

《原 著》

アシアロ糖タンパク—アシアロ糖タンパク受容体系を
応用した新しい肝機能検査法の開発—第3報 ^{99m}Tc 標識ネオ糖タンパククリアランス曲線解析に
よる肝機能検査法の検討—

羽間 弘*	河 相吉**	久保田佳嗣*	小島 通真**
村瀬登志彦*	奥野 裕康*	内藤 雄二*	西山 豊**
鷲野 弘明****	長谷川武夫**	沢村 隆也*	田代 裕***
田中 敬正**	塩崎 安子*	鮫島 美子*	

要旨 アシアロ糖タンパク—アシアロ糖タンパク受容体系を応用した肝シンチグラフィーによる新しい肝機能検査法の有用性を検討した。アシアロ糖タンパクと生理的に等価に肝細胞に取り込まれる合成ネオ糖タンパクを、 ^{99m}Tc で標識し、ガラクトサミン急性肝障害および CCl_4 慢性肝障害ラットに $50\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ 体重を投与し、肝シンチグラフィーにより、クリアランス曲線を作製した。ついで、肝クリアランスならびに受容体活性が、急性肝障害では血清 GOT 値、コレステロールエステル比 (E/T 比)、慢性肝障害については肝 hydroxy proline (Hyp) 含量、薬物代謝酵素含量との関係を検索した。また、急性および慢性肝障害における、肝クリアランスと受容体活性の関係を比較検討し、以下の成績を得た。

すなわち、肝障害時には、 ^{99m}Tc ネオ糖タンパククリアランスの延長と受容体活性の低下がみられるが、これらは、急性肝障害では GOT の上昇および E/T 比の低下と、慢性肝障害においては肝 Hyp 含量の増加および cytochrome P₄₅₀, cytochrome b₅ 含量の減少と密に関連した。また、肝障害時の肝クリアランスは、受容体活性に規定されて変動することが明らかとなった。

以上により ^{99m}Tc ネオ糖タンパククリアランス曲線解析による肝クリアランスの測定は、肝障害度を鋭敏に反映する新しい肝機能検査法になると考える。

I. はじめに

アシアロ糖タンパク (asialoglycoprotein: ASGP) は、血清糖タンパクの糖鎖非還元末端のシアル酸がはずれ、末端にガラクトース残基が露

出した糖タンパクである。この ASGP の糖鎖末端を識別する受容体(レクチン)が肝細胞膜に存在し、ASGP は受容体を介して肝臓に特異的に取り込まれる、いわゆるクリアランス現象が報告されている^{1,2)}。

今回われわれは、ASGP と生理的に等価である合成糖タンパクのネオ糖タンパク (galactosyl human serum albumin: GHSA)³⁾ に、 ^{99m}Tc を標識し、ガラクトサミン急性肝障害と CCl_4 慢性肝障害ラット血中に投与して、肝シンチグラフィーにより肝クリアランスを測定した。また、肝クリアランスと ASGP 受容体活性、および急性肝障害では血清 GOT、コレステロールエステル比 (E/

* 関西医科大学第三内科

** 同 放射線科

*** 同 第一生理

**** 日本メジフィジックス社

受付: 60 年 12 月 12 日

最終稿受付: 61 年 4 月 8 日

別刷請求先: 大阪府守口市文園町 1 (☎ 570)

関西医科大学第三内科

羽 間 弘

T 比) と, 慢性肝障害においては肝 hydroxy proline (Hyp) 含量, cytochrome P₄₅₀ (P₄₅₀), cytochrome b₅ (b₅) 含量との関係について検討した。

II. 対象および方法

(1) ネオ糖タンパクの ^{99m}Tc および ¹²⁵I の標識

ガラクトースを, ヒト血清アルブミンにカップリングさせた GHSA を使用し⁴⁾, ^{99m}Tc は SnCl₄ を還元剤として標識した⁵⁾。また, ¹²⁵I はクロミン T 法⁶⁾ にて標識した。なお, 本実験ではガラクトース/アルブミンのモル比が 32 のものを使用した。

(2) ASGP 受容体活性, 薬物代謝酵素活性および Hyp 肝含量の測定

ASGP 受容体活性は, Ehrenreich らの方法⁷⁾ により, total microsome 分画を抽出後, Hudgin らの Assay-A 法⁸⁾ に準じ ¹²⁵I-GHSA を用いて, competitive radioreceptor assay により測定した⁵⁾。

P₄₅₀ は Omura, Sato の方法⁹⁾ により, b₅ は Omura, Takesue の方法¹⁰⁾ により測定した。

肝 Hyp 含量は Blumenkranz らの方法¹¹⁾ により測定した。

(3) ガラクトサミン急性肝障害

ウィスター系雄性ラット, 体重 200 g に, D-ガラクトサミン 0.5~0.9 g/kg 体重を腹腔内に 1 回投与し, 投与後 48 時間目にエーテル麻酔下に ^{99m}Tc-GHSA 50 μg/100 g 体重を頸静脈より急速静注し, デジタル γ カメラ東芝 GCA-90B によりシンチカメラ画像を記録した。

その後, 十分に瀉血したのち肝を採取, 1.15% 冷 KCl により灌流, total microsome 分画を抽出し, ASGP 受容体活性を測定した。

また, 血清 GOT 値および E/T 比も測定した。

(4) CCl₄ 慢性肝障害

ウィスター系雄性ラット, 体重 200~220 g に, CCl₄・オリーブ油等量混合液 0.2 ml/100 g 体重, 週 2 回, 3~4 か月間皮下注射し, 投与中止後 5 日目に ^{99m}Tc-GHSA 50 μg/100 g 体重を頸静脈より注入してシンチグラフィーを記録した。その後,

肝を採取し, 氷温の TKM (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂) で homogenate した後, サンプルを 2 分し, 1 方より ASGP 受容体および P₄₅₀, b₅ を, 他方より肝 Hyp 含量を測定した。

(5) ^{99m}Tc-GHSA クリアランス曲線

シンチカメラ画像の心肝に関心領域を設定し, おおのの関心領域の各フレームの放射活性の変化を示す, クリアランス曲線を作製した。心および肝クリアランス曲線は, さきに報告したごとく¹²⁾, two compartment model により心消失率 K_d, 肝摂取率 K_u を求め, また, 肝クリアランス曲線がピークに達する時間を T_{max} とし, K_d, K_u, T_{max} を ^{99m}Tc-GHSA クリアランス速度のパラメータとした (Fig. 1)。また, 理論曲線の各計測曲線に対するあてはめを行った。

III. 結 果

(1) 計測曲線と理論曲線のあてはめ

Figure 2 に正常, 急性および慢性肝障害における心肝クリアランス曲線を, その理論曲線とともに示した。理論式に基づく理論曲線は, 各計測曲線に対しすぐれた適合性を示し, ^{99m}Tc-GHSA クリアランス曲線に対する各パラメータの妥当性を証明した。

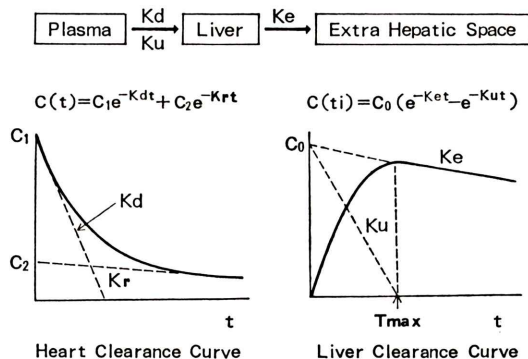


Fig. 1 Heart and liver clearance curves of ^{99m}Tc-GHSA. These curves were analyzed by the two-compartment model.

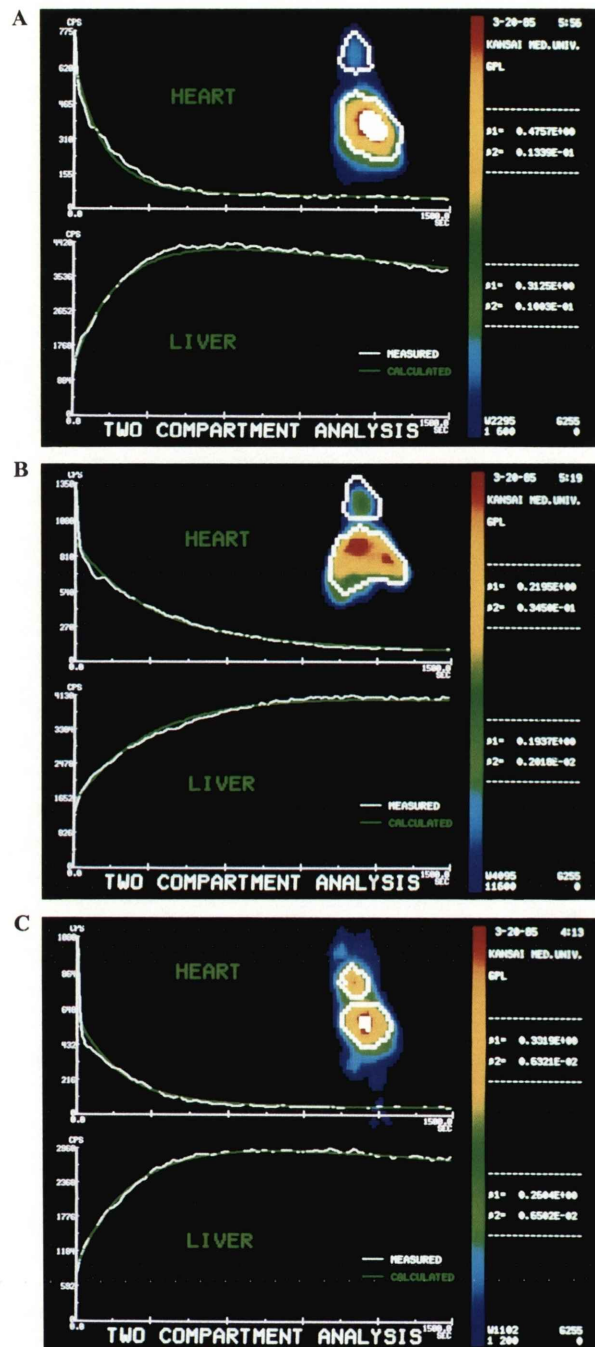


Fig. 2 Representative heart and liver clearance curves of ^{99m}Tc -GHSA in various liver diseases. White and green curves demonstrate the measured and calculated curves respectively. A: normal rat. B: acute hepatopathy. C: chronic hepatopathy.

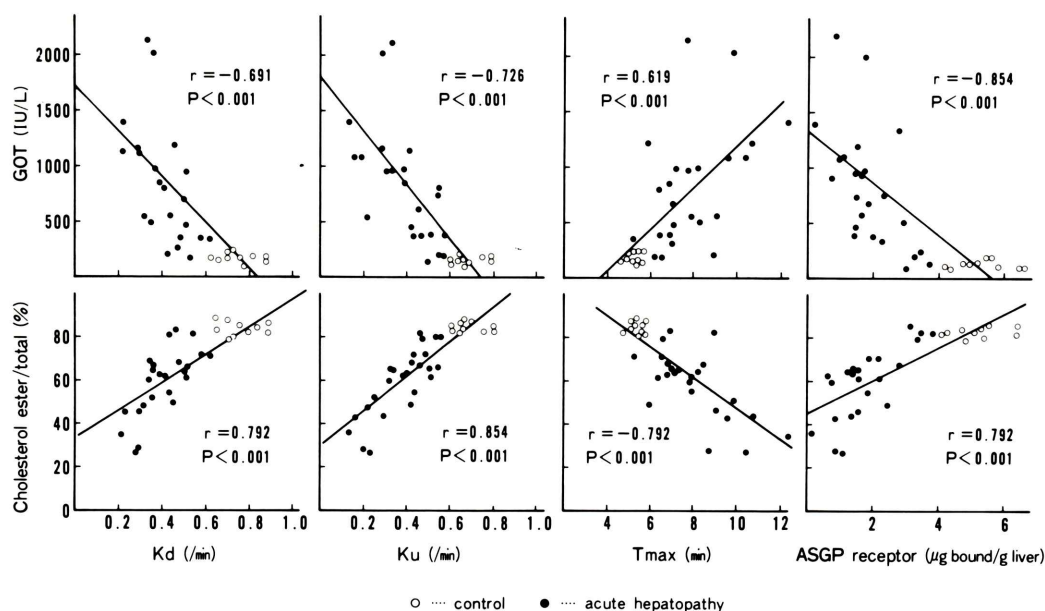


Fig. 3 Relationship among the parameters (K_d , K_u and T_{max}), the ASGP receptor activities, the serum GOT and the serum ratio of esterified cholesterol in the rats with D-galactosamine induced acute liver disorder. The livers were homogenized, and the total microsomal fractions were prepared according to Ehrenreich, et al⁷⁾. The ASGP receptor activities were determined by discribed previously⁵⁾.

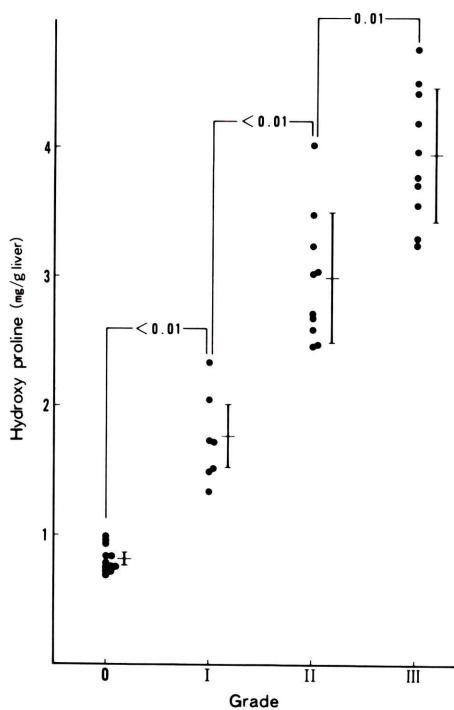


Fig. 4 Relationship between the development of morphological hepatic fibrosis and the content of liver hydroxyproline in the rats with CCl_4 induced chronic liver disorder.
 Grade 0: No increase of connective tissue
 Grade I: Slight increase of connective tissue
 Grade II: Obvious increase of connective tissue
 Grade III: Pseudolobules were formed

(2) 急性肝障害における ^{99m}Tc -GHSA クリアランスならびに ASGP 受容体活性と、血清 GOT 値および E/T 比との関係

急性肝障害について、パラメータ K_d , K_u , T_{\max} ならびに ASGP 受容体活性と、血清 GOT 値、E/T 比との関係を検討した。

Figure 3 に示すように、血清 GOT 値と K_d , K_u , T_{\max} 間の相関係数は、GOT K_d 間は -0.691 , GOT K_u 間は -0.726 , GOT T_{\max} 間は 0.619 であり、GOT 値と ASGP 受容体活性間の相関係数は、 -0.854 と、いずれも 0.1% 以下の危険率で有意に相関した。

血清 E/T 比と K_d , K_u , T_{\max} 間の相関係数は、E/T 比 K_d 間は 0.792 , E/T 比 K_u 間は 0.854 , E/T 比 T_{\max} 間は -0.792 . E/T 比と ASGP 受容体活性間の相関係数は 0.792 といずれも 0.1% 以下の危険率で有意の相関関係が成立した。

以上 ^{99m}Tc -GHSA クリアランスならびに ASGP 受容体活性は、急性肝障害においては、肝細胞障害度および肝合成能の低下を、よく反映すると考えられた。

(3) 慢性肝障害における ^{99m}Tc -GHSA クリアランスならびに ASGP 受容体活性と、肝 Hyp 含量との関係

慢性肝障害においては、肝線維化進行による残存肝細胞の減少に伴い、ASGP 受容体活性が低下すると考えられるため、肝線維化進行に伴う ^{99m}Tc -GHSA クリアランスおよび ASGP 受容体活性の変動を検索した。

肝線維化進行度の指標としては、コラーゲンに特異的なアミノ酸である Hyp の肝湿重量 1g 当たりの含有量を測定した。

同一検体について、肝 Hyp 含有量と組織学的に見た肝線維化進行度とを対比したものを Fig. 4 に示す。組織学的には、ヘマトキシリン・ワンギーソン染色による光顕組織切片により観察した間質の膠原線維増生度により、0~III 度に分類した。すなわち、結合組織の増加が全く見られないものを 0 度。中心静脈やグリソン鞘に軽度の線維化が見られるものを I 度。中心静脈やグリソン鞘に明瞭な線維化が見られるものを II 度。偽小葉を形成しているものを III 度とした。Hyp 含量を各群

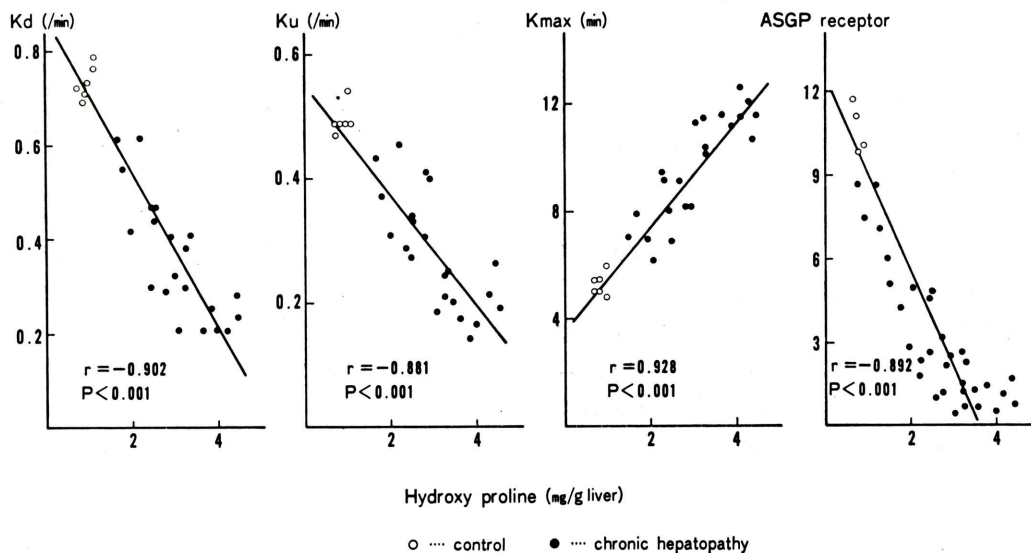


Fig. 5 Relationship among the content of liver hydroxyproline, the parameters, and the ASGP receptor activities, rats with CCl_4 induced chronic liver disorder. Hydroxyproline content was assayed as described Blumenkranz, et al¹¹⁾.

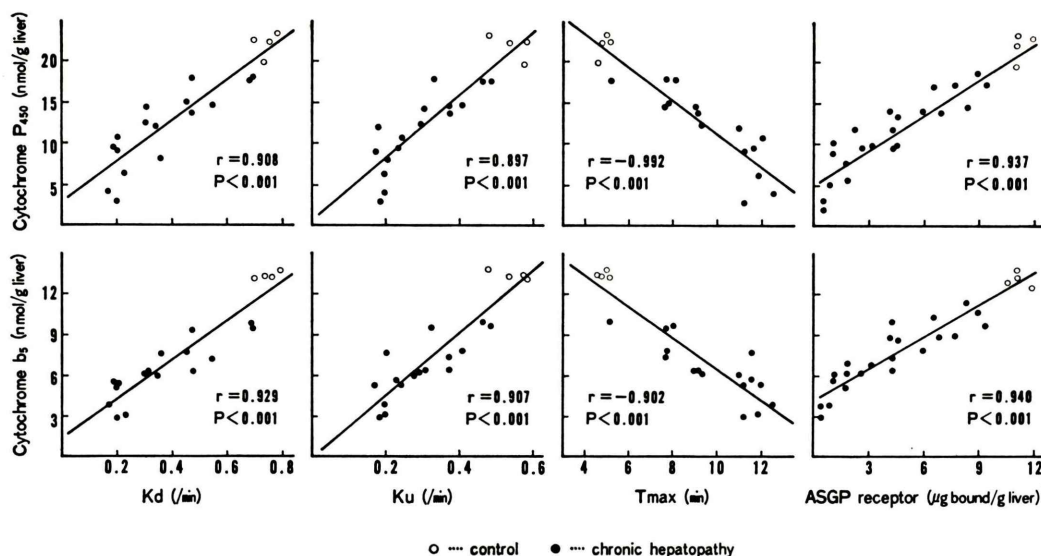


Fig. 6 Relationship among the parameters, the ASGP receptor activities, and the amount of the drug metabolised enzyme, cytochrome P-450, cytochrome b₅ in the rats with CCl₄-induced chronic liver disorder. The amount of cytochrome P-450 and cytochrome b₅ were determined as described by Omura and Sato⁹⁾ and Omura and Takesue¹⁰⁾ respectively.

ごとにプロットし、おのおのの平均値と標準偏差を求めたところ、各群間には1%以下の危険率で有意差が認められたので、肝Hyp含量は、肝線維化進行度を鋭敏に反映する指標であると考えられた。

この肝Hyp含量と、^{99m}Tc-GHSA クリアランスパラメータならびにASGP受容体活性との関係を比較検討したものをFig. 5に示した。おのおのの相関係数は、Hyp K_d間は-0.902, Hyp K_u間は-0.881, Hyp T_{max}間は0.928, Hyp ASGP受容体間は-0.892といずれも0.1%以下の危険率で有意の相関関係が成立した。

以上により、^{99m}Tc-GHSA クリアランスならびにASGP受容体活性は、慢性肝障害においては、肝線維化の進行をよく反映し、線維化進行に伴う残存肝細胞の減少に一致して変動すると考えられた。

(4) 慢性肝障害における^{99m}Tc-GHSA クリアランスならびにASGP受容体活性と、P₄₅₀およびb₅含量との関係

慢性肝障害については、肝代謝能の指標として、

P₄₅₀, b₅の1g肝湿重量当たりの含有量を測定し、^{99m}Tc-GHSA クリアランスならびにASGP受容体活性との関係を検索した(Fig. 6)。P₄₅₀とパラメータK_d, K_u, T_{max}およびASGP受容体活性間の相関係数は、P₄₅₀ K_d間は0.908, P₄₅₀ K_u間は0.897, P₄₅₀ T_{max}間は-0.992, P₄₅₀ ASGP受容体間は0.937。また、b₅とK_d, K_u, T_{max}およびASGP受容体活性間の相関係数は、b₅ K_d間は0.929, b₅ K_u間は0.907, b₅ T_{max}間は-0.902, b₅ ASGP受容体間は0.940と、いずれも0.1%以下の危険率で有意の相関関係が成立した。

以上により、^{99m}Tc-GHSA クリアランスならびにASGP受容体活性は、慢性肝障害においては、肝代謝能の低下とも良く一致する成績を示した。

(5) 急性および慢性肝障害における^{99m}Tc-GHSA クリアランスとASGP受容体活性の関係

急性肝障害では、^{99m}Tc-GHSA クリアランスの延長が、ASGP受容体活性の低下に規定されていることはすでに報告したが¹²⁾、今回は、慢性肝障害における^{99m}Tc-GHSA クリアランスと、ASGP

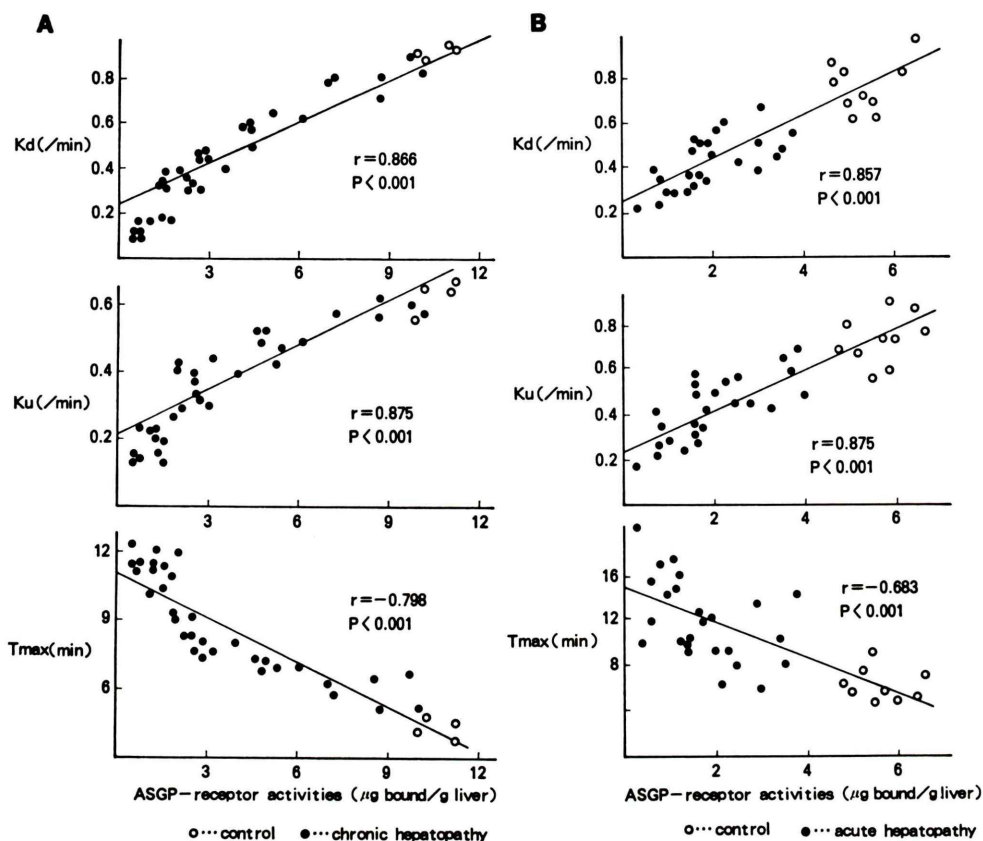


Fig. 7 Relationship between the ASGP receptor activities and the parameters in the rats with chronic hepatopathy (Fig. 7A) and in those with acute hepatopathy (Fig. 7B).

受容体活性との関係を検索し、さきに報告した急性肝障害における成績と比較検討した。

Figure 7-(A) に、慢性肝障害におけるクリアランスと ASGP 受容体活性との関係を、Fig. 7-(B) に、急性肝障害におけるクリアランスと受容体活性の関係を示した。慢性肝障害におけるクリアランスパラメータ K_d , K_u , T_{\max} と ASGP 受容体活性間の相関係数は、 K_d 受容体間には 0.866, K_u 受容体間には 0.875, T_{\max} 受容体間には -0.798 と、いずれも 0.1% 以下の危険率で有意に相関した。急性肝障害における各パラメータが、ASGP 受容体活性の低下に伴って linear に変動したのに対し、慢性肝障害では、ASGP 受容体活性が $4 \mu\text{g}$

bound/g 肝を境にして 2 相性に変動し、ASGP 受容体活性が $4 \mu\text{g bound/g}$ 肝以下に低下するとともに、クリアランスの急速な延長が認められた。

IV. 考 案

Ashwell らにより、ASGP-ASGP 受容体系が報告されて以来、種々の疾患患者について血中 ASGP が測定され、肝疾患患者では特異的に血中 ASGP の上昇が認められることが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。沢村らは、肝疾患にみられる高 ASGP 血症の原因を究明するために、ガラクトサミン急性肝障害ラットについて、血中 ASGP 量、ASGP 受容体活性を測定し、また、 ^{125}I 標識 ASGP ク

リアランスを経日的に観察した結果、血中 ASGP の上昇と ASGP 受容体活性の減少が、ほぼ鏡像を呈して変動し、血中 ASGP の減少時にはクリアランスが遅延することを証明した。この成績により彼は、高 ASGP 血症は ASGP 受容体活性が減少し、ASGP クリアランスが延長する結果、血中に ASGP が蓄積するためであると推察した¹⁶⁾。さらに彼は、種々の肝疾患患者において、ASGP 受容体活性が、急性肝疾患患者においては、血清 GOT, GPT, LDH, ビリルビンの上昇、総コレステロール、E/T 比の低下、プロトロンビン時間の延長と、また、慢性肝疾患患者においては、ICGR₁₅ の停滞、血清コリンエステラーゼ、E/T 比アルブミンの低下と、密に関連することを報告した^{17,18)}。さらに、肝癌患者において、CT スキャンで測定した癌部の肝内占有率の増加に一致して、血清 ASGP が上昇することを明らかにした¹⁹⁾。これらの成績は、種々の肝疾患に際し、ASGP 受容体活性が、急性肝疾患では肝細胞障害度と、慢性肝疾患および肝癌においては肝残存能もしくは肝残存重量と一致して変動し、それが ASGP クリアランスの変動に正確に反映されることを示唆するものである。

今回は、ASGP と等価に ASGP 受容体に結合し肝臓に取り込まれる GHSA を利用して、ラット急性および慢性肝障害における ^{99m}Tc-GHSA クリアランスならびに ASGP 受容体活性を測定し、それらが、急性肝障害では肝細胞障害度を、また慢性肝障害では肝線維化進行度および肝代謝能の低下を鋭敏に反映することを証明し、^{99m}Tc-GHSA クリアランス測定が、種々の肝疾患の重症度判定の指標として有用であることを明らかにした。

今回、^{99m}Tc-GHSA クリアランスのパラメータとした K_d , K_u は比例恒数であり、fractional clearance すなわち、単位時間 (1 分間) に、ラジオアイソトープが肝に除去される血液量の、全血液量 (V) に対する割合を表わす。すなわち、有効肝血流量を F、肝除去率を E とすると、 $K_d(K_u)=F \times E/V$ となり、肝除去率 E は先に述べたごとく¹²⁾

ASGP 受容体活性に一致して変動すると推定される。慢性肝障害における肝病変が肝硬変にまで進展すると、有効肝血流量が減少することは良く知られているが、本実験の慢性肝障害においても、パラメータが ASGP 受容体活性 $4 \mu\text{g bound/g}$ 肝を境にして 2 相性に変動した。この理由としては、ASGP 受容体活性が $4 \mu\text{g bound/g}$ 肝以下の重症慢性肝障害では、ASGP 受容体活性低下に伴う肝除去率の低下に加え、有効肝血流量が急速に減少することによると推測した。すなわち、先に述べた組織学的線維化進行度と対比させると、明瞭に膠原線維の増生が見られた grade II の状態より、grade III の偽小葉に改築されてゆく過程における有効肝血流量の減少が著しいと考えられた。

今回は、ラットという小動物を対象に行った実験であり、関心領域設定による肝の各部についての評価や、multicompartment analysis による信憑性のある肝血流の評価は困難であった。しかし本法は形態と機能の情報が同時に得られる検査法であり、SPECT を使用することにより、より詳細な局所肝機能の評価が可能であると考えられる。

文 献

- 1) Ashwell G, Morell AG: The role of surface carbohydrates in the rat hepatic recognition and transport of circulating glycoprotein. *Adv Enzymol* **41**: 99-128, 1974
- 2) 田代 裕, 沢村隆也, 中田 博, 他: 肝のアシアロ糖蛋白質の取り込みとその異常. *代謝* **20**: 49-60, 1983
- 3) Stowell CP, Lee YC: Neoglycoproteins: The preparation and application of synthetic glycoproteins. *Adv in Carbohydr Chem Biochem* **37**: 225-281, 1980
- 4) Stowell CP, Lee YC: Neoglycoproteins: The preparation and application of synthetic glycoproteins. *Adv in Carbohydr Chem Biochem* **37**: 225-281, 1980
- 5) 久保田佳嗣, 小島通真, 羽間 弘, 他: アシアロ糖タンパク-アシアロ糖タンパク受容体系を応用した新しい肝機能検査法の開発——第 1 報 ^{99m}Tc ネオ糖タンパクによる肝イメージングの検討——. *核医学* **23**: 899-905, 1986
- 6) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone

- of high specific specific radioactivity. *Biochem J* **89**: 114–123, 1963
- 7) Ehrenreich JH, Bergeron JJM, Siekevitz P, et al: Gorgi fractions prepared from rat liver homogenates: I. Isolation procedure and morphological characterization. *J Cell Biol* **59**: 45–72, 1973
 - 8) Hudgin RL, Pricer W, Ashwell G: The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* **249**: 5536–5543, 1974
 - 9) Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* **239**: 2370–2385, 1964
 - 10) Omura T, Takesue S: A new method for simultaneous purification of cytochrom b₅ and NADPH-cytochrome C reductase from rat liver microsomes. *Biochem J* **67**: 249–257, 1970
 - 11) Blumenkranz N, Asboe-Hansen G: A quick and specific assay for hydroxyproline. *Anal Biochem* **55**: 288–291, 1973
 - 12) 河 相吉, 羽間 弘, 久保田佳嗣, 他: アシアロ糖タンパク—アシアロ糖タンパク受容体系を応用した新しい肝機能検査法の開発——第2報 標識ネオ糖タンパクのクリアランス定量性における検討——. *核医学* **23**: 907–916, 1986
 - 13) Arima T, Motoyama Y, Yamamoto T, et al: Serum glycoproteins in the liver diseases: III desialated glycoproteins in the acute hepatitis. *Gastroenterol Jpn* **12**: 39–42, 1977
 - 14) Arima T: Serum Glycoproteins in the liver diseases: VIII desialated glycoproteins in the liver cirrhosis. *Gastroenterol Jpn* **14**: 349–352, 1979
 - 15) Sobue G, Kosaka A: Asialoglycoproteinemia in a case of primary hepatic cancer. *Hepatogastroenterol* **27**: 200–203, 1980
 - 16) Sawamura T, Kawasato S, Shiozaki Y, et al: Decrease of a hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins in galactosamine-treated rats. *Gastroenterology* **81**: 527–533, 1981
 - 17) Sawamura T, Kawasato S, Tsuda M, et al: Hyperasialoglycoproteinemia in acute liver diseases. *J Kansai Med Univ* **36**: 148–154, 1984
 - 18) Sawamura T, Kawasato S, Tsuda M, et al: Clinical application of the measurement of serum asialoglycoproteins to estimate residual liver function in patients with chronic liver diseases with or without hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Jpn* **20**: 203–208, 1985
 - 19) Sawamura T, Nakada H, Hazama H, et al: Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. *Gastroenterology* **87**: 1217–1221, 1984

Summary

A New Liver Function Test Using the Asialoglycoprotein-receptor System on the Liver Cell Membrane: III. Evaluation for Usefulness by Liver Function Test Using the Tc-99m-Neoglycoprotein

Hiroshi HAZAMA*, Soukichi KAWA**, Yoshitsugu KUBOTA*, Michimasa KOJIMA**, Toshihiko MURASE*, Hiroyasu OKUNO*, Yuji NAITOH*, Yutaka NISHIYAMA**, Koumei WASHINO****, Takeo HASEGAWA**, Takaya SAWAMURA*, Yutaka TASHIRO***, Yoshimasa TANAKA**, Yasuko SHIOZAKI* and Yoshiko SAMESHIMA*

**The Third Department of Internal Medicine, **Department of Radiology,*

****The First Department of Physiology, Kansai Medical University*

*****Nihon Medi-Physics Co., Ltd.*

We evaluated the validity of a new liver function test using liver scintigraphy based on the asialoglycoprotein (ASGP) receptor system on the liver cell membrane in rats with galactosamine-induced acute liver disorder and those with carbon tetrachloride-induced chronic liver disorder.

Neoglycoprotein (GHSA) produced by combining human serum albumin with 32 galactose units was labeled with ^{99m}Tc and administered (50 μg /100 g body weight) to rats with acute or chronic liver disorder. Clearance curves were produced based on liver scintigrams and analysed using the two-compartment model to obtain parameters.

In acute liver disorder, the prolongation of ^{99m}Tc -GHSA clearance and the decrease in ASGP receptor activities correlated well to the increase in serum GOT and the decrease in the esterified to total cholesterol ratio (E/T ratio); in chronic

liver disorder, they correlated significantly to the increase in the content of liver hydroxyproline (Hyp) which increased in proportion to the severity of liver fibrosis studied histologically, and to the decrease in the contents of cytochrome P-450 and cytochrome b_5 in liver microsomes. Significant correlation was observed between the prolongation of ^{99m}Tc -GHSA clearance and the decrease in ASGP receptor activities in both acute and chronic liver disorders.

These findings indicate that the measurement of ^{99m}Tc -GHSA clearance can be a new liver function test sensitively reflecting the severity of liver damage.

Key words: Liver function test, Asialoglycoprotein, Asialoglycoprotein receptor, Neoglycoprotein, Liver scintigraphy.