

岡山医学会雑誌

第96巻9, 10合併号 (第1078, 1079号)

昭和59年10月30日発行

実験的エタノール・ピラゾール 肝障害に関する研究

第 1 編

肝の形態および血液生化学検査の検討

岡山大学医学部第一内科学教室

曾 我 部 輝 子

(昭和59年7月23日受稿)

Key words: ピラゾール, エタノール,
マイクロゾーム, アルコール肝障害

緒 言

長期のエタノール飲用により生ずる肝障害に関しては、アルコール自体の作用によるものか、あるいはその際にみられる栄養障害によるものか、多くの論議のあるところである。1932年Bestが、アルコール肝障害は、アルコール濫用ともなう栄養障害による¹⁾と発表して以来、長い間その考え方が主流を占めていた。しかし1967年Lieberらが、アルコール肝障害のうち、少くとも脂肪肝の場合は、アルコール自体がその中間代謝を障害して、肝に脂肪を沈着させる²⁾と指摘してより、種々の実験がくり返されてきた。さらに、1974年RubinおよびLieberのヒヒによる実験で、適正な食餌と長期にわたるアルコール投与により、実験的に脂肪肝のみならず、アルコール性肝炎、さらに肝硬変をも生ぜしめ

た³⁾事実により、アルコール自体による直接肝障害説が唱えられるようになった。一方、ラットにおいても、アルコールによって同様な変化を惹起させようとする試みが、次々となされてきた。急性障害の作成のためには、アルコールを急性、かつ大量に胃内注入することによって、脂肪肝を作る方法^{4,5)}があるが、慢性障害を作成するためには、アルコールを飲料水として適正な食事と共に与え、次第にアルコール濃度を増加する方法³⁾、あるいは最近になって、アルコールを含み他の栄養素を適正に含有した液体飼料を、唯一の食事源として与える試み⁶⁾などがなされてきた。しかし、いずれの方法でも、ラットにおいては脂肪肝より強い肝障害を作成することには成功していない。そこで著者は、血中のアルコール濃度をできるだけ高く、かつ長時間持続させることにより、さらに高度の肝障害を

発生させることができるのではないかと考え、アルコール酸化に最も重要な役割をもつアルコール脱水素酵素（以下 ADH と略）の強力な阻害剤であるピラゾール^{7,15)}により前処置したラットにエタノールを飲用させる方法を試みた。すなわち、ピラゾールとエタノールを3週間同時に投与したラットについて、血液生化学的検査、肝の組織変化などを検討した結果、脂肪肝よりもさらに高度な肝障害を作成し得たので報告する。

実験材料および方法

1) 実験動物

体重200~300gのSprague-Dawley系雄性ラットを、次の4群に分けて、pair feedingを行った。

i) オリエンタル固形食と、水を自由に与えた対照群（以下C群と略）

ii) C群と同一条件下において、ピラゾールを毎日、3週間腹腔内注射したピラゾール群（以下P群と略）

iii) オリエンタル固形食で飼育すると同時に、飲料水として15g/dlのエタノールを投与したエタノール群（以下E群と略）

iv) E群と同一条件下において、ピラゾールを毎日、3週間腹腔内注射したエタノール・ピラゾール群（以下EP群と略）

なおエタノールを投与したラットは、慣らし飼いのため、あらかじめ、3~5週間低濃度から始めて、15g/dlまで漸増した。また屠殺12時間前にエタノールを水に置換した。また、ピラゾール投与群においては、1.68%ピラゾール（第一化学）水溶液50mg/kgを、屠殺2日前まで、毎日夕刻に腹腔内に注射した。

2) 実験方法

実験当日は、絶食2時間後に、ラットを軽いエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血、次いで脱血し、肝臓を摘出した。採血した血液については、グルコースを、血清については、aspartate aminotransferase（以下 GOT と略）、alanine aminotransferase（以下 GPT と略）、alkaline phosphatase（以下 Al-P と略）、および総ビリルビンを測定した。摘出肝については、

約4℃の生理食塩水でよく洗滌した後、一部肝切片をホルマリン固定し、組織検査に供した。ついで肝切片の約1gを生理食塩水を用いて、氷冷下にホモジナイズし、ホモジネートを triglyceride（以下 TG と略）および肝蛋白の測定に供した。グルコースは酵素法⁸⁾、GOT と GPT は Reitman-Frankel 法⁹⁾、Al-P は Kind-King 法変法¹⁰⁾、総ビリルビンは Evelyn-Malloy 法変法¹¹⁾により測定した。肝の組織学的検討のために、型の如く肝組織標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色および AZAN 染色により染色した。TG は Schmidt による酵素法¹²⁾で、蛋白は Lowry の方法¹³⁾によって測定した。

実験成績は平均値および標準誤差で表わし、t 検定で、有意差を判定した。

実験成績

1) 体重: Fig. 1 は、実験開始時より屠殺前日までの体重の変動を、平均値および標準誤差で表わしている。C群およびE群では、体重は増加しているが、P群においては、増加はなく、実験開始時と屠殺時とに、殆んど差がない。しかしEP群においては、著明な減少を認める。これを屠殺時体重の、実験開始時体重100に対する指数として表わせば、C群118、E群136、P群104、EP群83となった。

2) 肝重量/体重比 (Table 1): E群はC群に比して、やや増加の傾向はあるが、有意差はない。しかしP群およびEP群においては、明らかに肝重量の増加を認めた。

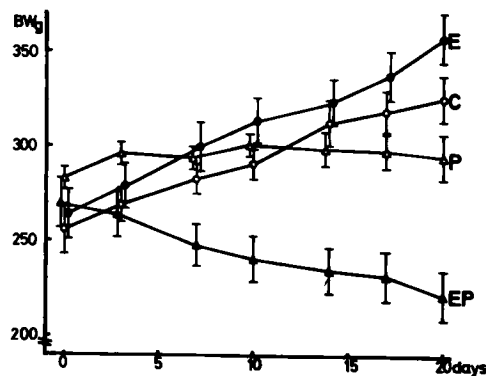


Fig. 1. Growth curve of rat in each groups.

Table 1. Liver-Body weight ratio (mean±SE)

Groups of rat	Number of rats	Liver weight / B.W. (%)	Significant difference
Control(C)	6	3.2±0.1	
Pyrazole(P)	7	4.2±0.1	P : C p<0.001 P : E p<0.001
Ethanol(E)	7	3.5±0.1	
Ethanol + (EP) Pyrazole	9	4.1±0.1	EP : C p<0.01 EP : E p<0.05

Table 2. Daily ethanol intake(mean±SE)

Groups of rat	Ethanol intake (g/kg/day)	Caloric ratio of ethanol to total dietary intake(%)
Ethanol(E)	13±4	28±2.6
Ethanol + (EP) Pyrazole	8±4	25±8.0

Table 3. GOT, GPT, Al-P and total bilirubin of rat serum(mean±SE)

Groups of rat	Number of rats	GOT (Karmen U)	GPT (Karmen U)	Al-P (King-ArmstrongU)	Total bilirubin (mg/dl)
Control(C)	6	210±15	49±7	30.6±4.2	0.40±0.09
Pyrazole(P)	7	199±9	65±12	28.5±3.6	0.36±0.09
Ethanol(E)	7	195±8	46±4	27.0±2.5	0.36±0.06
Ethanol + (EP) Pyrazole	9	284±36	184±44	39.0±3.6	0.59±0.21
Significant difference			EP : C p<0.05 EP : P p<0.05 EP : E p<0.05	EP : E p<0.05	

Table 4. Glucose concentration of rat blood, triglyceride and protein contents of rat liver(mean±SE)

Groups of rat	Number of rats	Glucose (mg/dl)	Triglyceride (mg/g)	Protein (mg/g)
Control(C)	6	131±12	8.2±0.7	165±2
Pyrazole(P)	7	121±4	5.0±0.1	155±5
Ethanol(E)	7	123±8	7.9±0.6	151±8
Ethanol + (EP) Pyrazole	9	112±8	10.5±2.1	138±5
Significant difference			C : P p<0.001 P : E p<0.001 P : EP p<0.05	C : EP p<0.01

3) Table 2はエタノール投与群の、平均エタノール摂取量および、全摂取カロリーに対する比率であるが、摂取量については、E群がEP群より有意に多くのエタノールを摂取しているが、全摂取カロリーに対する比率では、両群の間に殆んど差異が認められなかった。

4) 血清 GOT, GPT, Al-P および総ビリルビン (Table 3): 血清 GPT においては、EP 群が他の3群に比し有意に高値を示しているが、E群およびP群においては変動はない。Al-PはE群に比しEP群は有意に高値を示している。GOT, 総ビリルビンにおいては、いずれもEP群において高値を示す傾向はあるが、有意差は認められなかった。

5) 血中グルコース、肝 TG および肝蛋白 (Table 4) 血中グルコースはEP群において低値を示す傾向はあるが、有意差は認められなかった。肝 TG 量について見ると、C群に対して、EP群は増加の傾向を示してはいるが、有意ではない。P群では、C群に対して有意に減少している。従ってP群に対し、EP群においてはTGの有意な増加を認めた。肝ホモジネート蛋白では、EP群に有意の減少が認められた。

6) 肝の組織学的変化 (Fig. 2~7): 各群のヘマトキシリン・エオジン染色標本の、光学顕微鏡的所見について見ると、P群においては、著明な変化はないが、ただ、辺縁帯の細胞群に、細胞質の空胞形成と、核の大小不同および変性がみられた (Fig. 3)。

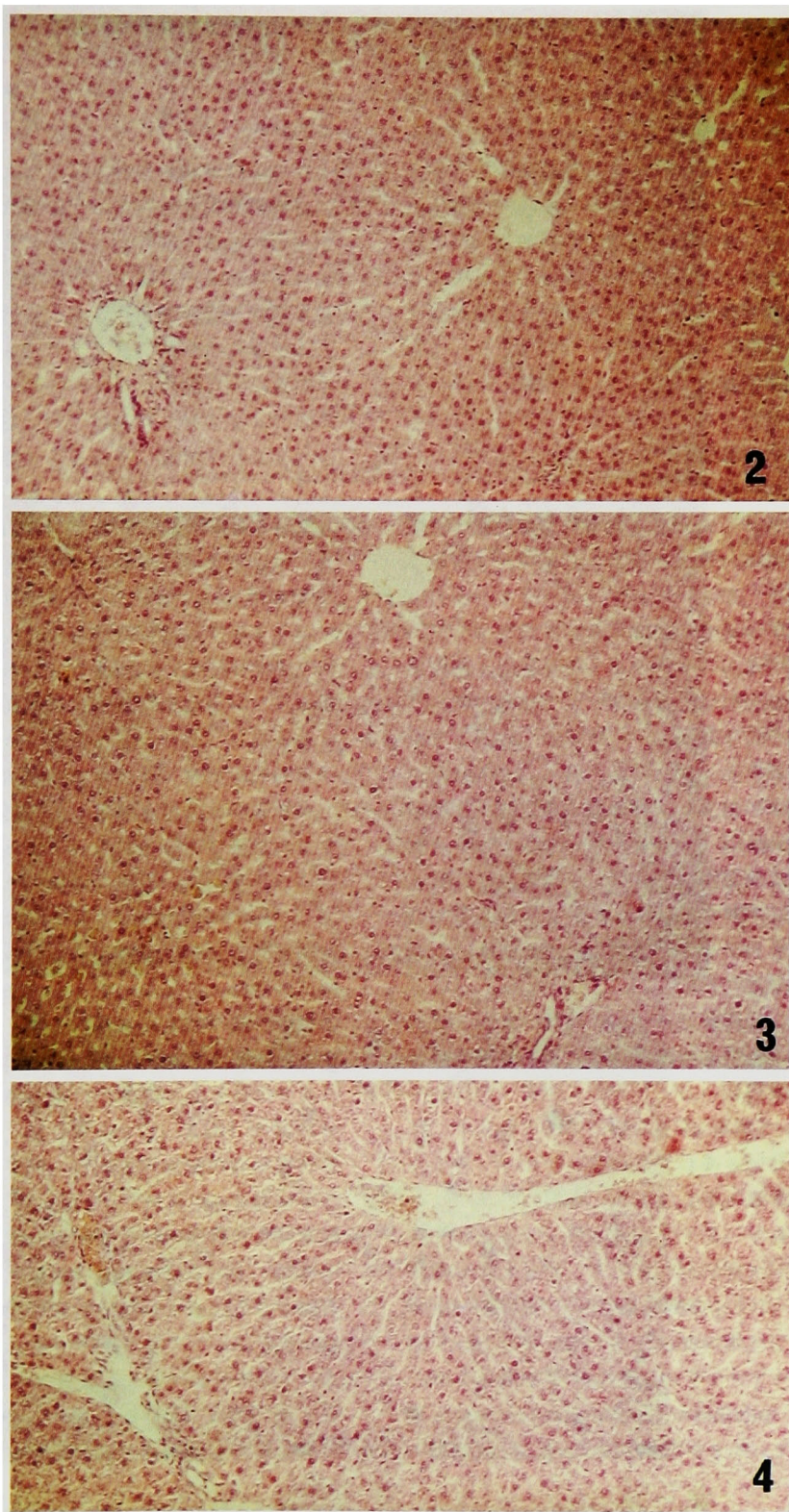
E群においては、軽い細胞質の変性を見るものもあったが、著変は認められなかった (Fig. 4)。

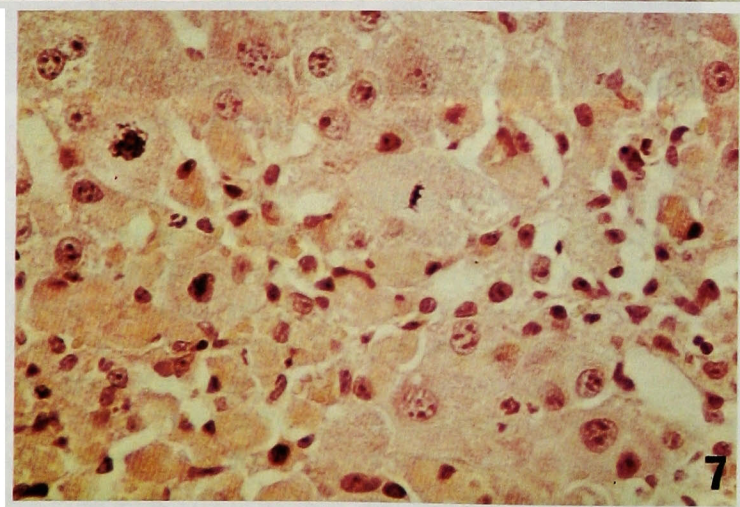
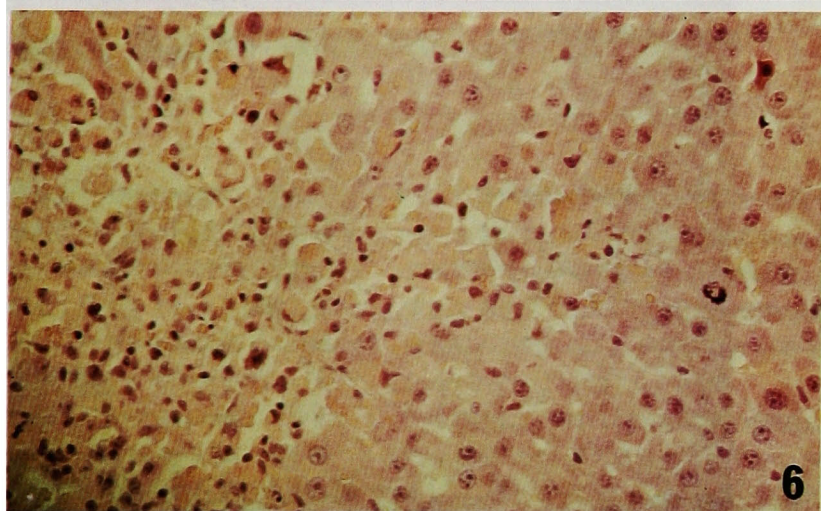
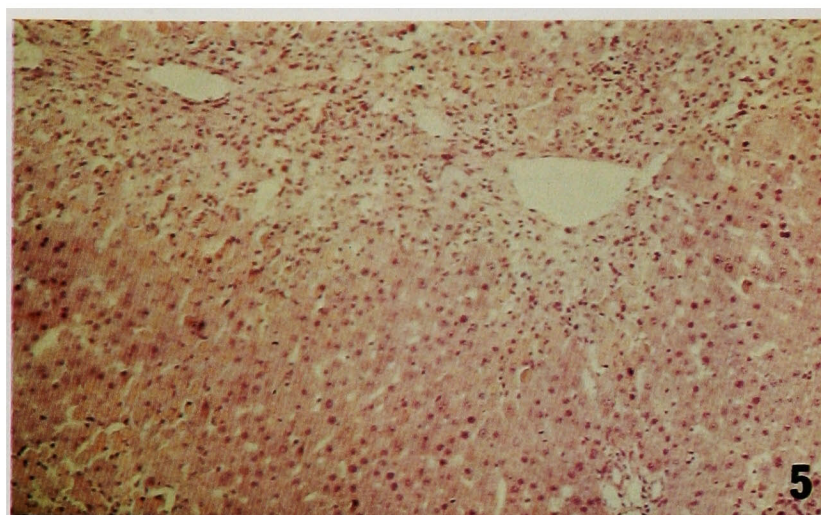
EP群においては、中心静脈周辺すなわち中心帯の細胞は、同心円を描くある範囲において、帯状壊死に陥っている (Fig. 5)。

壊死部と残存肝細胞との中間には、細胞質が均等に好酸性変性に陥り、核の染色性を失った肝細胞が配列している (Fig. 6)。

さらにそれよりも外側の肝細胞では、核の大小不同が目立ち、その一部は数個の核小体を有し、他の一部の肝細胞では、核分裂亢進の傾向を示している。またクロマチン構造の変性を示しているものもあり、そのような細胞は、細胞質に小脂肪滴を含んでいる。小型の脂肪空胞を有する肝細胞群が少数認められる。しかし円形細胞浸潤は強くない (Fig. 7)。

曾我部 輝子論文附图





AZAN 染色標本では、P 群、E 群では、共に線維の増生は認められなかった。EP 群において僅かに中心静脈周辺に、膠原線維を認めるのみであった。

考 案

ラットに、エタノール含有液体飼料などによって、比較的大量のアルコールを長期投与し、脂肪肝を発生させることは可能である^{5,6)}が、それ以上の高度な肝障害、すなわち人にみられるアルコール性肝炎、あるいは肝硬変を発生させることは困難とされてきた。著者の実験でも、15g/dl エタノールのみを、3 週間自由に飲用させた E 群では、肝の組織学的検査でも肝細胞質の軽度の変性をみる以外、異常所見は認められず、肝の TG 量も全く増加していなかった。また血清 GOT、GPT、Al-P の上昇も見られず、いわゆる肝障害の発生は認められなかった。しかしこれは、E 群の一日のエタノール摂取量が、総摂取カロリーのたかだか 28% にすぎず、ラットの脂肪肝を作成した Lieber らの液体飼料でのエタノール含有量 36% に比して少ないためと考えられる。また、P 群においては、E 群とほぼ同様の組織学的変化すなわち、軽度の肝細胞の空胞変性と、核の大小不同を呈している以外に著変はなかったが、肝の TG 量が C 群に比して軽度ではあるが、有意に低下の傾向を示した。この肝 TG 量の減少は、Cederdaum ら¹⁴⁾によっても指摘されており、脂肪酸合成の前駆物質であるクエン酸のミトコンドリアへの移送が抑制されるためと考えられる。また P 群の相対的肝重量の増加は、Lieber らの報告に見られるごとく¹⁷⁾、肝小胞体蛋白の増加によるものであらうと思われる。ピラゾールは、ADH の強力な阻害剤である^{15,16)}一方、その直接の肝障害の可能性について、Lieber ら¹⁷⁾は、ラット肝マイクロゾームの薬物代謝酵素系への影響および電顕による観察で、滑面小胞体の空胞化と、粗面小胞体の減少などの変化が認められたことを報告している。また藤井¹⁸⁾は、ピラゾール、300mg/kg 体重をラットに投与し、肝のマイクロゾームを主とした変化と共に血清 GOT、GPT の上昇をみており、ピラゾールが肝のマイクロゾーム

の障害を通じて、肝障害を発生させることを報告している。しかし藤井¹⁸⁾の実験では、用いたピラゾールの量が、300mg/kg 体重と、本実験の 6 倍の量で、同一には論じられないが、50mg/kg 体重でも毎日 3 週間の投与によって軽度ではあるが、肝マイクロゾームへの何らかの影響のあることが推察される。

これに対して、エタノール、ピラゾール併用群では、肝細胞への脂肪沈着の他、壊死、特に人のアルコール硝子体¹⁹⁾に類似した好酸性変性を認めたのを始め、肝 TG 量の軽度増加、血清においても GPT の著明な上昇、GOT の軽度上昇、Al-P の軽度上昇があり、形態学的にも機能的にも高度な肝障害を呈し、また肝蛋白の有意の減少も見られた。この肝障害発生の機序として、まずピラゾールによるアルコールの第一段階での酸化阻害により、アルコールが血中に長く停滞していることに基づく肝への影響が考えられる。すなわち、アルコールは、その作用の一つとして脳下垂体-副腎系を介して、肝の脂質代謝へ影響を与えると考えられる²⁰⁾が、ピラゾールの併用により血中にアルコールが長く停滞するため、内分泌系への影響がより強く出る可能性がある。さらにアルコール自体が、肝の小器官、特にその膜脂質に、直接の障害をより強く与えることも考えられる。Lelbach も著者と類似した条件で、ラットに脂肪肝よりも高度な障害を発生させ²¹⁾、その発生機序として、アルコールの血中への停滞があるためとしている。しかし、Lieber ら¹⁷⁾、および最近の藤井の報告¹⁸⁾、また、著者の P 群における肝細胞質の空胞変性と核の異常から、うかがわれるごとく、ピラゾール自体の肝マイクロゾームへの影響を考える時、本実験で用いた 50mg/kg 体重という、少量のピラゾールでも、軽度ではあるが肝のマイクロゾームへの障害、あるいはその準備状態を惹起させるものと思われる。一方、アルコールの代謝を考えると、アルコールは主として、肝 cytosol の ADH での脱水素反応をうけ、アセトアルデヒドになるが、それ以外の系として Lieber らにより提唱²²⁻²⁴⁾されたマイクロゾームに局在する microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) によって同じくアセトアルデヒドに脱

水素される系が存在している。このMEOSのKm値はADHのKm値に比して、約3倍と大きい²³⁾ため、少量のアルコール投与ではADH系が、大量の投与では、ADH系の他、MEOSも30%位は関与するものと考えられている。すなわち、本実験のEP群のように、アルコールをピラゾールと共に投与した場合、ADH系によるアルコールの代謝が阻害されるため、マイクロゾームへの負担は、アルコール単独投与よりも著しく大となる。したがってEP群においては、ピラゾール自体によるマイクロゾームへの軽度の障害作用と共に、アルコール代謝を通じて共同的に、マイクロゾームの負荷が増加し、ピラゾールまたはアルコール単独投与ではみられなかった高度な肝障害を、発生させ得たものとする。さらに血清GOT、GPTの変動パターンについて見ても、その血清での上昇はGPT優位であり、人のアルコール肝障害でみられるGOT優位のパターン²⁵⁾とは若干異なり、EP群での肝障害が、血液生化学的にも、アルコール単独投与による肝障害と異なったものであることを示唆している。

ま と め

ラットに、アルコール脱水素酵素阻害剤であるピラゾールと、アルコールを同時に3週間投与し、肝の光学顕微鏡的变化、血液生化学検査、肝 triglycerideなどを測定した。その結果、肝組織には明らかに肝細胞の変性、中心性带状壊死、核の著明な変化、脂肪沈着などの変化が認められた。また血液生化学的検査では、GPTの有意な上昇を認め、Al-Pも軽度の上昇を認めた。また明らかな成長の遅延を認めた。以上の結果より、アルコールとピラゾール併用により著明な肝障害が惹起されたが、これはピラゾールによってアルコールが、血中、ひいては肝内に長時間残存したために生じる内分泌系への影響、および肝細胞質小器官への影響によることと同時に、ピラゾールとアルコールによる肝マイクロゾーム障害への相乗効果のためと考えられる。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を頂いた長島秀夫教授ならびに、直接御指導頂いた国立岩国病院副院長河野宏先生および病理組織学的御指導を頂いた倉敷中央病院内科部長遠藤浩先生に深謝致します。

文 献

1. Best, C.H., Hartroft, W.S., Lucas, C.C. and Ridout, J.M.: Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by cholin. *Br. Med. J.* 2, 1001—1006, 1932.
2. Lieber, C.S., De Carli, L.M.: Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J. Nutr.* 91, 331—336, 1967.
3. Rubin, E. and Lieber, C.S.: Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. *N. Engl. J. Med.* 290, 128—135, 1974.
4. Maling, H.M., Highman, B., Hunter, J.M. and Butler, W.M.J.R.: Biochemical factors in alcoholism. *Pergamon press, Oxford*, p.185, 1967.
5. Lieber, C.S. and Sprits, N.: Diet; Role of dietary, adipose, and endogenously synthesized fatty acids (abstract). *J. Clin. Invest.* 44, 1065—1066, 1965.
6. Lieber, C.S., Jones, D.D. and De Carli, L.M.: Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver despite adequate diets. *J. Clin. Invest.* 44, 1009—1021, 1965.
7. Theorell, H. and Yonetani, T.: Liver alcohol dehydrogenase-DPN-pyrazole complex. A model of a ternary intermediate in the enzyme reaction. *Biochem. Z.* 338, 537—553, 1963.
8. Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. and Stork, H.: Methods of enzymatic analysis. Academic press, New York, p.1196, 1974.
9. Reitman, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic

- oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56—63, 1957.
10. 吉田孝光, 北村元仕: 酸性およびアルカリフォスファターゼ, 臨床化学分析Ⅳ. 酵素, 東京化学同人, 東京, p.88, 1970.
 11. Malloy, H.T. and Evelyn, K.A.: The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119, 481—490, 1937.
 12. Schmidt, F.H., und Dahl, K.: Zur Methode der enzymatischen Neutral-Fette Bestimmung in biologischem Material. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 6, 156—159, 1968.
 13. 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.
 14. Cederbaum, A.I., Rubin, E.: Effects of pyrazole, 4-bromopyrazole and 4-methylpyrazole on mitochondrial function. *Biochem. Pharmacol.* 23, 203—213, 1974.
 15. Lester, D., Keosky, W.Z. and Felzenberg, F.: Effect of pyrazoles and other compounds on alcohol metabolism. *Quart. J. Stud. Alcohol.* 29, 449—454, 1968.
 16. Goldberg, L. and Rydberg, U.: Inhibition of ethanol metabolism in vivo by administration of pyrazole. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1749—1762, 1969.
 17. Lieber, C.S. Rubin, E., De Carli, L.M., Misra, P. and Gang, H.: Effects of pyrazole on hepatic function and structure. *Lab. Invest.* 22, 615—621, 1970.
 18. 藤井 信: アルコール脱水素酵素阻害剤・ピラゾールによる実験的肝障害に関する研究. 肝臓, 20, 1221—1227, 1979.
 19. Mallory, F.B.: Cirrhosis of the liver. Five different types of lesion from which it may arise. *Bull. Johns. Hopkins Hosp.* 22, 69—74, 1911.
 20. Merry, J.: The effect of alcohol, barbiturate, and diazepam on hypothalamic/pituitary/adrenal function in chronic alcoholics. *Lancet* 2, 990—991, 1972.
 21. Leibel, W.K.: Liver cell necrosis in rats after ethanol ingestion under the influence of an alcohol dehydrogenase inhibitor. *Experimentia* 25, 816—818, 1969.
 22. Lieber, C.S. and De Carli, L.M.: Ethanol oxidation by hepatic microsomes; Adaptive increase after ethanol feeding. *Science* 162, 917—918, 1968.
 23. Lieber, C.S. and De Carli, L.M.: Hepatic microsomal ethanoloxidizing system; In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem.* 245, 2505—2512, 1970.
 24. Lieber, C.S. and De Carli, L.M.: Role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181, 278—287, 1972.
 25. 伊藤 進, 塚田悦男, 坂田晃康, 五十嵐正彦: アルコール脂肪肝とその硬変化に関する臨床病理学的知見. 肝臓, 13, 579—587, 1972.

附 図 説 明

Fig. 2. Control group, HE×100

Fig. 3. Pyrazole group, HE×100; almost normal.

Fig. 4. Ethanol group, HE×100; almost normal.

Fig. 5. Ethanol+Pyrazole group, HE×100; Centrilobular necrosis.

Fig. 6. Ethanol+Pyrazole group, HE×250; Centrozonal necrosis, midzonal eosinophilic degeneration of liver cells.

Fig. 7. Ethanol+Pyrazole group, HE×400; Periportal nuclear changes and cytoplasmic vacuoles.

Studies on experimental damage of the liver by ethanol and pyrazole

Part. 1 Morphology of the liver and liver function tests

Teruko SOKABE

First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

After administration of ethanol and pyrazole, a potent inhibitor of alcohol dehydrogenase, for 3 weeks to rats, histological changes, liver function tests and triglyceride contents of the liver were examined. Centrilobular zonal cell necrosis, remarkable eosinophilic degeneration, nuclear changes and fat deposition were found. Significant elevation of alkaline phosphatase was observed. Furthermore, there was retardation of growth. From these results, the marked liver damage produced by combination of ethanol and pyrazole can be attributed to the hormonal effect of a relatively high concentration of ethanol on liver cells and the combined effect of ethanol and pyrazole on liver cell microsomes.