

実験的エタノール・ピラゾール 肝障害に関する研究

第 2 編

肝の糖質代謝律速酵素およびアルコール脱水素酵素に関する検討

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 : 糖代謝律速酵素, アルコール肝障害,
ピラゾール, マイクロゾーム

緒 言

著者は、アルコールとピラゾールをラットに3週間併用投与することによって、アルコールおよびピラゾールそれぞれ単独投与においてはみられなかったような、強い肝障害を生ぜしめた¹⁾。その発生機序に関しては、ピラゾールによって、アルコールが血中に長時間残存した結果というよりもむしろ、アルコールとピラゾールによる肝マイクロゾーム障害への相乗作用によるものであらうと推論した。本実験においては、同じ実験条件下において、肝のアルコールおよび糖質代謝律速酵素活性を測定し、その代謝調節の異常の有無を検討し、他の肝障害の際の異常との比較によって、アルコール・ピラゾール肝障害の発生機序を解明しようと試みた。

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群においてpair feedingを行なった。

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、ラットをエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より脱血し、肝臓を摘出した。摘出肝はすばやく約4°Cの生理食塩水でよく洗滌した後、

i) 肝切片の約2gを0.154M KCl bufferを用い、氷冷下にホモジナイズし、ホモジネートの一部については、glucose-6-phosphatase(以下G6Paseと略)および肝蛋白を測定した。残りのホモジネートは、2°Cにおいて、Hitachi 18 PR-3 automatic high speed refrigerated centrifugeを用い、30000gで1時間遠沈した後、上清をglucokinase(以下GKと略)、pyruvate kinase(以下PKと略)、glucose-6-pho-

Table 1. Total activities of GK, HK, G6PD, PK, G6Pase and ADH in rat liver (μ mole/g liver/min) (mean \pm SE)

Groups of rat	GK	HK	G6PD	PK	G6Pase	ADH
Control(C)	1.28 \pm 0.27 n=6	0.271 \pm 0.030 n=6	3.78 \pm 0.46 n=6	46.1 \pm 6.5 n=6	12.8 \pm 1.4 n=6	0.496 \pm 0.032 n=6
Pyrazole(P)	1.33 \pm 0.11 n=7	0.186 \pm 0.020 n=7	5.27 \pm 1.13 n=6	31.1 \pm 6.1 n=6	7.9 \pm 0.6 n=7	0.476 \pm 0.056 n=7
Ethanol(E)	1.63 \pm 0.26 n=7	0.161 \pm 0.037 n=6	2.64 \pm 0.34 n=7	46.2 \pm 7.7 n=7	15.2 \pm 1.4 n=7	0.530 \pm 0.090 n=7
Ethanol + (EP) Pyrazole	1.29 \pm 0.10 n=9	0.214 \pm 0.044 n=9	4.76 \pm 0.65 n=9	14.7 \pm 4.2 n=8	6.2 \pm 0.7 n=9	0.534 \pm 0.073 n=8
Significant difference		P:C p<0.05	EP:E p<0.05	EP:C p<0.01 EP:E p<0.01	P:C p<0.01 P:E p<0.001 EP:C p<0.001 EP:E p<0.001	

n : number of rats

Table 2. Specific activities of GK, HK, G6PD, PK, G6pase and ADH in rat liver (mU= $m\mu$ mole/mg protein/min) (mean \pm SE)

Groups of rat	GK	HK	G6PD	PK	G6Pase	ADH
Control(C)	12.9 \pm 2.7 n=6	2.7 \pm 0.3 n=6	39.0 \pm 6.3 n=6	456 \pm 65 n=6	77.4 \pm 8.2 n=6	4.9 \pm 0.5 n=6
Pyrazole(P)	13.6 \pm 1.2 n=7	1.9 \pm 0.2 n=7	42.9 \pm 7.9 n=6	326 \pm 72 n=6	51.4 \pm 3.5 n=7	5.0 \pm 0.7 n=7
Ethanol(E)	16.1 \pm 2.5 n=7	1.7 \pm 0.4 n=6	27.1 \pm 3.9 n=7	475 \pm 88 n=7	101.0 \pm 8.4 n=7	5.5 \pm 1.0 n=7
Ethanol + (EP) Pyrazole	12.6 \pm 1.4 n=9	2.2 \pm 0.6 n=9	47.5 \pm 8.5 n=9	157 \pm 56 n=8	45.2 \pm 5.1 n=9	5.6 \pm 0.8 n=8
Significant difference				EP:C p<0.001 EP:P p<0.001 EP:E p<0.01	P:C p<0.05 P:E p<0.001 EP:C p<0.01 EP:E p<0.001	

n : number of rats

sphate dehydrogenase (以下 G6PD と略) および蛋白測定に供した。

ii) 肝切片の約 1 g を, 0.1M phosphate buffer を用い, 氷冷下にホモジナイズし, ホモジネートを i) の如く遠沈し, 上清を alcohol de-

hydrogenase (以下 ADH と略) および蛋白測定に供した。

GK は Vinuela らの方法²⁾, HK は Vinuela らの方法²⁾, G6PD は Kornberg Horecker の方法³⁾, PK は Tanaka の方法⁴⁾, G6Pase は Koi-

Table 3. Activities per g liver per 100g body weight of GK, HK, G6PD, PK, G6Pase and ADH in rat liver (μ mole/min/100g body weight) (mean \pm SE)

Groups of rat	GK	HK	G6PD	PK	G6Pase	ADH
Control (C)	4.22 \pm 0.98 n=6	0.873 \pm 0.113 n=6	12.16 \pm 1.56 n=6	151 \pm 26 n=6	40.3 \pm 4.0 n=6	1.59 \pm 0.14 n=6
Pyrazole (P)	5.58 \pm 0.46 n=7	0.775 \pm 0.078 n=7	21.28 \pm 4.19 n=6	133 \pm 27 n=6	33.2 \pm 2.3 n=7	2.01 \pm 0.26 n=7
Ethanol (E)	5.74 \pm 0.87 n=7	0.560 \pm 0.120 n=6	9.25 \pm 1.18 n=7	163 \pm 28 n=7	53.5 \pm 4.7 n=7	1.91 \pm 0.38 n=7
Ethanol + (EP) Pyrazole	5.28 \pm 0.47 n=9	0.858 \pm 0.160 n=9	19.64 \pm 2.84 n=9	59 \pm 16 n=8	25.2 \pm 2.7 n=9	2.19 \pm 0.30 n=8
Significant difference			P:E p<0.05 EP:E p<0.05	EP:C p<0.05 EP:E p<0.01	P:E p<0.01 EP:C p<0.01 EP:E p<0.001	

n : number of rats

deらの方法⁵⁾により, ADH 活性は Bonnichsonの方法⁶⁾によって, recorderつき Hitachi 624 digital spectrophotometer を用いて測定し, 蛋白は Lowry の方法⁷⁾によって測定した. なお酵素の総活性は $m\mu$ mole/g liver, 比活性は $m\mu$ mole/mg protein, 全肝当り活性は体重100g 当りの肝重量についての総活性で表わしている.

実験成績は, 平均値および標準誤差で表わし, t 検定で有意の変化を判定した.

実験成績

Table. 1 は各群別の酵素の総活性を, Table. 2 は比活性を, Table. 3 は肝全体の活性を表わす目的で, 体重100g 当りの肝重量についての活性 (全肝当り活性と略) を示している.

1) 解糖系律速酵素:

i) Glucokinase: 総活性, 比活性, 全肝当り活性いずれにおいても, 各群の間に有意の変化は認められなかった.

ii) Hexokinase: P群において, 総活性のみ有意の低下を認めた. 比活性, 全肝当り活性では, 有意の変化は認めなかった. 他の各群においては, 総活性, 比活性, 全肝当り活性に有意差を認めなかった.

iii) Glucose-6-phosphate dehydrogenase:

E群においては, 僅かに総活性の低下の傾向があるが, 有意ではない. 一方 EP 群においては, 逆に総活性の上昇をみているので, 推計学的には E群に比し, 有意の総活性の上昇が認められ, 同時に全肝当り活性でも同様のことがいえる. P群でも全肝当り活性が E群に比して有意に上昇している.

iv) Pyruvate kinase: E群と P群は C群に比して, 有意の差は認めないが, EP 群に著明な活性の低下を認めた. これは総活性のみならず, 比活性および全肝当り活性においても, 同様であった. したがって, E群, P群に対しても, 有意に活性の上昇を認めている.

2) 糖新生系律速酵素:

Glucose-6-phosphatase: E群においては, 各活性が C群に比して僅かに上昇傾向を認めるが, 有意ではない. しかし P群と EP 群においては, C, E 両群に対して共に著明な活性の低下を認めており, その傾向は, 総活性のみならず, 比活性, 全肝当り活性でも同様のことがいえた.

3) Alcohol dehydrogenase: 総活性, 比活性および全肝当り活性のいずれにおいても, 各群間に有意差を認めなかった.

考 案

アルコール投与あるいはアルコール肝障害の際の肝酵素パターンについての報告は少ないが、Jauhonenによるアルコール36%含有液体飼料7日間投与の実験では、肝G6Paseの上昇を認めており⁸⁾、またNelsonの急性腹腔内アルコール投与の実験によっても、肝G6Paseの上昇を認めている⁹⁾。同様にアルコールの急性血管内投与でも、肝G6Paseの上昇がみられている¹⁰⁾。さらにMarciniakの犬に対する慢性アルコール投与では、肝G6PDの上昇を認めている¹¹⁾。

今回の実験において、E群ではG6Paseの上昇は僅かに認められるが有意ではなかった。これはJauhonenおよびNelsonの両実験におけるアルコールの投与量が著者の実験のそれよりかなり多いためと考えられる。

G6PDについては、Marciniakの結果とはむしろ逆にE群では活性の低下をみている。これはMarciniakの実験が犬を使用し、しかも11週の長期にわたるアルコール投与で行なわれていることも、考慮に入れなくてはならない。

次に、ピラゾール単独投与群においてみると、HKの有意な活性の低下、G6PD活性の上昇傾向を認めるが、逆にPKにおいては、僅かに活性の低下傾向をみている。またG6Paseにおいては、有意な活性の低下を認めているが、武田によると、肝臓毒である四塩化炭素肝障害の際の酵素パターンは、HK、G6PD、PFK、Aldolase A、PKの筋肉型であるM₂が活性増加し、GK、G6Pase、FDPase、Aldolase B、PKの肝型であるLの活性減少を認めている¹²⁾。このような酵素パターンは、他の肝臓毒であるthioacetamide、allyl formate、galactosamineによる肝障害の際にもみられるもの¹³⁻¹⁶⁾であるが、本実験におけるP群の示す酵素パターンも共通した点をもっており、ピラゾールが単にアルコールの代謝阻害剤のみにとどまらず、肝臓毒としても働いているとする藤井らの報告¹⁷⁾や、著者の第1編での結論を支持していると考えられる。

本実験でのエタノール・ピラゾール併用群の示す酵素パターンを見ると、GK、HK、ADHには著明な変化が認められないが、G6PDでは

E群が活性低下しているにもかかわらず、EP群ではむしろ有意に上昇がみられている。またPKは、C群、E群、P群に比して、著明な低下をみている。G6Paseについてみると、E群では有意差はないにしても、僅かに上昇がみられるのに対して、EP群では著明な低下を認め、これも既に報告した¹⁾EP群での血中グルコース値の低下とも一致している。このEP群の示している酵素パターンは、E群の酵素パターンとは逆の傾向を示し、むしろP群のそれに類似し、その酵素パターンをより強調した形をとっている。すなわち、EP群においても、ピラゾールがそれ自体の影響を及ぼしており、さらにピラゾールは、アルコールの併用によって、両者の相乗効果を発揮し、肝の糖質代謝に対して大きな影響を与え、糖新生を抑制しているものと思われる。もっとも、これらの酵素パターンを生ぜしめたものが、ピラゾールとアルコールそれ自体の効果であるか、又は惹起された障害肝に二次的におきた生化学的変化のあらわれであるかは、本実験の成績からは解明されない。

以上のように、アルコールおよびピラゾールの併用による肝障害が、ピラゾールによってアルコール高濃度に作用した結果でもなく、また、ピラゾールそのものの効果でもなく、両者の相互作用によって全く異なった酵素パターンを呈し、その事が第1編においてみられた肝組織の変化を裏付けているものと考えられた。

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、肝の解糖系律速酵素のうち、GK、HK、G6PD、PKおよび、糖新生系律速酵素のうちG6Pase、ならびにアルコール脱水素酵素を測定した。その結果、GK、HK、ADHについては有意の変動はないが、G6PDは、アルコール群では活性低下しているにもかかわらず、ピラゾールとの併用群では有意な上昇をみている。またPKは、アルコール・ピラゾール併用群においてのみ、明らかな活性の低下を認めた。G6Paseはアルコール群では上昇を認めたが、ピラゾール単独群では僅かの、アルコール併用群では著

明な活性の低下を認めている。

以上の結果より、本実験の肝障害では、アルコール肝障害時の酵素パターンとは全く異なり、肝臓毒たる薬物の障害肝における酵素パターンとは共通点はあるものの、やはり異なったパターンを示している。これは、アルコールおよびピラゾールの併用による肝障害が、ただ単にピ

ラゾールによってアルコールが高濃度に血中に残存することのみではなく、アルコールおよびピラゾールの相互作用によって生じた障害であることを示していると考えられた。

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に深謝致します。

文 献

1. 曾我部輝子：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。岡山医誌，96，865—873，1984。
2. Vinuela, E., Salas, M. and Sols, A.: Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 238, PC1175—1177, 1963.
3. Kornberg, A. and Horecker, B.L.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods in Enzymology*, ed. S.P. Colowick, and N.O. Kaplan, Academic Press, New York. Vol. I, pp.323—327, 1955.
4. Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. and Morimura, H.: Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *J. Biochem. (Tokyo)*, 62, 71—91, 1967.
5. Koide, H. and Oda, T.: Pathological occurrence of glucose-6-phosphatase in serum in liver diseases. *Clin. Chim. Acta* 4, 554—561, 1959.
6. Bonnichson, R.K. and Brink, N.G.: Liver alcohol dehydrogenase. In *Methods in Enzymology*, ed. S.P. Colowick, and N.O. Kaplan, Academic Press, New York, pp.495—500, 1955.
7. Lowry, O.H., Rosebröugh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275, 1951.
8. Jauhonen, V.P., Savolainen, M.J., Hiltunen, J.K. and Hassinen, I.: Adaptive changes in gluconeogenic enzymes in rat liver and kidney during long-term ethanol ingestion. *Metabolism* 27, 1557—1564, 1978.
9. Nelson, P., Wagle, S.R. and Ashmore, J.: Studies on ethanol-induced stimulation of glucose-6-phosphatase activity. *Metabolism* 19, 349—352, 1970
10. Nelson, P., Tan, W.C., Wagle, S.R. and Ashmore, J.: Hepatic metabolism and enzyme activity in acute ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.* 16, 1813—1819, 1967.
11. Marciniak, M., Gudbjarnason, S. and Bruce, T.A.: The effect of chronic alcohol administration on enzyme profile and glyceride content of heart muscle, brain and liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 1021—1025, 1968.
12. Taketa, K., Tanaka, A., Watanabe, A., Takesue, A., Aoe, H. and Kosaka, K.: Undifferentiated patterns of key carbohydrate-metabolizing enzymes in injured livers. *Enzyme* 21, 158—173, 1976.
13. Tanaka, A., Taketa, K. and Kosaka, K.: Disorders of hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in liver injuries. In *Yamamura and Katsunuma Metabolic Regulation-Organ and Tissue*, The Committee sponsoring the Seminar on Metabolic Regulation, Tokyo pp.75—96, 1973, (in Japanese).
14. Taketa, K., Tanaka, A., Watanabe, A., Takesue, A., Aoe, H. and Kosaka, K.: Induction of hepatic key glycolytic enzymes by liver injury. *Proc. Symp. Chem. Physiol. Pathol.* 11, 30—35, 1971, (in Japanese).

15. Monier, D. and Wagle, S.R.: Studies on gluconeogenesis in galactosamine induced hepatitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**, 377—380, 1971.
16. Watanabe, A. and Taketa, K.: Dysregulation of protein synthesis in drug-induced liver injuries. *Jpn. J. Gastroenterol.* **71**, 1063—1065, 1974, (in Japanese).
17. 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.

Studies on experimental damage of the liver by ethanol and pyrazole**Part 2. Key carbohydrate-metabolizing enzymes
and alcohol dehydrogenase in the liver****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, enzyme activities of key glycolytic enzymes of the liver (glucokinase, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase), a key gluconeogenic enzyme, (glucose-6-phosphatase), and alcohol dehydrogenase were investigated. The resulting enzyme patterns are as follows: In rats treated with ethanol alone, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was decreased and glucose-6-phosphatase activity was increased. In the group treated with pyrazole, activities of hexokinase and glucose-6-phosphatase were decreased. In the group treated with pyrazole and ethanol, the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase was significantly increased, and those of pyruvate kinase and glucose-6-phosphatase were significantly decreased. The enzyme patterns appear to be different from those in liver injured by alcohol or hepatotoxins. This result suggests that liver damage caused by ethanol and pyrazole is due not only to high blood alcohol levels, but also to a combined effect of pyrazole and alcohol in regard to hepatic microsomes.