〈原 著〉

脂肪肝と Xylitol

—Xylitol の Lipolytic Effect について—

木 村 篤 人*

緒 言

オロット酸 (orotic acid, OA) は, 20 世紀初頭に初めて牛乳中で発見されて¹⁾以来, 人乳を含む数種の乳汁から分離され²⁾, またある種の酵母の必須栄養因子として知られていた有機酸である³⁾. 1948 年 Novak ら⁴⁾は, ネズミの成長促進因子をアルコール蒸留廃液中に発見してビタミン B₁₃ と名づけたが, その後紫外吸収特性や生物学的活性から既知の OA との類似性が指摘された⁵⁾. さらに牧野⁶⁾, Manna⁷⁾ はそれぞれ OA が子獣の発育を促進することを明らかにした.

他方では OA が pyrimidine nucleotide 生成の precursor として重要な中間体であることが明らかにされ⁸⁻¹¹⁾, また OA 自身の生合成機序が解明されてきた¹²⁾. このようにして OA の生物学的役割が明らかになるに及んで OA に細胞再生の促進効果, 細胞壊死の防止効果が期待されて, 肝疾患の治療剤として実験的あるいは臨床的な検討が加えられるようになり, Noelle¹³⁾, Beckmann ら¹⁴⁾, 吉田ら¹⁵⁾, 山形ら¹⁶⁾によって慢性肝疾患に対する治療効果が報告され, 肝治療薬剤として OA は広く臨床的に注目されるようになった.

ところが 1955 年, Standerfer, Handler ら¹⁷⁾は, OA の幼若ラットに対する発育成長効果の dose response を検討中, OA の投与量が増すにしたがって肝脂質量が増加することを認め, OA の経口投与によって脂肪肝が発症することを明らかにした. 1960 年 Handschumacher ら^{18,19)}は, 1%に OA を混合した合成飼料で飼育したラットに発症する脂肪肝が, 0.25%に adenine sulfate を飼料に添加することによって発症が抑制されることを認めた.

1959 年高橋, 藤沢ら²⁰⁾は, 黄変米カビによる実験的慢性肝障害に対して種々の肝臓保護剤の薬剤効果を比較検

討中, たまたま OA の投与によって肝の線維化が強く促進され, さらに 4-amino-5-imidazole carboxamide (AICA) が線維化を抑制する事実を見出し, にわかに OA 脂肪肝に対する関心を高め, 以後著者の教室では OA 脂肪肝の発生機序を肝内 nucleotide の代謝との関連から解明しようとして研究を続けてきた. すなわち adenine sulfate^{18,19)}や AICA²¹⁾の添加で OA 脂肪肝の発症が抑制されたという報告を基礎として, 各種の ribonucleotide 関連物質を飼料中の OA に対して 1/10 モル比に添加して, ラットを飼育して抗脂肪肝作用を比較検討したところ, 表 1 に示すごとく purine 系列では塩基部分にのみ認められ, nucleoside や nucleotide では

表 1. OA 脂肪肝に対する nucleotides および関連物質の抗脂肪肝作用

	Bases	Nucleosides	Nucleotides
Purine series	Adenine(++)	Adenosine(—)	AMP(—)
	4-Amino-5-imidazole carboxamide (AICA)(++)	Inosine(—)	IMP(—)
	Hypoxanthine(+)		Succinyl-AICA-ribotide(—)
Pyrimidine series	Uracil(—)	Uridine(—)	CMP(++)
	Cytosine(—)		UMP(—)
	Thymine(—)		CDP-choline(—)

明らかな作用は認められず, これに反して pyrimidine 系列では cytidine-5'-monophosphate (CMP) にのみ強い抗脂肪肝作用が認められた^{22,23)}.

これらの事実は, OA 脂肪肝の発症に purine と pyrimidine nucleotides 間の metabolic unbalance が関与することを示し, 藤沢²⁴⁾, 長村²⁵⁾は肝酸溶性 nucleotides の分析から, OA 脂肪肝では uracil nucleotides の著しい蓄積と adenine nucleotides や cytosine nucle-

* A. Kimura: 東京慈恵会医科大学 第 1 内科(主任教授: 高橋忠雄).

図 1. 肝における purine および pyrimidine nucleotide 生合成における feedback control

otides の著減を認めた。そして purine 塩基にみられる抗脂肪肝効果は、purine 塩基が OA との phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) のせり合いに勝って、purine nucleotide 生成への salvage 合成系が賦活され、同時に orotidylic acid を経る pyrimidine nucleotides の de novo の合成系への PRPP 利用が抑制されるのであろうと推定した (図 1)。Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) は purine および pyrimidine 塩基と直接反応して ribonucleotide を生合成するので、nucleotide 生合成の rate limiting step は PRPP の生成にあり、しかも de novo の purine nucleotide 生合成への PRPP の利用は、PRPP 自身の合成速度と pyrimidine ribonucleotide pyrophosphorylase 反応への PRPP の利用速度によって規正されていると考えられる。そこで肝における PRPP の合成あるいは供給を高めることができれば、OA 脂肪肝にみられる nucleotide 間の metabolic unbalance は是正され、脂肪肝の発症を抑制することができるはずである。

このような肝における PRPP の供給をたかめる物質として、著者は uron 酸回路の中間体である xylitol に注目した。Uron 酸回路は $\text{glucose} \rightarrow \text{glucuronic acid} \rightarrow \text{L-xylulose} \rightarrow \text{xylitol}$ を経て NAD-xylitol (D-xylulose) dehydrogenase によって xylitol は D-xylulose に変換し、ついで D-xylulose kinase によって D-xylulose 5-phosphate となり、ここで uron 酸回路は五炭糖磷酸回路に接続して、図 2 のごとく D-ribulose 5-phosphate $\rightarrow$ ribose 5-phosphate を経て PRPP を生成し^{26, 27)} nucleotide 合成系に連なる藤沢、高橋ら²⁸⁾はすでに xylitol の経口投与が、正常ラット肝の uron 酸回路、五炭糖磷酸回路を次々と賦活することを enzyme level の検討から明らかにし、さらに 1% OA 飼料に 5~10% の xylitol を添加してラットを飼育した場合、脂肪肝の発症が完全に抑制されることを観察した²⁹⁾。

本論文では、予防実験、治療実験を通じて脂肪肝に及

図 2. Xylitol と nucleotide 代謝

はす xylitol の脂肪肝抑制効果を脂質代謝、核酸代謝の面からくわしく検討して、xylitol の lipolytic effect の本態を中心に OA 脂肪肝自体の成因の解析を試み、脂肪肝発症機序の一つとして肝内 nucleotides の metabolic unbalance を重視し、さらに脂肪肝治療につながる問題点について論述するものである。

実験方法

1. 実験動物と飼料

実験動物は Wistar 系雄ラットで体重 150g 前後のものをを用いた。飼料は Handschumacher の報告にしたがった合成飼料³⁰⁾を基礎飼料とし、これに 1% の割合に OA を添加したものを OA 飼料、基礎飼料の 5~10% を xylitol でおきかえたものを xylitol 飼料、さらに xylitol 飼料に 1% に OA を添加したものを OA-xylitol 飼料とし、各飼料は体重 100g あたり 1 日 15g を投与した。

2. 実験条件

これらの各ラット群をそれぞれ基礎食対照群、xylitol 食対照群 (xylitol 群)、OA-xylitol 食群 (OA-xylitol 群) とよび、はじめから OA-xylitol 飼料で飼育した群は xylitol 予防群、また OA 飼料で飼育して脂肪肝発症後に OA-xylitol 飼料にきりかえた群は xylitol 治療群として、すべて 16 時間絶食ののちに実験に供した。

可及的すみやかにとりだした肝臓は、肝門部から生理的食塩水で灌流して十分肝内の血液を洗滌したのち秤量し、酸溶部をさけて切り出し、1) 脂質の分析に 1g, 2) 酸溶性 nucleotide の分析に 2g, 3) 酵素活性の測定に 1g, 4) 肝細胞分画に 2g, さらに一部を電顕的検索に用いた。

標識 xylitol の肝脂質、肝酸溶性 nucleotide 分画へのとりこみをみる実験では、6 時間絶食後 C^{14} -xylitol 50 μC を腹腔内に投与して 2 時間後実験に供した。なお末梢脂肪組織に関する *in vitro* の実験では、ラットの副辜丸脂肪組織 2g について観察した。

3. 生化学的測定法

肝脂質の分析：肝脂質は肝湿重量の 10 倍容の chloroform 2: methanol 1 (v/v) 混液で 37°C 60 分抽出し、抽出液をさらに 0.2 容の生理的食塩水と振盪して 1 夜放置後、chloroform 層を窒素気流中で濃縮乾固して重量を測定して肝総脂質量とした。この総脂質を 10ml の ether に溶解して一定量となし、その上清を各脂質分画の定量に用いた。Triglyceride の定量には末広法³¹⁾を用い、phospholipid は Fiske, Sabbarow 法³²⁾に従って脂質磷を定量し、これに 25 を乗じたものを phospholipid 量とした。Cholesterol の定量は Kiliani 反応を用いた柴田法³³⁾に従って総 cholesterol を定量した。

肝脂質の分画化は薄層クロマトグラフィーにより、固定相にシリカゲル、展開液に石油エーテル、エーテル、酢酸 (80 : 20 : 1 v/v/v)^{34,35)}を用い、展開後 triglyceride, phospholipid に相当する部分をけずりと、chloroform, methanol (2:1) 混液で 3 回抽出し、それぞれの分析に用いた。

肝の酸溶性 nucleotide の分析は Hurbert³⁶⁾ および寺田³⁷⁾ の semimicrogradient elution chromatography に準じて、凍結肝 2g の 0.6N 過塩素酸抽出液を 5N 苛性カリ溶液で中和して得た酸溶性分画抽出液を 0.6×40cm の Dowex 1 (×10) ギ酸型カラムで分画化した。なおこれらの肝脂質分画や酸溶性分画中の xylitol-14C の放射活性の測定は、各分画の一部をプランチエットにとり直接 gas flow counter で測定するか、あるいは thin layer chromatoscanner (Aloca, Model TRM 1-B) によった。

肝酵素活性の測定：肝 triglyceride lipase 活性の測定は Olson, Aloupovic の方法³⁸⁾に準じ、0.1M phosphate buffer (pH 7.2) で 10 倍の肝 homogenate をつくり、12,000×g 10 分間遠心してその上清を酵素液とし、1ml の酵素液に 7ml の 0.1M phosphate buffer (pH 7.2), 1ml の 4% sodium deoxycholate, 1.0ml の 10% olive oil emulsion (2% のアラビアゴムと 10% のオリーブ油を含む水溶液を homogenize したもの) を加え、37°C で incubate し遊離する脂肪酸を Trout らの変法³⁹⁾で測定した。肝 esterase 活性は Hesterin の変法⁴⁰⁾に準じ、肝 1g に 0.03M phosphate buffer (pH 7.4) 5ml を加えて homogenize し、12,000×g, 10 分間遠心してその上清を酵素液とし、1ml の酵素液を 0.9 ml の 0.03M phosphate buffer (pH 7.4) および 0.1 ml の methyl butyrate の ethanol 溶液 (methyl butyrate

100μmol を含む) を加えて 30 分 incubate したのち、水 4ml を加えてよく混和し、この溶液 0.5ml にアルカリ性ヒドロキシラミン 1.5 ml を加えて室温で 5 分放置後、18% TCA 1ml, 4N HCl 1ml および 10% FeCl₃ 溶液 1ml を順次加えて混合し遠心して、その上清について 530mμ の吸光度を測定した。

肝細胞分画化：0.25M sucrose 溶液で肝の 10 倍 homogenate をつくり、Schneider, Hogeboom 法⁴¹⁾にしたがって 0°C の冷却下で分画化した。

肝 mitochondria の脂肪酸酸化能の測定：Cheldierin, Beinert ら⁴²⁾の方法にしたがって 1.5 ml の mitochondria 懸濁液に 4μmol の MgCl₂, 3μM の adenine 5'-phosphate, 20μM の phosphate buffer (pH 7.2), sparker として 5μM の citrate, 基質として 20μM の sodium octanate を加え、0.9% KCl で最終容積が 3.0 ml になるように調製し、酸素をガス相として 37°C で manometric に O₂ uptake を測定し、基質を加えない場合の O₂ uptake を endogenous respiration として差し引き、O₂ uptake (μl) を mitochondria の乾燥重量で除して QO₂ とした。反応終了後、反応液に 0.2ml の 60% 過塩素酸を加え、生ずる沈殿をのぞき、上清の一部について Edson の aniline citrate 法⁴³⁾でアセト酢酸を定量した。

末梢脂肪組織の lipolysis については Kappeler の方法⁴⁴⁾に準じ、750 mg の脱脂 bovine albumin を含む Krebs Ringer bicarbonate 溶液 100ml に glucose または xylitol をそれぞれ 100mg 溶解した溶液をつくり、それぞれその 20ml 中で正常ラットの副腎丸脂肪組織 2 個を 37°C で振盪静置し、medium 中に遊離する glycerol 量を 30 分ごとに Eggstein, Kreutz の方法⁴⁵⁾で定量した。

4. 肝細胞の超微細構造の観察

細切した肝組織を氷冷 1.1% glutaraldehyde, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 中で 2 時間固定して、さらに 2% osmium tetroxide, 0.21M sucrose, 0.1M phosphate buffer にて 2 時間固定して得た標本を Porter 型超ミクロトーム (MT₂) により薄切し、uranylacetate および lead citrate で 2 重染色を施し、HV 11 DS 型電子顕微鏡にて直接 1.0×10⁴ で観察した。

成績ならびに考察

1. OA 脂肪肝に対する Xylitol の抗脂肝作用

1) Xylitol の脂肪肝予防効果

図 3. 肝脂質量の変化

Wistar 系雄ラットを OA 飼料で飼育すると、2 週間以内に肝小葉の周辺部からはじまる著明な脂肪肝が急速に発症するのであるが、OA-xylitol 飼料でラットを 2 週間飼育した場合には、脂肪肝の発症はほとんど完全に抑制された。すなわち、両群の肝脂質量の相異を xylitol 食群を対照として比較すると、図 3 のごとく OA 群の肝にみられた著明な triglyceride の蓄積は OA-xylitol 群では完全に抑制された。

腹腔内に投与された tracer dosis の C^{14} -xylitol の一部は、肝の triglyceride と phospholipid の glycerol 部分に incorporate されるので、xylitol の抗脂肪肝作用を OA 脂肪肝の発症初期について検討するため、基礎食、xylitol 食、OA 食、OA-xylitol 食でそれぞれラットを 5 日間飼育し、6 時間絶食後 $50\mu\text{C}$ の C^{14} -xylitol を腹腔内に投与して、2 時間後実験に供して肝脂質を抽出して、薄層クロマトグラフィーで triglyceride, phospholipid, cholesterol, free fatty acid を分離して、各分画の放射活性を thin layer chromatoscanner で測定して triglyceride と phospholipid 分画への放射活性の分布を各群についてみると、表 2 のごとく、OA 群にみられる

表 2. 肝脂質分画における Xylitol- C^{14} の分布

	Triglyceride	Phospholipid
Purified diet	26.5%	72.6%
Purified diet + Xylitol	27.6	70.2
Orotic acid diet	60.9	37.6
Orotic acid diet + Xylitol	19.2	80.7

図 4. 完成した OA 脂肪肝に対する xylitol の治療効果と肝内脂質

triglyceride 分画での放射活性の著減は OA-xylitol 群では逆転していることが観察された。このことは xylitol が脂肪肝における phospholipid 合成能を亢進して、triglyceride の蓄積を抑制することを示唆する事実である。

2) Xylitol の脂肪肝治療効果

ラットに OA 飼料を 2 週間投与して脂肪肝が完成したのちに飼料を OA-xylitol 食にきりかえると、図 4 のごとく、OA 投与群にみられた著しい肝 triglyceride の蓄積はきわめて短期間に急速に消失していく。この経過を組織学的にみると、完成した脂肪肝では肝小葉の全域に著しい脂肪浸潤が認められるのであるが(図 5-a)、この時期に OA 飼料に xylitol を 10% に添加して、3 日後には脂肪浸潤は小葉中心から急速に消失していく状態が認められた(図 5-b)。

2. Xylitol の lipolytic effect の本態

1) 脂肪肝の nucleotide pattern と xylitol

C^{14} -xylitol $50\mu\text{C}$ をラットの腹腔内に投与して、2 時間後の肝酸溶性分画の nucleotide pattern と xylitol- C^{14} の分布を、OA 脂肪肝および xylitol 治療肝(OA 食飼料で 2 週間飼育後、OA-xylitol 飼料で飼育 5 日後のラット肝)について比較すると、図 6-a に示すごとく、OA 脂肪肝にみられる adenine, cytosine nucleotide の減少と uracil nucleotide の増加という特異な nucleotide pattern と各 nucleotide 放射活性の低下は、図 6-b のごとく xylitol 治療 5 日で明らかに改善され、しかも xylitol- C^{14} は purine, pyrimidine nucleotide の全分画へ著しくとりこまれた。

2) 肝脂質の動態と xylitol

a. OA 脂肪肝 (OA 飼料で 16 日間飼育したラット肝)

b. Xylitol 治療肝 (OA で 14 日間飼育し以後 OA+xylitol 食で 3 日間飼育したラット肝)

図 5. OA 脂肪肝と xylitol 治療効果

a. Chromatographic profile of acid-soluble nucleotides in the rat liver, fed on an orotic acid diet for 19 days

b. Chromatographic profile of acid-soluble nucleotides in the rat liver, fed on an orotic acid diet for 19 days and xylitol for the last 5 days

図 6.

表 3. OA 脂肪肝と Xylitol 治療肝の肝脂質

a. 肝脂質量の変化

mg/g wet tissue	TG	PL
Purified diet	12.1	33.7
Orotic acid diet	109.0	29.1
Orotic acid+Xylitol	14.1	30.4

b. 肝脂質分画の放射活性の分布

	TG	PL	CHL	NEFA
†Purified diet	47.3%	43.3%	0%	2.0%
†Orotic acid diet	69.5	21.2	0	3.2
*Orotic acid+Xylitol	32.4	66.1	0	1.9

†Rats were fed for 14 days

*Rats were fed on orotic acid diet for 19 days, treated with xylitol for the last 5 days

基礎食群, OA 食群, xylitol 治療群の3群についての肝脂質の動態をみると, OA 脂肪肝では常に triglyceride の著しい蓄積と同時に phospholipid の減少が認められ, xylitol 治療肝ではほぼ正常域にまで改善を示す(表 3-a)。さらに tracer dosis の C^{14} -xylitol ($50\mu\text{C}$) を腹腔内投与後, 2時間における肝脂質分画へのとりこみを比較すると, 表 3-b にみるごとく, 基礎食群では, triglyceride と phospholipid にほぼ均等に放射活性が分布するのに反し, OA 群では triglyceride 分画に 69.5% のとりこみを認め, phospholipid 分画では 21.2% と放射活性の分布の低下を認めた。Xylitol 治療群ではこの関係は逆転し, triglyceride 分画へのとりこみは 32.4% と減少し, phospholipid 分画へのとりこみは 66.1% と高値を示し, 先の予防実験にみられた成績と同様の結果を得た。

以上の実験結果は, OA 脂肪肝に対する xylitol の lipolytic effect の本態について, xylitol が肝における nucleotide unbalance を正常化しつつ, 肝の磷脂質合成系を賦活する可能性をかなり明白に裏づけるものであろう。

3) Xylitol の lipolytic effect 機序について

表 4 は肝脂質にとりこまれた tracer dosis の xylitol- ^{14}C の経時的消長を示し, OA 脂肪肝では脂質の turn-over が著しく低下するのに反して, xylitol 治療わずか 3 日間で肝脂質の turnover が著しく高まって, ほぼ対照の速度にまで回復した。このような turnover rate の差異を肝の triglyceride lipase あるいは esterase 活性の相異に求めて検討を試みたのであるが, 図 7 に示すごと

表 4. 腹腔内に投与した Xylitol- ^{14}C ($50\mu\text{C}$) の肝脂質における turn over

	cpm/gm wet liver after intraperitoneal injection	2 hrs.	16hrs.	185 hrs.
Purified diet for 17 days	103,500	25,500	9,150	
Purified diet, 17 days + Xylitol for last 3 days	87,500	27,300	5,800	
OA diet for 17 days	150,000	81,350	36,900	
OA diet, 17 days + Xylitol for last 3 days	153,000	41,550	6,550	

a. 遊離脂肪酸量からみた肝 triglyceride lipase 活性

b. 肝の esterase 活性

図 7.

く, 基礎食群, xylitol 群, OA 群, OA-xylitol 治療群の間にほとんど有意の差が認められなかった。したがって肝にさかんに脂肪が蓄積している場合も, また xylitol 添加によって肝蓄積脂肪が急速にとれていく場合も, triglyceride の glycerol と脂肪酸への分解はほぼ同じ速

表 5. 肝 Mitochondria 脂肪酸酸化能に及ぼす Xylitol の影響

	O ₂ uptake, μ l	Dry weight (mg) of liver mitochondria	QO ₂
Purified diet for 4 W	119.0	33.7	3.54
Purified diet for 4 W +			
Xylitol for last 2 D	142.0	31.7	4.48
Orotic acid diet (4 W)	65.0	33.3	1.95
Orotic acid diet (4 W) +			
Xylitol for last 2 D	346.0	30.5	11.35

Mitochondrial suspension, 1.5 ml made to final volume of 3.0 ml with 0.9% KCl containing 3 μ moles of AMP, 4 μ moles of MgCl₂, 20 μ moles of phosphate buffer, pH 7.2, and 20 μ moles of sodium octanate. 5 μ -moles of citrate were added as a sparker. Gas phase was oxygen and the temperature was 37°C.

度で進んでいることになる。

次に脂肪酸酸化の場合である肝 mitochondria 分画について、octanate を基質として manometric に脂肪酸酸化能の動態を検討した。表 5 に示すごとく、OA 脂肪肝では脂肪酸酸化能が著しい低下を示したのであるが、xylitol 添加 2 日後にはこの酸化能は著しく促進された。同時にこれらの肝について subcellular fraction の磷脂質の分布を比較したところ、表 6 のごとく、OA 脂肪肝の mitochondria 分画にのみ有意な磷脂質量の低下が認められ、xylitol 添加で急速に正常レベルに戻る事が観察された。

表 6. 肝における磷脂質の Subcellular localization

	N	Mt	Mc	S
Purified diet	43.6	100.5	159.5	1.2
Purified diet+Xylitol	42.3	94.8	150.0	1.0
Orotic acid diet	44.2	58.5	158.8	2.8
Orotic acid diet+Xylitol	44.2	82.0	149.9	1.7

μ g/mg dry weight

N: nucleus Mt: mitochondria
Mc: microsome S: soluble fraction

このようにして、xylitol は脂肪肝の mitochondria における脂肪酸酸化能を著しく促進することが明らかになったのであるが、この過程で肝内にアセト酢酸の蓄積を伴うか否かは ketosis 発症の可能性につながる問題として重要である。そこで mitochondria の脂肪酸酸化能を

表 7. 肝 Mitochondria の脂肪酸酸化能および acetoacetate 生成に及ぼす Xylitol の影響

	QO ₂	Acetoacetate
Purified diet for 17 days	4.36	15.8 μ g/ml
Purified diet, 17 days, xylitol for last 3 days	5.66	17.8
OA diet for 17 days	0.91	4.5
OA diet, 17 days, xylitol for last 3 days	15.20	10.2

manometric に測定した反応液中のアセト酢酸量を Edson 法で検討したところ、表 7 に示すごとく、xylitol 治療肝では脂肪酸酸化の著しい亢進が認められたのにもかかわらず、アセト酢酸量は対照に比してむしろ低値を示した。このことは xylitol が脂肪酸の完全酸化を促進することを示唆するものであって、糖尿病における xylitol の antiketogenic な臨床効果⁴⁶⁻⁴⁸⁾ と考え合わせて興味ある実験結果と考える。

以上の生化学的観察から、OA 脂肪肝の本態は、肝における磷脂質合成の障害、ことに肝細胞 mitochondria の膜様構造における磷脂質量の低下による脂肪酸酸化の障害に基づく triglyceride の蓄積に帰せられ、また xylitol の lipolytic effect の本態はこのような脂肪肝 mitochondria の質的・機能的欠損の正常化にあることが明らかになったのであるが、さらに形態学的な裏付けを得るために、肝の mitochondria の population を中心に電顕的な観察を試みた。

図 8-a は xylitol 添加基礎食 2 週の対照肝の電顕像で、超微構造的に正常であるが、図 8-b の OA 脂肪肝では肝細胞内に脂肪滴の著しい浸潤が認められるとともに、bizzarr shape の mitochondria が出現し、その population は明らかに著減を示し、同時に粗面小胞体は層状配列を失って不規則な配列を示し、vesicular configuration が目立つ。OA 飼料に xylitol を添加すると、図 8-c のごとく肝細胞内の脂肪滴は急速に消失するとともに mitochondria の population は増して、粗面小胞体の規則正しい層状配列が復元されていく。

以上の実験的観察は、脂肪肝に対する xylitol の lipolytic effect についてなされたものであるが、本来 lipolysis とは脂肪組織について問題となる言葉であって、triglyceride の酵素的加水分解によって脂肪酸と glycerol を生成する現象と定義されている。したがって、脂肪組織の liposis に対して xylitol がどのように作用する

図 8-a. 基礎食で飼育し最後の3日間に xylitol を添加したラット肝の電顕像

図 8-b. OA 脂肝の電顕像

図 8-c. OA-xylitol 治療 10 日目のラット肝電顕像

a. 副睾丸脂肪組織の glycerol 放出に及ぼす xylitol の影響 (*in vitro*)

b. Glucose medium 中での副睾丸脂肪組織の glycerol 放出に対する xylitol の影響 (*in vitro*)

図 9.

かも検討されねばならない。そこで albumin を遊離脂肪酸の acceptor として, *in vitro* で副率丸脂肪組織を glucose 100mg/dl 添加 Krebs Ringer bicarbonate 中で incubate した場合と, 同濃度の xylitol 存在下で incubate した場合に, medium 中に遊離する glycerol を経時的に測定して比較すると, 図 9-a のごとく xylitol 添加によって脂肪組織の lipolysis は明らかに抑制された。また glucose medium 中で lipolysis の進行中に xylitol を添加しても, 図 9-b のごとく lipolysis は著しく低下することが認められた。

脂肪組織の lipolysis で生成される遊離脂肪酸と glycerol うち, 遊離脂肪酸の大部分は脂肪組織の 1-2-glycerophosphate として再エステル化され, さらに tri-glyceride として脂肪組織中へとりこまれるのであるが, 遊離 glycerol は glycerokinase を欠く脂肪組織では再利用されることはほとんどないので^{49,50)}, glycerol 量は lipolysis の正確な物さしとなりえよう。

一般に脂肪組織の lipolysis は glucose の供給と密接に相関し, 脂肪組織が glucose と十分利用しうる状態では lipolysis は抑制されて, むしろ triglyceride 合成がたかまる。Glucose 利用の低下している状態——飢餓や糖尿病——では lipolysis は亢進して, 遊離脂肪酸は肝臓, 筋肉等の組織に達して酸化基質としての需要をみたす⁵¹⁾。脂肪組織には hormone sensitive lipase が存在し, いわゆる lipolytic hormone としては ACTH⁵²⁾, 成長ホルモン⁵³⁾, epinephrine⁵⁴⁾, norepinephrine^{55,56)}, glucagon⁵⁷⁾ などが知られている。Insulin は逆に脂肪組織の lipolysis を抑制する⁵⁸⁾。また cyclic-3', 5'-AMP は脂肪組織の triglyceride lipase を活性化し, lipolysis を促進すると考えられ, 脂肪組織に対する glucagon の lipolytic effect は adenylcyclase 系を刺激して, 脂肪組織の cyclic 3', 5'-AMP level をたかめるためと考えられている^{59,60)}。

Insulin は細胞内の cyclic-3', 5'-AMP level を下げするため triglyceride lipase を不活性化に保ち, したがって lipolysis はほとんどみられなくなる^{61,62)}。一方, 脂肪組織の lipolysis を抑制する非ホルモン物質としては, nicotinic acid⁶³⁾, 2-deoxy-D-glucose⁶³⁾, adenosine⁴⁴⁾, adenine nucleotide⁴⁴⁾ などが知られている。

Xylitol が glucose に比して *in vitro* で脂肪組織の lipolysis を低下せしめたことは, xylitol が insulin independent に細胞内にとりこまれ, glucose に比してはるかに利用されやすい糖質である可能性を示唆している。

しかし 100mg/dl という xylitol 濃度はいかにも非生理的な濃度であって, 基質レベルでの拮抗阻害とも考えられ xylitol 添加量の吟味を試みるべきであろうが, 臨床的に xylitol が血中の脂肪酸レベルを低下させる事実⁴⁶⁻⁴⁸⁾を説明しうる理由の一つであろう。

Uron 酸回路の要員としての xylitol は, 生物学的活性物質として少なくとも2面の作用をもち, 1) 肝内 nucleotide 代謝相では PRPP 生成刺激物質として OA 脂肪肝に対しては強い lipolytic effect を示し, 2) 一方, 末梢脂肪組織では lipolysis を抑制する非ホルモン物質としての効果を示すことはきわめて興味深い。

結 語

以上 OA 脂肪肝の発生機序について, 核酸代謝と脂質代謝の関連から分析を行い, さらに uron 酸 cycle の member である五炭糖アルコール xylitol の経口投与による OA 脂肪肝発症過程に及ぼす影響を検討し, その lipolytic effect について検討を加え次の結論を得た。

1. 肝における nucleotide 代謝において xylitol は ribose-5-phosphate を経る PRPP 供与体として, OA 脂肪肝ラットの purine nucleotide の de novo 合成系を活性化することにより, 肝における purine と pyrimidine nucleotide の metabolic unbalance を改善する。

2. OA 脂肪肝における xylitol の lipolytic effect の本態は, 1) ATP 関与の CDP-choline, CDP-ethanol amine を介する phospholipid 合成系を賦活化し, 2) 脂肪肝の mitochondria 膜の構成脂質量の低下を是正することによって, 3) mitochondria の脂酸酸化能を著しく亢進するという代謝的な sequential potency にあるのであって, 肝の triglyceride lipase あるいは, 非特異的な esterase 活性を介する lipolytic action ではない。4) このような脂肪肝に対する xylitol の効果は超微形態的にも証明された。5) しかしながら, xylitol は末梢脂肪組織では lipolysis を抑制する。

本稿を終わるにあたり, ご指導, ご校閲を賜った, 恩師高橋忠雄教授, ならびに終始直接ご指導いただいた藤沢例講師に深く感謝するとともに, ご協力いただいた本学病理学教室安田寛基助教授, および当教室第3研究室の諸兄に深甚の謝意を表す。

なお本論文の要旨は, V. Sessio Soc. Int. Hepatolog-

icae (I.A.S.L.), Prag Karlsbad, 1968. 第3回日本肝臓学会東部会 1969, 第55回日本消化器病学会総会 1969にて発表した。

また本研究の一部は文部省科学研究費(高橋忠雄教授)に負うところ大であり, さらに xylitol- ^{14}C の提供をいただいた株式会社エーザイのご好意に深謝する。

文 献 1) Biscaro, G. & Belloni, E.: Ann. Soc. Chim. Milano, **11**, **18**: 71, 1905. 2) Bendich, A.: The Nucleic Acids, edited by Chargoff, E. & Davidson, J. N., Vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 81. 3) Wieland, O. P., Avenner, J., Boggiono, E. M., Bohonos, N., Hatchings, B. L. & Williams, J. H.: J. Biol. Chem. **186**: 737, 1950. 4) Novak, A. F. & Hause, S. M.: J. Biol. Chem. **174**: 235, 1948. 5) Wright, L. D.: J. Am. Chem. Soc. **72**: 2312, 1950. 6) 牧野堅, 佐藤精夫, 木下武夫, 佐々木位: ビタミン **6**: 605, 1953. 7) Manna, L. & Hauge, S. M.: J. Biol. Chem. **202**: 91, 1953. 8) Wright, L. D., Miller, C. S., Skeggs, H. R., Huff, J. W., Weed, L. L. & Wilson, D. W.: J. Am. Chem. Soc. **73**: 1898, 1951. 9) Weed, L. L. & Cohen, S. S.: J. Biol. Chem. **192**: 693, 1951. 10) Weed, L. L. & Wilson, D. W.: J. Biol. Chem. **189**: 435, 1951. 11) Hurlbert, R. E. & Potter, V.: J. Biol. Chem. **209**: 1, 1954. 12) Reichard, P. & Lagerkrist, U.: Acta. Chem. Scand. **7**: 1207, 1953. 13) Noelle, R.: Dtsch. Med. Wschr. **79**: 1331, 1953. 14) Beckmann, K., Brügel, H. & Mertz, D. P.: Dtsch. Med. Wschr. **81**: 572, 1956. 15) 吉田常雄, 永井清保, 富田昭夫, 松久博: 第45回日本消化器病学会 1959. 日消会誌 **57**: 902, 1960. 16) 山形敏一, 海藤勇ほか: 最近医学 **15**: 432, 1960. 17) Standerfer, S. B. & Handler, P.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **90**: 270, 1955. 18) Handschumacher, R. E., Creasy, W. A., Jaffe, J. J., Pasternack, C. A. & Hankin, L.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **46**: 178, 1960. 19) Handschumacher, R. E., Creasy, W. A. & Hankin, L.: Federation Proc. **19**: 310, 1960. 20) 高橋忠雄, 藤沢洌ほか: 第3回国際肝臓研究会日本支部総会, 1961. 21) 山村雄一: 第1回 AICA 研究会, 1962. 22) 田中照二: 日内会誌 **52**: 40, 1964. 23) 岡部和彦: 慈医誌 **80**: 890, 1965. 24) Fujisawa, K., Osamura,

H., Kurihara, N., Okabe, K., Tanaka, T. & Takahashi, T.: Nucleic Acid in Normal and Cancer Tissues, Gann Monograph 6, Maruzen Co., Tokyo, 1968, p. 143.

25) 長村日出夫: 慈医誌 **83**: 25, 1968.

26) Goldthwait, D. A., Peabsdy, R. A. & Greenberg, G. R.: J. Biol. Chem. **221**: 569, 1956. 27) Kornberg, A., Lieberman, I. & Simms, E. S.: J. Biol. Chem. **215**: 389, 1955. 28) Fujisawa, K., Ohkawa, K., Tanaka, T. & Takahashi, T.: International Symposium on Metabolism, Physiology and Clinical Use of Pentoses and Pentitols, edited by Horecker, B. L., Lang, K. & Takagi, Y., Springer Verlag, Berlin, Heiderberg, New York, 1969, p. 303. 29) Fujisawa, K. & Takahashi, T.: 5th International Meeting of International Association for the Study of the Liver, Karlovy Vary, Czechoslovakia, July 14, 1968. 30) Handschumacher, R. E., Cresy, W. A., Hankin, L., Jaffe, J. J. & Pasternak, C. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **46**: 178, 1960.

31) 末広雅也: 生化学 **33**: 387, 1961. 32) Fiske, C. H. & Sabbarow, Y.: J. Biol. Chem. **66**: 375, 1925. 33) 柴田進, 長谷川錦三郎: 医学と微生物学 **39**: 1956, p. 21. 34) Schlierf, G. & Wood, P.: J. Lipid. Res. **6**: 317, 1965. 35) Blank, M. L., Schmidt, J. A. & Privett, O. S.: J. Am. Oil Chemists Soc. **41**: 371, 1964. 36) Hurbert, R. B., Schmitz, H., Brumm, A. F. & Potter, V. R.: J. Biol. Chem. **209**: 23, 1954. 37) 寺田新一: 生化学 **31**: 795, 1959. 38) Olson, A. C. & Alaupovic, P.: Biochim. Biophys. Acta. **125**: 185, 1966. 39) Trout, D. L., Estes, E. H. Jr. & Friedberg, S. J.: J. Lipid Res. **1**: 199, 1960. 40) Robert, P. S.: J. Biol. Chem. **232**: 285, 1958.

41) Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H.: J. Biol. Chem. **183**: 123, 1950. 42) Cheldelin, V. H. & Beinert, H.: Biochim. Biophys. Acta. **9**: 661, 1952. 43) Edson, N. L.: Biochem. J. **29**: 2082, 1935. 44) Kappel, H.: Diabetologia **2**: 52, 1966. 45) Eggstein, M. & Kreutz, F. H.: Klin. Wschr. **44** (5): 262, 1966.

46) Bässler, K. H. & Dreiss, G.: Klin. Wschr. **41**: 593, 1963. 47) 山形敏一, 後藤由夫, 丸浜喜亮: 代謝 **2**: 410, 1965. 48) Yamagata, S., Goto, Y., Ohneda, A. & Anzai, M.: Lancet **II**: 918, 1965. 49) Leboeuf, B.: Handbook of Physiology, edited by Renold, A. E. & Cakill, G. F., Section 5, Adipose tissue

American Physiological Society, Washington, D. C. 1965, p. 385. 50) Vaughan, M.: J. Biol. Chem. **237**: 3354, 1962.

51) Frederikson, D. S. & Gordon, R. S.: Physiol. Rev. **38**: 585, 1958. 52) White, J. E. & Engel, F. L.: J. Clin. Invest. **37**: 1556, 1958. 53) Raben, M. S. & Hollenberg, C. H.: J. Clin. Invest. **37**: 922, 1958. 54) Jungas, R. L. & Ball, E. G.: Biochemistry **2**: 383, 1963. 55) Eaton, R. P.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **114**: 599, 1963.

56) White, J. E. & Engel, F. L.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **99**: 375, 1958. 57) Vaugham, M., Berger, J. E. & Steinberg, D.: J. Biol. Chem. **239**: 401,

1964. 58) Froesch, E. R., Buerger, H., Bally, P. R. & Leubhart, A.: Mol. Pharmacology **1**: 280, 1965. 59) Rizach, M.: J. Biol. Chem. **239**: 392, 1964. 60) Sutherland, E. W., Butcher, R. W., Robinson, G. A. & Hardman, J. G.: Wirkungsmechanismen der Hormone, 18 Colloqu. Ges. Physiol. Chem., Mosbach 1967, P. 1, ed. by Karlson, P. Berlin-Heidelberg- New York: Springer 1967.

61) Butcher, R. W., Sneyd, J. G. T., Park, C. R. & Sutherland, E. W.: J. Biol. Chem. **241**: 1651, 1966. 62) Jungas, R. L.: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **56**: 757, 1966. 63) Carlson, L. A.: Ann. New York Acad. Sci. **131**: 119, 1965.

*

*

*

*

*

*

*