

原 著

Ethionamide による脂肪肝の発現機序に関する実験的研究 (V)

Ethionamide 投与ラットにおける肝および
血清総コレステロール値の変動

井上 豊 治・吉村 伸 夫・和 知 勤

国立療養所近畿中央病院

受付 昭和 47 年 10 月 9 日

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

Liver and Serum Total Cholesterol in Ethionamide-administered Rats

Bunji INOUE, Nobuo YOSHIMURA and Tsutomu WACHI

(Received for publication October 9, 1972)

Some experiments were supplemented concerning the factors of fatty liver development induced by the oral administration of ethionamide (2-ethyl-thioisonicotinamide) to rats.

1) The liver total cholesterol level showed an increase of approximately 30% at 24 hours after the administration of ethionamide (200 or 400mg per kg body weight).

2) On the other hand, the serum total cholesterol level fell remarkably after the administration of ethionamide: it showed a decrease of 34.1% at 24 hours after the administration of 200mg ethionamide per kg body weight, and a decrease of 45.4% in the case of 400mg ethionamide per kg body weight.

3) There was a similar tendency both in the liver and serum total cholesterol levels of carbon tetrachloride-administered rats.

4) There was no obvious change in the serum GOT activity, whereas the serum GPT was twice as active as that of the control after the administration of ethionamide (400mg per kg body weight).

5) In carbon tetrachloride-administered rats, both GOT and GPT activities increased excessively.

6) From the results mentioned above and also of previous papers, it is suggested that the lipoprotein synthesis in liver or the release of lipids from liver to plasma may be impaired because of the injuries of hepatic cells in ethionamide-administered rats, and therefore these factors may have some influence on fatty liver development together with other factors.

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

緒 言

Ethionamide (TH) 投与ラットにみられる脂肪肝の発現機序については、これまでに肝内における脂肪酸合成の促進¹⁾²⁾、肝における脂肪酸の酸化分解能の低下³⁾および脂肪組織から肝への脂質の移行増進⁴⁾等の各因子について検討を加えてきた。その結果、TH を連日投与したラットでは肝上清分画のブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の活性が著明に上昇し¹⁾、また TH を大量に1回投与したラットでは、¹⁴C-acetate の肝脂質への取り込みが著明に増加する²⁾ ことなどから、肝内脂肪酸合成の亢進が考えられた。一方、正常ラットおよび TH 投与ラットの肝ならびに副率丸脂肪組織総脂質の脂肪酸組成を比較することにより、末梢脂肪組織から肝への脂質の移行増進が TH による肝脂形成の一因をなしていることを明らかにした²⁾³⁾。

各種の脂肪肝においてみられるように、脂肪肝の成因は単一ではなく、むしろいくつかの因子が相互に作用することによつて脂肪肝が形成されると考えられる。この点に関し、TH 脂肪肝において、さらに肝より血中への脂質の放出低下と密接な関連があると思われる事柄について若干の検討を加えたので追加報告したい。

材料および方法

1. 実験動物・飼料および薬剤の投与

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 100~130g の呑竜系雄ラットを用いた。TH は原末 (2-ethyl-thioisonicotinamide, 塩野義製薬) を乳鉢で磨砕し、蒸留水に懸濁したものを、耳鼻科用水銃で強制的に経口投与した (200 または 400 mg/kg 体重)。対照には同量の生食水を同様に与えた。また比較のための四塩化炭素は、流動パラフィンと

の混合液 (1:1, v/v) 5 ml/kg 体重を、その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。

2. 血清および肝総コレステロール値の測定

血清総コレステロール値の測定には、あらかじめ絶食したラットの頸動脈を切断し、流出血液をビーカーに採集、しばらく室温に放置したあと遠心分離して得られた血清を用いた。測定は Cholesterol Test Wako (和光純薬工業) を用い、日常の臨床検査方法に従つて行つた。また同時に従来の Zak-Henly 法⁵⁾⁶⁾ の変法による測定もあわせて行つた。

肝総コレステロール値の測定には、Folch ら⁷⁾ の方法による抽出液を用いた。すなわち肝組織 1g に対しクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) 20 ml を加えてホモゲナイズし、室温で2時間攪拌抽出したあと濾過、残渣に約 10 ml のクロロホルム・メタノールを加えてさらに2回抽出した。抽出液を合わせて 0.2 倍容の 0.73% 食塩水を加え、分液漏斗中で 10 秒間振盪したあと氷室に一夜放置した。クロロホルム層を分離し、0.5 ml を小型共栓付試験管にとつてデシケーター中で減圧乾固したあと、血清の場合と同様にして総コレステロール値を測定した。

3. 血清トランスアミナーゼ活性の測定

血清 GOT および GPT の活性の測定には前記 (1) 試料を用い、血清トランスアミナーゼ試薬セット (栄研) を用いて Reitman-Frankel 法⁸⁾ に従つて行つた。

結 果

1. TH および四塩化炭素投与ラットの血清総コレステロール値

表1は TH (200 または 400 mg/kg 体重) および四塩化炭素・流動パラフィン混合液 (5 ml/kg 体重) を経

Table 1. Serum Total Cholesterol Level after the Administration of Ethionamide or Carbon Tetrachloride

	Cholesterol	
	mg/dl (mean ± S. D.)	%
Control	80.4 ± 9.4 (10)	100
TH 200mg/kg 24hrs	53.0 ± 3.2 (3)	65.9
TH 400mg/kg 3 hrs	66.3 ± 2.1 (3)	82.5
6 hrs	64.6 ± 6.1 (6)	80.3
12hrs	53.5 ± 9.2 (3)	66.5
24hrs	43.9 ± 9.0 (10)	54.6
48hrs	73.6 ± 10.6 (3)	91.5
Control	93.0 ± 7.2 (5)	100
CCl ₄ in liquid paraffin (1:1, v/v)		
5ml/kg 6 hrs	78.4 ± 15.3 (3)	84.3
24hrs	58.3 ± 11.3 (5)	62.7

Table 2. Liver Total Cholesterol Level after the Administration of Ethionamide or Carbon Tetrachloride

	Cholesterol	
	mg/g liver * (mean ± S. D.)	%
Control	5.55 ± 0.51 (5)	100
HH 200mg/kg 24hrs	7.20 ± 0.20 (3)	130
TH 400mg/kg 3 hrs	6.37 ± 0.75 (3)	115
6 hrs	6.06 ± 0.20 (3)	109
24hrs	7.29 ± 0.79 (5)	131
Control	5.61 ± 0.53 (3)	100
CCl ₄ in liquid paraffin (1 : 1, v/v) 5ml/kg 24hrs	7.25 ± 0.35 (4)	129

*Wet weight

口投与した際の、血清総コレステロール値を経時的に測定した結果である。TH 200 mg/kg 体重の投与で血清コ

レステロール値は明らかに低下し、24 時間後においては対照の 66% を示した。TH 400 mg/kg 体重の投与では低下がさらに著しく、24 時間後では対照の 55% となり、72 時間後にはもとのレベルに回復した。

Fig. 1. Serum Transaminase Activities of Ethionamide-administered Rat

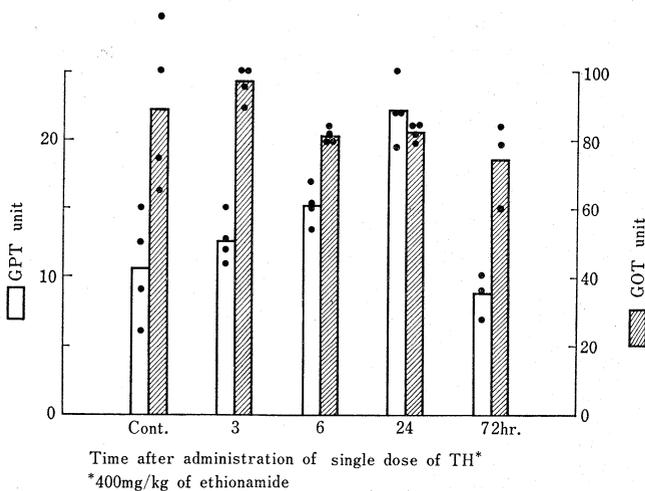
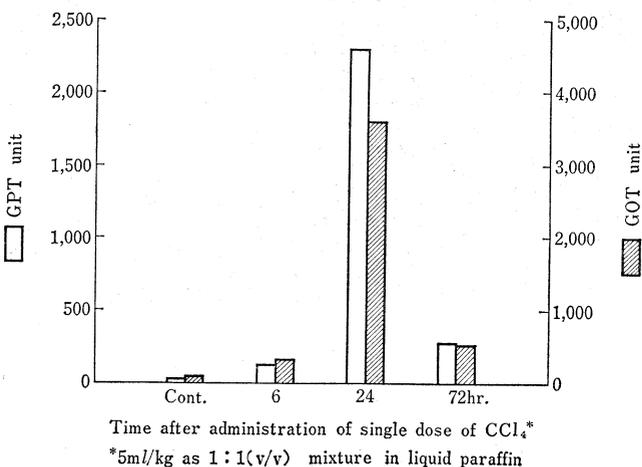


Fig. 2. Serum Transaminase Activities of Carbon Tetrachloride-administered Rat



四塩化炭素投与群においても同様に血清コレステロール値の低下がみられ、24 時間後では対照の 63% を示した。

2. TH および四塩化炭素投与ラットの肝総コレステロール値

上記のごとく、TH および四塩化炭素投与ラットにおいては血清総コレステロール値が低下するのに対し、肝総コレステロール値はむしろ増加の傾向が認められた(表2)。すなわち TH 200 mg/kg 体重および 400 mg/kg 体重投与後 24 時間では、それぞれ対照に比べ約 30% の増加がみられた。

四塩化炭素投与群においても同程度の増加が認められた。なお表1および表2に示す結果は、Cholesterol Test Wakoを用いた場合の測定値である。従来の Zak-Henly 法変法を用いた場合にも平均値には大差がなかったが、偏差が大であった。

3. TH および四塩化炭素投与ラットの血清トランスアミナーゼ活性

図1は TH 400 mg/kg 体重を投与した際の血清 GOT および GPT 活性の変動を示したものである。GOT の活性には変動が認められないが、GPT の活性には上昇が認められ、24 時間後には対照と比べ明らかな増加(対照の約2倍)がみられた。

図2は四塩化炭素投与ラットの血清 GOT, GPT の活性の変動を示したもので

あるが、両者ともに活性の上昇はきわめて著明であつた。

考 察

脂質代謝異常の診断には、血液中の脂質のうち測定しやすいコレステロール値がしばしば用いられる。血清総コレステロール値は肝硬変症、甲状腺機能亢進症、飢餓などで低下するほか、四塩化炭素⁹⁾、エチオニン¹⁰⁾、オロチン酸¹¹⁾等を実験的にラットに投与した場合にも低下することが知られている。血清コレステロール値の低下にはコレステロール生合成の抑制、コレステロールの異化の促進および食餌として摂取された、あるいは胆管より腸内へ排出されたコレステロールの再吸収の阻害等の要因をあげることができる¹²⁾。TH 投与ラットにおいては表2に示すごとく、肝総コレステロール値は増加の傾向がみられる。また伊藤ら¹³⁾は TH 投与ラット肝におけるコレステロールの増量を示しており、肝内におけるその合成低下ないし異化の促進は考え難い。

四塩化炭素障害肝においては、肝細胞の endoplasmic reticulum の形態的・機能的変化とともに蛋白合成が低下し¹⁴⁾、このためリポ蛋白の合成が抑制されるものと思われる。また一方、Bhargava ら⁹⁾は、四塩化炭素投与ラットではリポ蛋白の放出阻害が血清コレステロール値の低下をきたす原因になっていることを示している。リポ蛋白放出機構自体の阻害については、四塩化炭素投与ラットにおける血清トランスアミナーゼの著明な活性上昇が肝細胞の損傷による酵素蛋白の遊出と考えられている点において、なお検討すべき問題があるように思われる。

TH 投与ラットにおいては、血清トランスアミナーゼの活性の変動は必ずしも著明ではないが、光学顕微鏡による組織学的所見¹⁵⁾から肝細胞の損傷は明らかである。TH 投与ラットにおける血清総コレステロール値の低下が、肝細胞の損傷によるリポ蛋白の合成阻害によるものか、あるいはその放出機構の阻害によるものかについてはさらに検討が必要であるが、いずれの場合にも肝から血中への脂質の移行が阻害されるので、これが他の因子とともに脂肝形成に関与していることが考えられる。

Gamble ら¹⁵⁾は、ニコチン酸が血清コレステロール値を低下させる作用をもつことを示しているが、その原因としてコレステロールの生成阻害をあげており、TH の作用との関連において興味深い。

これまでの一連の研究結果から、TH 脂肝の成因は単一のものではなく、末梢脂肪組織から肝への脂質の移行増進、肝内における脂肪酸合成の促進あるいは肝より血中への脂質の放出阻害等の各因子が相互に関連していることは明らかである。したがってこれら各因子相互間の関連性をさらに追究することにより、TH による脂肝形成の機構をより明らかにすることが可能であろう。

結 論

TH の投与により、ラットに実験的に誘起される脂肝の発現因子の一つとして、肝より血中への脂質の放出阻害と関連のあるコレステロール値の変動について検討し、次のごとき結果を得た。

1. TH (200 または 400 mg/kg 体重) 投与ラット肝の総コレステロール値は、24 時間後では 7.2~7.3 mg/g 肝(湿重量)であり、対照に比べ約 30% 高い値を示した。
2. これに対し血清総コレステロール値は TH の投与によつて著明に低下し、200 mg/kg 体重投与後 24 時間では 53.0 mg/dl で対照の 65.9%、400 mg/kg 体重投与後 24 時間では 43.9 mg/dl で対照の 54.6% であつた。
3. 四塩化炭素投与ラットにおいても、肝および血清総コレステロール値は TH 投与ラットにおけると同様の変動を示した。
4. TH (400 mg/kg 体重) 投与ラットにおいては血清 GOT の活性の変動は認められず、GPT の活性は対照の 11.0 単位に対し 24 時間後では 22.5 単位となり、約 2 倍の活性上昇が認められた。
5. 四塩化炭素投与ラットでは、血清 GOT、GPT はともにきわめて著しい活性の上昇を示した。
6. 以上の結果は、TH 投与ラットでは肝細胞の損傷のために肝内リポ蛋白の生成阻害ないしは肝より血中への脂質の放出阻害が起り、これが他の因子とともに脂肝形成に関与していることを示唆するものと思われる。

本報告の要旨は昭和 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) 和知勤・井上豊治・内能美義仁・伊藤三千穂：結核，48：17，1973.
- 3) 井上豊治・和知勤：結核，45：115，1970.
- 4) 井上豊治・和知勤：結核，45：207，1970.
- 5) Zak, B.: Am. J. Clin. Path., 27: 583, 1957.
- 6) Henly, A. A.: Analyst, 82: 286, 1957.
- 7) Folch, J. and Lees, M.: J. Biol. Chem., 191: 801, 1951.
- 8) 金井泉・金井正光編：臨床検査法提要，VII-83，1972. 金原出版(東京).
- 9) Bhargava, M. M. and Sreenivasan, A.: Biochem. J., 100: 647, 1966.
- 10) Harris, P. M. and Robinson, D. S.: Biochem. J., 80: 352, 1961.
- 11) 織田敏次：医学のあゆみ，26: 330, 1958.
- 12) 今井陽・坂上利夫：脂質の生化学，189, 1966. 朝倉書店(東京).
- 13) 伊藤文雄・早野和夫：日本胸部臨床，23: 439, 1964.
- 14) Smuckler, E. A., Iseri, O. A. and Benditt, E. P.: J. Exptl. Med., 116: 55, 1962.
- 15) Gamble, W. and Wright, L. D.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 107: 160, 1961.