

急性肝不全時の窒素代謝に関する基礎的研究

— グアニジノ酢酸および

腎グリシンアミチノトランスフェラーゼ活性の変動 —

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室（主任：小坂二度見教授）

株 丹 浩 二

（平成元年1月24日）

Key words : 急性肝不全, グアニジノ酢酸, グリシンアミチノトランスフェラーゼ

緒 言

肝臓は尿素合成を含む窒素代謝にとって必須の臓器である。肝不全時、アミノ窒素処理能の低下により、高アンモニア血症や高アミノ酸血症を呈するが、その他の窒素化合物の動態は詳しくはわかっていない。グアニジノ化合物 (guanidino-compounds, 以下 GC) は腎不全時の毒性物質として注目されているが、このうちでグアニジノ酢酸 (guanidinoacetic acid, 以下 GAA) は急性肝不全時にその血中濃度が増加することが報告されている¹⁾。この血中 GAA 増加の機序を解明するため、ラットの急性肝不全モデルにおいて血液、肝、腎の GC 濃度を調べ、同時に GAA の産生酵素である腎のグリシンアミチノトランスフェラーゼ (Glycine amidinotransferase, 以下 GAT) の活性、および GAA の分解酵素である肝の GAA メチルトランスフェラーゼ (GAA-methyltransferase, 以下 GAA-MT) の活性を調べ、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

- (1) S-D 系雄性ラット (体重約 250 g) を用い、自由摂食、自由摂水にて飼育した。
- (2) D-ガラクトサミン 1 g/kg を腹腔内投与し、急性肝不全モデルを作成した²⁾。投与後 24 時間経過したものを A 群、投与後 48 時間経過したものを B 群とし、D-ガラクトサミン非投与のもの

を対照群 (C 群) とした。各群のラットはペントバルビタール 50 mg/kg を腹腔内投与して麻酔した後開腹し、大動脈より採血し、血清を得た。次に冷却したヘパリン生食にて灌流した後、肝および腎を摘出、直ちに氷冷下においた。肝実質および腎皮質は 9 倍量の蒸留水を加えてホモジネートした後、1000×G で 10 分間遠心分離し、この上清を 2 分間超音波処理し、試料とした。

GC の定量は次のようにして行なった。各試料に終濃度 10% のトリクロロ酢酸 (TCA) を加え除蛋白し、0.45 m μ のメンブレンフィルター (ミリポアコーポレーション製) で濾過した後、高速液体クロマトグラフィー (島津社製 LC-3A, ISC-05/SO504 カラムを装着) を適用した。分離は pH を変化させたクエン酸緩衝液を用いたステップグラジエント溶出法で行なった。溶出液は 55°C でニンヒドリン反応を用いて定量した³⁾。測定項目は、クレアチン (CR)、グアニジノ酢酸、アルギニン (ARG) である。

腎の GAT 活性の測定は、腎皮質試料を 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) にて 10 倍に希釈したのち、Van Pilsom の方法⁴⁾にて行なった。

肝の GAA-MT 活性の測定は次のようにして行なった。肝実質試料を 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) にて 5 あるいは 10 倍希釈した後、Im らの方法⁵⁾に準じて試料 0.2 ml に、2 mM GAA, 2 mM adenosylmethionine, 2 mM dithiothreitol を含む 50 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) 0.8 ml を混合し、ただちに終濃度 10% の TCA にて除蛋

白したもの、および60分間反応させTCAにて反応を止めたものについて、高速液体クロマトグラフィでCRを定量し、生成されたCR量によって、肝のGAA-MTの活性を計算した。

蛋白定量は腎および肝の試料についてビュレット法により行なった。

オルニチンカルバミールトランスフェラーゼ(Ornithinecarbamyltransferase, 以下OCT)活性の測定はOCT測定用キット(和光純薬社製)を用いて行ない、肝障害の指標とした。

血中尿素窒素(BUN)および血中クレアチニン値はそれぞれ和光純薬社製測定キットを用いて測定し腎障害の指標とした。

各測定値は平均および標準偏差で表示した。有意差の検定は、3群間の比較にはKruskal-Wallisの検定を、各2群間の比較にはMann-WhitneyのU検定を用い、 $P < 0.1$ を有意差ありとした。

結 果

- 1) 腎GAT活性を同一の試料の希釈倍数を変えて測定したところ、図1のごとく吸光度0.1から0.5の範囲で直線性を示したので、この範囲で測定が行なわれるよう希釈を調節した。また、肝GAA-MT活性も同様に測定したところ、図2のようにCR濃度0.5から3.0nmol/mlの範囲で直線性を示したので、この範囲で測定結果が得られるよう希釈倍数を調節した。
- 2) 血清OCT活性は、C群に比べA群が、A

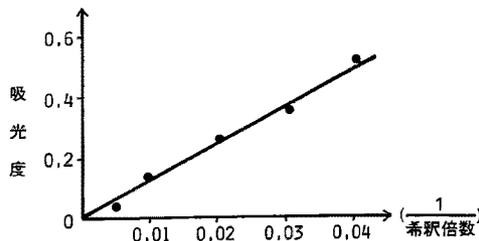


図1 腎GAT活性の希釈による変化
希釈倍数を変えると、GAT活性は吸光度0.1から0.5の範囲で試料の量に比例して直線的に増加した。

群に比べB群が有意に高値であった。BUN、血清クレアチニン値は、有意差はみられなかったが、C群にくらべてA群でBUNが低下し、C群、A群に比べB群で血清クレアチニン値が上昇する傾向がみられた(表1)。

3) 腎GAT活性はC群に比べ、A群、B群で上昇していた。B群はA群に比べ低い傾向がみられたが、有意差はなかった。また肝GAA-MT活性は、C群、A群に比べB群で減少していたが、C群とA群には有意差はみられなかった(表1)。

4) 血清CR、血清GAAはB群では、C群、A群に比べ上昇していたが、C群とA群には有意差はなかった。血清ARGはA群ではC群に比べ低下し、B群ではA群に比べ増加したが、B群はC群に比べると低下していた(表2)。

5) 腎CR、腎GAAはC群に比べA群で低下し、B群ではA群に比べ上昇した。B群はC群に比べ、GAAは高い傾向がみられたが有意差はなかった。肝CRはC群に比べA群では増加し、A群に比べB群では減少したが、C群とB群には有意差はみられなかった。肝ARGはB群でC群、A群に比べ減少していたが、C群とA群には有意差はみられなかった。

考 察

尿素サイクルは尿素を合成する窒素処理の系で、肝に局在する。これは尿素サイクルの各酵素が全てそろっているのは肝のみであるためで、

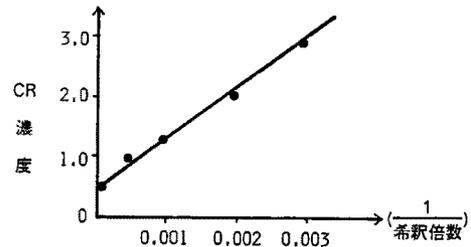


図2 肝GAA-MT活性の希釈による変化
希釈倍数を変えると、GAA-MT活性はCR濃度0.5から3.0の範囲で試料の量に比例して直線的に増加した。

それぞれの酵素は他の臓器にも存在する。例えば小腸粘膜の細胞にはOCTなどの尿素サイクルの酵素が存在し、循環血中のグルタミンよりシトルリン (Citrulline, 以下 CIT) を合成することができる⁶⁾。グルタミンは血中濃度も高く、遊離NH₃と速やかな行き来をもつことより、NH₃の貯蔵型、輸送型と考えられる⁷⁾。しかもグルタミンのα-アミノ基の窒素の多くは腸粘膜にお

いてピルビン酸に渡されアラニンとなり、このアラニンが肝に運ばれ尿素が合成される。しかしグルタミンのα-アミノ基の一部は腸粘膜においてCITに合成されると考えられる⁸⁾。しかも腸粘膜はCITを分解する尿素サイクルの酵素系を持たないので、合成されたCITは血中に放出される。このCITは肝で分解されることなしに肝循環を通過し、また生理的状态では肝で合成

表1 各群の血清OCT活性、腎GAT活性、肝GAA-MT活性、BUNおよび血清クレアチニン値

	C群 (n=12)	A群 (N=6)	B群 (N=12)
血清OCT活性 (μ M Cit/min/L)	2.85 \pm 3.15	1350 \pm 1290	2080 \pm 780
腎GAT活性 (nmol Orn/min/mg 蛋白)	0.750 \pm 0.179	1.066 \pm 0.375	0.948 \pm 0.249
肝GAA-MT活性 (nmol CR/hr/mg蛋白)	4.00 \pm 1.45	4.83 \pm 2.35	1.04 \pm 0.52
BUN (mg/dl)	18.7 \pm 3.5	17.0 \pm 2.7	18.1 \pm 5.3
血清クレアチニン (mg/dl)	0.628 \pm 0.090	0.598 \pm 0.143	0.750 \pm 0.146

* P < 0.1, *** P < 0.01

表2 血清、腎および肝のGC濃度

	C群	A群	B群
血清CR	244 \pm 59	233 \pm 87	565 \pm 68
血清GAA	4.53 \pm 1.29	3.98 \pm 0.84	26.6 \pm 16.7
血清ARG	165 \pm 34	2.93 \pm 1.15	9.63 \pm 7.62
腎CR	8.01 \pm 2.47	5.62 \pm 0.95	7.33 \pm 1.75
腎GAA	2.53 \pm 1.52	1.15 \pm 0.19	3.00 \pm 1.68
腎ARG	11.6 \pm 4.9	9.8 \pm 2.7	9.3 \pm 4.1
肝CR	1.15 \pm 0.30	1.75 \pm 0.81	1.23 \pm 0.46
肝GAA	0.0423 \pm 0.0243	0.0377 \pm 0.0096	0.0619 \pm 0.0346
肝ARG	0.203 \pm 0.089	0.208 \pm 0.032	0.114 \pm 0.047

単位: nmol/ml (血清) nmol/mg蛋白 (腎・肝)

* P < 0.1 ** P < 0.05 *** P < 0.01

された CIT は血中に放出されないで、腸粘膜は血中 CIT の供給臓器となっている⁹⁾。さらに腎ではアルギニノコハク酸合成酵素、アルギニノコハク酸分解酵素の活性が高く、血中の CIT を取り込んで ARG を合成できる。しかし、腎のアルギナーゼ活性は高くないので、尿素合成は少なく、合成された ARG は腎に蓄積され、あるいは血中に放出される。一方肝ではアルギナーゼの活性が高く、合成された ARG、あるいは腸管より吸収された ARG は直ちに尿素に分解される。このため腎は血中 ARG の主要な産生臓器になっていると考えられている⁹⁾。また、腎では ARG から GAA を合成する GAT の活性が高く、腎は GAA の主要な産生臓器となっている。GAA は肝に運ばれ、肝の GAA-MT により CR となり、血中へ放出されるとともに、GAA の一部は尿中に排泄される。ラットの実験では経口的に CR を投与すると腎 GAT 活性は抑制され、1 日で約 70% に低下するといわれている¹⁰⁾。ヒトの実験では、CIT を経口投与すると血中 GAA は増加し、尿中 GAA 排泄量は増加する。また、CR を投与すると、血中 GAA は減少し、尿中 GAA 排泄量は増加する、との報告がある¹¹⁾。以上より、図 3 のような腸管、腎にわたって肝をバイパスする不完全な尿素サイクルが存在し、その最終産物は ARG、GAA と考えられる。また生理的状態

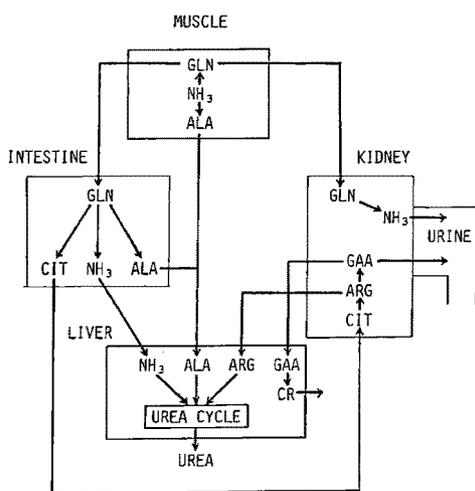


図 3 肝、腎、腸の代謝相関

でのこれらの系の目的は他臓器への ARG の供給と、肝での CR 合成の基質としての GAA の供給にあると考えられる。GAA についてはネガティブフィードバックが存在し、その調節点は腎 GAT 活性の調節と GAA の尿中排泄であるといえるが、短期の調節には尿中排泄が、長期の調節には GAT 活性が関与しているようである。

上記の系より、今回の結果を考えると、血清 OCT 活性より、A 群、B 群と肝障害が進行するに従って、最初に現われる変化は血清 ARG の著明な低下である。この時点で腎 GAT 活性はすでに上昇しているの、腎で合成された ARG の血中への放出が減少し、これが GAA の合成に向けられていると考えられる。しかし GAA の合成が増加していると考えられるのに、血清 GAA は増加せず、腎 GAA は逆に低下していることより、合成された GAA は積極的に尿中に排泄されていると考えられる。臨床例における検討でも、劇症肝炎のときには GAA の尿中排泄が増加することが報告されている¹²⁾。つまり、肝障害の早期では、腎で CIT より合成された ARG は血中に放出されず GAA の合成にまわり、この合成の増加した GAA も血中に放出されるよりも積極的に尿中に排泄され、窒素排泄に貢献するのではないかと考えられる。

さらに肝障害が進行すると肝 GAA-MT 活性が低下するため、血清 GAA が上昇してくると考えられる。腎 GAT 活性は A 群に比べ B 群では、有意ではないが低下傾向を示しているが、なお B 群では C 群よりも高い活性を示している。このような活性の低下が起こるとすれば、その機序として考えられるものは、肝腎症候群といわれるような肝障害時に高率に合併する腎障害の進行、あるいは前記の系でも示されている血清 CR 上昇による腎 GAT 活性の抑制などが考えられる。前者については、有意ではないが A 群より B 群において血清クレアチニン値が上昇傾向を示していることより考えられる。

次に後者の機序も十分考えられる。すなわち、ここで注目されるのは血清 CR の上昇である。B 群で肝 GAA-MT 活性が著明に低下するにもかかわらず、A 群より B 群の血清 CR が上昇している。この原因については現在のところ全く不

明であるが、次のような機序が考えられる。第一は、前述のごとく腎障害の合併である。CRは腎糸球体で濾過された後尿細管で再吸収され、正常では殆ど尿中に排泄されないが、筋の崩壊などでCRの腎への負荷量が増加すると、尿中排泄が増加して、血清CRは上昇し難いといわれている¹³⁾。このため腎障害で糸球体濾過による尿中排泄が減少して血清CRが上昇する可能性がある。これは今回の検討でも、B群では血清CR値と血清クレアチニン値には高い相関関係 ($r = 0.96$, $P < 0.01$) がみられている。第二には、骨格筋での代謝障害である。劇症肝炎などでは骨格筋量の低下が起こるといわれており¹⁴⁾、このためCRの代謝が障害されて血清CRが上昇する可能性がある。第三には、肝以外でのCRの合成であるが、これについては現在のところ不明である。

結 論

1. 急性肝不全時の窒素代謝動態を調べるため

に、GAAおよび腎GAT活性と肝GAA—MT活性の変動を、ラット急性肝不全モデルを用いて、24時間後群 (A群)、48時間後群 (B群)、コントロール群 (C群) で比較した。

2. その結果、血清ARGはA群、B群で著明に減少し、血清GAA、血清CRはB群で増加した。また、腎GAT活性はA群、B群で上昇し、肝GAA—MT活性はB群で低下した。

3. 以上より、急性肝不全時には、腎GAT活性は上昇し、何らかの機序で腎で合成されたARGが血中に放出されずGAAの合成にまわり、合成の増加したGAAは尿中に排泄される。この時、肝GAA—MT活性の低下が生じると血清GAAが上昇すると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室、小坂二度見教授、ならびに御助言をいただいた岡山大学医学部生化学教室、矢尾謙三郎講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 西谷恭子, 落合陽治, 雁木千恵子, 松田力哉, 香曾我部義則, 坂野義太郎, 小坂二度見: 急性腎不全を伴う劇症肝炎におけるグアニジノ化合物の動態。腎と透析 (1984) 16, 557—561.
- 2) Grün M, Liehr H and Rasenack U: Significance of Endotoxaemia in Experimental "Galactosamine-Hepatitis" in the Rat. Acta Hepato-Gastroenterol (1976) 23, 64—81.
- 3) 木下俊夫, 平賀やよい, 石田恭夫: ニンヒドリンを用いるグアニジノ化合物のHPLC。第3回グアニジノ化合物分析研究会講演要旨集 (1975), 46—52.
- 4) Van Pilsum JF, Taylor D, Zakis B and McCormick P: Simplified Assay for Transamidinase Activities of Rat Kidney Homogenates. Anal Biochem (1970) 35, 277—286.
- 5) Im YS, Cantoni GL and Chang PK: A Radioactive Assay for Guanidinoacetate Methyltransferase. Anal Biochem (1979) 95, 87—88.
- 6) Windmueller HG and Spaeth AE: Source and fate of circulating citrulline. Am J Physiol (1981) 241, 473—480.
- 7) 石田久枝, 橘 正道: 窒素代謝とその調節。代謝マップ—経路と調節: 日本生化学編, 東京化学同人, 東京 (1980) pp. 33—34.
- 8) Felig P: Amino acid metabolism in man. Annu Rev Biochem (1975) 44, 933—955.
- 9) Featherston WR, Rogers QR and Freedland RA: Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. Am J Physiol (1973) 224, 127—129.
- 10) Walker JB: Repression of arginineglycine transamidinase activity by dietary creatine. Biochim et Biophys Acta (1956) 36, 574—575.
- 11) 葛野公明, 入江章子, 久城英人, 児玉順三, 佐谷 誠, 林 長蔵, 宮井 潔: グアニジノ酢酸分析による腎

機能の解析. 医のあゆみ (1980) **121**, 419—421.

- 12) 株丹浩二, 落合陽治, 香曾我部義則, 辻 千晶, 杉本清治, 小坂二度見: 急性肝不全時の窒素代謝と腎の役割. ICU と CCU (1989) **13**, No. 2掲載予定.
- 13) 佐野元規, 古川哲雄: クレアチン. 日臨 (秋期増刊号) (1945) **43**, 258—260.
- 14) 渡辺明治: 肝不全とアミノ酸. 臨床内科 (1987) **2**, 895—903.

**An experimental study of nitrogen metabolism
in acute hepatic failure
(Changes in guanidinoacetic acid level
and kidney glycine amidinotransferase activity)**

Koji KABUTAN

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. F. Kosaka)

It was reported that serum guanidinoacetic acid (GAA) levels are elevated in acute hepatic failure. To explore the mechanism of this GAA level change, the activities of kidney glycine amidinotransferase (GAT) and liver GAA-methyltransferase (GAA-MT) were measured in experimental rat models of acute hepatic failure. GAA is synthesized by the former enzyme and catabolized by the latter enzyme. In the early stage, kidney GAT activity was increased ($P < 0.1$) but the serum GAA level remained normal. In the late stage, liver GAA-MT activity was decreased ($P < 0.01$) and serum GAA level was increased. From this result, it is concluded that GAA synthesis is increased in acute hepatic failure and that serum GAA level is increased when liver is severely damaged.