〈原 著〉

エタノール投与ラット肝 Mitochondria の Respiratory Control と Oxidative phosphorylation について

山 田 弘 三 勝 又 一 夫*

序 言

生体にエタノール（以下 E. A. と省略）を経口投与すると脂肪肝等の代謝変動^{1,2)} があるが、その本態は必ずしも明らかではない。最近、慢性 E. A. 中毒患者で肝生検の電顕像に mitochondria の変形が見出され³⁾、また尿中 porphyrin 排泄の増加から cytochrom 代謝の異常が想像されている⁴⁾。これらの事実は E. A. 飲用が mitochondria (以下 M. と省略) の機能になんらかの変化を及ぼす可能性を示す。一方 E. A. 連続投与ラットには V. A.⁵⁾、Choline⁶⁾、脂質代謝の異常等¹⁾ が存在する。

われわれは phospholipid は M. の重要な構成成分であり、長鎖の不飽和脂肪酸は uncoupler⁸⁾、u factor⁹⁾ であることから E. A. 投与ラットに肝 M. のなんらかの異常が存在する可能性を推定した。そこでわれわれは E. A. 連続投与ラットの肝 M. で oxidative phosphorylation と respiratory control (以下 R. C. と省略) を測定した。

実 験 方 法

体重 100 g 前後の雄性ウィスター系白ソ 20 匹をオリエンタル固形食 LOT17 と野菜にて 10 日間飼育し、10 匹は E. A. 群とし 1 日あたり 1.5 ml の純 E. A. を 30% 水溶液として飼料に混ぜてあたえ、他の 1 群 10 匹には等カロリーの glucose 液を混ぜて対照群とした。E. A. 投与後、毎日体重の測定を行ない 14 日後には絶食 5 時間後断頭屠殺しただちに肝をとりだし表 1 に示す荻原の方法で永冷しつつ M. suspension をつくり¹⁰⁾、Chance の方法で succinate を基質として Beckman の

oxygen electrode で酸素消費と R. C. を測定した¹⁰⁾。また肝の一部で組織化学的検索を行なうとともに、断頭時の血液について血中 E. A. の定量を Mcconned の方法¹¹⁾により行なつた。なお M. suspension のたんばく定量は Biuret 法¹²⁾によつた。また M. suspension の一部に in vitro で DPNH あるいは E. A. を加えその影響をみた。

表 1. R. C. Index と ADP/O の測定法

ラット肝 3 g + 27 ml A 液 ↓ ホモゲナイズ ↓ 30 ml の A 液加える ↓ 7000 g 5 分冷凍遠沈 ↓ 上清を 8000 g 10 分冷凍遠沈 ↓ 沈さを 30 ml の A 液でゆつくりホモゲナイズ ↓ 8000 g 10 分冷凍遠沈 ↓ 沈さを 15 ml の B 液に入れてゆつくりホモゲナイズ ↓ M. suspension A 液 { 0.21 M Mannitol 0.07 M Sucrose 10 ⁻⁴ M EDTA	M. suspension 1 ml + B 液 9 ml + 100 μM MADP (10 mM MADP 0.1 ml) + 5 mM Sod Succinate (0.1 M Sod Succinate) 0.5 ml + 10 μM 2,4DNP (1 mM 2,4DNP) 0.1 ml ↓ Beckman oxygen electrode で測定 B 液 { 0.25 M Mannitol 20 mM KCl 5 mM Phosphate 2 mM MgCl ₂ 0.2 mM EDTA
--	--

R. C. Index = $\frac{\text{ADP}}{100 \mu\text{M}}$ を加えないとき、すなわち加えた ADP がすべて ATP になつたときの 1 分間あたりの O₂ mg/l

ADP/O = $\frac{\text{ADP } 100 \mu\text{M}}{100 \mu\text{M}}$ の添加により消費された O₂ の μM = 1.6 mg/l / 消費された O₂ の mg/l

実 験 結 果

1) 体重、血中 E. A. 濃度、肝の組織像

E. A. 群と対照群とは同じ成長を示し、血中 E. A. 濃度は絶食 5 時間後では 20 mg/dl 前後で両群相等しく、

* K. Yamada (教授), K. Katsumata : 名古屋大学山田内科。

受稿 : 昭和 41 年 5 月 24 日。

肝の組織像は E. A. 群で軽度の脂肪沈着を認めたほかは著変がなかった。

2) ADP/O と R. C. Index

E. A. 群, 正常群それぞれ 6 例の ADP/O, R. C. Index を表 2 に示す。E. A. 群の ADP/O, R. C. Index はともに正常群のそれより有意に低下した ($P=0.01$)。

表 2. E. A. 投与ラットと対照ラットの ADP/O, R. C. index について

動物 番号	Albumin (－)		Albumin (＋)		
	ADP/O	R. C. Index	ADP/O	R. C. Index	
対 照 群	1	1.98	3.9	1.96	3.8
	2	1.88	4.5	1.89	4.4
	3	1.77	7.0	1.66	7.3
	4	1.80	5.0		
	5	1.68	3.4		
	6	1.89	5.5		
mean	1.83±0.169		4.89±2.11		
	p=0.01 t=3.707				
エ タ ノ ー ル 群	1	1.60	2.4	1.52	2.0
	2	1.52	3.3	1.53	3.4
	3	1.76	3.2	1.77	3.0
	4	1.74	2.9		
	5	1.58	3.4		
	6	1.64	2.6		
mean	1.64±0.155		2.97±0.664		
	p=0.01 t=3.707				

ADP/O について $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| = 0.19 \geq 0.178$ $p=0.01$ にて有意差あり

R. C. Index について $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| = 1.92 > 1.799$ $p=0.01$ にて有意差あり

図 1. Oxidative phosphorylation by control rat

図 2. Oxidative phosphorylation by ethanol treated rat

図 1, 2 にその実際例を示す。

In vitro で medium に bovine albumin 0.5 mg を加えてその前後で比較したが変化なく, M. suspension 1 ml 中のたんぱく量は E. A. 群 2.2 mg, control 群 2.12 mg と差はなかった。

また, 一部の M. suspension には 1 mM DPNH, あるいは 5 mg/ml of medium の E. A. を in vitro で加え, その前後で ADP/O, R. C. Index を比較したが差を認めなかった。

考 察

R. C. は ADP の incubation medium への添加の有無によつて, M. の呼吸の増減がおこる現象で, 最初 Lardy¹³⁾ によつて発見され, Chance ら¹⁴⁾ によつて解析がすすめられ, 通常 R. C. Index として表現されているが, その本態は不明である。

萩原¹⁰⁾は R. C. は M. 自体のもっている自動調節能であつて ADP の incubation medium への添加で M. の O_2 消費は増加するが, ATP ができてしまうと逆に O_2 消費は減少して基質 (この場合は Soc. Succinate) の無駄な消費を防止する合目的な機能であると推定している。

われわれは E. A. 投与ラットで肝 M. の ADP/O の低下と明白な R. C. Index の低下を認めた。従来, E. A. と oxidative phosphorylation との関連を論じた報告はきわめて少ない。最近 K. Kiesling ら⁹⁾は E. A. を 90 日間飲用せしめたラットの肝に大きな M. が出現する事実を電顕で認めたが, そのさい Sod. Succinate を基質とした P/O は対照とかかわらないと報告した。

彼らとわれわれの成績との不一致は E. A. の投与量, 食餌条件の差異のためであろう。R. C. と E. A. との関

連をみた報告はない。以下、われわれの確認した ADP/O, R. C. Index の低下の原因について考察を加える。

まず E. A., あるいはアセトアルデヒドによる toxic action を考えねばならない。ところが実験時には E. A. 群の血中 E. A. 濃度はほとんど正常であるので食餌に混入されて除々に吸収された E. A. は完全に処理されていることになる。しかしながら、かなり大量の E. A. を投与しているのである期間、相当の血中濃度に達する可能性がある。そこで in vitro で E. A. を 5 mg/ml of medium の割合で加えてみたが ADP/O, R. C. Index にはまったく無影響であつた。したがって E. A. あるいはアセトアルデヒドによる直接的毒作用による低下とはいえない。以上の考察より大量の E. A. が生体内で活潑に酸化される課程に伴う代謝変動が原因と思われる。大量の E. A. の投与によつて種々の代謝変動が知られているが、DPNH/DPN の増加¹⁾、脂質代謝異常¹⁵⁾、Vitamin 代謝とくに Choline⁷⁾、Vitamin A⁶⁾、porphyrin 代謝⁵⁾、たんばく代謝異常、とくに合成の低下¹⁶⁾等が注目される。In Vitro で両群のラットよりえた M. suspension に 1 mM の DPNH を加えたが、ADP/O, R. C. はまったく変化なく、DPNA/DPN の増加が原因をなすとはいえない。

長鎖の不飽和脂酸は uncoupler としてしられ⁸⁾、M. の u factor の主成分といわれている⁹⁾。一方 E. A. の大量投与では NEFA の増加をきたすので¹⁵⁾、NEFA が主役をなす可能性がある。そこで NEFA の uncoupling 作用を除去する albumin を in vitro で加えたがまったく変化なく、NEFA もまた原因とはいえない。ところで E. A. 投与ラットにみられる acetate 1-¹⁴C より phospholipid へのとりこみ減少¹⁶⁾、porphyrin 代謝とくに cytochrom 代謝異常⁵⁾、さらに Vitamin、たんばく代謝異常等はいずれも M. の構造、機能と密接に関連しているので、それらが相互に複雑に関連しつつ M. になんらかの損傷をあたえたものと想像できる。損傷を受けた M. は ADP/O, R. C. の低下をきたし、肝障害の一原因ともなるであろう。また従来よりわれわれの報告している連続投与ラットにみられる糖代謝異常¹⁷⁾の一要因でもあろう。

しかしながら E. A. による oxidative phosphorylation

の低下は E. A. それ自身のためではなく、E. A. の代謝課程に伴う代謝変動にもとづくものであるから E. A. の投与量、ならびに投与をうける生体側の状態、食餌条件等によつて oxidative phosphorylation の態度には大きな差が生ずるものと思われる。

結 論

われわれはラットに比較的大量のエタノールを食餌に混入して2週間投与し、肝 mitochondria の ADP/O, respiratory control index を測定するに、両者ともに、明白に低下していることを確認した。またその低下の機序について2, 3の考察を加えた。

文 献

- 1) Charls, S. L.: Am. J. Med., 33 (3): 319, 1962.
- 2) Perman, E. S.: Acta phys. Scand., 55: 207, 1962.
- 3) Perman, E. S.: Acta phys. Scand., 55: 189, 1962.
- 4) Kiesling, K. H.: quarterly J. Stud. on Alc., 27 (2): 189, 1966.
- 5) Tames, M., Sally, A., Schifton, M., Tohnson, H., Arthur, P.: quarterly J. Stud. on Alc., 24 (4): 598, 1963.
- 6) Melvine, L., Lucia, S.: quarterly J. Stud. on Alc., 26 (1): 1, 1965.
- 7) Gerald, K.: J. exp. Med., 100: 605, 1954.
- 8) Hulsmann, W. C., Elliot, W. B., Slater, E. C.: Bioch. Biophys. Acta., 39: 267, 1960.
- 9) Lrhninger, A. L., Remmert, L. F.: J. Biol. Chem., 234: 2459, 1959.
- 10) 荻原文二: 酸素化学シンポジウム, 15: 312, 1961.
- 11) Mcconnel, W. B.: Am. J. Clin. Pathol., 22: 1223, 1952.
- 12) Cornall, A. G., Bardawill, C. S., Parid, M. M.: J. Biol. Chem., 177: 751, 1949.
- 13) Lardy, H. A., Willman, H.: J. Biol. Chem., 159: 215, 1952.
- 14) Chance, B., Williams, G.: Adv. Enzym., 17: 65, 1956.
- 15) Brodie, B. B., Baller, W. M., Horning M. G.: Am. J. Clin. Nutr., 9: 432, 1961.
- 16) Klatskin, G.: Yale J. Biol. Med., 34: 124, 1961.
- 17) Katsumata, K., Yamada, K.: Excerpta, Med. Acta., 74: 110, 1964.

* * * * *