

痙攣による Aldolase 及び Transaminase の 変動に関する実験的研究

第 3 編

痙攣による Transaminase 活性の変動について

岡山大学医学部第 1 外科教室 (指導: 陣内傳之助教授)

小 田 皓 二

〔昭和 36 年 3 月 31 日受稿〕

第 1 章 緒 言

1937 年 Braustein¹⁾ らが Transaminase (以下 TA と略記す) の存在を発見して以来, 多くの研究者により広汎かつ多岐にわたる業績がなされている。グルタミン酸が転化する化学反応には多くの反応があり, これらの代謝経路がグルタミン酸を中心として交叉している。すなわち, (1) glutamic dehydrogenase による酸化的脱アミノ反応, (2) glutamic decarboxylase による脱炭酸反応, (3) Amido 形成反応, (4) glutaminase によるアミド基脱反応 (5) TA によるアミノ基転移反応などである。

TA はアミノ酸と α -Keto 酸との間の Amino 基の転移を司る酵素であり, その種類も多いが, glutamic oxaloacetic TA (GOT), および glutamic pyruvic TA (GPT) についての研究が最も多くなされている。

TA は広く生体内に含まれており, その分布もほぼ明らかにされている。すなわち, Wröblewski²⁾, Cammaretta³⁾, Cohn⁴⁾, Awapara⁵⁾, Ames⁶⁾ などによりそれぞれ異なった方法を用いて動物体内の種々の臓器, 組織についての測定が行なわれている。これらによると GOT は心筋, ついで肝臓に多く含まれ, GPT は圧倒的に肝臓に多く含まれている。同一組織においては一般に GOT は GPT より活性が高いが, 血清の TA はいずれもはるかに低値を示している。

近時これらの酵素が心および肝疾患において著明に増加することが知られ, 以来これら血清酵素の測定は心筋, 肝細胞の急激な壊死をきたす疾患に高い診断的価値を有することが認められてきた。

すなわち血清 GOT は心筋梗塞において最も診断的価値が高く, Wröblewski and La Due は, 発病

後早期に上昇し, その程度および上昇持続時間は梗塞の大きさにほぼ比例することを明らかにした。これに反して冠不全その他の心疾患では増加しないという⁸⁾。また急性肝炎でも多くの例でかなりの上昇がみられる。GPT は前述の如く心筋よりも肝臓に多く含まれており, 心筋梗塞では増加をみないが, 急性肝炎では極めて著しい上昇が認められ, 症状の改善とともに正常値に復帰し, GOT よりも常に高い値を示すことが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。

neurology の領域において Wröblewski¹¹⁾ は中枢神経系疾患では血清 GOT, GPT ともに有意の変化は認められないといい, 伊藤らもその有意性に対しては否定的態度をとっている¹²⁾¹³⁾。しかし Tagnon¹⁴⁾ は中枢神経系の退行変性, 頭部外傷, 脳血管障害, 多発性硬化症あるいは脳腫瘍において髄液, 血清ともにある程度の上昇を認めたとのべ, 体液中の TA 活性の消長については議論が分れている。

脳に関連した TA の研究としては, 奥村教授門下の種々の動物脳についての研究があり¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾, 教室国土も実験的痙攣家兎, ならびにてんかん患者脳について TA 活性を測定し, そのほか vitamin B₆ 欠乏動物脳²⁰⁾²¹⁾, vitamin B₆ 拮抗物質を投与した動物²²⁾²³⁾ の脳 TA 活性についての報告がある。Davenport²⁴⁾ は glutamic acid が amino 基転移系における B₆ の利用を促進し, かつ正常に amino 基転移反応が行なわれることが, 電撃閾値を正常に保つに必要な条件であるとのべ, 脳 TA が脳機能上に重要であろうとのべている。

しかしながら痙攣と TA の関係に注目した報告は見当たらない現状である。私は先に第 2 編において血清 Aldolase が痙攣に際して増加することを明らかにしたが, 本編においてはカルデアゾール (以下カ

と略記す)による誘発痙攣時の血清 TA について検討し,併せて痙攣前後の脳の TA 活性についても検討を加えた。

第1章 実験方法

1. 実験動物および酵素液の作成法

実験動物としては体重 2.5 kg 前後の成熟家兔を用い,酵素液として血清は採血後溶血を防いで分離し,可及的早期に測定に供した。組織よりの酵素液の作成は第1編に準じて行つた。

2. TA 活性の測定法

GOT, GPT の測定法として,① Paperchromatography による方法,② 分光光度計による方法,③ 比色法,④ Warburg 検圧計を用いる方法等多くの方法が行なわれている。このうち,最も簡便であり臨床面でも広く利用されている Frankel の方法²⁵⁾を採用することにした。その方法を略記すれば次の如くである。

GOT 測定法

試薬:

- 1) 100 mM phosphate buffer pH 7.4
- 2) 200 mM dl-aspartate, 2 mM α -Ketoglutarate (基質液)
- 3) 1m M2,4-dinitrophenyl hydrazine
- 4) 0.4 N NaOH
- 5) 2 mM pyruvate

測定方法: 基質液 1 ml をゴム栓付試験管にとり予め 40°C の恒温槽で温め,酵素液 0.2 ml を加えて混和し,40°C で60分間 incubate する。これに 2,4-dinitrophenyl hydrazine 1ml を加えて室温に20分以上放置する。次に 0.4 N NaOH を 10 ml 加え,ゴム栓をして強振すると赤褐色の着色がみられる。これをさらに室温で30分放置し,490 m μ の波長を用いて光電比色計により吸光度を測定する。blank としては酵素液にかえて蒸溜水 0.2 ml を加えて同様の操作を行なつたものを用いた。標準曲線は 2 mM pyruvate ならびに基質液を試験管にとり,これら種々の濃度のものに 0.2 ml の蒸溜水を加えて操作し,測定して作成した。血清の TA 活性は U/ml で表わし,組織 TA 活性は U/mg を用いた。

GPT 測定法

試薬:

- 1) 100 mM phosphate buffer pH 7.4
- 2) 200 mM dl-alanine, 2 mM α -Ketoglutarate (基

質液)

- 3) 1 mM 2,4-dinitrophenyl hydrazine
- 4) 0.4 N NaOH
- 5) 2 mM pyruvate

測定方法: 基質液に酵素液を加え,これを 40°C 30分 incubate するほかは GOT 測定の操作と同様に行なう。なお酵素活性値は GOT と同じく U/ml, U/mg で表わした。

3. カ誘発痙攣時の血清 TA の測定

痙攣誘発には第2編のべた如く,カ注射法によつた。まず注射前に採血し,ついでカ注射により痙攣を起させ,痙攣終了直後,15分後,60分後,120分後とそれぞれ同様に採血して測定に供した。

4. カ誘発痙攣時の大脳皮質 TA の測定

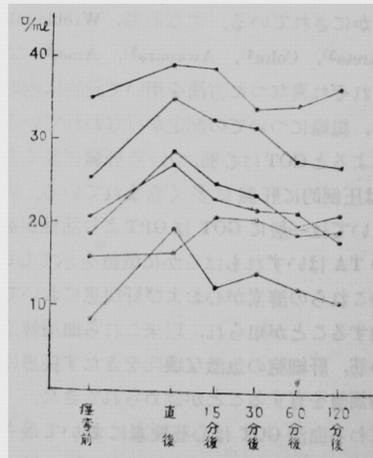
第2編に詳述した操作によりカ注射前に脳組織片を採取し,その後に耳静脈よりカを注射して痙攣を誘発し,痙攣直後に再び同様の操作により,他側より組織片を採取した。痙攣終了直後に組織片の採取を行なつたのは,この時期に血清 TA が最高に達する2例が多かつたからである。これらの組織より酵素液を作成し,大脳皮質の TA 活性を測定した。

第3章 実験成績

1. カ誘発痙攣による血清 TA 活性の変動

正常家兔の血清 GOT 活性は 35.2~8.5 U/ml, 平均 20.8 U/ml とかなりの個体差を認めた。カ痙攣による血清 GOT の変動をみるに,第1図,第1表の如く,痙攣直後は全例に活性の増加を認めた。その上昇の程度は最も著しい上昇をみた例では痙攣前のほぼ2倍に及んでいる。血清 GOT は痙攣直後で活

第1図 カ誘発痙攣による血清 GOT の変動



を測定するに、痙攣前に比し5例中4例に活性の低下を認め、他の1例は不変で平均9.1%の減少をみた。

GPTにおいてはその活性は痙攣前77.6~37.9 U/mg, 平均60.0 U/mgであつた。痙攣により減少をみた例は6例中4例であつた。逆に上昇したものの1例、さらにほとんど変動を認められなかつたものも1例あり、これら変動をみたものでも増加、減少の程度はいずれも軽度であつた。

第5章 考 按

最近の酵素化学の発展により血清TAの測定はとくに心、肝疾患において極めて重要な鑑別診断法として評価され、広く實用されるところとなつている。吉利¹⁾は冠動脈結紮による実験的心筋梗塞において、血清GOTは6時間以内に数倍ないし十数倍にも上昇し、24~48時間で最高に達し、その後は次第に活性値は下降して4~5日後には正常に復するという。この際の血清GOT活性の上昇は壊死心筋に由来することが確められている。血清GPTは上昇の程度が軽度で2~3日後には正常に戻る傾向を示している。

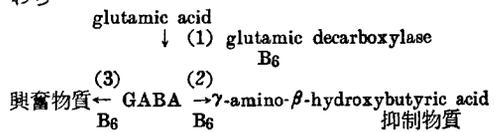
急性肝炎においてはGOT, GPTともに種々の検査成績に先行して上昇するが、GOTは高値を示し、極期には正常の10~100倍にも達する上昇をみるといわれる。これら酵素の上昇は肝の機能自体を反映するものではなく、むしろ急性の組織細胞の傷害に対する反応を示すものと考えられている。この点においては広汎かつ急激な組織の変性、壊死の際に血中に増加するAldolaseと軌を一にするものといえる。しかしながら痙攣時における血清TAの上昇は肝、心疾患に比較して遙かに軽度である。しかも痙攣の終了とともにより速やかに痙攣前のレベルに復帰している。すなわち一度上昇したTA活性も、その原因となるべき例件がなくなれば速やかに正常に復帰するものといえる。これは心筋梗塞あるいは肝炎の場合にもみられることであり、この事実よりすると血清TAもAldolaseの如く組織中の酵素の血中放出と消失の動的平衡の状態にあることを想像させるものである。

痙攣の場合に上昇の程度が軽度に止るのは、痙攣は極めて一過性であり、かつ又なんらの組織傷害をも伴わない点にあるものと考えられる。痙攣に際してAmmonia, Na, K, ChE活性等の変動が認められることはすでに知られているが、私の実験によりAldolaseのほかTA活性も変動することが明

らかとなつた。

また同時に、大脳皮質TA活性の低下の傾向のあることを認めたが、さきに松田²⁾は, INAH, hydroxyamine, desoxypridine, toxopyrimidineなどのvitamin B₆ 酵素系の阻害剤をマウスに投与し痙攣を起こさせた際、痙攣発現の前にすでに脳内TA活性が抑制されることを認め、Roberts³⁾もB₆ 欠乏時は脳TA活性の低下することを報告している。B₆はTAの補酵素であり、B₆ 欠乏の際にはTA活性が低下することは当然のことと考えられる。しかしB₆とは直接関係のない力による痙攣にさいしても僅かながら脳TA活性が低下することは興味あることである。

林⁴⁾は最近痙攣発作の発生機転に関して、その興奮過程および抑制過程ともにγ-aminobutyric acid (GABA)の誘導体が関与するとのべている。すなわち



この際にGABAの代謝の(2), (3)の過程にもGABAが関与するとのべているので、痙攣発作による急激な代謝により、急性のB₆ 欠乏状態が惹起されることも十分考えられる。

血清TA活性と脳のそれとの関係についてであるが、本実験によるとカ痙攣により血清TAは上昇し、逆に脳TAは低下するという成績をえた。しかし正常時における脳と血清のTA活性の比は約数千:1であり、脳内における局所的な変動も考えられ、また同時に起こると考えられる他の諸組織の変動も無視することはできないため、本実験の成績のみから両者の出納と直接関係づけて推論することは困難と考えられる。

第5章 結 論

カ誘発痙攣家兔の血清および大脳皮質TA活性をFrankel法により測定し、次の結論をえた。

- 1) 血清GOT, GPTは痙攣により一過性に上昇する。
- 2) 大脳皮質GOT, GPTはカ痙攣により軽度の活性の低下を認める。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜つた恩師陣内教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、教室森昭胤博士の御助言を謝す。

文 献

- 1) A, Braustein: Advance in Protein Chemistry 3
1. 1947.
- 2) F, Wröhlewski: Proc. Soc. Exp. Biol. & med.
91, 569. 1956.
- 3) P, Cammarata: J. Biol. Chem. 187, 439, 1950.
- 4) P, Cohen: J. Biol. Chem. 140, 711. 1941.
- 5) J, Awapara: J. Biol. Chem 194, 497. 1952.
- 6) S, Ames: J. Biol. Chem 166, 81, 1946.
- 7) F, Wröhlewski & La Due. Circulation 11,
871. 1955.
- 8) 吉利他: 呼吸と循環 6, 749. 1958.
- 9) 百瀬: 医学のあゆみ 33, 114. 1960.
- 10) 常岡他: 最新医学 33, 161. 1958.
- 11) F, Wröhlewski: Am. J. Clin. Path 28, 269.
1957.
- 12) 伊藤: 最新医学 11, 1636, 1956.
- 13) 伊藤: 最新医学 11, 2529. 1956.
- 14) H, Tagnon: New Engl. J. Med 249, 650. 1953.
- 15) 今井: 岡山医学誌 71, 1641. 1959.
- 16) 山田: Ibid 71, 7551. 1959.
- 17) 小野: Ibid 72, 507. 1960.
- 18) 近藤: 生化学 30, 449. 1958.
- 19) 国土: 岡山医誌 71, 5651.
- 20) N, Jonhaxy: Arch. Biochem. 28, 36. 1952.
- 21) 堤: 生化学 30, 540. 1958.
- 22) 松田: 生化学 29, 220. 1957.
- 23) 住田他: 生化学 28, 745. 1956.
- 24) V. Davenport: 脳神経領域 9. 51. 1951より
引用.
- 25) S, Frankel: Am. J. Clin. Path. 28, 56. 1957.
- 26) E, Roherts: J. Biol. Chem 191, 277. 1951.
- 27) 林: 第36回日本生理学会.

Experimental studies on aldolase and transaminase in
rabbits with convulsion

Part III On transaminase activity in serum and cerebral cortex
after convulsion

By

Koji Oda, M. D.

Dept. of Surgery. Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. D. Jinnai)

The transaminase activity in serum and cerebral cortex of rabbits were measured by Frankel method. The results were as follows.

1. After convulsion caused by metazol, GOT and GPT activities in the rabbits serum temporarily increased.
2. GOT and GPT activities in cerebral cortex slightly decreased after convulsion.