CCl₄ 投与ラットの肝臓および血漿脂質に及ぼす 各種抗酸化剤の影響*

長 修 司, 菅野 道 廣
(九州大学農学部食糧化学工学科)

昭和 49 年 8 月 26 日 受 理

Effects of Antioxidants on Liver and Plasma Lipids of Rats Treated with CCl₄ (Hepatotoxicity and Lipid Metabolism Part VIII)

By Shuji CHO and Michihiro SUGANO
*Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University*

Effects of pretreatment of rats with the antioxidants, N-N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD), *dl*- α -tocopherol acetate (Toc) or butylated hydroxytoluene (BHT) on the CCl₄-induced lipid changes in liver and plasma were investigated.

1. Accumulation of hepatic triglyceride due to CCl₄ treatment was significantly depressed by all of the antioxidants tested.

2. Pretreatment with the antioxidants showed no alleviatory effect on the decreased concentration of phospholipid in hepatic microsomes and mitochondria due to CCl₄ administration. DPPD and Toc, but not BHT, considerably mitigated the reduction of the concentration of plasma phospholipid in CCl₄-treated rats.

3. The effect of the antioxidants on the decrease by CCl₄ in percentage of arachidonic acid in phospholipids of liver organelles was obscure.

4. From these observations it is suggested that these antioxidants had considerable alleviatory effects on the lipid accumulation in liver and on the blockage of lipid transfer from liver to plasma shown in CCl₄-treated rats.

(Received Augvst 26, 1974)

緒 言

CCl₄ の投与によって引き起される肝臓への TG の沈着, すなわち脂肪肝発現に関し, ラット肝臓の各種グリセロ脂質の構造および分子種組成に, それぞれ特徴的な変化が起ることを認めた^(1,2). これらの変化は CCl₄ 投与後の経過時間でも異なり, 脂肪肝の程度と深い関係があることが示唆された.

CCl₄ が生体内でフリーラジカルに変化し, これが“引きがね”となって肝臓ミクロゾーム PL の高度不飽和脂肪酸の過酸化反応が進み, その結果生じた過酸化脂質によるリポたんぱく質の形成障害が脂肪肝を惹起させると Recknagel は述べている⁽³⁾. 脂質の過酸化反応が CCl₄ 脂肪肝発生の一因子であるとすれば, 抗酸化剤の効果は十分に期待できるものである. さらに, 脂質過酸化の現象は脂肪肝のみならず, 動脈硬化性疾患, 老化あるいは発癌の一原因⁽⁴⁾として問題視されてきていることから, CCl₄ 脂肪肝と脂質の過酸化反応との関係を明確にすることは重要である.

CCl₄ 脂肪肝ラットに対する抗酸化物質の効果に関して, 肝臓の脂質過酸化物の生成ならびに肝臓細胞の構造や機能の損傷などがある程度抑制することが知られてい

* 本報告は「肝臓障害と脂質代謝」(第 8 報)にあたる. 前報は農化, 49, 21 (1975).

次の略号を用いた. TG: トリグリセリド, PL: リン脂質, PC: フォスファチジルコリン, PE: フォスファチジルエタノールアミン, DPPD: N-N'-ジフェニル-*p*-フェニレンジアミン, Toc: *dl*- α -トコフェロールアセテート, BHT: ブチルヒドロキシトルエン.

るが^(5,6), 一方では全くその効果を認めなかったという報告もある⁽⁷⁾. いずれの報告においても, 肝臓と血漿脂質の量的変化について詳細に検討したものは見当らない. 本実験では, 各種の抗酸化物質 (DPPD, Toc あるいは BHT) をあらかじめ与えた CCl₄ ラットの肝臓と血漿のグリセロ脂質成分の分析を行なった.

実験方法

(1) 実験動物および投与方法 オリエンタル固型飼料 NMF (粗たんぱく質含量 29.8%) で飼育したウィスター系雌ラットを用いた.

(i) CCl₄ 投与群

(A) とうもろこし油 0.25 ml/100 g 体重を経口投与後, CCl₄-流動パラフィン混液 (1:1, v/v) 0.5 ml/100 g 体重を同様に投与した.

(B) 対照ラットにはとうもろこし油を同様に投与後, 流動パラフィン 0.25 ml/100 g 体重を投与した.

(ii) 抗酸化物質投与群

(A) DPPD, Toc あるいは BHT をそれぞれ 60 mg/0.25 ml とうもろこし油/100 g 体重を経口投与後, CCl₄-流動パラフィン混液 (1:1, v/v) 0.5 ml/100 g 体重を投与した.

なお, 本投与条件 (投与量) では蓄積した肝臓の TG をいずれも同程度に減少させることが知られており^(6,7), 3 種の薬剤の抗酸化能はほぼ等しいとみなすことができる.

(B) 対照ラットには抗酸化物質を同様に投与後, 流動パラフィン 0.25 ml/100 g 体重を投与した.

なお, 各ラットは CCl₄ (あるいは流動パラフィン) 投与 18 時間前より絶食させ, 抗酸化物質 (あるいはとうもろこし油) は CCl₄ (あるいは流動パラフィン) 投与 28 および 4 時間前に 1 回

ずつ与え, CCl₄ (あるいは流動パラフィン) 投与 20 時間後に屠殺した.

(2) ミクロゾームと

ミトコンドリアの分離

肝臓からミクロゾームとミトコンドリアを調製

し⁽⁸⁾, その一定量についてピウレット法⁽⁹⁾によりたんぱく質の定量を行なった.

(3) 脂質成分の分析 肝臓 (ミクロゾームおよびミトコンドリア), 血漿から脂質を抽出純化し⁽¹⁰⁾, 各脂質の含量と脂肪酸組成の測定⁽¹¹⁾を行なった.

実験結果

Table あるいは Fig. 中の A は, CCl₄ のみを与えた群あるいは抗酸化物質を投与したのちに CCl₄ で処理した群, B はそれぞれの対照群を示す.

(1) 体重および肝臓重量

使用したラットの体重と肝臓重量を Table I に示した.

(2) 肝臓および血漿の TG 量

肝臓 TG 量はそれぞれの対照群と比較して, CCl₄ で 9.1 倍, DPPD で 6.2 倍, Toc で 4.3 倍, BHT で 4.2 倍を示し, 3 種の抗酸化剤とも, CCl₄ による肝臓 TG の蓄積の程度をかなり軽減した (Table II). CCl₄ 処理による血漿 TG 量の減少は, DPPD によっていくらか軽減された. 肝臓と血漿の TG に対する抗酸化剤による改

Table I. Body and Liver Weight of Rats¹⁾

		CCl ₄ ²⁾	DPPD ³⁾	Toc ³⁾	BHT ³⁾
Body weight (g)	A	228 ± 8	206 ± 6	261 ± 4	208 ± 5
	B	216 ± 11	198 ± 5	258 ± 3	203 ± 3
Liver weight (g)	A	7.1 ± 0.2	8.7 ± 0.6	10.4 ± 0.8	10.1 ± 0.2
	B	5.6 ± 0.3	7.1 ± 0.4	7.9 ± 0.4	9.4 ± 0.1

¹⁾ Values are expressed as means and S.E. from four to five rats.

²⁾ CCl₄ was administered by stomach tube to female rats in a dose of 0.5 ml CCl₄-liquid paraffin mixture (1:1, v/v) per 100 g body weight (A). Controls received 0.25 ml liquid paraffin per 100 g (B). Corn oil (0.25 ml/100 g) was given by oral intubation to both rats at 28 and 4 hours prior to administration of CCl₄ or paraffin solution. All rats were fasted for 18 hours before CCl₄ (or liquid paraffin) treatment and killed 20 hours after administration of CCl₄ (or liquid paraffin).

³⁾ Antioxidants (DPPD, Toc or BHT) dissolved in corn oil were given orally in the amount of 60 mg per 100 g at 28 and 4 hours before receiving either CCl₄ (A) or liquid paraffin (B).

Table II. Concentration of Liver and Plasma Triglyceride

		CCl ₄	DPPD	Toc	BHT
Liver (mg/g)	A	158.5 ± 7.9 ¹⁾	93.9 ± 7.0 ^{1,2)}	70.9 ± 5.0 ^{1,2)}	87.0 ± 8.2 ^{1,2)}
	B	17.5 ± 0.7	15.2 ± 1.1	16.5 ± 1.2	20.9 ± 3.3
Plasma (mg/dl)	A	35.5 ± 5.9 ¹⁾	49.2 ± 9.5	42.4 ± 2.5 ¹⁾	—
	B	78.5 ± 2.4	68.8 ± 4.3	79.0 ± 6.8	—

¹⁾ Differences from corresponding control groups are significant at $p < 0.005$.

²⁾ Difference from CCl₄ group is significant at $p < 0.005$. See also Table I.

Table III. Concentration of Liver and Plasma Phospholipids

		CCl ₄	DPPD	Toc	BHT
Liver (mg/g)	A	25.9±0.8 ¹⁾	25.2±0.7 ¹⁾	27.2±1.5 ¹⁾	28.4±0.9
	B	33.4±0.7	30.7±0.7	38.9±1.6	31.5±1.6
Plasma (mg/dl)	A	103.7±14.2 ¹⁾	159.0±25.2	117.0±8.7	—
	B	191.7±5.7	187.2±7.1	133.2±7.7	—
Liver microsomes (mg/mg protein)	A	0.19±0.01 ³⁾	0.17±0.02 ¹⁾	0.12±0.01 ¹⁾	0.22±0.01 ²⁾
	B	0.24±0.02	0.29±0.01	0.27±0.01	0.29±0.01
Liver mitochondria (mg/mg protein)	A	0.18±0.00 ¹⁾	—	0.20±0.01 ²⁾	0.25±0.01 ⁴⁾
	B	0.20±0.00	—	0.24±0.01	0.27±0.01

Differences from corresponding control groups are significant at ¹⁾ $p < 0.005$, ²⁾ $0.005 < p < 0.01$, ³⁾ $0.01 < p < 0.025$ and ⁴⁾ $0.025 < p < 0.05$, respectively. See also Table I.

善効果の程度は、必ずしも平行しなかった。

(3) 肝臓および血漿の PL 量

CCl₄ 投与で肝臓 PL 量は低下するが、BHT で減少の程度は緩和された (Table III)。一方、CCl₄ ラットの血漿 PL 量の低下は DPPD, Toc でかなり軽度になった。CCl₄ によるたんぱく質当りのミクロゾーム PL 量の減少の程度は、抗酸化剤を与えても回復せず、DPPD, Toc ではより顕著であった。ミトコンドリアでも CCl₄ 処理で PL 量は減少したが、抗酸化物質の投与の効果は認められなかった。

(4) ミクロゾームおよびミトコンドリアの PC および PE

ミクロゾームでは CCl₄ により PC の占める割合は減少し、PE では逆に増加した (Table IV)。この傾向は BHT 群を除いては、ほぼ同様であった。一方、CCl₄ 処理ラットのミトコンドリアでは、両 PL の組成に差は認められなかった。Toc, BHT とも CCl₄ 群とはほぼ類似の傾向を示したが、DPPD では PC の占める割合が増加

Table IV. Composition of Liver Microsomal and Mitochondrial Phospholipids

			CCl ₄	DPPD	Toc	BHT
Microsomes	{	A {	PE 23.2	29.1	22.6	26.1
		PC 44.1	56.2	38.9	40.6	
	{	B {	PE 14.4	24.1	17.3	27.8
		PC 55.6	62.9	53.6	47.6	
Mitochondria	{	A {	PE 28.6	25.6	28.2	30.4
		PC 44.3	57.2	43.0	52.0	
	{	B {	PE 26.7	31.3	25.2	31.9
		PC 42.8	43.3	48.1	52.1	

Per cent of total lipid phosphorus

PE and PC represent phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, respectively. The duplicate analyses of pooled samples are from four to five rats per group. See also Table I.

し、PE で低下した。

(5) 肝臓および血漿脂質の脂肪酸組成

CCl₄ により生体内で過酸化反応が起るとすれば、高度不飽和脂肪酸は最も損傷を受けやすい。肝臓および血漿各脂質のリノール酸、アラキドン酸およびドコサヘキサエ

ン酸の占める割合を重量パーセントで示した。

(i) 肝臓および血漿 TG (Fig. 1) : 肝臓 TG のリノール酸の変化の程度は、4 群とも僅少であった。一方、血漿 TG のリノール酸は CCl₄ の投与で著しく減少したが、DPPD でかなり緩和され、Toc, BHT では逆にその割合は著増した。なお、肝臓と血漿のリノール酸の占め

Fig. 1. Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Liver and Plasma Triglycerides.

Values are the means expressed as a per cent for the total fatty acids. Analyses of pooled liver and plasma are from four to five rats per group. See also Table I.

Fig. 2. Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Liver Microsomal Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine.

See also Fig. 1.

る割合は、4群ともその傾向が著しく異なっていた。

(ii) ミクロゾームの PC および PE (Fig. 2) : PC および PE のアラキドン酸の占める割合は、 CCl_4 によって減少した。この傾向は3種の抗酸化剤とも同様で、DPPD 群の PE を除いて、むしろその程度は CCl_4 より著明であった。Toc の PE でリノール酸の占める割合が、著しく増加した。ドコサヘキサエン酸は BHT の PC および Toc, BHT の PE で減少した。

(iii) ミトコンドリアの PC および PE (Fig. 3) : PC のアラキドン酸は CCl_4 , DPPD および Toc とともに各々の対照群と比較して著減したが、BHT ではその程度がかなり緩和された。PE のアラキドン酸は、 CCl_4 および抗酸化物質群ともほぼ同程度に減少した。

なお、 CCl_4 および抗酸化剤群とも PL アラキドン酸の減少の程度は、ミクロゾームよりもミトコンドリアの方がいくらか低いようであった。

(iv) 血漿の PL (Fig. 4) : 血漿 PL のリノール酸は、抗酸化剤によってその割合がさらに増加した。 CCl_4

Fig. 3. Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Liver Mitochondrial Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine.

See also Fig. 1.

Fig. 4. Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Plasma Phospholipids.

See also Fig. 1.

によるアラキドン酸およびドコサヘキサエン酸の減少の程度は、抗酸化物質によっていくらか緩和された。

考 察

CCl_4 脂肪肝の改善に関して、肝臓および血漿脂質の

含量と脂肪酸組成の両面から検討した結果, 肝臓での脂質成分の沈着ならびに血中への放出阻害が, 抗酸化物質によってかなり緩和されることが明らかになった. 実験条件はやや異なるが, Meldolesi ら⁽¹²⁾は標識アミノ酸の CCl₄ 処理ラット肝臓ミクロゾームへの取り込み抑制が, Toc によってかなり軽度になることを示しており, 肝臓のたんぱく質の生合成の面からも, 抗酸化剤の効果が認められている. しかしながら, CCl₄ 処理ラットの肝臓ミクロゾームおよびミトコンドリア PL (PC および PE) の含量, および脂肪酸 (とくにアラキドン酸) の損傷の程度はともに著しく, 抗酸化剤の効果も少ないようであった. CCl₄ 投与 1~2 時間ですでにミクロゾームでの過酸化反応が始まり, それに伴って肝臓 TG 量が漸次蓄積するとの報告があり⁽³⁾, 本実験での CCl₄ 投与後 20 時間という条件では, ミクロゾームばかりでなくミトコンドリアもかなりの障害を受けており, このような現象を招いたものと思われる. Comporti らは, DPPD によりミクロゾームのアラキドン酸の割合の減少の程度が緩和されることを報告しているが⁽¹³⁾, これは CCl₄ 投与数時間後での結果である.

in vitro あるいは *in vivo* での脂質過酸化のモデル実験で, 肝臓ミクロゾームのアラキドン酸がオレイン酸やリノール酸よりも損傷を受けやすいことが知られている⁽¹⁴⁾. さらに, 本実験での CCl₄ 処理ラット肝臓のミクロゾームおよびミトコンドリア PL のアラキドン酸の減少の程度が, リノール酸, ドコサヘキサエン酸のそれに比べて著しいことから, 肝臓の細胞顆粒成分中のアラキドン酸に対する特異的な過酸化反応が示唆される. CCl₄ によるミクロゾーム PL のアラキドン酸の減少パターンは多くの研究者の一致した見解でもあり^(15,16), 肝臓 TG 量とともに, この酸の変動の程度を障害の指標とすることは, 脂肪肝発生のメカニズム解明や有効抗酸化物質の検索に, 重要な手がかりを与えるものと思われる. しかしながら, 本実験の結果のみから, ミクロゾーム PL の損傷が CCl₄ の過酸化反応のみによるものであるかどうかははっきりしない. CCl₄ が過酸化反応以外の作用で影響する可能性は Warhol ら⁽¹⁷⁾の実験に示されるように, CCl₄ が直接脂質成分の中に取り込まれるという事実からも充分推察される.

さらに, CCl₄ および抗酸化物質を与えたラットとも PL 量, PL 中での PC の占める割合および PC と PE のアラキドン酸の損傷の程度は, ミクロゾームに比較し

てミトコンドリアの方が概して軽度であった. これは, CCl₄ の肝臓障害作用に両細胞顆粒間で時間的な“ずれ”があること⁽⁸⁾や, あるいはグリセロ脂質の代謝やリポたんぱく質生成の場が, ミクロゾームを中心としていることなどからも説明できる.

肝臓の PL 量 (Table III) や PC, PE 中のアラキドン酸の割合 (Table IV) などの減少の程度が, CCl₄ 単独投与の場合よりも抗酸化剤群でより顕著であったり, さらに血漿 TG 中のリノール酸の割合が抗酸化剤間で全く異なるなどの現象が観察された. とりわけ, PL のこのような傾向はとくに Toc 群に多くみられ, 他の合成抗酸化剤よりも投与後の肝臓での残存率が高いという事実⁽¹⁸⁾とは矛盾するようである. 脂質の過酸化反応と抗酸化物質との関連性からは充分に説明がつかないこのような現象は, これら薬剤の生体内での抗酸化能の程度や脂質代謝に及ぼす影響が異なることを示唆するものであろう.

最近, CCl₄ のみならずエタノール⁽¹⁹⁾や栄養性⁽²⁰⁾の脂肪肝も過酸化反応によって惹起するともいわれており, Recknagel らの説をさらに有力にしているが, 一方では Cawthorne らの抗酸化物質の投与方法を種々組み合わせた実験⁽⁷⁾や, Keller らの ESR による肝臓でのフリーラジカルの測定結果⁽²¹⁾などから, 脂質の過酸化反応が CCl₄ 脂肪肝生成の主因子とはなり得ないとの意見もある. このような相反した結果は, CCl₄ および抗酸化物質の投与の方法や量が研究者によってまちまちであることによるものと考えられ, 今後抗酸化剤の改善効果をこのような観点から詳細に検討していくことが必要であろう.

要 約

N-N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD), *dl*- α -tocopherol acetate (Toc) あるいは butylated hydroxytoluene (BHT) をあらかじめ与えた後, CCl₄ 処理したラットの肝臓と血漿の脂質成分の分析を行ない, 以下の結果を得た.

1. CCl₄ による肝臓 TG の蓄積は, 3 種の抗酸化剤によって著しく抑えられた.

2. CCl₄ 処理ラットの肝臓ミクロゾームおよびミトコンドリアの PL 量の回復には, いずれの抗酸化剤も効果がなかった. DPPD および Toc は, CCl₄ ラット血漿の PL 量の減少の程度を軽度にした.

3. CCl_4 によって減少した肝臓ミクロゾームおよびミトコンドリア PL のアラキドン酸の割合は, 抗酸化剤によって, はっきりとは回復しなかった。

4. 以上のことから, CCl_4 処理ラットの肝臓での脂質の沈着ならびに血漿への放出抑制の程度が, 抗酸化物質によってかなり軽減されることが示された。

本研究の一部は, 昭和 48 年度文部省科学研究費 (奨励研究 A) の補助によった。結果の一部は, 昭和 48 年度日本脂質生化学研究会 (東京) において発表した。

- (1) M. Sugano, S. Cho, K. Imaizumi and M. Wada : *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2325 (1970).
- (2) M. Sugano, K. Imaizumi, S. Cho and M. Wada : *Lipids*, **6**, 141 (1971).
- (3) R. O. Recknagel : *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145 (1967).
- (4) 島蘭順雄, 勝井五一郎 : ビタミン E, 朝倉書店, 1973, p. 342.
- (5) N. R. Di Luzio and F. Costales : *Exp. Mol. Path.*, **4**, 141 (1965).
- (6) M. Comporti and A. Benedetti : *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 418 (1972).
- (7) M. A. Cawthorne, J. Bunyan, M. V. Sennitt and J. Green : *Br. J. Nutr.*, **24**, 357 (1970).
- (8) G. H. Hogeboom : "Methods in Enzymol," Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 16.
- (9) A. G. Gornall, C. S. Bardawill and M. M. David : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- (10) J. Folch, M. Lees and G. H. Sloane-Stanley : *ibid.*, **226**, 497 (1957).
- (11) H. Maeda, M. Sugano and M. Wada : *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **17**, 303 (1973).
- (12) J. Meldolesi, L. Vincenzi, P. Bassan and M. T. Morini : *Lab. Invest.*, **19**, 315 (1968).
- (13) M. Comporti, E. Burdino and G. Ugazio : *Italian J. Biochem.*, **20**, 156 (1971).
- (14) L. K. Dahle, E. G. Hill and R. T. Holman : *Arch Biochem. Biophys.*, **98**, 253 (1962).
- (15) J. E. Miller and W. E. Cornatzer : *Lipids*, **4**, 19 (1969).
- (16) M. Comporti, G. Landucci and F. Raja : *Experientia*, **27**, 1155 (1971).
- (17) M. J. Warhol, E. S. Reynolds and M. T. Moslen : *Fed. Proc.*, **31**, 618 (1972).
- (18) A. C. Francois and A. Pihet : *Ann. Zootech.*, **9**, 195 (1960).
- (19) N. R. Di Luzio : *Exp. Mol. Path.*, **8**, 394 (1968).
- (20) 小滝 祥, 奥村ミサオ, 中川洋吉, 八木国夫 : ビタミン, **37**, 466 (1968).
- (21) F. Keller, A. B. Snyder, F. J. Petrcek and K. M. Sancier : *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2507 (1971).