

胆汁酸の肝細胞膜輸送に及ぼすグルカゴンの影響

奈良県立医科大学第3内科学教室

久保良一

EFFECT OF GLUCAGON ON THE MEMBRANE TRANSPORT OF BILE ACID IN HEPATOCYTES

RYOICHI KUBO

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received March 30, 1994

Abstract: We have found that serum total bile acid (TBA) levels decreased in some patients with liver cirrhosis after intravenous administration of 1 mg glucagon. In the present study, the mechanism of this phenomenon was investigated in vitro using the hepatocyte culture system. The effect of the addition of glucagon on the membrane transport of ^{14}C -taurocholic acid (^{14}C -TCA) was studied in freshly isolated rat hepatocytes. The results were as follows:

1) Glucagon distinctly stimulated the release of cyclic AMP from hepatocytes in the standard medium.

2) Glucagon enhanced ^{14}C -TCA uptake by hepatocytes in a concentration-dependent manner between 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L.

3) Dibutyl cyclic AMP also enhanced the ^{14}C -TCA uptake at the concentration of 10^{-5} or 2×10^{-5} mol/L.

4) The uptake curves of ^{14}C -TCA by hepatocytes both with and without glucagon (10^{-6} mol/L) were linear until 120 seconds and reached a constant value by 900 seconds in the standard medium. However, in the Na^+ -free medium or in the ouabain-added standard medium, the uptakes were strongly depressed either with or without an addition of glucagon.

5) In a kinetic analysis, the hepatocytes uptake of ^{14}C -TCA either with or without glucagon showed a saturation curve of the Michaelis - Menten type. With an addition of glucagon V_{max} was increased, although the K_m was unchanged.

In conclusion, glucagon promoted the Na^+ -dependent active carrier-mediated transport in hepatocytes and increased their bile acids uptake.

Index Terms

glucagon, bile acid, hepatocellular membrane transport

緒言

空腹時血清総胆汁酸の測定は、肝疾患のスクリーニング検査の一つとして確立されており、内因性および外因性胆汁酸負荷試験における血清胆汁酸の動態の検討は、

肝予備能検査として臨床応用されている¹⁾²⁾。肝硬変では空腹時血清総胆汁酸値はほとんど全ての症例で上昇しており、その上昇の程度は非代償性肝硬変の方が代償性肝硬変より著しいといわれている³⁾。このような血中胆汁酸上昇の機序については、肝細胞による胆汁酸の取り込

みの低下、門脈一大循環短絡、および有効肝血流量の低下などが考えられている。

ところで、最近当教室の山田⁴⁾らは肝疾患におけるグルカゴン負荷試験⁵⁾に際し、従来から測定されてきた cyclic AMP に加えて血清総胆汁酸(TBA)の変化を検討したところ、高値を示していた TBA が、グルカゴン静注後減少する症例のあることに気づき、さらに、肝硬変においてグルカゴン負荷後の血清胆汁酸変化率が、ICG 停滞率やコリンエステラーゼなどと強い相関関係を示したことから、グルカゴン負荷後の血清胆汁酸変化率が肝予備能の新たな指標と成り得ることを報告した。

著者はこのグルカゴン投与時の、TBA 減少の機序を知る目的で、ラット分離肝細胞を用いた実験を行い、肝細胞における胆汁酸取り込みに対して、グルカゴンが促進作用を示すことを明らかにしたので報告する。

対象および方法

1. 実験動物

体重約 200 g の Sprague-Dowly 雄性ラット (SLC, 浜松) を用い、実験前 2 週間はオリエンタル標準固形食飼料により、室温 23°C、湿度 60% の定環境下で飼育した。また、実験前夜午後 8 時から絶食とした。

2. ラット分離肝細胞作製法

ラット腹腔内に pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) を 25 mg/kg 体重投与して麻酔後開腹した。肝細胞の分離は Berry and Friend の方法⁶⁾を一部変更したコラゲナーゼ灌流法により行なった。すなわち、開腹後門脈に 21 ゲージのカニューレを挿入し、0.5 mmol/L の ethylene glycol bis-n,n,n',n'-tetraacetic acid を含む Dulbecco の Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free PBS (37°C, pH 7.4) を用いて毎分 12 ml の流速で肝を前灌流し、直ちに腹部大動脈を切断した。肝臓が十分脱血されたことを確認後、腹部下大静脈断端を結紮し、右心房より胸部下大静脈にカニューレを挿入し回路を設置した。次いで灌流液を collagenase type I (Sigma, St. Louis, USA) 0.05% と CaCl₂ 10 mmol/L を含む Hanks 液に変更し、さらに約 15 分間灌流した。灌流終了後肝臓を切除し、シャーレに移し、ハサミで細切した後軽くピペッティングを行い、ガーゼを重ねた径 48 mm 150 mesh 金属フィルターで濾過した。得られた肝細胞粗分画浮遊液を 4°C で 50×G、2 分間、計 3 回低速遠心分離し、肝実質細胞を得た。分離肝細胞の viability はトリバンブルー試験を用いて検討し、90% 以上であることを確認後、種々の緩衝液を用いて分離肝細胞を 1×10⁶ cells/ml の濃度になるように調整し実験に供した。なお、実験はすべて

細胞分離後 2 時間以内に終了するようにしたが、分離 2 時間後の viability は不変であった。

3. 緩衝液

standard medium の組成は、NaCl : 135 mmol/L, KCl : 2 mmol/L, KH₂PO₄ : 3 mmol/L, CaCl₂ : 0.3 mmol/L, MgSO₄ : 1 mmol/L, Tris-HCl : 10 mmol/L (pH 7.4) である。また、standard medium の NaCl を完全に choline chloride に置換したものを、Na⁺ free medium とした。さらに、Na⁺, K⁺-ATPase 阻害剤として ouabain (E, Merck AG, Darmstadt, Germany) 1 mmol/L や蛋白合成阻害剤である cycloheximide 1 mmol/L を standard medium に添加し、その影響を検討した。なお緩衝液作製に用いた試薬はすべて半井化学薬品(京都)から購入した。

4. グルカゴンによる肝細胞 cyclic AMP 産生能の検討
standard medium で作製した肝細胞浮遊液 (1×10⁶ cells/ml) に、グルカゴン (Novo, Bagsvaerd, Denmark) を終濃度 1×10⁻⁶ mol/L となるように添加し、37°C の条件下で incubation した。15 分後および 30 分後に細胞浮遊液の一部を採取し、培養液中に分泌された cyclic AMP 濃度を radioimmunoassay キット (Yamasa)⁷⁾ を用いて測定した。

5. 肝細胞の胆汁酸摂取に及ぼすグルカゴンの影響

グルカゴン添加濃度と肝細胞の ¹⁴C-taurocholic acid (¹⁴C-TCA) 摂取量との関係を検討するため、standard medium に終濃度が 10⁻⁷, 10⁻⁶, または 10⁻⁵ mol/L になるようにグルカゴンを添加し、5 分後に ¹⁴C-TCA (1 μmol/L, New England Nuclear Research Products, Boston, USA, 40-60 mCi/mmol) を添加して、37°C, 120 strokes/min の振盪下で反応を進め、15 分後に反応を停止させ、肝細胞の ¹⁴C-TCA 摂取量を測定した。すなわち正確に 200 μl の細胞浮遊液を採取して、直ちにシリコンオイル 100 μl, 3 mol/L KOH, 50 μl を含む遠心管に加え、速やかに Eppendorf 5514 S centrifuge を用いて遠心分離 (15600×G, 10 秒間) し、反応を停止した。得られた packed cells に Protosol (New England Nuclear Research Products, Boston, USA) を加え溶解後、Atomlight (New England Nuclear Research Products, Boston, USA) を加え、Beckman LS-7500 液体 scintillation counter で肝細胞内に取り込まれた ¹⁴C の細胞あたりの放射活性を計測した。なお dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP, 第一製薬, 東京) も反応開始 5 分前から加えるようにした。

次に、¹⁴C-TCA 取り込みの時間経過に及ぼすグルカゴン添加の影響を検討するため、グルカゴン (10⁻⁶ mol/L)

含有ならびに非含有 standard medium に¹⁴C-TCA(1 μmol/L)を添加し、反応開始後 10, 30, 60, 90, 120, 300, 600, 900 秒に細胞浮遊液を採取し、同様に肝細胞の¹⁴C-TCA 摂取量を測定した。

さらに、肝細胞の¹⁴C-TCA 摂取における肝細胞膜 Na⁺, K⁺-ATPase の影響を検討するため、standard medium に Na⁺, K⁺-ATPase 阻害剤である ouabain(1 mmol/L)を添加する実験系、ならびに Na⁺ free medium を用いる実験系を追加し、それぞれグルカゴン(10⁻⁶ mol/L)の存在下、非存在下での¹⁴C-TCA 摂取を測定した。

6. 胆汁酸肝細胞膜輸送における速度論的解析とグルカゴンの影響の検討

standard medium および Na⁺ free medium に 1~100 μmol/L の¹⁴C-TCA を添加し、グルカゴン存在下(10⁻⁶ mol/L)ならびに非存在下における、胆汁酸の肝細胞膜輸送における速度論的解析を行なった。

7. 肝細胞の¹⁴C-TCA 取り込みに及ぼすグルカゴンお

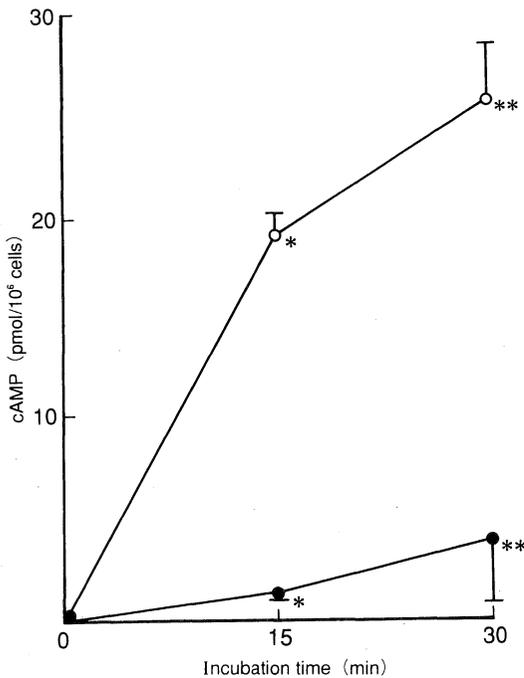


Fig. 1. Effect of glucagon on cyclic AMP levels in the incubation medium. Open circles indicate medium with glucagon (1×10⁻⁶mol/L) and closed circles indicate control standard medium.

Cyclic AMP markedly increased by an addition of glucagon.

* : p<0.001, ** : p<0.001

よび cycloheximide 添加の影響

standard medium を対照群とし、standard medium にグルカゴン(10⁻⁶ mol/L)を添加した群、それぞれに cycloheximide(1 mmol/L)を添加した群の 4 群を設定し、15 分後の¹⁴C-TCA(1 μmol/L)肝細胞内胆汁酸摂取量を測定し、胆汁酸の肝細胞内取り込みに及ぼす蛋白合成の影響を検討した。

8. 胆汁酸の肝細胞膜輸送に及ぼす DBcAMP の検討
standard medium および Na⁺ free medium に DBcAMP を 1×10⁻⁵~10⁻³ mol/L 添加し、15 分後の肝細胞の¹⁴C-TCA(1 μmol/L)摂取量を測定した。

9. 推計学的検定

有意差検定は student t-test を用いて行なった。

成 績

1. 分離肝細胞の cyclic AMP 分泌に及ぼすグルカゴンの影響

グルカゴン(1×10⁻⁶ mol/L)添加後の standard medium 中の cyclic AMP 濃度は 15 分後 19.00±1.00 pmol/10⁶ cells, 30 分後 26.00±2.24 pmol/10⁶ cells であった。一方、グルカゴン非添加群では 15 分後 1.44±0.44

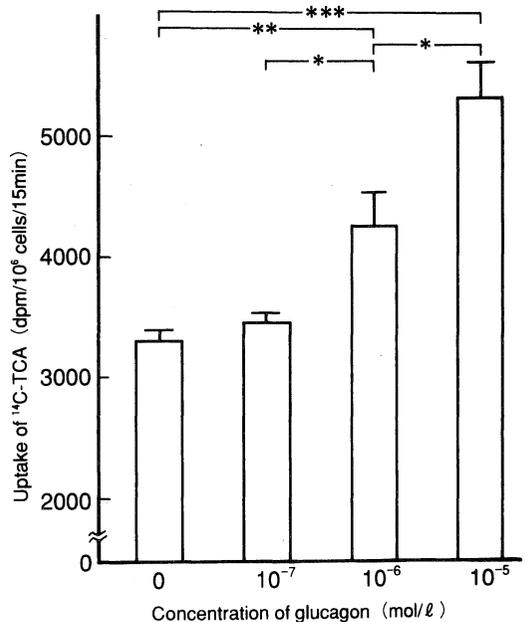


Fig. 2. Relationship between glucagon concentration in the medium and uptake of ¹⁴C-TCA incubated for 15 minutes. The uptake increased in a concentration-dependent manner.

*** : P<0.001, ** : P<0.01, * : P<0.05

pmol/ 10^6 cells, 30分後 3.95 ± 2.80 pmol/ 10^6 cells であり, グルカゴン添加により培養液中 cyclic AMP は有意な増加を示した(Fig. 1).

2. 肝細胞の ^{14}C -TCA 取り込みに及ぼすグルカゴン濃度の影響

^{14}C -TCA($1 \mu\text{mol/L}$)の肝細胞内摂取量は, グルカゴン濃度 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L において濃度依存性に増加した(Fig. 2).

3. 分離肝細胞による ^{14}C -TCA 取り込みの時間的推移とグルカゴン添加の影響

Fig. 3 に示すように standard medium における ^{14}C -TCA($1 \mu\text{mol/L}$)の肝細胞内への摂取量は2分まで直線的に増加し, 15分ではほぼ飽和に達した. グルカゴンを添加した場合には, ^{14}C -TCA の肝細胞内への摂取量は15分まで増加し続け, どの時点においても standard medium の場合より高値を示した. しかし, ouabain を含

んだ standard medium や, Na^+ free medium の場合には ^{14}C -TCA の肝細胞への摂取量は著明に減少していた. さらにこれらにグルカゴンを添加しても, ^{14}C -TCA の肝細胞内への摂取量は増加を示さなかった.

4. 胆汁酸肝細胞膜輸送における速度論的解析とグルカゴンの影響

種々の濃度の ^{14}C -TCA を添加した際の TCA 濃度 ($1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$)と, 分離肝細胞の initial uptake rate との関係を図. 4 に示す. initial uptake rate はグルカゴン投与後 $10 \sim 120$ 秒の直線部分から算出した. standard medium での値【(A)および(B)】から Na^+ free medium での値【(C)および(D)】を差し引いてプロットした点線の推移【(A)-(C)および(B)-(D)】は, TCA の Na^+ dependent uptake とみなされ, グルカゴン添加群, 非添加群とも Michaelis Menten 型の飽和曲線を示した. さらに Lineweaver Burk の逆数プロットから得

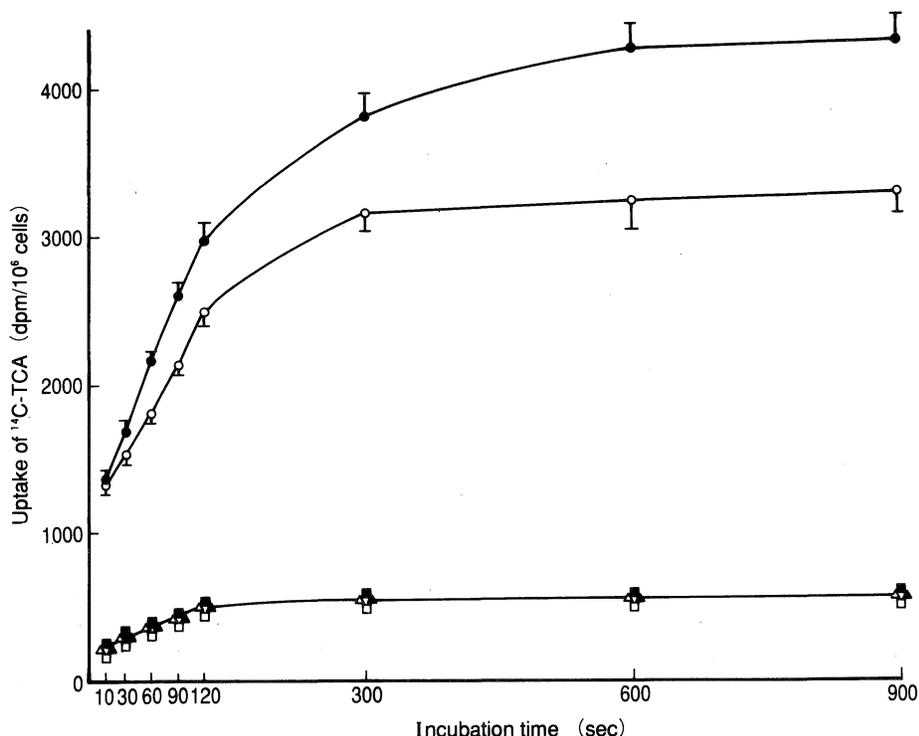


Fig. 3. Changes in the uptake of ^{14}C -TCA into isolated rat hepatocytes.

The effect of glucagon on taurocholic acid transport was investigated in the standard medium containing 10^{-6} mol/L glucagon. Five minutes preincubation in glucagon containing medium was followed by the usual 15 minutes incubation after the addition of ^{14}C -TCA.

○; standard medium. ●; standard medium with glucagon
□; standard medium with ouabain, ■; standard medium with ouabain and glucagon, △; Na^+ -free medium, ▲; Na^+ -free medium with glucagon.

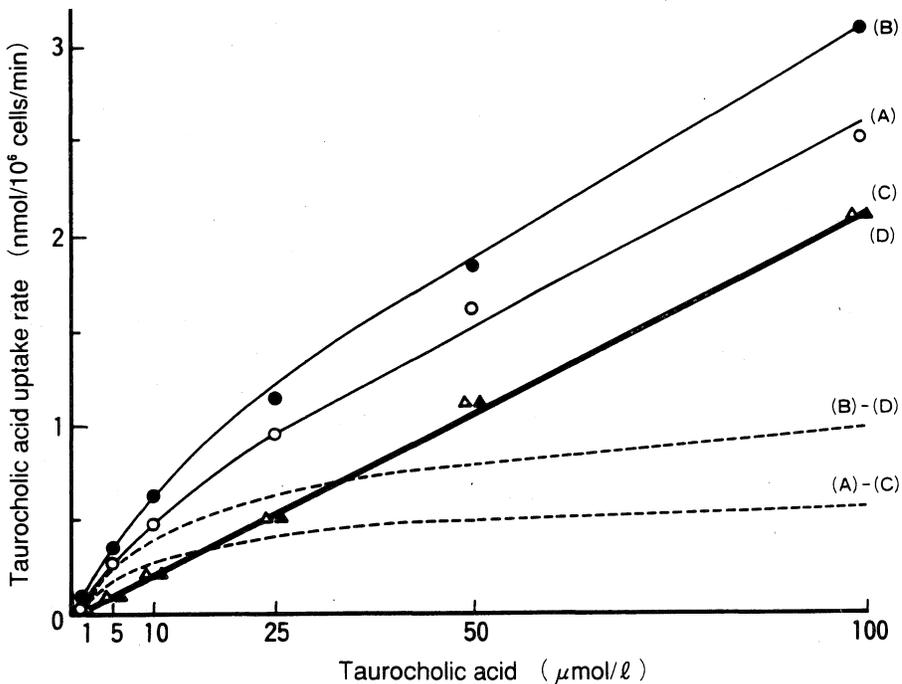


Fig. 4. Relationship between extracellular taurocholic acid concentration (1-100 μ mol/L) on initial uptake rate of taurocholic acid.

○(A) ; standard medium ●(B) ; standard medium with glucagon
 △(C) ; Na⁺-free medium ▲(D) ; Na⁺ ; free medium with glucagon

られた Km, Vmax 値は, グルカゴン添加群では Km 13.71 μ mol/L, Vmax 0.975 nmol/min/10⁶ cells, グルカゴン非添加群では Km 13.58 μ mol/L, Vmax 0.611 nmol/min/10⁶ cells であった.

5. 肝細胞の¹⁴C-TCA 取り込みに及ぼすグルカゴンおよび cycloheximide 添加の影響

¹⁴C-TCA (1 μ mol/L) 添加 15 分後の肝細胞の¹⁴C-TCA 摂取量は, 対照では 3293 \pm 99 dpm/10⁶ cells, グルカゴン 10⁻⁶ mol/L 添加では 4254 \pm 329 dpm/10⁶ cells であったが, それぞれに cycloheximide 1 mmol/L を添加すると, 3627 \pm 205 dpm/10⁶ cells, 4197 \pm 230 dpm/10⁶ cells となった. すなわち cycloheximide の有無に関わらず, 肝細胞の胆汁酸摂取はグルカゴンにより同程度に促進された.

6. 胆汁酸の肝細胞膜輸送に及ぼす DBcAMP 影響

standard medium に DBcAMP を 1 \times 10⁻⁵~10⁻³ mol/L の濃度で添加したところ, 肝細胞の¹⁴C-TCA 摂取量は, DBcAMP 濃度 1 \times 10⁻⁵ mol/L, 2 \times 10⁻⁵ mol/L では増加したが, 1 \times 10⁻³ mol/L の高濃度では逆に DBcAMP 非添加時よりも減少した.

一方, Na⁺ free medium では DBcAMP を添加しても, ¹⁴C-TCA の肝細胞内摂取量に変化は認められなかった (Fig. 5).

考 案

胆汁酸の肝細胞内への取り込みについては(1)Na⁺依存性のキャリアー仲介輸送, (2)Na⁺非依存性のキャリアー仲介輸送(3)Na⁺非依存性の受動拡散輸送の3種類の異なった輸送機構が存在することが指摘されている⁸⁾⁹⁾. 特に Na⁺依存性のキャリアー仲介輸送には, 肝細胞膜に存在する Na⁺, K⁺-ATPase の関与が重要視されている. ouabain は Na⁺, K⁺-ATPase に対し特異的な阻害作用を示すが, Schwarz et al. ¹⁰⁾ は ouabain 1 mmol/L で肝細胞膜の Na⁺, K⁺-ATPase を阻害すると, TCA の肝細胞内への取り込みが約 75% 低下すると報告し, Dietmaier et al. ¹¹⁾, Scharschmidt et al. ¹²⁾ も同様の成績を報告している. 著者の成績でも, ouabain 1 mmol/L 添加および choline chloride で置換した Na⁺ free medium を用いた検討において, 他の報告と同程度に TCA の肝細胞内摂取量の減少を確認した. また, この減

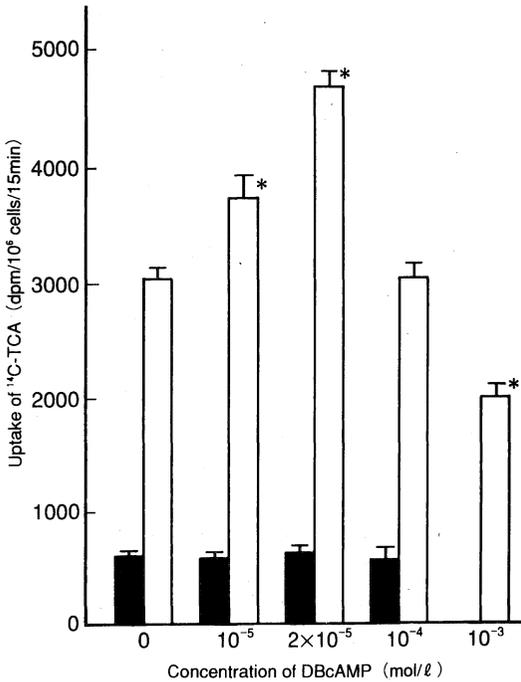


Fig. 5. Effect of dibutyryl cyclic AMP on uptake of ¹⁴C-TCA into hepatocytes.

Open column indicate control standard medium with dibutyryl cyclic AMP and closed column indicate Na⁺-free medium. Dibutyryl cyclic AMP enhanced ¹⁴C-TCA uptake into hepatocytes at the concentration of 10⁻⁵ or 2×10⁻⁵mol/l, but inhibited at 10⁻³ mol/L.

However, in the Na⁺-free medium dibutyryl cyclic AMP showed so effect on ¹⁴C-TCA uptake into hepatocytes.

* : p<0.01 VS DBcAMP(0mol/L)

少の程度からみて TBA の生理的濃度内では、Na 依存性の取り込み機構は胆汁酸取り込み機構の最も大きい部分を占めているものと考えられた。さらにこれら ouabain 添加系、および Na⁺ free medium にグルカゴンを添加した系において、TCA の肝細胞内摂取量が増加しなかったことより、グルカゴンによる胆汁酸の肝細胞内取り込み促進の作用点は、Na 依存性のキャリア-仲介輸送の部分にあるものと考えられた。

グルカゴンの肝細胞における機能は、まず肝細胞膜表面にあるグルカゴンレセプターとの結合に始まる。この結果、G-protein を介して adenylate cyclase が活性化され、セカンドメッセンジャーである cyclic AMP の生成が増加する。これは cyclic AMP 依存性の protein kinase の活性化につながる。以上がグルカゴンの肝細胞

に対する作用の主たる経路と考えられている^{13) 14)}。本実験においても、グルカゴン添加後分離肝細胞の cyclic AMP 産生が明らかに増加したことや、cyclic AMP 誘導体である DBcAMP がグルカゴンと同様に胆汁酸取り込み促進作用を示したことから、グルカゴンの胆汁酸取り込み促進作用も cyclic AMP を介した機序によることが考えられる。この cyclic AMP を介する機序の詳細については酵素などの機能蛋白のリン酸化による活性化¹⁵⁾や、蛋白合成の誘導¹⁶⁾などが考慮される。しかし、本研究において cycloheximide により肝細胞の蛋白合成を阻害¹⁷⁾しても、グルカゴンによる胆汁酸の肝細胞膜輸送促進作用に変化がなかったことから、グルカゴンが肝細胞内の carrier protein や、Na⁺, K⁺-ATPase などの酵素蛋白の合成促進に直接作用した可能性は少ないものと考えられた。

一方、グルカゴンによる胆汁酸肝細胞膜輸送に及ぼす影響について速度論的 parameter から検討を加えたところ、Vmax(最大取り込み速度)の増加が認められ、Km は不変であった。このことはグルカゴンが担体の capacity を増加させ、胆汁酸の肝細胞膜輸送を促進させたことを意味するものであり、担体の胆汁酸に対する親和性を高めた結果ではないことを示唆している。ところで、Petersen¹⁸⁾はグルカゴンが肝細胞膜の membrane potential を増大させることを報告しており、その機序として Na⁺, K⁺-ATPase の関与を示唆している。これらのことからグルカゴンは cyclic AMP を介して Na⁺, K⁺-ATPase を活性化させ、Na⁺依存性輸送を全体的に高め、胆汁酸の取り込みを促進させたものとする。

肝硬変患者にグルカゴンを投与した際、高値を示していた TBA が減少する機序については他に、有効肝血流量に及ぼすグルカゴンの影響も考慮する必要がある。事実、グルカゴンは健常人および実験動物において、門脈血流量を増加させることが知られている^{19) 20)}。しかし、肝硬変においては、健常人に比べ門脈血流量が低下していると言われており^{21) 22)}、肝硬変患者にグルカゴンを投与しても、健常人に比して門脈血流量の増加反応が乏しい傾向にあると報告されている²³⁾。さらに、肝硬変では肝内外において門脈-大循環系に短絡が存在するため、有効肝血流は低下している²⁴⁾。したがって、肝硬変においてグルカゴンが有効肝血流量を増加させ、TBA を減少させた可能性も否定はできないが、その関与の程度は少ないと推測される。本研究において明らかとなったように、胆汁酸の肝細胞膜輸送に及ぼすグルカゴンの直接作用が、血清胆汁酸低下の主たる機構をなすものとする。

結 語

ラット分離肝細胞を用いて胆汁酸の肝細胞膜輸送に及ぼすグルカゴンの影響を検討し、以下のごとき結論を得た。

1) グルカゴンは分離肝細胞の cyclic AMP 産生を促進した。

2) グルカゴン添加により、肝細胞への¹⁴C-TCA 摂取量は有意に増加し、さらにこの摂取量の増加は添加したグルカゴン濃度(10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L)に依存性を示した。

3) dibutyryl cAMP(10^{-5} ~ 2×10^{-5} mol/L)添加により、肝細胞への¹⁴C-TCA 摂取量は有意に増加した。

4) 実験系に ouabain を添加した際ならびに Na⁺ free medium を用いた際には、肝細胞への¹⁴C-TCA 摂取量は著明に減少し、グルカゴンを添加しても¹⁴C-TCA 摂取量は増加しなかった。

5) 肝細胞への¹⁴C-TCA の Na⁺ 依存性取り込みは、Michaelis-Menten 型の飽和曲線を示し、速度論的解析でグルカゴンは V_{max} を増加させたが K_m は変化させなかった。

6) グルカゴンによる胆汁酸取り込み促進効果は、cycloheximide 添加においても解除されなかった。

以上の成績からグルカゴンは肝細胞において、胆汁酸の Na⁺ 依存性の能動的キャリア-仲介輸送を促進させることが明らかとなった。

(本論文の要旨は、第 21 回日本肝臓学会総会及び第 5 回アジア太平洋肝臓学会議において発表した。稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師辻井 正教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜った生化学教室の神谷知彌教授ならびに病態検査学教室の中野 博教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり常に御指導、御助言をいただいた森田倫史前助教授、福井 博助教授、病態検査学岡本康幸助教授ならびに御助力いただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。)

なお本研究の一部は、文部省科学研究費補助金奨励(A)61770499 によって行なった。

文 献

- Morita, T., Matsuyama, Y., Fujimoto, T., Higuchi, M., Tsujii, T. and Matsuoka, Y. : *Gastroenterologia Japonica* 13 : 491, 1978.
- Tobiasson, P., Fryden, A. and Tagesson, C. : *Scand. J. Gastroent.* 16 : 763, 1981.
- 辻井 正, 森田倫史 : *臨床科学* 17 : 1355, 1981.
- 山田全啓, 森田倫史, 久保良一, 松村吉庸, 北野浩行, 帆風洋一, 熨斗秀興, 辻井 正, 岡本康幸 : *薬理と治療* 14 (Suppl. 2) : 345, 1986.
- Maekubo, H., Matsushima, T., Okuda, F., Honma, M. and Ui, M. : *Digestive Diseases and Sciences* 25 : 700, 1980.
- Berry, M. N. and Friend, D. S. : *J. Cell. Biol.* 43 : 506, 1969.
- Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M. : *Biochem. Wed.* 18 : 257, 1977.
- Anwer, M. S., Kroker, R. and Hegner, D. : *Hoppe-seyler's Z. physiol. chem.* 357 : 1477, 1976.
- Anwer, M. S. and Hegner, D. : *Hoppe-seyler's Z. physiol. chem.* 359 : 181, 1978.
- Schwarz, L. R., Burr, R. and Schwenk, M. : *Eur. J. Biochem.* 55 : 617, 1975.
- Dietmaier, A., Gasser, R., Graf, J. and Peterlik, M. : *Biochimica et Biophysica Acta* 443 : 81, 1976.
- Scharschmidt, B. F. and Stephens, J. E. : *Cell Biol.* 78 : 986, 1981.
- Broadus, A. E., Kaminsky, N. I., Nortcutt, R. C., Hardmann, J. G., Sutherland, E. W. and Liddle, G. W. : *J. Clin. Invest.* 49 : 2237, 1970.
- Pohl, S. L., Birnbaumer, L. and Rodbell, M. : *J. Biol. Chem.* 246 : 1849, 1971.
- Soderling, T. R., Hickenbottom, J. P., Reimann, E. M., Hunkeler, F. L., Walsh, D. A. and Krebs, E. G. : *J. Biol. Chem.* 245 : 6317, 1970.
- Ernest, M. J. and Feigelson, P. : *J. Biol. Chem.* 253 : 319, 1978.
- Roberts, A. F., VIÑA, J. R., Munday, M. R., Farrell, R. and Williamson, D. H. : *Biochem. J.* 204 : 417, 1982.
- Petersen, O. H. : *J. Physiol.* 239 : 647, 1974.
- 山下幸孝, 森安史典, 玉田 尚, 川崎俊彦, 小野成樹, 木村 達, 梶村幸三, 染谷 仁, 内野治人 : *日消誌.* 86 : 1460, 1989.
- Bashour, F. A., Geumei, A., Nafrawi, A. G. and Downey, H. F. : *Pflügers Arch.* 344 : 82, 1973.
- Moremo, A. H., Burchell, A. R., Roussetot, L. M., Panke, W. F., Slafsky, S. F. and Burke, J. H. : *J. Clin. Invest.* 46 : 436, 1967.

- 22) 田辺高由, 戸部和夫, 小出典男, 森近 茂, 土屋隆
宏, 喜田恵治, 長島秀男, 原岡昭一: 肝臓 26: 65,
1985.
- 23) 岡崎和一, 宮崎正子, 伊藤憲一: 肝臓 25: 1039,
1984.
- 24) **Hofmann, A. F.**: Adv. Intern. Med. 21: 501,
1976.