

原 著

Ethionamide による脂肪肝の発現機序に関する実験的研究 (IV)

—Ethionamide 投与ラットにおける ^{14}C -acetate
の肝脂質への取り込み—和 知 勤・井 上 豊 治
内 能 美 義 仁・伊 藤 三 千 穂

国立療養所近畿中央病院

受付 昭和 47 年 9 月 20 日

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE MECHANISM OF FATTY
LIVER FORMATION INDUCED BY ETHIONAMIDE (IV)*—Incorporation of [$2\text{-}^{14}\text{C}$] Acetate into the Liver Lipids
of Ethionamide-Administered Rats—

Tsutomu WACHI, Bunji INOUE, Yoshihito UCHINOMI and Michio ITO

(Received for publication September 20, 1972)

In order to clarify the mechanism of fatty liver formation by ethionamide, the effects of ethionamide on the fatty acid synthesis in rat liver were investigated.

Male Donryu rats weighing 100 to 130g were used. Pure ethionamide (2-ethyl-thioisonicotinamide) suspended in distilled water was given orally through stomach tube. Rats were sacrificed within 48 hours after single administration of ethionamide, livers removed and the specific activities of NADPH₂ generating enzymes in the soluble fraction of liver were measured spectrophotometrically.

Another experiments were performed with regard to the incorporation of [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate into the liver lipids of ethionamide-administered rats. Each rat received intraperitoneally $10\mu\text{Ci}$ of sodium acetate- $2\text{-}^{14}\text{C}$ (3.75 mCi/m mole) at some time after the administration of ethionamide and was sacrificed 3 hours later. Liver total lipids were extracted according to the procedure of Folch et al. Total lipids evaporated to dryness under nitrogen were dissolved in a small amount of chloroform, treated with acetone and then separated into two portions; acetone soluble and insoluble fractions. The former neutral fat fractions were evaporated to dryness and dissolved in 10ml of chloroform. The latter phospholipid fractions were dissolved in 3ml of chloroform. After evaporation of aliquots of the lipid extracts to dryness, total lipid, neutral fat and phospholipid were measured gravimetrically. Another aliquots of the lipid extracts were added 15ml of scintillation fluid and the radioactivities were assayed with a liquid scintillation spectrometer (Packard Model 3003). The results obtained were as follows.

There were no remarkable changes in the NADPH₂ generating enzyme activities of both 200mg and 400mg per kg body weight of ethionamide-administered rat liver.

Incorporation of ^{14}C -acetate into the total liver lipids of ethionamide-administered rats increased remarkably, and showed approximately three times the specific radioactivity of the control rat liver 3

* From the National Sanatorium Kinki Central Hospital, 1180 Nagasone-cho, Sakai-shi, Osaka 591 Japan.

hours after the administration of ethionamide. Furthermore, it was found that the incorporation of ^{14}C -acetate increased particularly in the neutral fat fraction.

It has been demonstrated that incorporation of ^{14}C -palmitate into the liver lipids increased in carbon tetrachloride-administered rats, and that incorporation of ^{14}C -acetate into the liver triglyceride increased remarkably also in orotic acid-administered rats. Other investigators suggested that the stimulation of hepatic fat synthesis might be a significant factor contributing to the development of fatty liver. Another report from this laboratory and the results presented above suggest that the utilization of acetate in the liver of ethionamide-administered rats increases and, as a result of the stimulation of fatty acid synthesis, the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase rises in accordance with increased requirement of NADPH_2 . As described in another report, however, an increased import of lipid into the liver from adipose tissue was observed in the case of a high dose administration of ethionamide. It is necessary, therefore, to investigate more minutely the relation between these factors contributing to the development of fatty liver.

緒 言

Ethionamide (TH) を継続投与したラットにおいて、肝細胞可溶分画中のブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素 (G 6 PDH) の活性が著明に上昇することから、われわれは TH 脂肝の成因の一つが、肝内における脂肪酸合成の促進と関連があることを推測したり。しかしその後の実験により、大量の TH を1回投与したラット肝では、脂肪の著明な肝内蓄積が認められるにもかかわらず、G 6 PDH の活性は必ずしもこれと平行しないことを認めた。そこで肝内脂肪酸合成系に及ぼす TH の作用をさらに検討するため、TH 投与ラットにおける ^{14}C -acetate の肝脂質への取り込みを調べたので、その結果について報告する。

研究 方法

1. 実験動物

実験動物には、固型飼料 (ゼネラル MR-1, 実験動物関西研究所) で飼育した体重 100~130 g の呑竜系雄ラットを用いた。

2. 薬剤の投与方法

TH は 2-ethyl-thioisonicotinamide の純末 (塩野義製薬) を乳鉢で磨砕した後蒸留水に懸濁し、200 mg または 400 mg/kg 体重を耳鼻科用水銃を用いて、強制的に経口投与した。対照には同量の生食水を同様にして与えた。

3. NADPH_2 産生酵素活性の測定法

NADPH_2 産生酵素試料の調製法および酵素活性の測定法は前報¹⁾ 同様である。

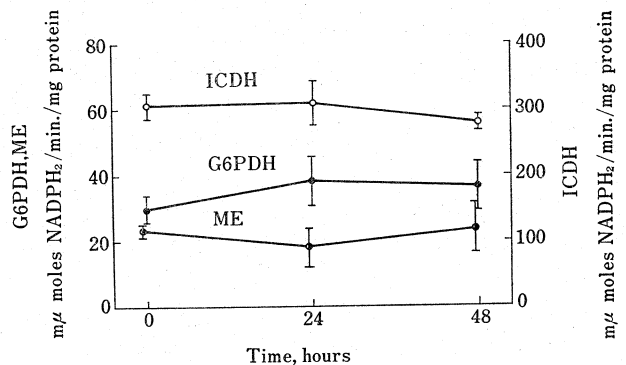
4. ^{14}C -acetate の肝脂質への取り込み測定法

前述のごとく TH を経口投与した後3時間、6時間および24時間絶食したラットの腹腔内

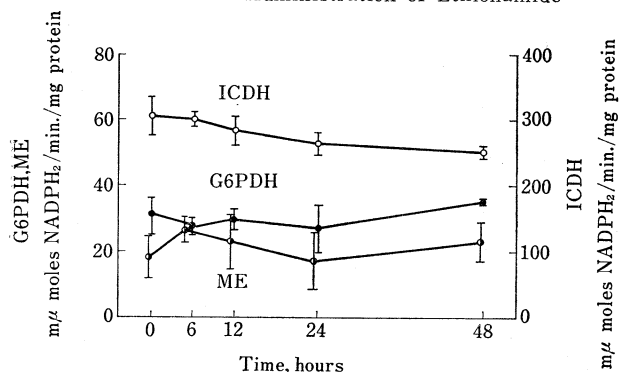
に sodium acetate- $2\text{-}^{14}\text{C}$ 10 μCi (3.75 mCi/m mole) を注射した。3時間後に断頭脱血し直ちに開腹、氷冷生食水で灌流した後取り出した肝の重量を測定し、前報²⁾のごとく Folch らの方法³⁾ により肝総脂質を抽出した。

総脂質試料をなす型コルベンにとり、毛細ガラス管で窒素ガスを通じながら 60° の水浴上で減圧濃縮した。これを 1 ml のクロロホルムに溶かし、10 ml のアセトンを加えた。氷室に1夜放置した後、遠沈によりアセトン可溶部と不溶部を分離し、可溶部を中性脂肪分画とした。沈渣はリン脂質分画とし、10 ml のアセトンを加えてさらに1夜氷室に放置した。分離した沈渣を 3 ml のクロロホルムに溶かし、以下の測定に用いた。

Fig. 1. Activities of NADPH_2 Generating Enzymes in Rat Liver after Administration of Ethionamide



200 mg/kg body weight of ethionamide was given orally through stomach tube. Rats starved over night were sacrificed by decapitation at the indicated time after the administration of ethionamide. Livers were homogenized in 9 volumes of ice-cold medium containing 0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM Tris (pH 7.4), and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 minutes. The supernatant solutions were further centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 minutes, and used as crude enzyme solutions. Enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G 6 PDH), malic enzyme (ME) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) were measured spectrophotometrically by increase of NADPH_2 at 340 m μ , at 25° .

Fig. 2. Activities of NADPH₂ Generating Enzymes in Rat Liver after Administration of Ethionamide

400 mg/kg body weight of ethionamide was given orally through stomach tube. Another conditions were same as in Fig. 1.

上記のごとくして得られた各肝脂質試料の一定量を蒸発乾固し、総脂質、中性脂肪およびリン脂質量をそれぞれ重量法により測定した。また各脂質試料 1 ml に、1 l 中 1,4-bis-2-(5 phenyloxazolyl) benzene (POPOP) 200 mg, 2,5-diphenyloxazole (DPO) 5g を含むトルエン 20 容とエタノール 1 容との混合液 15 ml を加え、液体シンチレーションカウンター (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Model 3003) で放射能を測定した。

結果

1. TH の大量 1 回投与ラットにおける肝 NADPH₂ 産生酵素活性

図 1 は TH 200 mg/kg 体重を 1 回投与後 24 時間および 48 時間のラットにおける、肝 NADPH₂ 産生酵素の活性を測定した結果である。イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH), リンゴ酸酵素 (ME) とともに活性の変動はなく、また G6PDH はわずかに活性の上昇する傾向がみ

られるが、その変動は必ずしも著明ではない。図 2 は TH 400 mg/kg 体重を 1 回投与した際の酵素活性を示したものであるが、TH 投与後 48 時間までの 3 酵素の活性は著明な変動がみられない。

2. TH の大量 1 回投与ラットにおける ¹⁴C-acetate の肝脂質への取り込み

表 1 は TH 200 mg/kg 体重投与後 3 時間、6 時間および 24 時間のラットに ¹⁴C-acetate を投与した際の、肝総脂質量の変化および ¹⁴C-acetate の肝総脂質への取り込みを示したものである。TH 投与肝では ¹⁴C-acetate の取り込みの増加が著しく、総脂質 1 mg 当り 1 分間の比放射能は、TH 投与後 3 時間で最も高く対照

の約 3 倍に達し、同 6 時間約 1.8 倍、同 24 時間約 1.3 倍となつている。

表 2 は TH 200 mg/kg 体重投与後 3 時間のラットについて、肝総脂質を中性脂肪を主とするアセトン可溶部およびアセトン不溶部 (リン脂質) に分画し、それぞれの量的変化と ¹⁴C-acetate の取り込みを調べた結果である。表 1 に示すごとく、TH 投与後 3 時間の肝総脂質量の変化はきわめてわずかであり、中性脂肪およびリン脂質の量的変化は認められない。しかるに TH 投与肝では ¹⁴C-acetate の取り込みの増加が著明であり、特に中性脂肪分画への取り込みが著しく、対照の 2.7 倍となつている。この傾向は TH 投与後 6 時間の肝においても認められるが、TH 投与後 3 時間の肝におけるほどは著明ではない。

考 察

脂肪酸の生合成の際には ATP⁴⁾, CoA⁵⁾, NADPH₂⁶⁾⁷⁾ 等の補酵素が代謝調節因子として取り上げられてきた

Table 1. Total Lipid Content and Incorporation of [2-¹⁴C] Acetate into the Liver Lipid of Ethionamide-Administered Rats

	Total lipid mg/g liver (Mean ± S · D)	cpm / mg lipid (Mean ± S · D)
Control (3)	51.3 ± 3.2	263.0 ± 17.0
3 hrs post-TH (5) **	67.2 ± 7.0	830.7 ± 224.3
Control (3)	65.0 ± 6.8	274.7 ± 125.5
6 hrs post-TH (5) **	78.5 ± 3.9	485.6 ± 26.0
Control (3)	60.3 ± 3.8	254.3 ± 57.5
24 hrs post-TH (5) **	119.1 ± 16.7	339.5 ± 32.0

* Wet weight.

** 200mg/kg of ethionamide was given orally through stomach tube.

Each rat received intraperitoneally 10 μCi of [2-¹⁴C] acetate (3.75mCi/m mole) 3, 6 and 24 hrs after the administration of ethionamide. They were sacrificed 3 hrs later, liver total lipid extracted in chloroform-methanol (2 : 1) and the radioactivity assayed with a liquid scintillation spectrometer.

Table 2. Lipid Content and Incorporation of (2-¹⁴C) Acetate into the Liver Lipids of Ethionamide-Administered Rats

	Total lipid		Acetone soluble fraction		Acetone insoluble fraction	
	mg/g liver*	cpm/mg	mg/g liver*	cpm/mg	mg/g liver*	cpm/mg
Control (5) ***	46.9	260.3	15.2	275.6	29.6	684.5
3 hrs post-TH (5)	53.1	360.5	15.9	735.5	29.7	798.4

* Wet weight.

** 200mg/kg of ethionamide was given orally through stomach tube.

Each rat received intraperitoneally 10 μ Ci of (2-¹⁴C) acetate (3.75 mCi/m mole) 3 hrs after the administration of ethionamide. They were sacrificed 3 hrs later, liver total lipid extracted and treated with acetone, and the radioactivity assayed.

が、中でも NADPH₂ による脂肪酸合成の調節は、興味ある問題としてしばしば指摘されるところである⁸⁾⁹⁾。脂肪酸合成の促進によって増大する NADPH₂ の要求に関しては、絶食後再び食餌を与えることにより、ラット肝では G 6 PDH の活性が著明に上昇すること¹⁰⁾¹¹⁾、また糖尿病肝ではこれが低下する¹¹⁾¹²⁾ ことなどから、G6PDH が主要な役割を果たしているものと考えられている。高橋ら¹³⁾ はオロチン酸脂肝および食餌性脂肝において、HMP 系の亢進と脂肪酸合成酵素活性の上昇が同時に観察されることを報告している。しかし図 1 および図 2 に示すごとく、TH の大量 1 回投与の際には、肝内に著明な脂肪の蓄積が認められるにもかかわらず、肝細胞上清分画の G 6 PDH は明らかな活性の上昇が認められない。このことは、TH 脂肝の成因に関しては、G 6 PDH の活性上昇が少なくとも脂肝形成初期の律速因子ではないことを示唆するのかもしれない。いずれにせよ、TH 投与肝では ¹⁴C-acetate の肝内脂質への取り込みの増加が著しく、TH 投与後比較的短時間のうちに、しかも特に中性脂肪分画への取り込みの増加が著しいので、肝内における脂肪酸合成の亢進を否定することはできない。

四塩化炭素脂肝における ¹⁴C-パルミチン酸の triglyceride への取り込みの増加¹⁴⁾、オロチン酸投与¹⁵⁾あるいはスレオニン欠乏脂肝¹⁶⁾における ¹⁴C-acetate の肝脂質への著明な取り込みの増加等、脂肝形成の要因の一つが肝内における脂肪酸合成の亢進にあるとする見解は多数報告されている。これまでに報告した結果¹⁾ ならびに今回得られた実験結果から、TH 投与ラット肝では acetate の利用亢進により脂肪酸合成が induce される結果、増大する NADPH₂ の要求に対応して G 6 PDH の活性が上昇するという推論が可能である。しかし TH の大量 1 回投与の場合には、これまでの一連の実験結果²⁾¹⁷⁾ から、むしろ末梢脂肪組織から肝への脂質の移行増進が主要な因子であろうと考えられるが、それにもかかわらず ¹⁴C-acetate の取り込みに著明な増加が認められることは、TH 脂肝の形成には肝外因子のみならず、脂肪酸合成の促進等肝内因子の関与を示唆するものであろう。

結 論

1. TH を大量に 1 回投与したラット肝について、脂肪酸合成に際して要求される NADPH₂ の産生に関与していると考えられている G 6 PDH, ME および ICDH の酵素活性を調べた結果、いずれも著明な変化は認められなかった。
2. ¹⁴C-acetate の肝総脂質への取り込みは著明に増加し、TH 投与後 3 時間で対照の 3 倍以上に達した。
3. また肝総脂質をアセトンで分画すると、¹⁴C-acetate の取り込みは特に中性脂肪を主とするアセトン可溶部において著しい増加を示した。
4. これらの結果から、TH 脂肝の形成には脂肪組織より肝への脂質の移行増進のほか、肝内における脂肪酸合成の促進があり、脂肝形成に関する他の要因およびこれら各因子相互間の関連についての総合的な検討が必要である。

本報告の要旨は、昭和 46 年 9 月第 26 回国立病院療養所総合医学会および昭和 47 年 4 月第 47 回日本結核病学会総会において発表した。なお本報告は、科学技術庁国立機関原子力試験研究費の配分を受けて行つた研究の一部である。

文 献

- 1) 井上豊治・和知勤：結核，44：123，1969.
- 2) 井上豊治・和知勤：結核，45：115，1970.
- 3) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.: J. Biol. Chem., 226: 497, 1957.
- 4) Hall, J. C., Sordahl, L. A. and Stefko, P. L.: J. Biol. Chem., 235: 1536, 1960.
- 5) Brady, R. O., Mamoon, A. M. and Stadtman, E. R.: J. Biol. Chem., 222: 795, 1956.
- 6) 今井陽：生化学，33：637，1961.
- 7) 今井陽：生化学，34：428，1962.
- 8) 弓狩康三・松田友宏・三瀬徹・須田正巳：医化学シンポジウム，3：43，1963.
- 9) Bortz, W., Abraham, S. and Chaikoff, I. L.: J. Biol. Chem., 238: 1266, 1963.

- 10) 弓狩康三・松田友宏・須田正巳：医化学シンポジウム, 4: 43, 1964.
- 11) Glock, G. and McLean, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 16: 446, 1955.
- 12) Matthes, K. J., Abraham, S. and Chaikoff, I. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 568, 1963.
- 13) 高橋忠雄・坪井栄一：日本消化器病学会雑誌, 61: 437, 1964.
- 14) Maling, H. M., Frank, A. and Horning, M. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 64: 540, 1962.
- 15) Creasey, W. A., Hankin, L. and Handshumacher, R. E.: *J. Biol. Chem.*, 236: 2064, 1961.
- 16) Wilfred, G. and Varma, T. N. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 187: 442, 1969.
- 17) 井上豊治・和知勤：結核, 45: 207, 1970.