

培養肝細胞内Ca²⁺および蛋白分泌 に対するビタミンKの影響

東邦大学医学部生化学

浦山 功, 伴野 雅洋
東邦大学医学部小児科

埜 嘉之
東邦大学医学部第2病理

伊藤 金次

研究の背景と目的

抗生物質投与, 下痢, 肝障害, 母体への薬剤投与など原因の明らかな続発性ビタミンK (以下VK) 低下を除外して, 新生児および乳児における特発性のVK欠乏性出血傾向とされるものについて, その発症機構を考察するために種々事実関係を整理して見ると, まず第一に母乳栄養児の場合が殆どである^{1,2)}。第二に原因がどうであれVK投与には予防および治療効果がある³⁾。第三に血中PIVKAの高値またはプロトロンビン活性/抗原の比低下に対して例外が存在する^{4,5)}。また第四に母乳中のビタミンK含有量も統計的に低値ではあるがバラツキの中は広く例外的存在が少なくない⁶⁾。以上四つの観点をふまえて考えた場合, 血中プロトロンビン活性等の低下が肝細胞内のカルボキシレーション反応不全のみが原因であるとは断言できず, また母乳栄養によるVK不足だけがその発症原因であるとも言い難く思われる⁶⁾。勿論それらが主原因であるとしても, 発症に至るには他条件を必要とする場合もあり得ることは否定できない。肝細胞がVK依存性凝固因子を供給するためにはPIVKA生合成, 次にカルボキシレーション, そして分泌の三段階の経過が必要である。従って血中プロトロンビン活性等が低下する原因を追求するとき, VKが決定的に不足していない場合はカルボキシレーション酵素系の未発達や分泌障害の有無が論理的に問題となる。但しこの酵素蛋白系の未成熟を証明する報告は今のところない。他方, 分

泌機能との関連性は未知ではあるがVKの生理作用として肝細胞などの膜蛋白に働き細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる作用がある。このことからVKが肝細胞の蛋白分泌に対して促進作用があるかどうか, また母乳成分に細胞の泌泌機能を抑制するものがないかどうかを新たな問題としてとらえる必要性を考え, この点の検索目的として, Ca²⁺動態の観察, 母乳成分で問題となるPregnane-diol steroid存在非存在下におけるVK刺激前後の培養肝細胞内プロトロンビンおよびフィブリノーゲン等の染色観察を行った。

材料および方法

1. 肝細胞懸濁液の作製

ラット肝の組織細片をCa-Free Hanks液に入れ, 振盪後ガーゼ濾過し, 細片を集め, それをコラゲナーゼ液に入れて振盪した。できた細胞懸濁液をガーゼ濾過し, 濾液を低速遠心した。上清を捨てHanks液で更に低速遠心法による洗浄操作し, 最後に10% FCS加MEM培養液に10⁶ CELLS/mlの懸濁液を作製した。

2. カバーガラス接着細胞標本の作製

シャーレにカバーガラス(特注サイズ)を入れ, 各ガラス上所定の位置にステンレスリング(特注)を乗せ, リングが埋没しない程度の培養液を満たした。リング内に10⁵個程度の細胞を入れ, CO₂インキュベーターで24時間放置後, リング内外共にMEM無血清培養液に換え, 更に24時間インキ

ュベートした。

3. 細胞内Ca²⁺変動の観察

カバーガラスに接着処理した肝細胞の培養液に濃度0.25mM QUIN2/AMを添加し、37℃、3時間インキュベートした。

BSS (130mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂, 5.5mM glucose, 10mM HEPES, pH 7.8) を満たした蛍光光度計用石英セルの対角線上に上記カバーガラスの細胞接着面を励起光に向けてそれを差入れ、蛍光光度計にセットした。Excitation 339nm, Emission 500nmでVK₁, VK₂(エーザイ)等の刺激剤添加後の蛍光強度を経時的に測定した。

4. 肝細胞内プロトロンビン、フィブリノーゲン等の染色観察

上記の肝細胞を接着培養したカバーガラスをPBS洗浄後アセトン固定し、第一抗体として抗ヒトプロトロンビンまたは抗ラットフィブリノーゲンのヤギ血清を塗布、第二抗体として抗ヤギIgGウサギFITC(ab')製品を用いて染色した。前処理条件としては100μM ビタミンK 1時間、あるいは250μM 5β-Pregnane-3α, 20β-diolを1時間次いで100μM ビタミンK 1時間、ならびに無処理コントロール等を行った。尚、プロトロンビンについては抗ラット血清がないので抗ヒト血清との交差反応を利用したものである。

成 績

1. VKによる細胞内Ca²⁺増加

図に示すように40μM以上の濃度においてはVK₁, VK₂共に添加後40秒前後に最高値を示す細胞内Ca²⁺レベル上昇が観察された。尚、最下段のグラフに認証済刺激剤としてのPDGFを参照目的に用いたものである。

2. 肝細胞内蛋白の分泌とPregnane-diol誘導体による阻害

コントロールとして前処理なしの細胞は当然ながら細胞質内にプロトロンビン蛋白が蛍光染色された。それに対しVK刺激後ではその蛍光染色程

度が急減した。それがPregnane-diol処理後にVK刺激した場合にはコントロールと略同様の蛍光強度が観察された。このことは培養細胞に対するVK作用が生理的か非生理的かは別として、プロトロンビン分泌促進効果があるのに対して、Pregnane-diolはそれを阻害した可能性があると言える。フィブリノーゲンについても同様な現象が観察された。アルブミンに関してはVK添加による染色強度の減少が明確ではなかったが、やはり同様の傾向が感じられた。

結 論 と 考 察

まず最初に細胞内Ca²⁺変動の計測を行うのに通常手段の細胞懸濁液を直接用いず、接着細胞を用いる方法を開発した理由は、定量性に未解決問題を残してはいるが、いずれヒト肝の微量生検試料への技術的適用を前提としたことと、分泌現象観察における細胞と同条件にしたことである。得られた結果は定性的ではあるがVKによる蛋白分泌の促進とPregnane-diol誘導体による分泌の抑制である。VKの実験濃度が生体中の肝細胞膜成分局所における濃度と比べて非生理的高濃度であるかどうか問題となるらるが、培養条件における細胞側の応答感度についても未知の問題である。いずれにしても分泌の促進機構が如何なるものであったにせよ、結果的に起こる分泌亢進をステロイドが抑制したとすれば、その方に重要な意義があると考ええる。ステロイドがフィブリノーゲン分泌をも抑制するなら、カルボキシル化反応の阻害を介する分泌抑制ではなく、比較的非特異的に分泌機能そのものに影響していると考えられる。尚、分泌制物質が母乳中にあるとすれば、その本体が何であるか、対象となる母乳試料による実験が必要である。

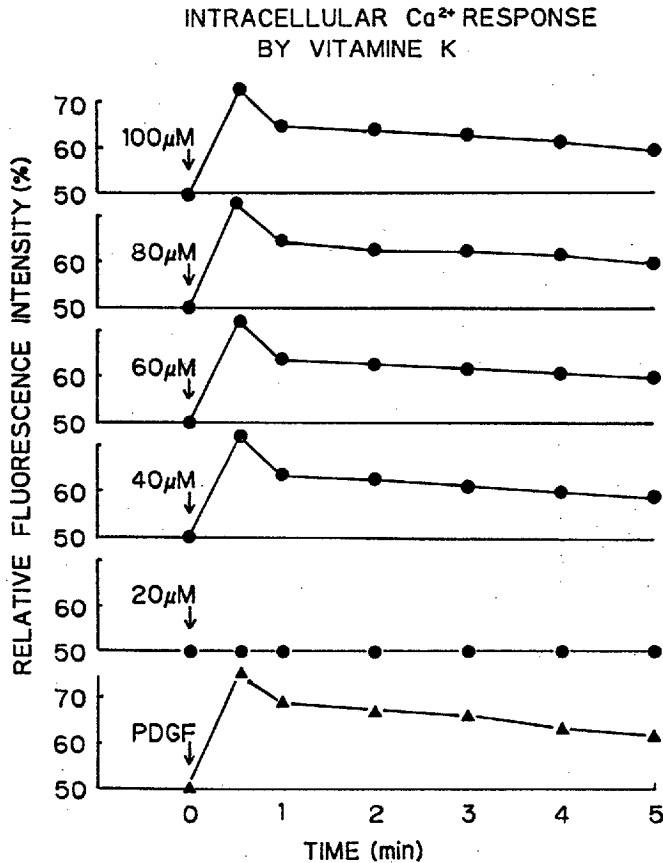
実験結果をふまえた観点からVK欠乏性出血の発症成因を考察すると、まず第一に特発性である続発性であれVK摂取乃至吸収量が絶対的に不足すれば当然それだけで充分条件となる。第二に肝臓に到達したVK量が論理的に発症寸前程度の不

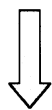
足状態に置かれた場合発症への引き金となる種々な危険因子が成立することになる。その一つは何らかの悪条件で肝臓全般の蛋白合成能が低下し、それが結果的にカルボキシル化反応産生量への影響を決定的にすること、もう一つは母乳中の分泌抑制物質の量が律則因子となることである。本実験結果は後者の確認と同定が重要課題であることを示唆するものとする。

文 献

1) Sutherland, J. M., et al : Haemorrhagic disease of the new born
Am. J. Dis. Child., 113 ; 524, 1967.
2) 堀 嘉之, 他 : 乳児ビタミンK 欠乏性出血症 - 第2回全国調査成績 (速報) 日本医事新報 No 3239, 26-29, 1986.

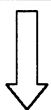
3) Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics : Vitamine K compounds and water soluble analogues : Use in the therapy and prophylaxis in pediatrics Pediatrics 28 : 501, 1961.
4) van Doorm J.M., Muller A.D., Hemker H.C. : Heparin-like inhibitor, not vitamine K deficiency, in the newborn [letter]. Lancet 2 : 852, 1977.
5) Malia G.R., Preston F.E., Mitchell V.E. : Evidence against vitamine K deficiency in normal neonates Thromb. Haemostasis 44 : 159, 1980.
6) 白幡 聡, 他 : 母乳ならびに調整粉乳中のビタミンK 含量 医学のあゆみ 118 : 857, 1981.





検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究の背景と目的

抗生物質投与,下痢,肝障害,母体への薬剤投与など原因の明らかな続発性ビタミン K(以下 VK)低下を除外して,新生児および乳児における特発性の VK 欠乏性出血傾向とされるものについて,その発症機構を考察するために種々事実関係を整理して見ると,まず第一に母乳栄養児の場合が殆どである。第二に原因がどうであれ VK 投与には予防および治療効果がある。第三に血中 PIVKA の高値またはプロトロンビン活性/抗原の比低下に対して例外が存在する。また第四に母乳中のビタミン K 含有量も統計的に低値ではあるがバラツキの巾は広く例外的存在が少なくない。以上四つの観点をふまえて考えた場合,血中プロトロンビン活性等の低下が肝細胞内のカルボキシレーション反応不全のみが原因であるとは断言できず,また母乳栄養による VK 不足だけがその発症原因であるとも言い難く思われる。勿論それらが主原因であるとしても,発症に至るには他条件を必要とする場合もあり得ることは否定できない。肝細胞が VK 依存性凝固因子を供給するためには PIVKA 生合成,次にカルボキシレーション,そして分泌の三段階の経過が必要である。従って血中プロトロンビン活性等が低下する原因を追求するとき, VK が決定的に不足していない場合はカルボキシレーション酵素系の未発達や分泌障害の有無が論理的に問題となる。但しこの酵素蛋白系の未成熟を証明する報告は今のところない。他方,分泌機能との関連性は未知ではあるが VK の生理作用として肝細胞などの膜蛋白に働き細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる作用がある。この事から VK が肝細胞の蛋白分泌に対して促進作用があるかどうか,また母乳成分に細胞の分泌機能を抑制するものがないかどうかを新たな問題としてとらえる必要性を考え,この点の検索目的として, Ca²⁺動態の観察,母乳成分で問題となる Pregnane-diolsteroid 存在非存在下における VK 刺激前後の培養肝細胞内プロトロンビンおよびフィブリノーゲン等の染色観察を行った。