

肝細胞の刺激応答性凝固因子分泌に対する阻害因子

(分担研究： 新生児・乳児のビタミンK欠乏性出血症の予防に関する研究)

浦山 功,* 伴野 雅 洋

要 約

肝細胞がVK依存性凝固因子を供給するのに因子蛋白の生合成とカルボキシル化の他に分泌もその過程の一つである。因子生合成またはカルボキシル化反応がある程度低下している状況のもとに、それに加えて分泌障害が重なればそれが発症の決定要因となり得ると考える。本研究の最終目標は母乳中にそのような阻害成分を見出すことにある。肝細胞は刺激応答性のプロトロンビン分泌反応を示すが、本報告は脂肪酸成分に着目し培養肝細胞の上記プロトロンビン分泌反応に対して不飽和脂肪酸製品に分泌阻害作用成分のあることを検証したものである。

見出し語： 肝細胞, 凝固因子, 分泌, 脂肪酸, オレイン酸, アラキドン酸

研究 方法

1. 肝細胞懸濁液の作製： モルモット肝の組織細片をCa²⁺-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をし、最後に10% FCS加MEM培養液に10⁶ CELLS/mlの懸濁液を作製した。
2. プロトロンビン測定用ELISA法の確立： 抗ヒトプロトロンビン-ヤギIgGのFab分画を作製しそれを96穴プレートの各穴にコーティングした。それに肝細胞培養液の検体を結合させ、次に予め準備した抗ヒトプロトロンビン第一抗体とALP標識抗ヤギIgG第二抗体との複合体を加え、最後にパラニトロフェニルリン酸基質を加えて吸光度を測定した。健康人混合血漿を標準とし、その示

す値を1.0と置いて相対値を求めた。

結 果

1. 脂肪酸の影響： VK₁無添加の場合肝細胞培養30分の培養液中プロトロンビン相対濃度は平均0.74 x 10⁻⁴であるが、図に示すように100 μmol/l VK₁刺激により9.85 x 10⁻⁴と約10倍に急増した。この刺激応答性分泌の実験系に対し10 μmol/lの各種脂肪酸による37℃、30分前処理を行ったところ、無前処理の分泌量を100としたとき、パルミチン酸で97、リノール酸で82、ステアリン酸で69、オレイン酸で21、アラキドン酸で23の分泌量を示した。即ち前三者には分泌阻害効果は認められなかったが、後二者には明らかな分泌阻害作用が見られた。尚濃度系列実験では1 μmol/lでも同様の阻害が認められた。またこの阻害系にアスピリン或いはデキサメサゾンを加えても脱阻害することはなかった。

* 東邦大学医学部生化学
(Dept. of Biochem. Toho Univ. School of Med.)

2. ステロイドによる影響： 上記VK刺激応答性分泌実験系に対してプロゲステロン，エストラジオール，プレグナンジオールの前処理添加を試みた。プレグナンジオールのみは高濃度で阻害がかかったが， $1 \mu\text{mol/l}$ 以下では三者とも有意阻害作用を示さなかった。

結論と考察

VKの代わりにエピネフリン，セロトニン，ヒスタミン，PDGFを用いて培養肝細胞の分泌刺激実験を試みたところPDGFに刺激効果がみられたが他には認められなかった。何れにしても $40 \mu\text{mol/l}$ 以上という高濃度のVKによる分泌刺激は生理的条件を反映するものではないが，肝細胞にVKとは限らず何らかの生理活性物質の刺激に应答する分泌機構が存在することは言えるのではないかと考える。尚VK濃度依存性細胞破壊の有無を見るために，Triton-X 100による膜破壊と平行実験を行ったところVKによるLDH等細胞質酵素の遊出は検出されなかった。

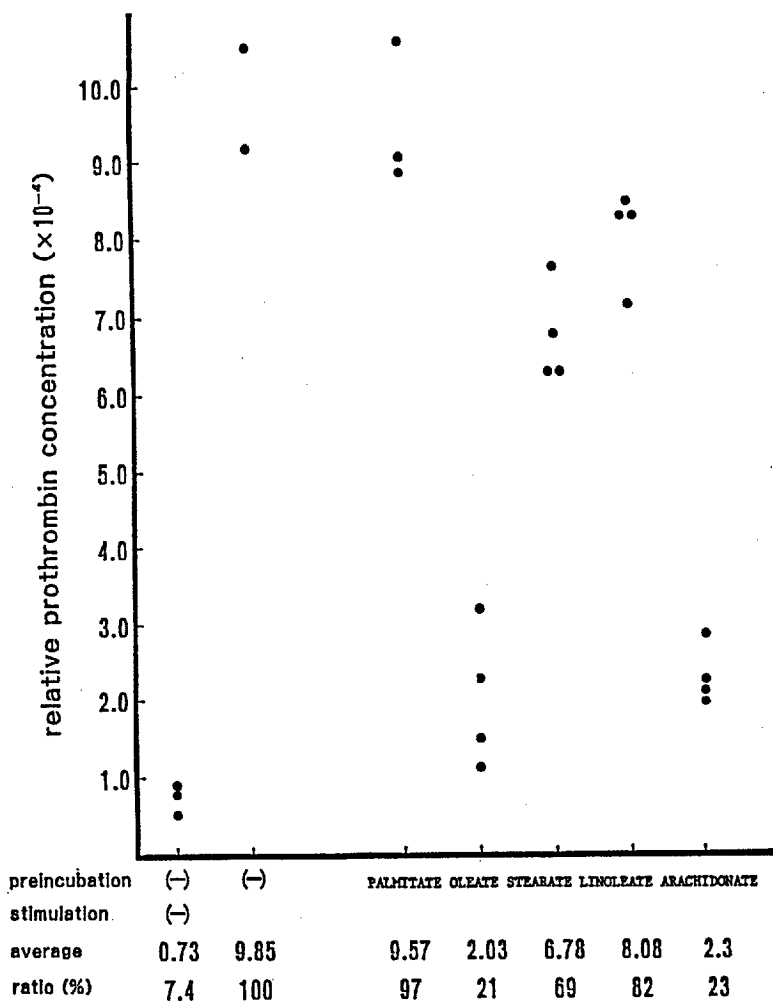
オレイン酸とアラキドン酸に強い分泌阻害がみられたが，リノール酸は阻害しないので，不飽和脂肪酸であることだけが原因ではなく，またデキサメサゾンやアスピリンが脱阻害しない以上はプロスタグランジン経路の機構とは直接関連はないことになる。唯言えることはオレイン酸およびアラキドン酸或いはその製品の中に未知の機構による分泌阻害作用を示すものが実在するということである。そのような物質の存在が出血素因の原因に荷担していたと仮定するとなぜ母乳にあるのか，そしてなぜ南北問題があるのか示唆を与えるものであると推察する。但し対象となる母乳の入手と直接その母乳試料による実証が残された課題であり，また分泌とその抑制機構の解明も興味ある問題となる。

総括して考察すると，新生児および乳児における特発性VK欠乏性出血傾向とされるものの発症

機構を考えるに当たり，前提条件として問題となる事実関係には第一に母乳成分に何らかの関連があるが必ずしもVK含有量が決定要因となる程の低値とは限らない例も無視できない¹⁾。第二に血中PIVKAの高値またはプロトロンビン活性/抗原の比低下を来さない場合も存在する^{2) 3)}。以上の事実をふまえると，母乳栄養によるVK不足のみが原因で肝細胞内のカルボキシル化反応不全に至ると言う筋書だけでは説明しきれないことになる。従ってVK投与に予防効果がある以上，ある程度のVK不足が基本的要因の一つではあるが，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。特発性であれ続発性であれ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発症の充分条件となるが，肝臓に到達したVK量が発症には至らないまでもその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速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意味するものと考えらる。

文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Malia G. R., Preston F. E., Mitchell V. E.: Evidence against vitamine K deficiency in normal neonates Thromb. Haemostasis 44: 159, 1980



培養モルモット肝細胞のV K刺激応答性プロトロンビン分泌に対する脂肪酸の影響



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



要約

肝細胞が VK 依存性凝固因子を供給するのに因子蛋白の生合成とカルボキシル化の他に分泌もその過程の一つである。因子生合成またはカルボキシル化反応がある程度低下している状況のもとに、それに加えて分泌障害が重なればそれが発症の決定要因となり得ると考える。本研究の最終目標は母乳中にそのような阻害成分を見出すことにある。肝細胞は刺激応答性のプロトロンビン分泌反応を示すが、本報告は脂肪酸成分に着目し培養肝細胞の上記プロトロンビン分泌反応に対して不飽和脂肪酸製品に分泌阻害作用成分のあることを検証したものである。