障害肝の脂質変動と線維化との関連ならびに orotic acidとpurine関連物質の併用効果について

東京慈恵会医科大学第一内科（指導 高橋忠雄教授）

田 中 照 二

THE RELATION BETWEEN FATTY METAMORPHOSIS AND FIBROSIS AND THE EFFECTS OF JOINT USE OF OROTIC ACID AND PURINE BODIES

Teruji TANAKA

The First Department of Internal Medicine, The Jikei

University, School of Medicine, Tokyo

(Director: Prof. Tadao Takahashi)

概要 著者は黄変米カビ障害の初期にみる肝内脂質の変動と障害後半にみる線維化過程とを生化学的な面を中心として経時的に観察することにより、肝障害時の脂質代謝異常と結合組織代謝との反応相の一端の追求を試みた。肝障害初期、まずglycogenの減少とともに肝内脂質の増量を来し、さらに障害が進行するとphospholipidの減少を契機として全脂質分画は一斉に減少し、同時にhexosamineが漸次増量、その後hydroxyprolineはこれより遅れて増加する。組織学的にも同様の傾向をみた。また本障害時にpyrimidine nucleotideのprecursorであるorotic acidとpurine bodyである4-amino-5-imidazole carboxamide, inosine-5'-phosphateの併用は、orotic acidの脂肝作用、線維化作用に抑制的效果をしめすことを認めた。このことは、nucleotide間のimbalanceを是正することによるものとも考えられる。以上の成績より、肝障害時の脂質変動と線維化過程との関連について考案した。

緒 言

肝障害時にみられる脂肪浸潤および線維化機転のおのおのについては、あるいは代謝面からあるいは酵素化学的な面より病態生化学的解明がなされている¹⁾。しかし、この脂肪浸潤と線維化過程との間の相互関係に注目した研究は少ない。

われわれの教室では、数年来肝線維化過程の形態学的ならびに生化学的研究を行なっており、あわせて障害過程に及ぼす各種nucleotideならびにその前駆物質、助酵素ならびにvitamin、副腎皮質ホルモン等の効果を検討して来た。すでに肝線維

化にさいして、まずglutamine hexose-6-phosphate transamidase (hexosamine合成酵素) 活性の上昇が起こり、次いでmucopolysaccharideの生合成が促進され、これを基盤として膠原線維増生が生ずることを報告し²⁾、さらにorotic acidは黄変米カビ障害による肝線維化を助長する傾向を示すが、4-amino-5-imidazole carboxamide (AICA), inosine-5'-phosphate (IMP)ではこのような線維化促進作用はなく、むしろこれに反して抑制せしめることを報告した³⁾。

このようなorotic acidの作用は、orotic acidがuridine nucleotideのprecursorであるところから肝障害時の糖質代謝異常¹⁾と関連して、uridine

本論文の要旨は第48回日本消化機病学会総会（1962年）において発表した。

nucleotideからのUDP-glucosamineの生成を高め、このことがさらにmucopolysaccharideの生成を促進して、結果的にcollagen増生を来すとも考えられる。

また、肝障害時に起こる脂質代謝異常が糖質代謝異常と密接な関連を有し、同時にムコ多糖体代謝と脂質代謝の間にも何らかの関連が存在するであろうことは容易に推定される。殊にcollagen代謝の異常が、肝障害の慢性化から肝の病的反応の終末像である硬変化へと直ちに結びつくだけに、上述のごとき各代謝間の相互関係について考案することは、極めて意義のあるところと考える。

以上の見地から著者は、黄変米カビ障害の初期にみられる肝内脂質の変動と障害後半にみられる線維化過程とを、生化学的な面を中心として経時的に観察することにより、肝障害時の脂質代謝異常とcollagen代謝異常との反応相の一端の追求を試みた。さらに、このような障害過程に対してpyrimidine前駆体であるorotic acidとpurine関連物質であるAICA、IMPの併用による治療効果を観察し、それにより肝障害時の脂質代謝、collagen代謝に及ぼす核酸代謝の影響について検討した。

実験方法

I. 実験動物

(1) 障害群

体重 100～120 g のWistar系雄性シロネズミを用い、オリエンタル粉末飼料に10%の割に黄変米カビ (*Penicillium islandicum* Sopp) を混入した食餌1匹あたり8 gを連日投与し、投与開始後5, 10, 15, 20, 30日と経時的に実験に供した。

(2) 治療群

上記障害過程に対するorotic acidとpurine関連物質との併用効果を検討すべく、10%黄変米カビ混入飼料による障害開始と同時に治療群を3群に分ち、次の如く薬剤を添加した。

(i) Orotic acid単独投与群 (OA群)

体重 100 g あたりorotic acid 5 mgを1日量と

した。

(ii) Orotic acid・AICA併用群 (OA+AICA群)

体重 100 g あたりorotic acid 5 mgとAICA 5 mgを1日量とした。

(iii) Orotic acid・IMP併用群 (OA+IMP群)

体重 100 g あたりorotic acid 5 mgおよびそれと当モルのIMP 12.5 mgを1日量とした。

以上、薬剤投与はすべて経口的に行ない、障害20日後実験に供した。なお、肝hydroxyproline量は、障害40日後にも測定した。

II. 生化学的測定方法

実験動物は12～15時間絶食の後、実験に供した。まず、エーテル麻酔下にて開腹開胸し、心臓穿刺により脱血後、肝を摘出し、肝glycogen, DNA・RNA, 総粗脂質量, triglyceride, phospholipid, cholesterol, hexosamine, hydroxyprolineの定量を行ない、同時に組織像についても観察した。

(1) 肝glycogen量

摘出した新鮮肝組織を用い、Good, Kramer and Somogyi法⁴⁾にて定量した。

(2) 肝内核酸量

新鮮肝組織を採り、Schmidt-Thannhauser法⁵⁾で抽出後、RNAはorcinol塩酸反応⁶⁾、DNAはDischeのdiphenylamine反応⁷⁾を用いて定量した。

(3) 肝内総粗脂質量

肝内脂質の抽出は、以下の如き操作で行なった。まず摘出した肝よりglycogen、核酸および組織標本用の切片を採取後、0.9%食塩水にて肝門部より灌流し、充分肝内の血液を洗滌したのち、肝門部の線維成分を可及的に摘除した。次いで秤量し、同量の蒸留水を加えてホモジナイズしたのち、Folch法によりクロロホルム・メタノール(2:1)混液10倍容で37°C、60分間抽出した。吸引濾別後、濾液はさらに分液漏斗に移し、クロロホルム・メタノール層をとり、窒素気流下で減

圧濃縮を行ないデシケーター中で乾固したのち、重量法にて新鮮肝組織 1 g あたりの肝総粗脂質量を算出した。

(4) 肝triglyceride量

乾燥脂質を 10ml のエーテルに溶解し、1500 rpm, 5 分間遠沈を行ない、上清を 10ml 目盛付試験管に移し、エーテルを正確に 10ml の画線まで加えて混和後直ちに 3 本の小試験管に各 0.5ml 宛移した。この各々を肝内脂質分画の定量に供した。

Triglycerideの定量は末広法⁹⁾を用いた。

(5) 肝phospholipid量

Fiske and Subbarow法⁹⁾にて磷脂質磷を定量後、これに 25 を乗じて肝phospholipid量とした。

(6) 肝cholesterol量

Kiliani反応を用いる柴田法¹⁰⁾にて、肝cholesterolおよびcholesterol esterの定量を行なった。

(7) 肝hexosamine量

肝内脂質抽出の際に得られた濾過残渣をさらにメチルアルコール、ついでエーテルで脱脂・脱水した後、五酸化磷上で乾燥させた。

脱脂乾燥組織 100mg を共栓試験管にとり、3 N 塩酸 2.0ml を加えて 7 時間煮沸水浴中で加水分解した。冷却後、水を加えて全量 10.0ml とした後、その濾液 3.0ml をとって Boas 法¹¹⁾に従い、hexosamine量を定量し、乾燥組織 1.0 g あたりのhexosamine含量を求めた。

(8) 肝hydroxyproline量

脱脂乾燥組織 50mg に 6 N 塩酸 1.0ml を加えて封かんし、油浴中にて 120°C, 10 時間加水分解を行なった。冷却後、鬼塚法¹²⁾に従いhydroxyproline量を定量し、乾燥組織 1.0 g あたりのhydroxyproline含量を求めた。

Ⅲ. 組織化学的研究法

上記生化学的測定と同時に採取した肝組織片を 10% ホルマリン液にて固定し、hematoxyline & eosin 染色, Sudan Ⅲ 染色, periodic acid Schiff 染色 (PAS 染色) および Azan-Mallory (A-M 染色) をほどこし、組織学的に観察した。

実験成績

I. 肝内脂質の変動と肝線維化

(1) 肝glycogen量

黄変米カビ障害進行過程における肝glycogen量を経時的に観察すると、Fig. 1 に示すごとく 5 日より減少を認め、以後極めて著明に減少した。正常群の平均 25.0mg/g wet w't (100% とする) に対して障害群は 5 日では平均 20.8mg/g wet w't (83%) に下降し、10 日では減少はさらに著明で平均 6.0mg/g wet w't (24%), 15 日では 0.2mg/g wet w't (0.8%) と以後いずれも 1%

Fig. 1. Glycogen content in liver.

Fig. 2. DNA, RNA content in liver.

Fig. 3. Total crude lipid content in liver.

Fig. 4. Triglyceride content in liver.

以下の低値を示した。

(2) 肝内核酸量

肝湿重量あたりのDNA量では、Fig. 2に示すごとく正常群では平均4.7mg/g wet wtであり、障害群では各時期とも平均4.4～4.6mg/g wet wtと殆ど変動を認めなかった。

肝RNA量は正常群で平均17.1mg/g wet wtに対し、5日にて平均20.4mg/g wet wtとやゝ増量を示し、その後10日には平均13.4mgと正常群に比しやゝ低値となり、以後漸減の傾向があるも極めて軽度で、殆ど変動を認めなかった。

(3) 肝総粗脂質量

Fig. 3のごとく、障害初期5、10日には正常群の平均36.2mg/g wet wtに対し、それぞれ37.0、41.5mg/g wet wtと一時増量し、15日以後は26.5、19.7mg/g wet wtとむしろ漸減の傾向を示した。

(4) 肝triglyceride量

Fig. 4に示すごとく、肝triglyceride量は正常群平均1.9mg/g wet wt (100%とする) に対

Fig. 5. Phospholipid content in liver.

Fig. 6. Total and ester cholesterol content in liver.

し、5日には2.8mg/g wet wt (147%)と増量を示し、10日には3.2mg/g wet wt (168%)と最高に達する。15日は2.9mg/g wet wt (152%)と下降をみせ、20日には0.8mg/g wet wt (42%)と著減を示した。

(5) 肝phospholipid量

肝phospholipid量はFig. 5のごとく総粗脂質量、triglyceride量とは異なり、障害初期において正常群を上回ることなく、10日より減少し、20日にはこの傾向は極めて著明になった。すなわち、正常群の平均29.9mg/g wet wt (100%)に対して5日では30.2mg/g wet wtと殆ど変化を示さないが、10日には25.5mg/g wet wtと下降し、正常値の85%を示し、以後15日には22.2mg/g wet wt (74%)、20日には4.5mg/g wet wtと正常値のわずか15%にまで著減を示した。

(6) 肝cholesterol量

Fig. 6にみるごとく肝内総cholesterol量は、あまり著明な変動は示さないが、脂質の他の分画

Fig. 7. Hexosamine content in liver.

と同様10日を頂点として、以後障害の進行と共に漸減の傾向を示した。すなわち正常群平均 3.8 mg/g wet w'tに対し、10日では 4.3mg/g wet w'tと増量し、以後は15日、20日と障害の進行につれ、おのおの 4.2, 2.7mg/g wet w'tと漸減を示した。しかし、20日においても正常値に対する百分率は71%にとゞまり、triglycerideの42%, phospholipidの15%に比し減少は軽度であつた。ester cholesterol量もほぼ同様の変動を示した。

E/T比についてみると、正常群の60%に対して5日 56.0, 10日 52.4, 15日 49.0, 20日 45.3%と経過を追い下降を示した。

(7) 肝hexosamine量

肝hexosamine量は障害の経過とともに漸増の傾向を示したが、上記の脂質の変動が10日に最高の増量傾向を示したのに比し、やや遅れて20日に最高値を示した。すなわち、Fig. 7のごとく、正常群平均 3.49mg/g wet w'tに対して、5日 4.10, 10日 5.20, 15日 5.75と徐々に増加を示

Fig. 8. Hydroxyproline content in liver.

し、20日には5.80mg/g wet w'tと正常群値の166%に増量を示した。この時期を頂点とし30日の観察では、4.90mg/g wet w't (144%)と下降をみせた。

(8) 肝hydroxyproline量

Collagen蛋白内の特異的アミノ酸であるhydroxyproline量の増加を、collagen増生の指標として肝線維化の進行を観察した (Fig. 8)。障害の進行とともに、極めて軽度の上昇を示すが、20日には1.57mg/g wet w'tとなり、正常群の1.16 mg/g wet w'tに比し135%となるが、hexosamineが最高値を示す20日を境として急激に増量をきたす。そして、障害30日には2.46mg/g wet w't (212%)と高値を示した。このことは組織学的観察の結果ともよく平行した。

(9) 組織学的所見

障害5日の肝組織像は未だ著しい変化はみられず、肝細胞がやや膨化し、その配列の乱れがごく軽度に認められる程度であつた。

障害10日になると、上述の変化がさらに強く肝細胞の大小不同が目立つようになり、中心静脈およびグラー周囲の肝細胞内に小脂肪滴を認めた。

障害15日には小葉内に散在する小壊死巣が発現し、中心静脈およびグラー周囲に円形細胞浸潤を認め、同部にはPAS陽性物質を認めるようになる。なお、この時期にはAzan-Mallory染色にて青染する結合組織は明らかに認められない。また障害10日の肝で認めた中心静脈およびグラー周囲の肝細胞に散在する脂肪は、この時期では認められなかつた。

20日ないし30日の障害肝では実質の変化はさらに強度となり、中心静脈およびグラー周囲はAzan-Malloryに青染する結合組織が増生し、30日の障害肝では、その増生した結合組織は互いに連絡するようになり、小葉の改築を認める肝硬変ともいふべき状態になる。

II. Purine関連物質とorotic acidの併用効果

(1) 肝glycogen量および核酸量に及ぼす影響

Fig. 9. Total crude lipid content in liver.

Fig. 10. Triglyceride content in liver.

Fig. 11. Phospholipid content in liver.

Fig. 12. Total and ester cholesterol content in liver.

変動の大きいglycogen量については、直ちに各群の効果の優劣は決めにくいが、いずれの治療群も障害対照群に比して肝glycogen量減少抑制の傾向がみられ、特にOA群およびOA+IMP群がOA+AICA群に比して、その程度が高度であつた。肝RNA, DNA量に対しては3群の間に差異は認められなかつた。

(2) 肝内脂質量に及ぼす影響

Fig. 9は肝総粗脂質量を示し、OA群にやや増量を認めた。このような傾向は肝cholesterol量、肝triglyceride量および肝phospholipid量にも認められた。すなわち、肝triglyceride量はOA群に著明な増量を認め、OA+AICA群、OA+IMP群では軽度の増量を認めた(Fig.10)。また、肝phospholipid量もほぼ同様の傾向を示した(Fig. 11)。Fig. 12の肝cholesterol量は障害群に比し、OA群では著明な増量を示し、AICA, IMPの併用により、これを抑制しようように思われる。また、IMP群において、E/T比がほぼ正常群程度にまで回復していたことは注目すべきことと思われる。

(3) 肝hexosamine, hydroxyprolineに及ぼす影響

障害20日前後では、障害群では肝hexosamine量(Fig. 7)は漸減の時期にあたり、また肝hydroxyproline量は増量し始める時期にあるのでこれら薬剤の使用により、hexosamine hydroxyproline, 増減に時期のずれを生ずることを考慮すると、これら薬剤の効果をこの時期(障害20

Fig. 13. Hexosamine content in liver.

蓄積の起こることはすでに幾多の報告がなされている。著者の実験でも、障害初期（5～10日）の肝glycogen量の著明な減少の認められる時期に肝内中性脂肪の増加がみられ（Fig. 15），組織学的にも中心静脈，グ鞠周辺に著明な脂肪浸潤が認められている。この時期では肝phospholipidはまだ減少を認めず，障害がさらにすすむ15～20日頃になると肝phospholipidの減少と同時にtriglycerideを始めとして全脂質分画の著明な減少がみられた。

肝障害時，G-6-Paseの活性低下，G-6-P dehydrogenase，6-phosphogluconic acid dehydrogenase，glyceroaldehyde phosphate dehydrogenaseの活性が上昇し，phosphohexose isomeraseの活性が低下することがすでに報告されており¹¹，このような肝内酵素活性変動のpattern（Fig. 16）は，肝内脂質合成の盛んな時期にみられるChaikoffら¹³のいわゆるlipogenic patternと極めて類似していることは非常に興味深い。高橋らは急性四塩化炭素障害ラットにおいても同様にG-6-Pase，phosphoglucoisomeraseの活性低下，G-6-P dehydrogenaseの活性上昇を認めており¹¹，また高橋，長村ら¹⁴は黄変米カビ障害白ネズミにおいて，初期のglycogenの減少，triglyceride増加の時期にG-6-Pase活性の低下することを認めている。このことから黄変米カビ障害初期のglycogen減少，triglyceride増加の時期にlipogenic patternと極めて類似した肝内酵素活性の変動が起こっているのではないかと推定される。この時期には，まだ総phospholipid量には著変なく，このような解糖系酵素活性変動を基盤としてHMP系の比重が大となり，ここで産生されるNADPHを介して脂酸合成が促進されるのではないかと考えられる。

一方，Dumphy and Udupa¹⁵は皮膚創傷治癒の実験において，collagenの増生に先行してムコ多糖体の増量が起こることを報告し，線維形成に対するムコ多糖体の重要性を認めており，肝線維化の生化学的過程にても蒲地は同様のことを認

めている²。すなわち，蒲地は黄変米カビ障害過程を生化学的に検討し，障害肝のglutamine hexose-6-phosphate transamidase（G. H-6-P transamidase：hexosamine合成酵素）活性，hexosamineおよびhydroxyproline量を経時的に測定して，このような肝線維化過程では，hexosamine合成酵素の活性がまず上昇し，次いで肝hexosamine量が増量し，これが最高値を示す時期から肝hydroxyproline量が急速に増量し始めることを観察したが，このG. H-6-P transamidase活性の上昇を認める時期は，著者の実験における肝内glycogenの減少，脂質の増加をきたす時期と一致するものと考えられる。

Embden-Meyerhof系を介しての解糖はphosphofructokinase活性がlimiting stepと考えられており¹⁶，またHMP系を介してのF-6-P産生も考えられることから，これらにより蓄積されるF-6-PがG. H-6-P transamidase活性上昇を促すとも考えられ，事実障害時のF-6-Pの蓄積が報告されており，また高橋，藤沢ら³は黄変米カビ障害マウスにorotic acidを投与して肝線維化の促進を認め，著者の実験でも同様の变化を認めている。このようなorotic acidの線維化促進作用は，orotic acidがuridine nucleotideのprecursorであるところから，mucopolysaccharide合成に必要なUDP-glucuronic acid，UDP-glucosamine生成を高めるとも推定される。また著者の実験では障害初期のglycogen減少，triglyceride増加の極期より次第にmucopolysaccharideの指標として測定したhexosamineの増加が起こることが認められており，この推定を裏づけるものと考えられる。

さらに著者はorotic acid投与により肝triglycerideの著明に増加することを認めている。

Handschumacherら¹⁷は白ネズミを1% orotic acidを含む飼料で飼育し，脂肪肝の起こることを報告し，高橋，岡部ら¹⁸はorotic acid脂肪肝にuridineを投与して中性脂肪蓄積の増加と線維化傾向の増強を認めており，orotic acid脂肪

肝の本態としてuridine nucleotideのprecursorであるorotic acidがuridine nucleotideの比較的增加を来し、cytidine nucleotideとのimbalanceからKornberg, Pricer¹⁹⁾, Kennedyら²⁰⁾のCDP-cholineを介してのphospholipid合成系を阻害してdiglycerideよりtriglycerideへの合成が盛んになるのではないかと考案している。

このようにuridine nucleotideならびに解糖系を介して、肝線維化と肝脂質量との間に密接な関連が存在するものと考えられる。

また、著者は黄変米カビ障害時にorotic acid投与で起こる線維化促進と肝脂質量の増加が、AICA, IMPにより抑制されることを認めた。

pyrimidine nucleotideのprecursorの投与により起こったこのような現象が、AICA, IMPのpurine関連物質の併用により消失したことは、pyrimidine体単独投与により生じたpurine, pyrimidine体間のimbalanceがpurine体投与により是正されたものとも考えられる。

Handschumacher¹⁷⁾はorotic acid投与によるorotic acid脂肪肝がadenineで抑制されることを見出し、東、山村および田村、柴山はorotic acid脂肪肝がAICAにより抑制されることを見出している。さらに山村はAICA, adenosine等による抑制を報告しているおり、著者の実験成績と考え合わせると極めて興味深い。

結 論

著者は、障害肝にみられる脂肪浸潤と線維化過程との反応相を生化学的に検討するため、黄変米カビ障害白ネズミを用いて、肝内脂質およびhexosamine, hydroxyproline量を経時的に測定し、併せて組織学的観察を行ない、次のごとき成績を得た。

1) 障害初期、まず肝glycogenの減少とともに肝内脂質の増量を来し、さらに障害がすすむとphospholipidの減少を契機として脂質は減少し、同時にhexosamineが漸次増量、その後hydroxyprolineはこれより遅れて増加する。

2) 組織学的にも、まず脂肪浸潤が中心静脈、グラー周辺に現われ、次いで脂肪の減少とともにPAS陽性物質の出現、そしてAzan-Malloryに青染する結合織の増生を認めた。

3) 本障害時に対するpyrimidine nucleotideのprecursorであるorotic acidとpurine nucleotideおよびそのprecursorであるAICA, IMPの併用効果はnucleotide間のimbalanceを是正することにより、orotic acidの脂肝作用、線維化作用に抑制的効果を示した。

4) 肝障害時の脂肪浸潤と線維化過程との関連について考案した。

文 献

- 1) 高橋忠雄、藤沢冽他：最新医学，16：1793, 3097 (1961)，高橋忠雄，吉川春寿編，代謝の生理と病態，p. 252，朝倉書店，1961。—2) 蒲地大八：日内会誌，51：193 (1962)。—3) 高橋忠雄，藤沢冽他：第107回日本生化学会関東部会(1960年，東京)。—4) Good, C.A., Kramer, H. and Somogyi, M.: J. biol. Chem., 100: 485 (1933)。—5) Schmidt, G. and Thannhauser, S.J.: J. biol. Chem., 161: 83 (1945)。—6) Kerr, S.E. and Seraidarian, K.: J. biol. Chem., 159: 211 (1945)。—7) 江上不二夫編：核酸及び核蛋白質，上巻，p. 140，共立出版，東京，1951。—8) 末広雅也：生化学，33，387 (1961)。—9) Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: J. biol. Chem., 66: 375 (1925)。—10) 柴田進，長谷川錦三郎：医学と生物学，39: 21 (1956)。—11) Boas, N.F.: J. biol. Chem., 204: 553 (1953)。—12) 鬼塚卓彌：生化学，32: 857 (1960)。—13) Fitch, W.M. and Chaikoff, I.L.: J. biol. Chem., 235: 554 (1960)。—14) 高橋忠雄，長村日出夫他：第49回日本消化機病学会総会(大阪) (1963)。—15) Dumphy, J.E. and Udupa, K.N.: New England J. Med., 253: 847 (1955)。—16) Olson, R. E., Robson, J.S., Richards, H. and Hirsch, E.G.: Fed. Proc., 9: 211 (1950)。—17) Handschumacher, R.E., Creasey, W.A., Jaffe, J.J., Pasternak, C.A. and Hankin, L.: Proc. N.A.S., 46: 178 (1960)。—18) 高橋忠雄，岡部和彦他：肝臓，4: 178 (1963)。—19) Kornberg, A. and Pricer, W.E.Jr.: J. biol. Chem., 204: 329 (1953)。—20) Kennedy, E.P.: Ann. Rev. Biochem., 26: 130 (1957)。