

部分肝切除後の再生肝における α 1-酸性糖蛋白質産生機能評価

菅原 満 [北海道大学医学部附属病院薬剤部／助教授]

背景・目的

α 1-酸性糖蛋白質(AAG)はその生理的機能は未だ明らかにはなっていないが、主に循環器系疾患に用いられる塩基性薬物を始めとする種々の薬物を結合し、その体内動態に影響をおぼすことが知られている。近年、肝移植例が急増し、肝移植患者や時には提供者に対する薬物治療を必要とする機会が多い。AAGは肝臓で生合成されるため、肝移植患者や提供者では生成量が変化していると考えられる。したがって、通常の薬物投与量では多すぎたり少なすぎることも考えられる。そこで本研究では部分肝切除後のAAG血漿中濃度の変動と再生された肝組織におけるAAG合成能を蛋白質レベルおよびmRNAレベルで健常時と比較する。

内容・方法

1 ラット部分肝切除術

ラット(Wistar系、雄性)の全肝臓の約60~70%を切除した。Sham手術では正中切開後、肝臓を摘出せずに閉腹した。

2 CYP3A活性測定

CYP3A活性の測定は、摘出したラット肝組織からミクロゾーム画分を調製し、テストステロンの 6β 水酸化反応を測定することを行った。

3 血漿からの蛋白除去によるAAG部分精製とSDS-PAGEによる分離

血漿中AAGを部分精製し、SDS-PAGEにより分離した。

4 Western blotting法

上記3で得られたサンプルを電泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、抗ラットAAG抗体を用いて常法に従ってWestern blottingを行った。この際、抗体をあらかじめHRP標識し、ECL試薬(ファルマシア)による化学発光をX線フィルムで検出した。

5 RT-PCR法によるAAG-mRNAの検出

部分切除後、12、24、48、72時間後に摘出した肝組織からtotal RNAを抽出し、RT-PCRの手法を用いてAAGのmRNA発現量を比較した。

結果・成果

AAG濃度やmRNAの検討に先立って、部分切除後の肝臓重量の回復や酵素活性から見た機能回復の経時推移から肝

再生期と考えられる時期を推定した。まず、切除後の肝臓がどの程度の速さで回復するかを見る目的で、肝重量の推移を検討した。1日目までは肝重量に変化は認められなかつたが、それ以降、急激に増加し、3日目にはほぼもとの大きさにまで戻ることが明らかとなった。術後1日経過した時点から約3日目までが再生期にあることが示唆された。一方、肝ミクロソームCYP3A活性は肝切除後約24時間で最低値を示し、その後、徐々に増大するが重量変化においてほぼ100%の回復が認められた3日後においても約44%と低値であった。その後さらに回復を続け、7日後にはほぼ100%まで回復し、重量の回復に比べ遅れて起ることが明らかとなった。これらの結果より、少なくとも術後1日経過時点から3日までは重量、機能いずれにおいても再生期にあるものと推察された。

血漿からAAGを部分精製したといえ、SDS-PAGEでは多数のバンドが認められ、AAGに特異的なバンドを比較することが困難であった。そこで、Western blottingによるラット血漿中AAG濃度の経時的推移を検討した。その結果、術前に比べ術後36および72時間後では、血漿中AAG含量が高くなっている。AAG濃度は肝再生期には顕著に上昇することが明らかになった。この変化は、酵素活性が肝切除により一端低下し、その後回復して正常値に戻るという推移を示したのに対し、術前の状態から増大するという点で異なっていた。このような推移を示す理由として、一つは切除したにもかかわらず全体としてのAAG産生量が増加したことがあげられる。もう一つの理由としてAAGの消失速度が遅くなっている可能性が考えられる。AAGの消失機構としては循環血液中でアシクロバドとなり、肝細胞表面のレセプター(アシクロバドレセプター)に結合し細胞内に取り込まれ分解されるが、肝切除によりレセプター数の減少と取り込み機能が低下したことが考えられる。実際、切除36時間後および72時間後ではWestern blottingにより低分子量のバンドが認められており、これがアシクロバドの可能性も考えられる。

AAG産生量の増大とは異なり、mRNAレベルには肝再生期においてもほとんど変化は認められなかつた。したがって、肝再生時のAAG産生量増大には蛋白合成過程の regulatonが関与しているものと推察される。

今後の展望

今回の検討から、肝再生期にはAAGの濃度増大(量的変動)が起こることが明らかとなった。今後はAAG濃度増大が薬物結合量におよぼす影響を定量的に評価する必要があるものと考えられる。また、AAGには遺伝的変異体や不均一性体の存在も知られており、それぞれに対する薬物結合性が異なることが明らかにされつつあることから、肝再生期に増大する変異体や不均一性体の分子種の特定も重要と思われる。最後に、AAGの生理機能や産生のメカニズムは未だ明らかにされていないことから、この点についても解明が期待される。