

原 著

ラット肝アルデヒド脱水素酵素についての研究

長期アルコール連用に対するアルデヒド脱水素酵素の  
細胞内局在とレスポンス

飯 島 義 浩

信州大学医学部第二内科学教室  
(主任: 小田正幸教授)

STUDIES ON ALDEHYDE DEHYDROGENASES IN  
RAT LIVER

SUBCELLULAR DISTRIBUTION AND RESPONSE OF ALDEHYDE  
DEHYDROGENASE TO PROLONGED ETHANOL INGESTION

Yoshihiro IJIMA

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,  
Shinshu University  
(Director: Prof. Masayuki ODA)

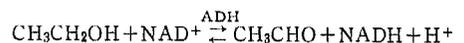
Key words: アルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase)  
アセトアルデヒド (acetaldehyde)  
アルコール長期連用 (prolonged ethanol ingestion)  
系統差 (strain difference)

I. 緒 言

アルコール性肝障害の成因に関しては、アルコール (EtOH) 自体の肝毒性を重視する説と、アルコール摂取に伴う栄養障害が主因であるとする説が長い間対立して来た。Lieber ら<sup>1)</sup>は食餌性因子の不足のない条件下でも、EtOH の投与量が多いさいにはラットに脂肪肝の発生が確実にみられることから EtOH の肝毒性を証明した。さらにヒヒにも同様に長期間、大量の EtOH を投与することにより、ヒトと類似の脂肪肝、アルコール性肝炎および肝硬変を作成することに成功した<sup>2)</sup>。現在ではこれらの実験成績から EtOH そのものの肝毒性が重視されて来ている。EtOH の直接的肝障害の発生機序に関しては、これまで数多くの説明がなされている。生化学的、薬理学的な面からも EtOH の脂質過酸化作用<sup>3)</sup>、EtOH によるコラーゲン代謝回転の亢進作用<sup>4)</sup>、EtOH 酸化に起因する細胞内代謝の乱れ<sup>5)</sup>、代謝産物で毒性の強いアセトアル

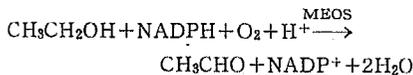
デヒド (ACE) による直接の肝細胞障害<sup>6)</sup>などが論じられている。

生体に投与された EtOH は胃、小腸、結腸から速やかに吸収され、90%以上が肝で代謝される。肝内で EtOH は ACE に酸化され、ついでアセテートへと段階的に酸化される。アセテートは主に肝外組織に運ばれ、acetyl-CoA に合成されて TCA cycle に入り CO<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O になる<sup>10)</sup>。EtOH 酸化の第一段階、すなわち EtOH → ACE は主にアルコール脱水素酵素 (ADH, Alcohol: NAD oxidoreductase, EC 1. 1. 1. 1) により触媒される。一部は non-ADH pathway である、カタラーゼ (EC 1. 11. 1. 6)<sup>11)</sup>と microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)<sup>12)</sup>により酸化される。ADH 反応は、

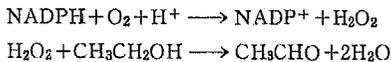


で示される。ADH は肝細胞可溶画分に局在する酵素で、これまでにカイネティクス、分子構造、アイン

ザイムなどが詳細に研究されている。この酵素が *in vivo* での EtOH 酸化の key enzyme であることはほぼ間違いないと思われるが、反応については NADH の NAD<sup>+</sup> への再酸化が反応の律速段階と考えられる<sup>13)</sup>。In vitro で測定された ADH 活性と、*in vivo* での EtOH 代謝速度との間には相関が認められない<sup>14)</sup>。In vitro で EtOH は肝ミクロゾームにより NADPH, O<sub>2</sub> 依存の酸化を受け、ACE になることが証明されている<sup>15)</sup>。しかし、この系の反応機構については以下の2つの見解があり、*in vivo* での EtOH 酸化における役割についても意見の一致をみていない。一つは NADPH, O<sub>2</sub> 依存の肝ミクロゾームの mixed function oxidase system であるとする立場<sup>12)</sup>で、

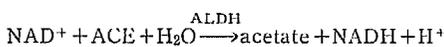


の反応式で示され、microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) と呼ばれている。もう一つは肝ミクロゾームの NADPH oxidase により生じた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と、同じくミクロゾームのカタラーゼ、あるいはほかのヘム蛋白がカプルして過酸化反応が起き、EtOH が酸化されるとする立場である<sup>11)</sup>。



*In vivo* での阻害剤あるいは inducer を用いた種々の実験から<sup>54)55)</sup>、これら non-ADH pathway が EtOH 酸化に果たす役割は大きくないと思われる。Pyrazole 処置ラットでは、MEOS は体内 EtOH 酸化の 20~25% を占めるといわれている<sup>16)</sup>。ADH の EtOH に対する Km 値は 2mM 以下と低いのに対して、MEOS のそれは 8~10mM と高いこと<sup>16)</sup>から生体内で EtOH 濃度が高い場合に、より大きな役割を演ずるものと思われる。

EtOH 酸化の第二段階、すなわち ACE → アセテートへの酸化は主として NAD<sup>+</sup> 依存アルデヒド脱水素酵素 (ALDH, Aldehyde : NAD oxidoreductase, EC 1. 2. 1. 3) が触媒し、ほかにフラビン酵素が関与する可能性が報告されている<sup>17)</sup>。ACE は ALDH により、つぎの様に酸化される。



ALDH は 1949 年 Racker<sup>18)</sup> により初めてウシ肝から精製され、NAD<sup>+</sup> 依存性であること、基質特異性が

低く ACE のほかに数多くのアルデヒドを基質としうることが報告された。その後ヒト<sup>19)</sup>、ウマ<sup>20)</sup>、ラット<sup>21)</sup>、マウス<sup>22)</sup> の肝からも精製され、肝のほか脳、腎、肺、心など<sup>21)23)</sup> に広く分布していることが知られている。肝細胞内分布についてはこれまで、可溶画分のみ存在するとされて来た<sup>21)23)</sup> が、近年になって主としてミトコンドリア画分に局在することが明らかとなった。またミクロゾーム画分にもかなり高い活性が認められている<sup>24)25)26)</sup>。Tottmar ら<sup>25)</sup> は、ラット肝には少なくとも 2 つの特異性の低い NAD<sup>+</sup> 依存 ALDH 活性が存在することを報告している。いわゆる enzyme I 活性は ACE に対する Km が 10μM 以下で、ミトコンドリアマトリックスに局在し、enzyme II 活性は ACE に対する Km が 0.9~1.7mM で、ミトコンドリア外膜、ミクロゾーム、可溶画分に認められる。

肝細胞内での EtOH 由来の ACE の酸化の場合については、ADH 反応と同様に細胞質で行われるものと信じられて来たが、ALDH 活性がミトコンドリアにおいて著しく高いことから疑問が持たれて来ている。Grunnet ら<sup>27)</sup> は分離ラット肝細胞を用いた実験で、ADH を介さない EtOH 酸化によって生じた ACE は、大部分ミトコンドリアで代謝されると報告している。これらの事実から、EtOH 酸化のさいに産生される ACE は、肝細胞内ミトコンドリアに局在する ALDH によって主に酸化されるものと思われる。

ALDH は phenobarbital などの inducer によって酵素活性が増加することが知られている。Phenobarbital で増加するのは可溶画分の酵素で、ミトコンドリア画分の酵素活性は不変である。この phenobarbital に対するレスポンスは遺伝支配を受けており、single autosomal co-dominant gene の存在が推測されている<sup>28)29)</sup>。一方、長期 EtOH 投与によっても phenobarbital と同様、肝細胞滑面小胞体の増生とミクロゾームの薬物代謝酵素の誘導がもたらされることが知られている<sup>30)31)32)</sup>。

EtOH の代謝産物である ACE は EtOH に比べて毒性が強い。しかし、EtOH 投与時の血中 ACE 濃度はきわめて低く、同時に存在する EtOH 濃度の約 1/1,000 といわれている<sup>33)</sup>。Korsten ら<sup>33)</sup> は、アルコール中毒患者と健康者に経静脈的に大量の EtOH を投与して血中 EtOH 濃度を一定にし、経時的に血中 EtOH, ACE 濃度を測定して、EtOH の血中消失速度には差がないこと、アルコール中毒患者で有意に高い

血中 ACE 濃度が持続することを認めている。Cederbaum ら<sup>8)</sup>は、慢性 EtOH 投与ラットの肝ミトコンドリアに酸化的リン酸化の障害、Ca<sup>2+</sup> 吸収の抑制などの機能的障害がみられること、in vitro で ACE の添加によってミトコンドリアに同様な障害が認められることから、アルコール性肝障害における ACE の役割を強調している。また、ACE はラット肝ミトコンドリアの脂肪酸酸化能をも低下させる<sup>34)</sup>。肝以外の臓器でも ACE により、脳内アミン代謝<sup>35)</sup>、心筋の蛋白合成能の抑制作用<sup>36)</sup>が認められており、種々の生体機能に及ぼす ACE の中毒作用が明らかにされつつある。

今回著者は、Wistar, Long-Evans および Sprague-Dawley の 3 系のラットを用いて、肝細胞各分画の ALDH の長期 EtOH 連用に対するレスポンスについて研究し、また系統差の有無についても検討を行った。

## II. 実験方法

### A. 実験動物

13週令の Wistar 系 (体重約 250g), Long-Evans 系 (約 300g), Sprague-Dawley 系 (約 300g) 雌ラットを用い、食餌はオリエンタル社製 MF 固型飼料を与えた。対照群には水を、長期 EtOH 連用群では 10% (v/v) EtOH のみを与えて、約 3ヶ月間自由に飲用させた。実験条件を一定にするため両群とも断頭屠殺前 12時間絶食にして実験に供した。

### B. 肝細胞下分画法

断頭後肝を素早く摘出し、氷冷 0.16M の KCl 溶液で洗い秤量した。ついで 4 倍容の 10mM sodium phosphate, pH 7.4 と 2mM mercaptoethanol を含む 0.25M sucrose 溶液を加え、Pottar 型 Teflon ホモジナイザー (クリアランス 0.1mm) を用い、上げ下げ 15回により homogenize した。homogenate を 700×g で 5 分間遠沈し、生じた上清をさらに 4,500×g で 10 分間遠沈し、沈査を 0.25M sucrose 溶液に浮遊させミトコンドリア画分用とし、上清はミクロゾームと可溶画分の分画に用いた。ミトコンドリア画分用の懸濁液を 4,500×g で 10 分間遠沈し、沈査を 0.25M sucrose 溶液で懸濁し 700×g で 5 分間遠沈し、上清を 4,500×g で 10 分間遠沈した。その沈査を初めの肝重量の 2 倍の量の 0.16M KCl 溶液に Teflon ホモジナイザーを用いて懸濁させ、0.3% (w/v) sodium deoxycholate で 20 分間処理した。その浮遊液を 106,

000×g で 60 分間遠沈し、上清をミトコンドリア画分として酵素活性を測定した。前述のミクロゾームと可溶画分を含む上清を 12,000×g で 15 分間遠沈し、その上清をさらに 106,000×g で 60 分間遠沈して得た上清を、10mM sodium phosphate と 2mM mercaptoethanol を含む 0.25M sucrose 溶液で 3 倍に稀釈して可溶画分の酵素活性測定に使用した。106,000×g で 60 分間遠沈し可溶画分を得た後の沈査を sucrose 溶液に懸濁し、さらに 106,000×g で 60 分間遠沈した。その沈査を当初肝重量の 2 倍量の sucrose 溶液に懸濁して、0.3% (w/v) sodium deoxycholate で 20 分間処理し 106,000×g で 60 分間遠沈後、上清を 2 倍量の sucrose 溶液で稀釈してミクロゾーム画分の酵素標本として使用した。

### C. 酵素活性測定

#### 1. ALDH 活性の測定

著者らが以前に報告した方法<sup>37)</sup>に準じて行なった。基質に ACE を用い波長 340nm での NADH 生成速度を HITACHI EPS-3T 型自記分光光度計で測定した。反応液は 50mM sodium pyrophosphate, pH 8.8; 1.0mM NAD<sup>+</sup>; 0.1mM pyrazole; 0.025~5mM ACE と 2μM rotenone を使用した。反応液量は計 3.0ml である。反応は基質を入れて開始させ、25°C で 2 分間測定しその初速度を測定した。

#### 2. 標識酵素活性の測定

##### a. Monoamine oxidase (EC 1.4.3.4)

Schurr と Livne の方法<sup>38)</sup>により測定した。基質に benzylamine hydrochloride を用い benzaldehyde hydrochloride の産生を波長 250nm で測定した。反応液は 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.4; 1mM benzylamine hydrochloride に酵素標本を加え 37°C, 20 分間インキュベートし、1.4% ZnSO<sub>4</sub> と 0.67N NaOH で除蛋白を行ない、10,000 rpm, 10 分間遠沈しその上清について測定した。

##### b. Glutamate dehydrogenase

(EC 1.4.1.3)

Tottmar ら<sup>25)</sup>の方法に準じて測定した。反応液は 50mM potassium phosphate, pH 7.5; 100mM ammonium acetate; 0.2mM NADH; 1mM ADP; 0.1% (v/v) Triton X-100 に 7mM の α-oxoglutarate を加えて吸光度を測定した。

##### c. NADPH-cytochrome c reductase

(EC 1.6.2.3)

Phillips と Langdon の方法<sup>39)</sup>で測定した。

各画分の蛋白量は Lowry 法<sup>40)</sup>により bovine serum albumin をスタンダードとして求めた。

3. ALDH の ACE に対する見掛けの  $K_m$  値は 0.025~5mM の ACE を用いて Lineweaver と Burk<sup>41)</sup>の方法, Reiner<sup>42)</sup>の方法から求め、有意差検定は F-検定で行なった。

### III. 実験成績

NADPH-cytochrome c reductase 活性はミトコンドリア画分に約9%, 可溶画分に約5%認められた。Monoamine oxidase 活性はマイクロゾーム画分に約49%, 可溶画分に約0.5%認め、glutamate dehydrogenase 活性はそれぞれに約20%, 10%認められた。すなわち、本実験の細胞下分画法でミトコンドリアからマイクロゾームへの酵素の移行は、外膜で約49%, マトリックスで約20%であった。しかし、ミトコンドリアとマイクロゾームの酵素の可溶画分への contamination は少なかった。

#### A. ALDH 活性の肝細胞内局在

##### 1. ミトコンドリア画分

Fig. 1 は無処置 Wistar 系ラット肝ミトコンドリア ALDH の Lineweaver-Burk プロットである。ACE に対し全く異なる見掛けの  $K_m$  値を有する2種類の ALDH が存在し、一方は  $K_m$  値 0.013mM (low  $K_m$ -enzyme), 他方は 0.75mM (high  $K_m$ -enzyme) であった。ほかの2系のラットについても同様であり、系統差は認められなかった (Table 1)。

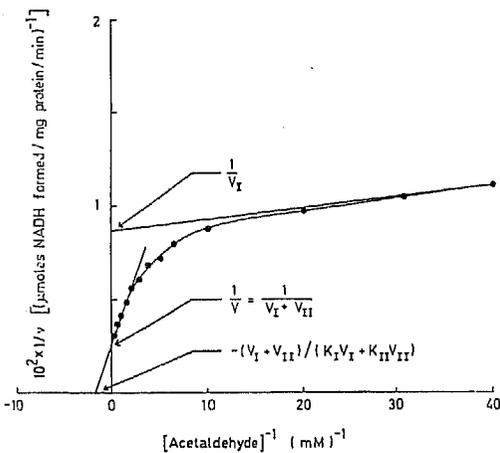


Fig. 1. Double reciprocal plot for the oxidation of acetaldehyde by mitochondria

##### 2. 可溶画分

Fig. 2 は無処置 Wistar 系ラット肝の可溶画分に基質として ACE を用いた時の double reciprocal plot である。明らかに異なる  $K_m$  値をもつ2種類の ALDH の存在を示し、おのおのの見掛けの  $K_m$  値は 0.009 mM (low  $K_m$ -enzyme) と 2.07mM (high  $K_m$ -enzyme) であった。しかも、これらの酵素活性はミトコンドリア画分の酵素活性に比べてかなり低い。ほかの2系についても同様であった (Table 1, 2)。

##### 3. ミクロゾーム画分

Fig. 3 はマイクロゾーム画分の ACE 酸化の Lineweaver-Burk プロットである。ミトコンドリア画

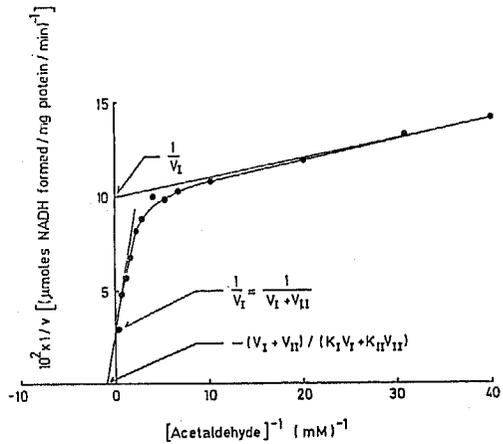


Fig. 2. Double reciprocal plot for the oxidation of acetaldehyde by soluble fraction

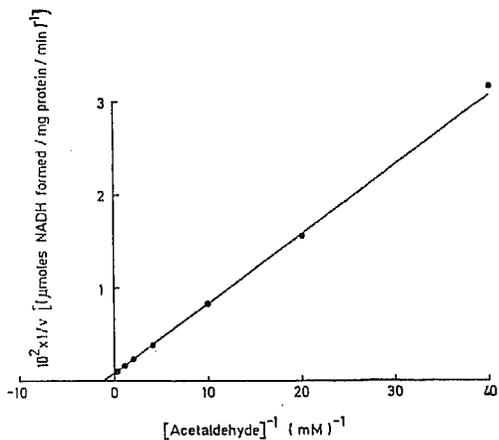


Fig. 3. Double reciprocal plot for oxidation of acetaldehyde by microsomes

Table 1. Apparent Km Values of Aldehyde Dehydrogenases

Strain	Liquid Ingestion	Mitochondrial fraction		Soluble fraction		Microsomal fraction
		Low Km-enzyme	High Km-enzyme	Low Km-enzyme	High Km-enzyme	
Wistar	Water (17)	0.013±0.004	0.75±0.10	0.009±0.003	2.07±0.67	1.92±0.54
	EtOH (17)	0.011±0.003	0.70±0.11	0.011±0.004	1.92±0.85	1.92±0.54
Long-Evans	Water (17)	0.015±0.003	0.60±0.08	0.017±0.005	1.18±0.04	1.05±0.17
	EtOH (17)	0.015±0.004	0.65±0.14	0.016±0.005	1.33±0.16	1.13±0.31
Sprague-Dawley	Water (15)	0.013±0.003	0.61±0.09	0.010±0.005	0.91±0.07	1.00±0.20
	EtOH (15)	0.010±0.005	0.73±0.09	0.008±0.003	1.20±0.20	1.00±0.18

The value is shown as mean value ± standard deviation.

The number of animals used for each value is in parentheses.

Apparent Km : acetaldehyde mM saturating NAD<sup>+</sup>

Table 2. Activities of Aldehyde Dehydrogenases after Prolonged Ethanol Ingestion

Strain	Liquid Ingestion	Mitochondrial fraction		Soluble fraction		Microsomal fraction
		Low Km-enzyme	High Km-enzyme	Low Km-enzyme	High Km-enzyme	
Wistar	Water (17)	16.0±1.6	34.5±8.5	1.0±0.5	4.7±1.4	99.8±1.5
	EtOH (17)	14.9±2.9	35.7±4.6	2.1±0.6**	5.3±0.5	99.3±7.9
Long-Evans	Water (17)	13.6±1.5	36.7±4.8	1.5±0.2	6.3±2.0	105.3±7.8
	EtOH (17)	14.6±2.2	37.9±7.2	1.5±0.4	6.1±0.9	107.7±7.6
Sprague-Dawley	Water (15)	12.7±3.0	38.6±5.7	1.6±0.7	6.7±1.3	87.4±23.7
	EtOH (15)	10.1±2.3	35.5±3.0	1.9±0.6	7.8±1.1*	92.1±6.4

The value is shown as mean value ± standard deviation.

The number of animals used for each value is in parentheses.

Enzyme activity :  $\mu$ moles NADH formed/mg protein/min

Low Km-enzyme activity : 0.05mM acetaldehyde

High Km-enzyme activity : 5mM acetaldehyde-0.05mM acetaldehyde

Microsomal enzyme activity : 5mM acetaldehyde

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  for difference between control and ethanol-treated rats

分、可溶画分と異なり直線であった。見掛けの Km 値は 1.92mM で、ほかの 2 系についても同様であった (Table 1)。

以上のごとく、ALDH 活性の肝細胞下分布と各画分の ALDH 活性には系統差は認められなかった。

#### B. 長期 EtOH 連用に対する各画分酵素のレスポンス

Wistar 系ラットにおいてのみ、可溶画分の low Km-enzyme 活性が約 2 倍に増加した。ほかの 2 系においては変化が認められなかった。Sprague-Dawley 系ラットにおいてのみ、可溶画分の high Km-enzyme 活性が軽度ではあるが有意に増加した。他の 2

系においては変化は認められなかった。すなわち、EtOH により可溶画分酵素のレスポンスには系統差が認められた。ミトコンドリア、ミクロゾーム画分の ALDH 活性は長期 EtOH 連用により変らなかつた (Table 2)。

いずれの系においても、長期 EtOH 連用により、各画分の ALDH の見掛けの Km 値は変らなかつた (Table 1)。

#### IV. 考 案

##### A. ALDH の肝細胞内局在について

この酵素は生体内で肝、脳、腎、肺、心などに広く

分布しているが、特に肝に多く存在している<sup>21)23)</sup>。酵素活性の肝細胞内分布に関して、これまで数多くの報告がなされて来ている。Büttner<sup>23)</sup>および Deitrich<sup>21)</sup>はラット肝細胞内の ALDH の分布について研究し、酵素活性のほとんどは可溶画分に認められると報告している。Deitrich<sup>21)</sup>はミトコンドリアとミクロゾーム画分にも酵素活性を認めており、さらにゲル濾過法により、可溶画分の酵素とミトコンドリア画分の酵素が異なることを示唆している。これに対し Marjanen<sup>43)</sup>は、ALDH 活性はラット肝の可溶画分には約20%しか認められず、残り80%はミトコンドリア画分に局在すると報告している。Büttner<sup>23)</sup>は基質として 27mM の ACE を用い、Marjanen<sup>43)</sup>は 0.5mM の ACE を用いている。その後さらに Shum と Blair<sup>44)</sup>は、ラット肝可溶画分から2種の異なる ALDH を分離して部分精製し、それらが基質特異性、至適 pH、阻害剤に対する態度を異にし、ACE に対する見掛けの Km 値とともに mM のオーダーであると報告している。しかし、これらの Km 値はいずれも Marjanen<sup>43)</sup>の報告 ( $10^{-5}$ M 以下)に比べ著しく高い。

Tottmar<sup>25)</sup>は、ラット肝 ALDH のカイネティクスから、少なくとも2つの特異性の低い NAD<sup>+</sup> 依存 ALDH 活性が存在することを報告している。いわゆる enzyme I 活性は、ACE に対する Km が  $10\mu\text{M}$  以下でミトコンドリアマトリックスに局在し、enzyme II 活性は、ACE に対する Km が  $0.9\sim 1.7\text{mM}$  でミトコンドリア外膜 (20~30%)、ミクロゾーム (70~80%) と可溶画分 (5%以下) に分布することを明らかにした。この成績はその後、Horton と Barrett<sup>45)</sup>、Koivula と Koivusalo<sup>26)</sup>によりほぼ確認されている。

今回著者は、基質  $0.025\sim 5\text{mM}$  の ACE を用いてラット肝細胞各画分の ALDH のカイネティクスを検討し、ACE に対してミトコンドリア画分で Km  $0.013\sim 0.015\text{mM}$  および  $0.60\sim 0.75\text{mM}$  の2つ、可溶画分で、Km  $0.009\sim 0.017\text{mM}$  および  $0.91\sim 2.07\text{mM}$  の2つ、ミクロゾーム画分で Km  $1.0\sim 1.92\text{mM}$  の ALDH を認めた。Low Km-enzyme 活性はミトコンドリア画分に局在し (89~94%)、一部可溶画分にも存在した (6~11%)。High Km-enzyme 活性はミトコンドリア (25~29%)、可溶画分 (3~5%) とミクロゾーム画分 (66~72%) に存在した。著者の成績は ALDH 活性の肝細胞内局在に関しては、Tottmar<sup>25)</sup>の成績とよく一致していたが、ミトコンドリア画分の high Km-enzyme の Km 値がいわゆる en-

zyme II 活性のそれよりも低く、少なくともカイネティクスからはミトコンドリアの high Km-enzyme は、他の画分の high Km-enzyme とは異なると考えられる。

以上、現在のところラット肝 ALDH については、ACE に対する Km 値を異にする少なくとも2つ以上の酵素の存在が考えられ、ミトコンドリア画分、可溶画分そしてミクロゾーム画分に局在していることが確かめられた。

#### B. 長期 EtOH 連用による肝細胞内 ALDH のレスポンスについて

Korsten<sup>39)</sup>は、ヒトに経静脈的に EtOH を点滴静注して血中 EtOH 濃度が約 20mM (約 100mg/dl) 以上の時は、血中 ACE 濃度は EtOH の血中濃度と関係なく一定であることと、アルコール中毒患者 (delirium tremens と軽度肝機能障害のある) の禁酒2週間以内の臨床実験における血中 ACE 濃度は  $42.7\pm 1.2\mu\text{M}$  と健康者の  $26.5\pm 1.5\mu\text{M}$  に比し有意に高いことを報告している。このアルコール中毒患者にみられる高 ACE 血症発現の機序として、つぎの2つが考えられる。1つは肝内 ACE 産生の増加である。長期 EtOH 連用によりヒト、動物において EtOH の血中消失速度の促進が認められている<sup>46)47)</sup>。EtOH 酸化に主として関与する ADH に関しては、長期 EtOH 連用による活性の変化について一定の結論が出ていない<sup>48)</sup>が、MEOS 活性は誘導される<sup>16)49)</sup>。もう1つの機序としては肝の ACE 酸化能、とくにミトコンドリアの ACE 酸化能の低下が考えられる。すなわち、EtOH 由来の ACE の酸化に主として関与するミトコンドリアの low Km-enzyme 活性の低下が考えられる。

長期 EtOH 連用によるラット肝の ALDH 活性については、現在までのところ一致した成績は得られていない。Horton<sup>50)</sup>と Hasumura<sup>41)</sup>は、それぞれ  $26.4, 60\mu\text{M}$  の ACE を基質として長期 EtOH 投与ラット肝ミトコンドリア画分の ALDH 活性を測定し増加すると報告している。彼らのいう酵素活性は著者の実験のミトコンドリア画分の low Km-enzyme 活性に一致すると思われるが、著者の成績ではいずれの系のラットにおいても変化が認められなかった。成績の異なる原因として、EtOH の投与量・期間などが考えられる。なお、彼らはミトコンドリアの high Km-enzyme 活性、可溶画分とミクロゾーム画分の酵素活性については測定していない。一方、Tottmar<sup>25)</sup>は5

mM の ACE を, Koivula と Lindros<sup>52)</sup>は 4.5mM の propionaldehyde と 0.5mM の ACE を基質として, 長期 EtOH 投与ラット肝のミトコンドリア, ミクロゾームと可溶画分の ALDH 活性を測定した。前者は対照群と差がみられなかったとし, 後者は3画分とも低下したと報告している。しかし, これらは用いた基質濃度の問題があり, この基質濃度では total activity を測定していることになる。著者の今回の実験は, 0.05mM と 5mM の ACE を基質として用いて行ない, Wistar 系ラットと Sprague-Dawley 系ラットの可溶画分の, それぞれ low Km-enzyme と high Km-enzyme 活性が有意に上昇していた。

これらの ALDH 活性の変化が, EtOH 酸化由来の ACE の酸化に及ぼす意義付けは難しい。最近, Hasumura<sup>ら</sup><sup>9)</sup>は低濃度 (60 $\mu$ M) の ACE を用いて, 長期 EtOH 連用ラットでは対照群と比べて肝ミトコンドリアの ACE 酸化能が有意に減少していることを認めている。

#### C. ALDH 誘導の遺伝支配について

Deitrich<sup>28)</sup>と Deitrich<sup>ら</sup><sup>29)</sup>は, ラットに phenobarbital を投与して 0.33mM の propionaldehyde で ALDH 活性を測定すると, 肝可溶画分の酵素活性が約10倍も上昇するが, ミトコンドリア画分では上昇がみられないことを認めている。この酵素誘導は遺伝支配を受けており, single autosomal co-dominant gene の存在が考えられている。また系統差が認められている。

EtOH も長期投与により肝の滑面小胞体の増生が認められ, microsomal mixed-function oxidase system を誘導することが知られているが, この機序は phenobarbital とは異なると考えられている<sup>30)-32)53)</sup>。

今回の長期 EtOH 投与ラットの実験では, Wistar 系ラットと Sprague-Dawley 系ラットの肝可溶画分で, それぞれ low Km-enzyme と high Km-enzyme 活性の有意の増加がみられたが, Long-Evans 系ラットにおいては変化がなかった。すなわち, 長期 EtOH 投与によりラット肝可溶画分酵素のレスポンスには系統差が認められた。

#### V. 結 語

アルコール性臓器障害とくに肝障害における ACE の役割が注目されて来ている。

今回著者は, 肝細胞各画分の Km 値の異なる各 ALDH 活性に及ぼす長期 EtOH 投与の影響, 特に EtOH

由来の ACE の酸化に主に関与すると思われるミトコンドリアの low Km-enzyme のレスポンスを検討した。また, EtOH 効果の系統差をみる目的で3系のラットについて研究した。

A. ミトコンドリア画分の low Km-enzyme, high Km-enzyme 活性は, いずれの系においても長期 EtOH 連用によって変化がなかった。

B. 可溶画分の酵素活性は Wistar 系ラットにおいてのみ, 長期 EtOH 連用により low Km-enzyme 活性が約2倍に増加した。Sprague-Dawley 系ラットにおいてのみ, high Km-enzyme 活性が軽度ではあるが有意に増加した。すなわち, EtOH に対する可溶画分酵素のレスポンスには系統差が認められた。

C. ミクロゾーム画分の酵素活性はいずれの系においても変化がみられなかった。

D. いずれの系においても, 長期 EtOH 連用により, 各画分の ALDH の見掛けの Km 値は変らなかつた。

本論文の要旨は1976年9月第11回, 1977年6月第12回日本アルコール医学会総会において発表された。

稿を終るにあたり御指導, 御校閲を頂いた小田正幸教授に深謝致します。直接御指導頂いた富山医科薬科大学薬理学の中西頼央教授に深謝致します。

本研究は, 本学薬理学教室の御援助により行なった。御校閲頂いた千葉茂俊教授ならびに種々の御援助を頂いた塩原あい子講師に深謝致します。

#### 文 献

- 1) Lieber, C. S., Jones, D. P., Mendelson, J. and DeCarli, L. M.: Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption, despite adequate dietary intake. *Trans. Ass. Amer. Phycns*, 76: 289-300, 1963
- 2) Lieber, C. S., DeCarli, L. M. and Rubin, E.: Sequential production of fatty liver, hepatitis, and cirrhosis in sub-human primates fed ethanol with adequate diets. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72: 437-441, 1975
- 3) Di Luzio, N. R. and Hartman, A. D.: Rate of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. *Fed. Proc.*, 26: 1436-1442, 1967

- 4) Feinman, L. and Lieber, C. S. : Hepatic collagen metabolism : Effect of alcohol consumption in rats and baboons. *Science*, 176 : 795, 1972
- 5) Chen, T. and Leevy, C. M. : Ethanol-induced collagen synthesis in liver. *Gastroenterology*, 62 : 173, 1972
- 6) Rawat, A. K. : Effects of ethanol infusion on the redox state and metabolite levels in rat liver in vivo. *Europ. J. Biochem.*, 6 : 585-592, 1968
- 7) Forsander, O. A. : Influence of ethanol on the redox state of the liver. *Quart. J. Stud. Alcohol*, 31 : Part B, 550-570, 1970
- 8) Cederbaum, A. I. and Rubin, E. : Molecular injury to mitochondria produced by ethanol and acetaldehyde. *Fed. Proc.*, 34 : 2045-2051, 1975
- 9) Hasumura, Y., Teschke, R. and Lieber, C. S. : Acetaldehyde oxidation by hepatic mitochondria : Decrease after chronic ethanol consumption. *Science*, 189 : 727-729, 1975
- 10) Lundquist, F., Tygstrup, N., Winkler, K., Mellemsgaard, K. and Munck-Petersen, S. : Ethanol metabolism and production of free acetate in the human liver. *J. clin. Invest.*, 41 : 955-961, 1962
- 11) Thurman, R. G., Ley, H. G. and Scholz, R. : Hepatic microsomal ethanol oxidation : Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Europ. J. Biochem.*, 25 : 420-430, 1972
- 12) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : Ethanol oxidation by hepatic microsomes : Adaptive increase after ethanol feeding. *Science*, 162 : 917-918, 1968
- 13) Lundquist, F. and Wolthers, H. : The kinetics of alcohol elimination in man. *Acta pharmacol. (Kbh.)*, 14 : 265-289, 1958
- 14) Wallgren, H. and Barry, H. : In "Actions of Alcohol", vol. 2, pp.871, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1970
- 15) Orme-Johnson, W. H. and Ziegler, D. M. : Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 21 : 78-82, 1965
- 16) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 181 : 279-287, 1972
- 17) Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. : Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. biol. Chem.*, 237 : 922-928, 1962
- 18) Racker, E. : Aldehyde dehydrogenase, a diphosphopyridine nucleotide-linked enzyme. *J. biol. Chem.*, 177 : 883-892, 1949
- 19) Blair, A. H. and Bodley, F. H. : Human liver aldehyde dehydrogenase : partial purification and properties. *Canad. J. Biochem.*, 47 : 265-272, 1969
- 20) Feldman, R. I. and Weiner, H. : Horse liver aldehyde dehydrogenase. I. Purification and characterization. *J. biol. Chem.*, 247 : 260-266, 1972
- 21) Deitrich, R. A. : Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochem. Pharmacol.*, 15 : 1911-1922, 1966
- 22) Sheppard, J. R., Albersheim, P. and McClearn, G. : Aldehyde dehydrogenase and ethanol preference in mice. *J. biol. Chem.*, 245 : 2876-2882, 1970
- 23) Büttner, H. : Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase-Aktivität in Leber und Niere der Ratte. *Biochem. Z.*, 341 : 300-314, 1965
- 24) Smith, L. and Packer, L. : Aldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem.*, 148 : 270-276, 1972
- 25) Tottmar, S. O. C., Pettersson, H. and Kiesling, K.-H. : The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochem. J.*, 135 : 577-586, 1973
- 26) Koivula, T. and Koivusalo, M. : Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim. biophys. Acta*, 397 : 9-23, 1975

- 27) Grunnet, N., Quistorff, B. and Thieden, H. I. D.: In "Alcohol and Aldehyde Metabolizing System", pp.137-146, Eds. Thurman, R. G., Yonetani, T., Williamson, J. R. and Chance, B., Academic Press, New York and London, 1974
- 28) Deitrich, R. A.: Genetic aspects of increase in rat liver aldehyde dehydrogenase induced by phenobarbital. *Science*, 173: 334-336, 1971
- 29) Deitrich, R. A., Collins, A. C. and Erwin, V. G.: Genetic influence upon phenobarbital-induced increase in rat liver supernatant aldehyde dehydrogenase activity. *J. biol. Chem.*, 247: 7232-7236, 1972
- 30) Rubin, E., Bacchin, P., Gang, H. and Lieber, C. S.: Induction and inhibition of hepatic microsomal and mitochondrial enzymes by ethanol. *Lab. Invest.*, 22: 569-580, 1970
- 31) Iseri, O. A., Lieber, C. S. and Gottlieb, L. S.: The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Amer. J. Path.*, 48: 535-555, 1966
- 32) Kawahara, I., Kawai, H., Nakanishi, S., Kinoshita, G., Shiohara, E. and Tsukada, M.: Aniline p hydroxylase activity and ultrastructure of the smooth endoplasmic reticulum after chronic ethanol feeding and after withdrawal from ethanol in rats. *Jap. J. Stud. Alcohol*, 8: 24-30, 1973
- 33) Korsten, M. A., Matsuzaki, S., Feinman, L. and Lieber, C. S.: High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. Difference between alcoholic and nonalcoholic subjects. *New Engl. J. Med.*, 292: 386-389, 1975
- 34) Cederbaum, A. I., Lieber, C. S. and Rubin, E.: Effect of acetaldehyde on fatty acid oxidation and ketogenesis by hepatic mitochondria. *Arch. Biochem.*, 169: 29-41, 1975
- 35) Ortiz, A., Griffiths, P. J. and Littleton, J. M.: A comparison of effects of chronic administration of ethanol and acetaldehyde to mice. Evidence for a role of acetaldehyde in ethanol dependence. *J. Pharm. Pharmacol.* 26: 249-260, 1974
- 36) Schreiber, S. S., Oratz, M., Rothschild, M. A., Reff, F. and Evans, C.: Alcoholic cardiomyopathy. II. The inhibition of cardiac microsomal protein synthesis by acetaldehyde. *J. molec. cell. Cardiol.*, 6: 207-213, 1974
- 37) Nakanishi, S., Shiohara, E., Tsukada, M. and Iijima, Y.: Aldehyde dehydrogenase activities after treatment with phenobarbital in Long-Evans rats. *Jap. J. Stud. Alcohol*, 12: 5-12, 1977
- 38) Schurr, A. and Livne, A.: Differential inhibition of mitochondrial monoamine oxidase from brain by hashish components. *Biochem. Pharmacol.*, 25: 1201-1203, 1976
- 39) Phillips, A. H. and Langdon, R. G.: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: Isolation, characterization and kinetic studies. *J. biol. Chem.*, 237: 2652-2660, 1962
- 40) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951
- 41) Lineweaver, H. and Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. chem. Soc.*, 56: 658-666, 1934
- 42) Reiner, J. M.: In "Behavior of Enzyme Systems", 2nd edn., pp.127-132, Van Nostrand-Reinhold Co. New York, Toronto, London and Melbourne, 1969
- 43) Marjanen, L.: Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem. J.*, 127: 633-639, 1972
- 44) Shum, G. T. and Blair, A. H.: Aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Canad. J. Biochem.*, 50: 741-748, 1972
- 45) Horton, A. A. and Barrett, M. C.: The subcellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Arch. Biochem.*, 167: 426-436, 1975
- 46) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M.: Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system: In vi-

- tro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. biol. Chem.*, 245 : 2505-2512, 1970
- 47) Misra, P. S., Lefèvre, A., Ishii, H., Rubin, E. and Lieber, C. S. : Increase of ethanol, meprobamate and pentobarbital metabolism after chronic ethanol administration in man and in rats. *Amer. J. Med.*, 51 : 346-351, 1971
- 48) 中西顯央 : アルコールの代謝. *臨床精神医学*, 2 : 47-53, 1973
- 49) Matsumura, R., Masamura, E., Tsukada, M. and Nakanishi, S. : Ethanol oxidation by the hepatic microsomes after prolonged ethanol treatment. *Med. Shinshu Univ.*, 15 : 291-292, 1971
- 50) Horton, A. A. : Induction of aldehyde dehydrogenase in a mitochondrial fraction. *Biochim biophys. Acta*, 253 : 514-517, 1971
- 51) Tottmar, S. O. C., Kiessling, K.-H. and Forsling, M. : Effects of phenobarbital and ethanol on rat liver aldehyde dehydrogenases. *Acta pharmacol. (Kbh.)*, 35 : 270-276, 1974
- 52) Koivula, T. and Lindros, K. O. : Effects of long-term ethanol treatment on aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 24 : 1937-1942, 1975
- 53) Nakanishi, S., Masamura, E., Tsukada, M., Miyazawa, T. and Matsumura, R. : Hepatic drug-metabolizing enzymes in rat with adequate diet after prolonged ethanol treatment. *Med. J. Shinshu Univ.*, 15 : 91-95, 1970
- 54) Kanna, J. M. and Kalant, H. : Effects of inhibitors and inducers of drug metabolism on ethanol metabolism in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 19 : 2033-2041, 1970
- 55) Kanna, J. M., Kalant, H., Lin, G. and Bustos, G. O. : Effects of carbon tetrachloride treatment on ethanol metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 20 : 3269-3279, 1971

(53. 3. 22 受稿)