

肝障害時の脂質代謝に関する研究

第 2 編

四塩化炭素障害ラット肝におけるリノール酸およびγ-リノレン酸の アラキドン酸生成効果および脂肪肝抑制作用について

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂淳夫教授）

小 川 智 之

〔昭和46年3月20日受稿〕

I 緒 言

肝は物質代謝の中心であり、肝障害時の脂質代謝異常については多方面より研究されており、特にガスクロマトグラフィーの開発により脂酸レベルでの検討がなされている。肝疾患時の血漿脂酸構成についてはパルミトオレイン酸比率の著増、パルミチン酸およびオレイン酸比率の増加、リノール酸およびアラキドン酸比率の減少が報告されている。またリノール酸を投与するとリノール酸は増加するが、アラキドン酸の増加は認められず、リノール酸よりアラキドン酸への生体内転換過程に障害があることが考えられている^{1) 2)}。著者は第1編¹⁾において急性肝炎では肝機能検査が正常化したのちもパルミトオレイン酸比率はなお高値にとどまり、その比率の正常化は肝機能検査のそれより遅れること、アラキドン酸比率は急性肝炎急性期で減少傾向、回復期で減少を認めることを報告した。1957年 Mead ら³⁾はリノール酸よりアラキドン酸への転換過程を明らかにしたが、γ-リノレン酸はその中間代謝物質であり、γ-リノレン酸を投与すると迅速且完全にアラキドン酸に転換されることを報告した。またリノール酸などの高級不飽和脂酸は血清脂質の低下作用をもつことが知られており⁴⁻⁷⁾、Allmann ら⁸⁾はリノール酸の投与は肝内脂酸合成系酵素の活性を著しく減少させると報告している。

そこで著者はリノール酸およびγ-リノレン酸を無脂肪食飼育四塩化炭素障害ラットに投与し、リノール酸およびγ-リノレン酸のラット肝におけるアラキドン酸生成効果および脂肪肝抑制作用について、急性期高度障害群と回復期軽度障害群に分けて検討

し、肝障害時の脂酸代謝に及ぼす影響について知見をえたので報告する。

II 実験方法

平均体重 144.9±16.3g の Spargue-Dawley 系雄性ラットに表1の如き組成の無脂肪食を16g宛隔日に投与し、6週間飼育し平均体重 193.3±25.0g になった所で表2の如く6群に分け、図1の如く四

表1 無脂肪食

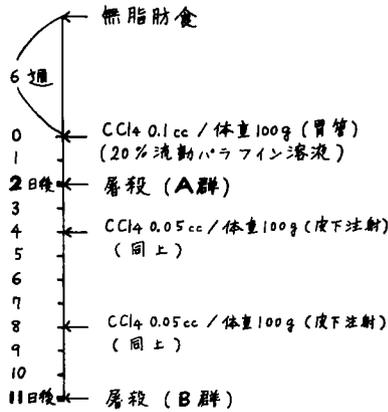
	重 量 比
ビタミンフリーカゼイン	16%
γ-セルロース	4%
蔗 糖	74
マツカラム塩	4
総合ビタミン	1
コリンクロライド	1

表2 無脂肪食飼育ラット

I 群	対 照
II 〃	リノール酸投与 (400mg/日)
III 〃	29.6%γ-リノレン酸投与 (400mg/日)
IV 〃	CCl ₄
V 〃	CCl ₄ +リノール酸投与 (同上)
VI 〃	CCl ₄ +29.6%γ-リノレン酸投与 (同上)

塩化炭素（以下 CCl₄ と略）は体重100gあたり0.1ccを20%流動パラフィン溶液として胃管にて投与し、4日および8日後その半量を皮下に注射した。同時にリノール酸エチルエステル（以下リノール酸と略）或いは29.6%γ-リノレン酸含有リノール酸エチル

図1 実験方法



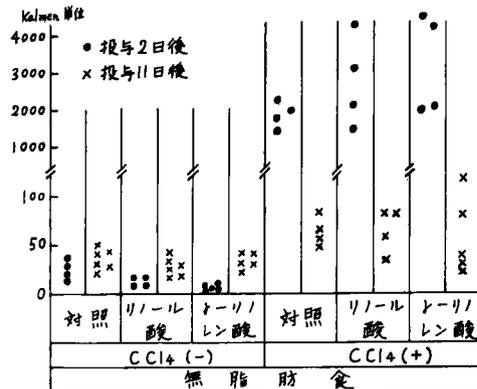
エステル (以下 γ -リノレン酸と略) を1日量 400 mg宛胃管にて連日投与し, 2日および11日後脱血屠殺し, 肝について脂酸量および構成比をガスクロマトグラフィーを用いて測定した. 使用ラットは各群共4乃至6匹であった (表4)

表4 ラット肝脂質分画脂酸量及び総脂酸量 (mg/g)
平均値±標準偏差

	ラット数	PL分画 脂酸量	TG分画 脂酸量	CE分画 脂酸量	総脂酸量	
A群	I	4	33.00±2.90	11.90±2.24	1.44±0.52	46.34±5.66
	II	4	29.34±5.24	14.89±2.85	0.86±0.02	45.09±8.11
	III	5	35.03±3.83	7.56±1.48	0.71±0.32	43.30±5.63
	IV	4	28.95±4.35	58.32±7.65	1.66±0.45	88.93±2.45
	V	4	26.15±1.55	31.42±9.37	1.64±0.27	59.21±1.19
	VI	4	25.88±2.56	46.68±6.90	2.01±0.39	74.57±9.85
B群	I	6	33.25±4.80	9.65±2.10	1.17±0.58	44.07±7.48
	II	6	27.89±4.61	12.63±3.05	0.67±0.21	41.19±7.87
	III	5	23.68±6.61	9.12±4.45	0.44±0.10	43.24±1.16
	IV	4	23.54±0.82	73.87±6.34	3.40±0.42	110.81±7.58
	V	4	24.54±1.59	28.12±2.90	0.81±0.29	63.47±4.78
	VI	5	21.96±4.37	38.00±4.38	1.23±0.38	71.19±9.12

投与された脂酸の構成比はリノール酸ではC₁₆: 0.1.3%, C₁₈: 17.3%, C₁₈: 291.4%であり, γ -リノレン酸ではC₁₈: 2.1%, C₁₈: 268.3%, C₁₈: 29.6%である. ラット血清GPT活性は図2の如くCCl₄投与2日後では1000Kalmen 単位以上の高度上昇を示したのに反し, CCl₄投与11日後では100Kalmen 単位以下の軽度上昇にとどまった. 組織学的にはCCl₄投与2日後では肝は中心性凝固壊死に陥っており, CCl₄投与11日後では肝細胞の壊死はみられるが前者

図2 ラット血清GPT活性



に比しきわめて少なく, 再生後もみられ, 血清GPT活性の変動とよく一致している. 以上にてCCl₄投与2日後の群を急性期高度障害群 (A群), CCl₄投与11日後の群を回復期軽度障害群 (B群)とした.

III 測定方法

a) 脂質抽出法

1gのラット肝をFolch法⁹にて脂質を抽出し, 0.73%食塩水にて水洗し総脂質を得, これを2.5ccのクロロホルムに溶かし, その1/5容を薄層クロマトグラフ法による検査に使用した.

b) 脂質各分画の分離

脂質各分画の分離には薄層クロマトグラフ法¹⁰を用いた. 0.05% Rhodamin 6G溶液にSilica GelH (Merck製)を2.5倍 (V/W)に溶かし, 厚さ0.3mm, 大きさ20×20cmの薄層平板をつくり, 150℃3時間活性化し, 0.5ccオズワルドピペットにて帯状にクロロホルム脂質抽出液の連続スポットをつくり, 展開液は石油エーテル:エチルエーテル:氷醋酸=87:13:1 (V/V/V)を用い, 30分間展開する. それにより原点より先端にかけて磷脂質, 遊離コレステロール, 遊離脂酸, 中性脂肪, コレステロールエステルの順に帯状に桃色の分離層がえられる. それらのコレステロールエステル (以下CEと略), 中性脂肪 (以下TGと略), 磷脂質 (以下PLと略)の帯をけずりとり, あらかじめヘキサンおよびエチルエーテル各10ccにて洗浄しておいた直径1cmの綿栓をほどとしたガラスカラムに入れる. ついでCEおよびTGはエチルエーテル, PLはメタノールそれぞれ10ccを用いて2回抽出する. その際の回収率はCE94.5%, TG89%, PL54.7%であった. ついで窒素ガス下にてエチルエーテルは40℃, メタノ

ールは65℃の水浴にてとばしCE, TG, PLを得た.

c) 脂酸メチル化の方法

脂酸メチル化は Sfoffel ら¹³⁾ の interesterification によった. すなわち 5%無水塩酸メタノール 5 cc と内部標準物質として 0.1mg のペンタデシル酸 (C¹⁵) を含有した脱水ベンゼン 0.5cc を 10cc の丸底アンプルに入れ封入後, 70℃の水浴中にて 3 時間メチル化する. 窒素ガス下 65℃の水浴にて溶媒をとばし, 石油エーテルにて再抽出し, 芒硝と重曹を 4:1 の割合で混和したものを小匙一杯程度入れ脱水中和する. ついで石油エーテル層をスピッツ試験管に移し, 窒素ガス下 40℃水浴にて石油エーテルをとばし, 得られた脂酸メチルエステルは窒素ガスを封入し deep freezer (-20℃) に保存し, 1 週以内にアセトンに溶かしガスクロマトグラフに注入脂酸分析を行った.

d) ガスクロマトグラフ法による脂酸分析, 脂酸分析は島津 GC-IC 水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフを用い, カラムは 3mm×3000mm, 充填剤は Diethyleneglycol Succinate 15% on Celeite 60/80 mesh, カラム温度 200℃, 検出器温度 240℃ 試料気化室温度 290℃, 空気 0.8kg/cm²にて測定した. 脂酸の同定は標準物質および保持時間と炭素数の分析によった. 脂酸構成比の計算は半値幅法にて行ない, 脂酸量は内部標準物質として用いたペンタデシル酸 (C¹⁵) のピーク面積より比例計算にて算定した¹²⁾.

$$\text{脂酸量 (mg/g)} = \frac{\text{脂酸のピーク面積}}{C^{15}} \times 0.1 \text{mg} \times \frac{5}{1} \times \frac{100\%}{\text{TLCの回収率 (CE 94.5\%, TG 89\%, PL 54.7\%)}}$$

IV 実験成績

1) アラキドン酸の生成について

アラキドン酸は表 3 に示す如く, ラット肝では大部分は PL 分面に含まれ, CE 分面にわずかに認められるが, TG 分面には存在しない. このことから投与されたリノール酸およびγ-リノレン酸は大部分 PL 分面に取り込まれ, 代謝されたものと考えられる.

PL 分面アラキドン酸構成比は図 3 の如く CCl₄ 非障害群では脂酸投与 2 日後既に対照に比しリノール酸群およびγ-リノレン酸群の順で増加し, 投与 11 日後にはそれぞれ約 2 倍および 3 倍の増加を示し, リノール酸に比しγ-リノレン酸ではアラキドン酸生成効果が有意に認められた. CCl₄ 障害群では投与

図 3 ラット肝磷脂質分面アラキドン酸構成百分比

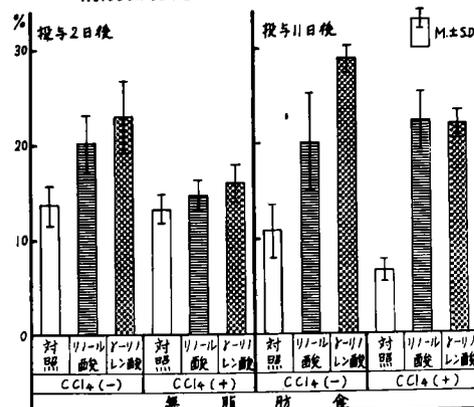


図 4 ラット肝磷脂質分面アラキドン酸量

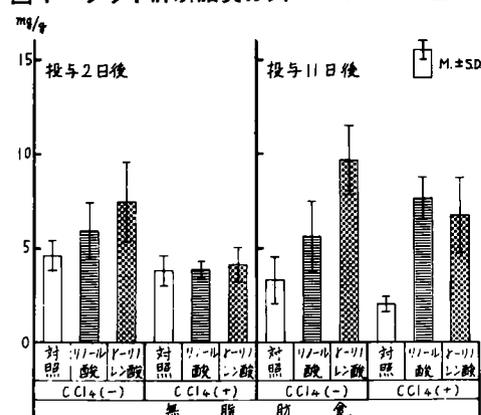


図 5 ラット肝 CE 分面アラキドン酸構成百分比

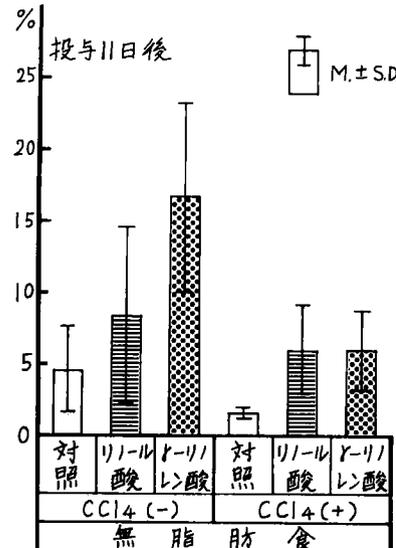


表3 ラット肝脂酸分画脂酸量 (mg/g) 平均値±標準偏差

		C 14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:4	
燻脂質分画	A 群	I 群	007±0.04	6.47±0.61	2.23±0.91	8.54±1.29	9.87±0.84	1.24±0.14	4.59±0.84
		II "	005±0.04	6.07±1.44	1.94±0.44	706±1.20	5.83±1.09	2.49±0.13	5.94±1.53
		III "	011±0.04	7.97±1.01	2.10±0.44	8.45±1.00	6.93±0.81	1.97±0.26	7.48±2.10
		IV "	009±0.05	7.09±1.24	1.81±0.84	7.15±1.09	7.82±1.54	1.17±0.48	3.82±0.83
		V "	009±0.03	6.18±0.77	1.08±0.12	7.13±0.36	5.19±0.74	2.63±1.03	3.88±0.46
		VI "	007±0.04	6.27±0.93	1.33±0.16	6.11±0.67	6.24±0.66	2.06±0.46	4.15±0.93
	B 群	I "	008±0.02	6.80±0.84	2.31±0.45	7.78±1.42	8.14±0.65	1.10±0.42	3.28±1.27
		II "	009±0.02	6.53±0.97	1.42±0.33	7.37±0.77	4.34±0.87	2.16±0.57	5.64±1.87
		III "	010±0.01	7.16±1.32	1.26±0.29	8.56±1.86	5.09±1.40	1.67±0.26	9.66±1.86
		IV "	010±0.03	7.12±0.38	2.52±0.24	7.20±0.39	9.88±0.33	0.73±0.26	1.96±0.39
		V "	010±0.05	7.43±0.82	1.56±0.39	8.56±0.51	6.06±0.88	2.42±0.80	7.55±1.16
		VI "	010±0.04	7.91±0.66	1.65±0.47	8.20±3.00	5.96±0.75	1.16±0.42	6.64±2.01
中性脂肪分画	A 群	I "	008±0.03	2.85±0.70	1.42±0.43	0.20±0.05	7.17±1.04	0.17±0.04	
		II "	011±0.06	4.68±1.62	1.71±0.55	0.27±0.05	7.75±0.73	0.40±0.22	
		III "	007±0.03	2.28±0.38	0.73±0.49	0.18±0.12	4.02±0.67	0.25	
		IV "	071±0.17	19.73±4.99	6.06±1.87	1.79±0.99	29.12±0.35	0.68±0.51	
		V "	033±0.10	8.07±2.42	2.92±1.60	1.33±0.28	16.26±5.38	2.27±0.95	
		VI "	067±0.31	13.88±5.00	4.92±2.95	1.47±0.27	24.06±8.41	1.56±0.39	
	B 群	I "	010±0.04	2.91±0.52	1.20±0.21	0.22±0.06	5.19±1.44	0.04	
		II "	016±0.05	4.52±1.30	1.88±0.47	0.24±0.09	5.64±1.54	0.26±0.14	
		III "	008±0.04	2.85±1.39	0.90±0.46	0.21±0.09	4.75±2.48	0.23±0.08	
		IV "	063±0.15	21.40±5.13	14.34±5.02	0.87±0.68	36.55±8.64		
		V "	030±0.05	9.76±1.01	3.73±0.57	0.35±0.06	12.92±1.67	0.66±0.33	
		VI "	039±0.11	11.80±1.60	5.67±1.17	0.35±0.12	16.85±1.85	1.64±0.64	
コレステロール・エステル分画	A 群	I "	002	0.40±0.20	0.19±0.05	0.06±0.01	0.73±0.28	0.02±0.01	0.01
		II "	001	0.41±0.10	0.08±0.04	0.04±0.02	0.25±0.09	0.02	0.01
		III "	001	0.39±0.27	0.05±0.01	0.04±0.01	0.16±0.05	0.03±0.02	0.02
		IV "	003±0.01	0.55±0.09	0.24±0.12	0.08±0.02	0.70±0.29	0.03±0.01	0.01
		V "	002±0.01	0.60±0.11	0.12±0.06	0.09±0.03	0.67±0.17	0.08±0.04	0.07±0.04
		VI "	003±0.01	0.67±0.14	0.22±0.02	0.12±0.04	0.89±0.20	0.05±0.03	0.04±0.04
	B 群	I "	002	0.27±0.08	0.15±0.07	0.10±0.06	0.59±0.38	0.01	0.04±0.04
		II "	001	0.25±0.12	0.06±0.02	0.11±0.07	0.17±0.07	0.03±0.01	0.05±0.02
		III "	001	0.12±0.04	0.03±0.01	0.05±0.02	0.14±0.06	0.01	0.07±0.02
		IV "	001	0.62±0.13	0.72±0.14	0.06±0.01	1.89±0.18	0.04±0.02	0.06±0.01
		V "	001	0.19±0.03	0.14±0.05	0.04±0.01	0.36±0.20	0.03±0.02	0.04±0.01
		VI "	001	0.29±0.13	0.25±0.13	0.03±0.02	0.53±0.17	0.05±0.02	0.07±0.02

2日後の高度障害群では上記脂酸非投与群でアラキドン酸は減少せず、脂酸投与群でアラキドン酸の生成はみられないが、CCl₄投与11日後の軽度障害群では脂酸非投与群でアラキドン酸構成比は減少し (P<0.05)、リノール酸群およびγ-リノレン酸群でそれぞれ約2倍の増加を示したが、リノール酸群とγ-リノレン酸群との間にはアラキドン酸生成に関して有意差は認められなかった。

PL分画アラキドン酸量は図4の如く構成比とほぼ同様の結果が得られた。

CE分画アラキドン酸構成比は図5の如くPL分画構成比と同様にCCl₄非障害群では脂酸投与11日後にはリノール酸群で1.8倍、γ-リノレン酸群で3.6倍の増加を示し、リノール酸に比しγ-リノレン酸ではアラキドン酸の生成効果が有意に認められた。CCl₄投与11日後の軽度障害群では脂酸非投与群で

減少, リノール酸および γ -リノレン酸群で約1.3倍の増加を示したが, リノール酸群と γ -リノレン酸群との間にはアラキドン酸生成に関して有意差は認められなかった。

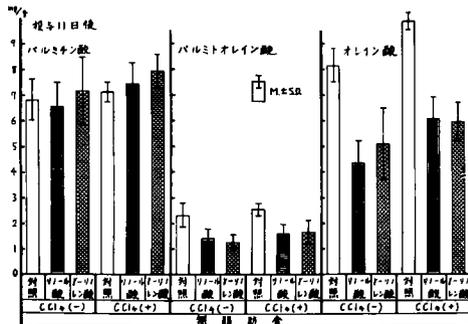
CE分面アラキドン酸量は量的にきわめて少なく, PL分面アラキドン酸量の約1/100以下の程度であって計算上誤差が大きく検討を省略した。

2) リノール酸および γ -リノレン酸による脂肪肝抑制作用。

A) 脂酸分面脂酸量 (表3)

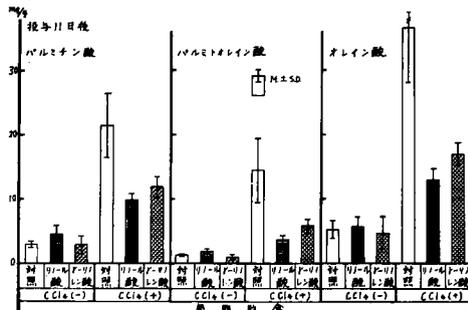
a) PL分面脂酸: ミリスチン酸, パルミチン酸およびステアリン酸に関しては, CCl₄ 非障害群およびCCl₄ 障害群共に変化は認めなかったが, パルミトオレイン酸およびオレイン酸はリノール酸および γ -リノレン酸投与により, CCl₄ 非障害群およびCCl₄ 障害群において共に減少した (図6)。リノール酸は脂酸投与で群でわずかに増加した。

図6 ラット肝脂質分面脂酸



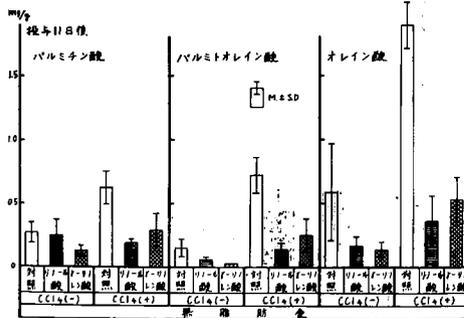
b) TG分面脂酸: TG分面ではリノール酸は少なく殆どは内因性脂酸である。これら内因性脂酸はCCl₄ 非障害群では脂酸投与の影響は認めないが, CCl₄ 障害群では脂酸非投与群で著明な増量がみられ, リノール酸および γ -リノレン酸投与によりその増量は半分以下に抑制され, 特にパルミトオレイン酸およびオレイン酸にその傾向は著明であった。

図7 ラット肝中性脂肪分面脂酸



c) CE分面脂酸: CE分面中の脂酸はPL分面, TG分面中の脂酸に比し量的にきわめて少ない。TG分面とほぼ同様に内因性脂酸はCCl₄ 投与11日後の軽度障害群で脂酸非投与群において著増するが, リノール酸および γ -リノレン酸投与によりその増量は半分以下に抑制された。特にパルミトオレイン酸およびオレイン酸にその傾向は著明であった。CCl₄ 非障害群においてもリノール酸および γ -リノレン酸投与により脂酸量は減少した (図8)。

図8 ラット肝コレステロール・エステル分面脂酸

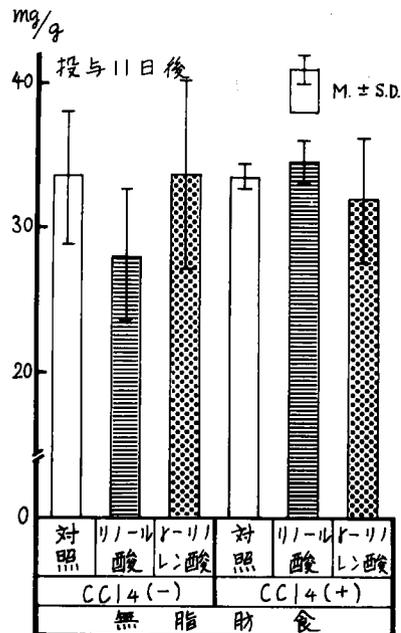


パルミトオレイン酸およびオレイン酸は脂酸非投与群では高度肝障害群よりも寧ろ軽度肝障害群においてより著しく増量し, TG分面およびCE分面でその傾向は著明であった。

B) 脂質分面脂酸量および総脂酸量 (表4)

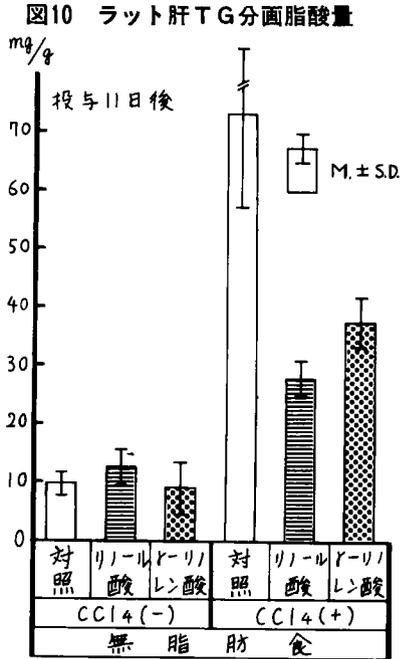
a) PL分面脂酸量: 図9の如く各群ともほぼ同

図9 ラット肝PL分面脂酸量



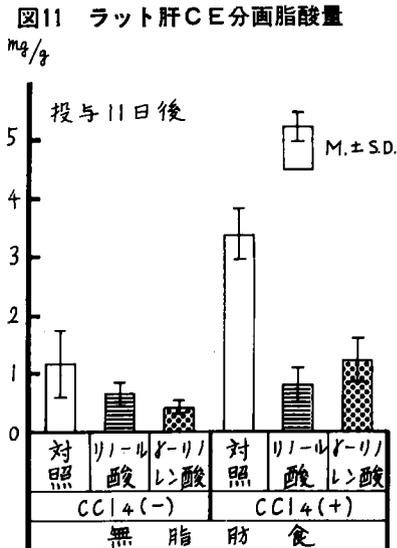
量であり、CCI4 障害の有無や脂酸投与の影響はあまり認めない。

b) T G 分画脂酸量：図10の如く CCI4 非障害群



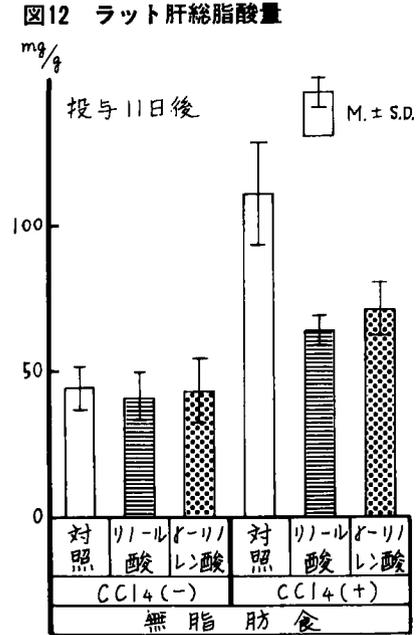
では脂酸投与の影響は殆んどみとめないが、CCI4 軽度障害群では脂酸非投与群で8倍の増加をみたが、リノール酸およびγ-リノレン酸投与群ではその増加は50%以下に抑制された。

c) CE分画脂酸量：量的には少ないが、図11の



如く CCI4 非障害群でもリノール酸およびγ-リノレン酸投与により脂酸量の減少をみとめ、CCI4 軽度障害群では脂酸非投与群で約3倍の増加をみたが、リノール酸およびγ-リノレン酸投与によりその増加は50%以下に抑制された。

b) 総脂酸量：ラット肝総脂酸量は図12の如くC-



CI4 非障害群では脂酸投与により影響をみないが、CCI4 障害では脂酸非投与群で著増し、リノール酸およびγ-リノレン酸投与によりその増加は著明に抑制された。

V 総括ならびに考按

リノール酸およびアラキドン酸は必須脂酸であり、リノール酸は生体内で合成されず、すべて食餌脂肪として摂取される¹⁹⁾。アラキドン酸は食餌脂肪に殆んど含まれていないといつてよく、その大部分は生体内特に肝においてリノール酸より合成される。その生合成経路は Mead 一派の標識脂肪酸を用いた一連の実験によってほぼ明らかにされた¹⁵⁻¹⁶⁾。すなわちリノール酸 ($\Delta^9, 12-C_{18}$) $\xrightarrow{-2H}$ γ-リノレン酸 ($\Delta^6, 9, 12-C_{18}$) $\xrightarrow{+2C}$ ホモ-γ-リノレン酸 ($\Delta^5, 8, 11, 14-C_{20}$) $\xrightarrow{-2H}$ アラキドン酸 ($\Delta^5, 8, 11, 14-C_{20}$) となる。

肝疾患、特に肝硬変患者では血漿アラキドン酸比率の減少がみられ、リノール酸エチルを投与するとリノール酸は増加するが、アラキドン酸は低値にと

どまることより、リノール酸よりアラキドン酸への生体内合成過程に障害があるものと考えられているが²¹、合成過程のどの個所での障害により起るものであるかは明らかではない。もしリノール酸→ γ -リノレン酸の過程での障害によりアラキドン酸生成障害が起るものと仮定すれば、肝障害時に γ -リノレン酸を投与すればアラキドン酸生成は支障なく行なわれるはずである。ところで本実験では γ -リノレン酸を29.6%含有するリノール酸エチルを投与したさいは肝障害がなければ肝P L分面にリノール酸単独投与よりも著明なアラキドン酸生成をみとめたが、CCI4 肝障害の条件下ではアラキドン酸生成はほぼ同じ程度に抑制され、生成効果には差が認められなかった。このことは障害個所が γ -リノレン酸以降の過程によるものとするよりも、次の点でCCI4 肝障害自体の特異性によるものとするのが妥当であろう。即ち Wakil¹⁷⁾はC16のパルミチン酸までの de novo 合成はラット肝の上清部分、それ以上の鎖長延長反応はミトコンドリアで起ると考えたが、Nugteren はラットの肝細胞のミクロゾームと上清部分を合した条件で18:2^{ω6}→18:3^{ω6}の反応の起ることを確めた後¹⁸⁾、次の実験でミクロゾームにより1時間に75%の高効率で18:3^{ω6}→20:3^{ω6}に変換されるこのことを認めており、この反応はミトコンドリアでも起るがこれはミクロゾームの混入と考えられる程度のものであるとし¹⁹⁾²⁰⁾、不飽和化も鎖長延長もミクロゾーム分面で行なわれることを明らかにした。一方 CCI4 障害脂肪肝発生病作はミトコンドリアの障害²⁾によるのではなく、ミクロゾームの Integrity の破壊による primary の障害が最も重要因子であることが明らかにされた²²⁾²³⁾。即ち CCI4 障害ではミクロゾームの生化学的変化により不飽和化および鎖長延長のすべての酵素系が破壊されるため、18:2^{ω6}→20:4^{ω6}に至るすべての生合成系が中断する。したがって中心性壊死のみられた CCI4 急性期高度障害群ではリノール酸および γ -リノレン酸を投与してもアラキドン酸の生成はまったく認められず、CCI4 回復期軽度障害群では肝細胞の壊死も少なく、再生像もみられたことから、ミクロゾーム分面の酵素系がある程度回復したと考えられ、リノール酸および γ -リノレン酸投与によりある程度のアラキドン酸生成が認められたが、ほぼ同量となり、生成効果に差が認められなかったものと考えられる。磯崎らも CCI4 障害ラット肝P L分面ではオレイン酸、リノール酸および γ -リノレン酸を投与してもア

ラキドン酸生成に関して変化をみていない²⁴⁾。しかし低蛋白、低リノール酸のコリン欠乏食で飼育したラットにリノール酸および γ -リノレン酸を投与した場合、肝および血清P L分面アラキドン酸の増加はリノール酸を投与した場合よりも γ -リノレン酸を投与した場合の方が著明であり²⁵⁾、A/G比1.2以下の肝硬変13例に γ -リノレン酸を30%含有するリノール酸エチルを1日2.4g投与した所、血清P L分面アラキドン酸は投与1ヵ月で増加し、2ヵ月後にもそれを持続し、投与を中止すると減少することをみとめている²⁴⁾。田中ら²⁶⁾はオロト酸脂肪肝にてラット肝P L分面アラキドン酸は減少するが、 γ -リノレン酸投与により可成り改善されることを報告している。吉川ら²⁹⁾は無脂肪食飼育ラット肝で、200mg/kg(体重)の γ -リノレン酸の投与はリノール酸750mg/kg(体重)に相当するアラキドン酸生成をみたと報告している。

以上から肝障害が認められない場合あるいはミクロゾームの機能が破壊されていないような肝障害では γ -リノレン酸はリノール酸に比し強いアラキドン酸生成が期待される。しかし CCI4 肝障害の如く顆粒分面特にミクロゾームの破壊が激しい肝障害ではアラキドン酸生成はまったく認められず、障害が軽減し、ミクロゾームの機能がある程度回復したと考えられる時期ではアラキドン酸はある程度生成されるが、その生成効果はリノール酸も γ -リノレン酸も同じと考えられる。

リノール酸などの高級不飽和脂酸を含む植物性油が血清コレステロール低下作用を持つことはKinsellら⁴⁾(1952)以来知られている⁵⁻⁶⁾。その作用機序として、Gordonら²⁸⁾、Levis²⁹⁾、Goldsmithら³⁰⁾は不飽和脂酸が糞へのステロールの排泄を増加させることを認めており、一方Spitzら³¹⁾は血清から体の他の部分へのコレステロールの再分配によるためと考えている。いずれにしてもコレステロールの運搬にはリノール酸が必要である³²⁻³⁵⁾。

Allmannら⁸⁾は無脂肪食ラットでは肝の脂酸合成は促進しており、2%リノール酸エチルの投与は肝内脂酸合成系酵素の活性を著るしく減少させると報告している。高橋¹⁾は低脂肪食実験でリノール酸は脂肪酸合成を抑制する力がパルミチン酸より強いことを報告している。木畑ら³⁶⁾はリノール酸の添加が in vitro の全血細胞の脂酸合成およびコレステロール合成の抑制、特に18:1の著明な合成抑制を来すことを報告している。

最近生体内に於ける脂質動態が急速に明らかにされるようになった。即ち空腹時に於ては貯蔵脂肪から多量のFFAが血中に動員され、その大部分は肝に入り、一部はその場で利用され、一部は中性脂肪、燐脂質に組み入れられ、あるtime lagをもって再びリポ蛋白として血中に放出される。この中性脂肪の放出機構が障害されると、肝に中性脂肪が蓄積することになる。FFAは血中脂質の5%に過ぎないが、半減期が約2分という短時間であるため、肝を中心とする脂質代謝において重要な因子である。かかる脂質動態面より Recknagel ら^{29,37)}はCCl₄障害の早期にマイクロゾーム諸酵素系の活性減退がみられたことから、CCl₄脂肪肝は肝よりのリポ蛋白の分泌、即ち“Hepatic triglyceride secretory mechanism”の障害によることを提起している。橋本³⁸⁾は構成脂酸のヨード価の測定から、CCl₄脂肪はごく初期には肝のリポ蛋白分泌の障害、その後は貯蔵脂肪の肝への動員、脂酸々化障害、脂酸合成の亢進も関与していると考えるのが妥当であろうとしている。

リノール酸および γ -リノレン酸がCCl₄脂肪肝の中で最も著明な増加を来したTG分画脂酸量を著減させ、投与日数の増加と共にその脂酸量増加抑制効果が増大し、PL分画脂酸量には殆んど影響を与えなかった事実はこれら高級不飽和脂酸が肝よりのリポ蛋白分泌障害を改善させる作用を有するものと考えられる。すなわち中性脂肪およびコレステロールの代謝と運搬にはリノール酸が必要である³²⁻³⁵⁾ことよりこれら高級不飽和脂酸はマイクロゾーム諸酵素系の障害を保護し、リポ蛋白の生成と分泌を促進し、中性脂肪が肝細胞内に蓄積するのを防ぐものと思われる。

しかし急性期高度障害群よりも回復期軽度障害群に、TG分画脂酸量がより著明に増加することは、マイクロゾームの回復がきわめて遅いことが予想されると同時に、リポ蛋白の分泌障害のある間は、貯蔵脂肪から動員された多量のFFAがたえず肝内に流入し、中性脂肪に組み込まれ蓄積されるためと思われる。高橋ら^{39,40)}は人脂肪肝の脂酸構成を検討し、肝の中性脂肪が脂肪組織の脂酸構成に似ていることから、脂肪肝発生には肝内への脂酸の流入が無視出来ない要因とのべ、又絶食状態で行った実験的各種の脂肪肝でも、肝内に蓄積する脂酸が脂肪組織に由来することを報告している⁴¹⁾。今井ら⁴²⁻⁴⁵⁾はCCl₄中毒肝など一般に脂肪肝ではモノ不飽和化能は低下

しており、モノ不飽和酸の生成量は少ないが、オレイン酸などのモノ不飽和酸含有量はむしろ増加していることより、増加したモノ不飽和酸は主として肝外より導入されたものであるとのべている。橋本³⁸⁾は構成脂酸のヨード価の測定から、CCl₄脂肪肝では肝内脂肪と貯蔵脂肪の交替が起るものと考えている。著者の成績でもTG分画パルミトオレイン酸およびオレイン酸量が急性期高度障害群よりも回復期軽度障害群で他の脂酸に比してとびぬけて著増していたことは貯蔵脂肪の脂酸構成にモノ不飽和酸が多い⁴⁶⁾ことから考えて、貯蔵脂肪由来の多量のFFAが肝内へ流入したものと考えられよう。

このように回復期軽度障害群で肝内にモノ不飽和酸の蓄積が増加することは、第1編¹⁾で急性肝炎患者の血清GPT活性が正常化してもなお血漿パルミトオレイン酸構成比は異常高値をとり、肝機能検査に比して血漿パルミトオレイン酸の正常化は遅れるという事実をよく説明する。即ちマイクロゾームの諸酵素系の障害が回復した時期には血清GPTも正常化していると考えられ、流入し蓄積したモノ不飽和酸はリポ蛋白に合成され血中に戻るため、血漿パルミトオレイン酸比率は高値を持続するものと思われる。このことは肝炎治療期にしばしば肝細胞内に脂肪沈着を認め、その一部の症例には脂肪肝と診断される程度の脂肪沈着を示すものもある⁴⁷⁾という事実からも是認される。

リノール酸および γ -リノレン酸投与により肝内TG分画パルミチン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸は著減し、その量は急性期高度障害群と回復期軽度障害群ともほぼ同量であったことは高級不飽和脂酸投与により、先ず脂肪組織由来のFFAの肝内への流入抑制機構が働き、次いでリポ蛋白の合成分泌亢進が加わるものと考えられる。即ち急性期高度障害群ではアラキドン酸の生成がみられなかったことよりみて、マイクロゾームの諸酵素系は強く障害されており、したがってこの時期ではリポ蛋白の合成分泌は少なく、FFAの流入抑制が主力と考えられる。回復期軽度障害群ではアラキドン酸生成がみられたことから、この時期ではマイクロゾーム諸酵素系は回復しており、FFAの流入抑制にリポ蛋白の合成分泌が加わり、肝脂肪蓄積を一層強く抑制したものと思われる。

燐脂質は膜の透過性を正常に保ち、酵素の遊出を阻止し⁴⁸⁾、ある酵素の活性を保つのに必要であり、その除去により酵素活性は失われる^{49,50,51)}。この

ような作用は必須脂酸を含む磷脂質にみられ、飽和脂酸のみの磷脂質ではみられない。又磷脂質は蛋白質と共にリポ蛋白形成に関与し、 β 位に必須脂酸を多く結合し、その存在が磷脂質の活性を高める⁵²⁾。以上からリノール酸および γ -リノレン酸投与が磷脂質の活性を高め、磷脂質を介してリポ蛋白の合成と分泌を亢進させることが考えられる。以上の点より著者の成績をみてみると、回復期軽度障害群では肝内PL分画脂酸量は脂酸投与およびCCl₄障害の有無にかかわらず、各群ともほぼ同量であるが、上記不飽和脂酸投与によりパルミトオレイン酸およびオレイン酸は減量し、リノール酸特にアラキドン酸が増量したことは投与された必須脂酸は殆どPL分画にとりこまれている、アラキドン酸に生成され、パルミトオレイン酸およびオレイン酸の位置におきかわることによって活性が高まり、リポ蛋白合成分泌亢進を来したのと思われる。深沢、高橋ら⁵³⁾は無脂肪食ラットにみられる脂肪肝はリノール酸および γ -リノレン酸投与により軽快するが、これには β -リポ蛋白合成亢進を介して肝脂肪蓄積を抑制する機序も関与しているとのべている。

肝内脂肪酸合成に関してはAllmannら⁵⁴⁾、高橋⁵⁵⁾の報告にあるように、リノール酸および γ -リノレン酸は合成に対し抑制的に働いていると考えられる。しかしCCl₄脂肪肝発生機序から考えて脂肪肝抑制という点に於ては重要な因子とは考えられない。又モノ不飽和化を行う酵素はリノール酸によって強く抑制され、モノ不飽和酸生成は抑えられた^{56) 58)}ことと、高級不飽和脂酸投与によりPL分画モノ不飽和酸の減量を来したことが一致するかの如く思われるが、CCl₄障害ではモノ不飽和能は低下しており、その生成量は少ない^{42) 46)}ことから重要な因子とは考えられない。

脂肪酸の酸化障害ということに関しては合田²⁹⁾はCCl₄障害肝でミトコンドリアの酸化的磷酸化の低下に一致して、ミトコンドリアのPL分画オレイン酸の増加とアラキドン酸の減少をみている。OHARA & UTUMI⁵⁶⁾は障害肝のミトコンドリアのゆったりした膨化に一致して、ミトコンドリアの脂質の大質部分であり、かつ膜の構成成分であるGlycerophosphatideの脂酸構成においてオレインの増加とアラキドン酸の減少をみとめている。したがってリノール酸および γ -リノレン酸投与がアラキドン酸生成を介して、磷脂質の活性を高めて脂酸酸化障害を改善することは考えられる。

以上からリノール酸および γ -リノレン酸のCCl₄脂肪肝抑制機序は投与されたこれら高級不飽和脂酸が肝内に取り込まれることにより脂肪組織由来のFFFAの肝内への流入抑制を来し、次いでアラキドン酸生成により磷脂質の活性を高め、リポ蛋白の合成分泌亢進を来すためと考えられる。

VI 結 論

無脂肪食飼育CCl₄障害ラットにリノール酸エチルおよび29.6% γ -リノレン酸含有リノール酸エチルを投与し、肝について脂酸量と脂酸構成をガスクロマトグラフ法を用いて測定し、アラキドン酸生成効果と脂肪肝抑制作用について検討し、次の結果を得た。

1) PL分画アラキドン酸はCCl₄非障害群では投与2日後既にリノール酸投与群および γ -リノレン酸投与群の順で増加し、投与11日後にはそれぞれ約2および3倍に増加した。CCl₄障害群では投与2日後の急性期高度障害群でアラキドン酸生成はみられなかったが、11日後の回復期軽度障害群ではリノール酸および γ -リノレン酸投与群で約2倍のアラキドン酸生成がみられたが、両群間には差は認められなかった。

2) パルミトオレイン酸、オレイン酸は急性期高度障害群よりも回復期軽度障害群の方が、TG分画およびCE分画で著明に増量し、他の内因性脂酸ともども、これら高級不飽和脂酸投与により50%以下に減少した。

3) PL分画脂酸量は各群ともほぼ同量であったが、高級不飽和脂酸投与群ではPL分画パルミトオレイン酸、オレイン酸は減量し、リノール酸、アラキドン酸は増量した。

4) TG分画脂酸量、CE分画脂酸量および総脂酸量は脂酸非投与、CCl₄障害により著増し、高級不飽和脂酸投与により半減し、その増加は著るしく抑制された。

5) 以上によりリノール酸および γ -リノレン酸のCCl₄脂肪肝抑制機序はリノール酸および γ -リノレン酸が肝内に取り込まれることにより脂肪組織由来のFFFAの肝内への流入抑制を来し、次いでアラキドン酸生成により磷脂質の活性を高かめ、リポ蛋白の合成分泌を亢進させることにあると考えられた。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜った恩師小坂淳夫教授に深甚の謝意を表わすと共に、本研究に

直接御指導賜わった武田和久博士，田中昭博士に深謝いたします。

(本論文要旨は第10回日本老年医学会総会および第11, 12回老人病研究会にて発表した。)

文 献

- 1) 高橋善弥太：第17回日本医学会総会学術講演集 III：299, 1967.
- 2) 平山和之：日消誌, **64**：187, 1967.
- 3) 小川智之：投稿中
- 4) Kinsell, L. et al：J. clin. Endocrin. & Metab., **12**：909, 1952.
- 5) Frishley, R. W. et al：Circulation, **12**：492, 1955.
- 6) Ahrens, E. H. et al：J. Clin. Invest. **34**：918, 1955. **34**
- 7) Bronte Stewart, B. et al：Lancet, **i**：523, 1956.
- 8) Allmann, D. W. & Gibson, D. M.：J. Lipid Res., **6**：51, 1965.
- 9) Folch, J. et al：J. Biol. Chem., **226**：497, 1957.
- 10) Mangold, H. K.：J. Am. Oil Chemists Soc., **38**：708, 1961.
- 11) Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E. H.：Anal. Chem., **31**：307, 1959.
- 12) 高橋善弥太，田中圭：脂質実験法，生物化学実験法. VII：55, 2版，共立出版.
- 13) Mead, J. F., Steinberg, G. & Howton, D. R.：J. Biol. Chem., **205**：683, 1953.
- 14) Steinberg, G., Slaton, W. H., Howton, D. R. & Mead, J. F.：J. Biol. Chem., **220**：257, 1956.
- 15) Mead, J. F. & Howton, D. R.：J. Biol. Chem., **229**：575, 1957.
- 16) Howton, D. R. & Mead, J. F.：J. Biol. Chem., **235**：3385, 1960.
- 17) Wakil, S. J.：J. Lipid Res. **2**：1, 1961.
- 18) Nugteren, D. H.：Biochim. Biophys. Acta, **60**：656, 1962.
- 19) Nugteren, D. H.：Biochem. J., **89**：28, 1963.
- 20) Nugteren, D. H.：Biochim. Biophys. Acta, **106**：280, 1965.
- 21) Christie, G. S. & Judah, J. D.：Proc. Roy. Soc. London B., **142**：241, 1954.
- 22) Recknagel, R. O., Lombardi, B. & Schotz, M. C.：proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **104**：608, 1960.
- 23) 合田満雄：日消誌, **64**：49, 1967.
- 24) 磯崎正弘他：第12回老人病研究会報告集, p. 49, 1968.
- 25) 磯崎正弘他：脂質生化学研究, p. 25, 1968.
- 26) 田中照二，西川弘，栗原宜夫，岡部和彦，藤沢列：第12回老人病研究会報告集, p. 49, 1968.
- 27) 吉川巖他：日消誌, **64**：117, 1967.
- 28) Gordon, H. B., Levis, B., Eales, L. & Brock, J. F.：Lancet, **ii**：1299, 1957.
- 29) Levis, S.：Lancet, **1**：1090, 1958. **B**
- 30) Goldsmith, G. A., Hamilton, J. G. & Miller, O. M.：Arch. Int. Med., **105**：512, 1960.
- 31) Spitz, M., Grundy, S. & Ahrens, E. H.：J. Clin. Invest., **42**：981, 1963.
- 32) Holman, R. T.：Am. J. Clin. Nutr., **8**：403, 1960.
- 33) Holman, R. T. & Pfeifer, J. J.：J. Nutr. **70**：411, 1960.
- 34) Gambal, D. & Queckenbush, F. W.：J. Nutr., **70**：497, 1960.
- 35) Aaes-Jorgensen, E.：Physiol. Rev., **41**：1, 1961.
- 36) 木畑正義他：日老医会誌, **4**：177, 1967.
- 37) Recknagel, R. D. & Lambardi, B.：J. Biol. Chem., **236**：564, 1961.
- 38) 橋本修治：治療, **46**：1947, 1964.
- 39) 沖中重雄，高橋善弥太他：肝臓, **2**：47, 1960.
- 40) Takahashi, Y. & Tanaka, K.：J. Biochem. **46**：713, 1961.
- 41) 高橋善弥太：日消誌, **61**：80, 1964.
- 42) Imai, Y.：Biochem., **49**：642, 1961.
- 43) 三橋修，今井陽：脂質生化学研究, **p29**, 1965.
- 44) Imai, Y. & Mitsuhashi, O.：J. Biochem. **61**：712, 1967.
- 45) 今井陽：最新医学, **22**：1630, 1967.
- 46) 相沢豊，中村治雄：日本臨床, **22**：501, 1964.
- 47) 小林敏成：肝臓, **11**：295, 1970.
- 48) Estranda, O. S. et al：Biochem.,

- 5 : 3432, 1966.
- 49) Sekuzu, I. et al : Biochem. Bioph. Res. Com., **6** : 71, 1961.
- 50) Jurtshuk, P. Jr. et al : Ibid. **76**
- 51) Marinetti, G. V. et al : J. Biol. Chem., **228** : 819, 1957.
- 52) 坂上利夫, 折居忠夫 : 日本臨床, **22** : 2085, 1964.
- 53) 深沢俊男, 高橋善弥太他 : 脂質生化学研究 p. 29, 1968.
- 54) 内山充他 : 生化学, **36** : 580, 1964.
- 55) Brenner, R. R. et al : J. Biol. Chem., **241** : 5213, 1966.
- 56) Ohara, S. & Utumi, K. : Acta med. Okayama, **18** : 339, 1964.

STUDIES ON FATTY ACID METABOLISM IN LIVER DISEASES

Part 11

Effects of Linoleate and γ -linolenate on the Synthesis on Arachidonate and the Prevention of Fatty Liver in the Carbon Tetrachloride Injured Rat Liver

by

Tomoyuki OGAWA

The First Department of Internal Medicine
OKAYAMA University Medical School, OKAYAMA, Japan
(Director: Prof. Kiyowo KOSAKA)

ABSTRACT

Gaschromatographic observations of the quantities and the compositions of fatty acids in liver tissues were carried out of rats injured by carbon tetrachloride after feeding on free fat diet to investigate the effects of ethyl-linoleate administration with and without 29.6% γ -linolenate on injured liver.

The results were as follows:

1. Arachidonate in phospholipid fraction of the control group increased two days after linoleate or γ -linolenate administrations. After eleven days this increased level of arachidonate was corresponded to two and three times of the control value respectively. Whereas in the carbon tetrachloride injected rats no increased synthesis of arachidonate could be observed two days after that treatment. Two fold increased synthesis of arachidonate was found, however, eleven days after the carbon tetrachloride treatment in the group with the linoleate or the γ -linolenate, and there were no differences in the both groups.
2. Palmitoleate and oleate in triglyceride fraction and cholesterolester fraction increased markedly at the regenerating stage in injured livers rather than the sever damaged stage. Other endogenous fatty acids as well as these fatty acids decreased below 50% by administration of these highly unsaturated fatty acids.
3. Fatty acid in phospholipid fraction was found to be about equal quantity in each group. On the other hand, in unsaturated fatty acids treated group, palmitoleate and oleate decreased with the simultaneous increase of linoleate and arachidonate.
4. Fatty acid in tryglyceride fraction, fatty acid in cholesterolester fraction and total fatty acid increased more remarked in the carbon tetrachloride treated group. These levels were decreased, however, 50% by the administration of highly unsaturated fatty acids, and such administration markedly inhibited the increase of these fatty acids.
5. From these findings the preventive effects of linoleate and γ -linolenate on carbon tetrachloride induced fatty liver might be explained as that the intrahepatic increase of administered these fatty acids depressed the inflow of FFA into the liver tissues from peripheral fat tissues and the sequential synthesis of arachidonate accelerated the synthesis and secretion of lipoproteins.