

閉塞性黄疸における肝蛋白合成に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8969

閉塞性黄疸における肝蛋白合成に関する実験的研究

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

磯 部 芳 彰

(昭和57年1月21日受付)

閉塞性黄疸のアルブミンおよび肝蛋白合成におよぼす影響を、ラットを用い実験的に検討した。体重約200gのウィスター系雄ラットの総胆管を結紮したものを閉塞性黄疸群、単開腹術を行ったものを対照群とした。術後1週目に、両群のラット腹腔内に ^3H -ロイシン(100 μCi)を投与し、10分から120分間に経時的にラットを屠殺し、肝を採取した。ホモジナイズした肝の蛋白およびPCA可溶性分画および不溶性分画の ^3H -ロイシンの測定を行った。次に細胞分画を行い、核、ミトコンドリア、マイクロゾーム、上清分画を得、各分画について蛋白および ^3H -ロイシンの放射活性を測定した。 ^3H -ロイシンの放射活性はマイクロゾーム分画に最も多くみられた。肝ホモジネート蛋白中の ^3H -ロイシン放射活性は30分でピークに達するが、ピーク時の放射活性は閉塞性黄疸群では対照群に比し有意に低値を示した。同様の傾向はマイクロゾームおよびミトコンドリア分画で著明に認められた。しかし、核、上清分画では30分でのピークは認められず、また、 ^3H -ロイシンの取り込みにも両群に差は認められなかった。これにより、閉塞性黄疸群においてはマイクロゾームでの分泌蛋白合成が障害されていることが示唆された。マイクロゾームのいかなる蛋白中に ^3H -ロイシンが取り込まれているかを分析するために、マイクロゾームDOC可溶性分画をUltragel AcA 54でゲルカラムクロマトグラフィーを行い、4つの放射活性のピークが得られた。第1のピークはマイクロゾームの膜蛋白と考えられ、第2のピークはSDS電気泳動で確認されたが、マイクロゾームアルブミンに取り込まれた ^3H 放射活性であった。第3のピークは分子量18,000、等電点5.5の蛋白(18K protein)の ^3H 放射活性であった。第4のピークは遊離の ^3H -ロイシンによるものであった。マイクロゾームアルブミンに取り込まれた ^3H -ロイシンは、閉塞性黄疸群では対照群に比し低値を示し、18K proteinの ^3H 放射活性は閉塞性黄疸群では認められなかった。また、血清アルブミンへの ^3H -ロイシンの取り込みは、閉塞性黄疸群では対照群に比べ低下していた。以上の結果により、閉塞性黄疸肝では、肝構成蛋白の合成能は比較的保持されているが、アルブミンの合成能は障害されていると結論された。

Key words Protein synthesis, Obstructive jaundice, Rat liver, Albumin synthesis.

従来、閉塞性黄疸における肝障害の重症度は、トランスアミナーゼ値などの経時的な測定を指標として判定されてきたが¹⁾、閉塞性黄疸時にはこれら一般的な肝細胞機能検査では正常もしくは軽度異常にとどまるものが多い、しかし、手術侵襲により容易に肝不全に陥る症例も稀ではなく、単なる肝機能検査では手術を前提とした閉塞性黄疸時の肝予備能の把握には不充分である²⁾。そこで近年、閉塞性黄疸における肝の機能的予備力の判定には、多くの新しい工夫がなされているが³⁾⁻⁷⁾、肝の持つ最も重要な機能のひとつであるアルブ

ミン合成についての知見は、いまなお充分とはいえない。血清アルブミンは肝で合成され⁸⁾⁻¹²⁾、しかも血清蛋白のうちで量的にも機能的にも重要な蛋白質で、閉塞性黄疸においてその合成能を知ることは、閉塞性黄疸肝の機能的予備力の判定にきわめて有用と考えられるが、閉塞性黄疸肝におけるアルブミン合成能は、種々の要因によって影響を受けるため¹³⁾⁻³¹⁾、その動態に關しては一定の見解が得られていない。そこで著者は、これら諸種の要因をできるだけ除外し、食餌摂取量、血中遊離アミノ酸濃度などが対照とほぼ同一な実験系

Influence of Obstructive Jaundice on Protein Synthesis in Rat Liver. Yoshiaki Isobe, Department of Surgery (II), (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University.

を作製し、閉塞性黄疸肝のアルブミン合成能を細胞レベルで検討し、二、三の興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 実験動物と実験群の作製

実験動物にはオリエンタル固形飼料および水道水を自律摂取飼育した体重 200 g 前後のウィスター系雄ラットを用いた。閉塞性黄疸は、ラットをエーテル麻酔下で開腹し、総胆管を 6-0 プレードシルクで結紮後切離し、両断端を約 0.5 cm 離して作製した。対照としては同時に単開腹したものを用いた。

2. 測定項目

- 1) 食事摂取量
- 2) 体重増加率
- 3) 血清総ビリルビン値
- 4) 血清アルブミン値
- 5) 血清および肝内遊離アミノ酸
- 6) 肝ホモジネートの ^3H -ロイシンの取り込み。
- 7) 肝各細胞成分における RNA 含量および NADPH チトクローム C 還元酵素活性。
- 8) 肝各細胞成分への ^3H -ロイシンの取り込み
- 9) マイクロゾーム DOC 可溶性分画のグルクロマトグラフィー溶出液中の ^3H 放射活性
- 10) マイクロゾーム DOC 可溶性分画の SDS 電気泳動ゲルの ^3H 放射活性
- 11) 血清アルブミン中の ^3H -ロイシン取り込み

3. 試薬

- 1) 標識アミノ酸：L-(4,5- ^3H)ロイシン (40-60 Ci/mmol, The Radiochemical centre: Amersham, 以下 ^3H -ロイシン)
- 2) 細胞分画に用いられた溶媒
 - i) Medium A: 0.25 M 蔗糖, 1 mM EDTA, 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5).
 - ii) Medium B: 0.35 M 蔗糖, 35 mM KHCO_3 , 25 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 20 mM K_2HPO_4 (pH 7.4).
 - iii) Medium C: 0.1 M MgCl_2 .
 - iv) Medium D: 3% デオキシコール酸ナトリウム (Difco Laboratories 製).
- 3) グルクロマトグラフィーの緩衝液: 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0).

4. ^3H -ロイシンの投与方法

約 16 時間絶食したラットの腹腔内に生理食塩水で 3 倍に希釈した ^3H -ロイシン 100 μCi を 0.3 ml 注入した。採血は一定時間後、エーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈よりエラストー針にて行った。

5. 細胞分画法

1) 肝ホモジネートの作製法

in situ で冷生理食塩液 30 ml で灌流した後摘出した肝を、水冷した生理食塩液を含むビーカーに入れ、さらに数回、同じ生理食塩液で洗浄し水冷保存した。ホモジナイゼーションに先立って、まず十分に水分を拭ってから肝組織全体を鉗で細切し、そのうちから湿重量で 2.5 g 相当を採取した。この細切片をまずポッター型のテフロンホモジナイザーでホモジナイズし、Medium A を加え、ホモジネート (H) を調整した。

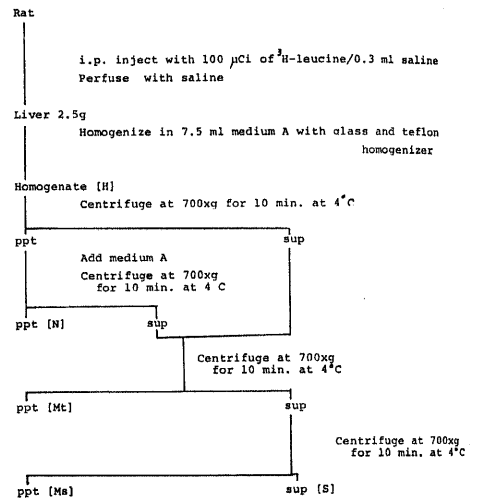


Fig. 1. Fractionation of rat liver homogenate labeled with ^3H -leucine. Medium A contained 0.25 M sucrose, 5 mM Tris HCl pH 7.5 and 1 mM EDTA. H: homogenate, N: nuclear fraction, Mt: mitochondrial fraction, Ms: microsomal fraction, S: supernatant fraction

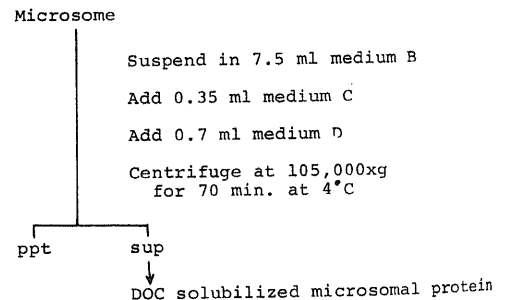


Fig. 2. Solubilization of microsomal proteins with sodium deoxycholate (DOC). Medium B contained 0.35 M sucrose, 35 mM KHCO_3 , 25 mM KCl, 4 mM MgCl_2 and 20 mM K_2HPO_4 , pH 7.4. Medium C contained 0.1 M MgCl_2 . Medium D contained 3% DOC.

2) 分画遠心法 (図1)

De Duveの方法³²⁾に準じて行った。すなわちホモジネートを、冷却遠心機で700×g、10分間遠心し、沈澱はMedium Aで洗浄後、再び遠心し、その沈澱をMedium Aで懸濁し核分画(N)とし、上清を15,000×g、10分間遠心し沈澱をMedium Aで懸濁してミトコンドリア分画(Mt)とした。次いで、その上清を超速心機で105,000×g、60分間遠心し、沈澱をMedium Bで懸濁してマイクロゾーム分画(Ms)を得た。また、上清を上清分画(S)とした。

6. DOCによるマイクロゾーム分画(Ms)の可溶化法 (図2)

マイクロゾーム分画(Ms)懸濁液に、9 mM MgCl₂になるようにMedium Cを加え、次いで0.26% DOCになるようにMedium Dを加え、0°Cで15分間放置し、時々攪拌した後、105,000×g、70分間遠心し、その上清をDOC可溶性分画とした。

7. ゲルクロマトグラフィーによる分離法

Ultra-gel AcA 54をつめたカラム(1.6 cm×75 cm)をリン酸緩衝液で平衡化しておき、血清は0.5 ml、DOC可溶性分画は3.0 mlをカラムのトップにのせ、次にリン酸緩衝液で溶出し、70滴(約2.0 ml)づつ、約50本に分取した。

8. SDS電気泳動法

Lammeliの原法³³⁾を改良したStudierの方法³⁴⁾を用いて行った。蛋白染色はメタノール・酢酸混液中にとかしたコマーシ・ブリリアントブルーで行い、脱色はメタノール・酢酸混液で、背景が透明になるまで行った。蛋白の分子量マーカーの標準として、牛アルブミン(M. W.64,000)、オバルミン(M. W.45,000)、ミオグロビン(M. W.17,000)、チトクロームC(M. W.12,000)を用いた。

9. 放射活性の測定法

1) 測定試料の作製法

i) 肝ホモジネート中の放射活性測定試料

0.1 mlのホモジネートにNCS (Amersham) 1.0 mlを加え、透明になるまで、50°Cで加熱分解し、カウンティングバイアル中の液体シンチレーター(トルエン:700 ml, トリトン X-100:300 ml, DPO:4 g, POPOP:0.1 g)の5.0 mlに加え、溶解した。

ii) 肝ホモジネートおよび各細胞成分蛋白中の放射活性測定試料

0.1 mlのホモジネートおよび細胞成分に、氷冷した5%過塩素酸5.0 mlを加え、4°Cで3,000 rpm、10分間遠心し、得られた沈澱を、氷冷した5%過塩素酸で2回洗浄したものをi)と同様にシンチレーターに加え、試料を作製した。

iii) ゲルクロマトグラフィー溶出液中の放射活性測定試料

0.5 mlのカラム溶出液を直接カウンティングバイアル中の液体シンチレーターに加えた。

iv) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動ゲル上の放射活性測定試料

1 mm厚のゲルを一定の巾にカミソリで切り出し、カウンティングバイアルに入れ、0.5 mlのNCSを加え、完全に浸漬させて、37°Cで一晩放置後、室温に戻してから、5.0 mlのシンチレーターを加えゲルはそのまま計測した。

2) ³H放射活性の測定

Aloka液体シンチレーションカウンターLSC-671型式で、³H-自動計測モードで1分間カウントした。

10. その他の分析方法

1) 血清総ビリルビン値

アルカリアゾビリルビン法³⁵⁾で測定した。

2) 血清アルブミン値

ビウレット法³⁶⁾で得られた総蛋白およびセルロースアセテート膜を用いた電気泳動法により求められた総蛋白に占めるアルブミンの割合(%)を基に算出した。

3) 血清および肝内遊離アミノ酸

血清遊離アミノ酸は、血清1.0 mlに5%スルホサルチル酸を加え除蛋白し、日立835-50型高速アミノ酸分析計を用い、高Na法で分析した。肝内遊離アミノ酸は、肝ホモジネートを過塩素酸で除蛋白し、その1.0 mlに同量のクエン酸緩衝液(pH 3.0)を加えて攪拌後、3,000 rpmで5分間遠心分離し、その上清0.5 mlを同様にアミノ酸分析計で測定した。

4) 肝蛋白含量

ホモジネートおよび細胞成分の懸濁液に過塩素酸を5%となるように氷冷下で加え、3,000 rpm 10分間、遠心して得られた沈澱を1 N-NaOHに溶解後、Lowryらの方法³⁷⁾に従い、牛血清アルブミンを標準にして、760 nmの波長の吸光度から日立124型分光光度計で測定し定量した。

5) 肝RNA含量

ホモジネートおよび細胞成分の懸濁液をSchmidt-Thannhauser-Schneiderの方法³⁸⁾に改良を加え、RNAを分画し、Majbaum³⁹⁾に従い、リボースをオルシノール反応で定量し、RNA量はリボース量に3.76を乗じて求めた。

6) 肝NADPHチトクロームC還元酵素活性

Omura-Takesueの方法⁴⁰⁾に従い、還元型チトクロームと酸化型チトクロームの吸収ピークの差の大きい550 nmの波長の吸光度の増加を、日立124型分光光度計で経時的に記録し、活性値を求めた。

Table 1. Changes in body weight, amount of food uptake and levels of albumin and total bilirubin in serum

		1 day	3 days	5 days	1 week	2 weeks
Body weight	%	J 97.7±1.5	102.2±2.6	107.1±3.2	112.0±4.8	128.9±7.7
		C 101.9±2.4	109.9±1.6	116.0±1.5	123.3±2.2	139.0±4.0
Food uptake	g/day	J 0.2±0.4	16.8±1.7	18.5±1.5	23.3±2.2	25.5±3.6
		C 5.0±4.6	23.5±2.9	22.7±2.4	25.2±2.4	24.8±1.3
Serum albumin	g/dl	J 3.43±0.19	3.38±0.30	3.60±0.27	3.29±0.20	2.62±0.11
		C 3.80±0.10	3.48±0.17	3.55±0.23	3.26±0.15	3.26±0.13
Total bilirubin in serum	mg/dl	J 5.30±0.53	6.47±0.80	6.53±0.77	6.71±0.67	8.08±1.60
		C 0.25±0.08	—	—	—	—

Body weight was defined as: $\frac{\text{Body weight after operation}}{\text{Body weight before operation}} \times 100\%$

J: obstructive jaundice
C: control

得られた値の統計的処理は、T検定に従った。

成 績

1. 総胆管結紮後の生化学的諸検査の推移 (表 1)

両群について血清総ビリルビン, 食餌摂取量, 体重, 血清アルブミンを, 術後, 1日目, 3日目, 5日目, 1週目, 2週目に測定した。血清総ビリルビンは総胆管結紮後, 1日目より, 5.30 ± 0.53 mg/dl と対照に比し, 20倍以上に上昇し, 1週目には, 6.71 ± 0.67 mg/dl となり, それ以降の増加は緩慢であった。食餌摂取量は, 術後5日目まで閉塞性黄疸群では対照群に比べてやや少なかったが, 以後は両群ともほぼ同量の食餌を摂取した。体重は, 閉塞性黄疸群では術直後に低下するが, 以後の増加程度は両群に差はなかった。血清アルブミンは, 1週目までは両群に差はみられなかったが, 2週目になると, 対照群の 3.26 ± 0.13 g/dl に対し閉塞性黄疸群では 2.62 ± 0.11 g/dl と低下していた。以上の成績から閉塞性黄疸作製後, 手術の影響から離脱し, 充分の食餌摂取量があり, 血清アルブミンが正常範囲にある時期, すなわち総胆管結紮後1週目のラットが本実験には適当と考えられた。

2. 血清および肝内遊離アミノ酸濃度 (図 3)

アミノ酸濃度が蛋白合成に影響をおよぼすことがすでに報告されている^{19)~21)}。そこで, 術後1週目のラットの血清および肝内遊離アミノ酸含量を検討した。血清遊離アミノ酸では閉塞性黄疸においてオルニチンの増加とアルギニンの低下をみるが, 他のアミノ酸については両群ともほぼ同様のパターンを示した。特に蛋

白合成, ことにポリゾームの形成に関与するトリプトファン²¹⁾は閉塞性黄疸群で 7.47 ± 1.68 μ mol/dl, 対照群で 7.12 ± 1.89 μ mol/dl, と差は認められなかった。また, 肝内遊離アミノ酸でも両群に差はみられなかつ

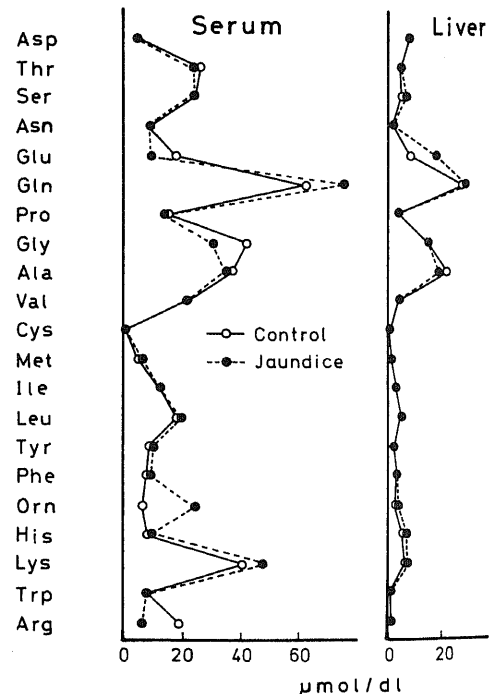


Fig. 3. Amino acid concentrations in the serum and liver tissue of obstructive jaundice rats.
●: obstructive jaundice ○: control

た。

3. 肝ホモジネートへの³H-ロイシン取り込み動態 (図4)

³H-ロイシン投与後 10 分, 30 分, 60 分, 120 分にラットを屠殺して, 肝ホモジネート中の³H 放射活性と, 蛋白に取り込まれた³H-ロイシンおよび遊離の³H-ロイシン, すなわち, PCA 不溶性分画および PCA 可溶性分画中の³H 放射活性を測定し, 両群で比較した。肝ホモジネートへの³H-ロイシンの取り込みは, 両群とも投与後 10 分ですでに閉塞性黄疸群で $1.99 \pm 0.44 \times 10^6$ DPM/g tissue, 対照群で $2.42 \pm 0.50 \times 10^6$ DPM/g tissue と多量に認められ, 30 分で最大となり次第に減少した。これを両群で比較すると, いずれの時間でも閉塞性黄疸群は低値をとるが, 特に 30 分では, 対照群 $5.32 \pm 0.90 \times 10^6$ DPM/g tissue に対し, 閉塞性黄疸群は $3.22 \pm 0.24 \times 10^6$ DPM/g tissue と有意に低値を示した。肝ホモジネート PCA 不溶性分画の³H 活性の経時的变化も同様のパターンを示し, 30 分で閉塞性黄疸群 $2.62 \pm 0.48 \times 10^6$ DPM/g tissue と, 対照群の $5.09 \pm 1.17 \times 10^6$ DPM/g tissue に対し約 50% の低下がみられた。一方, 肝ホモジネート PCA 可溶性分画では, 両群とも³H-ロイシン投与後, 次第に減少するが, 閉塞性黄疸群と対照群に差はみられなかった。

4. 細胞分画法による肝総蛋白および各細胞成分蛋白への³H-ロイシンの取り込み動態

1) 細胞分画の妥当性の吟味 (図5)

まず, 分画遠心により得られた, N, Mt, Ms, S, の各分画における肝蛋白, RNA 含量および NADPH チトクローム C 還元酵素活性を測定し, これらの各細胞成分への分布を調べ, 分画方法の妥当性と分布の偏奇を検討した。

この図では De Duve らの方法²²⁾に従い, 各分画の蛋白の肝総蛋白への割合 (%) を横軸に, 縦軸には肝の総蛋白当りの総 RNA (比含量) および NADPH チトクローム C 還元酵素 (比活性) に対する各分画の比含量, 比活性の相対比を示している。肝蛋白は閉塞性黄疸群では肝湿重量当り 177.2 ± 13.1 mg/g tissue と対照群 209.4 ± 20.0 mg/g tissue に比して低値を示した。肝蛋白の分布をみると閉塞性黄疸群では, N に多く, Mt, Ms に少かった。RNA は, 肝湿重量当りでは, 閉塞性黄疸群 $15,630 \pm 1,504$ μ g/g tissue と閉塞性黄疸群はやや低値を示すが, 閉塞性黄疸群では肝蛋白量が低下するため, 蛋白当りでは対照群 75.21 ± 8.39 μ g/mg protein に対し, 閉塞性黄疸群 83.5 ± 11.45 μ g/mg protein とむしろ高値を示した。しかし, いずれも有意の差ではなかった。RNA は Ms に最も多く分布してい

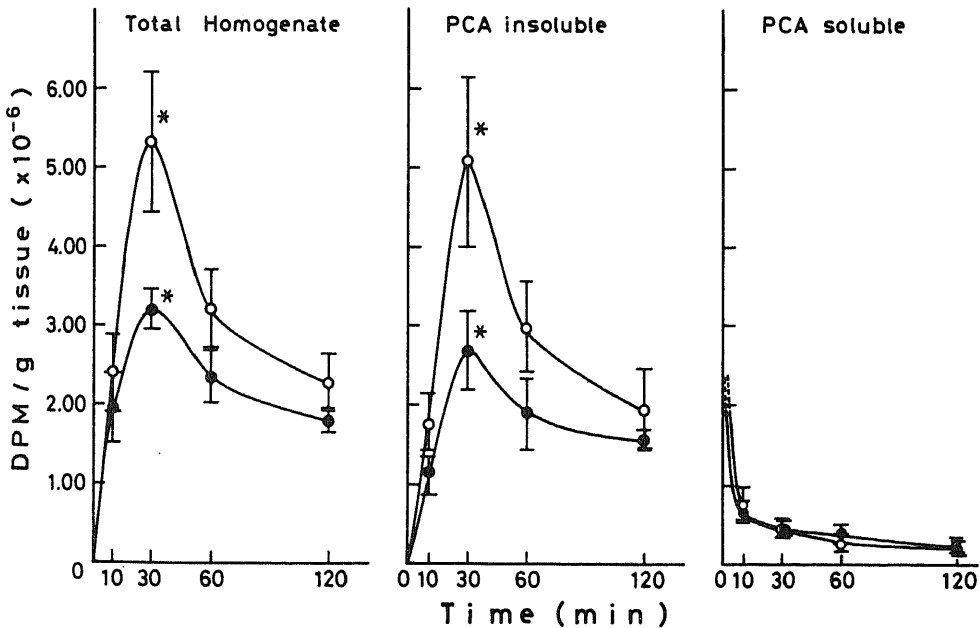


Fig. 4. Time course of incorporation of ³H-leucine into total liver homogenate and its PCA insoluble - and soluble - fractions of obstructive jaundice rats.

● : obstructive jaundice ○ : control

Each group represents a mean \pm S. D. of 6 rats. *P<0.01

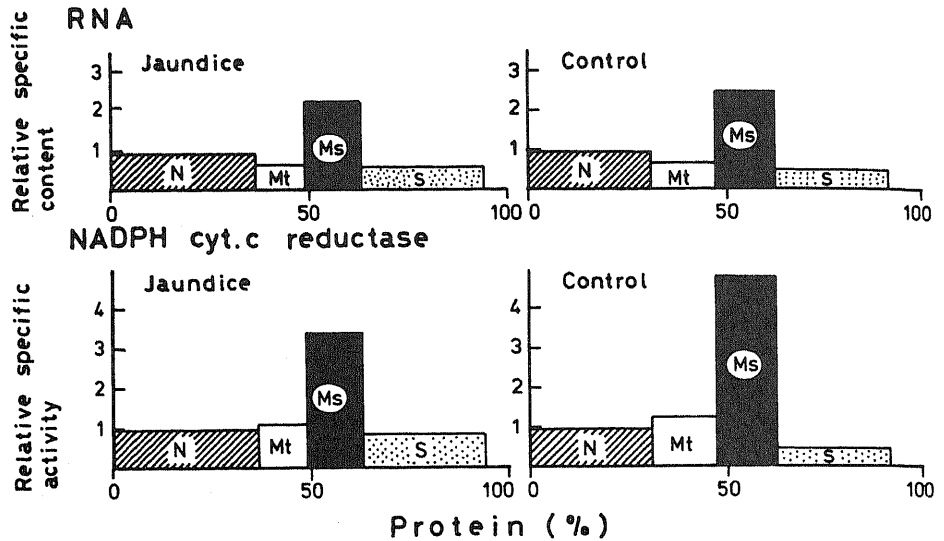


Fig. 5. Subcellular distribution of protein, RNA and NADPH cytochrome C reductase. Subcellular fractions were separated by differential centrifugation as described in Fig. 1.

たが、両群を比較すると、閉塞性黄疸群ではNのRNA含量が多い傾向がみられた。NADPHチトクロームC還元酵素は、閉塞性黄疸群 3.02×10^{-5} unit/mg protein, 対照群 3.43×10^{-5} unit/mg protein と閉塞性黄疸群は低値を示した。分布はいずれもMsに多く認められたが、閉塞性黄疸群でMt, Msでの低下がみられた。

RNA, NADPHチトクロームC還元酵素はともに、マイクロゾームのマーカーとして知られているので、この分画で得られたMsはマイクロゾームであり、小胞体に富んでいるものとして差支えないと考えられた。ミトコンドリアにはRNAがともに低値で、NADPHチトクロームC還元酵素は含まれていないとされているので、MtにみられたRNAおよび酵素活性はマイクロゾームの混入によると思われる。

2) 肝総蛋白および肝各細胞成分への ^3H -ロイシン取り込みの経時変化(図6, 図7)

肝総蛋白への ^3H -ロイシンの取り込みは、両群とも30分目に最大値となり、その後は減少し、60分後はほぼ一定となった。両群を比較すると、10分では閉塞性黄疸群 $57.94 \pm 18.09 \times 10^2$ DPM/mg protein, 対照群 $68.08 \pm 12.77 \times 10^2$ DPM/mg protein と差はみられなかったが、30分では閉塞性黄疸群は $122.95 \pm 17.88 \times 10^2$ DPM/mg protein と対照群の $186.67 \pm 43.75 \times 10^2$ DPM/mg protein に比し低値を示した。60分では閉塞性黄疸群はやや低値となったが、120分では差はなかった。

次に細胞分画により得られたN, Mt, Ms, Sの蛋白に取り込まれた ^3H -ロイシンの経時変化をみると、Nでは30分で最大となり、その後やや低下しているが、ほとんど一定の放射活性を有していた。SもNの場合

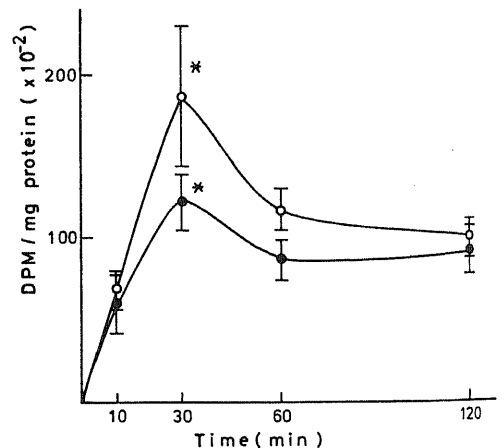


Fig. 6. Time course of incorporation of ^3H -leucine into liver protein of rats with obstructive jaundice. Liver homogenates were treated with 5% PCA and insoluble ^3H -radioactivities were measured.

● : obstructive jaundice ○ : control
Each group represents a mean \pm S. D. of 6 rats.
* $P < 0.01$

と同じ経過をとった。一方、Msでは30分で急激に取り込みが増大し、対照群においては10分での取り込みの約3.6倍、60分での取り込みの約2.5倍であった。MtにおいてもMsと同様の経時的変化のパターンを示した。このように、放射活性の現われ方にはNやSの場合にみられる単純増加型と、MsやMtのような30分目に一過性のピークを伴う経時的な変化を示す型のふたつのパターンがある。単純増加型は、核、ミトコンドリア、小胞体の構成蛋白や、または上清蛋白などのturn overの比較的長い蛋白への取り込みに相当するも

のであり、Ms分画における ^3H 放射活性の急激な増加と減少は、蛋白中に遷移的な分泌蛋白が多量に含まれていることを示すものである。また、Mt分画にみられたMs様のパターンは少量のマイクロゾームの混入によるものと思われ、先のRNA, NADPHチトクロームC還元酵素活性がMtへ混入していた所見とよく一致していた。

次に、各分画への ^3H -ロイシンの取り込みを両群で比較すると、NおよびSでは、いずれの時間にも両群に差はみられなかったが、Msでは、30分で閉塞性黄疸群

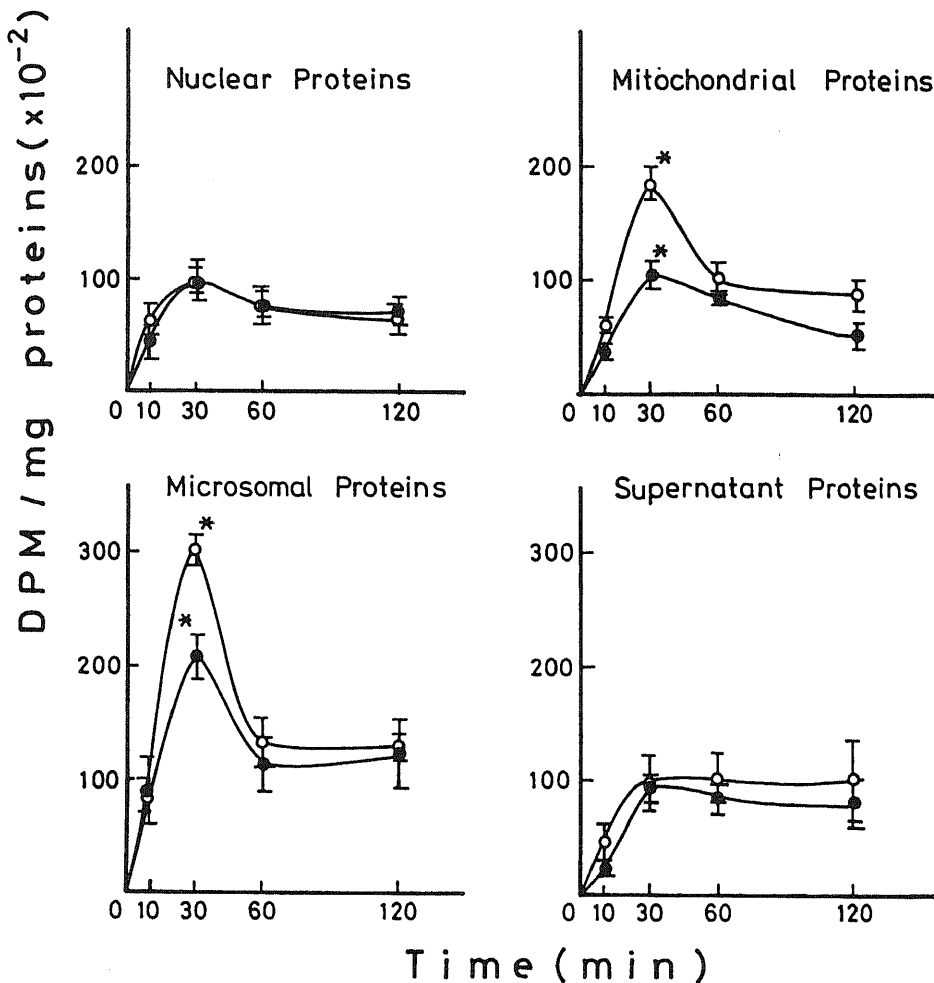


Fig. 7. Time course of incorporation of ^3H -leucine into nuclear, mitochondrial, microsomal and supernatant proteins of rats with obstructive jaundice. PCA insoluble subcellular fractions were subjected to determination of ^3H -radioactivities.

● : obstructive jaundice ○ : control

Each group represents a mean \pm S. D. of 6 rats.

* $P < 0.01$

207.57±20.85×10²DPM/mg protein, 対照群 300.80±14.12×10²DPM/mg protein と, 閉塞性黄疸群は対照群に比し著しく低値をとっていたが, 10分, 60分, 120分における両群の差は明らかではなかった。Mt においても同様の傾向がみられ, 30分閉塞性黄疸群では 107.35±12.47×10²DPM/mg protein と対照群の 186.31±14.19×10²DPM/mg protein に比べ低値を示した。

5. マイクロゾーム DOC 可溶性分画のゲルクロマトグラフィー

1) ゲルクロマトグラフィー溶出パターン(図8, 図9)

Ms 分画のいかなる分子種の蛋白に³H-ロイシンが取り込まれているか, また, それらの取り込み動態について詳細に検討するために, Ms 分画を DOC で可溶化

し DOC 可溶性分画を作製した。この DOC 処理により³H-ロイシンの 90%以上が DOC 可溶性分画に回収され, 未回収放射活性部分は, 105,000×g. 沈澱部分のリボゾームに見い出された。280 nm での吸光度によって測定した蛋白濃度の溶出パターンは, fraction number 13 に単一のピークを有する型となった。一方,³Hの溶出パターンは経時的に変化するが, 対照群での³H-ロイシン投与後 10 分のパターンでは 4 つのピークに分画された。

最初に溶出されるピークは, 主として完全に可溶化されていないマイクロゾームの膜蛋白で, これに取り込まれた³H-ロイシンの放射活性を示している(以下 membranous protein rich fraction)。第2のピークはアルブミンを含んだ分画で, SDS 電気泳動でのコマーシブルによる蛋白染色では, 10 数種のバンドが

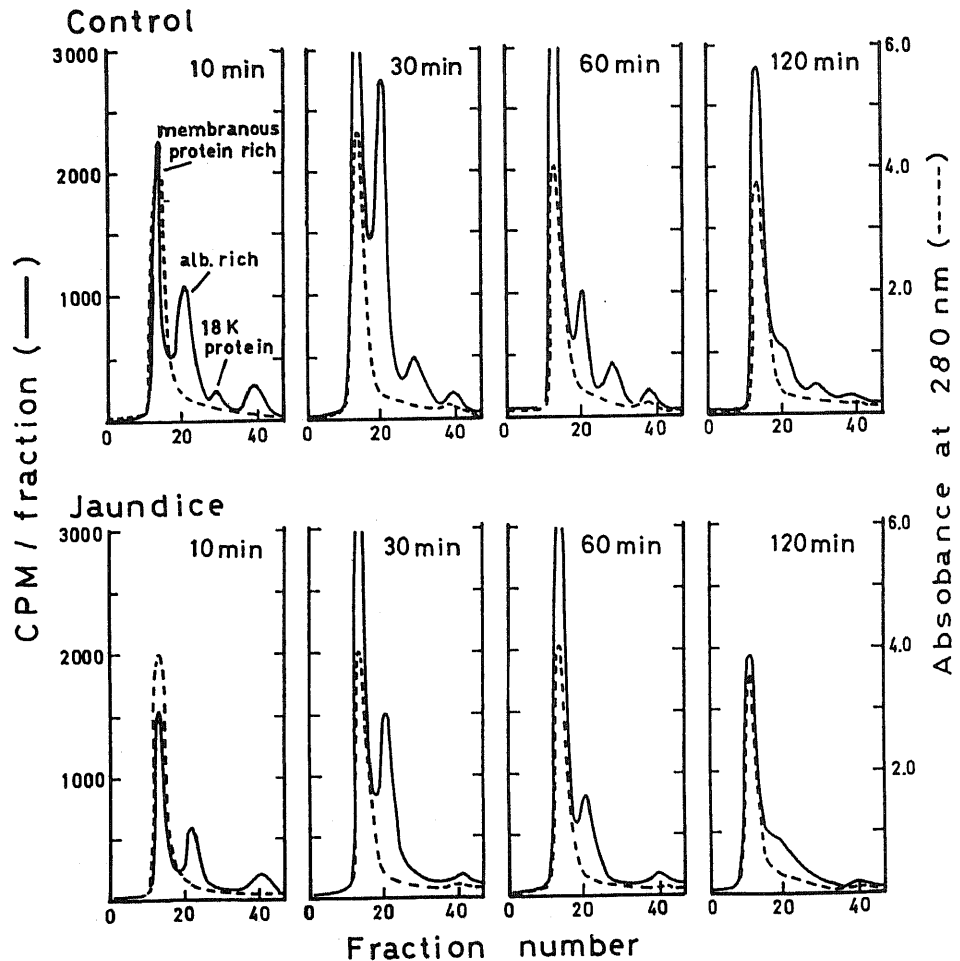


Fig. 8. Elution profile on an Ultro-gel AcA 54 column of DOC solubilized fraction from liver microsomes of rats labeled in vivo with ³H-leucine for various times.

認められたが、 ^3H の放射活性は単一のバンドでアルブミンに完全に一致した(以下 albumin rich fraction)。第3のピークは、SDS電気泳動で6本のバンドを示すが、 ^3H の放射活性はこのうち一本のバンドにのみ存在しており、分子量は約18,000でpH 5.5に等電点を有する蛋白であった。しかし、その他の性質は不明であるので、このピークを unknown protein fraction とし、蛋白を 18 K protein とした。このピークは閉塞性黄疸群では、いずれの時間にも認められなかった。第4のピークは遊離の ^3H -ロイシンの放射活性であった。

2) 各 fraction 蛋白への ^3H -ロイシン取り込みの経時的変化(図10)

membranous protein rich fraction; albumin rich fraction および unknown protein fraction の放射活性を積分し、その経時変化を観察した。membranous protein rich fraction では、 ^3H 放射活性は30分で最大となり、60分でやや低下した後、一定の高い活性を有する遷移性のラベルプロフィールを示したが、albumin rich fraction では30分で明確なピークを形成して最大となった後、急速な低下を示した。いずれの fraction においても閉塞性黄疸群では ^3H の放射活性の低下がみられ、ことに30分での両群の差が著明であった。

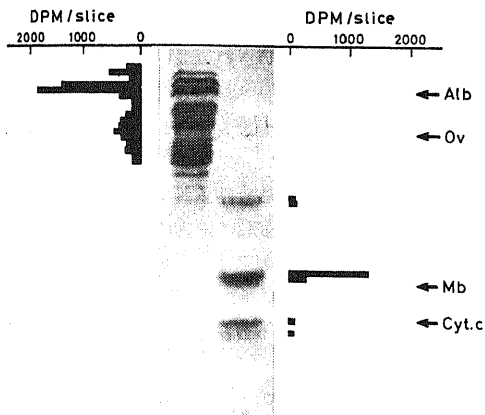


Fig. 9. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) of albumin rich fraction and 18K protein fraction and distribution of ^3H -leucine on SDS polyacrylamide gels. Albumin rich fraction and 18K protein fraction, obtained by gel chromatography of DOC solubilized microsomal fraction, were used for SDS PAGE analysis. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue G250. Gels were cut into small pieces and their ^3H -radioactivities were measured. Albumin (Alv), ovalbumin (Ov), myoglobin (Mb) and cytochrome C (Cyt C) were molecular weight markers.

membranous protein rich fraction における放射活性の経時的パターンからは、この fraction 内のアルブミンやほかの分泌蛋白への ^3H の取り込みの可能性を否定できないが、この fraction の SDS 電気泳動では、アルブミンの分子量に一致するバンドには放射活性は認められなかった。

unknown protein fraction では、上記2つの fraction に比べピークは著しく低かったが、30分まではゆるやかに増加し、その後次第に減少を示したことから 18 K protein は分泌蛋白の可能性が示唆された。

6. アルブミンの血清中分泌の経時変化(図11)

アルブミンの血清中への分泌過程をみるために、Ultra-gel AcA 54 で分画された血清アルブミンへの ^3H -ロイシンの取り込みを経時的に測定した。対照群では、60分目まで急速に上昇してプラトーに達するが、閉塞性黄疸群では、上昇がゆるやかでプラトーに達するまでの時間が有意に遅延しており、また、全体に ^3H の放射活性低下が認められた。

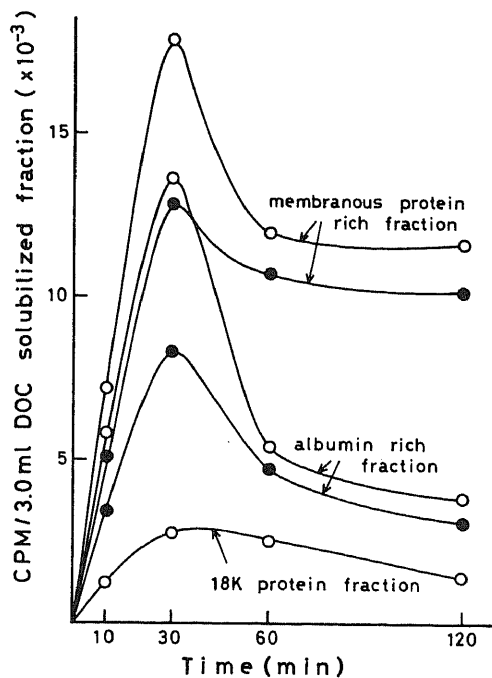


Fig. 10. Time course of incorporation of ^3H -leucine into microsomal membranous protein rich- and albumin rich-fractions and 18K protein fraction separated by gel chromatography of microsomal DOC extract from the liver of obstructive jaundice rats labeled in vivo with ^3H -leucine.

● : obstructive jaundice ○ : control

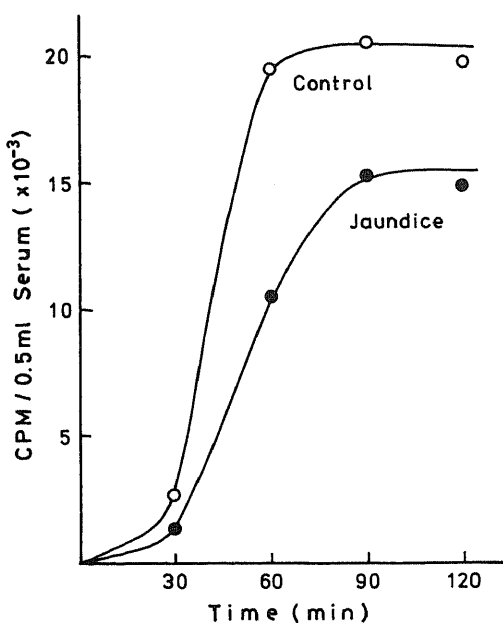


Fig. 11. Time course of incorporation of ^3H -leucine into serum albumin of obstructive jaundice rats.

● : obstructive jaundice ○ : control

考 察

閉塞性黄疸における肝の蛋白合成能は、未だ不明な点が多く、Leeら⁴¹⁾は、閉塞性黄疸ラットでは血清アルブミン値や、尿素生成が低下することにより蛋白合成能が障害されていると推察しているが、Lundborg^{42), 43)}らは、ラットにおける ^3H -ロイシンの取り込み実験で、蛋白合成は *in vivo* では閉塞性黄疸群と対照群の間に差はなく、*in vitro* ではむしろ閉塞性黄疸群で亢進していると異った結果を述べている。

蛋白の合成は肝障害時のみならず、食餌、特に摂取蛋白の量・質^{14)~18)}、手術侵襲^{30) 31)}などに影響され、また、黄疸が長期化すると二次的な病態を生じ多くの修飾をうけるなど閉塞性黄疸そのものの正確な蛋白合成能の把握は困難となる。このため、*in vivo* で閉塞性黄疸肝の機能的予備力の指標として蛋白合成能を検討するにあたっては、可能な限り、これらの因子を排除した実験系の設定が必要である。そこで、著者は本実験に入る前に総胆管結紮後、ラットの食餌摂取量、血清アルブミンの測定を行ったところ、2週目以降では閉塞性黄疸群で血清アルブミンが有意に減少するという結果を得たので、結紮後1週目のラットが本実験には適当と考えた。

以上のことをふまえて、総胆管結紮後1週目の閉塞性黄疸群と、同時に単開腹した対照群について、 ^3H -ロイシン投与により、肝蛋白および各細胞成分蛋白への ^3H -ロイシンの取り込み、肝内アルブミンの ^3H -ロイシンの取り込み、血清中へのアルブミン分泌など閉塞性黄疸での蛋白合成能を *in vivo* の肝細胞レベルで検討した。

標識アミノ酸の肝への取り込みは、投与方法により若干異なるが⁴⁴⁾、Peters⁴⁵⁾はラット静脈より ^{14}C -ロイシンを投与すると、肝内の放射能は1分から1.5分の間に最大値となり、肝に摂取された ^{14}C -ロイシンは急速に肝蛋白中に見出されることを認めている。著者は、腹腔内に ^3H -ロイシンを投与し、10分、30分、60分、120分後にラットを屠殺し、経時的に肝ホモジネートの ^3H 放射活性、肝蛋白中の ^3H 放射活性および肝内の遊離の ^3H -ロイシンを測定したが、投与後10分目ですら対照群で肝に摂取された ^3H -ロイシンの70%以上、閉塞性黄疸群でも60%以上が肝蛋白中に取り込まれていたため、腹腔内投与でも本実験には差支えないものと判断された。

次いで肝内の遊離の ^3H -ロイシン放射活性と肝蛋白中の ^3H 放射活性の経時変化を両群で比較すると、前者は合成された蛋白中に移行し次第に低下するが、いずれの時間でも両群に差は認められなかった。一方、後者は投与後30分で最大となった後次第に低下し、60分以後では一定となるという経過を示し、何らかの分泌蛋白の合成が行われている事を示唆したが、閉塞性黄疸群では対照に比して低値を示し、ことに30分では著明な差がみられた。

以上の事実を考慮すると閉塞性黄疸群においては、 ^3H -ロイシンの肝での摂取は正常に行われているが、肝細胞内での蛋白合成に障害がみられること、さらに30分での肝蛋白への ^3H -ロイシンの取り込み低下がみられることから、肝における分泌蛋白の合成障害が推察された。

蛋白合成が肝細胞中のマイクロゾームで行われていることは、多くの研究により証明されている^{46)~50)}。そこで著者は、マイクロゾームの蛋白合成能を検討するために細胞分画を行い、核分画(N)、ミトコンドリア分画(Mt)、マイクロゾーム分画(Ms)、上清分画(S)を作製し、各分画蛋白中の ^3H 比放射活性を経時的に測定した。測定に先立ち著者の行った分画方法の妥当性と分布の偏奇についてRNAおよびNADPHチトクロームC還元酵素をマーカーとして吟味してみたが、Msにおいてはいずれのマーカーも多量に証明され、この分画は小胞体に富んだマイクロゾームであることが確認された。一方NADPHチトクロームC還元酵素を合

まなはずの Mt にも若干の酵素活性が証明されたが、これは小量のマイクロゾームの混入によるものと考えられた。N, S への³H-ロイシン取り込みの経時的パターンは単純増加型を呈し、これらの分画の構成蛋白に取り込まれた³Hの動態を示すものと思われたが、閉塞性黄疸群は対照群の比較では両群に差はみられなかった。一方、Ms では他の分画よりはるかに高い比放射活性を示し、一過性のピークを伴う経時変化を示した。これは Ms で盛んに蛋白合成が行われ、しかも Ms の構成蛋白以外にも遷移的な分泌蛋白が合成されていることを示している。両群の比較では、ピーク時における閉塞性黄疸群の³H 比放射活性は有意に低下し対照群の約3分の2になっていた。マイクロゾームの混入があると思われる Mt では Ms と同じ型の経時変化を示し、ピーク時の³H 比放射活性も Ms と同様に閉塞性黄疸群では有意に低下していた。これらの結果より、³H-ロイシン投与後 30 分目に最も著明に認められる肝総蛋白への³H-ロイシンの取り込み低下は、この時点における Ms, Mt への取り込みの障害、すなわち主として分泌蛋白への取り込み低下に起因するものと考えられた。

それでは Ms 分画のいかなる分泌蛋白の合成障害が生じているのであろうか。著者はさらに詳細に検討するため Ms 分画の DOC 可溶性分画を作製し、ゲルクロマトグラフィーを行ってみた。その結果、Ms 分画の³H 放射活性は、membranous protein rich fraction, albumin rich fraction, unknown protein fraction, 遊離の³H-ロイシンの fraction の 4 つに分けることができ、さらに、電気泳動によって albumin rich fraction の放射活性はアルブミンであることが確認され、Ms 分画の分泌蛋白の主体はアルブミンであることが明らかになった^{51)~54)}。閉塞性黄疸群では、この albumin rich fraction における³H-ロイシンの取り込みが対照群と比較して著明な低下を示すことが認められたが、一方、unknown protein fraction が閉塞性黄疸群においてほとんど検出されなかったことも注目をひいた。この fraction 中の放射活性を有する蛋白 (18 K protein) は、分子量約 18,000, pI 5.5 に等電点を有し、放射活性が時間の経過とともに Ms 分画から消失していくため、一種の分泌蛋白と考えられたが、その他の性質は今回の検討で明らかにし得なかった。しかし、閉塞性黄疸作製後 1 週目にしてこうした未知の分泌蛋白の合成に明らかな障害のみられたことは興味深く、今後の臨床上の意義についても検討の必要があろう。

ところで、閉塞性黄疸肝のアルブミン合成障害はいかなる機序によるものであろうか。アルブミン合成障害の誘因は①肝外アルブミン合成促進因子の低下ある

いは欠落^{14)~26)}、②肝機能障害^{55)~66)}の2つに大別することが出来る。肝外のアルブミン合成促進因子として最も重要なものは栄養で、ことに蛋白摂取によるアルブミン合成の調節が注目されている。臨床的にも¹³I-アルブミンによる観察で Cohen ら¹⁴⁾は Kwashiorkor 患者のアルブミン代謝率は低下しているが、高蛋白食事により蛋白合成の増加を認めると述べ、Hoffenberg ら¹⁵⁾も正常人に低蛋白食 (等カロリー食) を摂取させることによりアルブミン合成が低下することを指摘している。実験的には、Kirsh ら¹⁶⁾が、McFalarlane の方法⁶⁵⁾を用い、低蛋白食で飼育したラットではアルブミン合成速度が低下することを認め、Roshchild ら¹⁷⁾も同様の方法を用い、in vivo、灌流肝ともにアルブミン合成速度が低下することを認めている。また、低蛋白食の摂取によりマイクロゾームへの³H-ロイシンの取り込みが低下することも知られており¹⁷⁾、Morgan ら¹⁸⁾も無蛋白食で飼育したラットのマイクロゾームアルブミン量は正常に比べ 40% に減少していると報告している。さらに低蛋白食によるアミノ酸摂取の低下が肝におけるアルブミン合成障害をもたらすことが、Rothschild ら¹⁹⁾のウサギ肝灌流による実験で明らかにされ、Munro ら^{20), 21)}も蛋白合成単位であるポリソームの形成に及ぼすアミノ酸の影響を指摘している。しかし、著者の実験においては、実験に供した時点でのラットは、閉塞性黄疸群、対照群において血清蛋白、食餌摂取量、食餌内容、血清・肝内遊離アミノ酸動態ではほとんど差がなく、閉塞性黄疸群で認められたアルブミン合成の低下は、栄養環境の変化に基ずくものとは考え難い。

一方、肝障害時にアルブミン合成の障害がみられることは、アルブミンの合成が肝のみで行われるということ^{8)~12)}からも、容易に予測することが出来る。事実、肝硬変や薬物による肝障害でアルブミン合成が障害を受けるという報告^{56)~66)}は多く、電顕的な研究から粗面小胞体の変化やリボゾームの減少などがひとつの原因と推定されている^{67)~68)}。一方、閉塞性黄疸では肝細胞の変化壊死による肝細胞数の減少がアルブミン合成の低下をもたらすことも考えられるが、山内ら⁶⁹⁾は総胆管結紮後 1 週目では肝細胞数の減少は著明ではないとしており、この時期ではむしろ個々の細胞のアルブミン合成低下が主たる原因であろうと思われる。また、閉塞性黄疸肝では ATP 産生の低下することが知られており⁷⁾、in vitro における実験では ATP の添加によって、リボゾームの³H-ロイシンの取り込みが増加するという報告もみられる^{70), 71)}。しかし一方では、閉塞性黄疸肝の電顕像においても滑面小胞体や粗面小胞体の減少、リボゾームの小胞体よりの分離とポリソームの解重合などが観察されている^{72), 73)}。著者の行った Ms 分画の DOC

可溶性分画のゲルクロマトグラフィーでの結果も、生化学的な立場から、マイクロゾームのアルブミン合成の障害を明らかにしており、閉塞性黄疸肝での蛋白合成障害も薬物による肝障害などと同様、粗面小胞体やリボゾームの質的、量的変化が、アルブミン合成障害の原因と考えるのが妥当であろう。

ところで、著者の実験で認められたように閉塞性黄疸では肝内のアルブミン合成が低下しており、さらに血清中へのアルブミン分泌にも低下がみられているにもかかわらず、血清アルブミン値が正常に維持されているのはいかなる理由によるのであろうか。一般に閉塞性黄疸ではその初期において、血清アルブミン濃度は正常値をとることが多く⁷⁴⁾、また、高度な蛋白合成障害をきたす肝硬変、四塩化炭素障害肝においても、血清アルブミン濃度の低下はアルブミン合成量の減少に比較して小さいことが知られており^{56), 63)}、肝障害時には血清アルブミン濃度を保持しようとする何らかのメカニズムの存在することが推定されている。沢田は⁵⁹⁾肝障害によりアルブミンの合成が低下するとともに、分解率が減少することにより総アルブミン量の低下を防止しようとする機構があると考えており、アルブミン合成の低下により血管外のアルブミンの血管内への移行が増加することも観察されている¹⁵⁾ので、閉塞性黄疸においても、これらの調節機構により血清アルブミンは正常に保たれているものと考えられる。

このように、アルブミンの合成と分解が相互に影響しあい、さらに血管外アルブミンの調節により血清アルブミン濃度を保とうとしているのであるが、閉塞性黄疸の外科的治療にさいしては、手術侵襲による分解の亢進と、本実験では明らかにされた合成能の低下のため、術後には著明な血清アルブミン濃度の低下が予想される。したがって、閉塞性黄疸症例の術前術後の管理にあたっては、血清アルブミン値が正常であってもこれらのことを考慮に入れ、血漿やアルブミンなどの補給が必要であり、肝の蛋白合成能からみても早期の手術が望ましいと考えられる。

結 論

1. 総胆管結紮後1週目の閉塞性黄疸ラットでは、血清総ビリルビン値は高値となるが、食事摂取量、血中および肝内遊離アミノ酸含量は対照と差はなかった。また、血清アルブミン濃度にも有意差はなかった。
2. 肝内遊離の³H-ロイシン放射活性は閉塞性黄疸群と対照群の間に有意差はなく、肝のアミノ酸も両群に差はなかった。
3. 肝総蛋白への³H-ロイシンの取り込みは30分でピークに達するが、閉塞性黄疸群ではピーク時での取

り込みの低下がみられた。

4. 核蛋白、上清蛋白への³H-ロイシンの取り込みは、単純増加型の経時変化を示すが、両群に差はなかった。

5. マイクロゾーム蛋白への³H-ロイシンの取り込みは、一過性のピークを有する経時変化を示すが、閉塞性黄疸群ではピーク時での取り込みが著明に低下していた。

6. マイクロゾームアルブミンへの³H-ロイシンの取り込みは、投与後30分でピークに達するが、閉塞性黄疸群ではピーク時の取り込みが著明に低下していた。

7. 閉塞性黄疸群ではある種の分泌蛋白(18 K protein)の合成が抑制されていた。

8. 血清アルブミンへの³H-ロイシンの取り込みは、投与後10分から30分後にみられ、60分でプラトーに達するが、閉塞性黄疸群ではプラトーに達するまでの時間が遅延しており、全体に取り込みの低下がみられた。

以上により、閉塞性黄疸肝では、肝構成蛋白の合成能は比較的保持されているが、アルブミンを中心とした分泌蛋白の合成能は早期からすでに障害されていることが明らかとなった。

本論文の要旨は昭和55年4月5日、第80回日本外科学会総会(仙台)、昭和55年10月13日、第53回日本生化学会大会(東京)において発表した。

稿を終るに臨み、終始、御懇篤な御指導と御校閲を賜った恩師宮崎逸夫教授に謹んで謝意を捧げます。また、本研究のための御教示、御助言をいただいた藤田秀春講師ならびに第一生化学教室の松川茂博士に深謝致します。最後に、種々に御援助下さいました第一生化学教室の米山良昌教授に感謝致します。

文 献

- 1) Sherlock, S.: Protein metabolism, p32-37. In S. Sherock (ed.), Disease of the liver and biliary system, 5th ed. Blackwell scientific publication, Oxford, 1975.
- 2) 佐藤寿雄, 小山研二: 閉塞性黄疸の病態生理. 肝障害を中心として. 外科, 36, 426-433 (1973).
- 3) Moody, F. G., Rikkers, L. F. & Aldrete, J. S.: Estimation of the functional reserve of human liver. Ann Surg., 180, 592-598 (1974).
- 4) 小澤和恵: 肝障害, 肝の代償性からみた肝の機能的予備力の把握. 外科, 36, 1092-1098 (1974).
- 5) 山岡養生, 南部裕和, 高三秀成: ミトコンドリア機能からみた閉塞性黄疸. 医学のあゆみ, 86, 499-503 (1973).

- 6) 大柳治正, 白川勝, 山下修一, 関田幹雄, 奥村修一, 中谷正史, 鄭正秀, 永津正章, 光野考雄: 閉塞性黄疸の病態生理と手術時期についての検討. 日消外会誌, 8, 211 - 219 (1975).
- 7) 菅原克彦, 河野信博, 三谷進, 岩月淳, 長尾桓, 金高伸也: 閉塞性黄疸のもたらす肝障害と外科的治療効果の病態生理. 日消外会誌, 10, 736 - 742 (1977).
- 8) Peters, T. Jr. & Anifinsen, C. B.: Production of radioactive serum albumin by liver slices. J. Biol. Chem., 182, 171 - 179 (1950).
- 9) Miller, L. L., Bly, C. G., Watson, M. L., & Bale, W. F.: The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. —A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine ¹⁴C. J. Exp. Med., 94, 431 - 453 (1951).
- 10) Campbell, P. N. & Stone, N. E.: The synthesis of serum albumin and tissue protein in slice of rat liver and liver tumor. Biothem. J., 66, 19 - 31 (1957).
- 11) Kukral, J. C., Kerth, J. D., Pancner, R. J., Cromer, D. W. & Heneger, G. C.: Plasma protein synthesis in the normal dog and after total hepatectomy. Surg. Gynecol. Obstetr., 113, 360 - 372 (1961).
- 12) Weissman, S. M., Wochner, R. D., Mullins, F. X., Wynngate, A. & Waldmann, T. A.: Synthesis of plasma proteins by hepatectomized dogs. Amer. J. Physiol., 210, 128 - 132 (1966).
- 13) Rothschild, M. A., Oratz, M. & Schreiber, S. S.: Albumin synthesis. Int. Rev. Physiol., 21, 249 - 274 (1980).
- 14) Cohen, S. & Hansen, J. D. L.: Metabolism of albumin and γ - globulin in Kwashiorkor. Clin. Sci., 23, 351 - 359 (1962).
- 15) Hoffenberg, R., Black, E. & Brock, J. F.: Albumin and γ - globulin tracer studies in protein depletion states. J. Clin. Invest., 45, 143 - 152 (1966).
- 16) Kirsh, R., Frith, L., Black, E. & Hoffenberg, R.: Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. Nature, 217, 578 - 579 (1968).
- 17) Rothschild, M. A., Oratz, M., Mongelli, J. & Schreiber, S. S.: Effects of a short - term fast on albumin synthesis studied in vivo, in the perfused liver, and on amino acid incorporation microsomes. J. Clin. Invest., 47, 2591 - 2599 (1961).
- 18) Morgan, E. & Peters, T. Jr.: The biosynthesis of rat serum albumin. V. Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. J. Biol. Chem., 246, 3500 - 3507 (1971).
- 19) Rothschild, M. A., Oratz, M., Mongelli, J., Fishman, L. & Schreiber, S. S.: Amino acid regulation of albumin synthesis. J. Nutr., 98, 395 - 403 (1969).
- 20) Munro, H. N.: Free amino acid pools and their role in regulation, p299 - 386. IN H. N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism, vol. 4, Academic Press Inc., New York, 1970.
- 21) Sidransky, H., Sarma, D. S. R., Bongiorno, M. & Verney, E.: Effect of dietary tryptophan on hepatic polyribosomes and protein synthesis in fasted mice. J. Biol. Chem., 243, 1123 - 1132 (1968).
- 22) Rothschild, M. A., Bauman, A., Yalow, R. S. & Berson, S. A.: The effect of large doses of desiccated thyroid on the distribution and metabolism of albumin -¹³¹I in euthyroid subjects. J. Clin. Invest., 36, 422 - 428 (1957).
- 23) Lewallen, C. G., Rall, J. E., & Berman, M.: Studies of iodoalbumin metabolism. II. The effect of thyroid hormone. J. Clin. Invest., 38, 88 - 101 (1959).
- 24) Rothschild, M. A., Schreiber, S. S., Oratez, M. & McGee, H. L.: The effects of adrenocortical hormones on albumin metabolism studied with albumin -¹³¹I. J. Clin. Invest., 37, 1229 - 1235 (1958).
- 25) Feldhoff, R. C., Taylor, J. M. & Jefferson, L. S.: Synthesis and secretion of rat albumin in vivo, in perfused liver, and in isolated hepatocytes. J. Biol. Chem., 252, 3611 - 3616 (1977).
- 26) Crane, L. J. & Miller, D. L.: Plasma protein synthesis by isolated rat hepatocytes. J. Cell. Biol., 72, 11 - 25 (1977).
- 27) Majumder, C., Tsukada, K. & Lieberman, I.: Liver protein synthesis after partial hepatectomy and acute stress. J. Biol. Chem., 242, 700 - 704 (1967).
- 28) Rothschild, M. A., Oratz, M., Mongelli, J. & Schreiber, S. S.: Effect of albumin concentration on albumin synthesis in the perfused liver. Am. J. Physiol., 216, 1127 - 1130 (1969).
- 29) Rothschild, M. A., Oratz, M., & Schreiber, S. S.: Serum albumin. Am. J. Dig. Dis., 14, 711 - 744 (1969).
- 30) 関矢忠愛: 蛋白代謝に与える手術侵襲, グルココルチコイドおよび絶食の影響. 日外会誌, 70, 380 - 404

(1969).

- 31) 吉川恵次: 術後の糖, 蛋白, 脂肪代謝に関する総合的研究 (第3報) —¹⁴C—グルコースを用いての実験—術後代謝, 12, 172 - 176 (1977).
- 32) De Duve, Pressman, B. C., Glanetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F.: Tissue fractionation studies.—6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 60, 604 - 617 (1955).
- 33) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680 - 685 (1970).
- 34) Studier, F. W.: Analysis of bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.*, 79, 237 - 248 (1973).
- 35) Malloy, H. T. & Evelyn, K. A.: The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.*, 119, 481 - 490 (1937).
- 36) Gorrall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M.: Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751 - 766 (1949).
- 37) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 - 275 (1951).
- 38) Schneider, W. C.: Phosphorus compounds in animal tissues. III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, 164, 747 - 751 (1946).
- 39) Mejbaum, W.: Über die Bestimmung Kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 258, 117 - 120 (1939).
- 40) Omura, T. & Takenue, S.: A new method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH - cytochrome C reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 67, 249 - 257 (1970).
- 41) Lee, E., Ross, B. D. & Haines, J. R.: The effect of experimental bile - duct obstruction on critical biosynthetic functions of the liver. *Brit. J. Surg.*, 59, 564 - 568 (1972).
- 42) Lundborg, H. & Hamberger, A.: Amino acid incorporation into liver proteins during extrahepatic cholestasis in the rat. *Europ. Surg. Res.*, 6, 95 - 109 (1974).
- 43) Lundborg, H. & Hamberger, A.: Synthesis and turnover of liver proteins during extrahepatic cholestasis in the rat. *Europ. Surg. Res.*, 6, 219 - 232 (1974).
- 44) Glaumann, H.: Studies on the synthesis and transport of albumin in microsomal subfractions from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 224, 206 - 218 (1970).
- 45) Perters, T. Jr.: The biosynthesis of rat serum albumin. II. Interacellular phenomena in the secretion of newly formed albumin. *J. Biol. Chem.*, 237, 1186 - 1189 (1962).
- 46) Hultin, T.: Incorporation in vivo of ¹⁵N - labeled Glycine into liver fractions of newly hatched chicks. *Exp. Cell Res.*, 1, 376 - 381 (1950).
- 47) Borsook, H., Deasy, C. L., Haagen - Smit, A. J., Keighley, G. & Lowy, P. H.: Metabolism of ¹⁴C - labeled glycine, L - histidine, L - leucine and L - lysine. *J. Biol. Chem.*, 187, 839 - 848 (1950).
- 48) Keller, E. B., Zamecnik, P. C. & Loftfield, R. B.: The role of microsomes in the incorporation of amino acids into proteins. *J. Histochem. Cytochem.*, 2, 378 - 386 (1954).
- 49) Siekevitz, P.: Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. *J. Biol. Chem.*, 195, 549 - 565 (1952).
- 50) Zamecnik, P. C. & Keller, E. B.: Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acid into protein. *J. Biol. Chem.*, 207, 337 - 354 (1954).
- 51) Redman, C. M.: The synthesis of serum protein on attached rather than free ribosomes of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 31, 845 - 850 (1968).
- 52) Peters, T. Jr.: The biosynthesis of rat serum albumin. I. Properties of rat albumin and its occurrence in liver cell fraction. *J. Biol. Chem.*, 237, 1181 - 1185 (1962).
- 53) Sargent, J. R. & Campbell, P. N.: The sequential synthesis of the polypeptide chain of serum albumin by the microsome fraction of rat liver. *Biochem. J.*, 96, 134 - 146 (1965).
- 54) Takagi, M. & Ogata, K.: Direct evidence for albumin biosynthesis by membrane bound polyosome in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 33, 55 - 60 (1968).
- 55) McFalarlane, A. S.: Measurement of synthesis rates of liverproduced plasma proteins. Bio-

- chem. J., 89, 277 - 290 (1963).
- 56) 水野義晴: アルブミンの代謝. 一肝硬変を中心して—最新医学, 20, 331 - 346 (1965).
- 57) Hasch, E., Jarnum, S. & Tygstrup, N.: Albumin synthesis rate as a measure of liver function in patients with cirrhosis. Acta Med. Scand., 182, 83 - 92 (1967).
- 58) Wilkinson, P. & Mendenhall, C. L.: Serum albumin turnover in normal subjects and patients with cirrhosis measured by ^{131}I -labelled human albumin. Clin. Sci., 25, 281 - 292 (1963).
- 59) 沢田憲志: 肝硬変におけるアルブミン代謝. 日内会誌, 54, 635 - 645 (1965).
- 60) 平山千里: 血清蛋白の肝性起源に関する研究 (VII) ヒト肝切片のアルブミンおよび γ -グロブリン生成能について. 日内会誌, 47, 1435 - 1441 (1959).
- 61) 平山千里: 血清蛋白の肝性起源に関する研究 (VIII) ヒト肝切片細胞分画へのグリシン-2- ^{14}C の転入. 日内会誌, 48, 1743 - 1751 (1960).
- 62) 平山千里, 長峯護, 右田俊介, 中島明, 久米只彦, 岸川注: 血清蛋白の肝性起源に関する研究 (VI) 障害肝切片のアルブミンおよび γ -グロブリン生成能について. 生化学, 30, 1049 - 1055 (1958).
- 63) 各務伸一: ^{14}C 標式重炭酸ソーダー法による四塩化炭素肝障害ラットのアルブミン合成能. 一摘出肝灌流法を用いて—日消会誌, 68, 383 - 393 (1971).
- 64) 金井弘一: 血清アルブミンの代謝, とくに病態肝における生合成について. 日内会誌, 54, 625 - 633 (1965).
- 65) Farber, E.: Ethionine carcinogenesis. IV. Actual biological effects. Adv. Cancer Res., 7, 385 - 414 (1963).
- 66) Stekol, J. A.: Biochemical basis for ethionine effects on tissue. Adv. Enzymol., 25, 369 - 393 (1963).
- 67) Smuckler, E. A., Iseki, O. A. & Benditt, E. D.: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbon tetrachloride. J. Exp. Med., 116, 55 - 72 (1962).
- 68) Reynolds, E. S.: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. J. Cell. Biol., 19, 139 - 157 (1963).
- 69) 山内英生: Morphometry からみた外科的黄疸肝の病態. 日外会誌, 75, 1174 - 1175 (1974).
- 70) Villa-Trevino, S., Shull, K. H. & Farber, E.: The role of adenosine triphosphate deficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis. J. Biol. Chem., 238, 1757 - 1763 (1963).
- 71) Ogata, K., Hirokawa, R. & Omori, S.: Incorporation of leucine into microsomal albumin by microsomes and pH 5 enzymes from normal rat liver. Biochem. Biophys. Acta, 40, 178 - 179 (1960).
- 72) Schaffner, F., Baccin, P. G., Hutterer, F., Scharnbeck, H. H., Sarkuzi, L. L., Denk, H. & Popper, H.: Mechanism of cholestasis. 4. Structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after bile duct ligation. Gastroenterology, 60, 888 - 897 (1971).
- 73) Jones, A. L., Schmacker, D. L., Mooney, J. S., Adler, R. D. & Ockner, R. K.: Morphometric analysis of rat hepatocytes after total biliary obstruction. Gastroenterology, 71, 1050 - 1060 (1976).
- 74) Sherlock, S.: Selection of biochemical tests, p42 - 43. IN S. Sherlock (ed.), Disease of the liver and biliary system, 5th ed. Blackwell scientific publications, Oxford, 1975.

Influence of Obstructive Jaundice on Protein Synthesis in Rat Liver Yoshiaki Isobe, Department of Surgery (II), (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., 91, 203—218 (1982)

Key words: Protein synthesis, Obstructive jaundice, Rat liver, Albumin synthesis.

Abstract

In order to study the effect of obstructive jaundice on liver protein, especially on albumin synthesis, the following experiments were performed. The bile ducts of rats were ligated to produce obstructive jaundice. Control experiments were made on the animals by simple laparotomy. ^3H -leucine (100 μCi) was given intraperitoneally seven days after the operation. At different intervals from 10 to 120 min. after the injection, the rats were killed and the livers were homogenized. The homogenates were fractionated into nuclear, mitochondrial, microsomal and supernatant fractions by differential centrifugation. The specific activity of ^3H -leucine was the highest in the microsomal fraction. The time course experiment showed that the incorporation of ^3H -leucine into the protein of liver homogenate reached a peak 30 min. after ^3H -leucine injection in both the groups. The similar tendency was observed in the microsomal and mitochondrial fractions of both the groups. The ^3H -radioactivity at the peak was significantly lower in the obstructive jaundice group. However, in the nuclear and supernatant fractions the peak at 30 min. was not observed and a significant difference in the incorporation of ^3H -leucine was not observed in both the groups. It was suggested that in obstructive jaundice the secretory protein synthesis was reduced in the microsomal fraction. The deoxycholate solubilized microsomal proteins were subjected to Ultro-gel Aca 54 column chromatography to analyse the distribution of ^3H -radioactivity in the constituent proteins. Four peaks due to ^3H -radioactivity were reproducibly observed in the animal of control experiment. The first peak eluted at void volume was considered to derive from membranous proteins. The second peak was due to ^3H -radioactivity in microsomal albumin. This was proved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The third peak corresponded to a protein (18K protein) with M.W.18,000 and isoelectric point 5.5. The fourth was caused by free ^3H -leucine. In the obstructive jaundice animal, the incorporation of ^3H -leucine into microsomal albumin was smaller and 18K protein was scarcely labeled. Additionally, in the obstructive jaundice animal, the incorporation of ^3H -leucine into serum albumin was lower than in the control animal. The results indicate that obstructive jaundice impairs significantly the synthesis of secretory protein, especially of albumin of liver cell, while that of non-secretory proteins is not greatly damaged.