

Ethionamide による脂肪肝の発現機序に関する実験的研究 (II)

Ethionamide 脂肪肝における脂肪酸組成

井上 豊治・和 知 勤

国立療養所近畿中央病院貝塚分院

受付 昭和 45 年 2 月 7 日

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE MECHANISM OF FATTY LIVER
FORMATION INDUCED BY ETHIONAMIDE (Report II)*

Analysis of Fatty Acid Composition of Ethionamide-Induced Fatty Liver in Rat

Bunji INOUYE and Tsutomu WACHI

(Received for publication February 7, 1970)

By the oral administration of ethionamide (TH), a fatty liver is induced in rat experimentally. From the fact that glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of the soluble fraction of liver was enhanced in TH-administered rats, it was suggested that the remarkable increase of fatty acid synthesis in liver may cause the fatty liver of TH-administered rats. In this report, the fatty acid composition of total lipid in TH-administered rat liver was analysed by means of gaschromatography, comparing with those of the control and CCl_4 -administered rat livers.

Male Donryu rats weighing 100 to 150 g were used. TH (200 or 400 mg per kg body weight as a suspension in distilled water) and CCl_4 (5 ml per kg body weight as 1:1 mixture in liquid paraffin) were administered respectively by gastric tube. Rats were sacrificed at certain interval by decapitation and livers were removed.

The extraction of total lipid of liver was done according to the method of Folch. The extracts were washed in NaCl solution, evaporated to dryness and refluxed with H_2SO_4 -methanol. The methyl esters were washed, separated, evaporated and dissolved in small amount of ethyl ether.

Gaschromatographic analysis was carried out at 180°C in a glass tube of 2,000 mm long and 3 mm internal diameter. DEGS was used as stationary phase and nitrogen as carrier gas.

For the quantitative determination of the total fatty acid of liver, the method of Drysdale was employed.

The results obtained were as follows.

Total fatty acid increased both in the livers of TH-administered rats and in those of CCl_4 -administered rats. In the fatty liver induced by TH, palmitic, oleic and linoleic acids were increased and stearic and C20 unsaturated fatty acids were decreased in the percentage of the total lipid. These changes appeared in a short period after starting the use of TH, and lasted during the period of daily administration of TH. In case of a single dose, however, these changes disappeared completely 96 hours after the administration of TH.

Increase of oleic acid and decrease of stearic acid in percentage of total lipid were also

* From the Kaizuka Branch, National Sanatorium Kinki Central Hospital, 1587 Hashimoto, Kaizuka City, Osaka 597 Japan.

observed in the liver of CCl_4 -administered rats.

From these results, especially from a definite increase of linoleic acid, an extrahepatic factor as well as the intrahepatic one must be discussed in regard to the origin of the accumulated fat in TH or CCl_4 -administered rat liver.

緒 言

Ethionamide (以下 TH と略す) を実験的にラットに投与することにより肝臓に著明な脂肪の蓄積がみられ、いわゆる TH 脂肪肝を誘起する¹⁾。われわれはこの TH 脂肪肝の発現機序の解明を試み、前報²⁾のごとく、TH 投与ラット肝においては細胞可溶分画中の glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) の活性が上昇することから、TH による脂肪肝形成の一因が、肝における脂肪酸合成の異常な亢進にある可能性を推測した。しかし脂肪肝形成の要因は脂肪酸の合成促進³⁾のみならず、リポ蛋白の生成ないしはその肝組織外への分泌阻害⁴⁾などの肝内因子やさらに食餌あるいは脂肪組織などによる肝外因子^{7)~10)}が考えられる。

本報告においては、TH 脂肪肝における蓄積脂肪の由来を知る一つの手がかりを得る目的で、正常ラット肝および比較的多くの研究結果やその機構が明らかにされている四塩化炭素脂肪肝の脂肪酸成分と TH 脂肪肝のそれとを比較検討し、得られた 2, 3 の結果について報告する。

材料および方法

I. 実験動物、飼料および薬剤の投与方法

実験動物には、ゼネラル固型飼料 MR-1 (実験動物関西研究所) で飼育した体重 100~150 g の Donryu 系雄ラットを用いた。

TH は 2-ethyl-thioisonicotinamide (塩野義製薬) 原末を乳鉢で細かく砕き、所定量を蒸留水に懸濁させたものを耳鼻科用水銃で胃内に注入した。対照には同量の生食水を同様に与えた。四塩化炭素は流動パラフィンとの混合液 (1:1) 5 ml/kg 体重を、対照には同量の流動パラフィンのみを TH の場合と同様に経口投与した。

II. 試料の調製法

一夜絶食させた動物を断頭脱血した後ただちに開腹、氷冷生食水で肝を灌流、血球を十分洗い出してから肝を剔出、重量を測定し、ただちに -20°C のディープフリーザーに入れ凍結保存したものを試料として用いた。

III. 肝総脂質の抽出法

肝の総脂質の抽出は Folch の方法¹¹⁾に従った。すなわち湿組織 1 g につき chloroform・methanol (2:1, v/v) 20 ml を加えてガラスホモゲナイザーでホモゲナイズし、室温で 2 時間、マグネチックスターラーで攪拌

しながら抽出した後、水流ポンプを用いて濾過、残渣に chloroform・methanol 10 ml を加えて、さらに 2 回上記と同じ方法を繰返して抽出した。この濾液を先の抽出液に加え、これに 0.2 容の 0.73% 食塩水を加えて激しく振盪混和、一夜氷室 ($0\sim5^\circ\text{C}$) に放置した後分液漏斗で上層を除去した。この下層の chloroform 溶液を総脂質液として以下の測定に用いた。

IV. 総脂質の定量法

総脂質の定量は、前記総脂質の chloroform 溶液の一定量を既知重量の容器にとり、減圧下に 24 時間デシケーター中で乾固後秤量し、総脂質量とした。

V. 肝総脂肪酸の定量

肝総脂肪酸の定量は Drysdale の方法¹²⁾に従った。すなわち前記総脂質の chloroform 溶液 5 ml を共栓付試験管にとり、 60°C の温浴中で蒸発乾固した。これに無水 ethanol 5 ml と 4 N NaOH 0.5 ml を加えて軽く栓をし、 80°C の温浴中で 30 分間加温、再び乾固した。これに蒸留水 4 ml、0.2% methylred 1 滴を加え、4 N H_2SO_4 を数滴加えて酸性にした後 isopropanol 40 容、n-heptane 10 容および N H_2SO_4 1 容よりなる混合液 5 ml を加え、さらに 3 ml の n-heptane を加えて激しく振盪した。これを 5 分間放置した後上層液 5 ml を 50 ml 容コルペンに移し、thymolblue を指示薬として 0.02 N NaOH で滴定した。

VI. 総脂肪酸のメチル化およびガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分析

総脂質の chloroform 溶液 30~40 ml をなす型コルペンにとり、毛細管で窒素ガスを通じながら 60°C の温浴中で減圧蒸留した。残渣物に 3% H_2SO_4 methanol 液 20 ml を加え 70°C の温浴中で 3 時間環流した。冷却した後同量の蒸留水を加え、さらに同量の ethyl ether を追加して 1 分間分液漏斗中で振盪混和した。ether 層を分離し、これを同量の ether 飽和水で洗浄した後 40°C で減圧蒸留、残渣物を少量の ether に溶かした。これに少量の Na_2SO_4 の粉末を加え、窒素ガスとともに小型試験管中に密封保存した。

上記のごとくして得られた methyl ester 0.4~0.8 μl を使ってガスクロマトグラフィーにより、構成脂肪酸を分析した。ガスクロマトグラフィーに用いた装置および条件は、Biomedical Gaschromatograph Model 400 (F & M Scientific Corporation Avondale, PA.), ガラス

カラム 3 mm×2,000 mm, 担体 celite 60~80 mesh (島津), 液相 diethyleneglycol succinate 15%, キャリアーガス窒素, 流速 120 ml/min, カラム温度 180°C, 水素炎イオン化検出器である。なお各ピークの百分率は半値幅法により計算した。

結 果

I. TH 投与ラット肝における総脂質量の変化

TH 200 mg/kg 体重 (以下同じ) および 400 mg/kg をそれぞれ 1 回ラットに経口投与したさいの肝総脂質量と、四塩化炭素投与肝のさいのそれを測定し、表1のごとき成績を得た。すなわち肝湿重量 1g に対する総脂質量は、対照の 100 に対して TH 200 mg/kg 投与後 24 時間で 138%, 400 mg/kg 投与後 6 時間で 129%, 同じく 24 時間後では 156% と明らかに増加している。四塩化炭素投与群では脂質量の増加はさらに著しく、対照の 100 に対して、投与後 24 時間で 235% と 2 倍以上の増加を示した。

II. TH 投与ラット肝における総脂肪酸量の変化

TH 400 mg/kg を 1 回投与したさいの肝総脂肪酸量の変化は表2のごとくである。肝湿重量 1g 当りの脂肪酸量は、TH 投与後 24 時間までに対照のおよそ 2 倍に達するが以後減少し、96 時間後には対照のレベルに回復した。また四塩化炭素を投与したさいにも肝総脂肪酸量

Table 1. The Amount of Total Lipid in Rat Liver

Group	No. of rats	Total lipid	
		mg. g liver*	Ratio
Control	4	66.8	100
TH 200 mg/kg 24 hr.	3	92.2	138
400 mg/kg 6 hr.	3	86.2	129
24 hr.	3	104.0	156
CCl ₄ in liquid paraffin (1:1) 5 ml/kg 24 hr.	3	156.9	235

* Wet weight

Table 2. The Amount of Total Fatty Acid in Rat Liver

Group	No. of rats	Fatty acid*
Control	5	34.5
TH** 6 hr.	3	71.7
24 hr.	3	59.2
96 hr.	3	35.9
Control***	2	37.7
CCl ₄ **** 6 hr.	3	66.3
24 hr.	3	75.6

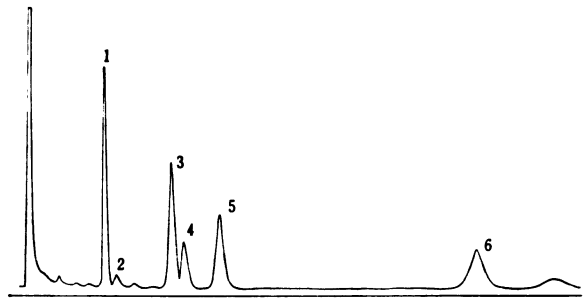
* mg per g wet weight of liver.

** 400 mg/kg of TH was given orally by gastric tube.

*** 5 ml/kg of liquid paraffin was given orally.

**** 5 ml/kg of CCl₄ was given orally as a 1:1 (V,V) mixture in liquid paraffin.

Fig. 1. Gas-Chromatographic Pattern of the Total Fatty Acid in the Control Rat Liver



(1) palmitic, (2) palmitoleic, (3) stearic, (4) oleic, (5) linoleic, (6) C 20 unsaturated acid.

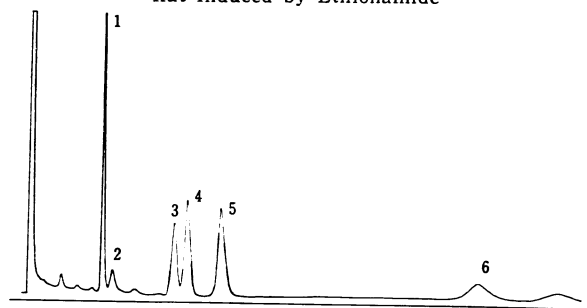
は著明な増加がみられ、24 時間後には対照の 2 倍に達した。

III. TH 脂肝における総脂質の脂肪酸組成の分析

TH の投与により増量した肝脂質の由来を検討するために、まず TH 脂肝の総脂質の脂肪酸組成の変動を追求した。図1は対照ラット肝、図2は TH 200 mg/kg 投与後 24 時間の脂肝におけるそれぞれの総脂質の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した結果を示す。これらの図より両者の脂肪酸組成のパターンの間には明らかな相違が認められる。すなわち TH 脂肝は C 18:1 のオレイン酸の著明な増加と C 18:0 のステアリン酸および炭素数 20 の不飽和脂肪酸 (C 20F) の著明な減少を示す。

そこで、TH 200 mg/kg/day を 4 日間連続投与したものの、TH 400 mg/kg 1 回投与後 24 時間のものおよびこれらの対照と、四塩化炭素 1 回投与後 24 時間のものとその対照の各群について肝総脂質の脂肪酸組成を分析し、各脂肪酸含量を百分率で示し各群を比較すると表3のごとくである。すなわちそれぞれの脂肪酸の占める割合は、TH 脂肝の対照ラット肝ではステアリン酸が 23% で最も多く、次いで C 16:0 のパルミチン酸 (22.7%),

Fig. 2. Gas-Chromatographic Pattern of the Total Fatty Acid in the Fatty Liver of Rat Induced by Ethionamide



24 hr. after the administration of 200 mg TH/kg body wt. (1) palmitic, (2) palmitoleic, (3) stearic, (4) oleic, (5) linoleic, (6) C 20 unsaturated acid.

C20F (21.8%) および C18:2 のリノール酸 (19.2%) の順に減少する。これに対して TH 200 mg/kg/day 4日間連続投与および TH 400 mg/kg 1回投与後 24 時間のラット肝ではパルミチン酸 (27.6%) が最も多く、リノール酸 (19.9~23.3%)、オレイン酸 (18.3~20.4%)、ステアリン酸 (11.2~13.3%) と減少し、オレイン酸、リノール酸およびパルミチン酸の増加とステアリン酸および C20F の著明な減少が特徴的である。

TH 脂肝の脂肪酸組成の特異的变化に対して四塩化炭素による脂肝における脂肪酸組成の変化は、オレイン酸の著明な増加とステアリン酸の著明な減少は TH 脂肝の場合と同じ傾向を示しているが、C20F 含量は TH 脂肝とは逆に増加する傾向にある。そしてこの点が TH 脂肝と四塩化炭素脂肝における脂肪酸組成を対比した場合の特徴的な差である。

IV. TH 投与時のラット肝脂肪酸組成の経時的変化

まず TH 400 mg/kg を 1 回投与したときのラット肝脂肪酸組成の経時的変化を示せば図 3 のごとくである。すなわち TH 投与後 6~48 時間の間にオレイン酸およびリノール酸の著明な増加とステアリン酸および C20F の著明な減少傾向を示すが、96 時間後にはいずれも TH 投与前の状態に復帰する。

次に TH 200 mg/kg/day の 8 日間連続投与に伴うラット肝脂肪酸組成の変動を追求し、図 4 に示すような結果を得た。すなわち TH の第 1 回目投与後 6~12 時間では TH 400 mg/kg 1 回投与の場合と同様にオレイン酸およびリノール酸の他パルミチン酸の割合が増加し、ステアリン酸および C20F はその割合が減少するが、TH の経日投与により 1 回投与の場合と異なり変化した脂肪酸組成をそのまま維持する傾向を示した。

考 察

実験的脂肝のさいに肝に蓄積する脂質の多くは中性脂肪であることは Lombard¹³⁾ によつてすでに明らかにされているが、伊藤¹⁴⁾ は本実験に使用した TH の投与によつて誘起する脂肝においても中性脂肪が増量し、中でもとくに triglyceride が増量することを明らかにした。

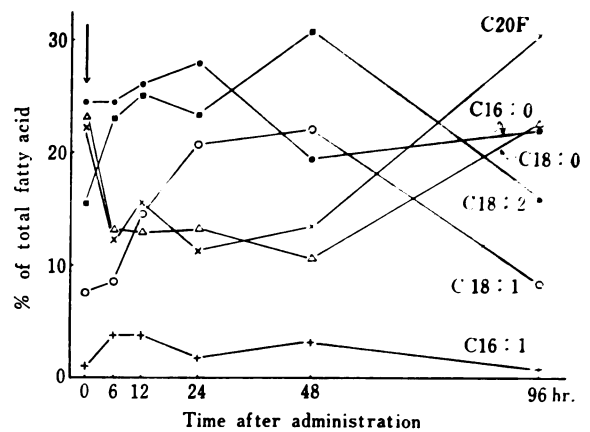
さて、この脂肝において増量した中性脂肪の由来についてはいろいろな角度から検討されているが、Creasey³⁾ はオロチン酸投与により ¹⁴C-acetate の肝 triglyceride への取込みが著明に増加することを認め、Maling⁴⁾ は四塩化炭素投与ラット肝内 triglyceride への ¹⁴C-

Table 3. The Fatty Acid Composition of Rat Liver
In percentage to the total

Group	Fatty acids					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20F
Control	22.7	1.1	23.0	10.2	19.2	21.8
TH 200 mg/kg/day, 4 days	27.6	2.7	11.2	18.3	19.9	9.3
TH 400 mg/kg 24 hr.	27.6	1.9	13.3	20.4	23.3	11.3
Control	23.0	1.7	30.5	9.3	17.3	17.5
CCl ₄ in liquid paraffin (1:1) 5 ml/kg 24 hr.	22.0	2.3	6.4	15.0	16.0	34.0

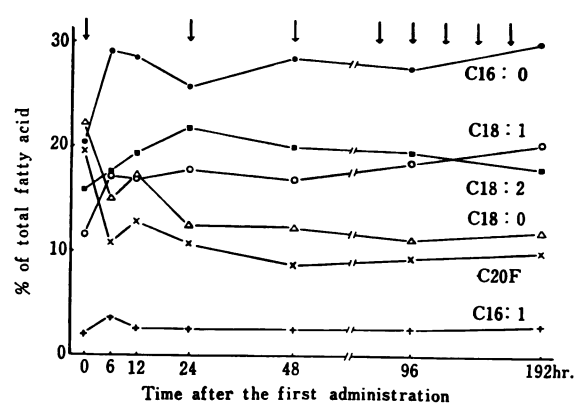
Each figure shows the mean of three or more animals.

Fig. 3. Effect of Single Administration of Ethionamide on the Fatty Acid Composition of Rat Liver



↓ 400mg TH/kg body wt. was given orally by gastric tube.

Fig. 4. Effect of Daily Administration of Ethionamide on the Fatty Acid Composition of Rat Liver



↓ 200mg TH/kg body wt./day was given orally by gastric tube.

パルミチン酸の取込みが増加することを報告している。また Yoshida⁵⁾ はメチオニン脂肝において脂肪酸合成が促進することを認めているなど脂肝成因の一つが肝内における脂肪酸合成の促進にあるとみる、いわゆる肝内因子的な見解がある。われわれは前報²⁾ において、主として NADPH₂ 産生酵素系、とくに G-6-PDH の活性化

昇による脂肪酸合成の促進が TH 脂肝の成因の一つであろうと推論した。

本報においては TH 脂肝の総脂質の脂肪酸組成を分析し、オレイン酸含量の割合の増加とステアリン酸および C20 F 含量の割合の減少を認めたが、これらについては Windmueller⁹⁾ の実験的オロチン酸脂肝における成績および Takahashi ら¹⁰⁾ のヒト脂肝における総脂質の脂肪酸組成の分析結果とよく一致し、その原因が肝内因子によることを示唆するかもしれない。しかしパルミチン酸の絶対量についてはこれらの報告およびわれわれの TH 脂肝においてもともに増加しているが、総脂質量に対する割合については前者においてはむしろ減少しているのに対し、われわれの成績では増加している。この点についてはさらに検討を加えたい。

こうした各種の脂肝における総脂質の脂肪酸組成の変化は、肝脂質中に占める中性脂肪の割合が増加することによるものと思われる。この増量した中性脂肪の由来について Windmueller⁹⁾ は、オロチン酸脂肝では ³H₂O の肝脂肪酸への取込みが増加する反面、血中の ³H 脂肪酸が減少すること、血中の triglyceride, cholesterol および磷脂質濃度が低下する時期と一致して肝脂肪の蓄積が始まることなどから、脂肝形成の要因が肝内に存在すると考えている。しかしわれわれは TH 脂肝の脂肪酸中リノール酸の絶対量の増加を認めた。このリノール酸は高等動物体内では合成できないか、または合成されてもその量はきわめてわずかであろう。とすればその増量の原因を肝内の脂肪酸合成促進だけでは説明できない。

脂肝の発生機序を肝内の因子に求める報告に対して、その機序を肝外因子によると考える人も多い。すなわち Takahashi ら¹⁰⁾ は、ヒトの脂肝における中性脂肪の脂肪酸組成が脂肪組織のそれと類似することから、肝内に蓄積される脂質は脂肪組織に由来することを示唆している。また Isselbacher ら¹¹⁾ は、アルコールを大量に投与したさいに上昇する血中遊離脂肪酸が脂肪組織にみられる脂肪酸と類似していたと報告している。Takahashi ら¹⁰⁾ のヒトにおける脂肝、Brodie ら¹⁰⁾ のアルコール脂肝においてはいずれも本実験で示された TH 脂肝の分析結果と同様リノール酸の増加を認め、脂肝の成因の一部が肝外にあることを主張している。したがって TH 脂肝の成因を考察するに当たってもさらに肝外の因子が重要な一因であることが示唆され、引続きこの点に焦点を合わせて研究を進めているので次報する。

四塩化炭素脂肝の成因については、Maling ら⁴⁾ は血漿中 triglyceride が低下し血漿 triglyceride への ¹⁴C-パルミチン酸の取込みが低下する一方、肝内 triglyceride への ¹⁴C-パルミチン酸の取込みが増加することから、脂肝形成の要因を肝内に求めている。しかし本報に示すごとく、四塩化炭素脂肝においても表 2 および表 3

から、リノール酸の絶対量は正常肝の湿重量 1g 当り $37.7 \times 17.3/100 = 6.5$ (mg) に対し、四塩化炭素投与後 24 時間の肝では $75.6 \times 16.0/100 = 12.1$ (mg) でその増加は明らかであり、したがって四塩化炭素脂肝についても TH 脂肝におけると同様、その成因を肝内だけの因子に限ることは論理的に困難で、さらに詳細に検討する必要があると考えられる。

結 論

1. TH 脂肝における蓄積脂肪の由来を知るための手がかりとして、正常ラット肝および四塩化炭素投与ラット肝の脂肪酸組成と TH 脂肝のそれとを比較検討した。

2. TH 脂肝においては総脂質のパルミチン酸、オレイン酸およびリノール酸の割合の増加とステアリン酸および C20 F の割合の減少がみられた。

3. オレイン酸の割合の増加およびステアリン酸の割合の減少は四塩化炭素脂肝においても著明であつたが、C20 F については、四塩化炭素脂肝では著明な増加がみられた。

4. TH の 1 回投与では肝総脂質の脂肪酸組成の変化は 6 時間後より現われ、96 時間後には正常に回復した。継続投与の場合には、変化した脂肪酸組成は TH の投与期間中そのまま持続した。

5. TH 脂肝におけるリノール酸の絶対量の増加から、TH 脂肝の成因については肝内の脂肪酸合成の促進のみならず、肝外因子も考えられる。

6. 同様に四塩化炭素脂肝についても脂肝形成においては肝内因子のみならず肝外因子が考えられ、検討の余地がある。

ご校閲賜りました大阪大学癌研坂本幸哉教授ならびにご指導、ご校閲賜りました岡山大学癌研内海耕雄助教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、実験にご協力いただいた岡山大学医学部金政泰弘講師、大阪大学医学部奥村明氏に深謝いたします。

本報告の要旨は昭和 44 年 7 月第 44 回日本結核病学会および昭和 44 年 10 月第 24 回国立病院療養所総合医学会において発表した。

なお本報告は、厚生省国立結核療養所中央個別研究費の配分を受けて行なつた研究の一部である。

文 献

- 1) 伊藤文雄・早野和夫：日本胸部臨床，23：439，昭 39。
- 2) 井上豊治・和知勤：結核，44：123，昭 44。
- 3) Creasey, W. A., Hankin, L. and Handschumacher, R. E.: J. Biol. Chem., 236: 2064, 1961.
- 4) Maling, H. M., Frank, A. and Horning, M. G.:

- Biochim. biophys. Acta, 64 : 540, 1962.
- 5) Yoshida, A. and Harper, A. E.: J. Biol. Chem., 235 : 2586, 1960.
 - 6) Windmueller, H. G.: J. Biol. Chem., 239 : 530, 1964.
 - 7) Shapiro, B. and Wertheimer, E.: Metabolism, Clin. and Exptl., 5 : 79, 1956.
 - 8) Snyder, F. and Stephens, N.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 106 : 202, 1959.
 - 9) Horning, M. G. et al.: Biochim. biophys. Res. Commun., 3 : 635, 1960.
 - 10) Brodie, B. B., Butler, W. M. Jr., Horning, M. G., Maicked, R. P. and Maling, U. M.: Am. J. Clin. Nutrition, 9 : 432, 1961.
 - 11) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.: J. Biol. Chem., 226 : 497, 1957.
 - 12) Drysdale, J. and Billimoria, J. D.: Clin. Chim. Acta, 5 : 828, 1960.
 - 13) Lombard, B.: Fed. Proc., 24 : 1200, 1965.
 - 14) Takahashi, Y. and Tanaka, K.: J. Biochem., 49 : 713, 1961.
 - 15) Isselbacher, K. T. and Greenberg, N. J.: New Eng. J. Med., 270 : 351, 1964.