

218 ジギトキシンとその代謝産物の分離精製法

東京都老人総合研究所 第一臨床生理

添川裕子, 太田 稔, 野久保宗孝, 木谷健一

臨床上用されるジギトキシン(DT₃)は肝代謝・胆汁内排泄を受けるとされ、その代謝に関して種々の研究が行われてきた。ヒトでは主として糖鎖の加水分解、12- β 位の水酸化(ジゴキシン系への移行)、抱合反応が知られている。今回我々は分離肝細胞及び胆汁からのDT₃とその代謝産物の分離精製法を検討し、それぞれの代謝産物を比較した。

ラット分離肝細胞は、酵素法(van Bezooijen, et al. Mech. Age. & Dev. 3: 107, 1974)によって調製し、これに³H-DT₃を加えて37°Cでインキュベートする。この反応液0.5 mlを3倍量のエタノール中に入れ遠心する。上清を濃縮乾燥後2 mlの水で3回溶解しアンバーライトXAD-2カラム(1×10cm)に吸着させ、20 mlの水で洗った後20 mlのエタノールで溶出させる。エタノール分画を濃縮乾燥後シリカゲルTLCを用い多段展開する(サイクロヘキサン:アセトン:酢酸[49:49:2]1回、イソプロピルエーテル:メタノール[6:1]4回)。ラジオクロマトスキャナーで各代謝産物の位置を確認した後各分画を液体シンチレーションカウンターで測定した。同様に、³H-DT₃投与ラットから採取した胆汁について分析した。

アンバーライトXAD-2カラムはDT₃とその抱合体を含む代謝物を試料水溶液から吸着するが水で洗うことにより塩類、糖類、蛋白質等の夾雑物は除かれる。エタノールによりDT₃とその代謝物はほぼ完全に溶出する。今回のTLC法は、ジゴキシン配糖体、ジゴキシン、DT₃の分離がやや困難であるが、原点(抱合体)、ジゴキシン(DG₃)、ジゴキシン二配糖体(DG₂)、DT₃、ジギトキシン二配糖体(DT₂)、ジギトキシン配糖体、ジギトキシンの各分画の分離精製が可能である。ウイスター系雄ラットの分離肝細胞とDT₃を60分インキュベートした場合DT₃の19%が代謝され、そのうち85%がDT₂であり、6%がDG₃、3%がDG₂であった。一方ウイスター系雄ラットにDT₃ 0.18 mg/100 g投与後60~120分に採取した胆汁中のDT₃とその代謝物のうち、44%がDG₃、22%がDG₂、10%がDT₃、17%が抱合体であった。

DT₃の代謝経路は、ラット分離肝細胞系ではアグリコンに結合している糖の加水分解が主であるのに対し、ラット生体中ではDT₃系からDG₃系への移行と抱合体の形成が主であった。今回用いた分析法はDT₃とその代謝産物が容易に効率良く抽出される事を始めとしステップが短く、代謝物相互の分離も従来法に比べ優れており、分離精製法として有用であると思われる。

219 肝細胞の有機陰イオン摂取機構の研究

一可溶性膜蛋白と有機陰イオンとの結合について—
丹野宗彦*, 山田英夫**, 戸張千年**, 千葉一夫*

川口新一郎*, 村田啓**, 飯尾正宏**

*慈恵医大青戸分院内科 **都養育院付属病院核放部

目的: 有機陰イオンで摂取される為には、従来よりリガンドが肝細胞膜にあるキャリアーと先ず結合する可能性が考えられている。いわゆるmembrane carrier-mediated Transport が考えられている。この点を解明する為、我々は血清蛋白と肝細胞膜との間における色素の結合能につき¹²⁵I-T-BSP, ³⁵S-S-BSPを用いて検討を加えてきた。その結果、この結合の特徴には可逆性、飽和性のみとめられ、肝細胞膜には、少くとも二種類以上の結合恒数と結合数を有する部位があることが分かった。そこでこの結合蛋白の肝細胞の局在、臓器分布等を明らかにする為には、肝細胞膜蛋白の分離、精製を行う必要がある。肝細胞膜蛋白を分離する為に肝細胞膜可溶性の基礎的検討を試みた。

方法: 肝細胞膜の採取方法及び確認は既に報告した。肝細胞膜の可溶性には、トリプシン、deoxycholic acid, Triton X-100を使用した。可溶性の方法は、肝細胞膜に一定量のdetergentを加え、37°C、30分間インキュベーション、その後3分間超音波処理し、100,000g、60分間遠心しその上清を可溶性蛋白とした。可溶性膜蛋白に¹²⁵I-T-BSP, ³⁵S-S-BSPを加え、Sephadex G 75, Phenyl-Sephadexで溶出させ、BSP結合能を検討した。また種々の有機陰イオンを加え溶出させ、BSPとの競合につき検討した。

結果: トリプシン処理による可溶性膜蛋白をTRIS-HCl 0.05M+0.9%NaCl(pH7.5)で平衡化させたSephadex Gで溶出させると、3つのピークを有する蛋白の溶出曲線が得られた。¹²⁵I-T-BSPの結合曲線より、3番目のピークに最も高い蛋白濃度当りのカウントを示した。0.2%DOCにより平衡化させたカラムで溶出させると3つのピークを有する蛋白の溶出曲線を認めた。³⁵S-S-BSPの結合曲線では2番目に蛋白濃度当り最も高いカウントを示し、そのピークはずれがみられた。

結語: 可溶性膜蛋白による溶出曲線は、detergentの種類、そのdetergentの添加量によって異なる。しかし、BSPの結合曲線を見ると、有機陰イオンと特異的に結合力が高い可溶性膜蛋白があることが証明された。