〈原 著〉

実験的再生肝における脂質の意義

青山進午 松原弘昌 菊地三郎
 木村邦夫 伊藤 圓 伊東英吉
 西尾昭男 宮守嵩博 藤田昭夫*

緒 言

肝の再生力の旺盛な事実は古くから報告されており、Higgins and Anderson¹⁾によればラットでは肝の70%を切除しても2週間以内に肝体重比が正常にもどるとされ、また硬変肝もほぼ正常肝と同様に旺盛な再生力を示すことが報告されている²⁾。しかしながらこれらの肝再生現象を促進ないし調節する因子に関する研究は未だ少なく、再生肝の代謝面から再生現象を観察した報告もあまり多くはない。肝の再生にあたっては細胞の分裂増殖^{1, 3, 4, 5)}が最も重要な課題であり、その円滑な運営には種々の酵素の活性の増大と代謝の亢進⁶⁾とが要求されるはずである。われわれは肝が旺盛な再生活動を営むに当り、いかなる変動が脂肪酸代謝にひきおこされるか、および再生活動において脂質がどのような役割を果たすかを検討する目的で、今回は正常肝について脂肪酸の分析と脂肪酸酸化酵素活性およびコハク酸脱水素酵素活性の変動とについて検討した。

実 験 方 法

実験動物： 体重110g前後のウイスター系雄性ラットを用い、Higgins and Andersonの肝部分切除法¹⁾にしたがつてエーテル麻酔下に開腹し、左右4肝葉のうち60%以上の切除術を行なった。動物は術後第1日のみ20%蔗糖液を与え、以後は十分な水分とオリエンタル固形食で飼育し、術後3, 5, 7, 14日と日を追って心穿刺により採血後肝を摘出したにち測定に供した。

* S. Aoyama (教授), H. Matsubara, S. Kikuchi, K. Kimura, M. Ito, E. Ito, A. Nishio, T. Miyamori, A. Fujita: 名古屋大学青山内科。

なお対照としては麻酔下に開腹術のみを実施したラットを用いた。

再生比の測定： 各動物の体重測定ならびに湿および乾燥重量を正常肝・切除肝について測定し、これらより正常肝体重比、再生肝体重比を計算し、さらに切除比を求め60%以上のものを実験に供した。

組織学的所見： 各再生肝についてH.E.およびSudan III染色によつて組織学的変化を観察した。

脂質測定法： 肝および血中の各脂質分画の測定は、総脂質量は重量法、磷脂質量はFiske Subbarow法⁷⁾、遊離および総コレステロール量はSperry-Webb法⁸⁾、総脂肪酸量はSmith-Kick法⁹⁾、遊離脂肪酸(NEFA)量はDoleの方法¹⁰⁾で行なつた。

酵素活性法： コハク酸脱水素酵素活性は肝ホモジネートを用いてワールブルグ検圧計を使用し、Schneider and Potterの方法¹¹⁾で測定し、脂肪酸酸化酵素活性はSchneider and Hogeboom法¹²⁾によつて作成した肝ミトコンドリアについて、カプリル酸を基質としてLehningerの方法¹³⁾によつて測定した。

ガスクロマトグラフィ(GLC)による脂肪酸組成の分析法： 脂肪酸メチルエステルの作成方法はBöttcherらの方法¹⁴⁾に準じて酸化に十分注意して行なつた。その詳細は教室の木村ならびに伊藤の報告^{15, 16)}のごとくである。GLCは水素炎イオン化ディテクターを装置した島津製GC-IB型高感度ガスクロマトグラフを使用した。分析条件は下記のごとくである。

カラム長	750 mm (内径 6 mm)
固定相	Celite 545 (80~100 mesh)
液 相	15% (W/W) の Diethylene Glycol の Succinate Polyester
気 相	ヘリウム 40 ml/min.
温 度	179°C
空 気	100 l/min. 水素 65 l/min.

Succinate Polyester は Herb, Magidmann and Rie-

menschneider の方法¹⁷⁾によって名大工学部応用化学福住研究室で合成されたものの提供をうけた。GLC で出現した高度不飽和脂肪酸のピークの同定は同研究室の指導協力により、水素添加、アルカリ異性化、尿素分別などの分析法を併用し、さらに各種既知高度不飽和酸の保持時間より決定したものである。これら各脂肪酸の組成比はプランメーターを用い、全面積に対する各ピークの面積の百分率として計算した。

実験成績

肝再生率の変動 (図1)

肝切除後のラットの体重 100 g 当りの湿および乾燥肝重量の増加ならびに体重 100 g 当りの湿および乾燥肝再生量の変化は図1に示した。肝再生率は3日目に最高であり5日目に最低であり7日目再び上昇を示した。これらの結果は Higgins らの2~3日目にかけて最大の再生率をみたという報告¹⁾とよく合致した。また14日目にはほぼ正常の湿肝体重比まで回復する傾向を認めた。

組織像の変化

組織学的には3日目の再生肝では肝細胞は比較的大型で核分裂像が最も強く細胞質内に脂肪滴を含むものの存在も認めた。5日目には3日目とほぼ同様の所見である

がうつ血水腫が軽度存在した。7日目でも核分裂像を認めたが、14日目には大型肝細胞は減少し核分裂像もほとんど認めなかつた。

肝脂質の変動 (図2)

乾燥肝重量当りの脂質分画の変動は図2のごとく、すべて3日目にすでにかかなり増加し5日目でやや軽度増加となり以後正常値にもどる。

血中脂肪酸量の変動 (表1)

血中総脂肪酸量は対照に比して有意の差を認めなかつた。一方血中 NEFA 量は全経過を通じて手術ラットでは高い傾向を示した。

再生肝の酵素活性の変動 (図3)

単位肝乾燥重量当りのコハク酸脱水素酵素活性は切除術後3日目に上昇を、5日目に低下をみ、7日以後再び上昇傾向を示した。脂肪酸酸化酵素活性は術後3日目の肝再生の最盛期に一致して著明な活性亢進を認め、以後14日目に至るも高値を示した。

肝および血漿脂質の構成脂肪酸組成の変動 (表2および図4, 5)

オリエンタル固型飼料の脂質構成脂肪酸組成は表2に示したごとくである。正常ラット肝の主な脂肪酸はパルミチン酸 (C_{16}), ステアリン酸 (C_{18}), オレイン酸

a. 肝重量の増加 (体重 100 g 当り) b. 再生肝重量の変化 (体重 100 g 当り)

図 1. 肝 再 生 状 態

図 2. 再生肝における肝脂質分画の変動 (乾燥肝重量当り)

表 1. 血中総脂肪酸量および非エステル型脂肪酸量の変動 (5例平均)

	術 前 値		3 日 目	5 日 目	7 日 目	14 日 目
血中総脂肪酸量	mg/dl 311.6±15.2	肝部分切除群	348.4±21.7	324.8±28.0	323.4±26.2	333.5±31.8
		対 照 群	322.0±27.6	320.0±24.7	293.2±26.7	326.0±21.8
血中非エステル型脂肪酸量	μEq/L 566.0±52.3	肝部分切除群	630.0±60.2	724.0±74.5	760.0±64.5	814.0±81.5
		対 照 群	610.0±67.5	702.0±68.8	650.0±70.5	680.0±62.0

(C_{18F_1}), リノール酸 (C_{18F_2}), アラキドン酸 (C_{22F_4}) であり, とくにその脂肪酸組成比において注目すべき事実は, 人間も含めて他の動物の肝に比してアラキドン酸が非常に高率に含有されていることである. さらに炭素数 22 二重結合 6 コを持つ C_{22F_6} (Docosahexanoic acid) も相当量含有されており, その他の炭素数 20 以上の高級脂肪酸の種々の不飽和酸 A, B, C, D も微量ではあるが,

その存在が認められた. 正常ラットの血漿脂肪酸構成でもほとんど同様であつたが, 主として高級不飽和酸組成比では肝に比して著明に低値であつた. これらの差異は磷脂質が肝脂質の主体である事実によるものであろう.

術後の再生肝におけるこれら脂肪酸の組成比上の変動は, 第 1 にアラキドン酸の著明な減少 (57.6%) である. また, 減少を示した肝脂肪酸のうちステアリン酸は再生

a. コハク酸脱水素酵素活性の変動(乾燥肝重量当り)

b. 脂肪酸酸化酵素活性の変動(乾燥肝重量当り)

図 3. 再生肝における肝酵素活性の変動

表 2. ラット肝および血中脂肪酸組成の変動

		C ₁₄	C ₁₆	C _{16F1}	C ₁₈	C _{18F1}	C _{18F2}	C _{18F3}	A	B	C _{20F4}	C	C _{20F5}	D	C _{22F5}	C _{22F6}	
オリエンタル 固形飼料		1.14	29.54		5.70	22.72	29.54	4.54	0	0	4.54	0	2.28	0	0	0	
肝	正 常	0.38	15.33	1.48	17.52	10.42	17.07	0.30	0	1.47	24.84	0	0.74	1.31	0.73	8.41	
	再 生	3 日	0.37	16.89	2.53	13.14	18.40	17.80	0.80	0	2.16	14.32	0.61	2.13	0	1.70	9.15
		5 日	0.39	16.60	3.12	15.81	14.49	15.64	0.39	0	1.97	18.18	0.98	1.18	2.17	0.39	8.69
脂 肝	7 日	0.51	16.97	2.58	16.93	10.76	12.82	0.71	0	3.15	15.46	0.71	1.21	3.20	0.99	14.00	
	対 照	3 日	0	13.14	1.60	14.74	9.66	15.38	0	0.96	4.48	23.07	1.60	2.56	1.28	0.64	10.89
		5 日	0	17.08	2.56	17.08	12.84	14.55	0	0	1.28	24.36	0	1.28	0	0.43	8.54
肪 酸	7 日	0	16.78	2.19	16.04	13.89	14.62	0	0	2.19	21.90	0	1.09	2.19	1.09	8.02	
	血 漿	正 常	2.33	21.85	4.51	7.84	16.48	23.18	1.26	0	0.18	14.19	0	3.45	0.61	0	4.12
		再 生	3 日	0.80	16.77	3.80	6.05	15.53	17.74	0.32	2.45	9.84	7.32	6.06	1.13	7.78	0
5 日			1.05	15.86	3.29	7.71	17.11	14.14	0.34	3.05	9.68	11.85	5.61	2.61	2.53	0.17	5.00
脂 肝	7 日	1.33	21.80	3.95	6.74	17.97	19.01	0.30	1.61	8.18	6.60	5.05	1.55	2.16	0	3.75	
	対 照	3 日	0.86	21.43	4.33	8.09	18.51	19.07	0.57	0	2.02	13.29	0.58	1.45	2.88	1.15	5.77
		5 日	0.70	18.19	2.78	9.05	15.33	18.11	0.70	1.39	4.87	13.93	2.08	1.04	4.17	0	7.66
肪 酸	7 日	0.95	17.73	3.29	8.73	15.69	15.37	0.64	1.13	5.73	13.04	3.15	1.02	6.04	0.63	6.86

a. 正常ラット肝脂肪酸

b. 正常ラット血漿脂肪酸

図 4. 正常ラット脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

図 5. 肝再生時のラッセ脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

初期に減少強く (75%), 徐々に回復するが, リノール酸は逆に術後徐々に減少程度が著しくなる傾向を示した (75.1%). 一方増加肝脂肪酸のうちではオレイン酸が再生初期に著明に増加し (176%), 7日目までにはほとんど術前値まで回復を認めた. また $C_{22}F_6$ 酸含有量は術後7日目に著明な増加 (167%) を示した. その他パルミトオレイン酸も増加傾向を示し, パルミチン酸もわずかながら増量を認めた. さらに炭素数 20 以上の肝の微量含有高級不飽和脂肪酸 (B, C, D 酸) はアラキドン酸の減少とは逆に全体として増量傾向を示した. 血中脂質の脂肪酸構成の変動は肝のそれと類似の態度を示すものもあるが, 異なつた態度をとるものが多い. 血中アラキドン酸減少 (47.0%) は肝のそれより著明であり, $C_{22}F_6$ も再生7日目に肝とは逆にやや減少 (85.0%) を示した. また前述のごとき正常ラッセ血中には存在しないか 1% 以下の含有量を示すのみ的高级不飽和脂肪酸 (B, C, D) はすべて顕著な増量を示し, とくに B 酸は全脂肪酸の 9.84%, C 酸は 6.06%, D 酸は 7.78% の高含有量を示した. また A 酸は再生時血中に新しく出現をみた. これら未確定の脂酸の増加は肝よりはるかに著明であり, 血中の著しいアラキドン酸ならびにリノール酸の減少を B, C および D 酸があたかも代償しているごとき態度を示した. 軽度増加を示した脂肪酸はオレイン酸 (109.0%) である. ミリスチン酸およびステアリン酸は初期に減少 (34.3% および 77.2%) し, パルミチン酸も初期に減少 (72.6%) し 7 日目に回復を認めた. パルミトオレイン酸も減少傾向を示し, さらにリノール酸も 5 日目に著明に減少 (61%) し, リノレン酸も減少した.

さらにこれらの個々の脂肪酸の変動を肝と血中とを対比して観察してみると, 肝と血中ともに再生初期に増加するものはなく, 肝と血中ともに再生初期に減少するのはアラキドン酸とステアリン酸であり, 肝では増加し

血中ではほとんど変動しないか減少するものは $C_{22}F_6$ であつた.

総括ならびに考按

肝部分切除術後の残存肝組織の再生能力は多くの報告のごとく¹⁻⁵⁾, 本実験でもきわめて旺盛であり, 肝再生の初期には体重当りの肝湿重量の回復は著しく (図 1), 肝の乾燥重量の増加もまた術後3日目でかなり著明である. 術後5日目には一時的な回復活動の低下を示すが, その後は再び軽度の増加傾向を持続し, 14日目までにはほぼ術前の正常肝体重比にまで回復した. これらの事実は先人の報告¹⁻⁵⁾ とよく一致する. 肝再生の旺盛な時期に核分裂の活発化^{1, 5)} をみ, DNA や膠原線維の増量³⁾, さらにアミノ酸, 蛋白量の増量^{6, 18, 19)} をみることは組織修復機転の見地より必然的なことと考えられる. われわれの成績では, 肝乾燥重量当りの各脂質含有量の変動は肝再生の最も旺盛な初期にいずれも増加の傾向を認め, さらに血中総脂肪酸および NEFA 量も時期をいつにしてすべて増加傾向 (表 1) を示した事実は, これら各脂質分画がそれぞれその旺盛な肝再生活動に積極的に関与しているものであらうことを示唆する.

一方, 各種肝酵素活性も再生旺盛な時期に一致して活性の亢進を示すとされているが⁶⁾, われわれの実験でも, 肝再生の一時的休止状態を示した5日目にコハク酸脱水素酵素活性の一時的な軽度の低下をみた以外は, 終始亢進しており, 脂肪酸酸化酵素活性も全経過にわたつて亢進を示し, 2週間後でもなお活性の亢進が認められ, 肝再生像とよく一致した傾向を認め得た. 再生肝中に増量した各脂質構成脂肪酸は, 亢進した脂肪酸酸化酵素活性により活発に Acetyl-CoA にまで β 酸化を受け, コハク酸脱水素酵素を含めた TCA 環を経て効果的な酸化的磷酸化の結果, 高エネルギー源として肝再生エネルギー供

給に重要な役割を演じているものと推測できる。

肝および血中の脂質構成脂肪酸組成の変動を比較してみると、①血中で減少し肝で著しく増加する $C_{22:7}$ 脂肪酸は肝の再生の構成必要成分であつて、血中にはあまり放出されないものと考えられ、②肝、血中ともに変動少なく増加傾向を示すものはパルミチン酸とオレイン酸であり、これらは貯蔵脂肪 (Triglycerides) の主成分である事実より末梢貯蔵脂肪からの活発な動員によるものと考えられ、③肝、血中ともに減少するものはアラキドン酸とステアリン酸であり、肝の再生のための新陳代謝に盛んに利用される脂肪酸であろうと推察される。

これらの脂肪酸のほかに、正常ラットには微量に存在するのみで、いまのところ同定は困難であるが、高級不飽和脂肪酸に属するものと推定される 2, 3 の脂肪酸で、肝切除によつて著しく増加するものが認められ、とくに血液において著明であり、これらの変動は既知高級不飽和酸の肝および血中の減少を代償するとき態度を示した。しかしその本態が明らかでないため、意味づけは今後の追求にまかしたいが、おそらくは旺盛な肝再生時における脂肪酸の合成ないし分解の中間産物であろうと思われる²⁰⁾。

結 論

1) 正常ラットにおいて 60% 以上の肝を部分切除しても、14 日目までにほぼ術前値に回復する。しかし再生現象には多少の変動があり、最も旺盛な再生力を示すのは 3 日目で、5 日目には一時的な再生能力の低下を認めた。

2) 肝における各種脂質分画はすべて肝再生の旺盛な時期に一致して増量した。

3) 血中総脂肪酸および非エステル型脂肪酸量も肝再生時に常に増加傾向を示した。

4) 肝ミトコンドリアの脂肪酸酸化酵素およびコハク酸脱水素酵素の活性は、肝再生状態と平行して亢進を認めた。

5) 肝および血中脂肪酸組成の変動は肝再生初期において著明であつた。すなわち、⑥肝、血中ともに減少するものはステアリン酸、リノール酸およびアラキドン

酸、⑦肝で増加、血中で減少するものは $C_{22:7}$ 脂肪酸、⑧肝、血中ともに増加傾向を示したのはオレイン酸であつた。

6) 肝再生初期には、正常時微量に存在しその同定は未だしえないが、炭素数 20 以上の高級不飽和脂肪酸と推定されるものが著明に増量した。

7) 以上の結果より旺盛な肝再生活動には脂質が積極的に関与し、その円滑な再生過程の必須要素であることを認めえた。

参 考 文 献

- 1) Higgins, G. M. & Anderson, R. M.: Arch. Path., 12: 186, 1931.
- 2) Rabinovici, N. & Wiener, E.: Gastroenterology, 40: 416, 1961.
- 3) Rabinovici, N. & Wiener, E.: Gastroenterology, 41: 251, 1961.
- 4) MacDonald, R. A. & Rogers, A. E.: Gastroenterology, 41: 33, 1961.
- 5) Novikoff, A. B. & Potter, V. R.: J. Biol. Chem., 173: 223, 1948.
- 6) Estela Sanchez, Q. et al.: J. Biol. Chem., 236: 1607, 1961.
- 7) Fiske, C. H. & Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., 66: 375, 1925.
- 8) Sperry, W. M. & Webb, M.: J. Biol. Chem., 187: 97, 1950.
- 9) 吉川春寿: 臨床医化学, 1: 294, 1947.
- 10) Dole, V. P.: J. Clin. Invest., 35: 150, 1956.
- 11) Potter, V. R. & Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 142: 543, 1942.
- 12) Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H.: J. Biol. Chem., 183: 123, 1950.
- 13) Lehninger, A. L.: Methods in Enzymology; Vol. 1, p. 545, 1955.
- 14) Böttcher, C. J. F. et al.: Recueil, 78: 794, 1959.
- 15) 木村邦夫: 日内会誌, 50: 8, 1962.
- 16) Ito, M.: Nagoya J. Med. Sci., (投稿中).
- 17) Herb, S. F., Magidman, P. & Riemenschneider, R. W.: J. Am. Oil Chemist's Soc., 37: 127, 1960.
- 18) Christensen, H. N., Rothwell, J. T., Sears, R. A. & Streicher, J. A.: J. Biol. Chem., 175: 101, 1948.
- 19) Ferrari, V. & Harkness, R. D.: J. Physiol., 124: 443, 1954.
- 20) Mead, J. F.: Fed. Proc., 20: 952, 1961.

*

*

*