

外傷脳及び脳腫瘍における Lysosome 酵素の 遊離並びに全活性の相関に関する研究

東邦大学医学部第2外科学教室（指導：栗津三郎教授）

清 木 義 勝

〔原稿受付：昭和54年11月10日〕

Changes of Lysosomal Enzyme Activity in Injured Brain and Tumors —Particularly the Correlation between Free and Total Activities of Lysosomal Enzymes—

YOSHIKATSU SEIKI

Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University
(Director : Prof. Dr. SABURO AWATSU)

The activity of Lysosomal enzymes, particularly of β -glucuronidase and acid phosphatase, was examined biochemically and histochemically in human brain tumors as well as in experimentally produced injury and tumors of the rat brain. Biochemical study is composed of measurements of total, free and binding activities of each enzyme. Further the effects of steroids and dibutyl 3' 5'-adenosine monophosphate (DBc-AMP) on the activity of these enzymes were also investigated. The results were as follows:

1. The cerebral cortex of normal rats has an even ratio between free and binding activities of both β -glucuronidase and acid phosphatase.
2. Injured brain tissue of rats: The highest total activity of β -glucuronidase is obtained on the 5th injured day. The total activity of acid phosphatase is almost the same as that of β -glucuronidase. The increase of free activity of both enzymes, on the other hand, is more rapid than that of the total or binding activity. The start of the elevation of free activity is also earlier than others. Further, the elevation of free activity is transient and the highest level is obtained on the 3rd injured day and the activity rapidly goes back to the normal level after the 5th day.

Key words : Lysosomal enzyme, β -glucuronidase, Acid-phosphatase, Dibutyl 3',5'-adenosine monophosphate (DBc-AMP), Steroid hormone, Experimental brain tumor, Injured brain, Human glioma.

索引語：ライソゾーム酵素, β -グルクロニダーゼ, 酸フォスファターゼ, サイクリック AMP, ステロイドホルモン, 実験的脳腫瘍, 外傷脳, 神経膠腫.

Present address : Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University 6-11-1 Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo, 143, Japan.

3. Brain tumor of rats: Total activity of both β -glucuronidase and acid phosphatase is highest in this group, and free activity accounts for 80 percents of total activity.

4. Human brain tumors: The sequence of total activity of both enzymes shows almost the same as the rat brain tumors do. The free activity of them accounts for 70 to 80 percents of total activity.

5. An administration of steroids inhibits total activity of both β -glucuronidase and acid phosphatase by 19 percents and 25 percents respectively in the injured group on the 5th day. The free activity of β -glucuronidase is inhibited by 43 percents while that of acid phosphatase is not inhibited.

6. DBc-AMP, likewise, inhibits total activity of β -glucuronidase and acid phosphatase by 37 percents and 49 percents respectively as compared with the injured rats without treatment of DBc-AMP on the 5th injured day. As is the case of steroid administration, there is inhibition of free activity of β -glucuronidase by 33 percents on the 5th day, but no inhibition of free activity of acid phosphatase is entertained.

7. Enzyme histochemical study of the injured brain demonstrates an increase of β -glucuronidase activity in a diffuse fashion in the injured area with deposit of coarse granules. In rat brain tumor β -glucuronidase activity is also increased diffusely, although the coarse granules as seen in the injured rats are not recognized except for the periphery of the tumor tissue. Human brain tumors show quite similar changes as the experimentally produced tumors.

The author presumes that the brain will become abnormal, when the balance between free and binding activities is disturbed and that the inhibition of enzyme activity by so-called lysosomal stabilizers, may not be the best therapy.

緒 言

ライソゾーム酵素は、種々の細胞環境の変化や病態変化に伴って、形態学的のみならず、その機能的な面においても、多様な変化を示す。外傷脳の急性期には repairing enzyme として活発に活動し、又、正常細胞や悪性脳腫瘍細胞の細胞分裂、増殖に際しても著明な活性変動を示している。さらに、細胞内外の病的な環境変化が起らなくても、ライソゾーム酵素は、脳の発育、加齢に伴って盛んな活性変動を起している。著者は、ライソゾーム酵素の役割を、特に、脳細胞の損傷時、および、細胞分裂、増殖時の2つの事象にしばって、生化学的手段と酵素組織化学的手段を用いて検討を試みた。ライソゾーム酵素としては β -glucuronidase (以後 β -G と略) と acid-phosphatase (以後 A-P と略) の2つの酵素を指標とした。また、対象資料として、外傷に伴う反応変化を検討する為に実験

的外傷脳ラットを作製し、細胞分裂、増殖に伴う変動を調べる為に、ENU 誘発脳腫瘍ラットおよび人悪性脳腫瘍を用いた。これら異った病態における2つの酵素の活性変動を free と binding activity の両面から酵素化学的に検討し、他方、酵素組織化学的手法によっても定性的に検討することにより、同一酵素の各種病態時における異った活動を解明し、そのことから病態時における Lysosome 酵素の役割を明らかにしようとした。

実験動物作製法

i) 実験的外傷脳ラットの作製：既に中野によって報告された方法²⁴⁾に従い、雌雄の別なく、体重 250~300g の wistar 系ラットを用いて作製した。ii) 実験的脳腫瘍ラットの作製：10週目の日本クレア産 Sprague-Drawley (以後 S.D と略) 系雌ラットを使用した。Ethylnitrosourea (以後 ENU と略) は、生

理的食塩水に ENU 10mg/ml の割合で suspend し、アラビアゴムを混入して、5%懸濁液とした。S.D ラットは腔栓形成を確認した日を妊娠、第1日目とし、妊娠14日目に ENU 50mg/kg を腹腔内注射し、経胎盤投与により、その子供に脳腫瘍を発生させ、この脳腫瘍組織を使用した。

I. 試料の調製

a) 生化学的検索時の試料

i) 実験の外傷脳ラット：左側大脳半球前頭部に切截手術を施行した白鼠を術後、経時的に断頭し、全脳を摘出、可及的速やかに脳軟膜、血管を取り除き、附着している血液を出来るだけ取り除き試料とした。手術後1ヶ月以上経過した外傷脳の切截部位の前後、約2mmの範囲の cortex には反応性に gliosis が形成されており、これを外傷脳の慢性期の試料とした。対照試料は右大脳半球の左側切截部位に一致した正常側脳皮質を同範囲切除し、使用した。また、normal control としては、非手術成単の左大脳半球の同一部位を用いた。

ii) 実験的脳腫瘍ラット：経胎盤投与法により作製した仔 ENU 誘発脳腫瘍ラットを飼育し、片麻痺、眼球突出、鼻出血、眼球出血、痙攣等、明らかな脳腫瘍症状を呈したラットを断頭、瀉血後、全脳を摘出、速やかに脳軟膜、血管を取り除き、血液を出来るだけ除去した。肉眼的に明らかな腫瘍部位から、平均 50mg を採取し試料とした。

iii) 人悪性脳腫瘍：手術時に摘出された腫瘍組織を直ちに、その場で血液を除き、一検体、約50mg を試料として使用した。

b) 酵素組織学的検索時の試料

各種摘出された試料は、直ちに Baker のホルモンカルシウム固定液 (PH 7.0~7.2) にて24時間固定し、その組織を試料とした。

II. 生化学的酵素測定法

ライソゾーム酵素の測定には total activity と free activity を測定し、両者の差より binding activity を算出した後、この3つの酵素画分の変動について検討した。total activity の測定は、採取した組織を終濃度 0.05% Triton X-100 溶液にて homogenize、完全に活性化させ酵素標品とした。free activity の測定には、0.32M Sucrose 溶液 (PH 7.2-7.4) を用いて homogenize したものを酵素標品とした。

i) β -Glucuronidase 測定法

total activity および free activity 測定用に調製さ

れた酵素標品を Fishman¹³⁾ 及び加藤¹⁸⁾の変法に従って測定した。即ち、sample 0.1ml に 0.2M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (PH 4.5) 0.35ml 並びに基質として p-nitrophenyl-glucuronide 0.05ml を混じ、37°C 温水にて24時間加熱後、アルカリ試薬として 0.4M glycine buffer (PH 10.45) 1.0ml を追加、10分間室温放置後、精製水 3.0ml にて希釈、光電比色計 (日立101型) 400nm にて比色定量した。標準液としては p-nitrophenol を使用し、単位は遊離 p-nitro phenol の μ g 数を組織蛋白量当りとして求め、時間当りの μ g 数を算出した。

ii) Acid-phosphatase 測定法

同一の酵素標品を用いて King-Armstrong¹⁷⁾ の変法に従い測定した。即ち、クエン酸緩衝液 1.0ml に基質として、フェニルリン酸 2-ナトリウム 4-アミノアンチピリン 1.0ml を加え、37°C 温水にて3分間 pre-incubation 後、sample 1.0ml を混じ、37°C で60分間温浴した。発色液として、フェリシアン化カリウム 20ml を用いて充分混和させ、約15分間室温放置後、570nm にて比色定量した。標準液としては、phenolphthalein を用い、micro g. phenol/mg. protein /hr. として算出した。

III. 酵素組織学的検索法

a) 組織切片の作製

酵素組織標本作製に際し、先に Baker 液に固定した各種試料を Holt's Hypertonic Gum Sucrose (0.88 M) 洗浄液にて20時間以上洗浄した後、大脳切片を作製、クリオスタット台に乗せ、-25°C~-30°C にて急速冷凍後、厚さ 6~10ミクロンに slice した。slice にあたっては、大脳の矢状方向、前頭断方向、脳表の slice と3方向の組織切片を作製した。

b) β -Glucuronidase 染色法

林たちによって新しく合成された naphthol AS-BI β -glucuronide を基質として用いた simultaneous-coupling アゾ色素法を用いた¹⁶⁾。即ち、基質液として Naphthol AS-BI (7-bromo-3 hydroxy-2 naphtho-anisidide β -glucuronide) 遊離酸 28.0mg を 0.05M 重炭酸ソーダ 1.2ml で完全に溶解し、0.2N 酢酸、酢酸ナトリウム緩衝液 (PH 5.0) を加え 100ml とした。4%亜硝酸ナトリウム液 0.3ml にパラロザニリン液を同量加え、ジアゾ化後、基質液 10ml を加え、1N-NaOH にて PH 5.2 に調整する。さらに、精製水を加え染色液の総量を 20ml とし、No. 1 の尹紙にて尹過後、適量をコップリングジャーに分注、これに切片

をひたし、37°Cにて5~20分間温水加温の後、組織切片を取り出し、蒸留水にて2回洗浄後、スライドガラスに乗せ自然乾燥、ダイヤモンドスにて封入後、光顕にて写真撮影した。

薬 剤 投 与 法

1) Steroid hormone 投与法

i) 実験的外傷脳ラットの急性期では、手術日より、連日7日間。 ii) 外傷脳慢性期では、外傷後2~3ヶ月目に連日7日間。 iii) 実験的脳腫瘍ラットでは種々の脳腫瘍症状が出現した日より、連日7日間。 iv) 正常脳ラットに対しては、生後3ヶ月目の成単に連日7日間、各々 Dexamethasone 1mg/kg を皮下投与した。

2) Dibutyl 3',5'-adenosine monophosphate 投与法 (以後 DBc-AMP と略)

Steroid hormone と同じ条件下にて、DBc-AMP 2mg/kg を連日5日間、皮下投与した。

実 験 成 績

A) 生化学的酵素活性

1. 正常成単脳における β -glucuronidase, acid-phosphatase について

正常成単脳での total activity, free activity 並びに

binding activity の変動を見ると free activity と binding activity は、ほぼ1:1の対応を示した (Table-1)。

2. 実験的外傷脳組織における経時的 lysosome 酵素の変動について

作製された外傷脳ラットを、手術後、1, 3, 5, 7, 14, 30, 60病日に各々断頭し、手術側外傷脳組織と対側同部の大脳皮質を対照として測定した。

a) 外傷脳組織における Total activity の変化—

β -glucuronidase, acid-phosphatase について：

total activity の経時的変動を観察すると、急性期は、両酵素とも、受傷後から著明な活性値の上昇を示し、第5病日で β -G は正常値の約4.6倍、A-P は約2.5倍の活性値を認め、その後、漸時、活性値は下降し、4週から8週目で、ほぼ正常値に復している (Table-2)。又、通常、gliosis 完成期として知られている受傷後、4週から8週目を見ると、この時期には、両酵素とも活性値は、ほぼ正常域にあり、ほとんど変化を示さなかった (Table-2)。

b) 外傷脳急性期における free activity の変化：

外傷脳急性期における両酵素の free activity は、total activity の変化とは、少々、傾向を異にしている。 β -G における free activity は受傷後3日目で、すでに活性値は peak に達し、正常値の約2.1倍を示し、5日目頃まで高値が維持され、その後、急激に正

Table 1. Lysosomal enzyme activities in normal rat brain

Conditions	β -glucuronidase (μ g/mg-protein/hr)	Acid-phosphatase (μ g/mg-protein/hr)
Total activity (6)	2.06±0.32	65.1±5.50
Free activity (6)	1.27±0.18	33.2±3.25
Binding activity (6)	0.93±0.25	31.4±4.50

Table 2. Changes of lysosomal enzyme activity in injured rat brain

Conditions	β -glucuronidase (μ g/mg-protein/hr)		Acid-phosphatase (μ g/mg-protein/hr)	
	Total activity	Free activity	Total activity	Free activity
3 days (9)	6.30±0.36	4.34±0.64	90.0±13.5	51.2±4.19
5 days (9)	9.52±0.84	4.16±0.42	128.1±20.5	51.1±4.08
7 days (9)	5.21±0.42	2.16±0.19	111.7±17.8	17.4±1.44
14 days (9)	4.10±0.38	2.28±0.25	90.0±10.8	20.3±2.65
30 days (9)	2.81±0.42	2.14±0.30	66.5±5.98	26.2±3.02
60 days (9)	2.94±0.34	1.67±0.16	60.3±6.64	28.4±4.52

Values represent as mean±S.D. () : Cases

Table 3. (a) Lysosomal enzyme activity in experimental brain tumor

Conditions	β -glucuronidase	Acid-phosphatase
Total activity (μ g/mg-protein/hr) (6)	33.6*~117.6** (75.6)***	167.4~243.0 (205.2)
Free activity (μ g/mg-protein/hr)	26.9~94.1 (60.5)	117.2~194.4 (155.8)

(b) Lysosomal enzyme activity in human brain tumor

Conditions	β -glucuronidase	Acid-phosphatase
Total activity (μ g/mg-protein/hr) (9)	45.2~64.8 (52.7)	105.6~121.9 (111.7)
Free activity (μ g/mg-protein/hr)	38.5~41.7 (39.8)	84.1~94.1 (87.6)

* minimum value ** maximum value *** mean value () cases

常値へ復している (Table-2)。この傾向は A-P の free activity でも全く同様で、3日目、すでに正常値の約2倍の値を示し、5日目以後、急激に活性値は低下を示した (Table-2)。

3. 実験的脳腫瘍組織におけるライソゾーム酵素の変動

ENU 経胎盤投与¹¹⁾により作製された実験的脳腫瘍ラットの腫瘍組織中のライソゾーム酵素活性の変動を検討する為、SD 系脳腫瘍ラット9匹を用いて同様の検討を行った。実験的脳腫瘍組織中の β -G、A-P 活性は正常脳組織に比し異常に高い値を示した。 β -G では total activity で平均 75.6/mg proteni/hr、A-P で平均205.2であった。この内、free activity の占める割合は両酵素とも、約80%を示した (Table-3a)。

4. 人脳腫瘍組織におけるライソゾーム酵素の変動

人脳腫瘍組織は9例で、Meningioma (1), Astrocytoma (3), Glioblastoma multiforme (3), Acoustic neurinoma (2) である。 β -G、A-P ともに活性値の変動巾は広いが、実験的脳腫瘍組織と同様に total activity は、各々、平均52.7、111.7と異常な高値を示し、さらに free activity の占める割合も70~80%と同様の傾向を示した (Table-3b)。この結果から、脳腫瘍組織における total activity の異常高値は free activity の活性上昇に依る事が判明した。

5. ライソゾーム酵素に対する薬剤効果

a) Stabilizer としての steroid hormone の効果

i) 正常脳組織：正常成兎脳での free activity と

binding activity の比が、ほぼ1:1の対応をしている事は前述したところであるが、この時期に steroid hormone を投与しても、ライソゾーム酵素は何らの影響も受けず、1:1の対応は崩れなかった (Table-4a)。

ii) 外傷脳組織：急性期における steroid hormone の効果をみると total activity は β -G で steroid 非投与群に比し、3日目29%、5日目19%、7日目で27%の活性抑制が認められ、A-P でも β -G と同様に3日目40%、5日目25%、7日目で33%の抑制効果が認められた (Table-4b)。この変化を free activity の面から観察すると、 β -G では steroid 非投与群に比較して、3日目35%、5日目43%と明らかな抑制効果が認められたが、A-P では β -G の場合と異なり、急性期の3日目、5日目でも、全く非投与群との差は認められず高値を示し、抑制効果は認められなかった (Table-4b)。

b) 細胞の分裂、増殖の stabilizer と云われる DBc-AMP の効果

i) 正常脳組織：正常成兎脳に対する DBc-AMP の効果は steroid hormone と全く同様で、 β -G、A-P ともに、全く影響は受けなかった (Table-5b)。

ii) 外傷脳組織：急性期における DBc-AMP の効果は total activity としては β -G で非投与群に比し、3日目46%、5日目37%、7日目で16%と著明な活性抑制を受けている。A-P でも β -G と同様に、DBc-AMP 投与群では、3日目で41%、5日目で49

Table 4. (a) Effect of steroid hormone on lysosomal enzyme activity in normal rat brain

Conditions	β -glucuronidase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)	Acid-phosphatase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)
Total activity (6)	2.59 \pm 0.58	62.7 \pm 4.97
Free activity (6)	1.40 \pm 0.13	31.7 \pm 3.23
Binding activity (6)	1.19 \pm 0.35	31.0 \pm 4.10

(b) Effect of steroid hormone on lysosomal enzyme activity in injured rat brain

Conditions		β -glucuronidase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)		Acid-phosphatase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)	
		Total activity	Free activity	Total activity	Free activity
3 days	non treated (9)	6.30 \pm 0.36	4.34 \pm 0.64	90.0 \pm 13.5	51.2 \pm 4.19
	Steroid (6)	4.50 \pm 0.61	2.83 \pm 0.93	54.2 \pm 6.51	51.9 \pm 5.13
5 days	non treated (9)	9.52 \pm 0.84	4.61 \pm 0.42	128.1 \pm 20.5	51.1 \pm 4.08
	Steroid (6)	7.76 \pm 0.47	2.84 \pm 0.23	95.5 \pm 12.5	62.4 \pm 6.85
7 days	non treated (9)	5.21 \pm 0.42	2.16 \pm 0.19	111.7 \pm 17.8	17.4 \pm 1.44
	Steroid (6)	3.80 \pm 0.37	2.94 \pm 0.38	74.5 \pm 8.19	21.0 \pm 1.95
30 days	non treated (9)	2.81 \pm 0.42	2.14 \pm 0.30	66.5 \pm 5.98	26.2 \pm 3.02
	Steroid (6)	2.73 \pm 0.20	1.89 \pm 0.28	71.1 \pm 6.97	35.6 \pm 3.86

Values represent as mean \pm S.D. () : Cases

Table 5. (a) Effect of DBc-AMP on lysosomal enzyme activity in normal rat brain

Conditions	β -glucuronidase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)	Acid-phosphatase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)
Total activity (6)	2.73 \pm 0.20	64.8 \pm 3.03
Free activity (6)	1.61 \pm 0.81	33.7 \pm 3.07
Binding activity (6)	1.12 \pm 0.19	31.1 \pm 3.05

(b) Effect of DBc-AMP on lysosomal enzyme activity in injured rat brain

Conditions		β -glucuronidase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)		Acid-phosphatase ($\mu\text{g}/\text{mg}\text{-protein}/\text{hr}$)	
		Total activity	Free activity	Total activity	Free activity
3 days	non treated (9)	6.30 \pm 0.36	4.34 \pm 0.64	90.0 \pm 13.5	51.2 \pm 4.19
	DBc-AMP (6)	3.43 \pm 0.58	2.87 \pm 0.23	53.2 \pm 6.80	50.9 \pm 4.20
5 days	non treated (9)	9.52 \pm 0.84	4.61 \pm 0.42	128.1 \pm 20.5	51.1 \pm 4.08
	DBc-AMP (6)	5.98 \pm 0.76	3.07 \pm 0.46	65.2 \pm 7.82	56.4 \pm 5.02
7 days	non treated (9)	5.21 \pm 0.42	2.16 \pm 0.19	111.7 \pm 17.8	17.4 \pm 1.44
	DBc-AMP (6)	4.36 \pm 0.36	3.10 \pm 0.16	61.4 \pm 4.91	21.7 \pm 2.06
30 days	non treated (9)	2.81 \pm 0.42	2.14 \pm 0.30	66.5 \pm 5.98	26.2 \pm 3.02
	DBc-AMP (6)	3.12 \pm 0.54	2.22 \pm 0.20	71.2 \pm 7.04	37.4 \pm 4.12

Values represent as mean \pm S.D. () : Cases

%, 7日目で45%の著明な抑制を受けていた (Table-5a)。一方, free activity に着目して, 急性期の両酵素の変動を観察すると, β -G では, 非投与群に比較して, 3日目で34%, 5日目で33%と明らかな活性抑制を認めたが, A-P では, steroid 投与群と同様に3日目, 5日目で全く抑制効果を受けなかった (Table-5b)。

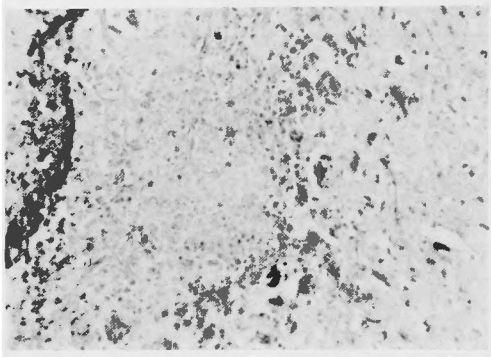


Photo. 1 Injured brain of rat : 5 days after operation.

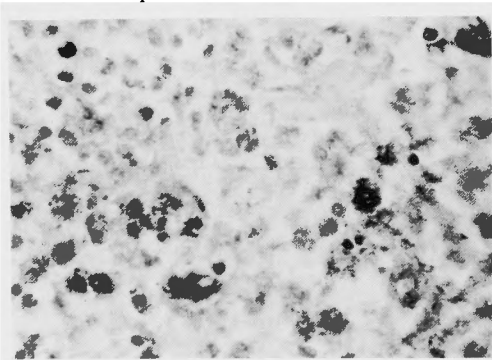


Photo. 2 Injured brain of rat : 5 days after operation.

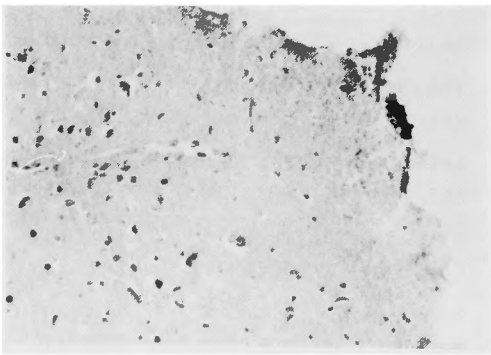


Photo. 3 Injured brain of rat : 4 weeks after operation.

B) 組織化学による実験成績

1) 外傷脳による変化

術後3日~5日: 薬剤未処置群では, 切截部位に一致して, β -G が比較的, 粗大顆粒として濃染されるが, 3日目では, 顆粒の密度は粗であるのに対し, 5日目では, 明らかに, 切截部位に限局して, 非常に密度の高い染色像が得られた。一方, steroid, DBc-AMP

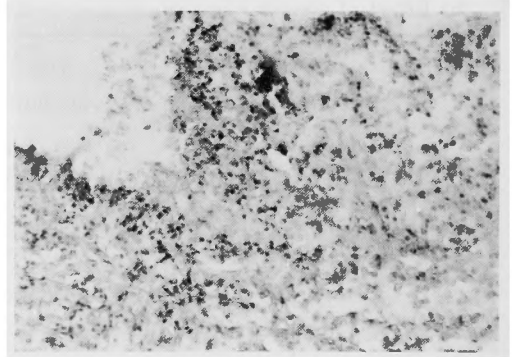


Photo. 4 Experimental brain tumor of rat.

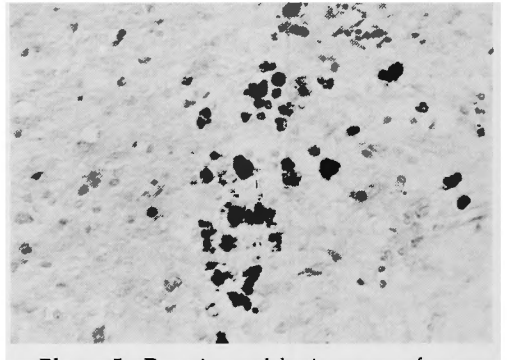


Photo. 5 Experimental brain tumor of rat. Border area between tumor and normal tissue.

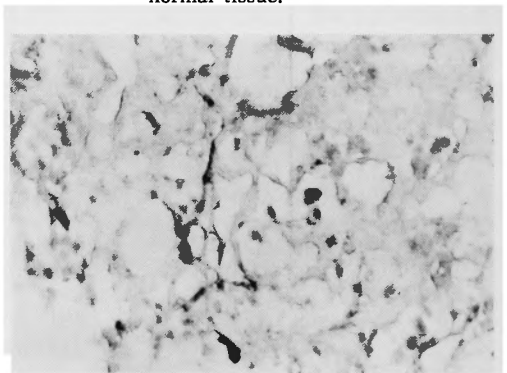


Photo. 6 Human brain tumor.

処置群でも、未処置群と同等に β -G が顆粒として染色され、組織化学によっては、明らかな抑制効果を認める事は出来なかった。

術後7日：薬剤未処置群では、未だ切截部位にて β -G 顆粒の強い反応を認めるが、5日目に比して染色度は弱く、密度も粗であった。steroid, DBc-AMP 処置群では、未処置群に比し、明らかに染色度は低下していた。

術後30~60日：この時期には、切截部位にても、 β -G の染色像は全く認められなかった。

2) 実験的ラット脳腫瘍組織

腫瘍組織中での β -G は diffuse な染色像としてとらえられるが、はっきりとした個々の顆粒としては染色されない。しかし、正常脳組織との境界部では、比較的粗大な顆粒として染色された。

3) 人脳腫瘍組織

ラット脳腫瘍組織と同様に、腫瘍組織全体に diffuse な染色像としてとらえられるが、腫瘍の種類によっては、比較的微小顆粒としても染色された。

考 察

A) 生化学的検討

lysosome 酵素が1955年、de, Duve⁹⁾ 等により生化学的に発見されて以来、この中に含まれる酸性水解酵素も初期の5種類から、今や、40数種類を数えるに至った。lysosome の機能も細胞内での消化(digestion)、異化(catabolism)、貯蔵(strage)、輸送(vesicular transport)など多岐にわたり、さらに、最近では、生理的な細胞¹⁾²⁷⁾分裂から老化現象⁷⁾²⁰⁾、更に、悪性腫瘍の細胞分裂³⁾にまで、何らかの形で関与すると云われている。ライソゾーム酵素活性の表現形式について de Duve らは bound activity (latent activity), free activity⁹⁾ として表し、Dingle らは unsedimentable activity, Sedimental activity¹⁰⁾³⁶⁾ として報告しているが、今回、著者は、外傷脳、実験的脳腫瘍、人脳腫瘍など各種病態における細胞での lysosome 酵素の動態を β -G, A-P の2種類の酵素を対照として total activity, free activity, binding activity の3つの表現形式に分けて、その変動を分析し、lysosome の機能を酵素化学的に詳細に検討した。

1. 細胞障害時の lysosome enzyme の変動

脳組織が損傷を受けると、出血、壊死、浮腫等急性期の反応を経て、融解、吸収、修復と云う一連の脳組織反応が生じる。これに伴ない細胞レベルで lysosome

酵素活性が大きく変動すると云われている。著者の実験においても、total activity の変化として、急性期で β -G, A-P ともに上昇し、第5病日で peak を示し、それぞれ正常値の4.6倍、2.5倍の活性値を示した。7日以後でも、なお高値を持続するが、その後、漸時、下降して4週から8週には、ほぼ正常値に復している (Table-2)。free activity は β -G, A-P ともに受傷後3日目で、すでに peak に達し、それぞれ、正常値の3.4倍、1.5倍の活性値を示した。しかし、その後 free activity は total activity とは態度を異にし、受傷後5日目より急激に低下を示し、受傷後7日目には正常値に復している (Table-2)。細胞障害時に生じた著明な lysosome 酵素の活性上昇が従来考えられていた lysosome 酵素に対する見地より見ると、今回、得られた著明な total activity の上昇現象に関しては説明出来ない。この現象は、いわゆる“bound form→free form”の theory で説明された lysosomal repairing enzyme の機能仮説をはるかに越えた複雑な機能と現象が生じていることを示すものと考えられる。少なくとも、細胞障害時に lysosome 酵素は細胞内環境変化に、直ちに対応して反応し、細胞内に、急速に induce されるものであること、しかも、

2つの存在様式として示した free activity と binding activity は、単に同一機序に基づき活性化され、相互間で変換されて型を変えるものとは言い難く、複雑な機構によって細胞内で生成、消失されていると思われる。この考えを裏づける事実として、著者は free activity, binding activity の変動を正常脳の活性値に対する増減率として検討を加えてみた (Fig. 1)。両酵素とも、それぞれの酵素活性間において、明らかに上昇速度と増加率との間に差を生じている。受傷後、まず最初に free activity が急激に上昇し、3日目でピークに達し、その後、急速に低下さ、7日目には正常活性値に復している。しかも、この free activity 上昇は、明らかに induce されたものと考えなければ説明出来ない値を示している。一方、binding activity は free activity のピークを示す3日目以後も急激に上昇を続け、5日目にピークを持ち、それ以降は、徐々に減少する態度を示した。この2つの存在様式を示す enzyme activity の統合として total activity のほぼ4週にわたる細胞障害時の repairing enzyme activity がとらえられた事は極めて、重要な興味ある事実と考えられる。しかも、後述するが、脳細胞障害の修復に重要な役割を持つと考えられ、しかも lysosome

Lysosomal Enzyme Activities in Injured Rat Brain

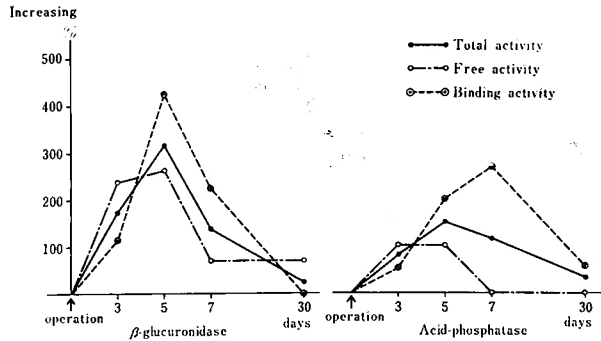


Fig 1.

酵素 に対しては、代表的な stabilizer である steroid hormone に対する free activity と binding activity の反応性は全く異なり、障害初期に急増する free activity は、全く無反応で stabilize されず遅れて上昇し、長期間活性化されている binding activity がきわめて著明な反応を示すことは、2つの異なった活性型が細胞障害に対しては、明らかに異なった反応機構から生じ、又、役割も異なるものであらうと推察される。少なくとも、この現象から、細胞障害に伴う lysosome 酵素の活性上昇は repairing mechanism の一環としての生体反応であり、lysosome 酵素としては、主として binding activity と云われる部分が主役を演じていると考えられる。

2. 細胞分裂における lysosome 酵素の変動

(実験的脳腫瘍、人脳腫瘍):

lysosome 酵素自体に蛋白分解能や DNA 分解能が存在することより、細胞分裂に lysosome の関与が考えられる事を Allison が報告して以来²⁾、細胞分裂に伴う lysosome 酵素の変動についての多くの報告がなされてきた。特に、ライソゾーム酵素活性の変動から、悪性腫瘍細胞の発生機序を解明しようとする試みは多数の研究者達によってなされている。著者も、今回、ENU 誘発実験的脳腫瘍組織と人脳腫瘍組織における lysosome 酵素活性を free activity, binding activity の面より分析し、悪性腫瘍とライソゾーム酵素との関連を検討した。

ライソゾーム酵素の変動については、すでに Allison²⁾, Allen⁴⁾, Monis¹⁹⁾, Fishman¹²⁾⁵⁾²⁵⁾²⁹⁾ らにより悪性腫瘍組織における lysosome 酵素が著しく高い事は報告されている。著者の研究においても同様に、実験

的脳腫瘍の β -G は total activity で、正常脳の約17~59倍、A-P では、約3~4倍の異常高値を示した (Table-3a)。さらに、両酵素に共通して free activity が total activity の70~80%を占める結果を得た。この傾向は、人脳腫瘍組織においても、全く同様であった (Table-3b)。この結果から、脳腫瘍組織における total activity の活性上昇は、ほとんどが free activity によるものである事は明白である。この事実は free activity が腫瘍細胞の分裂増殖の際に、何らかの役割を演じているにちがいないと考えられる。一方、佐藤、柴田ら²⁸⁾³⁰⁾は、外傷脳急性期における lysosome 酵素の変動に関する報告の中で、外傷脳組織の急性反応としての出血、脳浮腫等のピークは、一般的には、3日目までであり、 β -G、A-P の活性値が5日目にピークを示した事は、repairing enzyme としてのライソゾーム酵素の働きだけでは説明出来ないことを指摘した。この点に関して、著者は、外傷脳において、5日目に見られる total activity のピークは free activity の peak と、上昇して来た binding activity の相加作用によって引き起こされた結果であることを示した。また、柴田、佐藤らは、外傷脳で受傷後5~7日目頃より、組織学的に glia 細胞の反応性増殖が急速に起っていることに注目し、lysosome 酵素の total activity のピークが5日目にあることを、細胞分裂に関連するものとしてとらえている。今回の著者のデータから、この5~7日目には binding activity の急増があることが明らかとなった。この事実は、腫瘍組織での lysosome 酵素の活性型が、大部分 free activity が占める事とは、全く異なる現象である。これは、ライソゾーム酵素が細胞分裂増殖に密接に関連して活動

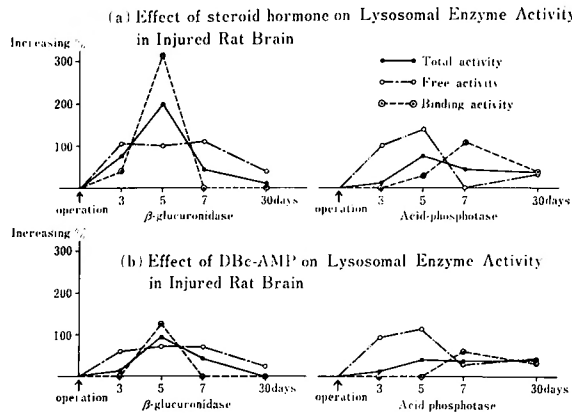


Fig. 2

していることを裏つけたものであり、同時に又、腫瘍細胞と正常細胞の分裂、増殖時におけるライソゾーム酵素の存在型が異なることを証明したものである。損傷脳と腫瘍細胞で得られた細胞分裂現象に際し、lysosome 酵素変動の相違の mechanism を説明することこそが、正常細胞と腫瘍細胞の細胞分裂機構の相違の解明に関連するものと期待される。

3. Steroid hormone と lysosomal enzyme

Steroid hormone がライソゾーム酵素を stabilize する事を Weissmann³⁶⁾³⁷⁾, Briggs⁶⁾ らが報告している³¹⁾。著者の実験でも、外傷脳急性期で、β-G は20~30%、A-P は30~40%の total activity の抑制効果を認め、諸家の結果と一致した (Table-4b)。しかし、free activity に対する抑制効果は β-G で認められたものの、A-P では、全く認められなかった。これは lysosome 酵素の種類の違いに原因するのか、あるいは、同じ生体内での酵素の機能的特異性に原因するのか、又、同一酵素の有する存在形式の特有の反応機能の相違によるのか、未だ、はっきりした解明は得られていない。しかし、これを薬剤未処置群の結果と同様に、正常脳に対する増加率で表わして見ると、両酵素とも、非常に共通した動きを示した。即ち、β-G の free activity は未処置群と同様に、受傷直後より若干の抑制は受けているものの、上昇開始は、最も早く、3日目で peak に達し、その後、上昇は示さなかった。これに対し binding activity は受傷早期より、著明に抑制され、その上昇速度は極端に鈍り、3日目頃より上昇傾向を示す。peak 時の5日目では30%、7日目には100%の抑制を受けていた (Fig.-2a)。この現象

は A-P では一層著明で free activity は受傷直後から全く抑制されず、早期より一過性の増加を示し、3日目で、すでに peak に達している点、これに反して binding activity は β-G 以上に、早期より完全に抑制されている (Fig.-2a)。この結果から、外傷脳急性期に steroid hormone によって stabilize される部分は binding activity にはかならないと考える。

4. DBC-AMP と lysosomal enzyme

1958年に発見された DBC-AMP³²⁾³³⁾ が hormone response theory から腫瘍細胞の分裂、増殖を抑制し、未分化細胞を、より分化させるとして抗腫瘍剤への応用が試みられている¹⁴⁾¹⁵⁾。著者は脳腫瘍組織のみならず、外傷脳組織に対する影響についても検討を行なった。外傷脳急性期における DBC-AMP の lysosome 酵素に対する効果は、total activity として β-G で35~45%、A-P で40~50%の抑制効果を示した (Table-5b)。この事実は DBC-AMP が Steroid hormone と同等か、又は、それ以上の抑制力を持っている事を意味しており、lysosome 酵素の Stabilizer と云ってよい。Steroid と比較する為、正常脳に対する増加率で検討すると、free activity においては steroid hormone と同様に β-G で若干の増加率の低下が認められたが、それにも増して binding activity への抑制効果が強い傾向を示した。この傾向は A-P では一層著明で free activity は全く抑制されず、未処置群と同様に、早期に一過性の増加を示しているが、binding activity は steroid hormone 処置群にもまして、5日目まで完全に抑制される結果を示した。従って、急性頭部外傷時の total activity の上昇

は、主に binding activity の上昇による結果であると同時に、薬剤によって抑制されるのも binding activity であり、free activity は影響を受け難い事が明白となった。しかしながら、DBc-AMP による lysosome 酵素の抑制機序が、steroid hormone と同様に lysosome 膜の安定化に直接、働く為にもたらされるのかどうかは、この実験では解明出来なかった。何故ならば、高須らの脳腫瘍患者の髄液中で³⁴⁾、又、長沢²⁶⁾、松元²¹⁾らの人脳腫瘍、実験的脳腫瘍組織中でも認められているように、悪性度の高い腫瘍程 lysosome 酵素活性が著しい上昇を示している点や、steroid hormone のみでは腫瘍組織中の free activity を低下させる事は出来なかった事、さらに、DBc-AMP 投与によっても、ある程度までしか酵素活性を低下させる事が出来ないばかりか、投与中止によって、短期間で、再び活性上昇を認める点等を考えるならば、lysosome 酵素活性動態のメカニズムを解明するには、未だ、不明な点が多く、今後の地道な研究を待たねばならない。

B) 酵素組織化学的検討

Lysosome 酵素は形態学的には、すでに、1954年 Rouiller らによって電顕的に“Pericanalicular dense body”として観察されていたのであるが、1956年、Novikoff により lysosome と同一のものとして紹介され²²⁾、後年、彼は電顕酵素組織化学的に、これを証明している²³⁾。今回、著者は lysosome 酵素の1つである β -G について、各種の脳の病態における β -G の活性変化を生化学的に追求した。この病態での β -G の局所動態を酵素組織化学的な面から裏づける為、 β -G の染色を行なった。外傷脳における steroid hormone と DBc-AMP の抑制効果を酵素組織化学的に捕える事は不可能であったが、少なくとも、脳損傷時の生化学的な lysosome 酵素活性の上昇が、損傷部位に限局する酵素活性によるものである事や、受傷後4週以降では、酵素組織学的に、損傷部位での酵素活性が、全く認められない点等、生化学的な活性変動の十分裏づけとなり得た事は非常に有意義な事であった。さらに、実験的脳腫瘍、人脳腫瘍においても、全く同様に、腫瘍組織全体に、微小顆粒として diffuse に、高い酵素活性が認められた事であり、腫瘍細胞と正常脳細胞境界に認められる β -G 活性は比較的粗大な顆粒として染色され、頭部外傷急性期の顆粒と非常に似かよっている反面、腫瘍内の活性とは、やや異なつた形ではとらえられた。これらの所見は、生化学的に

とらえられた repairing enzyme としてのライソゾーム酵素活性の上昇と、細胞分裂に伴うライソゾーム酵素活性の上昇とが異なる mechanism によるものではないかとの考えを酵素組織化学の面より裏づけ得るものと考えられた。今後、更に、多方面の研究分野より、この現象の解明につながる詳細な検討がなされる事が期待される。最後に、著者は、本実験をとおして、脳にとっては、ライソゾーム酵素の free activity と binding activity との比が1対1の balance を保っている事が、脳の正常な機能をつかさどる上で最も大切な事であり、この balance が崩れる時こそ、脳にとっては異常な病態におち入って行く時であろうと考える。この意味から、各種病態時における free activity 並びに binding activity の異常上昇を、ただ単に、下降させてしまう事だけが決して、脳細胞に対しての良い治療法ではなく、この unbalance を正常の balance に戻す事こそ、最も必要な治療につながるものではないかと考える。

結 語

実験的外傷脳ラット、実験的脳腫瘍ラット、人脳腫瘍の脳組織を用いて、各種病態時における脳組織中の lysosome 酵素活性の変動を生化学的、並びに酵素組織化学的に追求し、さらに、steroid hormone、DBc-AMP の lysosome 酵素に対する影響も、併せて追求した。

生化学的検索

1. 正常成単脳：正常脳組織中での free activity と binding activity は、 β -glucuronidase, acid phosphatase の両酵素とも、ほぼ、1:1の対応を示した。

2. 外傷脳：1) Total activity の変動： β -glucuronidase, acid phosphatase の両酵素ともに、外傷後、第5病日に peak を示し、正常脳と比較して、夫々、4.6, 2.5倍の活性値上昇を示したが、その後、漸時下降して、外傷後、4~8週で、ほぼ、正常値に復した。2) Free activity の変動：total activity, binding activity に比べて、両酵素とも free activity の上昇速度は速く、かつ上昇開始も早期で、その活性値上昇も一過性であった。すなわち、すでに、第3病日で活性値は peak に達し、夫々、正常値の2.1, 2.0倍の値を示し、第5病日まで活性高値が維持された後、急激に正常値に復した。

3. 実験的脳腫瘍：Total activity は β -glucuronidase で、最高117.6、平均75.6、acid phosphatase

で、最高243.0、平均205.5と異常な高値を示した。一方、free activity は、夫々、平均60.5、155.8と total activity の約80%を占めていた。

4. 人脳腫瘍：Total activity は β -glucuronidase で、最高64.8、平均52.7、acid phosphatase で、最高121.9、平均111.7と高値を示し、free activity は、夫々、平均39.8、87.6 と total activity の70~80%を占めていた。この事から、実験的脳腫瘍と人脳腫瘍での lysosome 酵素の動態は、全く同じ傾向を示した。

5. 薬剤効果：1) Steroid hormone：Total activity では、薬剤未処置群に比して、第5病日に、 β -glucuronidase で19%、acid phosphatase で25%の活性値抑制を認めた。一方、free activity は、第5病日に、 β -glucuronidase で43%の抑制効果を示したが、acid phosphatase では、全く抑制効果が認められなかった。2) DBc-AMP：Total activity では、薬剤未処置群に比べて、第5病日に、 β -glucuronidase で37%、acid phosphatase で49%の活性抑制を認めた。free activity では、第5病日に β -glucuronidase で33%の活性値抑制を認めたが、acid phosphatase では、全く抑制効果は認められなかった。この事から、明らかに、steroid hormone が lysosome 酵素の stabilizer である事、又、DBc-AMP に、steroid hormone と同等か、あるいは、それ以上に、lysosome 酵素の stabilizer としての働きが証明された。さらに、外傷脳急性期においては、free activity が薬剤の影響を受け難い傾向にあるのに対して、binding activity は、もっぱら、薬剤によって抑制され易い傾向にある事が判明した。

組織化学的検索

1：外傷脳：外傷後、第5病日では、外傷部位に一致して、局所的に、 β -glucuronidase が、高密度に粗大顆粒として濃染された。この事から、生化学的に証明された β -glucuronidase の活性上昇が、外傷部位の酵素活性に由来するものと考えられた。しかし、steroid hormone、DBc-AMP によって、生化学的に立証された lysosome 酵素活性の抑制効果を、酵素組織化学的には証明出来なかった。

2. 実験的脳腫瘍：腫瘍組織全体に diffuse な β -glucuronidase の染色を認めたが、粒大顆粒としては染色されなかった。しかし、腫瘍組織と正常脳組織との境界部位では、粗大顆粒として染色された。

3. 人脳腫瘍：実験的脳腫瘍と全く同様に、腫瘍組

織全体に diffuse な染色像としてとらえられたが、顆粒としては、はっきりと染色されなかった。しかし、腫瘍の種類によっては、微小顆粒としての染色像もとらえられた。

本論文の要旨は Fifth international meeting of the ISN (1975年, Spain) 6th. Int. Congress of Neurological Surgery (1977, sao Paulo), 第19回日本神経学会総会 (1978年, 東京) にて発表した。稿を終るに当たり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師栗津三郎教授並びに平野修助第2生理学教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また本研究に際し、御協力、御鞭撻を頂きました。柴田家門講師に深謝し、併わせて、日々御支援、御協力を頂きました。第2外科、脳神経外科及び第1病理学教室員の皆様方に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Allison AC, Mallucci L : Lysosome in dividing cells, with special reference to lymphocytes. *Lancet* 2 : 1371-1373, 1964.
- 2) Allison AC, Paton GR : Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature*, 207 : 1170-1173, 1965.
- 3) Allison AC : Lysosomes in biology, in pathology. North Holland Publishing Co, Amsterdam, London, p. 178, 1969.
- 4) Allen N : β -glucuronidase activities in tumors of the nervous system. *Neurology* 11 : 578-596, 1961.
- 5) 阿部弘, Allen N, 他 : Nitrosamine 投与による実験的脳腫瘍の lysosome 酵素の研究 : 脳神経外科 2 : 629-636, 1974.
- 6) Briggs M : Lysosomal enzyme activation by steroid hormone in vivo. *J Steroid Biochem* 4 : 341-347, 1973.
- 7) Comfort A : The prevention of ageing in cells. *Lancet*, 2 : 1325-1329, 1965.
- 8) de Duve C, Pressman BC, et al : Tissue fractionation studies., intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60 : 604-617, 1955.
- 9) de Duve C. : Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles, pp. 128 The Ronald Press, New York, 1959.
- 10) Dingle JT : Studies on the mode of action of excess of vitamin A 3. Release of a bound protease by the action of vitamin A. *Biochem J*, 79 : 509-516, 1961.
- 11) Druckery H, Ivankovic S, et al : Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of etylnitrosourea to pregnant

- rats. *Nature* **210** : 1378-1379, 1966.
- 12) Fishman WH and Anlyan AJ : Comparison of β -glucuronidase activity of normal, tumor, and lymph node tissue of surgical patients. *Science* **106** : 66-67, 1947.
 - 13) Fishman WH, Springer B, et al : Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood β -glucuronidase. *J Biol Chem* **173** : 449-456, 1948.
 - 14) Gerick D and Chandra P : Inhibition of tumor growth by nucleotide cyclic 3', 5' -monophosphates, Hoppe-Seyler's *Z. Physiol Chem* **350** : 1469-1471, 1969.
 - 15) Heidrick ML and Ryan WL : Cyclic nucleotide on cell growth in vitro. *Cancer Res* **30** : 376-378, 1970.
 - 16) Hayashi M, Nakajima Y : The cytologic demonstration of β -glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and Hexazononium pararosanilin. *J Histochem Cytochem* **12** : 293-297, 1964.
 - 17) King EJ and Armstrong AR : A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Canada M AJ* **31** : 376-381, 1934.
 - 18) Kato K, Yoshida K, et al : Synthesis of p-nitrophenyl beta-D-glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for the assay of beta-glucuronidase activity. *Chem Pharmac Bull* **8** : 239-242, 1960.
 - 19) Monis B, Banks BM, et al : β -d-glucuronidase activity in malignant neoplasms of man. *Cancer* **13** : 386-393, 1960.
 - 20) 水野伝一 : 老化と lysosome : 代謝 **9** : 295-299, 1972.
 - 21) 松元幹郎 : 実験的脳腫瘍組織の生化学的分析 *Arch Jap Chir* **48** : 459-470, 1979.
 - 22) Novikoff AB, Beaufay H, et al : Electron microscopy of lysosome-rich fraction from rat liver. *J Biophysic and Biochem Cytol* **2** : 179-184, 1956.
 - 23) Novikoff AB : "Lysosome" : Ciba foundation symposium. **36** : 1963 J. & A. LTD. Churchill, London.
 - 24) 中野重徳 : 外傷脳の生化学的研究—特に切截脳グリア組織の代謝的特徴について. *日外宝* **37** : 177-187, 1968.
 - 25) 長沢貞継, 柴田家門, 他 : グリオーマ細胞とグリア組織の生化学的分析. *脳研究会会誌* **2** : 94-95, 1976.
 - 26) 長沢貞継 : グリオーマの生化学的研究—DBC-AMP の腫瘍細胞に対する役割を中心として. *Arch Jap Chir* **48** : 471-483, 1979.
 - 27) Robbin E, Gonatas NK : The ultrastructure of a mamalian cell during the mitotic cycle. *J Cell Biol* **21** : 429-442, 1964.
 - 28) 柴田家門, 佐藤克之, 他 : 外傷脳の修復過程に伴う lysosomal enzyme の変化に関する研究. 第34回 *日脳外*, 口演記録 **76** : 1973, 福岡.
 - 29) Shibata I, Takasu N, et al : Lysosomal enzymes and dibutyl 3', 5' -Adenosine monophosphate basic and clinical studies on lysosomal enzyme activities in glioma tissue and glia cells. *Neurologia medico-chirurgica* **15** : 27-33, 1975.
 - 30) 柴田家門, 高須信美, 他 : 脳組織における Lysosome 酵素の病態時変動に関する研究. *東邦医学会雑誌* **25** : 246-249, 1978.
 - 31) 佐藤克之 : 損傷脳における Lysosome 酵素の変動について. *Arch Jap Chir* **46** : 396-405, 1977.
 - 32) Sutherland EW, Rall TW : Fraction and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particle. *J Biol Chem* **1077**-1091, 1958.
 - 33) Sutherland EW, Robison GA : Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5' -monophosphate (Cyclic AMP). *Circulation* **37** : 279-306, 1968.
 - 34) 高須信美 : Lysosome 酵素の髄液内変動について. *Arch Jap Chir* **47** : 42-53, 1978.
 - 35) Weissmann G, Thomas L : Studies on lysosomes: I. The effects of endotoxin, endotoxin tolerance, and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver. *J Exp Med* **116** : 433-450, 1962.
 - 36) Weissmann G : Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed Proc* **23** : 1038-1044, 1964.
 - 37) Weissmann G : Studies of lysosomes.....VI. The effect of neutral steroid and bile acid on lysosomes in Vitro. *Biochem Pharm* **14** : 525-535, 1965.