changes in levels of glutathione and related compounds and activities of glutathione-related enzymes during rat liver regeneration. *Res. Exp. Med.*, 195(1995)55-60.
- [61] J.P. Richie and C.A. Lang, A decrease in cysteine levels causes the glutathione deficiency of aging in the mosquito. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 187(1988)235-240.
- [62] G. Gaull, J.A. Sturman and N.C.R. Ráihá, Development of mammalian sulfur metabolism: Absence of cystathionase in human fetal tissues. *Pediatr. Res.*, 6(1972)538-547.
- [63] S. Awata, K. Nakayama, H. Mikasa and H. Kodama, Activities of cystathionine-related enzymes in tissues of growing rats. *Sulfur Amino Acids*, 7(1984)407-410.
- [64] L.G. Együd and A. Szent-Györgyi, On the regulation of cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56(1966)203-207.
- [65] M. Ray, J. Halder, S.K. Dutta and S. Ray, Inhibition of respiration of tumor cells by methylglyoxal and protection of inhibition by lactaldehyde. *Int. J. Cancer*, 47(1991)603-609.

- [66] J.E. Giese, J.A. Miller and C.A. Baumann, The carcinogenicity of *m'*-methyl-*p*-dimethylaminoazobenzene and of *p*-monomethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, 5(1945)337-340.
- [67] G. Beisenherz, H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt and G. Pfleiderer, Biuret Methode zur Proteinbestimmung. *Z. Naturforsch.*, 8b(1953)555-577.
- [68] W.J.P. Neish and A. Rylett, Effect of α -tocopheryl acetate on liver glutathione of male rats injected with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Biochem. Pharmacol.*, 12(1963)1147-1150.
- [69] W.J.P. Neish and A. Rylett, Azo dyes and rat liver glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, 12(1963)893-903.
- [70] W.J.P. Neish, H.M. Davies and P.M. Reeve, Carcinogenic azo dyes, dye-binding and liver glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, 13(1964)1291-1303.
- [71] A.L. Weber, Formation of the thioester, N-acetyl, S-lactoylcysteine, by reaction of N-acetylcysteine with pyruvaldehyde in aqueous solution. *J. Mol. Evol.*, 18(1982)354-359.
- [72] K. Takahashi, The reactions of phenylglyoxal and related reagents with amino acids. *J. Biochem.*, 81(1977)395-402.
- [73] L. Wlodek and M. Wróbel, Effect of aldehydes on free sulfhydryl groups and glycolysis in extracts of Ehrlich ascites tumor cells and mouse liver. *Neoplasma*, 39(1992)223-228.

- [74] T.W.C. Lo, M.E. Westwood, A.C. McLellan, T. Selwood and P.J. Thornalley, Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, 269(1994)32299-32305.
- [75] J.F. Scaife, Mitotic inhibition induced in human kidney cells by methylglyoxal and kethoxal. *Experientia*, 25(1969)178-179.
- [76] N. Krymkiewicz, E. Diéguez, U.D. Rekarte and N. Zwaig, Properties and mode of action of a bactericidal compound (= methylglyoxal) produced by a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 108(1971)1338-1347.
- [77] T. Yamaguchi, Mutagenicity of trioses and methylglyoxal on *Salmonella typhimurium*. *Agric. Biol. Chem.*, 46(1982)849-851.
- [78] H. Kasai, K. Kumeno, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, M. Nagao, Y. Fujita, T. Sugimura, H. Nukaya and T. Kosuge, Mutagenicity of methylglyoxal in coffee. *Gann*, 73(1982)681-683.
- [79] L.G. Együd and A. Szent-Györgyi, Cell division, SH, ketoaldehydes, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55(1966)388-393.
- [80] T. Jerzykowski, W. Matuszewski, N. Otrzonsek and R. Winter, Antineoplastic action of methylglyoxal. *Neoplasma*, 17(1970)25-35.
- [81] T. Jerzykowski, W. Matuszewski and R. Winter, Glyoxalase system enzyme activity in the liver of rats fed dimethylaminoazobenzene. *Neoplasma*, 21(1974)679-683.
- [82] T. Jerzykowski, R. Winter, W. Matuszewski and Z. Szczurek,

- Glyoxalase II activity in tumours. *Experientia*, 31(1975)32-33.
- [83] R. Winter, D. Piskorska and T. Jerzykowski, Further studies on liver glyoxalase I and glyoxalase II. Activity in mice bearing sarcoma 180 and L1210 leukemia. *Neoplasma*, 25(1978)465-470.
- [84] F. Ayoub, M. Zaman, P. Thornalley and J. Masters, Glyoxalase activities in human tumour cell lines *in vitro*. *Anticancer Res.*, 13(1993)151-156.
- [85] G. Foure and A. Meister, (1985) in *Methods in Enzymology* (A. Meister (ed.)) vol. 113, pp. 379-390. Academic Press, New York.
- [86] A. Meister, (1985) in *Methods in Enzymology* (A. Meister, (ed.)) vol. 113, pp. 393-399. Academic Press, New York.
- [87] S. Yamagata, K. Takeshima and N. Naiki, *J Biochem.*, 75 (1974)1221-1229.
- [88] N. Taniguchi, N. Yokosawa, S. Iizuka, Y. Sako, Y. Tsukada, M. Sato and K. Dempo, γ -Glutamyl transpeptidase of rat liver and hepatoma tissues: an enzyme immunoassay and immunostaining studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 417(1983)203-212.

謝 辞

稿を終えるにあたって、終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、岡山大学薬学部 大森晋爾教授に深甚なる謝意を表します。

また、終始御指導、御助言、御協力を賜りました、岡山大学薬学部 坪井誠二助教授、大塚正人助手に深く謝意を表します。

更に、多大な御指導、御助言、御協力を賜りました、岡山大学医療技術短期大学部 廣田和弘教授、岡山県立大学保健福祉学部 池田己喜子教授に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究を進める上で多くの御協力をして頂いた岡山大学薬学部生理化学教室員一同と卒業生、修了生の皆様に心より深く感謝致します。

