

実験的肝障害ラットの血漿及び 肝臓中の脂質について

— 四塩化炭素及び栄養障害性 —

金 行 孝 雄

はじめに

肝疾患においては障害された肝細胞の修復に栄養素が必要であるため、薬物療法にも増して食事療法が重要である。肝障害における治療食は基本的には高タンパク質、高エネルギー及び高ビタミン食である。¹⁾ 種々の原因による肝障害があり、症状に適した食事が必要であることは言うまでもないが、一般にタンパク質のうち動物性タンパク質を50%以上摂取することが望ましいとされているから動物性脂肪が多くなる。そこで種々の肝障害における動物性脂肪の適量を検討することは意義のあることと思う。

本実験では肝障害モデル動物を作製するための基礎的研究を目的とし、四塩化炭素及び栄養障害性に肝障害ラットをつくり、血漿及び肝臓中の脂質を測定し、2、3の知見を得たので報告する。

実験方法

1 実験動物

実験にはウィスター系雄ラットを使用した。四塩化炭素を用いた実験では初体重約150gのものを、また、栄養障害実験では初体重約90gのものをを用いた。栄養障害群以外の各群にはオリエンタルMF固形飼料と水を自由に摂取させて飼育した。

2 四塩化炭素投与による肝障害ラットの作製

i) ラットに四塩化炭素(0.1 ml/150 g 体重)を1日1回2日間投与し、最終投与の1、3、5及び7日後に断頭によりト殺した。

ii) ラットに四塩化炭素(0.1 ml/150 g 体重)を1日1回2日、4日及び6日間連続投与し、最終投与の24時間後に断頭によりト殺した。

iii) ラットに四塩化炭素(0.05 ml/150 g 体重)を1、4、7、11、14及び21日目に投与し、最初の投与から28日目に断頭によりト殺した。

3 栄養障害性肝障害ラットの作製

実験食の組成はラード38.0%、ショ糖45.375%、

カゼイン8%、オリエンタル配合ミネラル類4%、コリン欠乏オリエンタル配合ビタミン混合1%、L-システチン0.625%及びセルロース3%とした。実験群は実験食で4週間飼育した後、断頭によりト殺した。

4 試料の採取

ラットはエーテル麻酔下で断頭、血液は頸部の切り口よりヘパリンナトリウムの入った試験管に採取し、血漿を分離した。血漿及び肝臓は使用まで-20℃で保存した。

5 血漿脂質の測定

血漿中の総脂質はスルホホスホバニリン法²⁾、総コレステロール及び遊離コレステロールはKilliani反応によるZak抽出法^{3,4)}、トリグリセライドはアセチルアセトン法^{5,6)}及び遊離脂肪酸はItaya-Ui改良法⁷⁾を用いて測定した。

6 肝臓中の脂質の測定法

肝臓から脂質の抽出はFolchの溶媒を用いたBragdonの法⁸⁾を準用して行った。すなわち、冷凍保存したラット肝臓約1gを正確に秤量し、クロロホルム:メタノール(2:1)混液19 mlと共にテフロン-ガラスホモゲナイザーでホモゲナイズする。数時間室温に放置した後、東洋ろ紙No.7を用いてろ過し、ろ液を50 mlの共栓付遠心沈殿管に移す。残分をさらに同溶媒5 mlでホモゲナイズし、同様にろ過してろ液を前のろ液と合せて脂質抽出液とする。この抽出液に0.04%塩化カルシウム溶液2溶を加えて静かに混和した後遠心分離する。上層はアスピレーターにより吸引除去し、下層を集め、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で濃縮し、残水はベンゼンを加えて混合して留去する。残留脂質をクロロホルム:メタノール(2:1)に溶解して25 mlのメスフラスコに定量的に移す。総脂質は重量法⁸⁾トリグリセライドはアセチルアセトン法^{5,6)}及び総コレステロールと遊離コレステロールはKilliani反応によるZak抽出法^{3,4)}で測定した。

7 組織標本の作製

ラットをト殺後、肝臓を摘出し、その一部を10%ホルマリン液で固定した。凍結マイクロームで切片を作製し、スダンⅢ及びヘマトキシリン・エオシン染色を行い肝臓の構築について検索した。

8 統計による分析

各々の実験群の結果はmean±s.d.で現わした。対照群と実験群との間の有意差の検定はstudent's t-testを用いた。

実験結果

表1は実験食群と対照群ラットの体重を示す。実験食群は飼育直後から明らかに体重増加の減少があり、対照群との間に体重の有意差が認められた。

表1 ラットの体重表

Days	Control (g)	Experimental diet (g)
0	86.8 ± 4.0	89.6 ± 3.3
8	137.6 ± 11.1	99.4 ± 11.9
16	190.8 ± 12.8	106.8 ± 15.1
22	235.8 ± 15.4	112.4 ± 18.9
28	274.2 ± 22.9	121.2 ± 18.8

実験例数 = 10 実験値 = mean ± s.d.

表2は四塩化炭素投与後の各群の肝臓組織標本を分析し、肝障害の程度を相対的に現わしたものです。四塩化炭素の2日間投与群では脂肪変性は1日目が最も激しく、経時とともに回復傾向を示した。連続投与群では投与期間が長くなると脂肪変性、肝実質の壊死、デッセ腔の浮腫が顕著にみられた。実験食群での肝臓は脂肪滴が増大し、巨大な脂肪のうを形成し、明らかな脂肪肝を認めた。

表3と4は各実験群における血漿脂質の分析値です。総脂質は四塩化炭素投与3日群 (P<0.02)、連続投与4日群 (P<0.01)と実験食群 (P<0.01)で増加した。トリグリセライドは四塩化炭素投与1日 (P<0.05)及び3日 (P<0.02)群、連続投与4日群 (P<0.02)と実験食群 (P<0.01)で増加した。遊離脂肪酸は四塩化炭素投与1日 (P<0.01)及び3日 (P<0.01)群と連続投与4日 (P<0.01)及び6日 (P<0.01)群で増加した。総コレステロールは四塩化炭素投与3日群 (P<0.05)と実験食群 (P<0.01)で増加、遊離コレステロールは四塩化炭素投与1日 (P<0.02)及び3日 (P<0.01)群、連続投与4日 (P<0.01)及び6日 (P<0.01)群と実験食群 (P<0.02)で増加、エステル型コレステロールは実験食群 (P<0.01)で増加した。

表2 四塩化炭素投与ラット肝臓標本の分析

Days after administration of CCl ₄	Fatty deg.	Nec.	Edema of the Disse' spaces	Prolif.
	+	—	—	—
1	+++	++	+	—
3	++	+	+	—
5	++	+	±	—
7	+	+	±	—
Days of CCl ₄ administration				
Control	+	—	—	—
2	++	++	+	—
4	+++	++	++	—
6	+++	+++	++	—

deg; degeneration. nec; necrosis. prolif; proliferation.

表3 ラット血漿の総脂質, トリグリセライド及び遊離脂肪酸濃度

	Total lipid (mg/100ml)	Triglyceride (mg/100ml)	Free fatty acid (μ Eq/l)
Control	1428 \pm 47.6 (9)	22.5 \pm 14.6 (8)	324.7 \pm 29.5 (8)
Days after admini- stration of CCl ₄			
1	201.5 \pm 99.4 (9)	62.7 \pm 45.8 * (9)	828.1 \pm 371.0 *** (9)
3	210.2 \pm 25.0 ** (9)	59.7 \pm 35.7 ** (9)	954.2 \pm 424.0 *** (8)
5	190.3 \pm 57.3 (9)	37.1 \pm 20.6 (8)	369.1 \pm 207.6 (8)
7	161.1 \pm 28.4 (9)	21.6 \pm 18.0 (9)	270.1 \pm 81.0 (9)
Days of CCl ₄ administration			
4	213.5 \pm 49.2 *** (9)	86.1 \pm 63.6 ** (9)	884.0 \pm 189.3 *** (9)
6	169.0 \pm 50.8 (9)	50.5 \pm 38.2 (8)	807.7 \pm 285.7 *** (9)
Control	178.1 \pm 40.4 (8)	35.1 \pm 17.5 (8)	1010.1 \pm 143.7 (8)
Repeated admini- stration of CCl ₄	200.2 \pm 55.4 (8)	31.5 \pm 14.5 (8)	913.2 \pm 130.8 (8)
Control	178.1 \pm 40.4 (8)	35.1 \pm 17.5 (8)	1150.0 \pm 498.0 (7)
Administration of experimental diet	392.5 \pm 39.3 *** (7)	65.8 \pm 23.6 ** (7)	1105.0 \pm 223.0 (7)

*P < 0.05, **P < 0.02 及び ***P < 0.001 (Student's t-test) 対照群と比較した。

表4 ラット血漿のコレステロール濃度

	Cholesterol (mg/100ml)				E/T (%)
	Total	Free	Ester		
Control	60.8 ± 21.3	8.6 ± 4.3	52.2 ± 21.2	(9)	84.3 ± 9.2
Days after administration of CCl ₄					
1	68.0 ± 24.9	27.2 ± 19.2 **	40.7 ± 12.1	(9)	63.2 ± 15.7
3	82.0 ± 18.7 *	21.6 ± 8.6 ***	60.3 ± 14.7	(8)	73.5 ± 8.0
5	68.1 ± 22.7	11.1 ± 4.8	57.0 ± 20.7	(8)	82.6 ± 8.4
7	58.2 ± 11.3	8.0 ± 3.9	50.2 ± 13.6	(7)	85.3 ± 8.3
Days of CCl ₄ administration					
4	76.0 ± 13.7	26.0 ± 7.4 ***	47.6 ± 13.4	(9)	62.1 ± 10.1
6	66.0 ± 18.8	20.7 ± 8.2 ***	45.2 ± 16.0	(7)	68.7 ± 11.2
Control	94.0 ± 27.2	21.3 ± 4.8	72.6 ± 24.3	(8)	76.1 ± 5.6
Repeated administration of CCl ₄					
Control	92.3 ± 21.7	18.8 ± 6.8	73.3 ± 19.2	(8)	79.1 ± 7.0
Administration of experimental diet					
Control	62.4 ± 10.0	13.2 ± 4.8	49.1 ± 4.4	(7)	78.1 ± 8.8
Administration of experimental diet	117.2 ± 27.6 ***	24.8 ± 9.8 **	92.4 ± 22.6 ***	(7)	78.8 ± 6.2

*P < 0.05, **P < 0.02 及び ***P < 0.01, (Student's t-test) 対照群と比較した。

表5及び6は各実験群における肝臓中の脂質の分析値です。総脂質は四塩化炭素投与1日群 ($P < 0.01$) と実験食群 ($P < 0.01$) で増加, くり返し投与群 ($P < 0.02$) で減少した。トリグリセライドは四塩化炭素投与1日群 ($P < 0.01$) と実験食群 ($P < 0.01$) で増加, くり返し投与群 ($P < 0.05$) で減少した。総コレ

ステロールは四塩化炭素投与1日 ($P < 0.01$) 及び5日 ($P < 0.05$) 群と実験食群 ($P < 0.02$) で増加した。遊離コレステロールはいずれの実験群でも有意差は認められなかった。エステル型コレステロールは四塩化炭素投与1日群 ($P < 0.01$) と実験食群 ($P < 0.01$) で増加した。

表5 ラット肝臓の総脂質及びトリグリセライド濃度

	Total lipid (mg/g)		Triglyceride (mg/g)	
Control	42.6 ± 2.8	(8)	7.8 ± 1.6	(8)
Days after administration				
1	50.8 ± 4.8	*** (7)	13.1 ± 3.1	*** (7)
5	38.7 ± 5.4	(7)	7.9 ± 1.9	(7)
Control	45.1 ± 2.3	(8)	9.1 ± 1.4	(8)
Repeated administration of CCl ₄	40.7 ± 3.6	** (8)	7.6 ± 0.6	* (7)
Control	33.7 ± 4.4	(7)	10.0 ± 1.1	(7)
Administration of experimental diet	212.5 ± 75.7	*** (7)	149.0 ± 50.5	*** (7)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.02$ 及び*** $P < 0.01$, (Student's t-test) 対照群と比較した。

表6 ラット肝臓のコレステロール濃度

	Cholesterol (mg/g)						
	Total	Free	Ester	E/T (%)			
Control	3.5 ± 0.5	(8)	1.7 ± 0.38	(8)	1.8 ± 0.65	(8)	50.7 ± 12.8
Days after administration of CCl ₄							
1	4.8 ± 0.8	*** (7)	2.1 ± 0.45	(7)	2.7 ± 0.29	*** (7)	54.4 ± 6.7
5	4.1 ± 0.6	* (7)	2.0 ± 0.14	(7)	2.1 ± 0.64	(7)	50.3 ± 9.0
Control	5.1 ± 0.25	(8)	2.9 ± 0.17	(8)	2.2 ± 0.09	(8)	42.0 ± 3.1
Repeated administration of CCl ₄	5.2 ± 0.3	(8)	2.9 ± 0.32	(8)	2.4 ± 0.40	(8)	44.3 ± 6.5
Control	3.9 ± 0.4	(7)	1.2 ± 0.30	(7)	2.7 ± 0.30	(7)	69.7 ± 6.9
Administration of experimental diet	5.6 ± 1.5	** (7)	1.0 ± 0.14	(7)	4.6 ± 1.60	*** (7)	81.3 ± 5.9

* $P < 0.05$, ** $P < 0.02$ 及び*** $P < 0.01$, (Student's t-test) 対照群と比較した。

考 察

実験的肝障害モデル動物にはラット、マウス、イヌ、ウサギ等が用いられる。栄養性肝障害には特定の栄養素の欠乏（蛋白質総量の不足、必須アミノ酸の欠乏、シスチンの欠乏等）、栄養素の相対的過剰（炭水化物過剰、脂質過剰、シスチン過剰等）、低タンパク質・高脂肪食、抗脂肝因子の欠乏（メチオニン、コリン、レシチン、ビタミンB₆等）などを原因としている⁹⁾。薬物による肝障害はエチオニン、四塩化炭素、クロロホルム、砒素化合物、化学性発癌物質等が用いられる¹⁰⁾。胆汁性肝障害では不完全な輸胆管結紮を行う¹¹⁾。

本実験においては薬物は四塩化炭素を用い、また、栄養性には低タンパク質、高脂肪、コリン欠乏及びシスチン添加飼料を使用した。

四塩化炭素を2日間投与した後、1日目又は3日目までは血漿及び肝臓中の脂質の変動が認められるが5日目には対照群との間に有意差はなかった。肝臓の組織標本の分析において、四塩化炭素を投与した後、5日、7日と経過するに従って脂肪変性、肝実質の壊死及びデッセ腔の浮腫が改善された。肝臓障害の治ゆにともなって血漿及び肝臓中の脂質量は対照群との間に有意差がなくなった。

四塩化炭素を投与したラットでは投与1日目はほとんど摂食がないため連続投与群では体重の増加がなくむしろ減少した。くり返し投与群で肝臓中の総脂質及びトリグリセライドは減少しているが血漿中では有意差を認めないことは摂食量の影響を考慮する必要がある。また、四塩化炭素の2日投与実験とくり返し投与又は実験食投与実験との間の対照群において各脂質量が非常に異なるのは両実験群のラットに3週令の差があることとこの時期には体重増加が著しいことが原因であると考えられる。

肝障害により血漿の遊離脂肪酸と遊離コレステロールの増加、肝臓の総コレステロールの増加が認められた。肝炎では血中総コレステロールが高値を示し、重症肝炎や肝硬変では低下することが認められている¹²⁾。

本実験では四塩化炭素を2日投与した後3日群の血漿と1日群の肝臓で総コレステロールが上昇しているのが認められた。

実験食群において、肝臓の組織標本像は明らかな脂肪肝を示し、肝臓中の総脂質は約21%であった。血漿のコレステロールは増加し、肝臓では総コレステロールとエステル型コレステロールが増加した。このコレステロールの増加は実験食中のラード100g当り約83

mgの総コレステロールが含まれていることが主な原因と考える。本実験に用いた実験食（コリン欠乏）での肝障害では脂肪肝が生成し、長期間脂肪浸潤がつづくことと肝の線維化をきたし、さらに進むと肝硬変に移行する¹³⁾。

ヒトにおいてはウィルス性肝炎に関心が集中していることから、ウィルス感染による肝障害モデル動物を作製することが望ましい。しかし、現在サルに於いてウィルス性肝炎を作製したという報告があるが¹⁴⁾、オーストラリア抗原に対する動物実験はほとんど試みられていない。

四塩化炭素による形態学的変化は注射1分後にはシノソイドの変化、1時間後に小葉中心部の壊死、5時間後には脂肪浸潤がみられる。生化学的には非常に早く影響が現れ、注射15秒後にはDNA分子のdepolymerizationが起り、2時間後には遊離アミノ酸の上昇、3時間後には脂肪の上昇及び細胞内小器官の生化学的变化がみられる¹⁵⁾。

以上の結果からウィルス性肝障害のモデル動物の作製が困難な現状では四塩化炭素を用いた肝障害が、又、脂肪肝やアルコール性肝硬変に対してはコリン欠乏性肝障害が生化学的に病態生理を考察するためによい実験モデルであると考えられる。

結 語

1. 四塩化炭素による肝障害では血漿及び肝臓の総脂質、トリグリセライド、遊離脂肪酸及びコレステロール量の変動が認められる。これらの脂質量の変動は肝障害の程度により異なると共に摂食量とも関係している。

2. 実験食による肝障害では脂肪肝を生成し、血漿及び肝臓中の脂質は遊離脂肪酸を除いてすべて上昇した。

稿を終えるに臨み肝臓の組織標本分析に対して助言をしてくださりました馬屋原病院の森久博司博士に感謝します。

なお、本論文の要旨は第12回日本栄養・食糧学会中国四国支部大会（鳥取大学医学部、昭和54年11月）において発表した。

文 献

1. 杉山二六佑, 松本敦子, 増田さく, 小早川澄子: 新編食事療法シリーズ 2, 医歯薬出版株式会社, 東京, P 7 (1972)
2. Frings, C.S. and Dunn, R.T.: A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction, *Am. J. clin. path.*, **53**, 89 (1970)
3. Zak, B., Dickenman, R.C., White, E.G., Burnett, H. and Cherney, P.J.: Rapid estimation of free and total cholesterol, *Am. J. clin. path.*, **24**, 1307 (1954)
4. 馬場茂明, 奥田清編: 医化学実験法講座 第3巻B, 臨床化学Ⅱ, 中山書店, 東京, P 191 (1973)
5. Sardesai, V.M. and Manning, J.A. : The determination of triglycerides in plasma and tissues, *Clin. Chem.*, **14**, 156 (1968)
6. Fletcher, M.J. : A colorimetric method for estimating serum triglycerides, *Clin. Chem. Acta.*, **22**, 393 (1968)
7. 久城英人, 高野圭以, 曾山浩吉, 福井巖: 血清遊離脂肪酸比色定量法に関する検討 (第7報)- Itaya-Ui 改良法について, *臨床病理*, **18**, 833 (1970)
8. Bragdon, J.H. : Method for determination of total serum lipids. Lipids and steroid hormones in clinical medicine, (ed. by Sunderman, F.H. et al) Lippincott, Philadelphia, p 10 (1960)
9. 高橋忠雄, 大島良雄監修: 臨床内科全書 5・1 肝・胆道障害疾患, 金原出版(株) 東京, P 218 (1972)
10. 上田英雄: 肝臓病上巻, 南江堂, 東京, P 285 (1962)
11. 藤井儔子, 小山良修著: 動物実験手技改定第6版, 協同医書出版社, 東京, P 341 (1975)
12. 馬場茂明, 奥田清編 医化学実験法講座 第3巻B 臨床化学Ⅱ: 中山書店, 東京, P 196 (1973)
13. Hoffbauer, F.W. : Fatty cirrhosis in the rats: 1. A method of grading specimens., *Arch. Pathol.*, **68**, 160 (1956)
14. Barker, L.F., Chisari, F.V., McGrath, P.P. et al: Transmission of type B Viral hepatitis to chimpanzees, *J. Intern. Dis.*, **127**, 648 (1973)
15. 織田敏次, 大菅俊明, 兼子俊男, 久米章司: 中毒性肝障害の生化学, 代謝, **3**, 93 (1966)

昭和55年3月28日受理