

四塩化炭素肝障害に対する Diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (malotilate) の作用

片倉道啓 八田 慎一 齊藤利和
竹村晴夫 大鹿英世 田中 護*
札幌医科大学薬理学講座 (主任 大鹿英世 教授)

Protective Effects of Diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (malotilate) on Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury in Rats

Michihiro KATAKURA, Shinichi HATTA, Toshikazu SAITO, Haruo TAKEMURA
Hideyo OHSHIKA and Mamoru TANAKA*
Department of Pharmacology, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Ohshika)

Malotilate was reported to inhibit carbon tetrachloride (CCl₄)-induced elevation of serum transaminases and the accumulation of liver total lipid. The present study was undertaken to examine the effects of malotilate on CCl₄-induced hepatic accumulation of calcium and attenuation of the plasma cyclic AMP response to glucagon in rats.

CCl₄ (2.5 ml/kg) was administered to rats by a stomach tube. Malotilate (10 or 50 mg/kg) was orally administered to rats six hours before CCl₄ administration.

Calcium concentrations in liver homogenate and liver mitochondrial fraction were markedly increased at 24 hours after CCl₄ intoxication. Pretreatment with malotilate (50 mg/kg) effectively inhibited CCl₄-induced accumulation of calcium both in the homogenate and in the mitochondrial fraction at 24 hours.

Malotilate (10 or 50 mg/kg) alone significantly increased the bile flow in normal rats. The bile flow and the biliary excretion of sulfobromophthalein were decreased in rats 24 hours after CCl₄ intoxication. The decrease was prevented by pretreatment with 10 or 50 mg/kg of malotilate. Malotilate also prevented CCl₄-induced increases in serum GOT, GPT and total bilirubin at 24 hours after the administration.

A change in plasma cyclic AMP level in response to glucagon reflects the hepatic responsiveness to glucagon. Plasma cyclic AMP was remarkably increased by glucagon (100 µg/kg, s.c.) in normal rats. In contrast, glucagon-induced increase in plasma cyclic AMP was attenuated in rats at 24 hours after CCl₄ intoxication, and the depressed response in plasma cyclic AMP to glucagon was still observed at 72 hours after the administration. Pretreatment with malotilate (50 mg/kg) caused the significant inhibition of CCl₄-induced attenuation in the plasma cyclic AMP response to glucagon at 24 hours after the intoxication, and a rapid recovery toward the normal level in plasma cyclic AMP response was observed at 72 hours.

These findings suggest that malotilate has the protective effect against liver injury induced by CCl₄.

(Received June 22, 1984 and accepted July 23, 1984)

Key words: Malotilate, Carbon tetrachloride, Hepatic accumulation of calcium, Plasma cyclic AMP response

*札幌医科大学名誉教授 (Professor Emeritus of Sapporo Medical College)

1 緒 言

Diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (一般名: malotilate) は胆汁流量, 肝血流量増加作用¹⁾, 蛋白質合成促進作用²⁾を有する化合物で, 四塩化炭素 (CCl₄)³⁾, ethionine⁴⁾, および D-galactosamine⁵⁾ による肝障害に対して, 障害発現の抑制, あるいは障害肝の回復促進作用を示すことが報告されている。さらに, 臨床試験においても慢性肝疾患に対する malotilate の有用性が示唆されている⁶⁾。

CCl₄ の投与によって, 細胞の壊死と関連をもつと思われる肝細胞での calcium の異常な蓄積^{7,8)} や, sulfobromophthalein (BSP) などの色素の胆汁内排泄の低下^{9,10)} が生じる。これらの障害の発現には, 肝 microsome で代謝された CCl₄ 由来の free radical による脂質の過酸化が関与しているものと考えられる¹¹⁾。脂質の過酸化を阻止する処置が, 肝組織での calcium の異常な蓄積や, BSP の胆汁内排泄低下等の肝機能の低下を抑制することは我々が既に報告している⁸⁾。

Malotilate は, CCl₄ による脂質の過酸化を *in vivo* および *in vitro* において抑制する¹¹⁾ ので, malotilate による, CCl₄ 肝障害の発現抑制には, この脂質過酸化抑制作用が主要な役割を果しているものと思われる。

本研究は, 脂質過酸化抑制作用を有している malotilate の, CCl₄ 投与によって生じる肝組織での calcium の蓄積, ならびに BSP の胆汁内排泄低下に関する阻止効果を検討する目的で行なわれた。

一方膵臓ホルモンの一つである glucagon は, cyclic AMP を second messenger として, 肝臓の glycogen 分解や糖新生の調節に関与していることが良く知られている。近年, glucagon を負荷した際の, 肝臓由来と考えられる血中 cyclic AMP の上昇が, CCl₄ 肝障害時に減弱していることが報告された¹²⁾。この CCl₄ 障害肝の glucagon に対する応答性の低下は, 肝臓での glucagon レセプターの減少¹³⁾ によるものと思われる。そこで, 本研究において我々は, CCl₄ 肝障害に対する malotilate の作用を, glucagon に対する肝臓の応答性という観点から併せて検討を行った。

2 実験材料および実験方法

2.1 実験動物

実験には雄性 Sprague-Dawley 系ラット, 210 匹 (体重 200-250 g) を用い, 水, 飼料 (オリエンタル, NMF) は自由に摂取させた。

CCl₄ (2.5 ml/kg body weight) は 50% olive oil 溶

液として, ポリエチレンチューブを介し経口的に投与した。対照には同量の olive oil を投与した。

Malotilate は水に難溶性のため, olive oil 溶液として, 10 あるいは 50 mg/kg を, CCl₄ 投与 6 時間前にポリエチレンチューブを介して経口的に投与した。無処置群には, olive oil のみを投与した。使用した malotilate は日本農薬株式会社より提供を受けた。

2.2 肝臓組織内 calcium 量の測定

ラットを ether 麻酔下で開腹し, 門脈に挿入したポリエチレンチューブを介して, ice-cold saline で灌流した。肝内の血液を洗い除いた後, 肝臓を摘出し, 0.25 M sucrose で 10% homogenate とした。肝 mitochondria 分画は Carafoli and Tiozzo¹⁴⁾ の方法に従って調製した。10% homogenate および mitochondria 分画中の calcium 濃度は斎藤ら⁸⁾ の方法に従って, 原子吸光光度計 (日立 208 型) で測定した。Homogenate および mitochondria 分画 suspension の蛋白量は Lowry *et al.*¹⁵⁾ の方法で測定し, calcium 量は nmol/mg protein として表示した。

2.3 胆汁流量および BSP 胆汁内排泄量の測定

ラットを pentobarbital (40 mg/kg, i. p.) 麻酔下で開腹し, 総胆管へ挿入したポリエチレンチューブ (外径 0.8 mm, アトム製特注) によって胆汁を採取した。胆汁採取開始 30 分後, BSP (第一製薬) 25 mg/kg を大腿静脈より投与し, その後 90 分間胆汁を採取した。採取した胆汁は 1N NaOH で 100-1000 倍に希釈し, BSP を 580 nm で比色定量した。

2.4 血清 transaminases および血清 bilirubin の測定

ラットを ether 麻酔下で開胸し, 心臓穿刺により, 血液を採取し, 3,000 rpm, 5 分間遠心して血清を分離した。血清 transaminases は「血清トランスアミナーゼ測定用試薬」キット (ヤマトロン) を用いて 510 nm で比色定量した。また, 血清総 bilirubin は「ビリルビン測定試薬」キット (和光純薬) を用い, 600 nm で比色定量した。

2.5 Plasma cyclic AMP の測定

Pentobarbital (40 mg/kg, i. p.) 麻酔下, ラット尾静脈より血液 25 μ l を採取した。ただちに 10 mM EDTA-4Na 含有の saline (pH 7.4) 200 μ l に混和した。混和液を遠心後, 得られた上清 100 μ l を cyclic AMP の定量に用いた。Cyclic AMP の定量は, Yamasa cyclic AMP assay kit (ヤマサ) を用いて, radio-immunoassay¹⁶⁾ によって行った。Glucagon (100 μ g/kg) (Novo, Denmark) は背部皮下へ投与し, 採血は glucagon 投与前, および投与後 10, 20, 30 お

よび40分の時点でを行った。

実験結果はmean±S. E. で表示し、統計検定には Student's t-test を用いた。

3 実験結果

3.1 肝組織 calcium 量の変動

肝 homogenate および mitochondria 分画での calcium 量の変動を Fig. 1 と Fig. 2 に示した。正常ラット肝 homogenate での calcium 量は、 2.7 ± 0.5 nmol/mg protein であった (Fig. 1)。Calcium 量は CCl_4 (2.5 ml/kg) 投与 24 時間後に正常対照値の約 9.8 倍にまで増加したが、48 時間以後は、ほぼ対照値のレベルまで減少した。一方、 CCl_4 投与 6 時間前に malotilate (50 mg/kg) を前処置したラットでは、 CCl_4 投与 24 時間後でも calcium の増加は CCl_4 投与前の約 1.7 倍にとどまり、 CCl_4 単独投与群と比較して、その増加の程度は有意に低かった。

肝 mitochondria 分画における calcium 量の変動も、肝 homogenate での場合とほぼ同様であった (Fig. 2)。

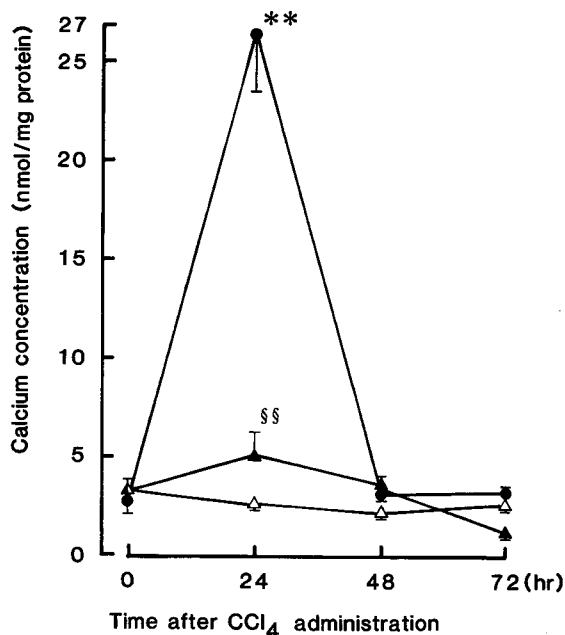


Fig. 1 Effect of malotilate on calcium concentration in liver homogenate after CCl_4 administration. The values are mean±S. E. The number of observation is 3-6.

●, vehicle+ CCl_4 ;

△, malotilate(50 mg/kg)+olive oil;

▲, malotilate(50 mg/kg)+ CCl_4 .

** $p < 0.01$ compared with the value at time 0.

§§ $p < 0.01$ compared with vehicle+ CCl_4 .

正常ラット肝 mitochondria 分画での calcium 量は 7.3 ± 0.8 nmol/mg protein であった。 CCl_4 投与 24 時間後、calcium は約 8.1 倍の増加を示したが、48 時間以後は対照値のレベルまで減少した。 CCl_4 投与 24 時間後で見られた mitochondria 分画における calcium の増加は、肝 homogenate の場合と同様に、malotilate の前処置ではほぼ抑制された。なお、malotilate のみの処置で、肝 homogenate および mitochondria 分画での calcium 量に著しい影響は認められなかった。

3.2 胆汁流量および BSP 胆汁内排泄量の変動

Malotilate の 10 および 50 mg/kg の処置によって、胆汁流量は、無処置正常ラットでの値と比較して各々、21% および 31% と有意に増加した (Table 1)。 CCl_4 投与 24 時間後のラットでの胆汁流量は、正常対照値の約 41% に減少したが、malotilate (10 あるいは 50 mg/kg) を前処置したラットでは、 CCl_4 による胆汁流量の減少は観察されなかった。

BSP の胆汁内排泄量は、 CCl_4 投与 24 時間後で正常対照群の値の約 34% に減少した (Table 1)。この CCl_4 による BSP 胆汁内排泄量の減少は、malotilate の 10

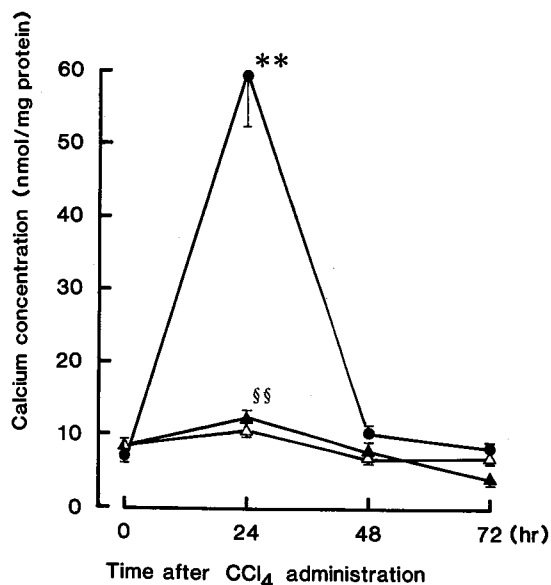


Fig. 2 Effect of malotilate on calcium concentration in mitochondria fraction after CCl_4 administration. The values are mean±S. E. The number of observation is 3-5.

●, vehicle+ CCl_4 ;

△, malotilate(50 mg/kg)+olive oil;

▲, malotilate(50 mg/kg)+ CCl_4 .

** $p < 0.01$ compared with the value at time 0.

§§ $p < 0.01$ compared with vehicle+ CCl_4 .

Table 1 Effects of malotilate on bile flow and biliary excretion of BSP in rats 24 hours after CCl_4 administration.

Treatment	No.	Bile flow (ml/kg/90 min)	BSP excreted into bile (mg/kg/90 min)
Vehicle — Olive oil	7	4.57±0.23	12.02±1.69
Malotilate (10) — Olive oil	3	5.53±0.14*	10.37±1.01
Malotilate (50) — Olive oil	5	6.00±0.63*	11.64±2.97
Vehicle — CCl_4	3	1.86±0.87**	4.14±2.02*
Malotilate (10) — CCl_4	4	4.89±0.58§	9.51±0.58§
Malotilate (50) — CCl_4	5	5.68±0.62§	9.62±0.45§

The values are mean±S.E. Doses of malotilate (mg/kg) are shown in parentheses.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with vehicle+olive oil.

§ $p < 0.05$ compared with vehicle+ CCl_4 .

および 50 mg/kg の前処置によって有意に抑制された。

3・3 血清 transaminases および bilirubin レベルの変動

前述したごとく、肝組織 calcium 量および BSP 胆汁内排泄に関して malotilate は CCl_4 による障害の発現を効果的に抑制した。さらに、この malotilate の CCl_4 肝障害に対する抑制作用は、血清 transaminases および bilirubin レベルの変動においても認められた。Fig. 3 の

A および B に示すごとく、血清 GOT および GPT レベルは、 CCl_4 投与後 24 時間で著しい上昇を示し、その値は正常対照値の各々、約 19 倍および 17 倍に達した。これらの transaminases レベルの上昇は、malotilate(50 mg/kg) の前処置によって著しく抑制され、ほぼ対照レベルに戻った。同様に、血清総 bilirubin レベルも CCl_4 投与後 24 時間で正常対照値の約 11 倍に上昇したが、malotilate の前処置は、この上昇も効果的に抑制

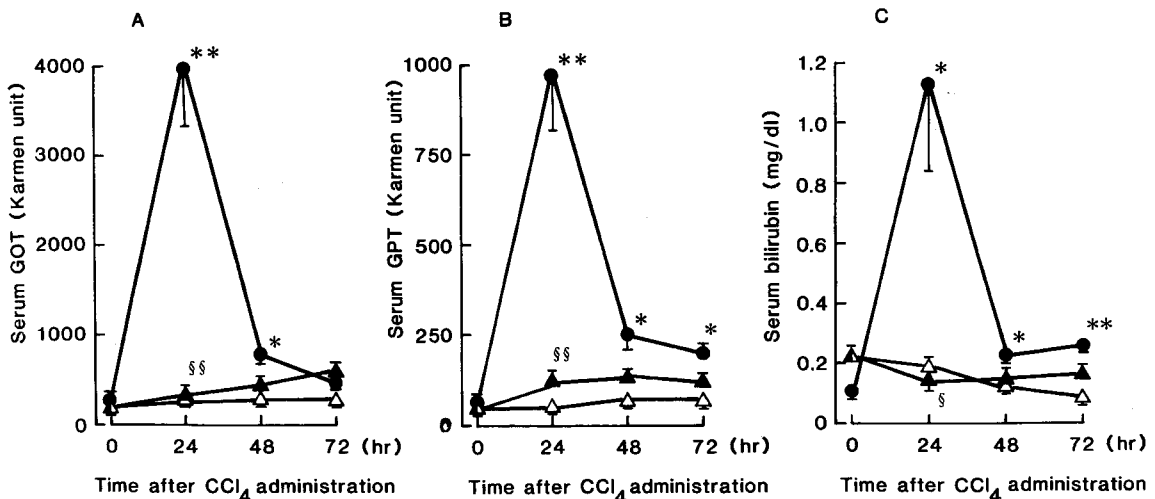


Fig. 3 Effects of malotilate on serum transaminases and bilirubin levels after CCl_4 administration.

The values are mean±S.E. The number of observations is 4-6.

●, vehicle+ CCl_4 ; △, malotilate(50 mg/kg)+olive oil; ▲, malotilate(50 mg/kg)+ CCl_4 .

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the value at time 0. § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ compared with vehicle+ CCl_4 .

した (Fig. 3, C).

3-4 Glucagon に対する plasma cyclic AMP 応答の変動

Glucagon は肝細胞膜の glucagon レセプターを介して adenylylase を活性化し、その結果形成される cyclic AMP を second messenger として、肝細胞での glycogen 分解および糖新生を促進する^{17,18)}ことが知られている。Glucagon を投与した際血中で増加する cyclic AMP は、主として肝細胞由来のものであるので¹⁹⁾、glucagon を投与した際の血中 cyclic AMP レベルを測定することで肝臓の glucagon に対する応答性を検討することが可能となる。CCl₄ 投与 24 時間後、ラットに glucagon を投与した際の plasma cyclic AMP レベルの変動について、Fig. 4 に示した。正常対照ラットへ glucagon (100 μg/kg) を投与した際、plasma cyclic AMP は glucagon 投与後 20 分でピークとなり、投与前の 428% まで上昇し、その後 40 分までに漸次減少した。しかし CCl₄ 投与のラットでは、glucagon によ

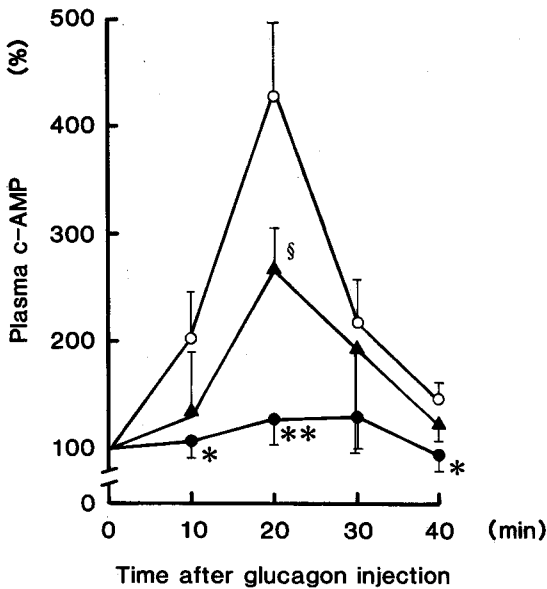


Fig. 4 Effect of malotilate on the plasma cyclic AMP response to glucagon in rats at 24 hour after CCl₄ administration. The values are mean ± S.E. The number of observation is 3-6. Glucagon (100 μg/kg, s. c) was injected to rats at time 0.

○, vehicle+olive oil; ●, vehicle+CCl₄; ▲, malotilate(50 mg/kg)+CCl₄.

* p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the value at time 0. § p < 0.05 compared with vehicle+CCl₄.

る plasma cyclic AMP の上昇は殆ど見られなかった。一方、この glucagon に対する plasma cyclic AMP 応答での CCl₄ による低下は、malotilate (50 mg/kg) の前処置で有意に抑制され、20 分での cyclic AMP 上昇の程度は正常対照値のレベルに近づいた。さらに plasma cyclic AMP 応答低下に対する malotilate の抑制作用は、CCl₄ 投与後 72 時間の時点で一層顕著になり、glucagon による cyclic AMP 上昇の程度に正常対照群とほぼ差がなくなった (Fig. 5).

4 考 察

障害肝モデルの作成に広く用いられている CCl₄ の投与は肝臓で蛋白質合成の障害、脂質の蓄積²⁰⁾、cytochrome P-450 含量の低下²¹⁾、BSP 色素の胆汁内排泄の障害^{9,10)}、などの変化をひき起こす。なかでも、肝細胞での calcium の異常な蓄積は、細胞の壊死とも直接的な関連を持つものと考えられている²²⁾。本実験においても Fig. 1 と Fig. 2 で示したごとく、CCl₄ の投与によ

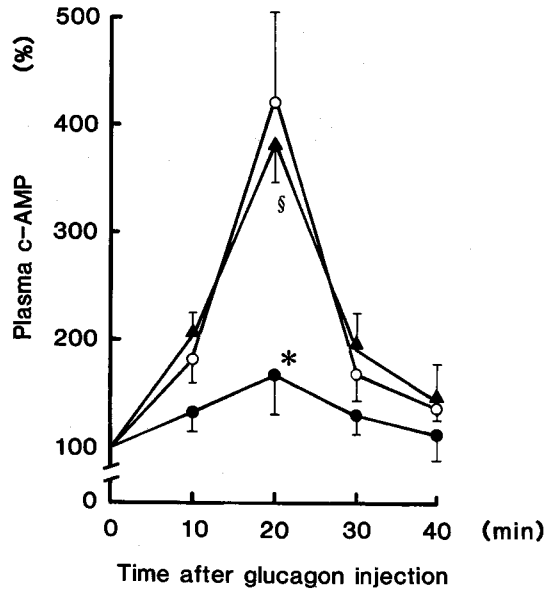


Fig. 5 Effect of malotilate on the plasma cyclic AMP response to glucagon in rats at 72 hour after CCl₄ administration. The values are mean ± S.E. The number of observation is 3-6. Glucagon (100 μg/kg, s. c) was injected to rats at time 0.

○, vehicle+olive oil; ●, vehicle+CCl₄; ▲, malotilate(50 mg/kg)+CCl₄.

* p < 0.05 compared with the value at time 0. § p < 0.05 compared with vehicle+CCl₄.

て肝 homogenate および mitochondria 分画で、calcium の著しい蓄積が認められた。これらの calcium の蓄積は、CCl₄ 投与 6 時間前に malotilate を前処置することによって有意に抑制された。CCl₄ 障害肝の mitochondria における calcium の蓄積は、障害によって増加した cytosol 中の calcium を mitochondria が取りこむことによって生じると思われる^{5,23}。従って、malotilate が、CCl₄ による mitochondria での calcium の蓄積を抑制するという結果 (Fig. 2) は、CCl₄ によって生じる肝細胞内への大量の calcium の流入を、malotilate が効果的に抑制していることみすものであろう。

CCl₄ 障害肝で生じる calcium の異常な蓄積がどのような機序によってもたらされているのか、まだ十分には理解されていない。しかしながら、microsome での CCl₄ の代謝によって形成された free radical による脂質の過酸化の結果、calcium の膜透過性を増大させるような plasma membrane の損傷や、あるいは active Ca²⁺ extrusion mechanism の障害が生じて、それらのことが原因となり、大量の calcium の蓄積が生じるものと考えられている²⁴。また、active Ca²⁺ extrusion mechanism については、microsome 分画での Mg-ATP dependent Ca²⁺ pump による細胞内から細胞外への Ca²⁺ の pumping 機構の障害が、Moore *et al.*^{23,25} や Recknagel *et al.*²⁴ によって示唆されている。

このように、CCl₄ 投与後、比較的早期に生じる free radical による脂質の過酸化と、より後期に発現する細胞機能の著しい損傷とは密接な関連を持っているものと考えられる。脂質過酸化抑制作用を有する malotilate¹¹ の前処置が、CCl₄ による肝組織での calcium の異常な蓄積を抑制するという本研究での結果は、抗酸化剤の N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine についての我々の報告⁹ と共に、前述の考えを支持するものであろう。

Malotilate は正常ラットへの投与で、胆汁流量を有意に増加し、このことは中山ら¹¹ によって報告されていることと良く一致した。この胆汁流量増加作用は、malotilate による Oddi 筋への直接的な弛緩作用によるものと考えられている²⁶。CCl₄ 肝障害時に見られる胆汁流量の低下、および BSP の胆汁内排泄の低下は、malotilate の前処置によって有意に抑制された (Table 1)。これらの malotilate の作用には、脂質過酸化抑制作用による CCl₄ 肝障害の進展の抑制に加えて、malotilate 自体による胆汁流量の増加が関与しているのであ

らう。さらに、malotilate の CCl₄ 肝障害発現抑制作用は血清 transaminases および血清 bilirubin レベルの変動に関しても認められ (Fig. 3)、中山ら³ の報告と一致した。

池田¹² が報告したごとく CCl₄ 投与後 24 時間の時点では、glucagon による plasma cyclic AMP の上昇は殆ど見られず (Fig. 4)、CCl₄ 障害肝の glucagon に対する応答性の低下が示唆された。Malotilate の前処置は、この障害時の glucagon に対する plasma cyclic AMP 応答の低下を抑制した。この改善効果は CCl₄ 投与後 72 時間の時点で一層顕著になった (Fig. 5)。CCl₄ 障害肝の glucagon に対する応答性の低下は、肝臓での glucagon レセプター数の減少¹³ によって生じていると思われる。しかし同じ膵臓ホルモンである insulin レセプター数での減少が CCl₄ 障害肝で観察されない¹³ ところから、障害肝での glucagon レセプター数の減少は CCl₄ による細胞膜の損傷などよりは、むしろ、肝障害時に生じている hyperglucagonemia^{13,27} による glucagon レセプターの down-regulation²⁸ によってもたらされていると考えられる。従って、障害肝の glucagon に対する応答低下を malotilate が抑制するという結果は、malotilate が CCl₄ 肝障害時の血中 glucagon レベルにおける異常の発現に対しても抑制的に作用していることを示すものかもしれない。或いはまた、malotilate の蛋白質合成促進作用² によって新たな glucagon レセプターの合成が促進され、そのことが malotilate による、障害肝の glucagon に対する応答低下の改善に貢献しているのかもしれない。これらの点に関しては、今後詳細な検討が必要であらう。

5 結 語

ラットを用いて、CCl₄ による肝障害に対しての malotilate の抑制作用を検討し、以下の結果を得た。

1) CCl₄ 投与後 24 時間で生じる、肝 homogenate 並びに mitochondria 分画での calcium の増加は、malotilate の前処置によって強く抑制された。

2) Malotilate は、CCl₄ による胆汁流量の低下、並びに BSP 胆汁内排泄量の低下を効果的に抑制した。さらに CCl₄ による血清 transaminases および、bilirubin の上昇に対しても malotilate は抑制効果を示した。また、正常ラットへの malotilate の投与によって胆汁流量の増加が認められた。

3) CCl₄ 投与後 24 時間で、glucagon に対する plasma cyclic AMP 応答は著しく低下していた。Malotilate の前処置は、この plasma cyclic AMP 応

答の低下を強く抑制した。Malotilate の改善効果は、 CCl_4 投与後 72 時間の時点で一層顕著になった。

これらの結果から、 CCl_4 による血清 transaminases や bilirubin レベルの変動に対してのみならず、BSP 胆汁内排泄量、肝組織 calcium 量、並びに glucagon に対する肝臓の応答性という観点においても、malotilate は CCl_4 による肝障害の発現に対して抑制的に作用していることが確認された。

文 献

1. 中山貞男, 栗本 忠, 初鹿野誠彦, 狩野元成, 坂本浩二: Diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (NKK-105) の薬理学的研究(第II報). 胆汁分泌ならびに胆汁成分に及ぼす影響. 昭医誌 **38**, 513-523 (1978).
2. Imaizumi, Y., Katoh, M., Sugimoto, T., and Kasai, T.: Effect of malotilate (diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate) on the protein synthesis in rat liver. Jpn. J. Pharmacol. **32**, 369-375 (1982).
3. 中山貞男, 後藤裕美, 小口江美子, 岡崎雅子, 坂本浩二: 四塩化炭素肝障害の成立, 進展過程に及ぼす diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (malotilate) の影響. 昭医誌 **42**, 605-611 (1982).
4. 中山貞男, 酒井節代, 栗本 忠, 加藤 仁, 岡崎雅子: Diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (NKK-105) の薬理学的研究(第V報). Ethionine 脂肪肝に及ぼす影響について. 昭医誌 **39**, 613-620 (1979).
5. 広岡慎吾, 田中哲二, 野方 勝, 加藤 稔, 杉本達芳: Malotilate の D-Galactosamine 肝障害の発症抑制作用. 医薬品研究 **13**, 1046-1052 (1982).
6. 鈴木 宏, 市田文弘, 瀧野辰郎, 長島秀夫, 平山千里, 藤沢 洌, 古田精市, 門祭丈之, 山本祐夫, 織田敏次: 慢性肝炎に対する Malotilate の効果—用量別比較試験. 肝胆臓 **5**, 149-160 (1982).
7. Thiers, R. E., Reynolds, E. S. and Vallee, B. L.: The effect of carbon tetrachloride poisoning on subcellular metal distribution in rat liver. J. Biol. Chem. **235**, 2130-2133 (1960).
8. 齊藤利和, 八田慎一, 大鹿英世: 四塩化炭素によるラット肝臓における Calcium の蓄積について. 札幌医誌 **48**, 397-407 (1979).
9. Klaassen, C. D. and Plaa, G. L.: Effect of carbon tetrachloride on the metabolism, storage, and excretion of sulfobromophthalein. Toxicol. Appl. Pharmacol. **12**, 132-139 (1968).
10. Hatta, S., Ohshika, H. and Tanaka, M.: Relationship of carbon tetrachloride-induced alterations of Ligandin and Z protein to sulfobromophthalein transport in rat liver. J. Toxicol. Sci. **6**, 177-189 (1981).
11. Egashira, T., Yamamoto, T. and Kuroiwa, Y.: Protective effects of diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (NKK-105) on liver injury by carbon tetrachloride (CCl_4). J. Toxicol. Sci. **7**, 13-18 (1982).
12. 池田雄祐: 肝障害における肝広汎切除の耐術判定に関する実験的研究—グルカゴン負荷と血中 cAMP 変動— 日外会誌 **81**, 632-639 (1980).
13. Mourelle, M. and Rubalcava, B.: Regeneration of the liver after carbon tetrachloride. Differences in adenylate cyclase and pancreatic hormone receptors. J. Biol. Chem. **256**, 1656-1660 (1981).
14. Carafoli, E. and Tiozzo, R.: A study of energy-linked calcium transport in liver mitochondria during CCl_4 intoxication. Exp. Mol. Pathol. **9**, 131-140 (1968).
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275 (1951).
16. Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. and Ui, M.: An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. Biochem. Med. **18**, 257-273 (1977).
17. Sokal, J. E.: Glucagon—An essential hormone. Am. J. Med. **41**, 331-341 (1966).
18. Exton, J. H. and Park, C. R.: Control of gluconeogenesis in liver. II. Effects of glucagon, catecholamines, and adenosine 3', 5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. J. Biol. Chem. **243**, 4189-4196 (1968).
19. Strange, R. C. and Mjos, O. D.: The sources of plasma cyclic AMP: Studies in the rat using isoprenaline, nicotinic acid and glucagon. Eur. J. Clin. Invest. **5**, 147-152 (1975).
20. Recknagel, R. O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. **19**, 145-208 (1967).
21. De Toranzo, E. G. D., Gomez, M. I. D. and Castro, J. A.: Mechanism of *in vivo* carbon tetrachloride-induced liver microsomal cytochrome P-450 destruction. Biochem. Biophys. Res. Commun. **64**, 823-828 (1975).
22. Schanne, F. A. X., Kane, A. B., Young, E. E., and Farber, J. L.: Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. Science **206**, 700-702 (1979).
23. Moore, L., Davenport, G. R., and Landon, E. J.: Calcium uptake of a rat liver microsomal sub-

- cellular fraction in response to *in vivo* administration of carbon tetrachloride. *J. Biol. Chem.* **251**, 1197-1201 (1976).
24. Recknagel, R O., Glende, E. A., Jr., Waller, R. L., and Lowrey, K.: Lipid peroxidation: Biochemistry, measurement, and significance in liver cell injury. In: Plaa, G. L. and Hewitt, W. R.: *Toxicology of the liver*. 213-241, Raven Press, New York. (1982).
25. Moore, L., Chen, T., Knapp, H. R., Jr., and Landon, E. J.: Energy-dependent calcium sequestration activity in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **250**, 4562-4568 (1975).
26. 栗本 忠, 中山貞男, 西村忠典, 和田育穂, 坂本浩
- 二: Diisopropyl 1,3-dithiol-2-ylidene malonate (NKK-105) の薬理学的研究. (第III報) 胆汁排出機序に及ぼす影響. 昭医誌 **39**, 7-17 (1979).
27. Hatta, S., Ohshika, H. and Tanaka, M.: Hepatic responses in DNA synthesis to adrenergic agonists, insulin and glucagon in CCl₄-treated rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **33(Suppl.)**, 186p (1983).
28. Soman, V. and Felig, P.: Regulation of the glucagon receptor by physiological hyperglucagonemia. *Nature* **272**, 829-832 (1978).
-
- 別刷請求先:
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目
札幌医科大学薬理学講座 片倉道啓