

原 著

ラットのエチオナミッド急性肝障害における還元型グルタチオンについて

上 條 与 司 昌

信州大学医学部第一内科学教室 (主任: 戸塚忠政教授)

THE REDUCED FORM GLUTATHIONE IN THE ACUTE LIVER IMPAIRMENT OF RATS CAUSED BY ETHIONAMIDE

Yoshimasa KAMIJO

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University.

(Director: Prof. T. TOZUKA)

Key words: グルタチオン (glutathione), エチオナミッド (ethionamide)

緒 言

Ethionamide (以下TH) は, Liebermann らによって抗結核作用を認められて以来, 二次抗結核剤として, その有用性が広く認められてきた。しかし, その副作用である胃腸障害, 肝障害などのため, 時として投与の中断を余儀なくされることは, 多くの臨床家が経験しているところである。この中で, 肝障害について堂野前(1)は, 221例のTH療法中11例が肝機能障害のため治療を中止し, そのうち5例に黄疸がみられた事を報じ, 日本人ではTHによる肝障害が意外に多く起り得ることを警告した。また伊藤ら(2)も, 羽曳野病院で214例中24例(11%)がBSP 10%以上を示したことを明らかにし, phosphoryl choline がTHによる臨床的肝障害に対し有効であることを報告している。

一方, グルタチオンは生命現象に重要なSH基を持ち, 広く生物界に存在し, その代謝機構において重要な役割を演じていることは古くから知られているが, とりわけ, 肝には多く存在し, 酸化還元, 抱合による解毒作用, SH酵素の賦活などに関与して, 生理的に重要な働きをしていることが明らかにされている。また近年, グルタチオンの量産化に成功し, 容易に利用できるようになり, 肝疾患に対する応用例がいくつか報告されるようになった。著者は臨床応用への前段階としてラットを用い, TH肝障害時の肝還元型グルタチオン(以下GSH)濃度

の変動をしらべ, またTH障害肝が合成GSHのとりこみにいかなる態度を示すか検討した。さらに, THによる肝の組織学的変化の発現に対し, 合成GSHの投与が予防的効果をもつかどうかについても検索した。

実験方法ならびに成績

実験I TH経口投与によるラット肝GSH濃度の経日的変化について。

1 実験材料および方法

体重 38 ± 2 g, 離乳直後のDonryu系雌のラットを用いた。脂肪肝誘起実験は表1のごとく, 伊藤(3)の方法にほぼ準じた。

表1 ラット脂肪肝誘起実験の条件

ラット	離乳直後の Donryu 系雌	
飼育条件	20±5℃	
飼料	カゼイン	20%
	ビタミン混合物	2%
	塩混合物	4%
	トーモロコシデンプン	2%
	タラ肝油	0.2%
	塩酸コリン	0.15%
	TH	0.3%
	蔗糖で100%にする	

TH 群は1群5匹, 対照群は1群4匹とし, 個々別々に飼育した。対照群の飼料は TH を除き, 他は TH 群と同じ組成からなっている。飼料量は両群とも1日5g とする。したがって, TH の1日平均摂取量はラットの体重を38g とすると39mg/100g になる。峰下ら(4)によれば, 初期体重 110±10g のウイスター系ラットを用い, 3日間の死亡率から Litchfield - Fertig 法により LD₅₀ を算出したところ, 経口法では1320±74mg/kgであったと述べている。水は自由に飲めるようにした。TH 群は実験開始後丸1日, 2日, 4日, 6日, 8日目に, 対照群は丸2日, 8日目に断頭脱血致死させ, 直ちに外側右葉を取り出し, 1部を sudan III 染色に, 他を GSH の定量に用いた。なお, 飼料の投与は午後6時に, 断頭致死は午後8時に行った。

GSH の定量法およびその検討

GSH の定量法については, これまで多くの方法が工夫され, 報告されているが, その測定方法の特異性, 精度, 簡便さなどから, 各々その目的に応じ, さまざまな方法が採用されている。今日一般に用いられているものとしては, iodometric titration method, glyoxalase method., alloxan "305" method などがある(5)。iodometric titration method は簡便であるが, 特異性に問題があり, glyoxalase method は特異性が非常に高いが, 測定方法が煩雑である。alloxan "305" method は特異性, 測定方法からして比較的秀れた方法であるが, 組織の GSH の測定にや・満足を欠くといわれている。著者は比較的特異性が高く, 簡便な方法として Cohn ら(6)の方法を多少変法して用いた。

表2の過程は, 多量の氷塊を浮べた水槽で十分に冷しながら行った。GSH-OPT fluorophore の activation spectra は340 m μ , fluorescence spectra は420 m μ であった。蛍光量は PH によっ

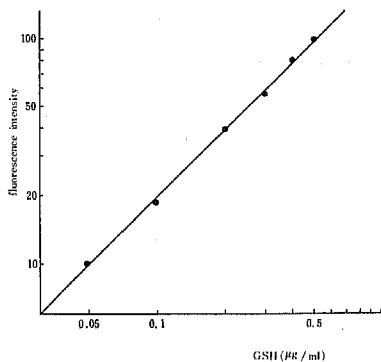


図1 GSHの標準曲線

表2 GSH の定量法

試薬	内容
A液	蒸留水に EDTA を30m μ moles/ml 加えた液
B液	25% (w/v) メタリン酸液
C液	PH 8.0 の0.2 M リンサン緩衝液
D液	特級メタノールに0.1% (w/v) の割合で0-フタルアルデヒドを加えた液

方法

ラット

↓ 断頭脱血

肝組織片 200mg

↓ A液 8ml で2分間ホモジナイズ

ホモジネート

↓ B液 2ml を加え良く混和。10分間放置後4000rpm 10分間遠沈する

上清 1ml

↓ A液を9ml 加える

稀釈液 2ml

↓ A液18ml を加え, 0.1 M 苛性ソーダ液でPH7.0にし, その量を測定する

PH7.0 の稀釈液 2ml

↓ C液 4ml を加えPH8.0とし, 直ちにD液0.4ml を加え混和する

測定 15~20分間室温に放置後, 日立蛍光分光光度計を用い測定する

て異なり, Cohn らによれば, PH8.0 が GSH に一番特異性が高いと報告している。

GSH の定量はその分解, 酸化などを抑制するため, 水槽に十分量の氷塊を入れ, 冷しながら表2のごとき過程に従って行った。測定は, GSH 0.1 μ g/ml 濃度の control と, A液, C液, D液よりなる blank を用い, 標準曲線の読みと希釈率から GSH の組織濃度を算定した。標準曲線は図1のごとく, 著者が測定した0.05~0.5 μ g/ml の範囲内

表3 GSH の再現性

	ラット肝 (μ g/100mg)	ラット肝+ GSH 40 μ g	再現率
例 I	109.2	145.0	90 %
II	100.0	139.4	99 %
III	137.8	181.0	108 %
IV	132.6	171.6	98 %
V	119.6	155.8	91 %

119.8 ± 14.1

97 ± 6 %

表4 関連する各種薬物の蛍光量の比較

	Cohn 等	著者
GSH	100.00	100.00
GSSG	0.96	1.50
cysteinylglycine	0.25	
cysteine	0.28	
S-methylcysteine	0	
cystine	0	
cysteic acid	0.30	
taurine	0	
2-mercaptoethylamine	0.14	
cystamine	0	0.50
glutamine	0.40	0.45
glutamic acid	0.04	
asparagine	0.46	
homocysteine	0.32	
homocystine	0	
ergothionine	0.50	
thiohistidine	1.80	
histamine	0.50	
methionine		0.40
ascorbic acid		0.40
TH		0

では、全対数グラフで直線的な関係が認められた。再現性試験では、表3のように97±6%と比較的良好な検出率を示し、関連する各種薬物の蛍光量の比較でも表4のように、かなりの特異性があることを認めた。THは水に対して難溶性であるので、ラット肝の同一葉を二分し、肝の一方にTHを加え、ホモジナイズして測定したが、両者には全く差が認められなかった。このことからTHは、この測定法では蛍光を示さないものと判断した。

表5 THによるラット肝GSH量の経日的変化

日	TH 群	対照群
1	83.0±10.8μg/100mg(5)	
2	157.0±13.2 "	(5) 96.2±4.8μg/100mg(4)
4	167.4±20.4 "	(5)
6	202.5±48.6 "	(5)
8	181.1±14.7 "	(5) 129.7±7.4 "

括弧内は使用した動物の数

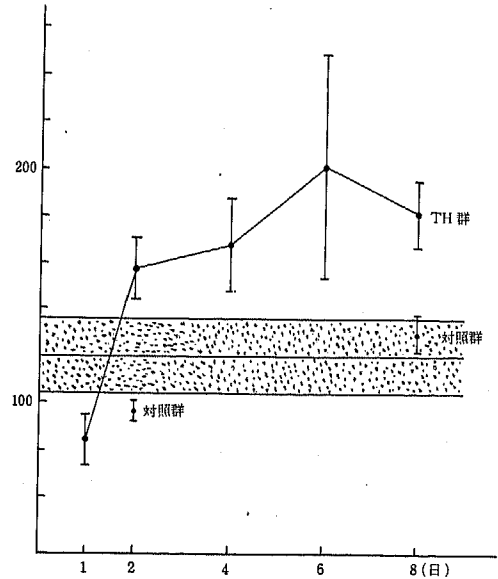


図2 THによるラット肝GSHの経日的変化

2 実験成績

普通一般に使用されている固型食 CE-Z で飼育した時のラット肝 GSH は、表3に示したように 119.8±14.1μg/100mgであるが、この量は、Cohnらが示した114μg/100mgとほぼ等しい。THを含まない配合飼料で飼育した対照群の肝 GSH は、表5、図2のごとく、2日目96.2±4.8μg/100mg 8日目129.7±7.4μg/100mgで、通常の固型食で飼育した未処置群の値に近いものであった。一方、TH群は第1日目83.0±10.8μg/100mgと未処置群より低値を示したが、2日目には157.0±13.2μg/100mgと高値を示した。2日目と8日目についてTH群と対照群とをCochran-Cox's methodに従って検定を行ったところ、2日目は1%の危険率、8日目は5%の危険率で有意であり、明らかにTHによって肝GSHが2日目から増量したものと見える。またsudan III染色による組織学的検索から、2日目より、主として小葉中心部に脂肪化がみられるようになった。

実験II ³⁵S-GSHの腹腔内投与方法による生体内分布について、TH群と対照群との比較

1 実験材料および方法

実験1と同じラットと飼料を用いた。

1の実験から明らかになったように、脂肪化が初めて認められた2日目と、脂肪化がやゝ増強している8日目の、それぞれ異なった時期のTH群と対照

群について、 ^{35}S -GSHの生体内分布を経時的に比較検討した。ただし、2日目と8日目とは投与した ^{35}S -GSHの量が多少異なり、取り出した時間および臓器が一部異なっている。

1) 2日目の実験

実験開始後丸2日たった時点でTH群、対照群に各々 ^{35}S -GSH $1\mu\text{Ci}$ 、非放射性GSH 4mg を腹腔内に注射した。1群を5匹とし、注射後5'、15'、30'、60'、120'、240'目に断頭致死させ、肝臓、腎臓、脾臓、肺臓、副腎、小腸などの一部または全部を摘出した。これをスライドグラスに乗せ、真空ポンプに連結したふ卵器の中で3日間十分乾固させた。その後、その一定量を試料皿にとり、局方硝酸を滴下し、赤外ランプ下で融解させ、途中水を滴下し希釈させた。適量になったところで、試料皿にそれよりやや小きめのろ紙を入れ、平均にわたるように吸着させた。これを十分乾燥させ、ガスフローカウンターで測定した。

2) 8日目の実験

実験開始後8日たった時点でTH群、対照群に各々 ^{35}S -GSH $2\mu\text{Ci}$ 、非放射性GSH 4mg を腹腔内に注射した。1群を4匹とし、注射後30'、60'、120'、240'目にエーテル麻酔を行い、心より脱血致死させ、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、小腸、脳などを一部または全部摘出し、以下1)と同じ処置を施し測定した。

2 実験成績

1) 2日目の実験成績

2日目の ^{35}S -GSHおよびその代謝産物の諸臓器における分布は、表6・図3・4から明らかのように、臓器別濃度では副腎が最も高く、肝、腎がこれに次ぎ小腸、肺、脾臓は余り差がない。また臓器別の濃度順位、経時的傾向は、TH群、対照群の区別なく類似している。細部にわたってみると、副腎、腎臓、肝臓などは両群とも60'値が最高値を示している。小腸は両群とも時間がたつに従って増加して行く傾向がみられる。脾臓はこれと反対に時間と共に僅かに減少して行く傾向がみられ、5'値が最高である。肺臓は対照群が時間の経過と共に増量して行く傾向がみられたが、TH群では僅かな増減を認めるにすぎない。両群の経時的濃度については、肝臓を除きほぼ近似の値を示している。肝臓は5'、15'値とも両群にあまり差異を認めなかったが、30'、60'値では危険率が0.5%で有意であり、TH群が対照群より明らかに低い値を示した。

2) 8日目の実験成績

8日目の実験成績は表7・図5・6から明らかのように2日目の成績と同じく、両群とも臓器別の濃度順位、経時的傾向についてはほぼ類似している。細部にわたってみると、5'、15'値を欠くが、副腎、肝臓などは60'値が最高である。腎臓は1)と異なって対照群は60'値が最高であるが、TH群は30'値が最高値を示し、時間と共に低下している。肝臓の

表6 腹腔内注射法による ^{35}S -GSHの体内分布について
(実験開始後丸2日目)

	肝 臓	腎 臓	副 腎	小 腸	脾 臓	肺 臓
TH 使用 群	5'	5.3±1.0	10.3±1.7	15.7±7.2	11.4±2.7	7.4±1.2
	15'	12.1±1.1	21.8±3.5	23.1±4.6	13.1±2.3	10.0±1.8
	30'	16.3±1.2	24.9±1.4	30.8±8.6	13.4±2.3	8.2±1.9
	60'	16.7±2.8	27.3±2.8	35.9±2.9	17.7±2.0	9.3±1.7
	120'	16.3±2.1	25.0±3.0	29.2±6.2	13.0±2.9	10.0±2.2
	240'	12.3±1.6	15.7±3.8	18.7±2.9	17.1±1.6	6.6±1.2
対 照 群	5'	2.8±0.9	9.0±1.8	17.5±3.9	11.5±4.8	6.8±2.6
	15'	16.4±2.8	21.6±2.2	24.2±6.8	12.9±1.4	9.3±0.4
	30'	27.6±3.2	28.3±4.8	36.4±3.6	12.7±2.5	9.0±2.4
	60'	28.0±1.8	30.2±2.1	40.1±2.9	12.3±2.8	10.6±0.7
	120'	18.0±4.0	21.1±6.3	26.9±8.0	15.6±2.2	12.1±1.8
	240'	13.1±1.5	13.8±3.2	18.4±4.2	13.7±1.3	7.9±1.1

※臓器1mg当りの計数率、測定時間5分

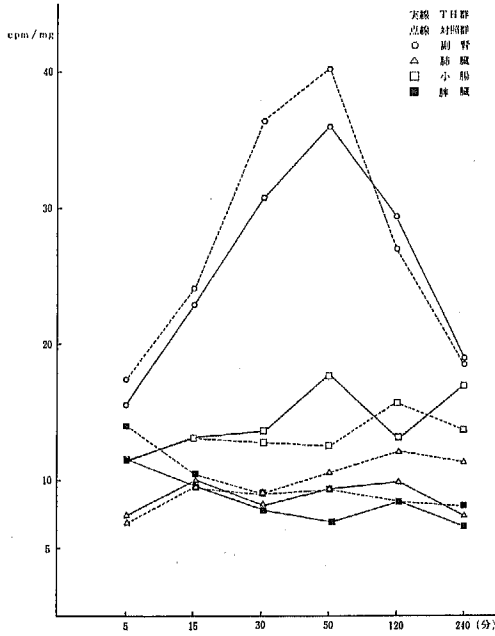


図3 腹腔内注射法による³⁵S-GSHの体内分布 (2日目)

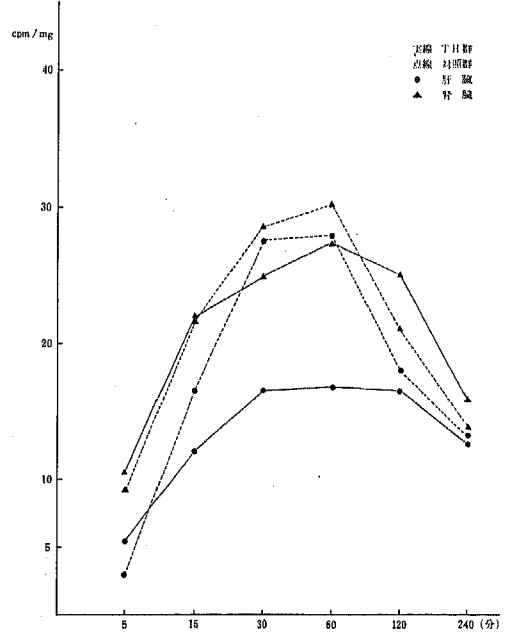


図4 腹腔内注射法による³⁵S-GSHの体内分布 (2日目)

場合30'~120' 値は対照群の方がや、高いが、腎臓の場合はその逆で、TH群の方が高い値を示した。脳は他の臓器と比べ、その値が著しく低く、GSHのとりこみが悪いことが明らかになった。

実験Ⅲ ラットのTH脂肪肝に対するGSHの影響について

TH含有配合飼料によってもたらされる肝の脂肪化が、毎日GSHを腹腔内に注射することによりいかなる影響を受けるか、次に示す4群の総脂質量、

2核細胞についてその影響の有無を調べた。

1 実験材料および方法

実験1と同じラットと飼料を用いた。実験グループは次の4群である。

- A群 13匹, 0.3% TH含有飼料で飼育, 蒸留水を0.4ml腹腔内に注入
- B群 14匹, 0.3% TH含有飼料で飼育, 0.1% GSH溶液を0.4ml腹腔内に注入
- C群 14匹, 0.3% TH含有飼料で飼育, 1%

表7 腹腔内注射法による³⁵S-GSHの体内分布について (実験開始後丸8日目)

	肝臓	腎臓	副腎	小腸	脾臓	脳	
TH使用群	30'	41±5	72±9	79±7	43±2	48±5	3±0
	60'	51±1	69±8	97±11	59±9	50±7	4±1
	120'	49±3	64±6	80±9	52±11	46±3	5±1
	240'	43±7	59±4	67±16	52±10	42±7	5±1
対照群	30'	48±5	61±16	78±6	51±16	50±5	4±1
	60'	54±8	65±4	92±22	49±2	48±3	6±2
	120'	52±1	63±10	89±26	65±2	50±8	5±0
	240'	36±7	64±3	85±24	63±4	52±2	6±2

※臓器1mg当りの計数率, 測定時間1分

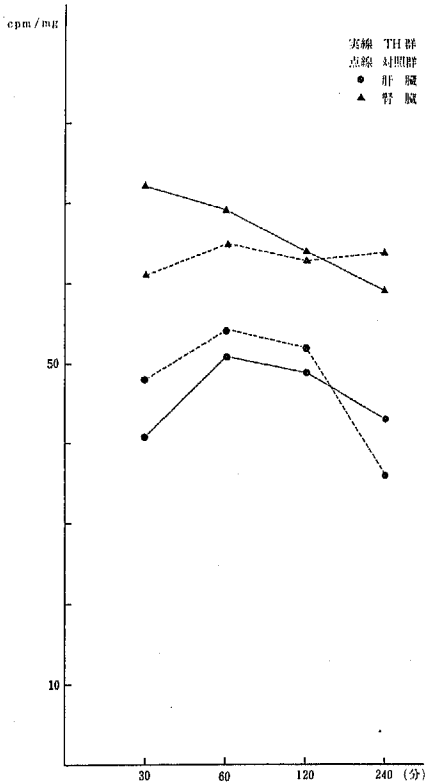


図5 腹腔内注射法による³⁵S-GSHの体内分布 (8日目)

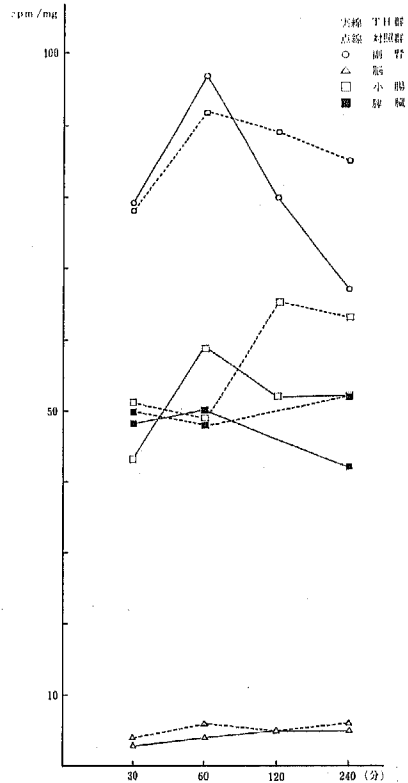


図6 腹腔内注射法による³⁵S-GSHの体内分布 (8日目)

GSH 溶液を0.4ml腹腔内に注入

D群 14匹, THを含まぬ飼料で飼育, 蒸留水を0.4ml腹腔内に注入

ラットを無作為にA, B, C, D群に分け, 個々別々に飼育した。薬物を含め, 摂取する飼料量をできるだけ等しく, しかも, 飢餓による死亡を防ぐために次のような工夫を行った。wet weight 3gの飼料を作り, これを乾固する。このうちTHを含まない配合飼料を1週間, 朝晩の2回に分けて投与した。この方法によってラットは飼い慣らされ, 投与直後より飼料を盛んに食べるようになった。その後, A, B, C群にTH含有配合飼料を, D群にTHを含まない飼料を与え, これにより摂取量を均一化することができた。水は自由に飲めるようにした。腹腔内注射は毎日午後6時に行い, 飼料の投与は午後8時と午前8時に行った。この方法により8日間飼育し, 24時間絶食後午後8時に断頭致死させ, 外側右葉と外側左葉を摘出した。外側右葉は総脂質

量を, 外側左葉は2核細胞数の測定に用いた。

a) 2核細胞数について

尾持ら(7)の細胞分離永久標本作製法に従って肝細胞の分離標本を作った。すなわち, 摘出した肝切片の一部約50~80mgを1mm³程度の大きさに細切れにし, ストマイの空瓶に入れられたRanvier 1/2アルコールに浸す。数時間後, 直径5mmの硝子玉を4個入れ, 振盪機で5分間強く振盪する。ガラス玉を除き, 内容物をシュピッツグラスに移し, 500回転で1分間遠沈する。その上清を再び他のシュピッツグラスに移し, 1500回転2分間遠沈した。上清を全部捨て, 沈渣に次の組成, すなわち, 蒸留水17.0ml, 卵製アルブシン0.4g, デヒドロ酢酸ナトリウム0.4g, 水飴13.0mlからなる固着液を1~2滴滴下し, 良く混和した。これを血液の塗抹標本のようにスライドグラスに塗抹した。ホルマリン固定後, アルコール系列に通し, ハマトキシリンエオジン複染色を施し, パルサムで封じた。以上の方法で作られた標本を鏡検し, 細胞数1000個をえ,

そのうちの2核細胞数を記載した。

b) 総脂質量について

肝の総脂質量は Folch ら(8)の方法に従って測定した。

試薬

A 液 クロロホルムとメタノールを2:1の割合に混じたもの

B 液 クロロホルム, メタノール, 水 を8:4:3の割合に混じ, 分液ロートで上相を分離し, B液とする

肝切片に肝の wet weight 20倍量のA液を加え, 3分間ホモジナイズし, 30分間放置後ろ過する。さらにその残渣にA液2mlを加え, ホモジナイズし, ろ過する。以上のろ液を合せ, 1/2量の水を加え, 静かに混和し, 10分間放置後2500回転20分間遠沈する。これにより粗抽出液は2相に分離され, その上相を途中までサイフォンで除去し, 残りをピペットで吸いとる。少量のB液を静かに管壁に伝わらせ, これを再びピペットで吸いとる。これを3回反復し, 非脂溶性の部分除去した。以上の操作後, 残りを十分乾燥させ, 総脂質量を測定した。

2 実験成績

a) 2核細胞数について

1) A群, B群, C群間の有意差の検定

TH含有飼料で飼育し, 2種類の濃度のGSHを使用した時の影響をみる。

表8 肝細胞1000個中の2核細胞数

	A 群	B 群	C 群	D 群
1	307	252	334	488
2	240	262	389	541
3	280	341	376	572
4	205	315	223	431
5	380	315	249	461
6	238	276	300	563
7	368	193	320	590
8	360	346	259	594
9	335	355	319	304
10	297	241	279	570
11	251	312	418	606
12	307	259	374	513
13	363	344	343	520
14		228	297	592

表9 TH群間の2核細胞数の変動に関する分散分析表

要因	変動(平方和)	自由度	不偏分散
級間	7083.73	2	3541.87
級内	112064.27	38	2949.06
総変動	119148.00		

級間, 級内不偏分散比

$$F = \frac{3541.87}{2949.06} = 1.20$$

自由度 $n_1 = 2$ $n_2 = 38$

F分布表より $F < F_{38}^2 (0.05)$

したがってA群, B群, C群間に差があるとは云えない。

ロ) A群, B群, C群, D群間の有意差の検定

TH群と非TH群間の差をみる

表10 TH群と非TH群の2核細胞数の変動に関する分散分析表

要因	変動(平方和)	自由度	不偏分散
級間	519775.90	3	173258.63
級内	201343.48	51	3947.91
総変動	721119.38	54	

級間, 級内不偏分散比

$$F = 43.89 \quad n_1 = 3 \quad n_2 = 51 \quad F > F_{51}^3 (0.01)$$

したがって有意差あり, TH群と非TH群間には著しい差がみられる。

b) 総脂質量について

表11 肝重量1g中の総脂質量

	A 群	B 群	C 群	D 群
1	60mg	60mg	49mg	42mg
2	59	64	64	42
3	52	51	69	46
4	49	61	43	44
5	63	50	66	45
6	49	61	59	47
7	61	76	76	44
8	66	68	68	43
9	46	50	68	41
10	64	49	56	43
11	59	57	69	50
12	46	65	49	50
13	58	60	55	42
14		80	63	47

肝重量は wet weight である

イ) A 群, B 群, C 群間の有意差の検定
TH 含有飼料で飼育し, 2 種類の濃度の GSH
を使用した時の影響をみる。

表12 TH 群間の総脂質量の変動に関する
分散分析表

要因	変動(平方和)	自由度	不偏分散
級間	183.75	2	91.88
級内	2970.20	38	78.16
総変動	3153.95	40	-

級間, 級内不変分散比

$$F = 1.18 \quad n_1 = 2 \quad n_2 = 38$$

$$F < F_{38}^2 (0.05)$$

したがって 3 群間に有意差ありとはいえない。

ロ) A 群, B 群, C 群, D 群間の有意差の検定

TH 群と非 TH 群間の差をみる

表13 TH 群と非 TH 群の総脂質量の変動に
関する分散分析表

要因	変動(平方和)	自由度	不偏分散
級間	2439.05	3	813.02
級内	3081.06	51	60.41
総変動	5520.11	54	-

級間, 級内不変分散比

$$F = 13.16 \quad n_1 = 3 \quad n_2 = 51$$

$$F > F_{51}^3 (0.01)$$

したがって TH 群と非 TH 群間に著しい差が認められた。

以上の成績から肝障害時には肝 2 核細胞が減少することを確認した。また, TH 群の中では合成 GSH 腹腔内投与群と非投与群における肝 2 核細胞の間には有意の差は認めなかった。総脂質量は TH 群が非 TH 群より有意差をもって増加しているが, TH 群で合成 GSH 投与群と非投与群の総脂質量を比較してみても, 特に有意差はえられなかった。

総括ならびに考按

GSH は γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine の 3 個のアミノ酸より成る tripeptide で, 生物界に広く, しかも大量に存在する。その分子の中には, 非常に反応性に富む SH 基を有し, 多くの酵素反応に様々な機構で関与し, 生理的意義はきわめて多彩である。早石ら(9)はこれを作用機構の面から分類し, SH 基の酸化還元に基づく作用形式と, 酸化還元に関係のないものに大別している。酸化還元と無関係に関与するものとして, glyoxalase 反応のような助酵素的な働きをするものと, BSP の GSH 抱合にみられるような, 外来性の芳香族ハロゲン化物のメルカプツール酸形成による解毒機構がある。酸化還元反応を通じて GSH が関与するものとしては, 生体内に非常に多い SH 酵素の保護がとりわけ重要である。

一方, 生体に投与された薬物の多くは, 主として肝で酸化, 還元, 抱合あるいは加水分解などの代謝, 解毒を受けて排泄されることはよく知られている。このことは, 肝には GSH をはじめとして多くの薬物代謝酵素系が存在し, 活発な代謝活動が行われていることからもうかがえるし, 反面, 薬物中毒による臓器障害も, とくに肝で起り易いことも関連している。

今回の実験の目的の 1 つは, TH 肝障害時の肝 GSH 濃度の変化を, 肝組織像との関連において追求することであり, さらに, TH 肝障害への合成 GSH のとりこみの度合, ならびに肝障害の進展に, いかなる影響を及ぼすかについて検討を試みた。今回用いた量の TH では, 投与 2 日目以後に肝組織に明らかな小葉中心部の脂肪化や, 後述する肝 2 核細胞の減少など, 肝障害を示す所見が得られている。肝 GSH 濃度については, TH 投与第 1 日目は減少がみられたが, 2 日目以後, すなわち肝の組織学的変化の発現とほぼ時を同じくして, かえって著明な増加が認められている。この量の TH 投与では, 明らかな全身中毒症状はみられなかったが, 予備実験で 2 倍量の TH を投与した群では, 投与後まもなく食餌摂取が著明に減少し, 比較的すみやかに死に至るものがみられた。したがって, 今回得られた成績は, TH 自身の肝障害について得られたものと考えられ, 全身中毒に付随した低栄養, 循環不全などにもとづく二次的な肝障害によるものでないと推察している。

体内の GSH 濃度は, 一般の代謝位相の変動, あるいは外部環境の変化を介する自律神経, あるい

は内分泌系の影響などの因子によって、きわめて変動しやすいものとされている。四塩化炭素、エチオニンなどの肝臓毒投与時の肝 GSH 濃度の変化については、いくつかの報告がなされているが、前者については低下するものが多く、後者については上昇するものが多いが、一致した見解は得られていない。もちろんこの理由として、薬物の種類、投与量及び方法、被験動物の種族差、薬物投与と肝 GSH の測定との時間的差異などが考えられる。

これに関連した主要な論文をあげてみると、四塩化炭素 (CCl₄) については、ラットを用いた安福¹⁰の実験がある。彼女は CCl₄ の急性肝障害時に、肝ならびに血液 GSH 濃度がはじめの 2~3 日間は低下し、以後回復したと述べている。佐々木ら¹¹は、マウスの CCl₄ 急性肝障害、ウサギの CCl₄ 慢性肝障害で、いずれも肝 GSH が低下し、しかも外来性の GSH を併用すると、CCl₄ による肝 GSH の低下が防がれるのみならず肝機能の 1 つの指標とも考えられているアセチル化能やコレステロールのエステル化能も正常値に近づくと述べている。これに反し、青山¹²は、安福や佐々木らより、多量の CCl₄ を用いて、ラットに急性肝障害を起しているが、肝 GSH は上昇したと述べている。また Shaker¹³ は少量の CCl₄ では低下し、大量では上昇するといふ、成績は一致していない。

一方、エチオニンでは、Hsu ら¹⁴によると、100 mg/kg の 1 回投与による急性肝障害のさいに肝 GSH は、初めの 5 時間まで著減し、24~48 時間では正常値より 60% も上昇したと報告している。彼らはこのような変化の説明として、次のように述べている。すなわち、5 時間目にみられる肝 GSH 濃度の低下は、肝における GSH 合成の抑制、異化作用の亢進によるものであり、肝内エチオニン濃度の低下とともに、かえって、この低濃度の毒物が刺激となって、GSH の産生が亢進し、肝 GSH 濃度の上昇がくると推論している。Calcutt¹⁵ もエチオニン 0.2% 含有飼料でラットを飼育したところ、2 日目より肝 GSH 濃度の上昇がみられ、4 日目より肝組織に脂肪の蓄積が認められ、肝 GSH 濃度が持続的に高い状態で有糸分裂と脂肪化とが周期的変化を示していることを明らかにしている。

その他の薬物の肝 GSH に対する作用についての報告をみると、Neish ら¹⁶ は発癌性のアゾ色素を使用して、24 時間目に著明な肝 GSH の上昇を認めている。丸山ら¹⁷ もアゾ色素含有飼料でラットを飼育した時、肝 GSH 濃度の上昇が認められ、これ

に酸化型グルタチオン (GSSG) の減少と glutathione reductase 活性の上昇が伴うことを明らかにした。このようなアゾ色素の作用は、phenobarbital や methylcholanthrene のような肝代謝系を促進させる物質の投与でもみられ、この反応と類似のものであろうと推論している。このような反応は鵜胎仔に As₂O₃ を投与した稲田¹⁸、INAH を投与した山崎¹⁹ の実験でもみられており、肝障害と肝 GSH 濃度の変化との間には、重要な関連があることが示唆されている。漆畑ら²⁰ は各種の肝胆道疾患患者の針生検材料について、肝 GSH 量を測定したところ、肝実質障害が認められる症例では、むしろ増加の傾向がみられたと興味ある成績を報告している。

ところで、TH 肝障害時の肝 GSH 濃度の動向については報告がみあたらないが、山村、伊藤ら²¹ はラットを 0.2~0.3% TH 含有飼料で飼育すると、1 週間後には、肝の総脂質量は対照の約 2 倍に増量すると述べている。また井上ら²² は、TH により、NADPH₂ の増量をもたらすところの G-6-PDH 活性の上昇がみられるが、P-450 の増量を伴わないことから、ミクロゾームの電子伝達系による NADPH₂ の利用促進は考えがたく、NADPH₂ は主として脂肪合成に利用され、これが TH 脂肪肝の成因の 1 つではないかと推測している。TH の体内での代謝過程については、十分明らかにされていないが、その大部分は代謝され、3 種類の dihydropyridines、すなわち carbamoyl, thiocarbamoyl, s-oxocarbamoyl にまで分解されて尿中に排泄される。これらの代謝的变化は、主として肝で行われると推察される。このことは、結核患者で TH 療法中に肝障害がみられることが稀でないことからもうかがわれる。実際に、ヒトの TH 肝障害時には血中 GOT, GPT 値の上昇、肝生検でも小葉中心部の円形細胞浸潤、肝細胞の破壊などの肝実質障害の所見がみられることがよく知られている。著者がラットでつくった TH 肝障害時に、漆畑らが観察している肝実質障害時の肝 GSH の増加と同様の傾向にあったことは、興味深いことと思われる。肝内での TH 代謝酵素系と GSH との直接的な関連は、今後明らかにされる問題であろうが、TH 障害時の GSH 濃度の変動は、肝が暴露される TH 濃度の推移、時間的な経過に密接な関係があると思われる。前記 Hsu らは少量のエチオニンによる慢性的刺激で、GSH の合成が亢進されると推論しているし、また丸山らのアゾ色素投与後の肝 GSH の増加のさいも、

GSSG の低下と glutathione reductase 活性の上昇を認めることから、この肝 GSH の上昇は、GSSG から GSH への還元作用の促進にもとづくことも考えられる。著者の実験で、TH 投与第 2 日目以降にみられた肝 GSH の増加は、TH 自身の肝細胞に対する慢性的刺激によってもたらされた、合成の促進による可能性が考えられる。しかしながら、肝障害時には肝 GSH の利用の低下も考えられ、これによる受動的な上昇も否定できないので、更に検討を要する問題と思われる。

肝機能と 2 核細胞の関係については、Münzer²², Pfuhl²³ 以来多くの研究がなされている。著者の実験では、TH 脂肪肝と 2 核細胞の関係、TH 脂肪肝でみられる 2 核細胞の減少と肝総脂質量の増加が、合成 GSH の投与でいかなる影響を受けるかについても検討を試みた。ここでこの問題に関連した主要な研究を概観し、著者の実験成績との関連を論じてみたい。

Münzer は動物の生理的条件によって、2 核細胞数は変動し、無糸核分裂は細胞の変性の徴候でもあるとしている。また Pfuhl は有糸核分裂による肝の大核細胞の形成を推定し、大核細胞と多核細胞とは互に移行し得るものであり、多核細胞になることにより核の表面積が増し、物質代謝の亢進に有利であると考えている。和田は²⁴各種条件下で 2 核細胞数の変動をしらべ、その変化は肝細胞自体の生活現象の 1 つの指標であるが、蛋白質の増加により増数し、細胞の退化とともに減少を示すと述べている。尾持ら²⁵によると、肝 2 核細胞は無糸核分裂により生ずるもので、逆に癒合によって 1 核にもどるといふ、活発な日内変動を起していることを明らかにしている。薬物による肝 2 核細胞数の変化については、Nagata²⁶は発癌性物質として知られている para-dimethyl-amino-azobenzol (DAB) による 2 核細胞数の減少を、百瀬²⁷は胆汁分泌亢進作用をもつといわれる benzyl-imidazoline、平野²⁸は dehydrocholic acid、ursodesoxycholic acid による 2 核細胞の増加を報告している。また、彼²⁸は CC₁₄ 肝障害時に 2 核細胞が減少することも認めている。著者は TH 投与群で、対照群に比し、明らかに 2 核細胞数の減少を認め、前記 Nagata、平野の成績と同じように、肝障害時には、肝 2 核細胞が減少することを確認し得た。この実験で、2 段階の量の合成 GSH をラットの腹腔内に毎日 1 回、8 日間連続投与し、最終注射時の 24 時間間に TH 群の 2 核細胞数を未処置 TH 群のそれと比較したところ、特に有意な差をみることができなかった。また、同時に行った TH 投与による

肝脂肪蓄積を、合成 GSH 投与群と非投与群について比較してみても、とくに有意差は得られなかった。この成績は前記山村らが、ラットの腹腔内に毎日 GSH を投与して、TH 脂肪肝の進展を阻止したという報告と一致しない。さらに彼らは、TH 脂肪肝の発現は GSH のほかに phosphoryl-choline、CDP choline のような choline 系物質、あるいは betaine のような薬剤、cystidine、uridine のような核酸系の物質、あるいは pyridoxal-phosphate などの投与によっても抑制されると述べている。このことからみても GSH の投与が特異的に TH 肝障害に予防的、治療的効果をもつかどうか明らかでない。合成 GSH を生体に投与した時、内因性の GSH と全く同様な生理的作用をもち、生体の代謝系に關与するかどうか、今後解明されるべき問題であろう。この点を解く 1 つの手がかりとして、また今回の実験で観察された TH 肝障害時の肝 GSH 濃度の上昇が、肝による GSH の取りこみの増加にも関連があるかどうかを検討するため、³⁵S-GSH の肝への取りこみを TH 投与群と非投与群について比較してみた。

著者は³⁵S-GSH をラットの腹腔内に注射し、各種臓器について経時的にその活性を測定したところ、高橋²⁹、清野ら³⁰と同じように活性の分布に大きな差がみられ、その放射活性は、清野らと同じように副腎、腎に高く、これに肝が続き、臓器別にみた内因性の GSH の濃度順位と必ずしも一致しない。水晶体は肝と共に GSH を多量に含み、白内障との関係が論じられているが、高橋らは全身オートラジオグラフィ法で³⁵S-GSH の分布を調べたところ、ガラス体と共に水晶体には殆ど活性が認められないことを明らかにしている。また赤血球への GSH のとりこみについては、中尾ら³¹は微弱ながら GSH 自体が摂取されることを認めているが、上原ら³²は殆ど赤血球に入らなかったと述べている。このように臓器及び組織の GSH 濃度と³⁵S の放射活性値の度合とは必ずしも一致しない。上原らは CC₁₄ による肝障害に³⁵S-GSH を静注し、その取込みを対照群と比較し、大差はみられなかったが、血漿中よりの消失速度は、CC₁₄ 中毒ラットの方が遅かったと述べている。著者の実験によれば 2 日目では、肝の放射活性は TH 群の 30', 60' 値が非 TH 群より明らかに低く、肝以外については TH 群と非 TH 群の間にあまり差異はみられなかった。このことは、TH が主として肝を障害することから興味ある点である。また 8 日目では、両群にはそれほど大きな差異はみられなかったが、TH 群のほうが肝の放射活性

が低く、腎は逆に高い値を示した。また高橋らによれば、肝の放射活性のうち、投与後3時間目ではその70%はGSHであったと述べている。これらのことから、THによってもたらされた肝GSH濃度の上昇は、合成GSHの取込みの亢進を必ずしも伴うものではないことが推察された。また、 ^{35}S -methionineあるいは、 ^{35}S -cystineの肝への取込みを研究したPutrichら³⁴は、エチオニン、 CCl_4 、brombenzeneによる急性肝障害時に取込みの低下がみられることを述べている。このように著者の成績ならびに諸家の報告からみて、肝実質障害時に合成GSHの取込みの低下が考えられ、このことは障害肝での合成GSHの利用の減退を示唆するものと思われ、これにより著者の実験でTH肝障害の発現にGSHの投与が予防的ないし治療的効果を示さなかったことを説明できると思われる。

結語

Ethionamide (TH) を経口投与することにより、ラットに急性肝障害を生じせしめ、障害時における肝GSH濃度の推移、障害肝への ^{35}S -GSHの取込みの度合、ならびに合成GSHの肝2核細胞数、総脂質量に対する影響について対照群と比較検討を行った。

- 1) 肝GSH濃度は、TH経口投与後丸1日目に軽度の低下をみたが、丸2日目より有意をもって対照群より上昇した。また2日目より小葉中心部に脂肪化が認められた。
- 2) 障害肝への ^{35}S -GSHの取込みは、丸2日目、丸8日目とも対照群より低下している傾向がみられた。肝以外の臓器への ^{35}S -GSHの取込みは両群の間に殆ど差異を認めなかった。
- 3) 肝2核細胞数は、TH群が有意をもって非TH群より減少していた。
- 4) 総脂質量は、TH群が非TH群より有意をもって増加していた。
- 5) TH肝障害群における肝2核細胞数の減少、および総脂質量の増加は、合成GSHの投与により、認むべき有意の影響を示さなかった。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜りました恩師戸塚忠政教授に深謝致しますと共に種々御助言御教示頂きました草間昌三助教授、伊古見文雄講師、望月一郎講師に感謝致します。また実験中御親切な御助言いただきました本学第1解剖学教室永田哲士助教授、放射線医学教室清野邦弘助手、生化学教室の諸先生方に深謝致します。

文 献

- 1) 堂野前維摩郷：1314 THの問題，結核，37：349～353，1962
- 2) 伊藤文雄，早野和夫：抗結核薬の副作用発現機序とその対策，日胸，23：439～444，1964
- 3) 伊藤文雄：二次抗結核剤の副作用と対策，最新医学，21：110～116，1966
- 4) 峰下鉄雄，林裕造，上田元彦，古川仁： α -ethylthioisonicotinamide 1314THと α -n-propylthioisonicotinamide 1321 THの毒性及び一般薬理作用の比較，最新医学，22：2042～2052，1967
- 5) PATTERSON, J. W. and LAZAROW, A. : Determination of glutathione, Meth. biochem. Anal. , 2 : 259～278, 1955
- 6) COHN, V. H. and LYLE, J. : A fluorometric assay for glutathione, Analyt. Biochem. , 14 : 434～440, 1966
- 7) 尾持昌次，永田哲士，島村和夫，小野沢実：細胞分離永久標本作製法，解剖誌，33：20～23，1958
- 8) FOLCH, J. , LEES, M. and SLOANE STANLEY, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, J. Biol. Chem. , 226 : 497～509, 1957
- 9) 早石修，市山新：グルタチオン研究の進歩，p.1, 診断と治療社，東京，1969
- 10) 安福慶子：肝臓疾患，糖尿病時のグルタチオンの態度とこれに及ぼすビタミンの影響に関する臨床的並びに実験的研究，名古屋医学，82：1100～1127，1960
- 11) 佐々木竜象：グルタチオンの臨床的応用，大阪大医誌，11：3545～3565，1959
- 12) 青山六弥：四塩化炭素負荷ラットの臓器還元glutathioneに及ぼすglucuronic acidの影響，昭医誌，20：1011～1023，1960
- 13) SHAKER, M. and SOLIMAN, M. K. : Distribution of glutathione in the blood and internal organs of white mice under physiological and toxic conditions, Indian J. Exp. Biol. , 4 : 176～178, 1966

- 14) HSU, J. M., BUCHANAN, P. J., ANJ-LANE, J. and ANTHONY, W. L. : Hepatic glutathione concentrations linked to ethionine toxicity in rats, *Biochem. J.*, 106 : 639~643, 1968
- 15) CALCUTT, G. : Sulphydryl levels of the liver and Kidneys from rats fed di-ethionine, *Brit. J. Cancer*, 15 : 683~686; 1961
- 16) NEI SH, W. J. P., DAVI ES, H. M. and REEVE, P. M. : Carcinogenic azo dyes, dye-binding and liver glutathione, *Biochem. Pharmacol.*, 13 : 1291~1303, 1964
- 17) 丸山悦子, 三浦捷子, 東胤, 坂本幸成 : Glutathione 及び Glutathione 還元酵素の生理的意義, 日本癌学会25回総会記事 : 53~54, 1966
- 18) 稲田謙三 : 砒素化合物の鵝胎仔 Glutathione に及ぼす影響, 日薬理誌, 55 : 755~791, 1959
- 19) 山崎雅治 : Isonicotinyl hydrazide 及び sodium glucuronate isonicotinyl hydrazone の鵝胎仔 glutathione 代謝に及ぼす影響, 昭医誌, 20 : 1309~1325, 1960
- 20) 漆畑勲, 前田耕治, 中川潤, 伊藤憲一 : BSP 代謝に関する臨床的並びに酵素学的研究第3報, 針生検材料による BSP 抱合酵素活性の測定と肝内グルタチオン定量, 日消誌, 63 : 458, 1966
- 21) 井上豊治, 和知勤 : ethionamide による脂肪肝の発現機序に関する実験的研究, 結核, 44 : 123~130, 1969
- 22) MÜNZER, F. T. : Experimentelle Studien über die Zweikernigkeit der Leberzellen, *Arch. mikr. Anat.*, 104 : 138~184, 1925
- 23) PFUHL, W. : Die mitorischen Teilungen der Leberzellen im Zusammenhang mit den allgemeinen Fragen über Mitose und Amitose, *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 109 : 99~133, 1938
- 24) 和田 寛 : 2 核性肝細胞に就ての実験的研究, 和歌山医学, 10 : 501~509, 1959
- 25) 尾持昌次, 永田哲士, 百瀬節生 : ラッテ肝臓細胞核分裂数の時間的変動及び二核細胞の運命について, 解剖誌, 32 : 416~422, 1957
- 26) NAGATA, T. ; Effect of DAB administration upon the cell division in the Hepatic cells of rat, *Med. J. Shinshu Univ.*, 4 : 457~468, 1959
- 27) 百瀬節生 : 肝細胞の無糸核分裂に関する研究II, 薬物投与による細胞分裂数の変動, 解剖誌, 34 : 205~210, 1959
- 28) 平野 格 : 利胆剤の肝細胞分裂に及ぼす影響(1), 信州医誌, 13 : 435~441, 1964
- 29) 平野 格 : 四塩化炭素による急性肝障害の肝細胞核分裂に及ぼす影響, 信州医誌, 14 : 304~314, 1965
- 30) 高橋忠男, 佐藤善重 : 全身オートラジオグラフィによる放射性化合物の生体内分布に関する研究 (第11報) ^{35}S - glutathione のマウス体内分布, *RADIO ISOTOPES*, 17 : 9~17, 1968
- 31) 清野邦弘, 坂本良雄, 渡辺俊一, 大畑武夫, 春日敏夫 : グルタチオンの放射線防護作用— ^{35}S -還元型グルタチオンの turnover—, 日本医放会誌, 28 : 1642~1646, 1969
- 32) 中尾喜久, 服部理男, 八幡義人 : 赤血球グルタチオンについて, グルタチオン研究の進歩, p94, 診断と治療社, 東京, 1969
- 33) 上原拓也, 倉元義人 : ラットにおける ^{35}S - glutathione の代謝に関する研究, 核医学, 4 : 70, 1967
- 34) PATRICK, R. S. and KENNEDY, J. S. : ^{35}S labelled amino acids in experimental liver disease, *J. Path. Bact.*, 88 : 107~114, 1964

(1971. 12. 15 受稿)