

# 血液細胞と肝の脂質代謝の比較に関する実験的研究

## 第 1 編

### 急性四塩化炭素中毒による検討

岡山大学医学部第二内科 (主任: 平木潔教授)

河 内 光 男

[昭和49年3月4日受稿]

#### 目 次

第1章 緒 言	のとりこみ
第2章 実験材料及びに実験方法	第2節 主要脂質分画への <sup>14</sup> Cのとりこみ
第1節 実験動物	1) 主要脂質分画への <sup>14</sup> Cのとりこみ Net C- ount
第2節 全血採取法及び肝スライス作成法	1) 主要脂質分画への <sup>14</sup> Cのとりこみ百分率
第3節 全血及び肝スライス培養法	第3節 1- <sup>14</sup> C Acetate Na から各脂肪酸への <sup>14</sup> Cのとりこみ
第4節 全血及び肝スライスからの脂質抽出法	第4章 総括及び考按
第5節 全血及び肝スライスによりとりこまれた <sup>14</sup> C測定法	第5章 結 語
第3章 実験成績	
第1節 総脂質, 総脂酸, 不けん化脂質への <sup>14</sup> C	

#### 第1章 緒 言

肝が脂質代謝に重要な役割をはたしていることについては古くから注目され、肝を中心とする脂質代謝異常は各方面より追求されてきたが未知の点が少ない。脂質代謝異常の知られている多くの疾患ないし疾病過程においてさえ、異常の発現機序が未解決のものが多い。一方教室に於ける研究業績<sup>1-3)</sup>にみるごとく血液細胞が脂質合成に関与することが知られ、肝、皮下脂肪組織その他に比して等閑視しえないことが明らかにされ、諸疾患時に於いて全血を用いての脂質合成を観察することがきわめて意義深いと思われる。

血液は体重の7~11%, 5~6,000mlといわれ、血液中で血液細胞が脂質代謝上に占める役割は可成り重要であると推定される。血液細胞がもつ脂質合成能が肝での脂質の動態と密接な関連性を有すると考えられ、事実、教室木畑<sup>4)</sup>は肥満マウス肝を用いての研究から、肝で行われる代謝のパターンが血液細胞でもみられると報告している。

血液細胞の脂質合成経路については、2つの経路、

即ち malonyl CoA pathway と mitochondrial pathway の存することが想定されている<sup>5)</sup>。木畑<sup>4)</sup>は血小板による 1-<sup>14</sup>C Acetate Na からの脂酸合成に際して、BAL, Antimycin A 等により酸化的磷酸化を阻害すると ATP 需要の高い malonyl CoA pathway が抑制されることを見出している。この事実は既に Wakil<sup>6)</sup>が鳩肝ホモジネートで明らかにしている所であって、このことから血液細胞も肝と同様な代謝経路を維持していると考えられる。

このように血液細胞が脂質合成能をもち、生体内での脂質の動態、特に肝での脂質代謝と密接な関連を有していることを特に注目したいのである。

そこで著者は血液細胞の脂質代謝が、諸条件によって如何に変動するかに興味を抱き、且つ、その際の肝の脂質代謝の変動と如何に関連するかを検討する目的で、四塩化炭素を用いて実験的急性肝障害を作り、肝及び血液細胞による 1-<sup>14</sup>C Acetate Na の脂質へのとりこみを観察した。

#### 第2章 実験材料及びに実験方法

##### 第1節 実験動物

Wister系雄性ラットで体重150~200gのものを用いた。四塩化炭素による急性肝障害を起すため体重100g当り、50%四塩化炭素オリーブ油液0.2mlを1回背部皮下に注射した。対照群にはオリーブ油液を同量注射した。注射後4時間、48時間で実験に供した。実験動物は四塩化炭素注射前後を通じてオリエンタル固型飼料と水で飼育し、実験前16時間前後絶食させた後、体重100g当り0.1mlのペントバルビタールを腹腔内投与した。

#### 第2節 全血採取法及び肝スライス作成法

ヘパリン加シリコン処理した注射器にて心穿刺を行い5mlの血液を採取後開腹し、直ちに右頸動脈から脱血し、生理食塩水で門脈より肝かん流を行った後肝を取り出し、厚さ0.4mmのスライスを室温で作成した。肝スライスは500mgを秤量後実験に供した。

#### 第3節 全血及び肝スライス培養法

100mlのErlenmyerフラスコに5mlのヘパリン加血液を入れ、5 $\mu$ ciの1-<sup>14</sup>C Acetate Naを添加し、95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>の気相で37°C、4時間incubateした。肝スライスは1-<sup>14</sup>C Acetate Na 5 $\mu$ ciを含むKrebs-Ringer bicarbonate 溶液5mlの反応液に入れ、気相を95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>で満たして、上記フラスコにガラス栓をほどこし37°C、4時間incubateした。

#### 第4節 全血及び肝スライスからの脂質抽出法

全血及び肝スライスともにFolchら<sup>3)</sup>の方法により総脂質を抽出し、さらに0.73%食塩水で2回水洗した。つぎにBjörntorp<sup>10)</sup>の方法によりけん化抽出を行ない、脂肪酸はMetcalfeおよびSchmitzら<sup>11)</sup>の方法によってメチル化した。

第5節 全血および肝スライスによりとりこまれた<sup>14</sup>C測定法

総脂質の一部はシリカゲル薄層クロマトグラフィーにて燐脂質、遊離コレステロール、遊離脂肪酸、中性脂肪、エステル型コレステロールに分離し、それぞれの部分をかきとり<sup>14</sup>Cとりこみを測定した。脂肪酸はメチル化したのち、Gaschromatography装置により個々の脂肪酸に分離した。流出する<sup>14</sup>C脂肪酸をシリコン処理をしたフィルターに吸着させ、直ちに液体シンチレーションカウンター用のバイアル瓶に入れた。ついでPPO-2, 5, -Diphenyloxazole 4gとPOPOP-1, 4-bis- [2-(5-pnenyloxazolyl)] - Benzene 100mgを1 $\mu$ lのtolueneに溶解して作成したシンチレーター10mlを加えて、液体シンチレーションカウンターによりその放射能を測定した。

### 第3章 実験成績

第1節 総脂質、総脂肪酸、不けん化脂質への<sup>14</sup>Cのとりこみ

1-<sup>14</sup>C Acetate Naからの総脂質への<sup>14</sup>Cのとりこみ絶対量についてみると表1及び図1に示すように、肝では対照群54, 141 $\pm$ 9, 982 CPM/g liver tissue, 4時間群4, 325 $\pm$ 1, 179, 48時間群173, 972 $\pm$ 64, 187で四塩化炭素投与後4時間で<sup>14</sup>Cのとりこみ絶対量は著るしく減少するが、48時間では著明な増加を示し対照群の約3倍に達した。血液細胞では対照群1, 554 $\pm$ 369 CPM/10<sup>6</sup>WBC, 4時間群2, 158 $\pm$ 636, 48時間群1, 597 $\pm$ 564で四塩化炭素投与後4時間で<sup>14</sup>Cのとりこみ絶対量は軽度の増加傾向を示すが、48時間では対照群に比しその変動は軽微であった。

1-<sup>14</sup>C Acetate Naからの<sup>14</sup>Cの総脂肪酸へのとりこみ絶対量についてみると表1及び図1に示すように、肝では対照群7, 989 $\pm$ 1, 463 CPM/g liver tissue, 4時間群1, 639 $\pm$ 682, 48時間群78, 099 $\pm$ 16, 043 であ

Table 1. Incorporation of <sup>14</sup>C-acetate into gross lipids fractions by whole blood and liver tissue of rat control and after CCl<sub>4</sub> intoxication

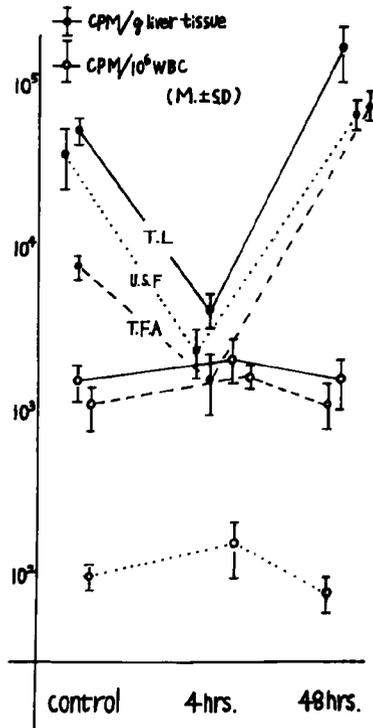
	control		4 hrs.		48 hrs.	
	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue
	7 cases	7	7	6	8	5
total lipids	1554 $\pm$ 369	54141 $\pm$ 9982	2158 $\pm$ 636	4325 $\pm$ 1179	1597 $\pm$ 564	173972 $\pm$ 64187
total fatty acids	1113 $\pm$ 351	7989 $\pm$ 1463	1674 $\pm$ 268	1639 $\pm$ 682	1136 $\pm$ 334	78099 $\pm$ 16043
unsaponifiable fractions	100 $\pm$ 18	39881 $\pm$ 16133	159 $\pm$ 61	2478 $\pm$ 800	79 $\pm$ 20	69448 $\pm$ 14458

liver tissue : CPM/g liver tissue  
whole blood : CPM/10<sup>6</sup> WBC  
(M.  $\pm$  S. D. )

った。この場合も先に述べた肝の総脂質の場合と同様、 $^{14}\text{C}$ のとりこみは4時間で低下がみられ、48時間で増加を示した。血液細胞では対照群、 $1,113 \pm 351$  CPM/ $10^6$ WBC、4時間群 $1,674 \pm 268$ 、48時間群、 $1,136 \pm 334$ であった。この場合も先に述べた血液細胞の総脂質の場合と同様、 $^{14}\text{C}$ のとりこみは4時間で軽度の増加傾向がみられたが、48時間では対照群に比してその変動は軽微であった。

1- $^{14}\text{C}$  Acetate Naからの $^{14}\text{C}$ の不けん化脂質へのとりこみ絶対量についてみると表1及び図1に示すように、肝では対照群 $39,881 \pm 16,133$  CPM/g liver tissue、4時間群 $2,478 \pm 800$ 、48時間群 $69,448 \pm 14,458$ であった。この場合も肝の総脂質、総脂酸の場合と同様、 $^{14}\text{C}$ のとりこみは4時間で低下がみられ、48時間では増加を示し対照群の約1.7倍に達した。血液細胞では対照群 $100 \pm 18$  CPM/ $10^6$ WBC、4時間群 $159 \pm 61$ 、48時間群 $79 \pm 20$ であった。この場合も血液細胞の総脂質、総脂酸の場合と同様の傾向を認めた。

Fig.1 Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate into gross lipids fractions by whole blood and liver tissue of rat



第2節 主要脂質分画への $^{14}\text{C}$ のとりこみ

1) 主要脂質分画への $^{14}\text{C}$ のとりこみ Net Count  
 磷脂質分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の Net Count は表2及び図2に示すように、肝では対照群、 $26,583 \pm 3,519$  CPM/g liver tissue、4時間群 $1,730 \pm 290$ 、48時間群 $35,316 \pm 10,264$ であった。四塩化炭素投与後4時間で $^{14}\text{C}$ とりこみ絶対量は著明に減少するが、48時間群では増加を示した。血液細胞では、対照群 $651 \pm 50$  CPM/ $10^6$ WBC、4時間群 $852 \pm 168$ 、48時間群 $600 \pm 67$ で四塩化炭素投与後4時間で $^{14}\text{C}$ のとりこみ絶対量は軽度の増加傾向を示すが、48時間ではその変動は対照群に比し軽微であった。

中性脂肪分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の Net Count は表2及び図2に示すように、肝では対照群 $1,462 \pm 487$  CPM/g liver tissue、4時間群 $861 \pm 273$ 、48時間群 $30,097 \pm 11,830$ で、この場合も先に述べた肝の磷脂質の場合と同様の態度を認め、特に48時間では対照群に比しその増加は約20倍に達した。血液細胞では対照群 $47 \pm 17$  CPM/ $10^6$ WBC、4時間群 $58 \pm 15$ 、48時間群 $42 \pm 18$ であった。

Fig.2 Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate into major lipids fractions by whole blood and liver tissue of rat analysed by thin layer chromatography

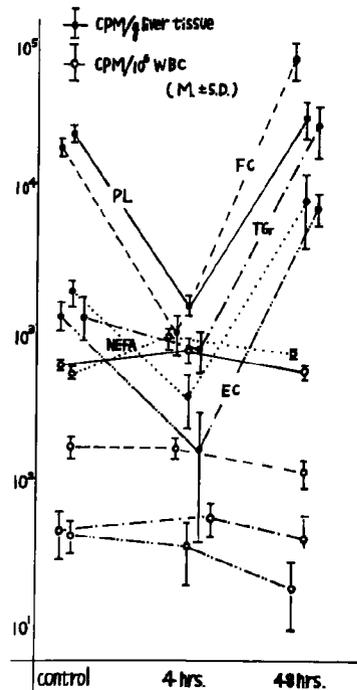


Table 2. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate into major lipids fractions by whole blood and liver tissue analysed by thin layer chromatography

	control		4 hrs.		48 hrs.	
	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue
	7 cases	7	7	6	8	5
PL	651±50	26583±3519	852±168	1730±290	600±67	35316±10264
FC	177±30	21440±3194	177±30	1120±359	121±27	89074±26966
NEFA	594±61	2112±433	1012±175	411±173	805±61	9221±4871
TG	47±17	1462±487	58±15	861±273	42±18	30097±11830
EC	44±11	1462±325	37±17	173±138	19±10	8177±1914

whole blood : CPM/ $10^6$  WBC  
 liver tissue : CPM/g liver tissue  
 (M. ± S. D.)

遊離コレステロール分画への $^{14}\text{C}$ のとりこみ絶対量は表2及び図2のように、肝では対照群 $21,440 \pm 3,194$  CPM/g liver tissue, 4時間群 $1120 \pm 359$ , 48時間群 $89,074 \pm 26,966$ であった。この場合も先に述べた肝の磷脂質, 中性脂肪と同様の態度を示した。血液細胞では対照群 $177 \pm 30$  CPM/ $10^6$  WBC, 4時間群 $177 \pm 30$ , 48時間群 $121 \pm 27$ であった。

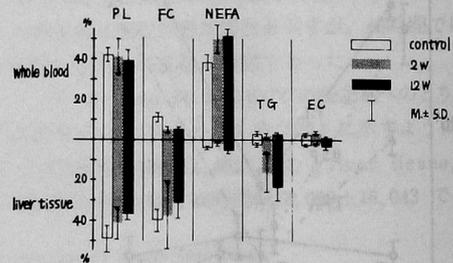
遊離脂肪酸分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の Net Countは表2及び図2に示すように、肝では対照群 $2,112 \pm 433$  CPM/g liver tissue, 4時間群 $411 \pm 173$ , 48時間群 $9,221 \pm 4,871$ であった。四塩化炭素投与後4時間で $^{14}\text{C}$ のとりこみ絶対量は著るしく減少するが、48時間では増加を示し対照群に比し約4倍に達した。血液細胞では対照群 $594 \pm 61$  CPM/ $10^6$  WBC, 4時間群 $1,012 \pm 175$ , 48時間群 $805 \pm 61$ であった。 $^{14}\text{C}$ とりこみ Net Countは対照群に比し4時間, 48時間ともに増加を認めた。

エステル型コレステロール分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の Net Countは表2及び図2に示すように、肝では対照群 $1,462 \pm 325$  CPM/g liver tissue, 4時間群 $173 \pm 138$ , 48時間群 $8,177 \pm 1,914$ であった。この場

合も先に述べた肝の他の脂質分画と同様の態度を示した。血液細胞では対照群 $44 \pm 11$  CPM/ $10^6$  WBC, 4時間群 $37 \pm 17$ , 48時間群 $19 \pm 10$ であった。

## 2) 主要脂質分画への $^{14}\text{C}$ のとりこみ百分率

磷脂質分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表3及び図3に示すように、肝では対照群 $49.1 \pm 6.5\%$ , 4時間群 $40.0 \pm 6.7\%$ , 48時間群 $20.3 \pm 5.9\%$ であった。四塩化炭素投与後、肝では磷脂質への $^{14}\text{C}$ のとりこみは相対的に減少することが認められ、48時間では対照

Fig.3 Percentage of  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into major lipids fractions by whole blood and liver tissue of ratTable 3. Percentage of  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into major lipids fractions by whole blood and liver tissue of rat

	control		4 hrs.		48 hrs.	
	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue
	7 cases	7	7	6	8	5
PL	41.9±3.2	49.1±6.5	39.5±7.8	40.0±6.7	37.5±4.2	20.3±5.9
FC	11.4±1.9	39.6±5.9	8.2±1.4	25.9±8.3	7.6±1.7	51.2±15.5
NEFA	38.2±3.9	3.9±0.8	46.9±8.1	10.2±4.0	50.4±3.8	5.3±2.8
TG	3.0±1.1	2.7±0.9	2.7±0.7	19.9±6.3	2.6±1.1	17.3±6.8
EC	2.8±0.7	2.7±0.6	1.7±0.8	4.0±3.2	1.2±0.6	4.7±1.1

(M. ± S. D.)

群の約1/2に減少した。血液細胞では対照群 $41.9 \pm 3.2\%$ 、4時間群 $39.5 \pm 7.8\%$ 、48時間群 $37.5 \pm 4.2\%$ であった。

中性脂肪分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表3及び図3に示すように、肝では対照群 $2.7 \pm 0.9\%$ 、4時間群 $19.9 \pm 6.3\%$ 、48時間群 $17.3 \pm 6.8\%$ であった。血液細胞では対照群 $3.0 \pm 1.1\%$ 、4時間群 $2.7 \pm 0.7\%$ 、48時間群 $2.6 \pm 1.1\%$ であった。四塩化炭素投与後対照群に比し肝では各群とも増加を示すが、血液細胞では低下傾向を認めた。

遊離コレステロール分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表3及び図3に示すように、肝では対照群 $39.6 \pm 5.9\%$ 、4時間群 $25.9 \pm 8.3\%$ 、48時間群 $51.2 \pm 15.5\%$ であった。血液細胞では対照群 $11.4 \pm 1.9\%$ 、4時間群 $8.2 \pm 1.4\%$ 、48時間群 $7.6 \pm 1.7\%$ であった。四塩化炭素投与後、肝における48時間での遊離コレステロールの合成増加は後述の肝再生と関連しているため注目される。

遊離脂肪酸分画へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表3及び図3に示すように、肝では対照群 $3.9 \pm 0.8\%$ 、4時間群 $10.2 \pm 4.0\%$ 、48時間群 $5.3 \pm 2.8\%$ であった。血液細胞では、対照群 $38.2 \pm 3.9\%$ 、4時間群 $46.9 \pm 8.1\%$ 、48時間群 $50.4 \pm 3.8\%$ であった。肝及び血液細胞がすでに4時間で遊離脂肪酸への $^{14}\text{C}$ とりこみの相対的増加を示したことは肝再生と関連して興味がある。

エステル型コレステロールへとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表3及び図3に示すように、肝では対照群 $2.7 \pm 0.6\%$ 、4時間群 $4.0 \pm 3.2\%$ 、48時間群 $4.7 \pm 1.1\%$ であった。血液細胞では対照群 $2.8 \pm 0.7\%$ 、4時間群 $1.7 \pm 0.8\%$ 、48時間群 $1.2 \pm 0.6\%$ であった。

第3節 1- $^{14}\text{C}$  Acetate Na から各脂肪酸への $^{14}\text{C}$ のとりこみ

四塩化炭素投与時の脂肪酸合成について、1- $^{14}\text{C}$

Acetate Na から主要脂肪酸への $^{14}\text{C}$ とりこみを総脂肪酸へとりこまれた $^{14}\text{C}$ に対して占める比率の面から検討した。この際、ミリスチン酸、パルミチン酸は、malonyl CoA Pathway で合成が行なわれることが知られているので一括して示した。

ミリスチン酸 (14:0)、パルミチン酸 (16:0) への $^{14}\text{C}$ のとりこみの比率は表4及び図4に示すように、肝では対照群 $40.1 \pm 5.6\%$ 、4時間群 $39.5 \pm 4.0\%$ 、48時間群 $36.9 \pm 5.0\%$ であった。一方血液細胞では対照群 $37.8 \pm 3.0\%$ 、4時間群 $35.6 \pm 5.1\%$ 、48時間群 $30.1 \pm 1.7\%$ であり肝での変動と同様の態度を示した。

ステアリン酸 (18:0) へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表4及び図4に示すように、肝では対照群 $8.1 \pm 1.3\%$ 、4時間群 $4.3 \pm 1.0\%$ 、48時間群 $7.7 \pm 2.9\%$ であった。血液細胞では、対照群 $12.6 \pm 1.5\%$ 、4時間群 $10.5 \pm 1.6\%$ 、48時間群 $11.2 \pm 1.1\%$ であった。肝及び血液細胞ともに4時間で減少するが、48時間では対照群との差は軽微であった。

オレイン酸 (18:1) への $^{14}\text{C}$ のとりこみの比率は表4及び図4に示すように、肝では対照群 $3.8 \pm 1.3$

Fig.4 Percentage of  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into each fatty acids by whole blood and liver tissue of rat

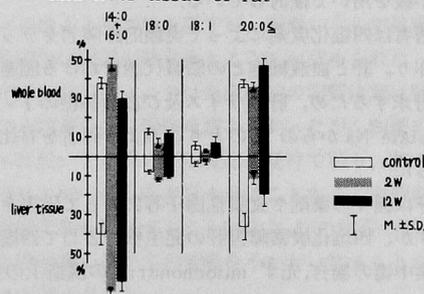


Table 4. Percentage of  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into each fatty acids by whole blood and liver tissue of rat

	control		4 hrs.		48 hrs.	
	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue	whole blood	liver tissue
	7 cases	7	7	6	8	5
14:0 + 16:0	$37.8 \pm 3.0$	$40.1 \pm 5.6$	$35.6 \pm 5.1$	$39.5 \pm 4.0$	$30.1 \pm 1.7$	$36.9 \pm 5.0$
18:0	$12.6 \pm 1.5$	$8.1 \pm 1.3$	$10.5 \pm 1.6$	$4.3 \pm 1.0$	$11.2 \pm 1.1$	$7.7 \pm 2.9$
18:1	$5.7 \pm 2.1$	$3.8 \pm 1.3$	$4.0 \pm 0.6$	$1.9 \pm 0.6$	$4.3 \pm 1.3$	$3.2 \pm 2.9$
20:0 ≤	$37.8 \pm 2.2$	$36.0 \pm 6.8$	$44.2 \pm 6.3$	$42.0 \pm 4.3$	$50.2 \pm 3.4$	$46.0 \pm 5.4$

(M. ± S. D.)

%, 4時間群 $1.9 \pm 0.6\%$ , 48時間群 $3.2 \pm 2.9\%$ であった。血液細胞では、対照群 $5.7 \pm 2.1\%$ , 4時間群 $4.0 \pm 0.6\%$ , 48時間群 $4.3 \pm 1.3\%$ であり、肝及び血液細胞ともにステアリン酸の場合と同様の変動を示した。

アラキジン酸(20:0)以上の長鎖脂肪酸へとりこまれた $^{14}\text{C}$ の比率は表4及び図4に示すように、肝では対照群 $36.0 \pm 6.8\%$ , 4時間群 $42.0 \pm 4.3\%$ , 48時間群 $46.0 \pm 5.4\%$ であった。血液細胞では対照群 $37.8 \pm 2.2\%$ , 4時間群 $44.2 \pm 6.3\%$ , 48時間群 $50.2 \pm 3.4\%$ であった。肝及び血液細胞ともに四塩化炭素投与時にアラキジン酸以上の長鎖脂肪酸への $^{14}\text{C}$ とりこみの増加がみられた。

#### 第4章 総括及び考按

Acetateを基質とした血液細胞の脂質合成には白血球、粒球及び幼若赤血球が関与することが知られている。 $^{14}\text{C}$ 血液細胞は体内の血液全量とヘマトクリット値より推定すればかなりの量となり、血液細胞全体としてはあるいは肝臓よりも多くの脂質を生成している可能性がある。Pastore et al<sup>14</sup>およびJames et al<sup>15</sup>は血液細胞が相当量の脂質を合成することを報告しており、一方1967年木畑らは高脂血症患者における脂質合成の異常について、全血及び血小板を用いて検討している。

著者は四塩化炭素によって実験的肝障害をラットに作り、肝と血液細胞との脂質代謝における関連性を追求するため、肝スライス及び血液細胞の $1-^{14}\text{C}$  Acetate Naからの $^{14}\text{C}$ のとりこみより両者を対比検討した。

肝は種々の薬剤や食餌性因子等によって障害をおこすが、四塩化炭素障害肝の発生機作として四塩化炭素中毒の場合、先ず mitochondria の構造上の変化として膜透過性の変化<sup>16</sup>や mitochondria 内での、 $\text{K}^+$ 減少と水の増加による変化<sup>17</sup>が、生化学的な面では、NADに依存する脱水素酵素の活性低下<sup>18</sup>、 $\text{Mg-ATPase}$ の活性化<sup>19</sup>、TCA回路の抑制<sup>19</sup>、酸化的リン酸化障害<sup>19</sup>、mitochondria 内補酵素含有量の低下等<sup>20,21</sup>が考えられているが、Recknagel<sup>23,22</sup>は四塩化炭素障害後2時間における mitochondria の呼吸機能を測定し、この時間にはまだ障害がみられないこと、一方microsomeに存在する肝のglucose-6-phosphataseはこのときすでに33%の減少を示し、また、microsomeのNADH, cytochrome C Reductaseも減少していることを示し、このことから四塩化炭素

障害肝発生の一次的な原因は mitochondria の機能障害にあるのではなく、endoplasmic reticulumの障害にあると考えられると述べている。一方脂肪酸の生合成は主に mitochondria 外、即ち malonyl CoA pathway で行われ、生合成に関与するピリジヌクレオチドは還元型で、しかも細胞内で還元型は主としてミトコンドリア外にNADH, NADPHの形で存在する方が多いとされている(今井ら<sup>24</sup>)。また、Acetateを基質とした脂質合成には、酢酸COAがATPとピオチン酵素によってマロニルCOAを生成しマロニル誘導体を経て生成されることが明らかとなっている。<sup>24</sup>

著者の実験成績において、四塩化炭素投与後4時間に於いて、肝スライスでは $1-^{14}\text{C}$  Acetate Naからの総脂質、総脂酸、不けん化脂質への $^{14}\text{C}$ とりこみの著明な抑制がみられる。このことは四塩化炭素を投与した際に、TCA回路の抑制、それに附随する酸化的リン酸化障害によるATP生成減少のためピオチン酵素が活性化され難く、更に脂肪酸の生合成に関与するNADPHの減少するためと考えられる。一方血液細胞の4時間では総脂質、総脂酸、不けん化脂質への $^{14}\text{C}$ とりこみは、肝のそれとは逆に増加傾向を示した。血液細胞での脂質合成が肝における変動と同一方向を示さず、むしろ逆の態度を示したことは極めて興味深い。その機作について強いて考察すれば肝での脂質合成抑制を代償するように推定される。

Byers & Friedman<sup>25</sup>は肝が常時大量の中性脂肪を血中に放出していることを明らかにしている。四塩化炭素投与時には血清の中性脂肪が早期から減少する<sup>26</sup>が、このことはいわゆるHepatic Triglyceride Secretory Mechanismの障害と考えられている。著者の実験成績において肝では4時間で中性脂肪への $^{14}\text{C}$ とりこみ絶対量の減少がみられることより、四塩化炭素投与時に血清の中性脂肪が減少する1つの要因に肝での中性脂肪生成抑制が関与していると推定される。一方血液細胞では $^{14}\text{C}$ とりこみの増加傾向がみられ、肝での中性脂肪生成抑制を代償するかの如き傾向がみられた。

著者の行なった急性障害実験で4時間後の肝での各脂質への $^{14}\text{C}$ とりこみをみると、Net Countでは各脂質ともに減少するが、この際百分率で検討すると燐脂質で低下、中性脂肪、遊離脂肪酸で増加を示している。このことは四塩化炭素投与時には肝での各脂質合成は全体として抑制され、脂質代謝パターンに変動を来すことが示唆される。すなわち遊離脂肪

酸の相対的増加を来し中性脂肪生成が優位を占めると考えられ、肝よりの血中放出障害<sup>23)</sup>とともに脂肪肝の成因として中性脂肪の相対的合成亢進が示唆される。磷脂質が相対的、絶対的に低下することを示したが、この点について酒井ら<sup>24)</sup>はP<sup>32</sup>の肝磷脂質へのとりこみは四塩化炭素障害3時間後にすでに対照より減少しており、そのときの肝の中性脂肪の増加を報告している。事実、肝におけるリポ蛋白の合成、肝より血中への放出に際して磷脂質が重要な役割を果たすことはみとめられている。<sup>25)</sup>一方この時点で血液細胞での各脂質への<sup>14</sup>CとりこみをNet Count及び百分率で検討すると、遊離脂肪酸への<sup>14</sup>Cとりこみの増加を認めるが中性脂肪は百分率でみるとむしろ減少傾向を示している。このように四塩化炭素投与時には肝のみならず血液細胞の脂質代謝にも変動が認められる。この際、興味あることは、肝で相対的に中性脂肪合成が亢進している時に、血液細胞では遊離脂肪酸合成亢進がみられることである。即ち血液細胞での遊離脂肪酸生成が亢進し、その結果肝への遊離脂肪酸の供給源となり血液細胞が肝での中性脂肪生成に、従って脂肪生成に対して促進的に関与していることが示唆される。

四塩化炭素投与後48時間の肝での<sup>14</sup>Cの総脂質、総脂酸、不けん化脂質へのとりこみは対照群に比して著明な増加を認めた。また、各脂質への<sup>14</sup>CとりこみNet Countは増加し、これを百分率で検討すると、4時間と同様、中性脂肪、遊離脂肪酸の相対的増加を認め中性脂肪合成がより一層亢進していることが明らかである。野田ら<sup>26)</sup>は四塩化炭素投与で著明な肝の中心性壊死をマウスに起し、肝再生を<sup>3</sup>H-thymidineオートラジオグラフィで検査し、四塩化炭素投与後2日程度のlag timeの後、爆発的な肝細胞核DNAの合成がみられ、肝実質細胞については正常の約1,600倍に及ぶと述べている。著者の48時間での実験成績は肝再生が著明にみられる時期にあたり、肝細胞核DNAの合成亢進に一致して脂質合成は全体として亢進し脂質合成酵素量の増加が推定される。特に中性脂肪合成が亢進することが認められた。ところが血液細胞での総脂質、総脂酸、不けん化脂質への<sup>14</sup>Cとりこみは対照群と比較して48時間での変動は軽微であった。血液細胞での各脂質への<sup>14</sup>CとりこみをNet Count及び百分率で検討すると遊離脂肪酸への<sup>14</sup>Cとりこみの増加を認め、中性脂肪はむしろ減少傾向を示した。肝での著明な中性脂肪合成亢進に対して血液細胞では遊離脂肪酸合成の相対的亢進が4

時間と同様に認められたが、脂質代謝全般を通して云うならば肝が著明な変化をうけるにもかかわらず対照と殆んど差を認めていない。

扱て、脂肪酸のレベルについてみるとWakilら<sup>8)</sup>の提唱する脂肪酸合成経路の2つの経路、すなわち、ミリスチン酸(14:0)、パルミチン酸(16:0)のできるmalonyl CoA pathwayと炭素数18以上の脂肪酸の合成を行なうchain elongation pathwayは肝と同様、血液細胞にも存在することが示されている<sup>11-10)</sup>が、上述の著者の成績を脂酸のレベルで<sup>14</sup>Cとりこみ百分率の変化を検討した。

肝及び血液細胞ともに四塩化炭素投与後、4時間、48時間でmalonyl CoA pathwayの抑制がみられ20:0以上の長鎖脂肪酸合成の相対的亢進が認められた。このことは先に述べた如く肝及び血液細胞ともにNADPH<sub>2</sub>の再酸化の抑制だけでなく、同時に酸化の阻害が存在すると思われ、そのためATP需要の高いmalonyl CoA pathwayが抑制されると推定される。

18:0, 18:1への<sup>14</sup>Cとりこみは肝及び血液細胞ともに四塩化炭素投与時減少ないし減少傾向を認めた。このことは炭素鎖延長酵素の活性が上昇し、chain elongation pathwayの亢進のために18:0, 18:1の相対的減少を来すと推定される。

四塩化炭素投与時、肝及び血液細胞での脂質代謝は上述のような変動を来すが、脂酸レベルでは肝と血液細胞は同様の態度をとることが認められた。即ち主要脂質のレベルでは血液細胞の脂質代謝は肝に於ける程著しい変化を認めなかったが、脂酸のレベルに於いては明らかな変化を受けて居り、然も肝のそれと同一の方向で示されることから、血液細胞の脂質代謝を検討することにより、肝の脂質の動態、特に脂肪酸レベルでの変動をうかがい知ることができると考えられる。

## 第5章 結 語

著者はwister系雄性ラットに四塩化炭素を皮下注射して実験的肝障害を作り、肝スライス及び血液細胞における1-<sup>14</sup>C Acetate Naからの<sup>14</sup>Cのとりこみを目標としてin vitroの脂質合成の面から肝及び血液細胞を対比検討し次の様な結論をえた。

1) 総脂質、総脂酸、不けん化脂質への1-<sup>14</sup>C Acetate Naからの<sup>14</sup>Cとりこみは四塩化炭素投与後4時間で肝では対照に比して著明に低下するが、血液細胞では逆に軽度の増加傾向を認めた。48時間後の

肝では肝再生のピークに一致して著明な<sup>14</sup>Cとりこみの増加を認めたが、血液細胞ではその変化は軽微であった。

2) 各脂質への<sup>14</sup>Cとりこみ百分率は注射後4時間48時間ともに肝で中性脂肪及び遊離脂肪酸が増加し血液細胞では遊離脂肪酸が増加を示した。このことより血液細胞の脂質代謝は四塩化炭素投与時脂肝生成に関与していることが推定された。

3) ラットの四塩化炭素投与時の脂酸合成に関しては、malonyl CoA pathwayの抑制及びchainel-

ongation pathwayの相対的亢進が認められた。このことは肝及び血液細胞で同時にみられ、脂酸レベルでは同様の変動を示すものと考えられた。

稿を終えるに当りご懇篤なる御指導と御校閲をいただいた恩師平木潔教授に心から感謝いたします。また直接御指導いただいた木畑正義講師に厚く御礼申し上げます。

尚本論文の要旨は第14回日本老年医学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 岩崎一郎, 木畑正義, 有森茂, 粟井弘二: 医学と生物学, 71: 2, 103, 1965.
- 2) 木畑正義, 岩崎一郎, 尾崎幸成, 藤井靖久, 水川士郎, 平木潔: 日本老年医学会雑誌, 4: 177, 1967.
- 3) 平木潔, 木畑正義: 広島医学, 21: 113, 1968.
- 4) 木畑正義, 尾崎幸成, 水川士郎, 藤井靖久, 平木潔: 高令医学, 7: 43, 1969.
- 5) 木畑正義, 水川士郎, 藤井靖久, 藤沢義人: 血液と脈管, 1: 661, 1970.
- 6) 木畑正義: 診察, 23: 37, 1970.
- 7) 木畑正義, 水川士郎, 尾崎幸成, 藤井靖久, 巻幡博之, 岩崎一郎, 平木潔: 第10回日本老年病学会, 1968. 札幌
- 8) Wakil, S. J. : J. Lipid Res., 2: 1, 1961.
- 9) Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. : J. Biol. Chem., 226: 497, 1957.
- 10) Björntorp, P. : Polyunsaturated fatty acids in man. Göteborg. 1960
- 11) Metcalfe, L. D. & Schmitz, A. A. : Anal. Chem., 33: 363, 1961.
- 12) Awai, K. : Metabolism., 13: 543, 1964
- 13) 高橋善弥太: 肝臓, 17: 543, 1966.
- 14) Pastor, E. J. & Lionetti, F. J. : Fed. Proc., 17: 287, 1958.
- 15) James, A. T., Lovelock, J. E. & Webb, J. P. W. : Biochem. J., 73: 106, 1959.
- 16) Christie, G. S. & Judah, J. D. : Proc. Roy. Soc. London B. 142: 241, 1954.
- 17) Share, L. & Recknagel, R. O. : Am. J. Physiol. 197: 121, 1959.
- 18) Recknagel, R. O. & Anthony, D. D. : Fed. Proc., 16: 105, 1957.
- 19) Calvert, D. N. & Brody, T. M. : J. Pharmacol. Expt. Therap., 124: 273, 1959.
- 20) Davis, H. A. : Arch. Surg., 48: 185, 1944.
- 21) 本多文夫: ビタミン, 20: 60, 1960.
- 22) Recknagel, R. O. & B. Lombardi: J. Biol. Chem., 236: 564, 1961.
- 23) Recknagel, R. O., Rao, K. S. & Glende, Jr, E. A. : Exp. Mol. Path., 12: 324, 1970.
- 24) 今井陽, 坂上利夫: 脂質の生化学, 朝倉書店, 東京.
- 25) Byers, S. O. & M. Friedman : Am. J. Physiol., 198: 629, 1960
- 26) K. Tomokuni : Acta Med. Okayama, 24: 315, 1970.
- 27) 酒井幸男: 日本臨床代謝学会記録III. 日本臨床代謝学会, 100, 1966.
- 28) 藤沢洵, 高橋忠雄: 日本臨床代謝学会記録III. 日本臨床代謝学会, 112, 1966.
- 29) 野田茂寿, 中沢幸胤, 内田雄幸: 肝臓, 12: 313, 1971.

Studies on Comparison of Lipid Metabolism in Whole Blood Cells and Liver  
Part I. The Effect of Acute Carbon Tetrachloride Intoxication on Lipid  
Metabolism

by

Mitsuo Kawauchi

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. K. Hiraki)

The present study was designed to investigate some role of whole blood cells in lipid metabolism compared to that of liver in acute carbon tetrachloride intoxicated rats.

In order to determine this, *in vitro* incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate Na into gross lipid fractions, major lipid fractions and total fatty acids was studied.

The experimental animals employed were male Wistar rats, which were subjected to subcutaneous injection of 50%  $\text{CCl}_4$  in olive oil, 0.2ml/100gm. of body weight. Animals were sacrificed at time intervals of 4 and 48 hours following treatment. The results obtained are summarized as follows:

- 1)  $^{14}\text{C}$  incorporation by liver slices into total lipids, unsaponifiable lipids and total fatty acids was markedly decreased at 4 hours, but at 48 hours it was strikingly increased in accordance with liver cell regeneration. On the other hand,  $^{14}\text{C}$  incorporation by whole blood cells into each of them showed a trend toward an increase at 4 hours, although there were few differences between carbon tetrachloride administered rats and controls at 48 hours.
- 2) Percent  $^{14}\text{C}$  incorporation by liver slices into TG and NEFA increased significantly following  $\text{CCl}_4$  treatment, while whole blood cells incorporated relatively more radioactivity into NEFA than that of controls. Consequently it is considered that fatty liver would be caused by enhancement of TG and NEFA synthesis in liver, and at the same time lipid metabolism in whole blood cells would contribute to fatty liver.
- 3) In acute  $\text{CCl}_4$  intoxication of rats, a decrease of percent  $^{14}\text{C}$  incorporation by liver slices into fatty acid group 14 : 0 + 16 : 0, namely the decreased activity of malonyl CoA pathway was observed, while that into 20 carbons and more longer chains, fatty acids, formed via mitochondrial pathway, showed a significant relative increase; the results being similar to those observed with whole blood cells.