UDC 612.397 ; 616.36-003.82

331. 小林忠之：シロネズミにおける薬物性脂肪肝と脂質代謝 その2

四塩化炭素障害脂肪肝（脂質代謝に関する研究 第6報^{*1}）

Tadayuki Kobayashi: Studies on Lipid Metabolism. VI. Fatty Liver
by Hepatotoxic Agents and Lipid Metabolism in Rats. (2).
Carbon Tetrachloride-injured Fatty Liver.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.^{*2})

In order to examine if anti-fatty liver substances, known to be effective for dietary fatty liver, would have preventive effect against acute liver damage caused by carbon tetrachloride, bromsulfaphthalein retention in the plasma of normal rat was tested and dose-response curve of carbon tetrachloride was examined. Nine kinds of chemicals were administered to rats with liver damages caused by carbon tetrachloride and plasma bromsulfaphthalein retention, liver fats, and amount of cholesterol were examined. It was thereby found that orotic acid, soy bean lecithin, inositol, and the extract of *Alisma plantago* were effective, while vitamin B₁₂ and sodium thioglycolate had no anti-fatty liver activity, although they were capable of effecting some improvement in hepatic functions, and DL-methionine, choline chloride, and glucuronic acid were entirely ineffective.

(Received June 9, 1960)

四塩化炭素をシロネズミ腹腔内に投与すると急性肝臓障害を起こすが、この事実は多くの文献に見られる。急性肝臓障害をひき起こす四塩化炭素量は 0.033~0.1 cc/100 g で^{1,2)}、四塩化炭素 0.2 cc/100 g では 80% のシロネズミが死ぬ³⁾ という。四塩化炭素による肝臓障害シロネズミに対して薬物が予防または治療効果を有するかどうかについて試験された例は数種文献に見られ、sodium thioglycolate が組織学的見地から 100% 治療効果⁴⁾ を、V. B₁₂ が肝脂肪量と BSP^{*3}-retention とについて試験した結果効果ありと報告された⁵⁾。著者は正常シロネズミにおける BSP-retention の測定を行ない、四塩化炭素の用量作用関係を検討し、つぎに四塩化炭素肝臓障害シロネズミに対するオロット酸など 9 種の薬物の効果をしらべた。

実験方法

正常シロネズミにおける BSP-retention の測定

1) BSP 標準曲線 ヘパトサルファレイン注射液 (50 mg/cc, 第一化学薬品) の BSP 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 mg に相当する量をそれぞれ 2 本の小試験管にとり、おのおの生理食塩水で 3 cc に希釈し、1 本には 10% HCl 2 滴を入れて対照とし、他の 1 本には 10% NaOH 2 滴を入れコールマン・フォトメーター 575 mμ で測定した。

2) 正常シロネズミにおける BSP 排泄機能 体重平均 142 g の SD 系雌シロネズミを 3 匹 1 群とし、BSP 20 mg/kg を尾静脈内に注射、注射後の時間経過にしたがつてどのような割合で BSP が排泄されるかをしらべた。

四塩化炭素障害による肝脂肪蓄積の用量作用曲線 体重 150~200 g の SD 系雌シロネズミを 6 匹 1 群とし、CCl₄ 投与前 16 hr 絶食させた。各用量を綿実油で 1 cc/100 g の割合に希釈し、腹腔内に 1 回投与した。CCl₄ 投与後 24, 48 hr に各実験群の各シロネズミに BSP 20 mg/kg を尾静脈内注射し、30 min 後頸動脈から採血し、その血漿について BSP-retention を測定した。肝臓は肝脂肪測定に供した。

四塩化炭素脂肪肝に対する薬物の影響 体重 150~188 g の SD 系雌シロネズミ 3 匹 1 群に CCl₄ 投与 3 日前から 1 日 2 回 (8 時, 16 時) 毎日つぎの薬物を腹腔内投与し、4 日目の 8 時に CCl₄ を腹腔内に薬物と同時に

*1 本研究の要旨は日本薬学会近畿支部例会で発表(昭和 35 年 3 月)。本研究は、荒蒔義知：脂質代謝に関する研究 (Y. Aramaki: Studies on Lipid Metabolism) の一部である。第 5 報：本誌 80, 1606(1960)。

*2 Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) J. N. Donerd, W. W. William: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **91**, 191(1956).

2) P. Hans, K. W. Difter, B. S. Paul: *Ibid.* **71**, 688(1949).

3) E. L. Hove: Arch. Biochem. **17**, 467(1948).

4) B. Alexander, J. Charles, N. Sabra: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **60**, 388(1945).

*3 Bromsulfaphthalein (disodium phenoltetrabromophthalein sulfonate).

投与、その後も1日2回の薬物投与を続け、6日目すなわち CCl_4 投与 48 hr 後実験に供した。なお CCl_4 投与前 16 hr から実験終末まで絶食させた。 CCl_4 は 0.033 cc を綿実油で 1 cc に希釈し、希釈液 1 cc/100 g を腹腔内に1回投与した²⁾。検体および用量はつぎのようである。

Exptl. No.	Drug	Dose (mg. $\times$ 2/kg./day $\times$ 5)	CCl_4 (cc./100 g. i. p.)
1.	Normal control		—
2.	Negative control		0.033
3.	Orotic acid	100	0.033
4.	Inositol	500	0.033
5.	Soy lecithin	150	0.033
6.	DL-Methionine	100	0.033
7.	Vitamin B ₁₂	50 γ $\times$ 2/kg./day $\times$ 5	0.033
8.	Choline chloride	50	0.033
9.	Takusha extract	100	0.033
10.	Glucuronic acid	100	0.033
11.	Na-thioglycolate	100	0.033

CCl_4 投与 48 hr 後肝臓障害を調べるためにつぎの試験を行なった。

i) BSP 20 mg/kg を尾静脈内に注射し、30 min 後採血、血漿中残留 BSP 量の測定。

ii) 血漿と肝脂肪中の neutral fat, cholesterol, phospholipid の定量。

iii) 肝粗脂肪量の測定。

実験成績

正常シロネズミにおける BSP-retention の測定

1) BSP 標準曲線 (Fig. 1)

Table I. Liver Weight, Liver Fat, and Liver Function (BSP-retention) after Administration of Carbon Tetrachloride

Exptl. group (cc./kg.)	Liver wt./body wt. (%)		Liver fat/liver wt. (%)		BSP-retention in plasma 30 min. after injection of 20 mg./kg. (mg%)	
	24 hr. after CCl_4	48 hr. after CCl_4	24 hr. after CCl_4	48 hr. after CCl_4	24 hr. after CCl_4	48 hr. after CCl_4
Control	2.8	2.7	5.8 $\pm$ 1.0 ^{b)}	6.4 $\pm$ 2.7 ^{b)}	0.7	0.7
CCl_4 (0.001)	2.7	2.8	7.9 $\pm$ 0.7	8.1 $\pm$ 1.6	0.6	0.5
CCl_4 (0.01)	3.0	3.1	7.7 $\pm$ 1.0	7.5 $\pm$ 2.0	1.1	0.5
CCl_4 (0.1)	3.6	4.1	11.3 $\pm$ 2.2	9.9 $\pm$ 1.0	6.7	5.0
CCl_4 (1)	4.2	4.2 ^{a)}	12.3 $\pm$ 2.2	16.0 ^{a)}	14.9	14.7 ^{a)}

a) 3/6 rats died 30~48 hr. after injection of 1 cc./kg. of CCl_4 , so that the data of this group are average of 3 rats.

b) Indicates fiducial limits ($p=0.05$). It is presumably due to fasting that liver fat content of control group is higher than that of normal rat.

Fig. 1.

Standard Curve of Bromsulfaphthalein on Optical Density

Fig. 2.

Elimination Curve of BSP in Plasma of Normal Rat (BSP 20 mg./kg. i. v. inj.)

2) 正常シロネズミにおける BSP 排泄機能 BSP 20 mg/kg をシロネズミの尾静脈内へ注射し、注射直後、5, 10, 15, 30 min 後に頸動脈から採血し、その血漿について残留 BSP 量を測定した (Fig. 2).

四塩化炭素による肝脂肪蓄積および肝機能の用量作用曲線 CCl_4 投与により肝臓は網状乳白色に変色肥大し、その程度は用量増加にしたがつて著しくなる傾向がある。各実験群の肝重量 (%), 肝脂肪 (%), BSP-retention は Table I のようになった。これを用量作用曲線で示すと Fig. 3 のようになる。

Fig. 3.
Dose-Response Curve of Carbon Tetrachloride
to Liver Weight, Liver Fat, and
BSP-retention in Rats

— 24 hr. after injection
----- 48 hr. after injection

Table II. Protective Effect of Several Lipotropic Agents to CCl_4 -induced Liver Damage tested by BSP Method

Sample	Dose (mg./kg./day for 5 days)	BSP-retention in plasma (mg%) ^{a)}	Protection (%)
Normal control		0.2	100
Negative control ^{b)}		3.9	0
Orotic acid	200	0.5	92.0
Inositol	1000	3.3	16.1
Soy lecithin	300	1.0	79.5
DL-Methionine	200	7.5	-95.5
Vitamin B ₁₂	0.1	2.3	44.6
Choline chloride	100	6.0	-54.5
Takusha extract	200	1.7	59.8
Glucuronic acid	200	5.0	-27.7
Na-thioglycolate	200	1.6	61.6

a) 30 min. after intravenous injection of 20 mg./kg. of BSP, 48 hr. after CCl_4 administration.

b) CCl_4 0.33 cc./kg. i. p.

Table III. Effects of Several Lipotropic Agents to Lipid Components in Plasma or Liver of Rat injured by CCl_4

Sample		Normal control	Negative control	Orotic acid	Inositol	Soy lecithin	DL-Methionine	Vitamin B ₁₂	Choline chloride	Takusha extract	Glucuronic acid	Na-thioglycolate
Plasma	Free cholesterol (mg%)	10	11	8	10	10	19	10	22	17	19	19
	Total cholesterol (mg%)	41	46	46	38	63	63	47	65	54	54	63
	Phospholipid (mg%)	68	63	78.5	68.5	77	73	65	73.5	84.5	72	82
	Total cholesterol	0.60	0.73	0.59	0.55	0.82	0.86	0.72	0.88	0.64	0.75	0.77
	Total phospholipid											
Liver	Triglyceride (mg%)	38.3	48.9	63.4	36.8	80.2	46.4	50.0	60.6	66.0	58.9	68.5
	Free cholesterol (%)	0.22	0.27	0.24	0.25	0.24	0.26	0.29	0.30	0.24	0.27	0.27
	Total cholesterol (%)	0.27	0.34	0.29	0.29	0.28	0.31	0.36	0.34	0.30	0.37	0.36
	Phospholipid (%)	1.52	1.45	1.20	1.11	1.10	1.22	1.48	1.00	1.53	1.07	1.18
	Triglyceride (%)	1.1	4.5	1.5	2.2	1.4	2.1	2.0	4.0	0.9	1.8	2.1
Liver	Crude fat (%)	4.6	7.5	4.5	5.6	4.8	6.4	8.0	8.9	4.4	6.3	9.1

Rat and dosage are the same as those indicated in Table II.

四塩化炭素脂肪肝に対する各種抗脂肝剤の影響 正常シロネズミにおいては BSP 20 mg/kg 静脈注射 30 min 後の血漿にはわずか 0.08 mg %しか存在しない (Fig. 2). この実験で control が 0.2 mg %の値を示しているのは絶食の影響と考える. 各実験群についてつぎのような結果が得られた (Table II, Fig. 4). protection % は normal control を 100, negative control を 0 として各薬物の効果が normal に回復する割合を見たものである. Table II から分かるように normal control 近く回復したものはオロット酸 (92 %), 大豆レシチン (79.5 %), チオグリコール酸ナトリウム (61.6 %), タクシャ抽出物 (59.8 %), V. B₁₂ (44.6 %) である.

肝粗脂肪量および血漿, 肝脂肪中の neutral fat, cholesterol, phospholipid の量は Table III, Fig. 5 のようになる.

Fig. 4.

Effect of Several Lipotropic Agents on Liver Fat and BSP-retention of Rat injured by CCl₄

Rats and dosage are the same as those indicated in Table II.

総括および考察

正常シロネズミにおける BSP-retention の測定 著者は各種脂肪肝が単に脂肪の蓄積のみならず肝機能をも低下させることを推定し, 臨床的に使用されている二, 三の機能検査法を検討してきたが, BSP 法が動物では最も手技簡単で信頼しうる成績を示し, 著者の目的にそうことがわかった. 荒蒔等が家兎で認めたと同じく正常シロネズミでは BSP 排泄は人にくらべて速やかに行なわれる. 20 mg/kg の大量を静脈注射するにもかかわらず, 血漿残留濃度は直後 48.9 mg %, 5, 10, 15, 30 分後にはそれぞれ 5.7, 0.9, 0.27, 0.08 mg % となる. すなわち直後の血漿 BSP 濃度を 100% とすると, 5 分後にはその 88.3%, 10 分後には 98.2% が排泄され, 大部分が 10 分以内に排泄されることがわかる. 30 分後にも相当の残留があれば肝機能障害を疑うに充分と思われたので, 障害肝検査には 30 分を採用した.

四塩化炭素障害による肝脂肪蓄積および BSP-retention の用量作用曲線

Table I に示されるように四塩化炭素を投与しない対照群にも正常シロネズミの肝脂肪量以上の増加と BSP-retention の多少の増加 (正常シロネズミの 0.08 mg % に対し 0.7 mg %) が見られるが, 本実験の条件である栄養のよい雌シロネズミの絶食は体から肝への脂肪移動を起こすことが文献にも知られていることから, このような現象の起こることがうなずかれる. 四塩化炭素障害は Table I および Fig. 3 で明らかのように肝脂肪量の点ではすでに 0.001 cc/kg の用量から有意に増加してくるが, 肝重量の増加 (ウッ血, 浮腫も原因となる) および BSP-retention の点では 0.01 cc/kg 以上からようやく影響を現わす. 用量作用曲線として見れば, 0.001 と 0.01 cc/kg とは肝脂肪量の点で平均値は逆転しているが, これらの逆転は実験誤差と考えられる. 0.01 cc/kg 以上からは用量に比例して脂肪量, BSP-retention とともに増加していて用量作用曲線が成立する.

肝脂肪量は四塩化炭素投与後 48 時間に最も著しい増加を示すと報告している文献²⁾もあるが, 著者の成績では 24 時間と 48 時間との差は 1 cc/kg 群でやや著しいが (この量では 48 時間後まで生存した動物は半数にすぎない), 他の用量では大差なく, 24 時間後にも障害は明らかといえる.

全体として 0.1 cc/kg 以上の投与ではいずれの時間後でも肝障害は一目瞭然である. したがって用量作用曲線

Fig. 5.

Effect of Several Lipotropic Agents on Liver Total Cholesterol and Plasma Total Cholesterol of Rat injured by CCl₄

Rats and dosage are the same as those indicated in Table II.

成立範囲内に含まれる四塩化炭素 0.3 cc/kg の投与 48 時間後 (次項の実験条件) の肝脂肪量, BSP-retention の増加を抑制する作用をもつて抗脂肪肝作用と見做してよいと考えた。

四塩化炭素脂肪肝に対する各種抗脂肪肝剤の影響

四塩化炭素をシロネズミに注射または内服させると肝臓に脂肪蓄積を起こすが, その原因としては Himsworth の vascular theory (肝血流の減少, ウッ血, 浮腫による hypoxia が原因であり, その証拠として四塩化炭素濃度がより薄くなる肝中心の静脈ほど脂肪変性が強いという), あるいは四塩化炭素が直接肝臓ミトコンドリアに働き, その結果ミトコンドリアのピリジヌクレオタイドの消失を起こし, 脂肪酸化の低下するのが脂肪蓄積の原因であるという生化学的説明⁵⁾もある。著者は食餌性脂肪肝に有効と知られたものが四塩化炭素やエチオニン脂肪肝に対し予防効果があるかどうかを調べて相互の性格の違いを明らかにしようと企図した。この実験に用いた検体の投与量はまちまちであり, しかもそれぞれ一用量にすぎないが, この量は著者の経験した他種の脂肪肝に対して充分作用を発揮する量であつて, 四塩化炭素脂肪肝に対する作用を推定するには適当な量と考えられたものである。

著者はこの量において薬物投与による肝脂肪量の著明な低下と肝色素排泄機能の改善を主としてしるべ, さらに cholesterol 量やリン脂質量に対する影響などについて検討した。Table II および Fig. 4 でわかるようにオロット酸, 大豆レシチン, タクシャ抽出物 および やや前三者よりは弱いが イノシトールが脂肪量と BSP-retention を対照に近くまで改善するのに対し, コリン, メチオニン, グルクロン酸は無効, V.B₁₂, チオグリコール酸は BSP-retention をやや改善するが, 脂肪蓄積には無効であつた。食餌性脂肪肝と異なつてコリンが無効なのにレシチン, タクシャ抽出物が有効なのは注目される。

cholesterol について見ると血漿のそれは四塩化炭素処理でわずかに増加するが, イノシトールだけがこれを無処理対照値以下に阻止し, オロット酸, V.B₁₂ が対照のレベルに留める他はいずれも助長する傾向を有し, とくにコリン, レシチン, メチオニン, チオグリコール酸は著しく, タクシャ抽出物は比較的少ない。肝臓のそれは四塩化炭素でわずかに増加するが, オロット酸, レシチン, イノシトール, タクシャ抽出物の四者はいずれも無処理対照値に近く改善する。

リン脂質は血漿中では四塩化炭素でやや低下するが, いずれの検体もこれを高め, とくにオロット酸, レシチン, タクシャ抽出物, チオグリコール酸では相当な増加が見られた。

動脈硬化に関係あるといわれる血漿 C/P 比は, 四塩化炭素で悪化する。オロット酸, イノシトール, タクシャ抽出物は C/P 比を改善したが, レシチンは cholesterol 値を著しく高めたため C/P 比はむしろ増加した。

肝中リン脂質は四塩化炭素によりむしろ減少する方向にあるが, タクシャを除いてはむしろこれを助長する方向に働き, 一定の関係を示さない。

肝の中性脂肪量は四塩化炭素脂肪肝の脂質増加の中心をなすものである。したがつてこれに対する各検体の効果は肝脂肪量と略称して来た粗脂質に対する効果と平行関係を示した。

以上を総括すると四塩化炭素肝障害に有効なものはオロット酸を筆頭として, レシチン, タクシャ抽出物, イノシトールであり, V.B₁₂, チオグリコール酸は肝機能をやや改善するが抗脂肪肝作用なく, その他は無効といえる。

結 論

正常シロネズミの血漿 BSP-retention を検討し, 四塩化炭素の用量作用曲線を調べた後, 四塩化炭素障害シロネズミに 9 種の薬物を投与して血漿 BSP-retention, 肝脂肪量, cholesterol 量などの点からどの薬物が四塩化炭素による肝障害を予防ならびに治療しうるかをしらべた結果, オロット酸, 大豆レシチン, タクシャ抽出物, イノシトールが有効なことを知つた。

本研究に当たり御鞭撻を賜つた研究所長 桑田 智博士, 第 2 部長 立岡末雄博士, 第 4 部長 金沢謙一博士, 主任研究員 田中邦喜博士に謹謝致します。また実験に協力された大菊洋子, 松村晴希, 安井清子の諸氏に深謝致します。

武田薬品工業株式会社研究所