

氏名(本籍)	ながせ 永瀬	そうじ 宗重	(茨城県)
学位の種類	医学博士		
学位記番号	博乙第268号		
学位授与年月日	昭和60年7月31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	ラット単離肝細胞におけるmethylguanidineの生合成について		
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	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
副査	筑波大学助教授	医学博士	加納勝利

論文の要旨

(1) 目的

uremic toxinの中でも、強い毒性で知られているmethylguanidine (MG)の産生経路および産生臓器は不明の点が多い。産生経路に関しては、creatinine, arginineあるいはguanidinoacetic acidより由来するとの説があった。産生臓器に関しては、肝、筋、腸内細菌などが想定されていた。そこで、MG産生臓器の1つとして、肝が該当するか否か、および肝におけるMG産生の前駆体を明らかにするために、この研究をおこなった。

(2) 方法

体重200-300g, 雄のWistar系ラットをペントバルビタール麻酔下に開腹し, Berryらの方法の変法に準じてcollagenaseを用いて肝細胞を分離した。肝細胞は栓をしたフラスコ中で、95%O₂+5%CO₂で平衡化したKrebs-Henseleit bicarbonate buffer(+3%bovine serum albumin+10mM lactate)に浮遊させ、60cycle/minで振盪しながら37°Cでincubateした。MGの前駆体と想定される物質として、終濃度8.8mM creatinine, 8.8mM arginine,+8.8mM arginine + monomethylamineおよび1.25mM guanidinoacetic acidをそれぞれmediumに添加した。反応の停止とMGの抽出はtrichloroacetic acid(終濃度5%)を加えてsonicationしておこなった。MGの測定は、高速液体クロマトグラフィーで分離後、9, 10-phenanthrenequinoneと反応させ、螢

光を測定する方法によった。MGの分離は東洋曹達IEX210sc (12 μ)を4.6 ϕ ×125 mmのカラムに充填したものを用いた。溶出は、0.2N-クエン酸ナトリウムbuffer (pH3.3)で20分、1 N Na-OHで10分、1.0 ml/minの流速でおこなった。

(3) 結 果

incubation mediumにMGの前駆体と想定される種々の物質を添加した際、creatinineを加えた場合にのみ、MG産生がみられた。さらに、8.8mM creatinineをmediumに添加し、経時的にMG産生量を調べると、2時間までは1.6n mol/g·liver/hであり、2時間以降4時間までは、5.7n mol/g·liver/hであった。また単離肝細胞を添加しない場合にも微量のMGが検出され、経時的に増加した。一方、mediumに添加するcreatinineの量を変えた場合、検討した最高濃度のcreatinine 200 mg/dlまでは、ほぼcreatinineの濃度に依存してMG産生は増加した。

(4) 考 察

MGの産生臓器に関して既に報告されているものでは、肝、筋、腸内細菌などである。これらの報告は、いずれも腎不全動物や正常の動物に長期にわたってcreatinineや蛋白含量の異なる食餌を与えて、組織内MG濃度の変化をみたものである。MGは血清中よりも組織中に高濃度に蓄積することが知られており、in vivoの実験で臓器内MG濃度の変化を根拠に、MGの産生臓器を決定することは不可能と考えられる。そこで、この研究は単離した細胞でMGをはじめて生合成したものであり、この結果は、生体でも肝におけるMG産生が存在することを強く示唆するものである。

一方、MGの前駆体に関しては、今までに種々の報告がある。化学的にはcreatinineの開裂によってMGが生じると推定されていたが、in vivoの実験では、creatinineやarginineを実験動物やヒトに投与し、尿中MG排泄の増加や組織内MG濃度の上昇がみられることから、これらが前駆体であろうと推定されていた。この研究によって単離肝細胞におけるMG産生は、creatinineの添加によって出現し、arginine, arginine+monomethylamineあるいは、guanidinoacetic acidの添加によっては出現しないことが明らかとなり、すくなくとも肝におけるMG産生は、creatinineが前駆体となっていることが示唆された。

しかし、この研究から得られた肝の単位重量あたりのMG産生率から、肝でのMG産生量を推定すると、腎不全ラットの尿中MG排泄量を説明しきれない。このことは、肝以外にもMG産生臓器が存在する可能性を示唆しているものと考えられる。

(5) 結 論

MGの産生臓器および前駆体を明らかにするために、ラットの単離肝細胞に、creatinine, arginine, arginine+monomethylamineおよびguanidinoacetic acidを添加し、MG産生をみた。その結果、MG産生がみられたのは、mediumにcreatinineを添加した場合のみであった。これはラット肝においてMGが産生されること、およびその前駆体がcreatinineであることを強く示唆するものである。

審 査 の 要 旨

MGは従来より慢性腎不全におけるurmic toxinの一つと考えられていたが、どの臓器で、どのような物質から作られるか不明の点が少くなかった。本研究はMGの産生臓器の一つと考えられている肝臓に焦点をあて、その単離細胞を用いてこの問題につき検討をおこなった研究である。

その結果、MGの産生は明らかに肝臓で行なわれ、その前駆物質としてクレアチニンが該当することが示された。かつ、MGの産生は添加するクレアチニンの濃度および反応時間に比例することも明らかになった。他方、一部の研究者が唱えているように、arginineやarginine+monomethylamineがuremic toxinとしてのMGの前駆体であると考えられなかった。なお、肝臓におけるMGの産生量より、肝臓以外の臓器における産生も十分可能性があると考えられる成績がえられた。

以上、本研究はuremic toxinの一つであるMGが肝臓で産生され、その前駆物質としてクレアチニンが該当することを明らかにした点で独創性のある極めて優れた研究である。従来まで推定の域を出なかったこの分野で、MGの生体内動態の一端を明らかにし、この領域に初めて解明の手がかりを与えた研究で、極めて高い評価が与えられる。

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認める。