

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

斎藤利和 八田慎一 大鹿英世

札幌医科大学薬理学講座 (主任 田中 護教授)

Carbon Tetrachloride Induced Calcium Accumulation in Rat Liver

Toshikazu SAITO, Shinichi HATTA
and Hideyo OHSHIKA

Department of Pharmacology, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. M. Tanaka)

Carbon tetrachloride (CCl₄) induces steatosis, calcium accumulation and necrosis in rat liver. It has been clarified that fat accumulation is independent of necrosis. However, the mechanism of calcium accumulation and the role of increased calcium in CCl₄ hepatotoxicity are obscure. The present study was undertaken to resolve the above problems. The results are summarized as follows.

1) After the administration of CCl₄ (2.5 ml/kg, p. o.), a transient increase, twice of normal level, of hepatic calcium at 2 hours (hrs) was observed prior to the marked increase of it at 24 hrs. However the increase of serum calcium level was detected only at 2 hrs. The hepatic calcium content at 24 hrs was ten-fold that of normal liver, and both mitochondrial and microsomal calcium increased at this time, while at 2 hrs only mitochondrial calcium increased. The TBA values in two subcellular fractions increased at 2 hrs, then were maintained at the same level at 24 hrs. No hepatic dysfunction was detected by several function test at 2 hrs.

2) While pretreatment with a small dose of CCl₄ (0.25 ml/kg) inhibited microsomal calcium accumulation, the increase of TBA values in subcellular fractions by 2.5 ml/kg of CCl₄ was seen. Pretreatment with N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine (600 mg/kg, three times) inhibited both CCl₄-induced increases of microsomal calcium and TBA values. Pretreatment with lanthanum chloride (2 g/kg) inhibited the calcium accumulation in two subcellular fractions but not lipid peroxidation of microsomal fraction.

The pretreatments except for lanthanum chloride inhibited CCl₄-induced hepatic dysfunction. From the above results, it seems likely that the cause for CCl₄-induced calcium accumulation in liver may be different between its early stage and its late stage, and that the increase of microsomal and/or cytosol calcium may play an important role for hepatic necrosis.

(Received February 5, 1979 and accepted May 1, 1979)

1 緒 言

四塩化炭素 (CCl₄) による肝障害については古くから多くの報告がなされており^{1,2)}, 動物への CCl₄ の投与は障害肝のモデルを作るための方法として薬理学の分野において広く利用されている. CCl₄ の急性投与後, 肉眼的にも明らかに認められる肝臓の脂肪変性と, 肝細胞の壊死との間の因果関係について, 最近では直接の関係はないとする考え方が支配的となってきた^{3~4)}. 一方 CCl₄ による肝障害時に, 肝細胞で calcium の異常な増加が認められているが⁵⁾, 肝細胞の壊死におけるこの calcium の増加の

意義については, まだ充分には解明されていない. さらに近年 CCl₄ の肝障害の機序として CCl₄ が肝 microsome で代謝されて free radical を形成し脂質の過酸化を促すことによるとの説が Slater³⁾ や Recknagel and Ghoshal⁶⁾ により提唱された. CCl₄ 投与後にみられる肝臓脂肪変性に関しては, CCl₄ 由来の free radical による脂質の過酸化をその原因とすることがほぼ確実となってきた^{2,7)}. しかし, 肝細胞の壊死との関係については, 脂質の過酸化の発現と肝細胞の壊死の顕在化との間に, かなりの時間的ずれがあることなどから, どのように両者が結びつくかについては, まだ議論のあるところである^{4,8)}.

著者らは、 CCl_4 (2.5 ml/kg) の急性投与後の肝細胞における calcium 量の著しい変動に注目し、その意義を検討する目的で、1) 非前投与群、2) CCl_4 の代謝を抑制する目的で少量 (0.25 ml/kg) の CCl_4 を前投与した群⁹⁾、lipid soluble antioxidant である N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD)⁷⁾ の前投与群、4) plasma membrane の calcium transport を阻止する¹⁰⁾ といわれる lanthanum chloride の前投与群の 4 群のラットに CCl_4 (2.5 ml/kg) を投与後、肝細胞における calcium 動態を経時的に測定し、脂質の過酸化ならびに肝機能の障害との間の関連について追求した結果、興味ある知見を得たのでここに報告する。

2 実験材料および実験方法

2.1 実験動物

体重 160~200 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを次の 4 群にわかれ使用前 18 時間絶食させたのち、 CCl_4 の 50% olive oil 溶液をポリエチレンチューブを介して胃内に投与した。 CCl_4 の投与量は体重 kg あたり 2.5 ml とした。対照群には olive oil のみ投与した。

① 非前投与群

② 2.5 ml/kg の CCl_4 の投与に先立ち、24 時間前に少量の CCl_4 (0.25 ml/kg) を 5% olive oil 溶液として経口投与した群。

③ N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD) (和光純薬) を olive oil に suspend し、 CCl_4 投与前 48 時間、24 時間、2 時間の 3 回、それぞれ体重 kg あたり 600 mg を腹腔内に投与した群。

④ lanthanum chloride LaCl_3 (Lanthanum) を 50% (W/V) 水溶液とし CCl_4 投与前 3 時間に体重 kg あたり 2 g を胃内に投与した群。

上記の 4 群について CCl_4 投与後、2, 7, 16, および 24 時間に、採血ならびに肝臓摘出を行い、calcium 量の測定、脂質過酸化の測定、肝機能検査を以下の方法に従って行った。

2.2 calcium 量の測定法

肝臓内 calcium の測定:

ラットを ether 麻酔下で開腹し、門脈にポリエチレンチューブを挿入し、ここから ice-cold saline を毎分 12 ml の速さで 7 分間注入して、肝内の血液を洗い流したのち肝を摘出した。肝 calcium 量は以下の 2 つの方法によって測定した。

① 乾式灰化法

CCl_4 2.5 ml/kg 投与前および 2, 7, 16, 24 時間後に前述の方法で採取した肝 1.5 g を磁製のルツボに入れ、105°C で 24 時間乾燥させた。肝乾燥重量測定後、電気炉で 620°C、

48 時間の加熱により灰化させた。灰化後ルツボ中に 0.1 N HCl を注加し、4°C で一夜放置し、calcium の溶解後その 0.5 ml を試験管にとり、これに 0.1 N HCl で溶解した 1% LaCl_3 溶液 4.5 ml を加え¹¹⁾、原子吸光度計 (日立 208 型) により calcium 量を測定した。

② 抽出法

前述の方法で採取した肝 2 g を 18 ml の 0.25 M sucrose で homogenize して 10% homogenate とし、肝 mitochondria 分画及び microsome 分画をそれぞれ Carafoli and Tiozzo¹²⁾、Moore *et al.*¹³⁾ の方法に従って調製した。calcium の抽出は、Carafoli and Tiozzo の方法¹²⁾ に準じ、10% 肝 homogenate、および mitochondria 分画もしくは microsome 分画の suspension の 1 ml を別々に試験管にとり、最終濃度がそれぞれ 0.15 N、0.25% となるように、あらかじめ調製した HCl および LaCl_3 を含む 10% trichloroacetic acid (TCA) 溶液 1 ml を各試験管に加えた。4°C で一夜放置した各試験管内容を充分攪拌したのち、遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) し、上清について原子吸光度計により calcium 量を測定した。homogenate、および mitochondria 分画と microsome 分画の suspension の蛋白量を Lowry *et al.*¹⁴⁾ の方法で測定し、calcium 量を mg protein あたりの mol 数で表示した。

血清 calcium 濃度の測定:

ラットを ether 麻酔下で開胸し、心臓穿刺により右心房より血液を採取した。この血液を直ちに 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた血清を Bradbury *et al.*¹⁵⁾ の方法に従い 1% LaCl_3 で 50 倍に稀釈後、原子吸光度計 (日立 208 型) で calcium 量を測定した。

2.3 チオバルビタール酸反応 (TBA 反応)

CCl_4 投与後、2 および 24 時間に摘出した肝より mitochondria 分画および microsome 分画を調製し、肝細胞での脂質の過酸化の程度を知る目的で TBA 反応を試みた。

mitochondria 分画の調製:

2 g の肝に 0.3 M sucrose + 3 mM EDTA 溶液 18 ml を加え¹⁶⁾、glass teflon-homogenizer を用い、氷水中で homogenize した。10% homogenate 10 ml を 800 × g で 10 分間遠心分離した。この上清を 14,000 × g で 10 分間遠心分離し、得られた pellet を 0.15 M KCl + 3 mM EDTA 溶液に suspend させ、再び 14,000 × g で 10 分間遠心分離し、その pellet を 0.15 M KCl + 3 mM EDTA 溶液に resuspend させた。

microsome 分画の調製:

mitochondria の場合と同様にして用意された 10% homogenate 8 ml を 1,475 × g で 10 分間遠心分離し、その上清を 12,500 × g で 20 分間遠心分離した。この上清を 105,000

×g で60分間遠心分離して得た pellet を0.15 M KCl+3 mM EDTA に resuspend させ、再び105000×g、60分間の遠心分離を行い、その pellet を0.15 M KCl+3 mM EDTA に resuspend させた。

尚、mitochondria 分画、microsome 分画とも遠心分離は4°Cの条件下で行った。

TBA 反応:

TBA 反応は内藤・菅原の方法¹⁷⁾を一部改変して行った。すなわち mitochondria 分画および microsome 分画の suspension 2 ml に40% TCA 溶液 1 ml を加えて1分間混和後、0.67% 2-thiobarbituric acid (和光純薬) 溶液を加えて、再び混和した。この混合液を水浴中で100°C 30分加熱した後、直ちに流水中で急冷し、N-butyl alcohol 4 ml を加え、1分間振盪、混和させた。混和後3,000 rpm で10分間遠心分離し、n-butyl alcohol 部分をとり、535 nm での吸光度を測定した。検量曲線の作成には1, 1, 3, 3-tetra-ethoxypropane (東京化成) 溶液を用いた。

2.4 肝機能検査

胆汁流量および sulfobromophthalein sodium

(BSP) 胆汁内排泄量の測定:

ラットを urethane 麻酔下 (1.5 g/kg, s. c.) で開腹し、総胆管より胆汁を採取した。採取開始30分後に BSP (第一製薬) を動物体重 kg あたり 25 mg を大腿静脈より投与し、その後1時間胆汁を採取し、これを 1 N-NaOH で100~2,000 倍に稀釈し、BSP を 580 nm で比色定量した。

血清 transaminases, および血清 bilirubin 値の測定:

軽い ether 麻酔下で開胸し、心臓穿刺により血液を採取し、3,000 rpm で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液」(ヤマトロン) high unit 用 kit を用いて測定操作を行い 510 nm で比色定量した。

血清 bilirubin は、和光純薬の「ビリルビン測定試薬」kit を用いて測定操作を行い 600 nm で比色定量した。

3 実験結果

3.1 肝臓および血清 calcium 濃度

乾式灰化法で測定した無処置正常ラットの肝 calcium 量は $150.8 \pm 12.9 \mu\text{g/g dry tissue}$ であった。対照として olive oil のみを投与した動物について経時的に測定した肝 calcium 量は、無処置正常ラットの場合とほぼ等しい値を示した。次に CCl_4 (2.5 ml/kg) を投与したラットの肝臓および血清内の calcium 濃度の経時変化を Fig. 1 に示した。すなわち肝 calcium 量は、 CCl_4 投与後2時間で $295.5 \pm 35.2 \mu\text{g/g dry tissue}$ と対照値の約2倍に増加したが、7時間後にはほぼ対照値のレベルにまで減少し

た。16時間後より、肝 calcium 量は、再び増加し、24時間後では対照値の約10倍に当る平均 $1513.6 \mu\text{g/g dry tissue}$ に達した。一方血清 calcium 濃度は無処置正常ラットにおいては $10.3 \pm 0.22 \text{ mg/dl}$ であり、 CCl_4 投与後2時間で一旦 $11.2 \pm 0.29 \text{ mg/dl}$ に上昇したが7時間以後は、

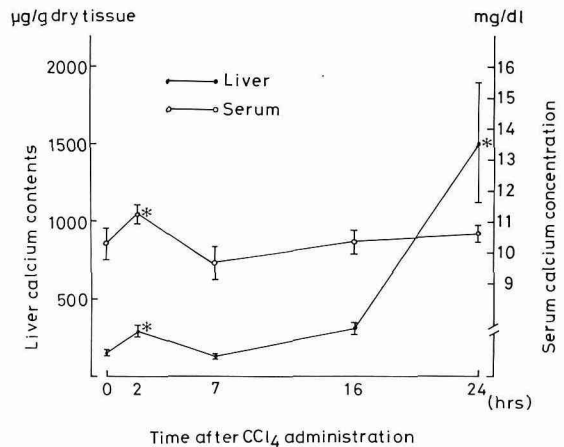


Fig. 1 Calcium concentration in the liver and serum of CCl_4 -intoxicated rats. Rats were given CCl_4 (2.5 ml/kg) by stomach tube and were sacrificed at the chosen time. Bars represent the mean \pm standard error.

* $P < 0.05$ when compared with zero time value.

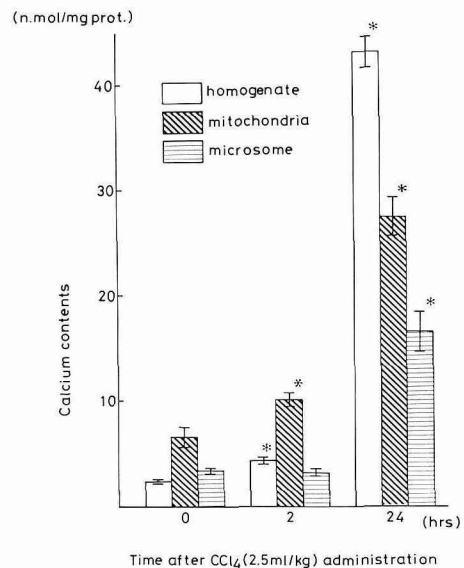


Fig. 2 Effect of CCl_4 administration (2.5 ml/kg, p.o.) on calcium content of rat liver. Bars represent the mean \pm standard error.

* $P < 0.05$ when compared with each zero time value.

ほぼ対照値のレベルを保った。次に CCl_4 投与後 calcium の肝細胞内分布を検討するため Carafoli and Tiozzo¹²⁾ の方法に従って測定した homogenate, mitochondria 分画および microsome 分画についての成績を Fig. 2 に示した。正常肝でのこれらの値はそれぞれ 2.5 ± 0.16 , 6.7 ± 0.74 , 3.5 ± 0.22 n mol/mg protein であった。 CCl_4 投与後2時間では homogenate における calcium 量の増加に平行して, mitochondria 分画の calcium 量も対照の約1.5倍に増加したが, microsome 分画の calcium 量は全く変動をみとめなかった。しかし CCl_4 投与後24時間では, homogenate, mitochondria および microsome 分画の3者いずれにおいても calcium 量の著しい増加がみられ, それぞれ対照の17.6, 4.1, 4.8倍に達した。

次に少量の CCl_4 (0.25 ml/kg), DPPD および Lanthanum を前投与したラットに 2.5 ml/kg の CCl_4 を投与した際の肝臓 calcium 量の測定成績を Table 1 に示した。少量の CCl_4 の投与後24時間 (CCl_4 2.5 ml/kg 投与直前に当る) では, homogenate, mitochondria 分画の calcium 量はそれぞれ対照の4.6倍, 3.1倍となった。しかし, microsome 分画では, その上昇は1.4倍にとどまった。少量の CCl_4 を前投与したラットにさらに CCl_4 2.5 ml/kg を投与すると, その2時間後では, homogenate および mitochondria 分画の calcium 量が CCl_4 (2.5 ml/kg) 投与前の約1.5倍に上昇したが, microsome 分画では, 変化が認められなかった。しかし, 24時間後では, homogenate, microsome分画の calcium量は非前投与群(CCl_4 2.5 ml/kg

単独投与群) に比して明らかな減少を示したが, mitochondria 分画の calcium 量については, 非前投与群との間に有意の差が認められなかった。次に DPPD 600mg/kg を3回前投与したラットの肝臓の homogenate, mitochondria および microsome 分画では, calcium 量にやや増加の傾向がみられた。しかし, これに CCl_4 2.5 ml/kg を投与した後2時間では, 各分画における calcium 量に変化は認められなかった。ところが, 24時間後の calcium 量は, homogenate, microsome 分画で, それぞれ 17.64 ± 0.43 , 5.12 ± 0.25 n mol/mg protein と減少し, 非前投与群のそれぞれとの間に有意の差が認められた。しかし, mitochondria 分画の calcium 量については, そのような有意差は認められなかった。

最後に, Lanthanum 2 g/kg を前処置したラットの homogenate, mitochondria および microsome 分画の calcium 量は, それぞれ 2.8 ± 0.17 , 8.4 ± 0.14 , 5.3 ± 0.32 n mol/mg protein であった。これに CCl_4 (2.5 ml/kg) を投与した2時間後では, 各分画における calcium 量は microsome 分画にて有意の減少を示した以外は, いずれもほとんど変動を示さなかった。しかし, 24時間後では, homogenate, mitochondria および microsome 分画の calcium 量は, 非前投与群のそれに比して, それぞれ, 約40%, 45%, および70%の著しい減少を示し, 両群の間に明らかに有意差が認められた。

3.2 過酸化脂質

CCl_4 投与後の肝細胞での脂質の過酸化の程度を知る目

Table 1 Effect of various pretreatments on calcium accumulation in liver of CCl_4 -intoxicated rats

Fraction	Time after CCl_4 (hrs.)	Calcium contents (n mol/mg protein)			
		Pretreatment			
		non	CCl_4 0.25 ml/kg	DPPD 600 mg/kg \times 3	Lanthanum 2 g/kg
homogenate	0	2.5 ± 0.16	11.3 ± 3.64	3.0 ± 0.18	2.8 ± 0.17
	2	$4.3 \pm 0.35^*$	$17.9 \pm 2.96^\bullet$	3.3 ± 0.34	4.8 ± 1.12
	24	$43.1 \pm 1.54^*$	$10.6 \pm 1.84^\bullet$	$17.6 \pm 0.43^*$	$25.8 \pm 4.00^\bullet$
mitochondria	0	6.7 ± 0.74	20.6 ± 6.14	9.9 ± 1.65	8.4 ± 0.14
	2	$10.2 \pm 0.68^*$	$31.3 \pm 3.95^\bullet$	9.5 ± 0.21	10.5 ± 0.84
	24	$27.5 \pm 1.85^*$	24.0 ± 3.92	$22.7 \pm 1.23^*$	$15.2 \pm 2.87^\bullet$
microsome	0	3.5 ± 0.22	5.0 ± 0.73	$4.4 \pm 0.23^\bullet$	$5.3 \pm 0.32^\bullet$
	2	3.2 ± 0.31	4.4 ± 0.03	3.5 ± 0.46	$3.9 \pm 0.11^*$
	24	$16.6 \pm 1.86^*$	$3.5 \pm 0.19^\bullet$	$5.1 \pm 0.25^\bullet$	$5.0 \pm 0.75^\bullet$

The values represent the mean \pm standard error.

* $P < 0.05$ when compared with each zero time value.

• $P < 0.05$ when compared with value of non-treated group.

的で TBA 反応陽性物質 (TBA 値) を測定したところ、無処置正常ラットの肝臓より得られた mitochondria 分画、および microsome 分画における TBA 値は、それぞれ、0.28 n mol/mg protein, 0.25 n mol/mg protein であった。

CCl₄ (2.5 ml/kg) 投与後、2 および 24 時間における mitochondria および microsome 分画の TBA 値を測定し、上記の値に対する百分率として表示することとして、成績を Table 2 に示した。

CCl₄ (2.5 ml/kg) 投与後 2 時間では、mitochondria および microsome 分画における TBA 値は投与前に比し、それぞれ 46% および 67% の上昇を示した。24 時間後においては、mitochondria 分画の TBA 値は 2 時間値と比べて差がないが、microsome 分画では減少する傾向に

あった。

少量の CCl₄ (0.25 ml/kg) の前投与によって、mitochondria および microsome 分画の TBA 値は、それぞれ 50%, 36% 上昇した。この前投与ラット群に、さらに CCl₄ (2.5 ml/kg) を投与したところ、2 時間後では、TBA 値のそれ以上の上昇は、mitochondria および microsome 分画共に認められず、また、24 時間後においても著しい変動は認め難かった。次に DPPD 前投与群では、前投与のみでは mitochondria および microsome 分画の TBA 値に変化は認められず、また CCl₄ 2.5 ml/kg 投与によってひきおこされる TBA 値の上昇も、全く認められなかった。Lanthanum を前投与したラットでは、前投与のみで mitochondria 分画の TBA 値は上昇したが、しかし、CCl₄

Table 2 TBA values of mitochondrial and microsomal fractions which were prepared from liver of CCl₄ (2.5 ml/kg) administered rats

Time after CCl ₄ (hrs.)	Fraction	TBA value (%)			
		Pretreatment			
		non	CCl ₄ 0.25 ml/kg	DPPD 600 mg/kg×3	Lanthanum 2 g/kg
0	mitochondria	100	150 ± 9.7●	100 ± 15.3	141 ± 7.7●
	microsome	100	136 ± 17.8	82 ± 27.9	109 ± 26.6
2	mitochondria	146 ± 9.6*	129 ± 18.0	122 ± 20.4	148 ± 14.6
	microsome	167 ± 15.0*	141 ± 22.8	110 ± 22.1	109 ± 17.2●
24	mitochondria	141 ± 18.4	158 ± 7.3	64 ± 6.2●	83 ± 4.3●
	microsome	148 ± 9.5*	181 ± 25.6	56 ± 33.3●	200 ± 22.2*

The values represent the mean ± standard error.

* P < 0.05 when compared with each zero time value.

● P < 0.05 when compared with value of non-treated group.

Table 3 Effect of various pretreatments on serum transaminase activities in CCl₄-intoxicated rats

Time after CCl ₄ (hrs.)	Enzyme	Transaminase activity (Karmen unit)			
		Pretreatment			
		non	CCl ₄ 0.25 ml/kg	DPPD 600 mg/kg×3	Lanthanum 2 g/kg
0	GOT	235 ± 21	1,757 ± 570	210 ± 30	312 ± 73
	GPT	108 ± 21	710 ± 99●	30 ± 4●	179 ± 47
2	GOT	520 ± 125	1,411 ± 731	187 ± 15	606 ± 207
	GPT	176 ± 30	834 ± 344	39 ± 8●	302 ± 93
24	GOT	5,335 ± 511*	1,750 ± 633●	578 ± 136●	2,840 ± 140*●
	GPT	3,595 ± 791*	1,007 ± 187●	329 ± 96●	1,467 ± 104*

The values represent the mean ± standard error.

* P < 0.05 when compared with each zero time value.

● P < 0.05 when compared with value of non-treated group.

(2.5 ml/kg) 投与後, 2時間の TBA 値は変わらず, 24時間後では逆に低下する傾向が認められた. しかし, microsome 分画については, 前投与および CCl₄ 投与後2時間においても変化を示さなかったが, 24時間後では約2倍に上昇をきたした.

3・3 肝臓機能検査

(1) 血清 transaminases 活性

Table 3 に示したように, 無処置正常ラットの血清中の GOT, GPT 値はそれぞれ 235±21, 108±21 Karmen unit (K.U.) であった. CCl₄ 投与後2時間では, GOT は2倍に, GPT は1.7倍に上昇した. 24時間後ではさらに GOT 値も GPT 値も共に上昇し, それぞれ23倍, 33倍に達した.

CCl₄ (0.25 ml/kg) の前投与のみで GOT, GPT 値は対照に比べそれぞれ7.5倍, 6.6倍に上昇した. この前処置ラットにさらに CCl₄ (2.5 ml/kg) 投与しても2時間および24時間後においては, 血清 transaminases 活性の上昇は認められず, 24時間後では非前投与群のそれと比較すると, 有意の差で活性上昇の抑制を認めた.

次に DPPD の前投与は, CCl₄ (2.5 ml/kg) 投与後2時間および24時間での GOT, GPT 値の上昇を強く抑制した. Lanthanum の前投与のみにより, GOT, GPT 値は上昇の傾向を示した. CCl₄ 投与後では, GOT, GPT 値は共に上昇する傾向を示したが, 24時間後の GOT, GPT 値は非前投与群のそれに比べると, 共に低下しており, 活性上昇が強く抑制されるのが認められた.

(2) 血清総 bilirubin 値

正常ラットの血清総 bilirubin 値は 0.35±0.03 mg/dl であった. CCl₄ 2.5 ml/kg 投与後2時間では正常値との間に差は認められなかったが, 24時間では上昇して正常値の約7.5倍に当たる 2.59±0.30 mg/dl に達した (Fig. 3).

CCl₄ (0.25 ml/kg) の前投与のみで血清総 bilirubin 値は 0.61±0.06 mg/dl に上昇した. この動物にさらに CCl₄ (2.5 ml/kg) を投与すると, 2時間後にはこの値は 0.98±0.16 mg/dl となり, 上昇を示したが24時間後においても, なお同じ bilirubin level を維持した. この24時間値を, 非投与群のそれと比較すると有意に bilirubin 値上昇が抑制された. DPPD 前投与群では, CCl₄ 投与後24時間での血清総 bilirubin 値は, 0.75±0.31 mg/dl であり, 非前投与群のそれと比較すると顕著な bilirubin 値上昇抑制が認められた. Lanthanum 前投与群では, CCl₄ 投与後24時間で 1.34±0.45 mg/dl に達し, 血清総 bilirubin 値の上昇に対する抑制効果は明らかではなかった.

(3) 胆汁流量および BSP 胆汁内排泄率

正常ラットの胆汁流量は 3.35±0.28 ml/kg/hr であり,

BSP を投与してから1時間の投与量に対する胆汁内排泄率 (以下 BSP 胆汁内排泄率と略) は平均 62.2% であった. CCl₄ (2.5 ml/kg) 投与後2時間では, 胆汁流量, および BSP 胆汁内排泄率ともにその減少は認められなかった. しかし24時間後においては, それぞれ 0.40±0.02 ml/kg/hr, および 1.47±0.46% となり著しい減少を示した (Fig. 4, 5).

CCl₄ (0.25 ml/kg) の前投与により, 胆汁流量は対照の約

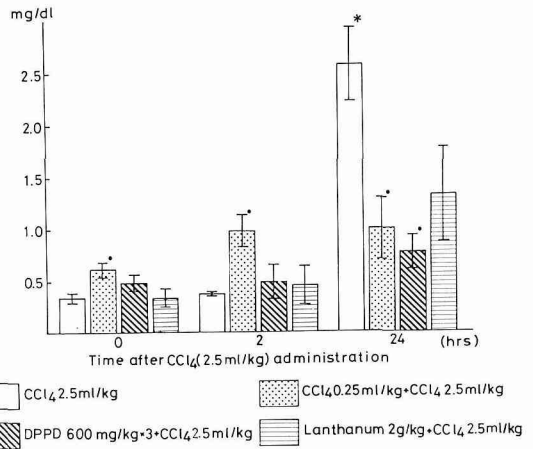


Fig. 3 Effect of various pretreatments on serum bilirubin level of CCl₄ intoxicated rats. The values represent the mean ± standard error.

* P < 0.05 when compared with each zero time value.

● P < 0.05 when compared with value of non-treated group.

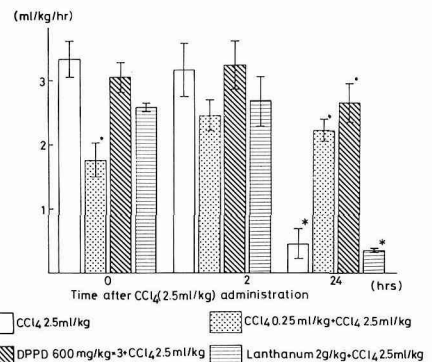


Fig. 4 Effect of various pretreatments on biliary flow in rats after carbon tetrachloride (2.5 ml/kg) administration. The values represent the mean ± standard error.

* P < 0.05 when compared with each zero time value.

● P < 0.05 when compared with value of non-treated group.

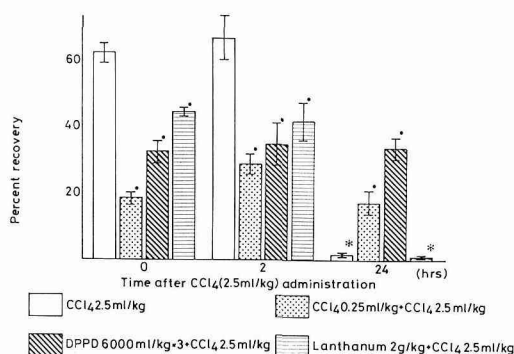


Fig. 5 Effect of various pretreatments on biliary excretion of BSP in rats after carbon tetrachloride (2.5 ml/kg) administration. The values represent the mean \pm standard error.

* $P < 0.05$ when compared with each zero time value.

● $P < 0.05$ when compared with value of non-treated group.

1/2に、BSP胆汁内排泄率は対照の約1/3に減少した。しかしこの前投与動物に CCl_4 2.5 ml/kgを投与しても、2時間後、および24時間後において胆汁流量とBSP胆汁内排泄率とにそれ以上の低下は観察されなかった。次にDPPDの前投与のみで、BSP胆汁内排泄率の減少がみられ、対照のほぼ1/2に減じた。しかし、このDPPD前投与ラットに CCl_4 2.5 ml/kgを投与しても、2時間および24時間後において、胆汁流量、BSP胆汁内排泄率の低下は観察されなかった。

Lanthanum前投与は胆汁流量、およびBSP胆汁内排泄率の軽度の減少をおこした。このLanthanum前投与ラットに CCl_4 (2.5 ml/kg)を投与すると2時間後では、胆汁流量とBSP胆汁内排泄率に変化が認められなかったが、しかし24時間後では、胆汁流量は 0.35 ± 0.03 ml/kg/hr、BSP胆汁内排泄率は $1.06 \pm 0.31\%$ と著しい減少を示した。

4 考 察

ラットに体重kg当り2.5 mlの CCl_4 を経口投与するとFig. 1にみられるごとく、投与後2時間および24時間に明らかな肝calcium量の増加が認められた。しかし、この両時点における肝calcium量の増加の内容には以下に述べるごとく違いが認められる。すなわち、1) CCl_4 投与後2時間では、その増加は、投与前の約2倍にとどまるが、一旦正常レベルに復したのち24時間後では投与前の約10倍にまで増加すること、2) subcellular levelでのcalciumの分布を比べると、2時間後ではmicrosome分画にcalciumの増量が認められないにも拘らずmitochondria分

画では既にcalcium量が1.5倍に増加していること、並びに24時間後においては、両分画ともにcalcium量が増加すること (Fig. 2, 3)血清calciumは2時間後でのみ9%上昇すること (Fig. 1) などから両時点における肝calcium量増加の間には単に量的な差にとどまらず質的な差異があるものと考えられる。

CCl_4 投与後にみられる肝calcium量の2峰性の増加については、Reynolds¹⁸⁾もこれを認めるとともに、この両増加の間の質的な違いを示唆している。この CCl_4 投与2時間後と24時間後とにみられた肝calcium量の増加が質的に異なることを裏付けるものとして、両時点における種々の肝臓機能検査の成績 (Fig. 3, 4, 5)をあげることができる。特に CCl_4 投与後2時間においては肝calciumの増加が認められるにも拘らず、肝機能の低下の証左が全く観察されなかったことから、この時点での肝calcium量の増加は、肝細胞機能の致命的な低下を伴わないcalcium蓄積であるものと考えられる。

CCl_4 投与後、脂質の過酸化が肝臓できわめて速やかに起こり¹⁶⁾、かつTBA反応を指標にしてみると投与後1~2時間が最高で、24時間後には最低であると言われている¹⁹⁾。この脂質の過酸化が、plasma membraneのcalciumに対する透過性の増大をきたし、calciumの蓄積に関与していることは十分に考えられる。しかし、一方 CCl_4 自体による膜透過性の亢進も、また一つの可能性として考えられる。

例えばStacey and Priestly²⁰⁾は、isolateした肝細胞を用いた実験で、1) TBA反応やdiene conjugationをほとんど生じさせない程度の濃度の CCl_4 により細胞からalanine aminotransferase (ALT)および K^+ の漏出が認められ、2) ADP/Fe^{3+} で肝細胞にdose dependentな脂質過酸化を起こさせた時には、ALTおよび K^+ のleakageがほとんど起こらないことを報告している。しかし後にも述べるごとく、antioxidantのDPPDを前投与しておく、肝細胞へのcalciumのtransportが、 CCl_4 投与後2時間で抑えられている (Table 1)とことから、 CCl_4 自体の作用によるcalcium流入の比率は、全体としては比較的低いことが予想される。むしろ血清calcium濃度の増加が脂質の過酸化と時期を同じくして起こったことが、肝におけるcalcium増加をひき起こしたものと考えられる²¹⁾。

膜脂質の過酸化は、 CCl_4 投与後初期の細胞内calciumの増加に関係していると考えられるものの、肝細胞内における総calcium量がその後一旦正常levelに戻り、再び著しい増加に至るまでにtime lagのあること (Fig. 1)から、24時間後に認められる肝calciumの蓄積を脂質の過酸化のみで説明することは困難である。我々の実験でも、

microsome および mitochondria 分画における TBA 値は, CCl_4 投与により 2 時間後に上昇し, 24 時間後でもほぼ同じ値を維持することが認められた (Table 2). したがって, “cytotoxic な過酸化物質およびその代謝物”²²⁾が, calcium level の下った時期にもなお肝細胞内で産生されつづけ, 最終的な肝細胞の壊死へ橋渡しをしている可能性²²⁾も考えられる. また CCl_4 によってもたらされた free radical による脂質の過酸化は, 連鎖反応的にその範囲を広げ蛋白の過酸化²³⁾をも包含した形で進行するに違いない.

一方 subcellular level での calcium の動きに注目してみると, CCl_4 投与 2 時間後には, calcium は mitochondria 分画で増加し, microsome 分画では増加していないことを認めた (Table 1). このことは, CCl_4 投与 2 時間後では血清 calcium 濃度が上昇しているため, 一時的に肝細胞内へ calcium の流入が増加し, cytosol の calcium 濃度を高めたと推測される. ところが脂質の過酸化を受けた microsome では calcium uptake の減少が起こっているため²⁴⁾ calcium content の増加がみられず (Table 1), 従って calcium 取り込み能がまだ抑制を受けていない mitochondria²⁴⁾に calcium の蓄積が起こったものと考えられる. 本実験でも, mitochondria 分画ではすでに 2 時間の時点で過酸化が起っている (Table 2)にも拘らず, calcium の取り込みの減少は認められなかった. それにしても, 一時的な cytosol の calcium 濃度の上昇は, 直ちに mitochondria により取除かれるとしても, mitochondria を含めた細胞諸器官の機能に影響を与えていることは想像に難くないし, また CCl_4 によって生ずる最終的な肝細胞の壊死へのひき金として一役を担っていることも考えられる²⁵⁾. CCl_4 投与後 24 時間における肝 calcium 量の増加に関しては, mitochondria 分画での増加にとどまらず, microsome 分画でも対照の約 4.8 倍に達した (Table 1). このことは, mitochondria での calcium 取り込みが上限に達したのが²⁶⁾, あるいは細胞からの calcium 汲み出し機構に障害が生じたか²⁷⁾のいずれかに起因することを推測させる. Thiers *et al.*⁵⁾も CCl_4 投与 16 時間以降で mitochondria 以外の fraction に calcium が増加していることを認めている. しかしながら, CCl_4 投与後 mitochondria が腫大, 変形空胞化することが知られており²⁸⁾, fractionation の過程で損傷をうけた mitochondria 分画の calcium が, mitochondria 以外の分画に混入しうる可能性も考慮しなければならぬであろう.

すでに述べてきたように, 脂質の過酸化が膜透過性の変化を起し, calcium の細胞内濃度を高めると共に, 他方過酸化の進行に伴う toxic substances の産生が, 細胞の壊死に関与していると考えられるならば, 1) CCl_4 由来の free

radical の産生の抑制, もしくは, 2) antioxidants の投与, 3) calcium の細胞内流入の阻止により, CCl_4 によって引き起こされる肝障害を阻止しうることが期待される.

さて, 少量の CCl_4 をラットに前投与しておくことにより, 後から投与した CCl_4 の毒性を著しく低下させる²⁹⁾ことが知られており, この機序は前投与した CCl_4 により microsome での CCl_4 の代謝が抑えられるため³⁰⁾と考えられている. 我々の実験で CCl_4 0.25 ml/kg の前投与のみにより, 明らかに肝機能障害が認められた (Fig. 3, 4, 5). しかし, これにさらに 2.5 ml/kg の CCl_4 を投与したところ, 前投与した場合と, しない場合とを比較すると, 24 時間後の microsome および mitochondria 分画での脂質の過酸化は, 同程度に認められたにも拘らず, 肝機能検査の成績は, 明らかに前投与群において肝機能障害の少ないことを示した. この点から言えば, CCl_4 0.25 ml/kg 程度の投与量は, 脂質の過酸化に影響を与えることの少ないものであり, また肝機能の保持に関しては, microsome での代謝酵素の抑制³⁰⁾以外に, 別の機序^{31, 32)}をも考えることが必要なのかもしれない.

肝 calcium 量については, CCl_4 前投与群においては, 二つのきわだった特徴を示した. 一方においては, 2 時間後にみられた肝 calcium 量増加であり, 特に mitochondria 分画の増加が著しい. 他方では, 24 時間後の mitochondria および microsome 分画において calcium 量の増加が見られず, 特に microsome 分画では calcium 増加が完全に抑えられたことである. 以上のことから, mitochondria に calcium が蓄積されるために, microsome や cytosol における calcium 量の増加が阻止されることとなり, 結果的に肝機能の障害の進行を抑制することに役立つものと考えられることができる.

次に lipid soluble antioxidant である DPPD の前投与群では, CCl_4 投与後に脂質の過酸化が強く起こる 2 時間において, 完全に TBA 値の上昇が抑制された. また CCl_4 投与後 2 時間における homogenate, mitochondria 分画での calcium の増加も完全に抑えられ, かつ transaminases の漏出も強く阻止された (Table 3).

ところが, CCl_4 投与後 24 時間においては, DPPD 前投与により TBA 値の上昇が完全に抑制され, かつ肝 calcium 量の増加も総体的には抑制されていたにもかかわらず, mitochondria 分画でのみ calcium 量の著しい増加が認められた. このことは, 肝細胞へ流入した calcium が mitochondria にほとんど取りこまれたために, cytosol や microsome 分画の calcium 濃度は上昇しないものと仮定すれば, そのためすべての肝機能が, 24 時間後においてもなお充分に維持されるものと考えられることができる. 従っ

て、 CCl_4 の肝毒性に対する DPPD の阻止作用は、脂質過酸化による膜透過性の変化の阻止にのみ帰すべきではなく、他の機序^{20,33)}をも考慮しなければならないように思われる。

上述してきたことから、もし CCl_4 による肝 calcium の蓄積と壊死発現との間に因果関係の存在を仮定すれば、肝 calcium の増加を抑制する処置は肝機能障害の阻止に働くかもしれない。

多くの実験から、種々の細胞の plasma membrane の calcium channel の機能を阻害する³⁴⁾と考えられている Lanthanum を前投与した実験においては、上述した2つの前投与の場合とは全く異なり、Lanthanum には肝機能を保護する作用はほとんど認められなかった (Fig. 3, 4, 5)。

Lanthanum が肝細胞の plasma membrane においても calcium の transport を抑制しうるかどうかについては、現在のところ報告は見当たらない。しかし、isolate した肝 mitochondria では、他の細胞の場合と同様に、Lanthanum は calcium の transport を強く抑制することが知られている²⁶⁾。今回の実験の Lanthanum 前投与群では CCl_4 投与 24 時間後に肝 calcium の増加が認められたにも拘らず、microsome 分画や mitochondria 分画での calcium 蓄積は認められなかった (Table 1)。すなわち、上述した少量の CCl_4 や DPPD の前投与の結果から推測されるところの、microsome 分画における calcium 量の増加と肝機能減退との関係は、この Lanthanum 前投与群では判然とはしなかった。この理由としては、1) Lanthanides の肝毒性^{34,35)}、2) Lanthanum の mitochondria への蓄積³⁶⁾などが肝機能障害の強化に寄与した可能性を挙げることができる。しかも Lanthanum 存在下では microsome 分画、および mitochondria 分画において calcium 量の増加が認められなくとも、cytosol では、calcium の上昇が存在したかもしれない。このように Lanthanum 自体に肝毒性はあるとしても、少量 (0.25 ml/kg) の CCl_4 の投与群には、Lanthanum の前投与が、胆汁分泌や BSP の排泄率からみて肝障害を阻止した³⁷⁾ことを考えると、Lanthanum 前投与による改善効果も期待できるかもしれない。ただし Lanthanum で阻止しうる以外の calcium transport の経路もあり得るし、大量の CCl_4 による膜透過性の極端な変化も考えられるので、これらから Lanthanum 投与時の肝 calcium 量増加が説明できるかもしれない。

5 結 語

CCl_4 を投与したラットの肝細胞における calcium の動態を経時的に測定し、脂質の過酸化並びに肝機能の障害と

の関連性を検討し、以下の結果を得た。

1) CCl_4 (2.5 ml/kg) 投与後、24 時間中に肝組織内 calcium 量は、2 時間後と 24 時間後に 2 峰性の増加を示した。 CCl_4 投与後、肝 mitochondria 分画、並びに microsome 分画の calcium 量は、2 時間後では mitochondria 分画のみで、24 時間後では mitochondria 分画、および microsome 分画で共に増加をきたした。血清 calcium は 2 時間後でのみ増加が認められた。

2) CCl_4 投与により、肝 mitochondria 分画、および microsome 分画の TBA 値は 2 時間後には共に上昇したが、24 時間後でもこの値にほとんど変動がなかった。

3) 少量の CCl_4 (0.25 ml/kg) の前投与は、大量の (2.5 ml/kg) CCl_4 投与後 24 時間に認められる肝機能障害の発現を阻止し、かつ microsome 分画における calcium 量の増加を強く抑制した。

4) DPPD の前投与は、 CCl_4 による肝機能障害を完全に阻止し、TBA 値を低く維持した。肝 mitochondria 分画の calcium 量は増加したが、microsome 分画の calcium には全く増加が認められなかった。

5) LaCl_3 の前投与は、 CCl_4 による肝機能障害を阻止できなかった。また、 CCl_4 による肝 mitochondria 分画や microsome 分画での calcium の増加は認められなかった。

以上の結果から、 CCl_4 投与後の 2 峰性の肝 calcium 量の増加は、その機序の上からも、細胞内分布の上からも、また肝機能障害との関連性の上からも互いに全く質的に異なったものと結論される。

稿を終えるにあたり、御校園いただきました田中護教授に深く謝意を表します。また、ご助言をいただいた本学病理学第 2 講座森道夫助教授、小川勝洋助手、生化学第 1 講座下条貞助教授、公衆衛生学講座菅原直毅助手に深謝致します。

文 献

1. Drill, V. A.: Hepatotoxic agents: Mechanism of action and dietary interrelationship. *Pharmacol. Rev.* **4**, 1-42 (1952).
2. Recknagel, R. O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **19**, 145-208 (1967).
3. Slater, T. F.: Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: A speculative mechanism based on activation. *Nature* **209**, 36-40 (1966).
4. Judah, J. D., McLean, A. E. M. and McLean, E. K.: Biochemical mechanisms of liver injury. *Am. J. Med.* **49**, 609-616 (1970).
5. 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).
6. Recknagle, R. O. and Ghoshal, A. K.: Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.* **15**, 132-146 (1966).
 7. Di Luzio, N. R. and Hartman, A. D.: Modification of acute and chronic ethanol-induced hepatic injury and the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. Ed. by Sardesai, V. M.: *Biochemical and Clinical Aspects of Alcohol Metabolism*. 133-154, Charles C Thomas Publisher. Springfield (1969).
 8. Roders, M. K., Glends, E. A., Jr. and Recknagle, R. O.: NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and the problem of pathological action at a distance. New data on introduction of red cell damage. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 437-443 (1978).
 9. Ugazio, G., Koch, R. R. and Recknagle, R. O.: Mechanism of protection against carbon tetrachloride by prior carbon tetrachloride administration. *Exptl. Mol. Pathol.* **16**, 281-285 (1972).
 10. Weiss, C. B.: Cellular pharmacology of lanthanum. *Ann. Rev. Pharmacol.* **14**, 343-354 (1974).
 11. Ross, D. H., Medina, M. A. and Cardenas, H. L.: Morphine and ethanol: Selective depletion of regional brain calcium. *Science* **186**, 63-65 (1974).
 12. Carafoli, E. and Tiozzo, R.: A study of energy-linked calcium transport in liver mitochondria during CCl_4 intoxication. *Exptl. Mol. Pathol.* **9**, 131-140 (1968).
 13. Moore, L., Chen, T., Knapp, H. R., Jr. and Landon, E. J.: Energydependent calcium sequestration activity in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **250**, 4562-4568 (1975).
 14. 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).
 15. Bradbury, M. W. B., Kleeman, C. R., Bagdoyan, H. and Berberian, A.: The calcium and magnesium content of skeletal muscle, brain, and cerebrospinal fluid as determined by atomic absorption flame photometry. *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 884-892 (1968).
 16. Rao, K. S. and Recknagle, R. O.: Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exptl. Mol. Pathol.* **9**, 271-278 (1968).
 17. 内藤周幸, 菅原令子: 血漿過酸化脂質測定法の検討ならびに血漿過酸化脂質におよぼすビタミンE摂取の影響. *臨床病理* **23**, 545-549 (1975).
 18. Reynolds, E. S.: Liver parenchymal cell injury. II. Cytochemical events concerned with mitochondrial dysfunction following poisoning with carbon tetrachloride. *Lab. Invest.* **13**, 1457-1470 (1964).
 19. Comporti, M., Saccocci, C. and Dianzan, M. U.: Effect of CCl_4 *in vitro* and *in vivo* on lipid peroxidation of rat liver homogenates and subcellular fractions. *Enzymologia.* **29**, 185-204 (1965).
 20. Stacey, N. and Priestly, B. G.: Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: Relationship to toxicity of CCl_4 , ADP/Fe^{3+} , and diethyl maleate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**, 41-48 (1978).
 21. Meyer, R. A., Jr. and Meyer, M. H.: Increased liver calcium after calcium or milk gavage in rats. *Experientia* **33**, 546-547 (1977).
 22. Recknagle, R. O. and Glende, E. A., Jr.: Lipid peroxidation: A specific form of cellular injury: *Handbook of Physiology* **9**, 591-601, American Physiological Society. Bethesda (1977).
 23. 大野公吉: 生体蛋白変性と過酸化脂質. *最新医学* **33**, 664-669 (1978).
 24. Moore, L., Davenport, G. R. and Landon, E. J.: Calcium uptake of a rat liver microsomal subcellular fraction in response to *in vivo* administration of carbon tetrachloride. *J. Biol. Chem.* **251**, 1197-1201 (1976).
 25. Wrogemann, K. and Pena, S. D. J.: Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* **1**, 672-673 (1976).
 26. Carafoli, E.: Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function. *Biochem. Soc. Symp.* **39**, 89-109 (1974).
 27. Cittadini, A. and Van Rossum, G. D. V.: Properties of the calcium-extruding mechanism of liver cells. *J. Physiol.* **281**, 29-43 (1978).
 28. 小野江為則: 肝臓の超微構造病理学. *日病会誌*, **57**, 3-36 (1968).
 29. Dambrauskas, T. and Cornish, H. H.: Effect of pretreatment of rats with carbon tetrachloride on tolerance development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **17**, 83-97 (1970).
 30. Glende, E. A., Jr.: Carbon tetrachloride-induced protection against carbon tetrachloride toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 1697-1702 (1972).
 31. Marchand, C., McLean, S. and Plaa, G. L.: The effect of SKF 525 A on the distribution of car-

- bon tetrachloride in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **174**, 232-238 (1970).
32. Tuchweber, B. and Kovacs, K.: Influence of phenobarbital and various steroids on CCl_4 hepatotoxicity. *Arch. Toxikol.* **27**, 159-167 (1971).
33. Farber, J. L. and El-Mofty, S. K.: The biochemical pathology of liver cell necrosis. *Am. J. Pathol.* **81**, 237-250 (1975).
34. Snyder, F., Cress, E. A. and Kyker, G. C.: Liver lipid response to intravenous rare earths in rats. *J. Lipid Res.* **1**, 125-131 (1959).
35. Neubert, D. und Hoffmeister, I.: Intracelluläre Lokalisation von Fettsubstanzen bei experimenteller Leberverfettung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathu. Pharmak.* **237**, 519-537 (1960).
36. Reed, K. C. and Bygrave, F. L.: Accumulation of lanthanum by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **138**, 239-252 (1974).
37. Ohshika, H., Saito, T., Hatta, S. and Tanaka, M.: Effect of carbon tetrachloride-induced liver damage on hepatic transport of organic anions in the rat. 7th International Congress of Pharmacology Abstract. p 581 (1978).