

# 発泡膏貼布による滲出液の研究

## 第2編 酵素化学的研究

岡山大学 平木内科 (主任: 平木 潔教授)

黒瀬 健吉

[昭和49年3月8日受稿]

### 目次

第1章 緒言	第3項 LDH 活性
第2章 実験材料並びに実験方法	第4項 年齢と発泡液 LDH 活性の関係
第1節 実験材料	第5項 発泡に要する時間と発泡液 LDH 活性の関係
第2節 実験方法	第6項 発泡液量と発泡液 LDH 活性の関係
第1項 発泡液の採液方法	第7項 発泡液細胞数と発泡液 LDH 活性の関係
第2項 酵素測定方法	第2節 LDH アイソザイム
第3章 実験成績	第4章 総括並びに考按
第1節 酵素活性	第5章 結語
第1項 GOT 活性	
第2項 GPT 活性	

### 第1章 緒言

近年における酵素化学の著しい進歩によって、臨床面における酵素化学的診断法は重要な地位を占めるようになり、現在多数の酵素が診断あるいは治療効果や予後の判定等に応用されてきている。すなわち、血清中の glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, lactic dehydrogenase, alkaline phosphatase, amylase, creatin phosphokinase 等の諸酵素の測定はそれぞれ特有の疾患に不可欠の検査法の一つとして日常の臨床に繁用されている。<sup>1,2,3)</sup>

体液中の酵素は血中のみでなく、尿、胸腹水、脊髄液等の体液にも存在し、これらの体液で酵素の測定の臨床診断的意義が認められている。<sup>4)</sup> また、カンタリジン発泡膏による発泡液中の酵素活性についても、すでに Weber 等<sup>4,5)</sup> がその存在について報告している。

一方、発泡膏を用いて生ずる皮膚の滲出液の細胞学的検索から、咲川<sup>6)</sup> は急性白血病においては細胞反応が正常に比して著しく低下することをみている

が、著者も前編において炎症性刺激に対する皮膚の反応は疾患によって差のあることを報告した。本編においては、同様の方法で得られた発泡液中の酵素活性及びアイソザイムを測定し、発泡液の酵素の病態生化学意義、皮膚反応と酵素の関係、発泡液中への酵素遊出の機序等について検討を行ったので、それらの成績を報告する。

### 第2章 実験材料並びに実験方法

#### 第1節 実験材料

研究の対象とした症例は、入院中の急性及び慢性肝炎13例、癌7例、肺結核12例、腎炎6例、レイノー氏病、蕁麻疹各1例の総計40例であり、癌患者について原発巣をみると、胃癌4例の他、肺、肝、食道に原発したものが各1例づつである。尚これらの症例はすべて他のアレルギー性疾患を合併しないことを確かめてから実験を行った。また、対象とした症例の年齢分布は29才以下の青年群が8例、30-59才の壮年群が19例、60才以上の老年群が13例である。

#### 第2節 実験方法

##### 第1項 発泡液の採液方法

被検部位は前腕屈側とし、1 cm<sup>2</sup> 当り約20mgの発泡膏 (Unguentum Vesicans) を均等に塗布した1 cm<sup>2</sup> の紙1枚と、1.5cm平方の紙3~4枚を約3cmの間隔をおいて皮膚に貼布し、絆創膏で皮膚に密着するように固定した。

貼布後24時間に発泡して生じた水泡液をツベルクリン注射器を用いて穿刺採液した。得られた発泡液を遠沈し、細胞成分を除いた上清について種々の酵素の測定を行った。

### 第2項 酵素測定方法

発泡液中の glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), lactic dehydrogenase (LDH) について活性を測定したが、測定方法はすべてヤトロン製の酵素測定用キットを使用した。

LDH については、更に Wieme<sup>7)</sup> の寒天ゲル電気泳動法を用い、Helm<sup>8)</sup>, Yakulis<sup>9)</sup> の方法を多少変更してアイソザイムの測定を行った。すなわち、載物ガラス上の厚さ2mmの寒天ゲルに長さ10mmの slit を作製し、約20 $\mu$ lの血清あるいは発泡液の上清を入れ、暗所で泳動槽を3~4℃に保ちつつ20volt/cmで40分間泳動し、その後 Yakulis<sup>9)</sup> の方法に準じ、37℃の染色液中に60分間 incubate して染色した。次いで常水中で約3時間水染し、乾燥後波長570m $\mu$ のフィルターを使用して densitometry を行い、アイソザイム各分画の百分率を算出した。

LDH アイソザイムは寒天ゲル電気泳動法によって5つの分画に分離されるが最も陰極側に泳動されるものより順に LD<sub>1</sub>, LD<sub>2</sub>, LD<sub>3</sub>, LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub> と命名した。

発泡液の酵素活性を測定する際、発泡液の採液と同時に採血し、GOT, GPT, LDH について血清酵素活性と LDH アイソザイムを測定し、発泡液と血清の比較を行った。

## 第3章 実験成績

### 第1節 酵素活性

#### 第1項 GOT 活性

肝炎13例における発泡液の GOT 活性は平均169.9単位であり、血清 GOT 活性の平均109.9単位より明らかな高値を示したが、発泡液と血清の GOT 活性の間には正の相関が認められた (図1)。

癌7例ではそれぞれ77.0単位、36.6単位と発泡液の GOT 活性が血清の約2倍の高値を示し、両者の間には略々正の相関がみられた (図2)。

肺結核12例でも69.6単位、33.4単位と発泡液の

図1. 肝炎のGOT活性

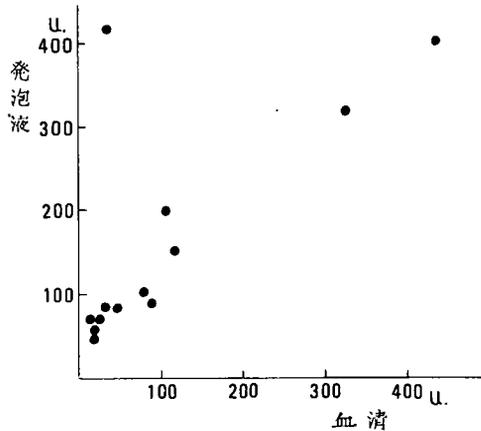
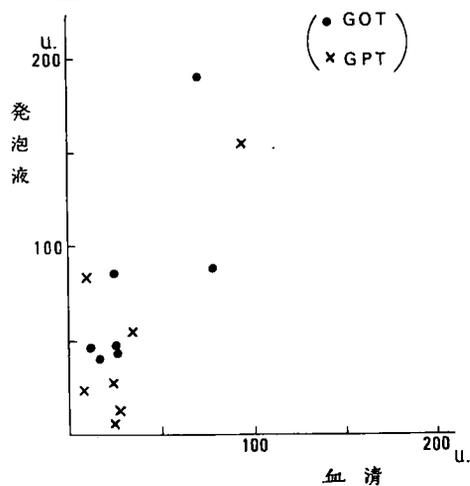


図2. 癌のGOT, GPT活性



GOT 活性が血清の約2倍の高値を示したが、両者の間には有意の相関々係は認め難い (図3)。

腎炎、蕁麻疹、レイノー氏病の8例では発泡液の、活性が64.8単位であり、血清の GOT 活性15.3単位の約4倍の高値を示したが、両者の間には相関々係はみられない (図4)。

全例をまとめると、GOT 活性の平均値は発泡液94.3単位、血清50.8単位であり、発泡液の活性が明らかに高値を示し、個々の症例について比較しても40例中37例で発泡液の活性がより高値を示した。また、血清 GOT 活性の上昇する肝炎及び癌の症例においてのみ、発泡液と血清の GOT 活性の間には正の相関々係が存在することが認められた。

図3. 肺結核のGOT, GPT活性

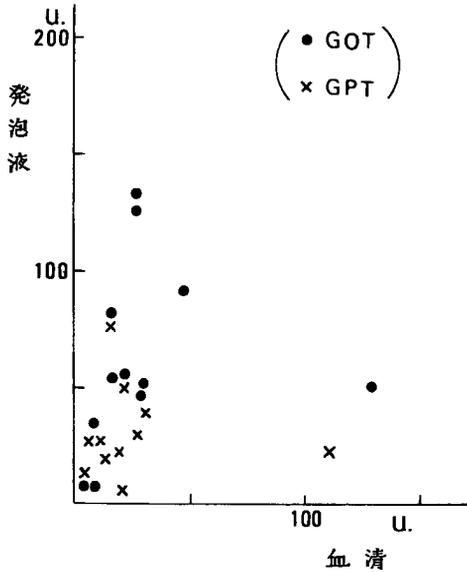


図5. 肝炎のGPT活性

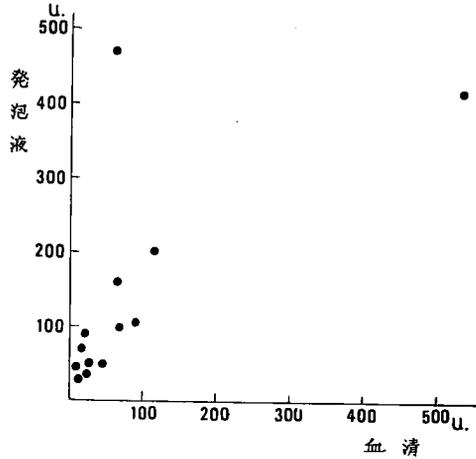
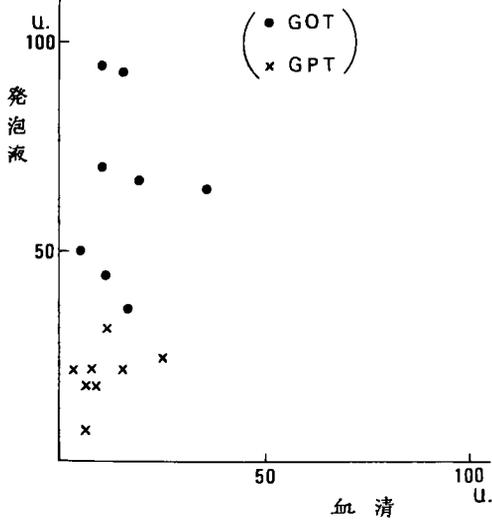


図4. その他の疾患のGOT, GPT活性



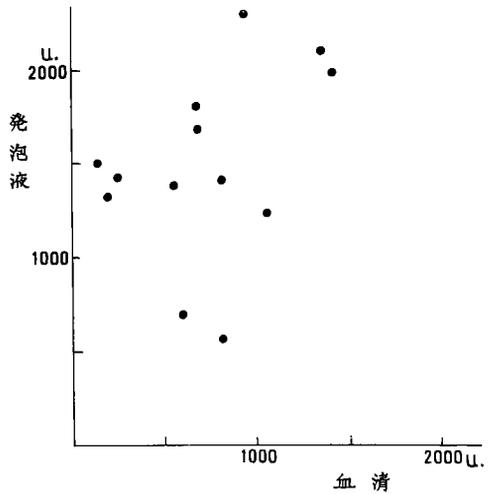
また相関関係も認められなかった(図2, 3, 4).

全例の平均では発泡液67単位, 血清39単位と, 前者で明らかに高く, 疾患別には肝炎で血清 GPT 活性の上昇と発泡液 GPT 活性の変動は略々平行していた.

第3項 LDH 活性

肝炎では血清 LDH 活性の平均値が770.4単位と上昇を示したが, 発泡液の活性は更に高く1520.8単位と血清の約2倍の高値を示した. しかし, 発泡液と血清の LDH 活性の間には相関関係はみられない(図6).

図6. 肝炎のLDH活性

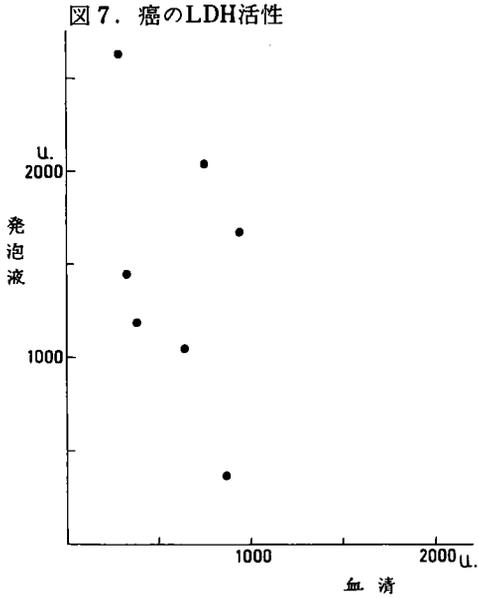


第2項 GPT 活性

肝炎13例の発泡液及び血清の GPT 活性はそれぞれ147.5単位, 84.5単位と発泡液の GPT 活性が高く, また両者の間に正の相関が認められた(図5).

癌7例では発泡液54.3単位, 血清29.1単位と前者の活性がやゝ高く, 肺結核ではそれぞれ30.9単位, 22.1単位, その他の疾患では19.9単位, 10.5単位と発泡液の活性がやゝ高い傾向がみられたが, いずれも活性の上昇がなくて両者の間に有意の差はみられず,

癌では発泡液の活性が1477.9単位であるのに対し、血清は595.7単位と前者で明らかな高値がみられたが、両者の間に相関々係はみられない(図7)。



結核ではそれぞれ1592.7単位, 360.9単位であり、その他の疾患をまとめても、それぞれ1546.2単位, 450.1単位といずれも発泡液の活性が血清より高いが、両者の間に相関々係は認められない(図8, 9)。

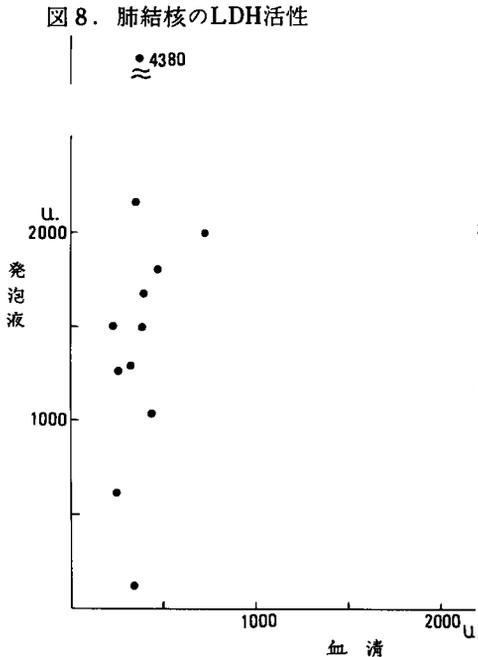
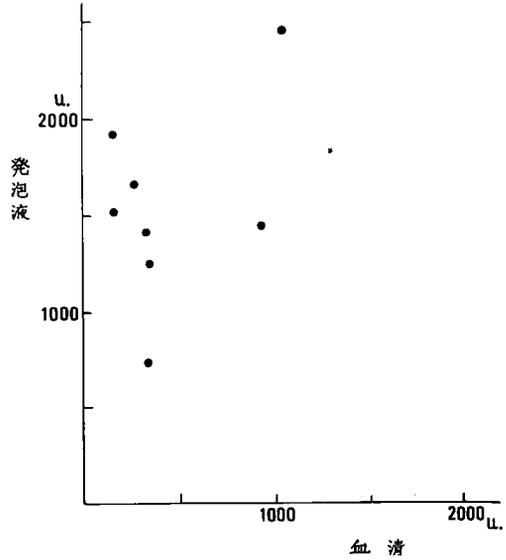


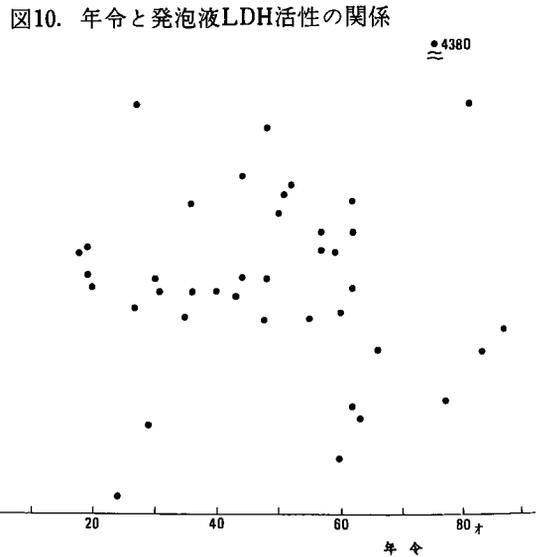
図9. その他の疾患のLDH活性



全例について LDH 活性を比較すると、発泡液の平均活性値が1462単位であるのに対し、血清では524.6単位と有意の差がみられたが、発泡液の LDH 活性は血清 LDH 活性の変動を全く反映せず、また疾患による差もみられなかった。

第4項 年齢と発泡液 LDH 活性の関係

実験を行った各症例の年齢と発泡液 LDH 活性の間には有意の関係は全く認められなかった(図10)。



第5項 発泡に要する時間と発泡液 LDH 活性の関係

発泡に要する時間と発泡液 LDH 活性との関係を見ると、短時間で発泡するものと、発泡までに長時間を要するものでは活性が低く、発泡膏貼布後9ないし15時間で発泡する症例に高活性を呈する傾向が認められた(図11).

図11. 発泡に要する時間と発泡液 LDH 活性の関係

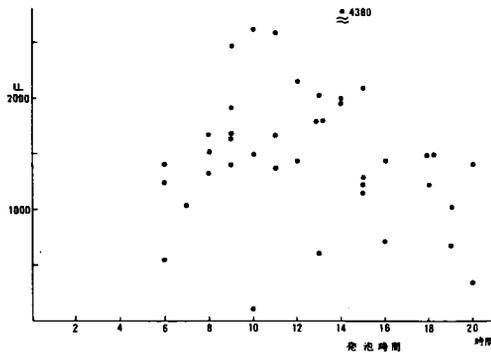
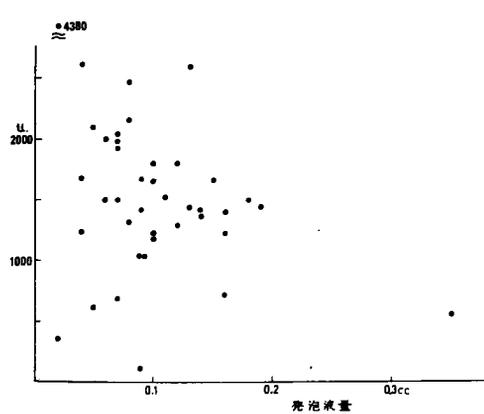


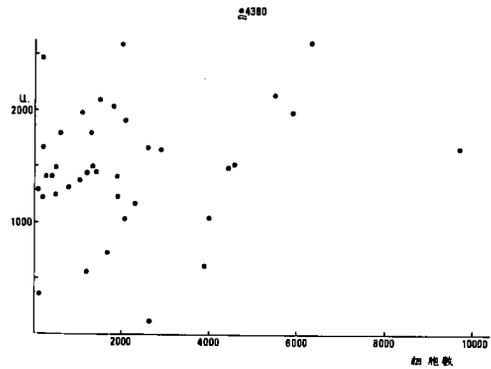
図12. 発泡液量と発泡液LDH活性の関係



第6項 発泡液量と発泡液 LDH 活性の関係  
発泡液量と発泡液 LDH 活性の間には有意の関係は全く認められなかった(図12).

第7項 発泡液細胞数と発泡液 LDH 活性の関係

図13. 発泡液細胞数と発泡液LDH活性の関係



発泡液細胞数と発泡液 LDH 活性の間には、有意の関係は全く認められなかった(図13).

第2節 LDH アイソザイム

肝炎4例、癌5例、肺結核4例、その他5例(腎炎4例、蕁麻疹1例)の18例について、発泡液及び血清の LDH アイソザイムパターンの比較を行った。

測定を行った18例の発泡液 LDH アイソザイムパターンが、LD<sub>1</sub> 56.0%, LD<sub>2</sub> 14.3%, LD<sub>3</sub> 6.7%, LD<sub>4</sub> 7.3%, LD<sub>5</sub> 15.7%であるのに対し、血清ではそれぞれ2.6%, 3.3%, 11.1%, 20.4%, 62.6%と全く異なるパターンを呈した(図14).

疾患別に比較した際にも、発泡液と血清の LDH アイソザイムは異り、特に LD<sub>1</sub> と LD<sub>5</sub> の百分率で対照的なパターンを示した(図15, 16, 17). また、肝炎でしばしば血清中に増加する LD<sub>1</sub> は、発泡液中では減少する傾向がみられた。

図14. 血清と発泡液LDHアイソザイムの比較 (全症例のまとめ)

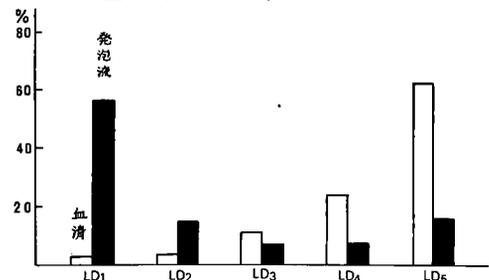


図15. 癌のLDHアイソザイム

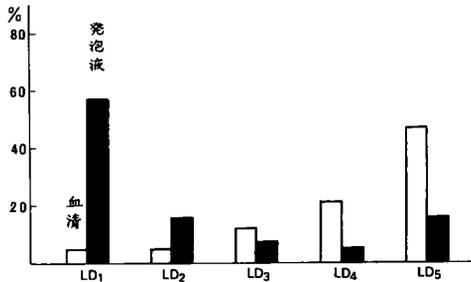


図16. 肝炎のLDHアイソザイム

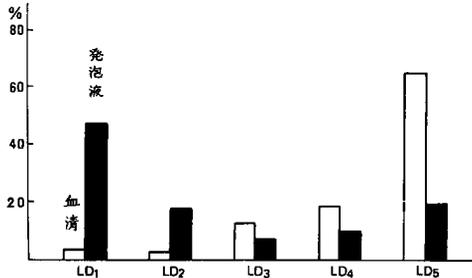
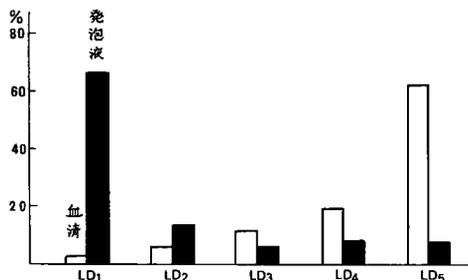


図17. 肺結核のLDHアイソザイム



## 第4章 総括並びに考按

発泡膏を用いて生ずる皮膚の滲出液について、発泡時間、液量、細胞等の検索から、年令あるいは疾患によって炎症性刺激に対する皮膚の反応に違いのあることを前編において報告した。

皮膚の滲出液の酵素については、僅かに Weber 等の報告がみられるにすぎない。すなわち、Weber 及び Theisen<sup>4)</sup> は老年性天疱瘡の患者について、表皮及び水泡液の aldolase, LDH, GOT, GPT, malic dehydrogenase (MDH) を測定し、血清の酵素活性と比較している。彼の成績によると、表皮、水泡液、血清の酵素活性は、aldolase 587 : 145 : 12.6, LDH 273 : 12.9 : 1.8, GOT 2775 : 129.4 : 11, GPT 56 : 9.2 : 6.2, MDH 637 : 218 : 32であり、いずれも表皮の活性が最高値を示し、水泡液の活性も血清より高く、水泡液中の酵素活性の起源を皮膚の旺盛代謝に求めている。

また、Weber 及び Wildner<sup>5)</sup> は種々の皮膚疾患について病的水泡液や、カンタリジンを用いて生じた発泡液の LDH 活性について血清との比較を行い、いずれの場合にも水泡液の LDH 活性が血清 LDH 活性より高いことをみている。

血清酵素の起源については、各種組織に由来するものとされ、種々の疾患において血清酵素活性の変動が可成り臓器特異性を有するものとして、臨床的には有力な診断法の一つとして応用されてきている<sup>6,7)</sup>。一方、皮膚の滲出液の酵素については、Weber 等の報告を除きその起源が皮膚由来のものか、血液から遊出するものか未だ全く明らかにされていない。従って、血清酵素活性にしばしば変動がみられる肝炎と癌をえらび、対照として血清酵素活性の変動の少ない肺結核、腎炎等の疾患を用いて、GOT, GPT, LDH の活性と LDH アイソザイムについてカンタリジン発泡液と血清で比較し、この点の解明を試みた。

実験の結果、GOT, GPT は血清で上昇のみられる肝炎及び癌で発泡液の活性も上昇し、両者の間、特に GOT では正の相関関係がみられるのに対し、肺結核、腎炎等の疾患では相関関係がみられなかった。しかし、両者の活性を比較すると、Weber 等<sup>4)</sup> の述べている如く、血清の酵素活性より発泡液の活性が高値を示していた。また、酵素活性と患者の年令、発泡に要する時間、発泡液量、発泡液中の細胞数との間には相関関係はなく、従って、発泡液の GOT, GPT 活性は、炎症性刺激に対する皮膚の反応を反映するよりも、表皮の酵素の発泡液中への逸脱と血清酵素の遊出の結果を反映したものと考えられた。

一方、LDH 活性については、疾患の種類と無関係に発泡液の LDH 活性が血清の活性より高く、また血清の酵素活性との間に相関関係がみられない。更に、患者の年令、発泡に要する時間、発泡液量、発泡液中の細胞数という皮膚の反応の強さを示す尺度と LDH 活性との間にも有意の相関関係は全く認められない。従って、発泡液中の GOT, GPT 活性が血清の活性変動を可成り反映するものであるのに対し、LDH は血清の影響を全く受けず、発泡に要する時間と LDH 活性の関係の成績からみて、皮膚の代謝活性により強く影響されるものと考えられる。

血清 LDH アイソザイムは健康人では LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub> が優位を占めるが、疾患によってそれぞれ特徴的なアイソザイムパターンの変動を示すことが明らかにされている<sup>10, 11, 12, 13)</sup>。皮膚の LDH アイソザイムに関しては、Weber 及び Pfeleiderer<sup>14)</sup> が LD<sub>1</sub> が約75

%と大部分を占めて、血液のアイソザイムパターンと著しく異なることを報告している。発泡液 LDH アイソザイムについては未だ報告はみられないが、著者が今回行った実験結果から、Weber 等の報告した表皮の LDH アイソザイムパターンに極めて類似したパターンを示すことが明らかとなった。しかし、疾患の違いによるアイソザイムパターンの差はなく、また皮膚の炎症刺激に対する反応の強さとの間にも関係がみられなかった。従って、アイソザイムの面からみても、発泡液 LDH は表皮由来のものが主要な部分を占め、血液の影響はないか、あっても極めて軽微であると考えられた。

発泡液の酵素の由来に関して、GOT, GPT は血清酵素の変動を比較的良好に反映するのに対し、LDH は主に炎症性刺激に対する皮膚の反応によって表皮の酵素が逸脱したものであり、それらの間に明らかな差がみられた。また、GPT の成績については GOT, LDH に比較して表皮に少いという Weber 等の成績から発泡液の GPT 活性の成績は容易に理解出来るが、GOT については表皮にも高濃度に存在するとされており、更にこれら三酵素の分子量には大きな差はない。従って、発泡液中のこれらの酵素の態度の違いを生ずる原因は、表皮の細胞膜及び血管からの酵素の透過性に差があるためと考えざるを得ない。

以上の成績から、カンタリジン発泡液の酵素について検索を行うことにより、種々の疾患の病態生化学的研究あるいは細胞内酵素の遊出機転等について一層の進歩が期待されるであろう。

## 第5章 結 語

肝炎、癌、肺結核、腎炎等の患者に発泡膏を貼布

し、局所の生体防衛反応の結果として生ずる皮膚滲出液について GOT, GPT, LDH の各酵素活性と LDH アイソザイムを測定し、次の如き結果を得た。

1) 発泡液 GOT 活性は血清 GOT 活性より有意に高く、血清酵素活性の上昇する肝炎、癌では両者の間に正の相関がみられた。

2) 発泡液 GPT 活性は血清 GPT 活性より高く、血清酵素活性の上昇する肝炎では両者の間に正の相関がみられた。

3) 発泡液 LDH 活性は血清 LDH 活性に比較して明らかな高値を示すが、両者の間に相関はなく、疾患による差もみられなかった。

4) 炎症性刺激に対する皮膚の反応の強さと発泡液酵素活性の間には、相関々係はみられなかった。

5) 発泡液 LDH アイソザイムは、表皮のアイソザイムパターンを反映して血清のパターンとは著しく異り、疾患によるアイソザイムパターンの違いも殆んどみられなかった。

6) 発泡液の酵素の由来については、GOT, GPT が血清の影響を明らかに受けているのに対し、LDH は大部分が表皮由来と考えられた。

稿を終えるに当たり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師平木潔教授、ならびに御指導を頂いた浅野健夫博士に深甚なる謝意を捧げます。

(本論文の要旨は第13回日本臨床総会病理学会に於て発表した。)

- 1) 赤堀四郎, 沖中重雄編, 臨床酵素学, 朝倉書店, 東京, 1964.
- 2) 田村善蔵, 織田敏次編, 血清酵素一測定法, 意義, 臨床一, 医学書院, 東京, 1960
- 3) 浅野健夫他, 数種血清酵素の臨床的意義に関する研究, 内科, **9** : 921, 1962.
- 4) Weber, G. and H. Theisen, Zum Nachweis enzymatischer Mechanismen in menschlicher Epidermis am Modell der subepidermalen Blase. Arch. klin. exper. Dermat., **208** : 459, 1959.
- 5) Weber, G. and I. Wildner, Über die Milchsäuredehydrogenase-Aktivität im Blut and der Hautblasenflüssigkeit bei Dermatosen, Dermatol. Wschr., **28** : 767, 1958.
- 6) 咲川嘉信, 発泡膏貼布による滲出液の細胞学的研究, 岡山医誌, **76** : 239, 1964.
- 7) Wieme, R. T., An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slide. clin. chim. Acta, **4** : 317, 1959.
- 8) Van der Helm, H. J., A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isozymes in serum. clin, chim, Acta. **7** : 124, 1962.
- 9) Yakulis, V. J, et al, Agar gel electrophoresis for the determination of isozymes of lactic and malic dehydrogenase, Am. J. Clin. path., **38** : 378, 1962.
- 10) 浅野健夫, 小野昌利, 石川允, 深津栄一, 鷹野護, 乳酸脱水素酵素の isozyme に関する研究, 日消会誌, **61** : 910, 1964.
- 11) 浅野健夫, 小野昌利, 石川允, 深津栄一, 鷹野護, 血液疾患における血清乳酸脱水素酵素とそのアイソザイムの臨床的意義について, 臨床血液, **5** , 326, 1964.
- 12) Wroblewski, F, and K. F. Gregory, Lactic dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94** : 912, 1961.
- 13) 浅野健夫, 福留正郎, 高安正雄, 和氣由紀子, アイソザイムによる血清 LDH 活性の上昇機序解明に関する一考察, 医学のあゆみ, **56** : 655, 1970.
- 14) Weber, G, and G. Pfliegerer, Isozymes in the human epidermis. Ann. N. Y. Acad. Sci., **94** : 933, 1961.

Studies on the exudates formed by the application of  
Unguentum vesicans.

Part 2. Enzymological studies.

Kenkichi KUROSE

Dept. of Internal Medicine  
(Director : Prof. K. HIRAKI)  
Okayama University Medical School

The study was performed to examine the relationship between defense reaction of skin to local stimulation and enzymological change of the exudates produced by the application of Unguentum vesicans.

The activities of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), lactic dehydrogenase (LDH) and LDH isozyme were measured about exudates and sera in hepatitis, cancer, lung tuberculosis, nephritis and other conditions.

The results of the study are summarized as follows.

(1) The activities of GOT, GPT and LDH of exudates were higher than the activities of sera in almost cases. The GOT activity of exudate was paralleled to elevation of GOT activity of serum in hepatitis and cancer, and similar correlation of GPT activity was observed in hepatitis. There was not correlation of changes of LDH activity between exudate and serum.

(2) There was not the relationship between the strength of local inflammatory responses and the enzyme activities of exudates.

(3) LDH isozyme of the exudate was similar to isozyme pattern of epidermis.

(4) The most of GOT and GPT of exudate were released from blood, but LDH of the exudate originated in epidermis.