Alcohol と肝 Mitochondria に関する研究

第2報 *In vivo* および *in vitro* の Alcohol 投与と肝 Mitochondria の脂質分画の変動について

勝 又 一 夫 山 田 弘 三 山 中 直 樹

勝 又 義 直 小 沢 高 将*

序 言

Alcohol の投与により白鼠肝 mitochondria の oxidative phosphorylation (以下 ox. phos.) が低下することはすでに報告した¹⁾。一方 isolate した肝 mitochondria に対して *in vitro* で加えた alcohol はその mitochondria の ox. phos. を明白に阻害することもよく知られている²⁾。そこで両者の mechanism において共通した面があるかどうか、換言すれば alcohol の経口投与により生体内で増加した alcohol が直接肝 mitochondria になんらかの影響を及ぼしうるかどうかは重大な問題であるが、現今その仮定の当否はまったく不明である。われわれは alcohol 投与後の血中濃度と *in vitro* での阻害濃度からみて低蛋白摂取に伴う大量 alcohol 飲用にさいしてその可能性を考えているが、肝細胞中の alcohol 濃度は不明であり、上述の推論は想像の域を出ない³⁾。そこでこの問題を解明する一つの手段として、肝 mitochondria の脂質とその分画が *in vivo* および *in vitro* での alcohol 投与によっていかなる影響を受けるかを追求した。肝 mitochondria の脂質はその機能特に ox. phos. を保護するためにきわめて重大であると考えられる。すなわち脂質は構成成分として mitochondria の形態に直接関与しているのみならず、CoQ etc. の Co factor が脂溶性であり、さらに mitochondria 内に疎水性の場を作ることにより energy 共役系を保護している⁴⁾。In vivo あるいは *in vitro* での alcohol の投与で低下した ox. phos. を示す肝 mitochondria の脂質分画は当然なんらかの変化を受けると思われるので両者の変動を比較することにより、alcohol の投与が肝 mitochondria に及ぼす

影響を追求せんと試みた。すなわち、本報告において、isolate した肝 mitochondria に alcohol を添加した場合と、alcohol を *in vivo* で投与した場合の肝 mitochondria の脂質分画を測定し、きわめて興味ある結果をえたので報告する。

実験方法

Oriental 固形食と野菜で飼育した体重 150g 前後の雄性 Wistar 系白鼠 14 匹を2群に分けた。

Alcohol 群は 30% alcohol 水溶液を胃管にて毎日 4.5 ml/100g 体重、14 日間経口投与し、対照群は等カロリーの glucose 液を投与した。投与2週間後、食後5時間に断頭屠殺し、mitochondria は Chance-Hagihara の方法によって分離精製した⁵⁾。

分離した肝 mitochondria suspension の蛋白量は Biuret 法で測定した⁶⁾。mitochondrial suspension よりの脂質の抽出と分離は以下の方法によった。すなわち、mitochondrial suspension (蛋白質として 10mg) を、クロロホルム：メタノール=2:1 (v/v) で抽出し、 $\frac{1}{2000}$ N H₂SO₄ で除蛋白して、次いで遠沈し (3000rpm)、脂質層を注射液でとり、その半分を rotating evaporator で乾燥させ、pet. ether: ethyl ether: acetic acid (84:15:1 (V/V)) の展開溶媒の下で silica gel (Mark Silica gel F₂₅₄) 薄層クロマトを使用して展開した。展開後、乾燥し、 $\frac{1}{200}$ N H₂SO₄ を噴霧し、100°C で発色させ、次いで濃度計により測定をして、各脂質分画の比を求めた。なお抽出した残り半分の脂質は同じように rotating evaporator で乾燥させ、次いで重クロム酸カリ法で総脂質を測定した⁷⁾。この総脂質から 100 分率により、脂質分画の脂質値を計算した。なお分離した mitochondria (蛋白量 10 mg) は、5 ml reaction mixture (0.3 M mannitol, 10mM KCl, 10mM phosphate, 2.5mM Mg

* K. Katsumata, K. Yamada (助教授): 名古屋大学第3内科; N. Yamanaka, Y. Katsumata, T. Ozawa (教授): 名古屋大学第1生化学。

Cl₂, 0.25mM EDTA) 中に加え, alcohol を 40 μ moles/ml と 2 μ moles/ml sodium succinate, 200 μ moles/ml の AMP を加えて 5 分間 magnetic stirrer を用いて incubate し, 次いで前述と同様な方法で脂質を抽出し, 総脂質と脂質分画を測定した。

実験結果

i) *In vivo, in vitro* の alcohol の投与と肝 mitochondria の総脂質について

Alcohol の *in vivo* の投与により明らかに肝 mitochondria の総脂質は増加した。

すなわち対照群白鼠の肝 mitochondria の総脂質は 4.3 $\pm$ 0.7mg/5mg protein であったが, alcohol 投与群の肝 mitochondria の総脂質は 6.3 $\pm$ 1.1mg/5mg protein で明白に増加していた。ところで *in vitro* の alcohol 添加では表 1 に示すごとく肝 mitochondria の総脂質は増

表 1. The lipid content of the rat liver mitochondria

Condition	Lipid content mg lipid/ 5mg protein
The liver mitochondria of rat fed with normal diet	4.3 $\pm$ 0.7
The liver mitochondria of rat fed with normal diet+alcohol addition <i>in vitro</i>	4.5 $\pm$ 0.9
The liver mitochondria of rat forcibly fed with alcohol	6.3 $\pm$ 1.1

加せず対照群とまったく差がなかった。

各群とも 7 例ずつの肝 mitochondria を使用し, その結果は mean $\pm$ SE で表わした。

ii) *In vivo, in vitro* の alcohol 投与と肝 mitochondria の脂質分画について

In vivo の alcohol 投与では, 表 2 に示すごとく triglyceride 分画の著明な増加が特長であった。

他の分画では脂質分画の変化としては存在しないが総脂質が多いので全体としてみると対照よりはいずれの分画でも増加している。

一方, *in vitro* の alcohol 添加では phospholipid の著明な減少と triglyceride の増加が特長であった。

他の分画については対照と明白な差が存在しなかった。なおいずれにも 7 例ずつの mean $\pm$ SD で表わした。以上の成績より *in vitro, in vivo* での alcohol の投与で肝 mitochondria の脂質分画は phospholipid に著明な差が存在することが明らかとなった。

考 案

In vitro の alcohol の添加で肝 mitochondria の phospholipid は著明に減少した。このことは alcohol による phospholipase A の活性化というよりはおそらく alcohol が直接 mitochondria の membrane へはいり, 水溶性, 脂溶性の性格から membrane の phospholipid 層へ集まり biochemical な, また osmotic な変化をきたし phospholipid を低下させたのではなかろうか? とところで triglyceride は増加しているので phospholipid の分解により遊離した脂肪酸は triglyceride へとりこまれているのかもしれない。Phospholipid は mitochondria の ox. phos. にきわめて重要であるので⁸⁾, phospholipid の低下は当然, mitochondria の ox. phos. の低下へとつながるであろう。ただしすでに前報で報告したごとく *in vitro* で添加した alcohol が直接共役因子に作用する可能性はなく, いわゆる uncoupler とはなりえない。したがって alcohol の直接的な mitochondria への作用は肝 mitochondria の membrane への侵入, 次いで phospholipid の低下という形をとるものと思われる。一方, *in vivo* の alcohol の投与では phospholipid はまったく変化がなかった。我々の実験ではかなり大量の alcohol

表 2. The percent of the lipid content on the lipid fraction of the mitochondria

Condition	Lipid fraction (%)				
	Cholesterol ester	Triglyceride	FFA	Free cholesterol	Phospholipid
The liver mitochondria of rat fed with normal diet	14.6 $\pm$ 1.1	14.3 $\pm$ 1.4	17.0 $\pm$ 1.9	15.1 $\pm$ 1.3	39.0 $\pm$ 2.1
The liver mitochondria of rat fed with normal diet+alcohol addition <i>in vitro</i>	14.6 $\pm$ 1.7	19.9 $\pm$ 1.9	17.0 $\pm$ 1.6	16.1 $\pm$ 1.9	32.4 $\pm$ 2.5
The liver mitochondria of rat forcibly fed with alcohol	14.0 $\pm$ 1.5	18.5 $\pm$ 1.7	15.0 $\pm$ 1.7	13.5 $\pm$ 1.5	39.0 $\pm$ 2.3

を飲ませているが、このような大量でも肝 mitochondria への alcohol の直接作用はないと考えられる。もちろん、もっと大量の alcohol 投与では *in vivo* でも phospholipid の減少、すなわち mitochondria への alcohol の直接作用があるかもしれない。ことに前報で述べたごとく低蛋白摂取に伴う大量の alcohol 飲用にさいしてはその可能性が存在する。*In vivo* の alcohol 投与では mitochondria の総脂質の増加、とくに triglyceride の増加が特長であった。この肝 mitochondria の triglyceride の増加の原因は不明であるが alcohol の代謝過程の変動が肝 mitochondria 内の脂肪の metabolism を変化させたのであろう。その詳細は不明で、今後の検討に待ちたい。いずれにせよ *in vivo* の alcohol 投与でみられる肝 mitochondria の脂質代謝の異常は当然 ox. phos. に重大な影響を与え、脂肪肝の形成にも関与するものと思われる。

結 語

Alcohol の *in vitro* の添加は isolate した白鼠肝 mitochondria の phospholipid の明白な減少をきたす。すなわち alcohol は肝 mitochondria の membrane へ侵入し phospholipid を減少させると考えられる。一方、

alcohol 経口投与後では白鼠肝 mitochondria では triglyceride 分画は増加するが、phospholipid 分画はまったく変化しない。以上の事実より alcohol の直接的な mitochondria への障害作用は mitochondria の phospholipid の減少として示された。Alcohol 経口投与後に、肝 mitochondria の phospholipid の変化がないことより、通常 alcohol の経口投与により肝 mitochondria は alcohol それ自身によって直接障害されないものと思われる。ただし、随伴する食餌摂取の状態と alcohol の量によってはその可能性も否定できない。

文 献 1) 山田弘三, 勝又一夫: 肝臓 7: 23, 1966.
 2) Thore, A. & Baltshelshy H.: Acta, Chem. Scand. 19: 1591, 1965. 3) Katsumata, K., Yamana, N. & Ozawa, T.: Nagoya J. Med. Sci. (in press). 4) Green, D. E. & Fleisher, S.: Biochem. Biophys. Acta. 70: 554, 1963. 5) Chance, B., Hagiwara, B.: Biochem. Biosys. Res. Commun. 3: 1, 1961. 6) Cornall, A. G., Bardawill, C. S. & Parid, M. M.: J. Biol. Chem. 159: 751, 1949. 7) Bragdon, J. H.: J. Biol. Chem. 190: 513, 1951. 8) Lester, R. L. & Fleisher, S.: Biochem. Biophys. Acta. 47: 358, 1961.

* * * * *

* * * * *