

Ethionamide による脂肪肝の発現機序に関する実験的研究 (Ⅲ)

Ethionamide 脂肪肝および副辜丸脂肪組織における脂肪酸組成
の関連と血清遊離脂肪酸の変動

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 6 月 12 日

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE MECHANISM OF FATTY LIVER
FORMATION INDUCED BY ETHIONAMIDE (REPORT III)*

Fatty Acid Composition of Ethionamide-Induced Fatty Liver
and Epididymal Adipose Tissue, and Serum Free Fatty
Acid in Ethionamide-Administered Rat

Bunji INOUE and Tsutomu WACHI

(Received for publication June 12, 1970)

As to the origin of the accumulated fat in liver of ethionamide (TH)-administered rat, an extrahepatic factor was investigated.

1. Comparing the epididymal adipose tissue of normal rat with that of TH-administered one in their fatty acid composition of total lipid, there was no remarkable difference in the proportion of each fatty acid to the total.

2. TH-induced fatty liver demonstrated an intermediate pattern between normal liver and normal epididymal adipose tissue in the fatty acid composition of total lipid.

3. The administration of TH resulted no remarkable change of serum free fatty acid content in rat 6 hours later, however, it caused an increase of nearly twofold to the control 12 hours later, which was recovered 24 hours later.

4. In carbon tetrachloride-administered rat, on the other hand, the content of serum free fatty acid showed a continuous increase from 6 hours after the administration and it reached more than twofold of that in the control rat 24 hours later.

From these results, apart from any other factors, it is quite probable that in TH-administered rat as well as in carbon tetrachloride-administered one, the accumulated fat in liver was transported from the adipose tissue through circulatory flow.

緒 言

Ethionamide (以下 TH と略す) をラットに投与したさいにみられる実験的脂肪肝の成因について、われわれは第 1 報¹⁾ においてそ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。しかるに脂肪肝の発現機序に関する多くの研究から、脂肪肝形成の要因については肝内および肝外因子の複雑な組合せを考えるのが妥当と思われる。この点に関してはすでに第 2 報²⁾ に述べたごとく、実験的 TH 脂肪肝における総脂質の脂肪酸組成を

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

検討した結果、高等動物においては肝内ではほとんど合成されないとされているリノール酸の増量を認めたことから、肝における蓄積脂肪の一部が末梢脂肪組織に由来するのではないかと考察した。

本報においては、TH 脂肝の成因の一部を肝外に求める立場から TH 脂肝総脂質の脂肪酸組成を正常肝および副睪丸脂肪組織のそれらと比較し、他方 TH 投与ラットの血中遊離脂肪酸量の測定を試みたのでそ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

実験動物は、これまで報告した一連の実験において用いたものと同様、固型飼料で飼育した体重 100~150g の Donryu 系雄ラットを用いた。TH は 2-ethylthioisonicotinamide (塩野義製薬) 原末を乳鉢でさらに細かく磨砕し、所定量を蒸留水に懸濁させたものを耳鼻科用水銃で経口的に胃内に注入した。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) 5ml/kg 体重を、その対照には同量の流動パラフィンのみを同様に経口投与した。

II. 実験材料

一夜絶食させた動物の頸動脈を切断し、血清中の遊離脂肪酸を定量する目的で可及的に大量の採血を行なった。採血後ただちに開腹し、総脂質の脂肪酸組成を分析する目的で肝および副睪丸脂肪組織を取り出し以下の実験に供した。

III. 肝および副睪丸脂肪組織総脂質の抽出

肝および副睪丸脂肪組織よりの総脂質の抽出は、前報²⁾に示す肝の総脂質の抽出と同様 Folch の方法³⁾に従った。

IV. 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

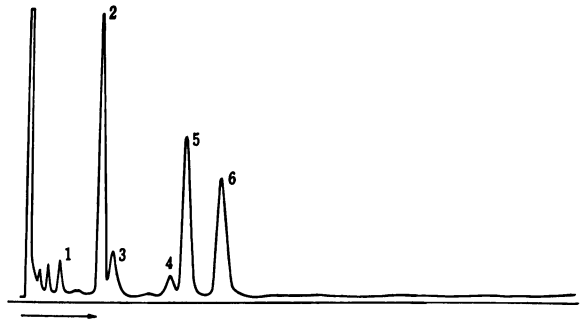
肝および副睪丸脂肪組織の総脂肪酸のメチル化は、IIIの方法で得られた試料を用いて前報²⁾と同様の方法で行なった。またガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分析方法ならびに測定条件についても前報²⁾と同様である。すなわち、装置は Biomedical Gaschromatograph Model 400 (F & M Scientific Corporation Avondale, PA.), ガラスカラム 3mm×2,000mm, 担体 celite 60~80 mesh (島津), 液相 diethyleneglycol succinate 15%, キャリアーガス, 窒素, 流速 100~120ml/min, カラム温度 180°C, 検出器は水素炎イオン化方式検出器を用いた。

V. 肝総脂肪酸の定量

肝総脂肪酸の定量は III の方法により得られた試料を用いて、前報同様 Drysdale の方法⁴⁾で行なった。

VI. 血清遊離脂肪酸の定量

Fig. 1. Gas-Chromatographic Pattern of Total Fatty Acid in the Epididymal Adipose Tissue of Control Rat



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

Table 1. Fatty Acid Composition of the Epididymal Adipose Tissue in the Control and Ethionamide-Administered Rats (Percentage to the total)

Group	Fatty acids					
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
Control	3.4	29.0	8.2	3.3	24.7	27.6
TH 400 mg/kg 24 hr.*	4.7	27.5	7.6	3.2	27.3	23.9

* Time after administration of single dose of TH. Each figure shows the mean of four animals.

血清遊離脂肪酸の定量は板谷らの方法⁵⁾に従った。すなわち蓋付き試験管に chloroform 6ml, 0.2M 磷酸緩衝液 (pH 6.2) 1ml および血清 0.2ml を加えて 90 秒間激しく振盪したあと 15 分間放置, 上層と蛋白沈殿を毛细管ピペットで吸引除去した。chloroform 層を別の蓋付き試験管に移し, これに 3ml の銅試薬 (1M triethanolamine 9 容: 1N 酢酸溶液 1 容: 6.45% 硝酸銅溶液 10 容) を加え 30 回振盪, 15 分間放置した後銅試薬を吸引除去した。残った chloroform 層を濾過し, 濾液にジエチルジチオカルバミン酸試薬 (Na-diethyldithiocarbamate の 0.1% (w/v) n-butanol 溶液) 0.5 ml を加え, 黄褐色に呈色したものを Beckman B 型分光光度計を用いて 440mμ の波長で比色定量した。

結 果

I. 正常および TH 投与ラットの副睪丸脂肪組織における総脂質の脂肪酸組成

前報²⁾において TH の投与により肝脂質が増量することを認めたが、この場合、肝における脂肪酸合成の促進のほかに、末梢脂肪組織から肝への脂質の移行増進という因子も考えられるので、これを検討する手段として、まず TH 脂肝の総脂質の脂肪酸組成と副睪丸脂肪組織総脂質の脂肪酸組成とを比較した。

図 1 は正常ラットの副睪丸脂肪組織における総脂質の

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。表1は正常ラット副睪丸脂肪組織の脂肪酸組成とTH投与ラット同組織の脂肪酸組成を比較したものである。表1における脂肪酸組成の数値は、ガスクロマトグラフィーにより得たパターンより各ピークの百分率を半値幅法により算出したものである。なお、このさいのTH投与量は脂肪肝を形成するのに十分な量である。これらの図表の結果より正常ラット副睪丸脂肪組織における総脂質の脂肪酸組成は、パルミチン酸(C16:0)が29.0%で最も多く、ついでリノール酸(C18:2)27.6%、オレイン酸(C18:1)24.7%、パルミトオレイン酸(C16:1)8.2%、ミリスチン酸(C14:0)3.4%およびステアリン酸(C18:0)3.3%の順であつた。

これに対してTH 400mg/kg投与24時間後のラットにおける同組織の総脂質脂肪酸組成をみると、C16:0が27.5%で最も多く、ついでC18:1 27.3%、C18:2 23.9%、C16:1 7.6%、C14:0 4.7%およびC18:0 3.2%の順となり、C18:2の割合がわずかに減少しているが、いずれも正常ラット副睪丸脂肪組織における組成と有意な差は認められない。

II. 正常ラット肝、TH脂肪肝および正常ラット副睪丸脂肪組織における総脂質の脂肪酸組成の比較

図2は正常ラット肝、TH脂肪肝および正常ラット副睪丸脂肪組織における総脂質の脂肪酸組成を比較したものである。3者のうち正常肝および正常副睪丸脂肪組織を比較すると、その脂肪酸組成は著しく異なる。すなわち後者においてはC20F(アラキドン酸を主体とする分画)が認められず、またC18:0の割合も著しく少なく前者の1/7にすぎない。これに対してC16:0は前者の1.4倍、C16:1 7倍、C18:1 2.5倍、C18:2 1.5倍となつている。またTH脂肪肝における総脂質の脂肪酸組成は、明らかに正常肝および正常副睪丸脂肪組織脂肪酸組成の中間型を示している。

III. ラット血中遊離脂肪酸に対するTHならびに四塩化炭素の影響

脂肪組織から脂肪が運び出されるときは遊離脂肪酸の形で遊出する^{9)・10)}から、脂肪組織から肝への脂質の移行が促進されている状態では血中の遊離脂肪酸の増加が認められるはずである。そこでTH投与時におけるラット血中遊離脂肪酸の変動を検討した。表2はTH 400mg/kgを1回投与したときの血中の遊離脂肪酸量を測定したものである。その結果前報²⁾で示したごとく、肝総脂肪酸の増加に伴いTH投与後12時間で血中遊離脂肪酸の著明な増加が認められた。血中遊離脂肪酸の増加は四塩化炭素を投与したさいにもみられた(表2)が、この場合の増加はさらに著明であつた。またTH投与群では12時間後のピークのあと24時間後に血中遊離脂肪酸量は正常値に復帰したが、四塩化炭素投与群のそれは投与後24時間まで引き続き増加が認められた。

なお、これらの実験と並行して、顕微鏡の病理組織所見により脂肪肝が形成されていることを確認した。

考 察

脂肪肝の成因については飢餓¹¹⁾¹⁰⁾による脂肪肝をはじめアルコール脂肪肝¹¹⁾¹²⁾、ニコチン酸脂肪肝¹³⁾およびエチオニン¹⁴⁾¹⁵⁾、四塩化炭素¹⁶⁾、オロチン酸¹⁷⁾などの薬物による各種の実験的脂肪肝においてその生成機構が追究され、脂肪肝形成の要因を肝内および肝外の因子についてそれぞれの観点から検討が加えられている。しかし脂肪肝の生成は実際にはいくつかの因子の組合せによつて起こる場合が多いと考えるのが妥当であろう。

Recknagelら¹⁸⁾は四塩化炭素による急性脂肪肝は肝のリポ蛋白生成障害による肝からのtriglyceride放出の低下が原因であろうと考えており、また一方Malingら¹⁹⁾は、肝における脂肪酸合成の促進をあげるなど、脂肪肝の成因には複数の因子が直接あるいは間接に作用していることを示している。さらにアルコール脂肪肝について、肝に蓄積される脂質が末梢脂肪組織に由来することを示すIsselbacher¹⁹⁾やBrodieら¹²⁾およびHorningら²⁰⁾の成績は脂肪肝の成因を肝外に求めるものであり、こ

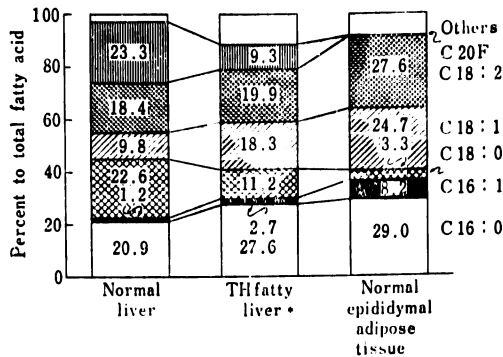
Table 2. Serum Free Fatty Acid and Total Fatty Acid in Liver of Ethionamide or Carbon Tetrachloride-Administered Rat

Time after administration		Hours			
		0	6	12	24
TH*	Serum free fatty acid (mean ± S.D.)	659 ± 141	599 ± 120	1,221 ± 199	644 ± 86
	Total fatty acid of liver (mean)	34.5	58.9	—	72.4
CCl ₄ **	Serum free fatty acid (mean ± S.D.)	649 ± 218	743 ± 151	968 ± 40	1,472 ± 205
	Total fatty acid of liver (mean)	37.7	66.3	—	75.6

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

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

Fig. 2. Fatty Acid Composition of the Total Lipid



* 24 hours after administration of single dose of 400 mg TH/kg body weight.

れに対して高濃度のアルコールを投与したさいに、肝からの triglyceride 放出が低下することを示した Schapiro ら²¹⁾の成績は、脂肪肝の成因の一部として肝内因子を指摘するものである。

われわれは第1報¹⁾において、TH 投与ラット肝細胞可溶分画中のグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性が著明に上昇することから、TH 脂肪肝生成の一因が肝における脂肪酸合成の促進にある可能性を推測した。しかし一方第2報²⁾において、TH 脂肪肝の総脂質量の著明な増加と総脂肪酸中リノール酸量の増加を認めたことから、その原因として肝外因子についても検討する必要があることを示唆した。

このような考察に基づいて、本報においては脂肪組織として副睾丸脂肪組織を選びその総脂質脂肪酸組成を分析し、その組成に対するTHの影響を検討するとともに正常ラット肝、TH 脂肪肝および正常副睾丸脂肪組織の総脂質脂肪酸組成を比較することにより脂肪肝形成のさいの肝外因子の可能性について追究した。その結果TH投与ラット副睾丸脂肪組織の脂肪酸組成は正常ラットの同組織とほとんど差が認められない。これに反しTH脂肪肝における各脂肪酸成分の割合は著明に変化しその成分パターンは正常肝および正常副睾丸脂肪組織のそれらとの中間的な関係を示し(図2)、TH脂肪肝において肝に蓄積される脂質の一部は脂肪組織に由来することを示唆する。

Brodie ら¹²⁾はアルコール脂肪肝形成のさいに、血中の遊離脂肪酸が著明に増加することから、肝内に蓄積された脂質が末梢脂肪組織に由来することを示している。本報においてもこの点を検討するためTH投与後の血中遊離脂肪酸の変動を測定し、脂肪肝形成の途中においてその著明な増加が認められた。しかし表2に示すごとく、TH投与後6時間の肝総脂肪酸量は対照の約70%増加しているが血中遊離脂肪酸の増加はみられない。このことからTHによる脂肪肝の発現機序に関して、末梢脂肪組

織より肝への脂質の移行増進が初期の要因であるか否かを論ずることは困難であるが、これを決定するためにはこの場合同時に血中より肝への脂肪酸の取り込みについても検討する必要がある。すなわち脂肪組織から血中への脂肪酸の放出が実際に促進されている場合でも、他方において、血中より肝への取り込みが増進することにより、血中の遊離脂肪酸量が平衡を保つことになり一定値を保持することも考えられる。ヒトに大量のアルコールを投与すると、血中遊離脂肪酸量は正常であるにもかかわらず肝には脂肪の沈着がみられるという²²⁾。

四塩化炭素による脂肪肝におけるごとく、その成因を肝内に求め説明するものが多い。しかしBarrett ら¹⁰⁾は肝内に蓄積した脂肪の大部分が末梢脂肪組織に由来することを示しており、われわれの一連の実験においても、前報²⁾のごとくTH脂肪肝や四塩化炭素脂肪肝におけるリノール酸の実質的な増加および表2の結果から、その成因の一部として肝外因子の存在が指摘される。

以上THによる脂肪肝形成の肝外因子として、末梢脂肪組織より肝への脂質の移行に関し若干の考察を加えた。しかしTH脂肪肝の成因についてはさらに肝より血中への脂質の遊出阻害をあげることができる。肝内から脂肪が運び出されるさいには β -リポ蛋白であることが知られているが、肝内における β -リポ蛋白の生成阻害¹⁷⁾²³⁾²⁴⁾あるいはその放出機構の阻害が脂肪肝形成の原因と考えられている場合もあり、この点に関して実験を進めているので次報する。

結 論

1. THによる脂肪肝形成の肝外因子として、末梢脂肪組織から肝への脂質の移行を示唆する事実を明らかにした。
2. 正常およびTH投与ラット副睾丸脂肪組織における総脂質の脂肪酸組成を比較すると、各脂肪酸含量の割合は両者の間に著しい差が認められない。
3. TH脂肪肝、正常肝および正常副睾丸脂肪組織における総脂質の脂肪酸組成を比較すると、TH脂肪肝の脂肪酸パターンは正常肝と副睾丸脂肪組織の脂肪酸パターンの中間型を示す。
4. TH投与後の血中遊離脂肪酸量は、6時間では変化がなく、12時間で対照の約2倍の増加を示し、24時間では正常に復帰する。
5. これに対し四塩化炭素投与ラットでは、血中遊離脂肪酸量は6時間後より増加が示され、24時間後には対照の2倍以上に増加する。
6. 本実験での結果を総合して、末梢脂肪組織から肝への脂質の移行がTH脂肪肝成因の一部となりうることを考察した。

ご校閲賜りました大阪大学癌研坂本幸哉教授ならびに岡山大学癌研内海耕健助教授に深甚なる謝意を表します。

本報告の要旨は昭和44年7月第44回日本結核病学会総会および昭和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) 井上豊治・和知勤：結核，44：123，昭44.
- 2) 井上豊治・和知勤：結核，45：115，昭45.
- 3) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.: J. Biol. Chem., 226: 497, 1957.
- 4) Drysdale, J. and Billimoria, J. D.: Clin. Chim. Acta, 5: 828, 1960.
- 5) Itaya, K. and Ui, M.: J. Lipid Res., 6: 16, 1965.
- 6) 奥田拓道・柳育子・藤井節郎：Proc. Symposium Chem. Physiol. Pathol., 3: 107, 1963.
- 7) 奥田拓道・柳育子・藤井節郎：第17回酵素化学シンポジウム予講集，1965.
- 8) Maickel, R. P. and Yamada, K., "Advances in Enzyme Regulation", Vol. 1, p. 235, 1963.
- 9) Mac Lachlan, P. L., Hadge, C. H., Bloor, W. R., Welch, E. A., Traux, F. L. and Taylar, J. D.: J. Biol. Chem., 143: 473, 1942.
- 10) Barret, H. M., Best, C. H. and Ridout, J. H.: J. Physiol., 93: 367, 1938.
- 11) Luzio, N. R. D.: Am. J. Physiol., 194: 453, 1958.
- 12) Brodie, B. B., Butler, W. M., Jr., Horning, M. G., Maickel, R. P. and Maling, H. M.: Am. J. Clin. Nutrition, 9: 432, 1961.
- 13) Rikans, L. L., Arata, D. and Cederquist, D. C.: J. Nutrition, 82: 83, 1964.
- 14) Villa-Trevino, S., Shull, K. H. and Fraber, E.: J. Biol. Chem., 238: 1757, 1963.
- 15) Shull, K. H. and Villa-Trevino, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 16: 101, 1964.
- 16) Maling, H. M., Frank, A. and Horning, M. G.: Biochim. Biophys. Acta, 64: 540, 1962.
- 17) Windmueller, H. G.: J. Biol. Chem., 239: 530, 1964.
- 18) Recknagel, R. O. and Lombardi, B.: J. Biol. Chem., 236: 564, 1961.
- 19) Isselbacher, K. T. and Greenberger, N. J.: New Eng. J. Med., 270: 351, 1964.
- 20) Horning, M. G. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 3: 635, 1960.
- 21) Schapiro, R. E. et al.: Clin. Res. 10: 234, 1962.
- 22) Lieber, C. S., Jones, D. P., Mendelson, J. and De Carli, L. M.: Trans. Assoc. Am. Physicians, 76: 286, 1963.
- 23) Forbes, J. C., Petterson, D. M. and Rudolph, R. A.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 118: 59, 1965.
- 24) Robinson, D. S. and Seakins, A.: Biochim. Biophys. Acta, 62: 163, 1962.