原著

二硫化炭素による肝障害とビタミン E による障害抑制効果

小野寺 みつ子*, 桜井 治彦*, 外山 敏夫*

THE PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN E ON THE HEPATOTOXIC EFFECTS OF CS₂ IN MALE ALBINO RATS OF WISTAR STRAIN

Mitsuko ONODERA†, Haruhiko SAKURAI† and Toshio TOYAMA†

In Vitamin E deficient rats, which had received an oral CS₂ administration of the dose at 1 mg/kg following a peritoneal injection of phenobarbital sodium and a fasting period of 24 hours, histopathological changes such as vacuolar degeneration and fatty infiltration of the liver were observed along with the increases in liver weight and liver/body weight ratio. On the other hand, no such effects could be found in Vitamin E supplemented rats which otherwise received the same treatment as the Vitamin E deficient group.

I. はじめに

長期間にわたる二硫化炭素の過剰な吸入は高血圧症、脳動脈硬化症、多発性神経炎、腎硬化症、虚血性心疾患の原因となることが報告^{1~9)}されているが、わが国における二硫化炭素中毒の病型は主として腎障害、眼底微細動脈瘤が前景にたっている^{1,2,8,10~15)}。一方欧米においては脳動脈硬化症、虚血性心疾患が優先している^{1,6,7,16)}。このことは二硫化炭素の暴露条件の違いのみでは説明できない人種や生活条件の差、とくに食生活の違いが影響していることが考えられる^{1,8,15,16)}。ビタミン E は抗酸化作用を持ち、とくに生体脂肪中の強力な抗酸化剤としては唯一のものと言われ、その欠乏は慢性血管障害の促進的な基盤となりうるとされる。またビタミン E の欠乏は動物実験において、肝障害、貧血、赤血球膜の脂酸構成の変化、生殖機能障害、神経筋肉疾患その他の多彩な現象をもたらすが¹⁷⁾、それは比較的高濃度の二硫化炭素中毒の疾病像と類似性がみられる。われわれはさきに二硫化炭素中毒の機作にビタミン E の相対的欠乏が関与しているのではないかと考え、あるレーヨン工場の二硫化

炭素作業者に生体のビタミン E 欠乏指標として、赤血球過酸化水素溶血試験を行なった。その結果、二硫化炭素作業者に赤血球溶血亢進の傾向が認められたことを報告した¹⁸⁾。一方, Bond ら¹⁹⁾, Magos ら²⁰⁾はラットによる動物実験でフェノバルビタール前投与によって二硫化炭素により著明な急性肝障害が生ずると報告している。われわれは二硫化炭素中毒の本態にビタミン E 欠乏が関与しうるとするならば、二硫化炭素性肝障害の場合にもビタミン E が抑制的な効果を持つのではないかと考え、Bond ら¹⁹⁾および Magos ら²⁰⁾の実験方法を応用して、二硫化炭素性肝障害を成立させ、その際のビタミン E による障害抑制効果を検討した。

II. 実験方法

動物はウィスター系雄ラット、体重 90 g 前後のもの 14 匹を使用した。ラットは環境になれさせるため、1 週間オリエンタル酵母社製の精製飼料標準配合 A で飼育し、体重測定のみ行なった。一度体重の低下がみられもとに戻ったところで、1 ケージ 2 匹ずつに分けて飼料をビタミン E 欠乏食として飼育した。本実験に使用したビタミン E 欠乏食は、さきにあたえた精製飼料標準配合 A よりビタミン E を除いたほかはまったく同じ組成のものである。飼料の量は 1 匹あたり、1 日約 15 g とし、水は吸水ビンによる自然吸飲とした。ビタミン E 欠乏食で飼

* 慶応義塾大学医学部衛生学・公衆衛生学教室
昭和55年11月27日受付

† Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University
Received for publication, November 27, 1980

育開始後、約1週間および2週間後に尾部より試験採血し、ビタミンE欠乏状態の指標として、Howitt 法¹⁷⁾により赤血球過酸化水素溶血試験を行なった。各ラットともに約2週間後に90%以上の溶血率を示したところで、No. 1~6についてはビタミンE 5mg/日を4日間にわたって投与した。投与方法はビタミンEを水で懸濁状態にしたものを餌に混合してあたえた。No. 7~14はひき続いてビタミンE欠乏飼料で4日間飼育した。つぎに各ラットにフェノバルビタール 50mg/kg を6時間ごとに2回、16時間後更に1回腹腔内に注射し、24時間絶食状態にした後 No. 1~12 については二硫化炭素 1mg/kg をオリーブ油で1:1にとかし、経口的に投与した。No. 13, 14 についてはオリーブ油のみを投与した。二硫化炭素投与 24 時間後に心臓穿刺により全採血の後解剖を行なった。検査項目は屠殺時の体重、肝重量、肝/体比、血清 GOT, GPT 活性値および肝の病理組織学的検査である。血清 GOT, GPT 活性値の測定は Reitman-Frankel の方法³²⁾により、病理組織学的検査はヘマトキシリン・エオジン (H.E) 染色および一部ズダンⅢの脂肪染色によった。

Ⅲ. 結 果

No. 1~14 のうち 24 時間の絶食中に共食いによって傷つけたもの1, 傷つけられたもの1, 全採血の際に採血不可能だったもの1, の3例はこの実験結果から除外した。残る 11 例について、A群すなわちビタミンE欠乏食で飼育後ビタミンE 5mg/日を4日間あたえ二硫化炭素を投与したもの4例, B群すなわちビタミンE欠乏食のみで飼育し、二硫化炭素を投与したもの5例, C群すなわち、ビタミンE欠乏食で飼育し、二硫化炭素を投与しないもの2例について、それぞれ比較検討した。病理組織学的検査の結果は空胞形成の程度によって(一), (±), (+), (++)、(+++)の5段階に分けて各標本はそのいずれかに分類した。脂肪沈着についても(一), (±), (+)の3段階に分け同様に分類した。空胞形成の(一)~(+++)は次のような規準にしたがった。正常な組織とまったく区別できないもの(一), 小葉中心部の肝実質細胞にわずかに空胞がみられるもの(±), 小葉中心部に空胞変性の広がりが見えはっきり認められるもの(+), 空胞変性の広がり小葉の半分位までしめているもの(++), 小葉の空胞細胞周辺の門脈付近に肝実質細胞の縁がわずかに残った場合(+++)とした。脂肪沈着についても正常な組織とまったく区別できないもの(一), 若干の脂肪滴がみられるもの(±), 標本全体に多数の脂肪滴が認められるもの(+)とした。各検査項目の結果は Table 1 に示すとお

りである。まず屠殺時の体重についてみるとA群が 110~170g, B群が 100~180g と両群ともかなり個体間のバラツキがみられる。これらの値を平均値でみるとA, B, C群ではC群でやや高い値を示したが, A, B群ではほとんど同じ値となっている。肝重量についても同じように個体間のバラツキがかなり大きい, その平均値はB群が 8.1g と最も高く, ついでC群 6.7g, A群 6.1g の順になっている。これを肝/体比でみるとそれぞれの群の各個体間のバラツキは少なくA, B, C各群の平均値はA群 4.6, B群 6.0, C群 4.9 でB群が最も高くこれらの群を比較した場合, A群とB群の間に危険率0.1%, B群とC群の間に危険率2%で有意の差が認められた。A, C群の間には差は認められなかった。血清 GOT, GPT 活性値に関しては各群間に差は認められなかった。肝臓の組織学的検査の結果はA群では4例のうち1例にわずかな空胞形成が認められ, これは脂肪沈着も(+)を示したがその他は脂肪沈着(±)を示したものの1例だけであった。B群では5例中3例に著明な小葉中心性の空胞形成が認められ, それらはすべて脂肪沈着(+)であった。また, 1例にわずかな空胞形成が認められ, これは脂肪沈着(±)を示した。残る1例は変化が認められなかった。C群では脂肪沈着(±)を示したが空胞形成は認められなかった。

Ⅳ. 考 察

動物を用いた二硫化炭素中毒の実験はすでに多くの報告^{1,21,22)}があるが Bond¹⁹⁾らのフェノバルビタール前投与によるラットの肝障害の実験は興味深いものであり, 彼らの実験によると飢餓状態のラットに二硫化炭素を経口的に投与した場合, 門脈周辺に脂肪の増加がみられるのみであるがフェノバルビタール前投与後に二硫化炭素をあたえると肝小葉中心部に壊死の広がりが生ずることを報告している。また Magos²⁰⁾らも同様にラットを用いて二硫化炭素の吸入暴露によりフェノバルビタール, 飢餓, 栄養状態による影響をみており Bond¹⁹⁾らと同じような結果を報告している。われわれの実験は Bond¹⁹⁾ら Magos²⁰⁾らの実験にもとづいて行なったもので, あらかじめフェノバルビタールを投与し更に飢餓状態にすることによって, 肝への影響が最も大きいことが予測される状態にあるラットに二硫化炭素の投与を行なった。このような条件での肝へのビタミンEの効果は非常に大きかった。今回の実験では例数が少ないにもかかわらずビタミンE投与群とビタミンE欠乏群の間に肝組織像および肝/体比にはっきりと差が認められ, ビタミンEが二硫化炭素による肝障害に対して抑制的效果を持つこと

Table 1. Effects of Vitamin E on CS₂ induced liver changes in rat.

Group	No.	Vitamin E deficient food	V.E	CS ₂	Body weight (g)	Liver weight (g)	Liver/body weight ratio (%)	Serum GOT (U)	Serum GPT (U)	Vacuole formation	Fatty infiltration
A	1	16 days	+	+	110	5.3	4.8	274	100	-	±
	2	"	+	+	170	8.1	4.8	115	28	±	+
	3	"	+	+	130	5.7	4.4	142	29	-	-
	4	"	+	+	125	5.4	4.3	95	20	-	-
	Mean				134	6.1	4.6	157	44		
B	7	20 days	-	+	100	6.2	6.2	93	42	-	-
	8	"	-	+	110	5.8	5.3	122	28	±	±
	9	"	-	+	160	10.1	6.3	274	95	±	+
	10	"	-	+	128	7.8	6.1	105	25	±	+
	11	"	-	+	180	10.6	5.9	132	42	±	+
	Mean				136	8.1	6.0	145	46		
C	13	20 days	-	-	150	6.7	4.5	100	26	-	±
	14	"	-	-	130	6.7	5.2	95	28	-	±
	Mean				140	6.7	4.9	98	27		

が明らかとなった。血清 GOT, GPT 活性値はビタミン E 欠乏群で組織像に変化が認められたにもかかわらずビタミン E 投与群およびビタミン E 欠乏群の 1 例ずつに活性値の上昇を示したほかは正常範囲内²³⁾に入っていた。血清 GOT, GPT 活性値の上昇が肝細胞の変性に対応することはよく知られていることであるが、ウィスター系ラットにおけるこの値は個体間の差が非常に大きいとされており、また薬物投与後の血清 GOT, GPT 活性値はその投与後の経過時間によって、活性上昇に変動を示すことが小山内²⁴⁾により報告されている。今回われわれが得た血清 GOT, GPT 活性値は二硫化炭素投与後 24 時間後に 1 回しか行なっておらず、しかも例数が少ないので以上の点を考えた場合この実験結果から二硫化炭素肝障害の場合に血清 GOT, GPT 活性値の上昇がないとただちに断定することはできないであろう。二硫化炭素による肝障害がフェノバルビタール前投与で増加することは、二硫化炭素の毒性の少なくとも一部が薬物代謝酵素活性の誘導に関連していることを示唆している。ビタミン E はまた、四塩化炭素、アルコールに対しても肝の脂肪蓄積を抑制する効果を持つことが報告^{25,26)}されており、その作用の機作についてもいろいろな意見が述べられている。四塩化炭素中毒の場合、その代謝過程で生じた遊離の CCl_3 基が過酸化脂質を形成し、肝細胞の膜構造を障害するとされるが Green²⁷⁾, Cawthorne²⁸⁾ らの報告によれば四塩化炭素中毒に対するビタミン E の作用は単に抗酸化作用による過酸化物の生成抑制のみではなく、ミクロソームにおける酸化酵素の誘導にも関連しているのではないかとされている。二硫化炭素性肝障害に対するビタミン E の抑制効果についてもこのような機作が推定できるが実験的根拠はまだ得られていない。また高血圧症、脳動脈硬化症、腎障害、虚血性心疾患等はいずれも加齢に伴って罹患率が上昇する疾病であるが、長期間の二硫化炭素吸入もそれらの原因となりうることを考えると二硫化炭素が老化促進に加担している可能性は当然考えられる。ビタミン E の老化抑制効果についてはすでに多くの報告²⁹⁻³¹⁾があり、二硫化炭素作業者がビタミン E 欠乏指標である過酸化水素溶血試験で低下の傾向を示したわれわれのさきの報告¹⁸⁾は二硫化炭素が老化を促進するという仮説に支持を与えるものであろう。ビタミン E と老化の関係について西岡³⁰⁾はその欠乏により細胞の老化過程が促進されることを実験的に示しており、また緒方³¹⁾は老ネズミにビタミン E を投与することにより細胞の再生賦活および神経細胞のリポフスチン減少によってその老化抑制効果を報告している。今回の実験成績で示された二硫化炭素性肝障害に対するビタミン E の

抑制効果は、ビタミン E のきわめて多面的な生理作用を考えると決して単一なものではなく、種々の要因が複雑に作用していると考えねばならないであろうが二硫化炭素中毒の本態にビタミン E 欠乏に類似の機作が関与している可能性を示唆していると言えよう。

V. 結 論

ビタミン E 欠乏およびビタミン E 投与ラットを用いて、フェノバルビタール前投与による二硫化炭素性肝障害に対するビタミン E の抑制効果を検討した。ビタミン E 欠乏群では投与群に比較して血清 GOT, GPT 活性値に明らかな差は認められなかったが、肝/体比、肝組織像に著明な差が認められビタミン E が二硫化炭素による肝障害に対して抑制的効果を持つことが明らかになった。

この論文の要旨は第 45 回日本衛生学会（昭和 50 年）において発表した。

文 献

- 1) 久保田重孝博士還暦記念出版刊行会(編): 職業病とその対策, 63-104, 興生社, 東京, 1968.
- 2) 後藤 稔, 堀田礼二: 慢性二硫化炭素中毒についての疫学的研究, 日本臨床, 25: 2820-2828, 1967.
- 3) 山形 陽, 浅田昭彦, 鈴木邦夫, 楠本 正, 高橋 衛, 土田秀一, 斉藤邦夫, 楠 信男: 二硫化炭素性腎硬化症—とくに糖尿病腎との類似性について (第 1 報) 腎生検所見, 糖尿病, 9: 208-216, 1966.
- 4) 山形 陽, 根本 正, 高橋 衛, 浅田昭彦, 鈴木邦夫, 土田秀一, 斉藤邦夫, 楠 信男: 二硫化炭素性腎硬化症—とくに糖尿病腎との類似性について (第 2 報) 臨床所見, 糖尿病, 9: 218-225, 1966.
- 5) Tiller, J. R., Schilling, R. S. F. and Morris, J. N.: Occupational toxic factor in mortality from coronary heart disease, Br. Med. J., 4: 407-411, 1968.
- 6) Schilling, R. S. F.: Coronary heart disease in viscose rayon workers, Am. Heart J., 80: 1-2, 1970.
- 7) Hernberg, S., Partanen, T., Nordman, C. H. and Sumari, P.: Coronary heart disease among workers exposed to carbon disulphide, Br. J. Ind. Med., 27: 313-325, 1970.
- 8) 後藤 稔: 慢性 CS_2 中毒と糖尿病性血管障害の類似性, 総合臨床, 22: 810-817, 1973.
- 9) 中村清史, 原田正純, 立津政順, 宮川太平, 津嘉山毅, 河野浩介, 樺島啓吉, 平田宗男, 東家 曉: 慢性二硫化炭素中毒の臨床的研究, 精神神経学雑誌, 76: 243-273, 1974.
- 10) 桜井治彦, 百溪 浩, 矢倉成幸, 外山敏夫: 二硫化炭素作業者の慢性腎障害, 産業医学, 9: 361-362, 1967.
- 11) 堀田礼二, 後藤 稔: 蛍光眼底撮影による二硫化炭素性細血管障害の研究, 日眼会誌, 74: 1463-1467, 1970.
- 12) 桜井治彦, 小野寺みづ子, 安達史郎, 百溪 浩, 外山敏夫: 二硫化炭素性腎障害の追跡調査, 産業医学, 13: 352-

- 353, 1971.
- 13) 小野寺みつ子, 桜井治彦: 職業性腎障害の予防における尿中タンパク微量定量の意義, *産業医学*, 18: 511-515, 1976.
 - 14) Sugimoto, K., Goto, S. and Hotta, R.: An epidemiological study on retinopathy due to carbon disulfide—CS₂ exposure level and development of retinopathy, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37: 1-8, 1976.
 - 15) Sugimoto, K., Goto, S. and Hotta, R.: Studies on chronic carbon disulfide poisonings—A 5 year follow-up study on retinopathy due to carbon disulfide, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37: 233-248, 1976.
 - 16) Tolonen, M., Hernberg, S., Nordman, C.H., Goto, S., Sugimoto, K. and Baba, T.: Angina pectoris electrocardiographic findings and blood pressure in Finnish and Japanese workers exposed to carbon disulfide, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37: 249-264, 1976.
 - 17) 島藺順雄, 藤井五一郎: ビタミンE, 168-199, 251-255, 朝倉書店, 東京, 1973.
 - 18) 桜井治彦, 小野寺みつ子: 二硫化炭素作業における過酸化水素溶血の亢進, *日本衛生学雑誌*, 29: 173, 1974.
 - 19) Bond, E. J., Butler, W. H., Matteis, F. De and Barnes, J. M.: Effects of carbon disulphide on the liver of rats, *Br. J. Ind. Med.*, 26: 335-337, 1969.
 - 20) Magos, L. and Butler, W. H.: Effect of phenobarbitone and starvation on hepatotoxicity in rats exposed to carbon disulphide vapour, *Br. J. Ind. Med.*, 29: 95-98, 1972.
 - 21) 日本化学繊維協会労働衛生研究会(編): ビスコースレーヨン工業の労働衛生(続), 82-136, 日本化学繊維協会, 東京, 1962.
 - 22) 外山敏夫, 草野 弘, 金井 潔: 二硫化炭素中毒動物に対する2, 3の医薬品の効果について, *労働科学*, 33: 192-204, 1957.
 - 23) 高木 新: トランスアミナーゼ (GOT, GPT) に関する実験的および臨床的研究—肝障害時における肝細胞内 GOT, GPT 活性の変動, および血清 GPT/GOT 活性比の変動に関する1考察, *肝臓*, 9: 355-362, 1968.
 - 24) 小山内博: 毒物による肝障害とアミノ基転移酵素活性に関する実験的研究, *労働科学*, 43: 567-584, 1967.
 - 25) 平山千里, 広重嘉一郎, 榎屋富一: エタノール脂肪に対するトコフェノールラクトンの予防効果について, *肝臓*, 10: 454, 1969.
 - 26) 谷川久一, 田中幹夫, 江村武志, 有松祥雄, 岡崎忠彦, 佐藤晋昭, 諸隈一徳, 奥田邦雄: アルコール性肝障害とビタミンE, *肝臓*, 10: 318, 1969.
 - 27) Green, J., Bunyan, J., Cawthorne, M. A. and Diplock, A. T.: Vitamin E and hepatotoxic agents—Carbon tetrachloride and lipid peroxidation in the rat, *Br. J. Nutr.*, 23: 297-307, 1969.
 - 28) Cawthorne, M. A., Bunyan, J., Sennitt, M. V. and Green, J.: Vitamin E and hepatotoxic agents—Vitamin E, synthetic antioxidants and carbon tetrachloride toxicity in the rat, *Br. J. Nutr.*, 24: 357-384, 1970.
 - 29) Tappel, A. L.: Vitamin E as the biological lipid antioxidant, *Vitam. Horm. (N. Y.)*, 20: 494-510, 1962.
 - 30) 西岡信博: 神経細胞内 Lipo-pigments の組織化学的研究—Ceroid 色素と Lipofuscin との比較ならびに Vitamin E 欠乏状態と老化過程との関連, *精神神経学雑誌*, 68: 836-855, 1966.
 - 31) 緒方知三郎: 老化防止に関する私共の最近の研究—ビタミンEについて, *診断と治療*, 53: 2407-2413, 1965.
 - 32) 北村元仕: 実践臨床化学, 338-345, 医歯薬出版, 東京, 1974.

著者への通信先: 小野寺みつ子, 〒160 東京都新宿区信濃町 35 慶応義塾大学医学部衛生学・公衆衛生学教室 *Reprint requests to* Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan (M. Onodera)