

肝組織糖代謝律速酵素活性の肝疾患における 変動とその臨床的意義について

岡山大学医学部第一内科学教室

島 村 淳之輔

(昭和61年11月18日受稿)

Key words : 糖代謝律速酵素, 肝疾患,
肝組織, 主成分分析

緒 言

ラットの実験的障害肝における糖代謝律速酵素活性を測定し, 障害肝では肝に特異的なGlucose 6-phosphatase (G 6 Pase), glucokinase (GK), fructose-1, 6-bisphosphatase (FBPase), 肝型pyruvate kinase (PK-L)の酵素活性が減少し, 逆に肝に非特異的なhexokinase (HK), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G 6 PD), prototype PK (PK-M₂)の酵素活性が増加することを明らかにし, これと同様の肝酵素活性の変化が, ヒトの急性肝炎, 慢性肝炎および肝硬変例の肝組織でもみられることを報告してきた²⁾. このような障害肝で未分化な酵素偏倚がみられることは, 硬変肝が肝細胞癌の発生母地となっていることと関連し, 前癌病変としての意味を含め重要な研究課題と考えられている³⁾. 今回ヒトの障害肝における未分化酵素偏倚の意義を明らかにする目的で, 諸種肝疾患での血液生化学による肝機能検査とこれら肝組織における酵素活性の変動を対比し, 相関分析および主成分分析により検討を加えた.

対象と方法

1. 対象

生検肝組織は腹腔鏡下または手術時に, 対照 (CONT) 11例, ウイルス性急性肝炎黄疸期 (AH (ict)) 4例, 同回復期 (AH (conv)) 9例, ヨーロッパ分類⁴⁾によるchronic persistent hepatitis (CPH) 20例, chronic aggressive hepatitis,

type moderate (CAH 2 A) 19例, chronic aggressive hepatitis, type severe (CAH 2 B) 31例, 壊死後性肝硬変 (LC) 20例, 肝細胞癌 (HCC) 11例の計125例から得た. また, これらとは別に日本住血吸虫による肝硬変 (LCsj) 1例, 原発性胆汁性肝硬変 (Sheuerの3期) (PBC) 1例と8週, 23週の, 各々子宮全摘, 人工中絶で得られた2例の胎児肝についても肝酵素活性を測定した. 顕性糖尿病, 栄養不良例は対象から除外した. 一過性のトランスアミナーゼ値の軽度上昇を示し, 肝疾患が疑われて肝生検を施行した例で, 有意な組織学的変化を認めなかったものをCONTとした. この研究期間に上記肝硬変22例のうち3例にHCCの発生を認めた. 1例はLCsj例で肝生検後2年3ヵ月後にHCCと診断され, 他の2例中, 1例 (LC-HCC1) は肝生検後4年7ヵ月後にHCCの手術を受け, 他の1例 (LC-HCC2) は肝生検後4年11ヵ月後にHCCで死亡した (Table 1).

2. 糖代謝律速酵素活性の測定

通常の組織学的検査に用いた残りの生検肝組織を直ちに, 0.154M KCl-0.32mM KHCO₃-4 mM EDTA, pH7.5の4容量で, 0.5mlのガラスホモジナイザー (Kontes Glass Co.) を使用し, 0°C, 800r.p.m.で1分間, 15秒毎に10秒間休止し乍らホモジナイズした. G 6 Pase活性^{5,6)}と蛋白濃度⁷⁾をホモジネートで測定し, 残りのホモジネートを2°Cで25,000×g, 60分間遠沈後得られた上清につき, 蛋白濃度, G 6 PD⁸⁾ (glycylglycine緩衝液の代わりに50mM Tris-

Table 1 Activities of key carbohydrate-metabolizing enzymes in limited number of cases^a

Subjects	Enzymes						
	G6PD	HK	high-Km HK	FBPase	GGPase	PFK	PK
Fetal liver (8W)	54.0	9.9	0	11.4	9.3	41.3	529.0
Fetal liver (23W)	55.8	4.5	2.5	18.9	11.5	74.0	N D
PBC	42.8	3.0	1.0	75.6	32.4	49.3	742.0
LCsj	64.0	13.5	3.0	75.2	28.9	62.7	986.1
LC-HCC1 [*]	38.1	10.0	4.4	76.6	40.0	N D	N D
LC-HCC2 [*]	38.5	9.2	1.4	65.7	24.9	N D	N D

a: Activities are given in mU/mg protein. ND: not determined.

*: LC cases in which HCC developed later and these two LC cases are included in Table 2.

HCl, pH7.5緩衝液を使用), HK, high-Km HK⁹⁾, FBPase¹⁰⁾, phosphofructokinase (PFK)¹¹⁾, PK¹²⁾ 活性を各文献に記載された方法に従って測定した。酵素活性の測定は全て37°Cで0.5又は1.0mlの最終反応容量で、各々の盲検に対するNADH又はNADPHの増減をGilford Model 240自記分光光度計で記録して行った。酵素活性はmilliunit (mU) (1分間に变化した基質のnmole量)を蛋白量で除したmU/mg proteinで表した。採取された肝組織が小さくて、前記の全ての酵素活性を測定できなかった症例も検討の対象とした。

3. 血液生化学による肝機能検査

血清ビリルビン (総ビリルビン (TBil), 直接型ビリルビン (DBil)), チモール混濁反応 (TTT), 硫酸亜鉛混濁反応 (ZTT), 血清総蛋白 (TP), 血清アルブミン (Alb), γ -グロブリン (Gglob), アルブミン/グロブリン比 (A/G), GOT, GPT, GOT/GPT, アルカリフォスファターゼ (Alp), コリンエステラーゼ (ChE) 値を肝生検前2週間以内に, indocyanine green 血漿消失率 (KICG) と α -フェトプロテイン (AFP) は肝生検前1ヵ月以内に測定したものを用いた。

4. 統計学的解析

各々の異なった肝疾患間の酵素活性の有意差検定はノンパラメトリック法を用いた Mann-Whitney の U-test¹³⁾ で行った。個々の肝疾患内の比較的少数例での各酵素活性間の相関を見るためには rank correlation test¹⁴⁾ を用い、

他は特に記載の無いかぎりには通常の方法で相関係数を計算した。主成分分析は microcomputer (PC-8001; NEC, Tokyo) を用い引用文献¹⁵⁾ のプログラムの一部を変更して使用した。

5. 試薬

酵素活性測定用の基質と補酵素は Sigma Chem. Co., St. Louis 社の製品を、精製した酵素は Boehringer Mannheim, GmbH 社の製品を使用した。他の試薬は全て、入手可能な純度の高いものを用いた。

結 果

1. 肝組織の糖代謝律速酵素活性

CONT 及び諸種肝疾患での糖代謝律速酵素活性を Table 2 に示した。G6PD と HK 活性は急性肝炎黄疸期に高値を示し、回復期に低下した。慢性肝疾患ではその進展に従って CPH, CAH 2 A, CAH 2 B, LC の順に、慢性肝炎から肝硬変症へと順次活性が増加し、HCC で最高値を示した。HCC で G6PD 活性は, AH (ict) を除いた他の肝疾患に比べて有意に高く ($p < 0.001$), HK 活性も同様に高値を示し、標準偏差は大であったが有意であった ($p < 0.05 - 0.001$)。測定した7種類の糖代謝律速酵素の内、HK 活性が最も多くの異なった肝疾患の間で有意差 ($p < 0.05 - 0.001$) を示し、それらの肝病態を区別することができた。

High-Km HK, FBPase, G6Pase 活性は, G6PD, HK 活性が急性肝炎および慢性肝炎の

Table 2 Key carbohydrate-metabolizing enzyme activities in controls and patients with liver disease^a

Subjects	Enzymes							
	G6PD	HK	high-Km HK	HK	FBPase	G6Pase	PFK	PK
CONT	20.3 3.4 (11)	2.9 0.8 (10)	10.6 2.8 (9)		96.7 11.5 (9)	45.5 7.9 (7)	58.9 8.1 (5)	653.5 119.6 (6)
AH (conv)	33.7 9.6 (9)	5.5 1.7 (9)	8.5 3.5 (8)		111.5 17.1 (8)	41.8 7.8 (9)	69.3 28.9 (4)	628.0 141.5 (7)
AH (ict)	46.3 6.3 (4)	10.7 4.2 (4)	8.0 6.5 (4)		92.5 29.1 (4)	40.6 15.1 (4)	78.3 13.6 (4)	844.4 ND (2)
CPH	27.6 7.7 (17)	4.0 1.5 (20)	8.4 3.7 (20)		111.3 19.2 (16)	40.5 8.3 (15)	54.3 15.5 (8)	657.5 166.5 (8)
CAH 2A	32.4 8.7 (17)	5.7 1.9 (17)	5.8 3.6 (17)		103.4 19.6 (16)	39.8 11.6 (12)	57.8 10.9 (5)	537.5 58.2 (9)
CAH 2B	38.5 9.9 (31)	7.4 3.2 (30)	4.7 4.0 (29)		105.4 26.8 (26)	42.4 12.6 (21)	56.7 18.3 (14)	642.6 246.7 (16)
LC	43.6 15.4 (18)	8.4 2.3 (19)	3.6 2.6 (17)		92.9 19.9 (16)	32.2 11.7 (15)	51.4 15.7 (9)	583.1 246.6 (10)
HCC	100.4 70.5 (11)	19.7 13.5 (11)	4.7 4.1 (11)		40.7 40.4 (11)	20.6 20.6 (11)	68.3 27.5 (8)	2072.4 1328.7 (6)

a: Activities are given in mU/mg protein. In each disease group, the top row represents mean, the middle SD and the bottom in parenthesis number of cases, respectively. ND: not determined.

進展と共に増加を示したのに対し、逆に、減少を示した。High-Km HK 活性は CAH 2 A, CAH 2 B, LC, HCC で CONT に比し有意の減少 ($p < 0.01 - 0.001$) を示した。これら肝疾患の中で、high-Km HK 活性は LC で AH (conv), CPH, CAH 2 A に比し有意に ($p < 0.05 - 0.001$) 低く、最低値を示し、HCC では CPH に比し有意に ($p < 0.01$) 低値を示したのみで、予想に反し HCC で LC よりも高値を示した。High-Km HK 活性が HCC でこのように比較的高値を示した背景には HCC で HK isozyme II の活性増加が寄与しているためで GK 活性によるものではない¹⁶⁾と考えられた。

FBPase 活性は HCC で AH (ict) を除いた他の肝疾患に比し有意に ($p < 0.05 - 0.001$) 低値を示した。G6Pase 活性は LC で CONT に比し有意に ($p < 0.05$) 低く、HCC では CONT, AH (conv), CPH, CAH 2 A, CAH 2 B に比し有意に ($p < 0.05 - 0.01$) 低値を示した。

PFK 活性は AH (ict) で高値を示したが、他の肝疾患での有意な変化は認められなかった。

PK 活性は HCC で CAH 2 A, CAH 2 B, LC に比し有意な ($p < 0.05$) 高値を示した。

PBC, LCsj での酵素パターンの変動は他の LC と同様であった (Tables 1, 2)。HCC での酵素パターンの変動は胎児肝のそれに似ていた。しかし個々の酵素に関しては HCC では活性の変動にばらつきが大きく、対照肝に近い値を示すものもあった。

CAH 2 B で HBsAg(+) と HBsAg(-) 例での各酵素活性を比較したが両群間に有意差は認められなかった。LC-HCC 1 例の手術時に得られた担癌硬変肝の酵素活性は (G6PD, 37.8; HK, 15.0; high-Km HK, 0.5; FBPase, 188.6; G6Pase, 78.4 mU/mg protein) であった。これを同例の HCC の未だ発症していない肝硬変のみの時の酵素活性 (Table 1) と比べた結果では、担癌硬変肝では HK 活性が増加して一般に言われている担癌肝の変化が見られたと同時に、FBPase, G6Pase の活性も増加し糖新生刺激の加わったことを示した。一方、high-Km HK 活性は減少を示した。数年後に HCC の発症を見た肝硬変 3 例

Table 3 Correlation coefficients among the activities of key carbohydrate-metabolizing enzymes in liver tissues in controls and cases of benign liver disease^a

Enzymes	G6PD	HK	high-km HK	FBPase	G6Pase	PK	PFK
G6PD	----	***	**	-0.025	-0.061	0.370	0.268 ^b
HK		----	***	-0.167	-0.088	0.368	0.190 ^c
high-km HK			----	**	***	0.039	0.253 ^c
FBPase				----	*	-0.029 ^f	0.128 ^b
G6Pase					----	0.145 ^d	0.011 ^d
PK						----	0.449 ^{*e}

a: Number of cases in each item is more than 50 except for cases with the following remarks: b, 48; c, 49; d, 45; e, 29; f, 47 and g, 39. Two cases of PBC and LCsj were not included. *, p<0.05; **, p<0.01 and ***, p<0.001.

Table 4 Correlation coefficients among the activities of key carbohydrate-metabolizing enzymes in liver tissues in all the cases studied^a

Enzymes	G6PD	HK	high-km HK	FBPase	G6Pase	PK	PFK
G6PD	----	***	*	***	***	0.897	0.248
HK		----	**	***	***	0.884	0.279 [*]
high-km HK			----	**	**	0.022	0.194
FBPase				----	***	-0.570	-0.133
G6Pase					----	-0.349 ^{*b}	0.050
PK						----	0.434 ^{***c}

a: Number of cases in each item is more than 50 except for cases with the following remarks: b, 45 and c, 35. Two cases of PBC and LCsj were not included. *, p<0.05; **, p<0.01 and ***, p<0.001.

の酵素パターンは他のLCの酵素パターンに比し、特に大きな差は認められなかった。

2. 糖代謝律速酵素活性間の相関

Table 3にHCCを含まない例での各酵素間の活性の相関を示す。G6PD, HK, PK間およびhigh-Km HK, FBPase, G6Pase活性は各々互いに正の有意な相関を示し、G6PD, HKとhigh-Km HKは有意な負の相関を示した。PFKはPKとのみ正の相関を示し、他の酵素活性とは有意な相関は認められなかった。Table 4にHCCを含む全例を対象とした各酵素間の活性の相関を示す。HCCを含まない場合と同様、G6PD, HK, PK間およびhigh-Km HK, FBPase, G6Pase間には各々互いに正の有意な相関が見られた。さらにG6PDはhigh-Km HK, FBPase, G6Paseと有意な負の相関を示し、PFK活性は

PKの他にHKとも正の相関を示した。即ちG6PD, HK, PK, PFKの群およびhigh-Km HK, FBPase, G6Paseの群の酵素活性は肝障害およびHCCで類似の変動を示すが、FBPaseおよびG6PaseではHCCを含めてはじめてG6PD, HK, PKと負の相関が見られ、HCCでの活性低下が特異的な変化であることを示した。

これら酵素間の相関が肝疾患全体でのみならず各々の異なった肝疾患内でも認められるかどうかを見るため、各肝疾患内で10例以上の測定値がある酵素間の活性の相関をrank correlation testで調べた。その結果、G6PDとHK活性の有意な相関をCPH, CAH 2A, CAH 2B, LCの各肝疾患内で認め、更に、大きなばらつきを示すHCC内でも認めた。

3. 糖代謝律速酵素活性と肝機能検査との相関

Table 5 Correlation coefficients between the activities of tissue enzymes and the values of blood chemistries in controls and cases of benign liver disease^a

Enzymes	Blood chemistries								
	TBil	Alb	Gglob	A/G	GOT	GPT	Alp	KICG	AFP
G6PD	0.222 [*]	-0.166	0.241 [*]	-0.072	0.425 ^{***}	0.302 ^{**}	0.058	-0.359 ^{**}	0.256 [*]
HK	0.264 ^{**}	-0.258 [*]	0.380 ^{***}	-0.195	0.492 ^{***}	0.309 ^{**}	0.146	-0.422 ^{***}	0.195
high-Km HK	-0.092	0.420 ^{***}	-0.285 ^{**}	0.355 ^{***}	-0.370 ^{***}	-0.231 [*]	-0.133	0.402 ^{***}	-0.315 [*]
FBPase	-0.143	0.316 ^{**}	-0.280 [*]	0.292 ^{**}	-0.227 [*]	-0.238 [*]	-0.214	0.113	-0.135
G6Pase	-0.024	0.298 [*]	-0.253 [*]	0.299 [*]	-0.151	-0.118	-0.172	0.308 [*]	-0.224
PFK	0.244	0.180	0.015 ^b	0.117	0.094	0.110	0.014 ^c	-0.033 ^d	-0.190 ^e
PK	0.400 ^{**}	-0.006	0.292 [*]	-0.038	0.207	0.122	0.214 ^f	-0.109 ^g	0.028 ^h

a: Number of cases in each item is more than 50 except for cases with the following remarks: b, 44; c, 41; d, 34; e, 37; f, 48; g, 43 and h, 46. *, p<0.05; **, p<0.01 and ***, p<0.001. GOT/GPT was omitted because of no significant correlations.

Table 6 Correlation coefficients between the activities of tissue enzymes and the values of blood chemistries in all the cases studied^a

Enzymes	Blood chemistries								
	TBil	Alb	Gglob	A/G	GOT	GOT/GPT	Alp	KICG	AFP
G6PD	0.000	-0.177	0.144	-0.140	0.106	0.313 ^{**}	0.108	-0.253 [*]	0.404 ^{***}
HK	0.116	-0.194 [*]	0.204 [*]	-0.193 [*]	0.213 [*]	0.310 ^{**}	0.190	-0.272 [*]	0.491 ^{***}
high-Km HK	-0.091	0.358 ^{***}	-0.264 ^{**}	0.322 ^{**}	-0.291 ^{**}	-0.204 [*]	-0.135	0.356 ^{***}	-0.137
FBPase	-0.325 ^{**}	0.359 ^{***}	-0.358 ^{**}	-0.150	-0.150	-0.332 ^{***}	-0.404 ^{***}	0.269 [*]	-0.437 ^{***}
G6Pase	-0.243 [*]	0.275 [*]	-0.293 ^{**}	0.318 ^{**}	-0.078	-0.360 ^{***}	-0.297 ^{**}	0.321 ^{**}	-0.338 ^{**}
PFK	-0.154	0.042	0.029 ^b	0.002	0.126	0.032	-0.164 ^c	-0.067 ^d	-0.236 ^e
PK	0.071	-0.128	0.098	-0.150	0.120	0.379 ^{**}	0.395 ^{**}	-0.133	0.318 [*]

a: Number of cases in each item is more than 50 except for cases with the following remarks: b, 5; c, 49; d, 44 and e, 40. *, p<0.05; **, p<0.01 and ***, p<0.001. GPT was omitted because of no significant correlations.

HCC を含まない良性肝疾患例での糖代謝酵素活性と肝機能検査との相関を Table 5 に示した。G6PD, HK 活性は TBil, GOT, GPT, Gglob 等の肝障害ないしは肝炎の慢性化で増加する検査項目と正の相関を示し、逆に KICG のごとく肝予備能を表し、肝障害で減少する検査項目と負の相関を示した。PK 活性も同様の傾向

を示した。一方、high-Km HK 活性は G6PD, HK 活性とは逆に、GOT, GPT, Gglob と負の、KICG とは正の相関を示し、FBPase, G6Pase も同様の傾向を示した。HCC を含まない例でも AFP は G6PD 活性と正の有意な (p<0.05) 相関を、high-Km HK 活性と負の有意な (p<0.01) 相関を示した。

Table 6 は同様に HCC を含む全症例を対象に相関を見たものである。G6PD, HK, PK 活性は GOT/GPT, AFP のような肝細胞の未分化の性質を表す検査項目と正の相関を有し、逆に、G6PD, HK 活性は KICG のような肝予備能を表す検査項目と負の相関を示した。high-Km HK, FBPase, G6Pase 活性は、上記酵素とは逆に、Gglob, GOT/GPT のような肝疾患で増加を示す検査項目と負の、Alb, KICG のような減少を示す検査項目とは正の相関を示した。HCC を含まない症例では GOT, GPT と酵素活性の間の相関が認められたが、GOT/GPT との相関は認められず、反対に HCC 例を含む症例では GPT と相関は認められずむしろ GOT/GPT と高い相関を示した。GOT/GPT は HCC のみならず対照肝でも高値をとっており、HCC が加わったことにより GOT/GPT のさらに高値例が加わったため、有意の相関が得られたものとして説明できる。逆に、GPT 値は AH (ict) が高値を示し、HCC では慢性肝炎よりも低い値をとり肝の酵素活性のみが極端に高い値をとったため、HCC を加えた例での相関は弱いものとなったことを示す。

以上より HCC を含む症例での相関の検討から肝酵素活性の変動は GOT/GPT, AFP のような肝細胞の未分化の指標となる検査項目と相関が認められ、HCC を除いた症例での相関の検討では GPT のような肝障害の指標となる項目と相関を示し、二つの異なる要因によることが示された。

4. 糖代謝律速酵素活性と肝機能検査の主成分分析

更にこれらの酵素活性の変動の意義付けをするため、データの脱落の多い PK, PFK を除いた 5 つの酵素と 15 種類の肝機能検査項目の計 20 の変数を用い、これらの項目が全て測定できた肝疾患 40 例 (CONT 2 例, AH (conv) 4 例, CPH 7 例, CAH 2A 4 例, CAH 2B 8 例, LC 7 例, HCC 8 例) につき主成分分析を行った¹⁷⁾。これらの 20 変数を用いた累積寄与率は第 1 主成分で 34.6%, 第 2 主成分までで 49.9%, 第 3 主成分までで 59.3% であった。Fig. 1 は 3 次元空間における上記 20 変数の因子負荷量の散布状態

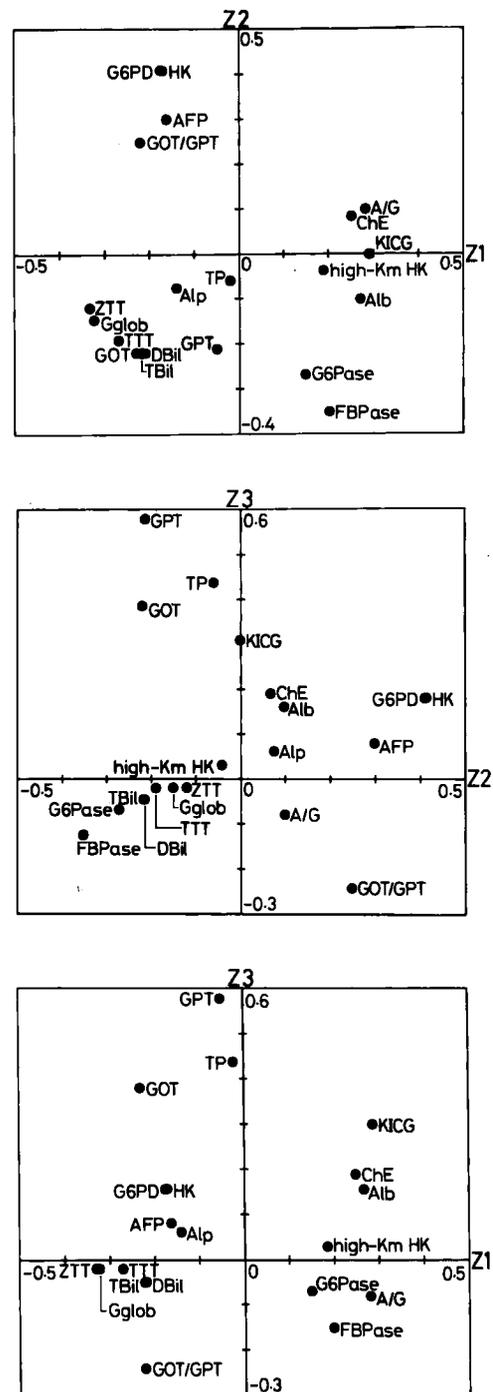


Fig.1 Factor loadings of 20 variables of key carbohydrate-metabolizing enzymes and blood chemistries in the Factor 1 (Z1) and the Factor 2 (Z2), in the Factor 2 (Z2) and the Factor 3 (Z3) and in the Factor 1 (Z1) and the Factor 3 (Z3), projected in one plane.

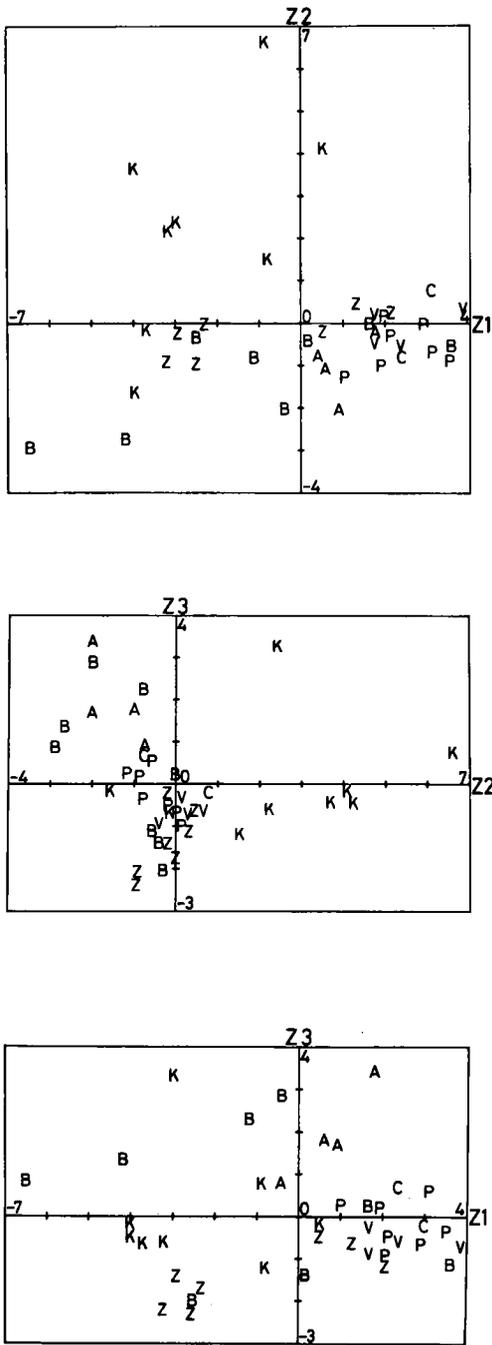


Fig. 2 Factor scores of 40 cases with 20 variables in the Factor 1 (Z1) and the Factor 2 (Z2), in the Factor 2 (Z2) and the Factor 3 (Z3) and in the Factor 1 (Z1) and the Factor 3 (Z3), projected in one plane. Abbreviations are: C, CONT; V, AH(conv); P, CPH; A, CAH 2A; B, CAH 2B; Z, LC; K, HCC.

を主成分 1 (Z1) と 2 (Z2), 2 (Z2) と 3 (Z3), 1 (Z1) と 3 (Z3) 毎に各平面上に射影したものである。Fig. 2 は同様に 20 変数での 40 症例の各因子 score を主成分 1 と 2, 2 と 3, 1 と 3 の各平面上に射影したものである。Fig. 1 より第 1 主成分の因子負荷量は正で大きいものに KICG, Alb, ChE, A/G, high-Km HK があり FBpase, G 6 Pase がそれらに続いた。負の小さいものには ZTT, Gglob, TTT, GOT, Bil があり, G 6 PD, HK, GOT/GPT, AFP がそれらよりやや大であった。第 2 主成分では G 6 PD, HK, AFP, GOT/GPT が正の大きい因子負荷量を示し, FBpase, G 6 Pase が負の小さい因子負荷量を示した。第 3 主成分では GPT, TP, GOT が正の大きい因子負荷量をなし, 負の因子負荷量は最も小さい GOT/GPT でも -0.3 以上で負の方向への因子負荷量は第 1, 第 2 主成分に比し小さかった。第 1, 第 2 主成分の平面では G 6 PD と HK 活性は AFP, GOT/GPT と並んで第 4 象限にあり, FBpase, G 6 Pase 活性は他の一般肝機能検査と異なり, 第 2 象限に G 6 PD および HK と対称をなして位置した。High-Km HK の因子負荷量は主成分 2 と 3 で 0 に近く, 第 1 主成分でのみ肝予備能を表す検査項目である ChE, A/G, KICG, Alb に近い位置を占めた。G 6 PD, HK, AFP の因子負荷量は 3 つのどの主成分上でもそれぞれ互いに近い位置を占め, 一群となっており, 未分化な性質を示すものと理解された。これら G 6 PD, HK, AFP の項目に対し G 6 Pase と FBpase の因子負荷量は常に 0 点を対称点とした点対称の位置を占めており, これらの項目の反対の特性を表していた。各項目の基準化した肝機能検査値および酵素活性値とそれぞれの因子負荷量の積の和から求めた各症例の各主成分に対する score を Fig. 2 に示した。Fig. 1 の結果と対応させながら各主成分の意味付けを行うと, 第 1 主成分で正に CONT および肝障害の軽微な例が多く, 負に HCC および LC, CAH 2B 例が多く, 肝炎の慢性化ないし進展を, 第 2 主成分は正に HCC 例が多く HCC と他の良性肝疾患との区別を, 第 3 主成分は, 累積寄与率からは全体の情報の 10% を説明するにすぎないが正の値をとるものに慢性肝炎例が多く, 肝実質障害の程度を主に表しているものと理解された。

考 案

肝細胞癌を含む各種肝疾患例の肝組織における糖代謝律速酵素活性を測定することにより、肝炎、肝硬変では肝に特異的な酵素 (high-Km HK, FBPase, G6Pase) の活性低下のみならず非特異的な酵素 (G6PD, HK) の活性増加が認められ、従来からの成績²⁾を確認することができた。酵素活性は蛋白量当たりで表されているので、単に肝障害により肝の機能細胞数が減少するために、これらの酵素活性の変化が起こるのではないことを示している。酵素パターンの変動はCAH 2BでHBsAg (+)とHBsAg (-)の間で差がなく、原発性胆汁性肝硬変、日本住血吸虫による肝硬変と壊死後性肝硬変との間で酵素パターンの違いが認められ無かった点より、その肝障害を惹起する原因は異なっても酵素パターンの変化は類似していた。G6PDとHKは個々の異なった肝疾患内でも互いに正の相関を示し、各主成分に対するこれら二つの酵素の因子負荷量は殆ど同じ値をとって重なった位置を占めた。また、酵素活性値のばらつきの非常に大きいHCC¹⁸⁾でもG6PDとHKの正の相関が認められた。

これらの変化を経時的に見ると、肝障害時の変化は急性肝炎の黄疸期と回復期の比較からわかるように可逆的であり、癌化における固定化された形質発現の異常¹⁹⁾とは異なる。Watanabe等²⁰⁾はラット障害肝でのG6PD活性の上昇は翻訳段階での酵素合成機構の異常による特異的蛋白合成の亢進によることを示している。また、Taketa等²¹⁾はラット障害肝によるこれら酵素パターンの変動は肝部分切除後の肝再生に見られるものよりも著明であることから肝疾患で見られる酵素パターンの変動は、単に肝障害に伴う肝再生での幼若肝細胞数の増加を反映しているものではないとしている。

各酵素間の相関では、HCCを含まない肝障害例で肝に非特異的な酵素は各々互いに有意な正の相関を示し、特異的な酵素も各々互いに有意な正の相関を示したが、これらの特異的、非特異的な酵素間ではhigh-Km HK以外有意な相関を示さなかった。上記の肝障害例にHCC例

を加えた症例の検討ではPFKとPKを除いた場合、特異的、非特異的な酵素間の相関を含め全て有意であった。この結果は、肝障害での肝に特異的なFBPase, G6Pase活性の減少は、肝に非特異的な酵素活性の増加に比例せず、HCC, LCではじめて有意な減少を示し、一方、high-Km HKはこれらの酵素に比べ肝障害で肝に非特異的な酵素活性の増加に逆比例して活性が減少し、いずれも肝障害の指標として有用なことを示した。

臨床的にCPHからLCへと慢性肝疾患の進展に沿って、これら酵素パターンの変動即ち酵素偏倚が大きくなり、LCと、LCへ進展し易いCAH 2B²²⁾、HCCと、大部分のHCCの発生母地となるLC²³⁾での酵素活性の変動がよく似ていることは興味深い。このことは肝硬変が前癌状態であることを示唆していることが出来るが、酵素パターンの変動ではLCは一方ではAH (ict)に近く、AH (ict)で見られる酵素パターンの異常はCONTに近い酵素パターンを有するAH (conv)に見られるように可逆的であり、これら両者の肝疾患は、これら酵素活性の変化から見ても根本的に異なっている。この点よりLCの酵素活性がHCCに類似することのみからはLCが前癌状態であるとは言えない。LC-HCC 1例の担癌硬変肝では酵素パターンの変動は必ずしも他のHCCの発生を見なかったLCでの変化に比してより未分化とは言えず、肝硬変からHCCへと連続的に酵素パターンがより未分化な方向に変化するのではないようである。

各肝酵素活性と肝機能検査との相関ではHCC例を除外した肝障害例での検討においてGOT, GPTは肝酵素活性と有意な相関を示したがGOT/GPTはいかなる酵素とも相関を示さず、

HCCを加えた症例では、逆に、GPTが肝酵素と有意な相関を示さず、GOT/GPTが有意な相関を示すようになった。このことはGPTが肝障害の程度を表し²⁴⁾、GOT/GPTがHCCの発生と関連した要因を表す^{24, 25)}ことと考え合わせ、これら肝酵素活性の変動は肝障害によるものと癌化によるものとに明確に区別できず、いずれの要因によってもこれらの酵素活性の変動をきたし得ることを示している。

AFP は HCC 例を除外した症例における検討でも肝酵素活性と弱い相関を示したが、HCC 例を加えると更に高い相関を多くの肝酵素と示した。これは AFP が肝障害でも軽度の増加を示し、HCC で更に著明に増加することと一致し、肝酵素活性も AFP と同様に肝障害でも軽度に、HCC で種々の程度に変化することを示している。

主成分分析で累積寄与率より全情報の 50% を説明し得る第 1, 第 2 主成分の平面では、各酵素と肝機能検査項目は大きく 4 つの群に分けられる。即ち、ChE, KICG, high-Km HK 等を含む肝予備能を表すと考えられる群、Gglob, GOT, Bil 等を含む肝炎の進展及び慢性化を表すと考えられる群、G 6 PD, HK, AFP, GOT/GPT を含む未分化を表すと考えられる群とそれに対称な肝の分化度を示す G 6 Pase, FBPase の群である。主成分分析で、G 6 PD, HK, AFP は第 1 から第 3 のどの主成分に対する因子負荷量の射影でも常に互いに近い位置を占め、全ての主成分で、各々互いに近い位置を占めている FBPase, G 6 Pase と対称的に位置した。これらの結果より G 6 PD, HK, AFP は肝疾患で同じ特性を表現しており、G 6 PD, HK は HCC と他の肝疾患を分ける第 2 主成分に大きな正の因子負荷量を有し、FBPase と G 6 Pase は G 6 PD, HK, AFP と逆の特性を表現していると考えられる。しかし同時にこれらの酵素は第 1, 第 3 主成分にもある程度の因子負荷量を示し、HCC のみならず肝障害でも酵素活性が変動することを示している。G 6 PD, HK の因子負荷量は HCC と関連を有する第 2 主成分に大きく、肝障害よりも未分化の性質を強く表していると言える。High-Km HK は第 2 主成分への因子負荷量は殆ど 0 であり、主に肝障害を反映している事を示したが、これは HCC で GK とは別に high-Km HK が比較的高値を示した事に起因すると考えられた。

結 論

肝組織中の 7 種類の糖代謝律速酵素活性を 125

例の肝疾患患者につき測定した。慢性肝炎から LC への臨床的な進展に伴って high-Km HK, FBPase, G 6 Pase の活性は減少し、逆に G 6 PD, HK の活性は増加した。酵素活性の変動は HCC と胎児肝で大きく、LC と AH (ict) がそれに次いだ。PFK 活性は急性肝炎で高く PK は HCC で高値を示した。これら酵素活性の変化と肝機能検査との相関分析の検討では、HCC 例を除外した肝障害例で G 6 PD, HK は GOT, GPT, TBil, Gglob 等の肝障害ないし肝炎の慢性化で増加する検査項目と正の相関を示し、KICG のごとく肝障害で減少する項目とは負の相関を示した。High-Km HK はこれらと逆の相関を示し、FBPase, G 6 Pase も同様の傾向を示した。HCC を加えた症例では GPT は肝酵素との相関を示さず、GOT/GPT が有意な相関を示すようになった。また AFP は HCC 例の有無にかかわらず一部の肝酵素と相関を示した。更にこれらの項目の主成分分析では G 6 PD と HK は AFP, GOT/GPT と近い関係にあり G 6 Pase, FBPase は共に G 6 PD, HK に対称的な因子負荷量の分布を示し、主に HCC が関与した第 2 主成分で G 6 PD, HK, AFP が大きな因子負荷量を示したが、酵素活性の変動要因は肝障害性のものと HCC によるものとに明確には分けられなかった。

これら酵素活性の測定は肝疾患の進展状態をより詳しく把握するのに臨床的にも有用と考えられた。

謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲頂いた岡山大学医学部第一内科学教室教授長島秀夫先生、直接御教示頂いた香川大学保健管理センター教授武田和久先生に深甚なる謝意を捧げます。また本研究にご協力頂いた岡山大学医学部第一内科学教室講師糸島達也先生以下腹腔鏡研究室の諸氏、岡山大学第一外科学教室教授折田薫三先生、同助教授三村久先生に深く感謝致します。

文 献

1. Taketa K, Tanaka A, Watanabe A, Takesue A, Aoe H and Kosaka K: Undifferentiated patterns of key carbohydrate-metabolizing enzymes in injured livers. I. Acute carbon-tetrachloride intoxication of rat. *Enzyme* (1976) 21, 158-173.
2. Taketa K, Shimamura J, Takesue A, Tanaka A and Kosaka K: Undifferentiated patterns of key carbohydrate-metabolizing enzymes in injured livers. II. Human viral hepatitis and cirrhosis of the liver. *Enzyme* (1976) 21, 200-210.
3. Okuda K: What is the precancerous lesion for hepatocellular carcinoma in Japan? *J Gastroenterol Hepato* (1986) 1, 79-85.
4. Review by an international group: Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* (1977) 2, 914-919.
5. Chen P S Jr, Toribara TY and Warner H: Microdetermination of phosphorus. *Analyt Chem* (1956) 28, 1756-1758.
6. Koide H and Oda T: Pathological occurrence of glucose-6-phosphatase in serum in liver diseases. *Clin Chim Acta* (1959) 4, 554-561.
7. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L and Randall R J: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) 193, 265-275.
8. Taketa K, Kaneshige Y, Tanaka A and Kosaka K: Differential responses of glucose 6-phosphate dehydrogenase and lipogenesis to fat-free diets. *Biochem Med* (1970) 4, 531-545.
9. Viñuela E, Salas M and Sols A: Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. *J Biol Chem* (1963) 238, PC 1175-PC 1177.
10. Taketa K and Pogell B M: Allosteric inhibition of rat liver fructose-1, 6-diphosphatase by adenosine-5'-monophosphate. *J Biol Chem* (1965) 240, 651-662.
11. Pogell B M, Tanaka A and Siddons R C: Natural activators for liver fructose-1, 6-diphosphatase and the reversal of adenosine-5'-monophosphate. *J Biol Chem* (1968) 243, 1356-1367.
12. Tanaka T, Harano Y, Sue F and Morimura H: Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *J Biochem Tokyo* (1967) 62, 71-91.
13. 水野哲夫: 臨床統計学. 医学書院, 東京 (1975) pp139-144.
14. Knox WE: *Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues*. S. Kager, Basel, Muenchen, Paris, London, New York, Sydney (1976) pp15-19.
15. 緒方正名, 大崎紘一, 菊池 進, 金関正弘: 医学統計手法. 同文書院, 東京 (1983) pp89-104.
16. 島村淳之輔, 武田和久, 長島秀夫, 植田昌敏: 原発性肝癌における hexokinase isozyme II の出現について. *生物物理化学* (1979) 23, 98.
17. Knox W E: *Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues*. S. Kager, Basel, Muenchen, Paris, London, New York, Sydney (1976) pp212-219.
18. Taketa K, Ueda M and Watanabe A: A case of minimal deviation hepatoma in man with elevated liver-type pyruvate kinase isozyme. *Gann* (1977) 68, 29-35.
19. Taketa K, Shimamura J, Kobayashi M, Nagashima H and Okajima K: Onco-fetal isoenzymes in human hepatomas and preneoplastic lesions; *Carcino-Embryonic Proteins*, Lehman F-G ed, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1979) pp381-389.
20. Watanabe A and Taketa K: Actinomycin D-insensitive induction of rat liver glucose-6-phosphate

- dehydrogenase by carbon tetrachloride injury. *J Biochem* (1973) **73**, 771-779.
21. Taketa K, Watanabe A and Kosaka K: Undifferentiated gene expression in liver injuries; in *Onco-developmental Gene Expression*, W H Fishman and S Sell eds, Academic press, inc., New York, San Francisco, London (1976) pp219-226.
 22. 小坂淳夫, 島田宣浩, 太田康幸, 小林敏成, 河野 宏, 遠藤 浩, 辻 孝夫, 幡 慶一, 水野保夫, 渡辺明治, 糸島達也, 武居篤史, 井上武紀, 太田 亘, 福原純一, 野崎 肇: 慢性肝炎の経過中にみられる亜小葉性肝壊死と肝硬変への進展. *日内会誌* (1971) **60**, 946.
 23. Nakashima T, Okuda K, Kojiro M, Jimi T, Yamaguchi R, Sakamoto K and Ikari T: Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer* (1983) **51**, 863-877.
 24. Shimokawa Y, Okuda K, Kubo Y, Kaneko A, Arishima T, Nagata E, Hashimoto M, Sawa Y, Nagasaki Y, Kojiro M, Sakamoto K and Nakashima T: Serum glutamic oxaloacetic transaminase/glutamic pyruvic transaminase ratios in hepatocellular carcinoma. *Cancer* (1977) **40**, 319-324.
 25. Miyake S: The mechanism of the release of hepatic enzymes in various liver diseases. II. Altered activity ratios of GOT to GPT in serum and liver of patients with liver diseases. *Acta Med Okayama* (1979) **33**, 345-358.

Hepatic Key Carbohydrate-metabolizing Enzymes in Benign Liver Diseases and Hepatocellular Carcinoma

Junnosuke SHIMAMURA

First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama

(Director: Prof. H. Nagashima)

Patterns of seven key carbohydrate-metabolizing enzyme activities were examined in liver tissue from 125 patients with various liver diseases. Along with the progression of chronic hepatitis to liver cirrhosis (LC), activities of high-Km hexokinase (high-Km HK), fructose-1, 6-bisphosphatase (FBPase) and glucose 6-phosphatase (G6Pase) decreased, and those of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and hexokinase (HK) increased. In hepatocellular carcinoma (HCC), similar alterations of these enzyme activities were observed. The extent of enzyme alteration was greatest in HCC and fetal liver, and slightly less in LC and the icteric stage of acute hepatitis. Phosphofructokinase (PFK) activity was increased in acute hepatitis, and pyruvate kinase (PK) activity was increased in HCC. Principal component analysis showed G6PD and HK to be located close to α -fetoprotein and the GOT/GPT ratio. G6Pase and FBPase were distributed symmetrically to G6PD and HK. Thus, the factor loadings effectively separated HCC from the benign liver diseases. The results indicate that the determinations of these enzyme activities are useful in the clinical assessment of the progression of liver disease, which is not revealed by routine blood chemistry.