

氏名(本籍)	大 ^{おお} 場 ^ば 正 ^{しょう} 二 ^じ	(茨城県)
学位の種類	医学博士	
学位記番号	博乙第230号	
学位授与年月日	昭和60年2月28日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当	
審査研究科	医学研究科	
学位論文題目	ラット肝におけるグアニジノコハク酸の合成について —尿素, オルニチンおよびD, L—ノルバリンの効果—	
主査	筑波大学教授	医学博士 小磯謙吉
副査	筑波大学教授	医学博士 岩崎洋治
副査	筑波大学教授	医学博士 杉田良樹
副査	筑波大学教授	医学博士 滝田齊
副査	筑波大学教授	医学博士 眞崎知生

論文の要旨

(1) 目的

Guanidinosuccinic acid (GSA) は腎不全でその合成が著しく増加し、血小板凝集抑制を初めとする種々の生体障害作用を有するため、uremic toxin の一つと考えられている。この GSA 合成機構に関しては Cohen や Natelson らの説があるが、未だ十分解明されていない。最近、この機構解明の手がかりとして、in vitro の単離肝細胞系において尿素から GSA 合成が促進されることが明らかにされた(青柳ら)。そこで in vivo においても尿素が短時間内に肝臓における GSA 合成を促進するか否か、また尿素合成の促進物質や阻害剤が GSA 合成や肝内アミノ酸にどのように影響するかを検討し、GSA 合成と尿素合成との関連を明らかにすることを目的とした。

(2) 研究方法

体重300—350 g の雄の正常 Wistar 系 rat を用いた。あらかじめ12時間絶食した後、D, L-norvaline (0.75 m mol/ml), ornithine (2 m mol/ml) および尿素 (100 mg N/ml) を単独またはそれぞれを組み合わせ、各々 1 ml/100 g 体重の割合で腹腔内に投与した。薬剤投与後3時間して肝臓をフリーズグラブ法にて摘出し、10% (W/V) trichloroacetic acid で GSA およびアミノ酸を抽出した。GSA の測定は陽イオン交換樹脂で分離後、guanidine 化合物と選択的に反応する9,10—phenanthroquinone を後反応に用いる HPLC 法にて行った。アミノ酸の測定はアミノ酸分析計(日本電子 JLC-6AH)によった。

(3) 結果および考察

1) 尿素投与による肝内 GSA 濃度の上昇

尿素投与群の肝内 GSA 濃度は 47.9 ± 12.1 n mol/g wet liver で、絶食群の 6.8 ± 2.7 n mol/g wet liver に対して約 7 倍と高値を示した ($P < 0.01$)、この結果は尿素自体が短時間内に肝内 GSA 合成を促進することを示唆している。

2) ornithine による肝内 GSA 濃度の上昇の阻害

ornithine は尿素合成経路の中間体であると同時に尿素合成を促進させることが報告されているが、尿素+ornithine 投与群の肝内 GSA 濃度は 23.4 ± 4.4 n mol/g wet liver と尿素投与群の約 50% と抑制された ($P < 0.01$)、このように尿素合成が促進する条件下では肝内 GSA 合成は逆に阻害されることが示唆された。

3) norvaline 投与時の肝内 GSA 合成の抑制

norvaline は尿素合成経路の 3 種類の酵素である ornithine transcarbamylase, argininosuccinate synthetase および arginase の阻害剤であり、norvaline の投与により尿素合成は抑制されることが報告されている。norvaline 投与群の肝内 GSA 濃度は 4.6 ± 0.6 n mol/g wet liver と絶食群の 68% に低下した ($P < 0.01$)、また尿素+norvaline 投与群の肝内 GSA 濃度は 13.1 ± 0.7 n mol/g wet liver と尿素投与群の約 27% に抑制された ($P < 0.01$)、このように尿素合成経路の酵素を阻害する norvaline も尿素による肝内 GSA 濃度上昇を抑制した。つまり尿素合成を促進させる ornithine でも、尿素合成経路の酵素の阻害剤によっても、尿素による肝内 GSA 濃度の上昇は阻害された。このことは一見相反することのようであるが、Natelson らの仮説のように canaline と carbamyl phosphate から尿素合成経路の酵素群を利用して GSA が合成されるとすれば、尿素合成と GSA 合成が競合することは説明しうる。

4) 肝内アミノ酸の変動

GSA の基質と考えられている arginine は絶食群と尿素投与群では検出されなかったが、尿素+norvaline 投与群と尿素+ornithine 投与群では各々 0.013 ± 0.001 , 0.04 ± 0.01 μ mol/g wet liver (mean \pm S.D.) と上昇した。また GSA の一方の基質と想定されている aspartic acid は尿素投与群および尿素+norvaline 投与群では絶食群に比して各々 67%, 28% と低下した。尿素+norvaline 投与群では ornithine, citrulline および arginine の上昇がみられ、尿素+ornithine 投与群では citrulline と arginine の上昇がみられた。ornithine による尿素的 GSA 合成の抑制は ammonia の存在下で in vitro でも認められ、この投与により citrulline と arginine は著しく増加し、これらが argininosuccinate synthetase を阻害することが GSA 合成の阻害の一因と考えられる。また、従来一日尿中への GSA 排泄量は摂取タンパク質の増加に伴い増加することから、尿素合成速度が早まると GSA 合成が増加すると考えられてきたが、むしろ肝内尿素濃度の上昇が GSA 合成を増加させていると考えられる。

(4) 結論

1) 高濃度の尿素的腹腔内投与により、rat 肝内 GSA 濃度は著しく上昇し、その上昇は

ornithine および norvaline により阻害された。

2) 尿素と ornithine または norvaline の投与により肝内 arginine の増加がみられたが、GSA 濃度は逆に抑制され、arginine からの GSA 合成説には否定的な結果であった。

審 査 の 要 旨

uremic soxin の一つと考えられる GSA の生体内代謝機構に関しては未だ十分解明されていない。この点を明らかにすべく in vivo で実験を行った結果、肝内 GSA 濃度は尿素により上昇、ornithine, norvaline で阻害されることが明らかになった。これより尿素自体が GSA 合成を促進するが、GSA 合成と尿素合成過程は競合的で、GSA が合成される経路の一部は尿素合成経路の酵素により触媒されることが推定された。肝内アミノ酸分析より arginine から GSA が合成されるとする説は否定的であった。

以上本研究は GSA 合成に関する新しい知見を開陳しており、本成果は uremic toxin 除去の臨床応用への足がかりを与えるものであり、高い学問的評価が与えられる。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものとみとめる。