

損傷脳における Lysosome 酵素の変動について

東邦大学医学部第2外科学教室 (指導: 栗津三郎教授)

佐藤 克之

(原稿受付: 昭和52年4月25日)

The Changes of the Lysosomal Enzyme Activities in Injured Brain Tissue

by

KATSUYUKI SATO

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

The lysosomal enzyme activities, especially β -glucuronidase and acid-phosphatase were studied in the course of time in the experimental injured rat brain cortex which was slashed onto one side of frontal lobe.

It is well known when the cell damage occurred, the activation of lysosomal enzyme will be induced and the lysosomal enzyme will lead to "autophagy" and "heterophagy", which are typical function of lysosomal enzymes. However, some reports state that lysosomal enzymes are also highly activated during cellular division and proliferation.

Based upon these reports, these two different functions of the lysosomal enzyme were examined in the injured brain tissue from the onset of acute damage till the formation of gliosis.

It has been studied that a variety of agents have the property of labilizing and stabilizing to the membranes of the lysosomes. In order to study these changes of the labilization and stabilization against the lysosomal membrane in the injured brain tissue, the author used Vitamin A palmitate as a labilizer and also use steroid hormone which was dexamethasone sulfate as a stabilizer of the lysosome.

These results were demonstrated as follows :

1) Enzyme activity of β -glucuronidase in the injured brain tissue was three times higher than the activity of normal one on the 3rd day after operation. On the 5th day after the surgery increasing of activity exceeded five times higher than the normal brain cortex. In the case of acid-phosphatase the enzyme activities were almost the same tendency as the activity of β -glucuronidase.

Key words Lysosome, lysosomal enzyme, β -glucuronidase, acid-phosphatase, gliosis, labilizer, stabilizer
Vitamin A palmitate, steroid hormone, cell division.

Present address : Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University, 6-11-1, Nishi, Omori, Ota-ku, Tokyo.

These activities reached their respective peaks on the 5th day after injury and then gradually decreased to the almost normal level in around one or two months after the operation.

2) After the administration of steroid hormone (dexamethasone) as a stabilizer, the enzyme activity of β -glucuronidase was inhibited about 37% to compare with the activity of steroid non-administrated samples on the 5th day after injury. The enzyme activity of acid-phosphatase on the same time was also inhibited about 24% in contrast to the non-administrated samples. On the other hand, the enzyme activity of β -glucuronidase which was treated by Vitamin A as a labilizer was six times higher than the activity of the normal tissue on the same time. And also in the case of acid-phosphatase the enzyme activity was four times higher than the normal one.

3) In the injured brain tissue, RNA and DNA contents were measured in the course of time after surgery and RNA/DNA ratio was less than control side on the 5th day after surgery. These results suggested increasing of cell counts due to reactive proliferation of glial cells.

According to these results, the enzyme activity which reached to the highest peak on the 5th day after operation strongly suggested that probably the lysosomal enzymes have a function not only to repair the degenerated tissue, but also to promote cell proliferation or cell division, Since according to the biochemical studies the brain edema was greatest within three days after operation and extremely active division and multiplication of glial cells were observed morphologically in the cerebral cortex around the operated area on the 5th day after operation.

緒 論

細胞内小器官である lysosome は、酸性領域に至適 pH を有し、一層の限界膜にかこまれた細胞内顆粒と定義され、この中には現在40種以上にも及ぶ酸性水解酵素の存在が知られている。この lysosome の機能としては、細胞の崩壊、壊死などに際し、lysosome 内の一連の水解酵素が活性化し、細胞外よりの物質の摂取、消化及び、細胞質の融解処理等の機能を活発に行っていると云われている¹⁾。

又近年細胞分裂に際しても、増殖の著るしい腫瘍組織で高い活性を示す本酵素が、何らかの形で細胞分裂に関与しているとも云われている²⁾。この様に lysosome の主なる役割と云われている細胞の修復機能への作用と、細胞の分裂機構に対する役割を知る意味で、成鼠正常脳に損傷を加え検討を行った。

即ち、外傷脳では脳組織の出血、壊死、細胞崩壊等の急性変化が起るが、これに対応して lysosome 酵素が如何なる態度をとり、又急性症状の消退と共に必発する glia 細胞の反応性増殖に対しても、本酵素が如

何なる態度をとるかを詳しく検討し、損傷脳に必発する、上述の2つの過程に lysosome 内の水解酵素がどの様に関与し変動しているかを経時的に追求した。

又これらの lysosome 酵素は、薬剤投与によっても活性化、或は不活性化など変化することが近年注目されており³⁾⁴⁾⁵⁾、外傷脳における lysosome 酵素活性の変化をこれら薬剤によって調節した場合についても検討を加え、活性化物質としては、Vitamin A palmitate、不活性化物質としては、steroid hormone の内 dexamethasone を用い本酵素の活性化及び、不活性化の状態、並びに生体に対する反応等を対比し検討を加えた。

実験方法

1. 実験動物作成法

本実験に関しては、既に中野によって報告された方法⁶⁾にて、雌雄の別なく体重約 250~300g, Wister 系 Rat を使用、麻酔法はペントバルビタール 50mg/kg を腹腔内に注射し、頭部剃毛及び消毒施行後、正中切開を加え、左大脳半球前頭骨に直径約 4.0mm の骨窓を開

け、止血後同部より尖刃を刺入し、左大脳半球前頭葉に切截を加え、損傷脳を作成した。脳表部の止血を確認後頭皮を縫合、消毒処置施行し手術を終了した。術後補液及び感染予防の目的にて、20%ブドウ糖4ml及びテラマイシン100mg/kgを術直後1回皮下投与した。飼育に関しては鼠用固形飼料(増殖用—NM型、オリエンタル酵母社製)を使用した。

2. 試料の調製

左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、可及的速かに脳軟膜、血管を取り除き試料に付着している血液をできるだけ取り除いた。gliosis組織としては、切截部位より前後約2mmの範囲の皮質を試料とし、対照側は右大脳半球の左切截部位に相当する正常脳皮質を同範囲に切除し、各々 operated side, non-operated side として用いた。又全く手術侵襲を加えない成鼠の同部位を同範囲に切除し normal control とした。

lysosome 酵素標品の作製:採取した組織を0.05% Triton X-100 溶液 0.5ml にてガラスホモゲナイザーにて homogenize し、全活性として酵素標品とした⁷⁾。

3. 核酸の定量

試料40~50mgを4%P.C.A.にて除蛋白し、Schmidt-Thannhauser の変法⁸⁾に従って核酸を抽出し、RNAは Orcinol の方法⁹⁾ DNAは Burton の方法¹⁰⁾により測定した。蛋白量は Lowry の変法¹¹⁾に準じた。

4. 酵素測定方法

a. β -glucuronidase: 切截脳約50~60mgを0.05% Triton X-100 0.5ml にて homogenate し酵素標品を作製、Fishman¹²⁾及び加藤の変法¹³⁾にて測定を行った。Sample 0.1ml に対し0.2M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5) 0.35ml 及び、基質として p-nitrophenyl-glucuronide 0.05ml を混じり、37°C、4時間温浴後、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) 400m μ にて比色定量した。標準液としては、p-nitrophenol を用い、単位は遊離 p-nitrophenol の γ 数を蛋白量当りとして求め、時間当りの γ 数を算出した。

b. Acid-phosphatase: β -glucuronidase と同様の方法にて酵素標品を作製、King-Armstrong の変法¹⁴⁾にて酵素活性を測定した。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 1-アミノアンチピリン 1.0ml を加え、37°C にて3分間 preincubation 施行し、その後酵素標品 0.1ml を混

じ、37°C にて60分間温浴施行、発色液として、フーリシアン化カリウム 2.0ml をもちいて十分に混和させた後、約10~60分間の間に光電比色計 570m μ にて比色定量した。標準液としては phenolphthalein を用い、単位は $\mu\text{g}\cdot\text{phenol}/\text{mg}\cdot\text{protein}/\text{hr.}$ にて算出した。

5. 薬剤投与方法

損傷脳 Rat に対し、steroid hormone 及び、Vitamin A を投与した。steroid hormone としては dexamethasone sulfate natrium (Schering 社製) を手術後より漸減法にて連日皮下注射にて投与、術後及び第1病日、1mg/kg、第2病日及び第3病日、0.64 mg/kg、第4病日 0.32mg/kg、第5病日 0.16mg/kg、第6病日 0.08mg/kg、第7病日 0.04mg/kg にて投与し、投与終了後直ちに試料を作製した。Vitamin A 投与は、Vitamin A palmitate (半井科学薬品株式会社製) を用い、損傷脳作成後第1病日より、第3病日迄の3日間、胃管挿入法にて、1日量50万I.U. とし連日3日間、経管法にて投与施行した。

実験成績

損傷脳においては、障害部に神経細胞の消失が起こり、これによって反応性にグリア細胞の増殖が起こる事は古くより知られている現象であるが、このグリア細胞の増殖、即ち gliosis 組織は、単なる結合支持組織や、瘢痕組織ではなく、種々の代謝的特徴を有している事は、中野⁵⁾紫田¹⁵⁾等の詳細な研究報告で明らかである。今回この組織において、lysosome 酵素が如何なる態度を取っているかを経時的に分析し、gliosis 組織の形成に至るまでの損傷脳修復過程に働く、lysosome 酵素を生化学的に検討した。

1) 核酸について

まず本実験動物脳が、手術侵襲に対応して gliosis 組織を形成している事を明らかにするため、DNA、及び RNA 量の経時的変化を追求した。Table-1 に示す如く、DNA 定量では、術後1週間迄は、手術側、非手術側共に著明な変化を示さず、術後2週目以降で、手術側に DNA の増加がみられ、1ヶ月目では明らかに gliosis 形成による細胞増加を示す結果がみられた。RNA は術後1ヶ月目迄にては、手術側、非手術側で有意の差を示さなかった。

2) β -glucuronidase 活性について

Fig-1 は β -glucuronidase の経時的変化を示したものである。実験動物数は、normal control は18例で

Table 1. RNA. DNA. contents in rat brain cortex

Conditions	RNA (mg/gr. dry. w. w.)		DNA (mg/gr. dry. w. w.)		RNA/DNA Ratio	
	Operated	Control	Operated	Control	Operated	Control
3 days (13)	1.85±0.21	2.12±0.17	0.68±0.10	0.65±0.09	2.72±0.14	3.26±0.22
5 days (13)	1.81±0.15	1.91±0.20	0.64±0.05	0.62±0.11	2.80±0.13	3.40±0.21
1 week (15)	1.93±0.20	1.85±0.22	0.65±0.08	0.51±0.12	2.96±0.17	3.62±0.21
2 weeks (15)	2.01±0.18	1.92±0.19	0.69±0.12	0.55±0.15	2.91±0.16	3.49±0.18
1 month (16)	2.11±0.22	2.13±0.25	0.77±0.18	0.62±0.20	2.74±0.17	3.43±0.19

Values represent as mean ±S.D. with experimental number in parentheses.
 RNA content was measured by Orcinol's method.
 DNA content was measured by Burton's method.

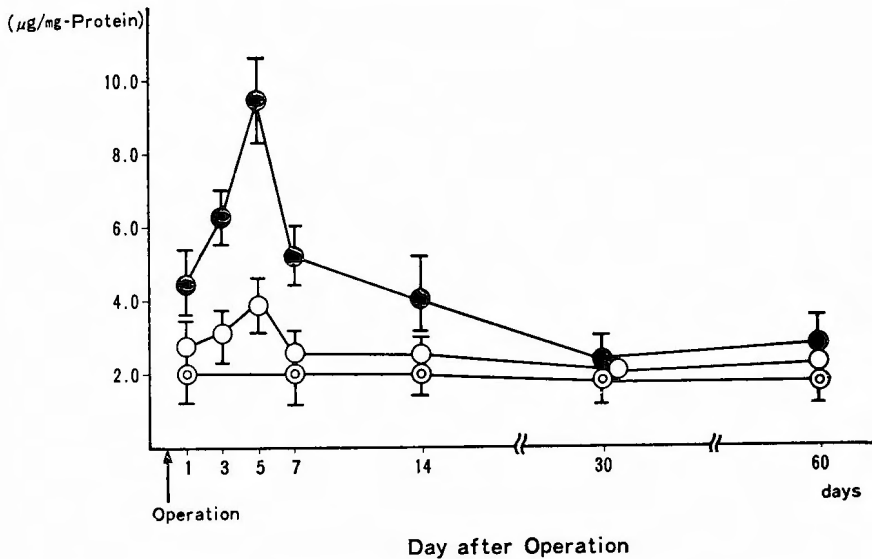


Fig. 1. β -glucuronidase activity in rat brain tissue

●—●: operated side, ○—○: non-operated side, ⊙—⊙: normal control
 Experimental numbers were described in textbook. Incubation medium contained 0.2M acetic buffer at pH 4.5, p-nitrophenyl- β -glucuronide and rat brain homogenate (0.1cc) equivalent to 3 to 5 mg of the tissue in wet weight, which were incubated at 37°C for 4 hours.

あり, operated side 及び non-operated side における 1 から 60 日目に至る各 7 区分の動物症例数は、各々 5, 5, 5, 10, 6, 10, 7 例である。

本酵素活性は、切截手術後第 1 病日にて手術側で正常値の約 2 倍の活性値の上昇を認め、第 3 病日にて約 3 倍、第 5 病日にて正常値の約 4.6 倍の著しい活性値上昇を示した。この上昇は第 5 病日を頂点とし、漸次下降するが、術後 1 ~ 2 週目では手術側は正常値及び対照側に比しても高値を持続し、反応性、gliosis の

完成したと考えられる約 1 ヶ月後にてほぼ正常値に復する傾向を示した。

非手術側では、手術側ではないが、術後 5 病日にて本酵素活性の最大値を示し、正常値の約 1.9 倍の活性上昇を認めたが、術後 1 週目にてほぼ正常値に復した。

3) Acid-phosphatase 活性について

Fig-2 は、acid-phosphatase の 繼時的変化を示したものである。実験動物数は、normal control は 18 例

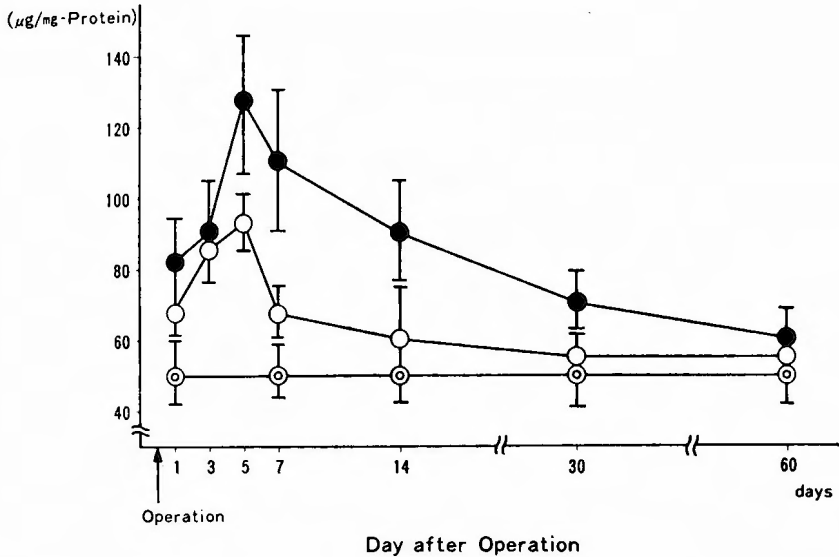


Fig. 2. Acid-phosphatase activity in rat brain tissue

●—●: operated side, ○—○: non-operated side, ⊙—⊙: normal control
 Experimental numbers were described in textbook. Incubation medium contained citrate buffer and disodium-phenylphosphate as substrate. Incubation was made at 37°C for an hour.

であり、同一動物の sample を用いて両酵素活性測定に使用しているのので、 β -glucuronidase に示したと同数である。

本酵素活性も、 β -glucuronidase 活性と、ほぼ同様の傾向を認めており、術後第1病日においては、手術側は、正常値の約1.6倍の活性上昇を認め、第5病日にて正常の約2.5倍と活性上昇の頂点を示し、以後直線的に活性値の下降を示すが、術後1~2週目においては、まだ活性値は高く、術後2ヶ月目にてほぼ正常値に復した。非手術側にては手術側同様第5病日に頂点を有する高値を示したが、1ヶ月後には正常値に復した。

4) lysosome 酵素に対する stablizer について

lysosome は一定の限界膜を有し、この lysosome 膜が破壊されると中の水解酵素が遊離し、種々の lysosome 酵素としての機能を発揮すると考えられており、現在迄この lysosome 膜の安定化、不安定化を起す種々の条件や薬剤等が明らかにされている。著者は、lysosome の安定化因子として steroid hormone を損傷脳 Rat に投与し、本酵素活性の変動を追求した。

術後より dexamethasone を前述の如き投与方法に従って1週間連日皮下注射にて投与した。

Fig-3 は steroid hormone 投与による lysosome 酵素活性の変動を示したものであるが、実験動物数は、非ステロイド投与手術側群、ステロイド投与手術側群、ステロイド投与非手術側群の3群にて各々、術後1より60日目迄の7区分で、5, 5, 5, 9, 5, 5, 7例である。

a) β -glucuronidase に対する効果

手術側は、非 Steroid 投与群で最大活性を示す第5病日にて、約37%の活性値の抑制を認め、術後1週より2週目にて同様に活性値は、抑制傾向を示し、術後2週目以後にて正常値に復した。非手術側は、第5病日で非投与群とあまり有異な差を認めなかったが、術後1週目には、既に正常値に復する傾向を示した。

b) Acid-phosphatase に対する効果

Acid-phosphatase についても、 β -glucuronidase とほぼ同様の变化を示した。手術側は、非 steroid 投与群にて最大活性を示す第5病日で、約24%の活性値の抑制を認め、1週後、2週後でもこの抑制傾向を継続し、各々約33%、23%の抑制率を示した。しかし、 β -glucuronidase に比し、術後1~2週目では未だ正常値には復さず、約1ヶ月後で正常値に復した。

5) lysosome 酵素に対する labilizer について

lysosome 膜の labilizer としては多数の因子が報告

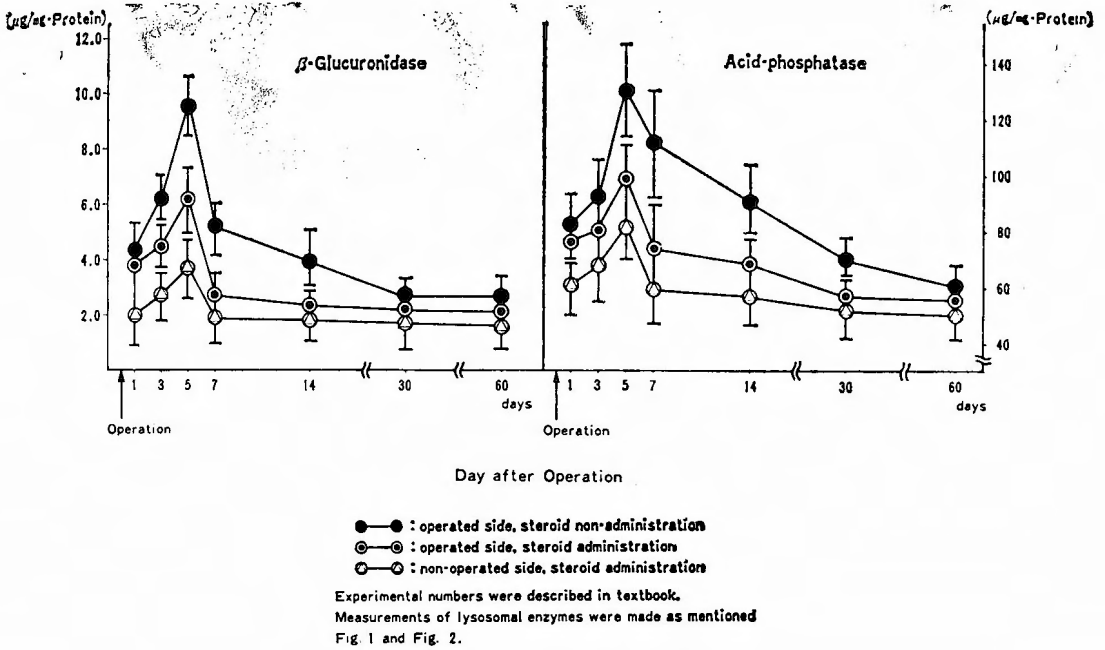


Fig. 3. Lysosomal enzyme activities in rat brain tissue after steroid hormone administration

されているが、今回は Vitamin A を取り上げ検討を加えた。Vitamin A palmitate を前述の方法で手術日より経管法にて投与し、本酵素活性の変動を追求した。

Fig-4 は、Vitamin A palmitate 投与後の lysosome 酵素活性の変動を示したものである。実験動物数は、非 Vitamin A 投与手術側群、Vitamin A 投与手術側群、Vitamin A 投与非手術側群、の 3 群にて、各々術後 1 より 30 日目迄の 6 区分で、5, 5, 5, 4, 4, 4, 例であり、normal control 群は 18 例である。

a) β -glucuronidase に対する効果

手術側では、非投与群で最大活性を示した第 5 病日で、正常値の約 6 倍、非投与群の約 30% の活性上昇率を示し、この活性値の上昇は術後 1 ~ 2 週目でも明らかに持続しており、術後 1 ヶ月目で正常の約 2.8 倍の高値を示した。非手術側も、明らかな labilizer の効果をうけてほぼ手術側と同程度の活性高値を示した。

b) Acid-phosphatase に対する効果

本酵素活性も β -glucuronidase と同様の傾向を示し、術後第 5 病日で手術側で正常の約 4.3 倍、非投与群の約 73% の活性増加率を示した。非手術側の活性値は β -glucuronidase におけると全く同様で、著明な labilization がみとめられ、ほぼ手術側に近似の活性

上昇を示しこの傾向は β -glucuronidase よりむしろ強く認められた。

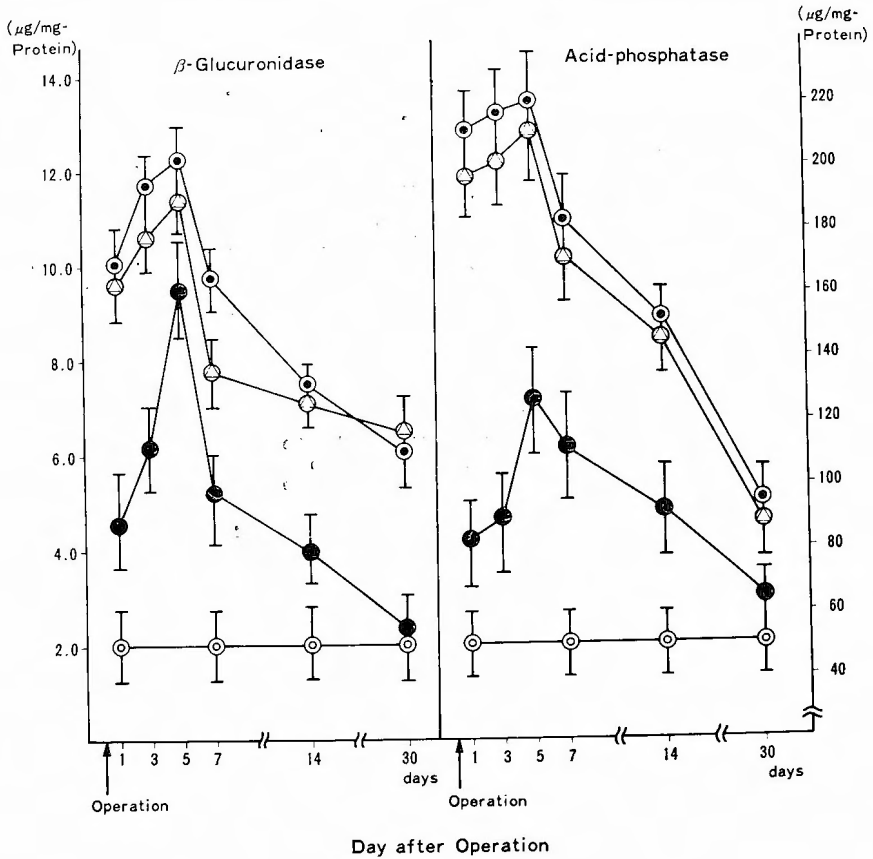
考 按

1955年、de Duve¹⁶⁾により提唱された細胞内小器官である lysosome は、その後多くの研究がなされ、現在約 40 数種に及ぶ lysosome 酵素が明確にされている。

生体内における本酵素の役割についても、多くの研究がなされているが、その主なる役割としては、細胞組織の病的及び、生理的な融解壊死に際しての、異物貪食 (heterophagy)、自己貪食 (autophagy) 等の細胞消化作用である。

又最近、本酵素は細胞分裂に関しても何らかの形でこれに関与しているものと考えられている¹⁷⁾。この様に種々の機能を有する lysosome が損傷脳の修復過程の中で、どのような変動を示し、gliosis 形成後の組織では、如何なる態度を取っているかは興味ある事と考えられる。

前述の如く gliosis 組織は高度の代謝活性を有するものと推定されており、その性格がより一層明確なものとなっている。この様な組織を用いて、lysosome 酵素活性を測定する事は lysosome の損傷に対する消化作用のみならず細胞の増殖に対する役割をも検討す



●—● : operated side, Vit. A non-administration
 ○—○ (with dot) : operated side, Vit. A administration
 △—△ (with dot) : non-operated side, Vit. A administration
 ○—○ : normal control

Experimental numbers were described in textbook.
 Measurements of lysosomal enzymes were made as mentioned
 Fig. 1 and Fig. 2.

Fig. 4. Lysosomal enzyme activities in rat brain tissue after Vitamin A administration

る上に好都合であると思えた。著者は lysosome 酵素の内、 β -glucuronidase 及び acid-phosphatase について、損傷時の急性期の状態より、損傷脳の gliosis 組織の完成される1ヶ月迄を経時的に検討し、合せこれらの両酵素の安定因子及び、不安定因子の作用等についても検討を加えた。

切截脳における本酵素活性の変動を経時的に観察すると、 β -glucuronidase, acid-phosphatase 共にほぼ同様の pattern を示した。即ち、両酵素共その活性値は、損傷後第1病日よりすでに上昇を認め、第5病日にて最大活性を示し以後漸次下降傾向を示し、 β -glucuronidase では約1ヶ月後、acid-phosphatase では、

約2ヶ月後にほぼ正常値に復した。この事を術後1週目迄の急性期及び、それ以後の時期とについて考えてみると、まず急性期の状態での活性値の上昇は、生体への損傷に対し lysosome 酵素の流出が活発化し、本酵素の機能の1つである autophagy や heterophagy が活発に行われ、損傷脳の修復に著明に働いている事と理解される。しかし、この急性期の状態において1つの疑問が生じている。既に諸家の報告にも多く見られるが、脳組織に損傷が加わった場合、急性期の反応である出血、脳浮腫等の極期は術後第3病日迄に頂点を有していると考えられている。損傷脳の損傷状態にのみ対応して本酵素の修復機能が働いているとすれば、当然最大活性値は第3病日以前に起ると考えられる。しかるに本酵素活性を測定すると、 β -glucuronidase, acid-phosphatase 共に第3病日より第5病日に酵素活性の最大値を有している事である。この事は損傷脳に対する lysosome の損傷細胞修復機構、即ち細胞を digest する lysosome 酵素の役割のみでは解釈するのに不充分であると考えられる。ここでこの時期の損傷を受けた脳組織について考えてみると、既に損傷後第5病日の脳組織では電顕的にも証明されている如く、glia 細胞の増殖が起り始める時期である。又同時期の細胞の分裂状態を検討する為に、経時的に核酸の定量を行ったが、術後第3病日、第5病日を通じて DNA, RNA 共に著明な変化は示さないが、その以降では、RNA/DNA Ratio は明らかに低下を示して細胞数の増加が強く起っている事を示唆している。これらの点より考え、急性期における本酵素活性の上昇は、lysosome の本来の機能と云われている消化 (digestion), 異化 (catabolism), 貯蔵 (storage) 等が活発に行われ、所謂 repairing enzyme としての機能を充分にはたしている事を示しているものであり、この点に関しては、de Duve¹⁾, Novikoff¹⁸⁾¹⁹⁾, Jacques²⁰⁾ らの見解と一致している。しかし、本酵素活性の最大活性値が術後第5病日にある事や、 β -glucuronidase, acid-phosphatase 共2週目で尚高い活性が認められ、gliosis 組織のほぼ完成される1~2ヶ月目にて正常値に復する事は、lysosome 酵素の働きが、単に一元的な細胞障害に対する修復機構のみでなく、損傷脳においては glia 細胞の分裂、増殖に起因した変動をも同時に考慮して初めて理解し得るものと思われた。さて、lysosome 酵素の内では、 β -glucuronidase と acid-phosphatase では上昇した活性値が正常値に復する迄の間に時間的ズレが認められた。この事は同じ lyso-

some 酵素でも、その種類により修復、分裂等に関与する態度が異なるものと考えられる。又同一の酵素でも、修復と細胞分裂では、活性化の機序が全く異っているものと考えられる。lysosome 酵素は、resting stage で、その存在様式が、free activity と binding activity とあることが知られており、binding activity 即ち sedimentable activity は、酵素の種類や細胞の状況に対応して変化する事も充分考えねばならない。この様に lysosome 酵素の活性化の機序は複雑であり未だ明確な結論を出すのは早計と考えられるが、柴田²¹⁾らの報告からも、少なくとも損傷脳では、free activity は殆んど変動せず、その変化は binding activity の変化によるものと考えられる。一方 lysosome は一定の限界膜により包まれた顆粒であり、lysosome 酵素の遊離は、この限界膜の破壊により引き起こされると考えられている。そしてこの lysosome 膜を破壊する条件及び薬剤が各方面から研究されて来た²²⁾。そしてこの lysosome 膜を安定化する因子としての stabilizer 及び、膜を不安定化する因子としての labilizer との概念が生じている。著者は stabilizer として、steroid hormone (dexamethasone) を用い、又 labilizer として Vitamin A palmitate を用い各々損傷脳における lysosome 酵素活性の変動を調べた。まず steroid hormone を損傷後より連日漸減法にて投与し、lysosome 酵素活性の変動をみると、 β -glucuronidase, acid-phosphatase 共に最大活性を示す第5病日で、それぞれ非投与群に比べ、約37%及び24%の活性値の減少を認めた。この抑制効果によって術後1週目で両酵素活性は共に正常範囲に復した。一方 Vitamin A palmitate を損傷脳に投与した場合、Vitamin A 投与群は、非投与群に比し β -glucuronidase, acid-phosphatase 共に第1病日より高度の活性値の上昇を示し、術後1週目を過ぎても尚高値を持続、約1ヶ月間の観察にて正常値に比し、数倍の活性値の上昇を示した。又 Vitamin A 投与では損傷側のみならず、損傷をうけない対照側にも同様に高度の活性上昇を示した。これら stabilizer, labilizer に関する研究は、Weissmann^{41),23)} 及び Briggs²⁴⁾ らの研究を始めとして数多くの報告がなされているが、著者の成績も諸家の報告と一致し、steroid hormone は明らかに lysosome 酵素の遊離を抑制し、Vitamin A palmitate 投与は明らかに活性値の高上昇を認め、lysosome 酵素の遊離が極めて盛んである事を示した。

さて、stabilizer としての steroid hormone が示し

た今回の一連の酵素活性値の変動を考えると, steroid hormone が lysosome の 限界膜に直接作用して安定化を促進した為のものか, 或は, lysosome 酵素に直接的に作用して活性を抑制したのか, 又は, 脳障害にて急性期に破壊された血液脳関門の修復に働き, 2次的に lysosome 酵素の活性化の程度が少なくてすんだ為なのかは, 未だ判然としない. しかし生体反応を観察すると, steroid hormone 投与後では, 損傷 Rat の術後回復は極めて良好であり, 酵素活性値もより早く正常化へと動く事がみられるのであり, 細胞障害の修復に働く lysosome 酵素の広義の repairing enzyme としての働きを結果的には助長している事は確かである. しかし尚細胞分裂及び増殖に関する lysosome 酵素の働きに対する steroid hormone の作用が digestive mechanism と同義的に考えて良いのかは, 未だ不明な点が多く今後の研究に持たねばならないと考える.

labilizer としての Vitamin A palmitate の lysosome 酵素に対する効果を考えると手術後著明な活性上昇を示し, しかもこの影響は, 非手術側にも及び, 手術側とはほぼ同程度の高活性を示すほどであった. これは Vitamin A 非投与群でも, 急性期で手術側の影響が非手術側にも及んでおり, この事は血液脳関門の破壊した時期では対側にも一過性に脳浮腫が惹起されていたと解釈される. しかし, 今回の Vitamin A 投与後の脳組織は肉眼的にも両側に広範な出血, 壊死, 浮腫を来し, 生体反応を観察しても術後5日以内に死亡するものが多く生存し得たものでも自動能が正常に復するの日に日数がかかり, 食物摂取の開始も遅れ, 長期生存をみるものが少なかった. この様に損傷脳急性期に投与された Vitamin A は一層血液脳関門の破壊による細胞膜の透過性を高め, 細胞障害を助長し, この病態は頭蓋内全体に及ぶ為, lysosome 酵素活性は一層活性化されると考えられた. 恐らくこの活性上昇の機序は, 高度な digestive mechanism の1つと考えると良いのであろうが, 術後1ヶ月以上を過ぎても正常化を示さない事は, 生体反応と合せ考えると少なくとも, 損傷脳の修復に関しては labilizer の使用は逆効果である事は確かな事である. この事は lysosome 酵素は repairing enzyme ではあるが, その活性化が必ずしも repair を促進することにはならない事を示唆している. 即ち, lysosome 酵素は損傷及び細胞の分裂, 増殖に強く関与しており, 特に損傷に対しては, これを速かに正常の状態に保つ様その細胞修復機能を

十分に発揮していると考えられ, 生体においては損傷に際し必要以上に lysosome 酵素を遊離させず, 早期に本酵素活性を正常に復させる状態がより生体に有利なものである事は明白である. その為に現在臨床的に広く使用されている steroid hormone が損傷脳において, 細胞レベルでの repairing mechanism と密接に関連している事が今回の実験により明らかになったと考える.

結 語

白鼠大脳半球皮質に切取手術を行い, 実験的に作成した損傷脳及び反応性に増殖した gliosis 組織を用い, 正常及び手術対照側と比較しながら lysosome 酵素活性の変動を経時的に追求した.

1) 損傷脳において, β -glucuronidase 活性は正常脳組織 lysosome 酵素活性に比し, 術後第3病日にて約3倍, 第5病日にて約4.6倍の活性上昇を示した. acid-phosphatase 活性も同様の傾向を示し, 正常値に比し第3病日にて約1.6倍, 第5病日にて約2.5倍の活性上昇を認めた. 両酵素共最大活性は第5病日に有し, 以後漸次直線的に下降し約1~2ヶ月後には両酵素共ほぼ正常値に復した.

2) 損傷脳に lysosome 酵素の stabilizer 及び labilizer を投与し, 経時的本酵素活性の変動をみると, stabilizer としての steroid hormone (dexamethasone) は β -glucuronidase で, 第5病日にて非投与群の約37%の活性値抑制を認め, acid-phosphatase では同時期にて非投与群に比し, 約24%の活性抑制を示した. この事より steroid hormone は明らかに lysosome の stabilizer であると証明し得た. labilizer として Vitamin A palmitate を損傷脳に投与し本酵素活性変動をみると, β -glucuronidase は第5病日にて非投与群の約30%の活性増加率を示し, 正常値の約6倍の高値を示した. acid-phosphatase は, 同時期にて非投与群に対し約73%の活性増加率を示し, 正常の約4倍の高値を示した. この事より Vitamin A に明らかに lysosome 酵素の labilizer としての働きのある事が示された.

3) 損傷脳の核酸の継時的定量を行い, 術後第5病日以後, RNA/DNA 比の低下を認め glia 細胞の増加が明らかに認められた.

本論文の要旨は, 第32回日本脳神経外科学会総会 (1973年福岡), 第15回日本神経化学会 (1974年, 京都), 第15回日本神経学会総会 (1974年, 横浜), 及び, Fifth international

meeting of the ISN (1975年, Spain) にて発表した。

稿を終るに当り、終始御懇篤な御指導を頂き、且つ御校閲を賜った恩師栗津三郎教授並びに第2生理学教室平野修助教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また本研究について御協力、御鞭撻を頂いた柴田家門博士に深謝し、併わせ日々御支援を頂いた、第2外科・脳神経外科及び第2生理学教室員の皆様方に対し、厚く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) de Duve, C. et al. : Function of lysosomes. *Ann, Rev. physical.*, **28** : 435-492, 1966.
- 2) Allison, A.C. : Lysosomes in biology in pathology, 2 (ed. by Dingle, J. T., Fell, H. B.), North Holland publishing Co Amsterdam London 178, 1969.
- 3) Weissmann, G. : Labilization and stabilization of lysosomes. *Fed Proc* **23** : 1038-1044, 1964.
- 4) Weissmann, G. : Studies of lysosomes-VI. The effect of neutral steroid and bile acids on lysosomes in Vitro. *Biochem Pharm* **14** : 525-535, 1965.
- 5) Weissmann, G. et al. : Studies on lysosomes, II. The effect of cortisone on the release of acid hydrolases from a large granule fraction of rabbit liver induced by an excess of Vitamin A *J Clinical Inv* **42** : 661-669, 1963.
- 6) 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. *日外宝函* **37** : 177-187, 1968.
- 7) 小川和朗, 他 : 酵素—Triton ×-100 処理によるライソゾーム内酵素の遊離とその阻止—。 *医学のあゆみ* **76** : 300-307, 昭46.
- 8) Hutchinson, W. C. et al. : The Determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst* **86** : 768, 1961.
- 9) Dishe, Z. : In the Nucleic Acid, ed. Chrgatt. E., Davidson *J N* **1** : 300, Academic Press 1955.
- 10) Burton, K. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical J* **62** : 315, 1956.
- 11) Lowry, O. H. et al. : Protein measurement

- with the folin phenol reagent. *J Bioch Chem* **193** : 265-275, 1954.
- 12) Fishman, W. H. et al. : Application of an improved glucuronidases assay method to the study of human blood β -glucuronidase. *J Biol Chem* **173** : 449, 1948.
- 13) Kato, K. et al. : Synthesis of p-nitrophenyl β -D-glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for the assay of β -grucuronidase activity. *Chem pharmac Bull* **8** : 239-242, 1960.
- 14) King, E. J. and Armstrong, A. R. : A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Canad M A J* **31** : 376-381, 1934.
- 15) 柴田家門 : 損傷脳に発生する反応性グリオージス組織の生化学的研究. *脳と神経* **25** : 329-336, 1973.
- 16) de Duve, C. et al. : Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* **60** : 604-617, 1955.
- 17) Allison, A. C. : Lysosomes and disease. *Sci-ent Amer* **217** : 62-72, 1967.
- 18) Novikoff, A. B. : Lysosomes and related particles in "The cell", Vol. II., ed. by Bracket, J. and Mirsky, A. E. Academic Press New York 423-488, 1961.
- 19) Novikoff, A. B. : Lysosome in Nerve cells, in Hyden, H. ed., *The Neuron*, New York Elsevier Pub Co 319-377, 1967.
- 20) Jacques, P. J. : Lysosomes in biology and pathology, ed. by Dingle, J. T. & Fell, H. B., North-Holland Pub Co Amsterdam **2** : 395, 1969.
- 21) 柴田家門, 他 (未発表)
- 22) Weissmann, G., : Labilization and stabilization of lysosomes. *Federation Proc* **23** : 1038-1044, 1964.
- 23) Weissmann, G. et al. : The effects of corticosteroids upon connective tissue and lysosomes, *Recent Progr. Hormone Res* **20** : 215-245, 1964.
- 24) Briggs, M. : Lysosomeal enzyme activation by steroid hormone in vivo. *J Steroid Biochem* **4** : 341-347, 1973.