

●原 著

実験的四塩化炭素肝障害に対する高圧酸素療法の影響

小島 範子* 恩田 昌彦* 森山 雄吉* 田中 宣威*
 田尻 孝* 徳永 昭* 笹島 耕二* 滝沢 隆雄*
 吉安 正行* 古川 清憲* 金徳 栄* 内藤 善哉*
 阿部 靖子**

高度肝障害の治療に対する OHP の有効性が報告されているが、その作用機序を明らかにするため、 CCl_4 障害肝に対する OHP の影響を検討した。

ラットに CCl_4 を 0.25ml/100g を腹腔内投与するとその生存率は 73.3% であるのに対し、OHP (3 ATA, 2 hrs.) を投与直後施行するとその生存率は 100% に上昇し、さらに組織学的所見からも CCl_4 による致死性障害は軽減されていた。また血清 GOT, GPT, T-Bil 値の変動から、24 時間後が最も障害が強く、72 時間後では正常域に戻っていたが、この際も OHP 施行することにより、その障害の程度は低く抑えられ、正常域に復すのもより早期から見られた。また、DNA 量は経時的に増加するが、72 時間後においては OHP 施行したことにより有意に上昇した。更に病理組織学的にみると、 CCl_4 による障害の程度は OHP 施行することにより軽度で、しかも 72 時間後では、肝組織の再生がより顕著に認められた。

以上のことより、OHP は、 CCl_4 による肝障害の軽減および改善さらに、肝再生の促進に有効であり、臨床的にも肝障害の治療の手段の一つとして有用であるものと思われる。

キーワード：高圧酸素療法、四塩化炭素、肝障害、フリーラジカル、肝再生

Effects of Hyperbaric Oxygenation on Experimental Liver Injury by Carbon Tetrachloride

Noriko Kojima*, Masahiko Onda*, Yukichi Moriyama*, Noritake Tanaka*, Takashi Tajiri*, Akira Tokunaga*, Koji Sasajima*, Takao Takizawa*, Masayuki Yoshiyasu*, Kiyonori Furukawa*, Deog Young Kim*, Zenya Naito*, and Yasuko Abe**

*The First Department of Surgery, Nippon Medical School

**The First Department of Biochemistry,

The effect of OHP upon liver injury by CCl_4 was investigated. CCl_4 (0.25mg/100g, i.p.) caused severe liver injury or death in rats without OHP and the survival rate was 73.3% at 72 hours later. Histological finding showed diffuse necrosis and fatty degeneration of liver cells. Blood examina-

tion at 24 hours showed highest GOT, GPT and total bilirubin values. Then, they all returned within normal limits at 72 hours later. DNA content of liver tissue increased gradually until 72 hours.

On the other hand, in OHP treated rats (3 ATA, 2 hours), there was no death at 72 hours. OHP decreased CCl_4 toxicity on liver cells histologically. Regeneration process could already be seen at 72 hours later. Transaminases were also significantly lower than control. From these results, OHP decreased CCl_4 toxicity on liver cells by reducing P-450 activity. This suggests that OHP may be effective for liver insufficiency.

Keywords :

high pressure oxygen therapy
 carbon tetrachloride
 hepatic injury
 free radical
 hepatic regeneration

*日本医科大学第一外科

**日本医科大学第一生化学

緒 言

肝細胞の機能回復には肝血流量が深く関与しており、特に肝切除後の経過にも肝血流量が重要であることが明らかにされてきた¹⁾。

ところで、高圧酸素療法 (OHP) は、高分圧酸素の吸入により、血中酸素含量を増大させる療法であり、従来 CO 中毒、末梢血行障害あるいはガス壊疽などの疾患に臨床的に用いられてきたが、最近高度肝障害に対する治療の一つとしての OHP の有効性が注目されつつある。すなわち術後肝不全に陥った症例に対し OHP 施行を契機として肝機能が好転し、さらに全身状態も、著しく改善したとの報告²⁾もあり、教室でも肝硬変症に伴う食道静脈瘤破裂症例でその治療中に血清ビリルビン値が徐々に上昇し、肝不全への移行が憂慮された症例に OHP が著効を奏した症例を経験、報告している³⁾。しかしながら、障害肝に対する OHP の作用機序に関する報告は少なく、いまだ十分解明されているとはいえない。そこで今回私どもは障害肝に対する OHP の治療効果を検討する目的で、四塩化炭素 (CCl₄) を用いて急性肝障害モデルを作成し、障害肝に対する OHP の影響を生化学的並びに病理組織学的に検索し、その作用機序について若干の検討を加えた。

方 法

1. 実験動物および薬剤

体重180g 前後の Wistar 系雌性ラット75匹を用い、CCl₄により実験肝障害を作成した。CCl₄は0.25ml/100g をオリーブ油等量混合液とし、腹腔内に1回投与した。I群は CCl₄投与後 OHP 無処置群とし、II群は CCl₄投与後 OHP 処置群とした。各群とも、24時間、48時間、72時間と経時的に屠殺し検索した。なお、OHP 処置は、空気加圧下3 ATA で2時間、純酸素吸入し、CCl₄投与直後15分以内に1回のみ施行した。

2. 各群における生存数の比較

OHP 処置の有無による生存数を CCl₄投与後72時間観察した。

3. 血液生化学的検索

ネンブタール麻酔下にて開胸し、心臓より採血した。GPT, GOT, choline esterase (CHE) total bilirubin (T-Bil), total cholesterol (T-Cho),

free fatty acid (FFA) の6項目に関してオートアナライザー (日立736 50E) にて測定し、比較検討した。

4. 肝組織中の DNA, RNA 定量

肝湿重量当たり4倍容の0.25M Sucrose-3.3 mM CaCl₂により homogenize 後、Schmidt-Thannhauser 法⁴⁾に従い、RNA, DNA 分画を調製した。DNA は Diphenylamine 法⁵⁾, RNA は Orcinol 法⁶⁾にて定量した。

5. 病理組織学的検索

CCl₄投与後、各群とも24時間、48時間、72時間に屠殺剖検した。肝を摘出後、10%ホルマリン液にて固定し、常法に従って H-E 染色を施し、光顕的に観察し CCl₄投与後、OHP 施行の有無による肝障害の程度を比較検討した。

結 果

1. 生存数の比較

CCl₄処置後 OHP 無処置の I 群30匹では、7時間後1匹、18時間後2匹、21時間後1匹と24時間以内に4匹死亡し、24時間後の生存率は86.7%であった。その後も29時間後1匹、34時間後1匹、42時間後2匹と24~48時間に4匹死亡し、72時間後までの生存率は73.3%であった。これに対し、CCl₄処置後 OHP を施行した II 群30匹では、72時間後まで全部生存し、生存率は100%であった (図1)。

2. 血液生化学成績

血清中の GPT, GOT, CHE, T-Bil, T-Cho,

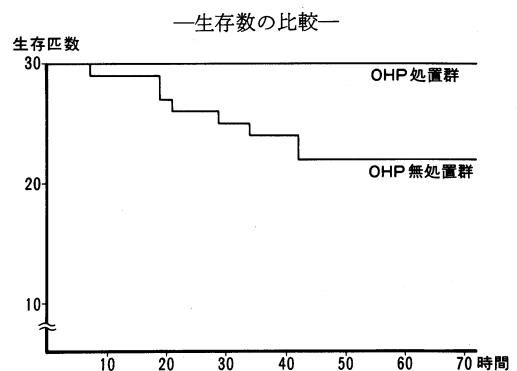


図1 CCl₄処置ラットに対する OHP 療法の影響

表1 血液生化学検査

	OHP	GPT (IU/l)	GOT (IU/l)	CHE (IU/l)	T-Bil (mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	FFA (mEq/l)	
CCl ₄ 無処置群	— (n=5)	46±2.5	125±16.1	12±1.1	0.2±0.04	65±5.3	0.181±0.071	
	+ (n=10)	40±6.8	125±13.3	10±0.9	0.2±0.03	54±3.8	0.493±0.062	
CCl ₄ 処置群	24 hr	— (n=10)	2006±328	6748±994	33±3	1.5±0.3	75±9	0.816±0.086
		+ (n=10)	1414±322	3820±822	21±2	0.6±0.1	69±3	0.868±0.049
	48 hr	— (n=10)	668±142	2635±527	11±0.8	0.7±0.06	69±3	0.841±0.054
		+ (n=10)	50±3	169±29	11±0.7	0.3±0.03	67±4	0.767±0.108
	72 hr	— (n=10)	127±50	368±79	9±1.0	0.4±0.04	79±10	0.767±0.048
		+ (n=10)	164±23	532±51	7±0.8	0.3±0.05	86±3	0.659±0.054

(Mean±S.E.) * : P<0.05, ** : P<0.005, *** : P<0.001

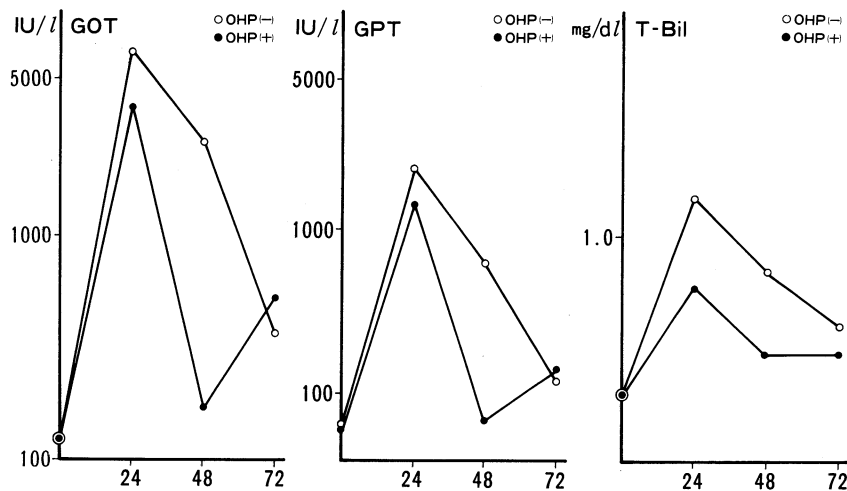


図2 血液生化学検査値の経時的変化

FFA値は表1に示した。これら6項目のうち、OHPの有無により差が見られたGOT, GPT, T-Bilの経時的変化を図2に示すが、GOT, GPT, T-Bilとも同様な傾向を示し、OHP無処置のI群では24時間でpeakを来し、その後時間の経過と共に低下、72時間ではcontrol値にほぼ近付いた。OHP処置のII群ではI群と同様24時間でpeakを示すが、その上昇はやや抑えられ、48時間でほぼcontrol値に近い値を示した。

3. 肝組織の生化学的検査

① 肝湿重量当たりのDNA量

両群ともほぼ経時的に増加する同様な傾向が見られ、72時間では、control値に比し、I群は約3倍値を、II群は約4倍値を示し、両群間には有意差(P<0.05)が認められた(図3)。

② 肝湿重量当たりのRNA/DNA比

両群とも同様な傾向を示し、24時間で最も低値を来し、control値の約1/2となり、48時間で約1/3に

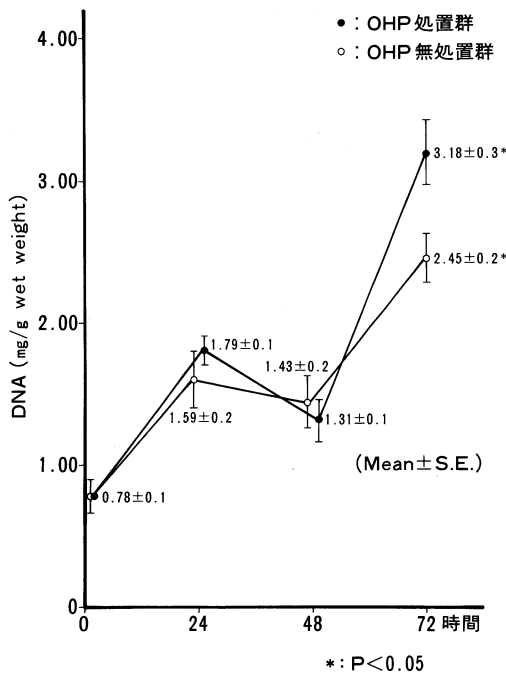


図3 DNA量の経時的変化

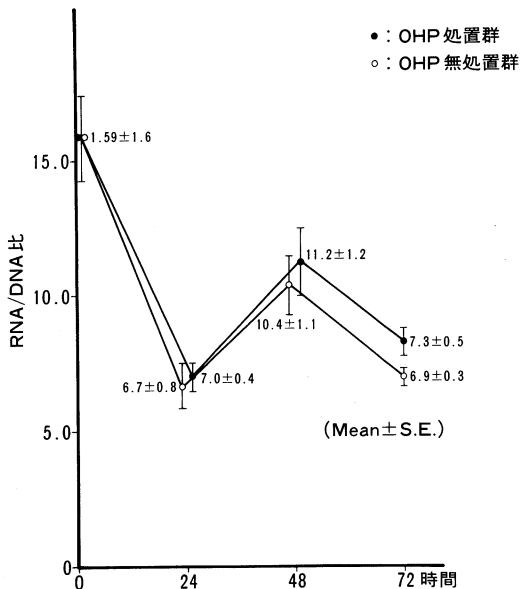


図4 RNA/DNA比の経時的変化

回復するものの、72時間では24時間とほぼ同様の値にまで減少し、両群間に差は認められなかった(図4)。

4. 病理組織学的所見

24時間後においては、I群では中心静脈から広がるび慢性の脱落変性と脂肪変性が見られるのに対し、II群では中心静脈周囲の変性はほとんど見られなかった(図5 a, b)。48時間のI群では中心静脈を結ぶ bridging necrosis が認められるものもあったが、II群では中心静脈周囲の肝細胞の脱落、変性はより軽度だった(図6 a, b)。72時間においては、I群では肝細胞の水腫様および脂肪変性が中心静脈領域に見られるが、再生像も散見された。II群ではグリソン周囲に軽度のクーパー細胞とリンパ球の浸潤像が見られるが、肝細胞の再生はI群に比しより顕著であった(図7 a, b)。

以上のように、 CCl_4 による肝組織障害の程度は、II群では、I群に比し軽度であり、経時的に見られる組織の修復像も顕著に認められた。

考 察

肝障害に対するOHPの有効性に関しては実験的並びに臨床的にいくつかの報告がなされている。すなわち Truss⁷⁾らは多量の CCl_4 を摂取した28歳男性に早期にOHPを施行した所、肝障害が最小限に抑えられたと報告しており、 CCl_4 投与による肝障害の主要因である低酸素素に起因する中心壊死をOHPによる組織酸素分圧上昇が抑制する効果であろうと述べている。また、江崎²⁾は肝細胞機能には肝血流量が深く関与しているという考え方から、血中酸素含量を増大させるOHPに着目し、これを術後肝不全症例に応用し有効であったと報告している。更に教室においても沖浜³⁾は、肝硬変症に随伴した高ビリルビン血症に高圧酸素療法が有効であった症例を経験、報告している。ところでこのような肝障害に対するOHPの作用機序についての研究報告は少なく、解明されるべき点も少なくない。

そこで私どもは、実験的 CCl_4 障害肝に及ぼすOHPの影響を検討した。まず CCl_4 投与後の生存率をみると、OHP無処置群では24時間後の生存率は86.7%で、48時間以後は73.3%であった。これに比しOHP処置群では、72時間後まで100%の生存率を示し、 CCl_4 による致死性障害はOHPにより明らかに軽減された。この結果は、 CCl_4 肝障害ラットにOHPを施行し、生存率の上昇を認め

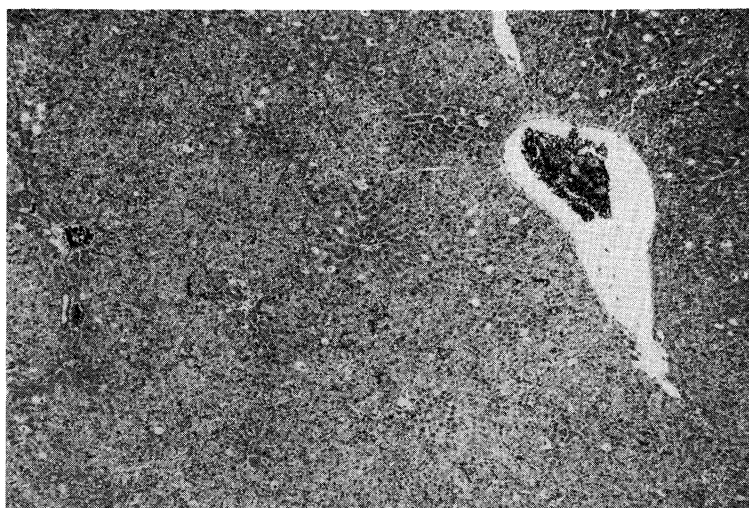
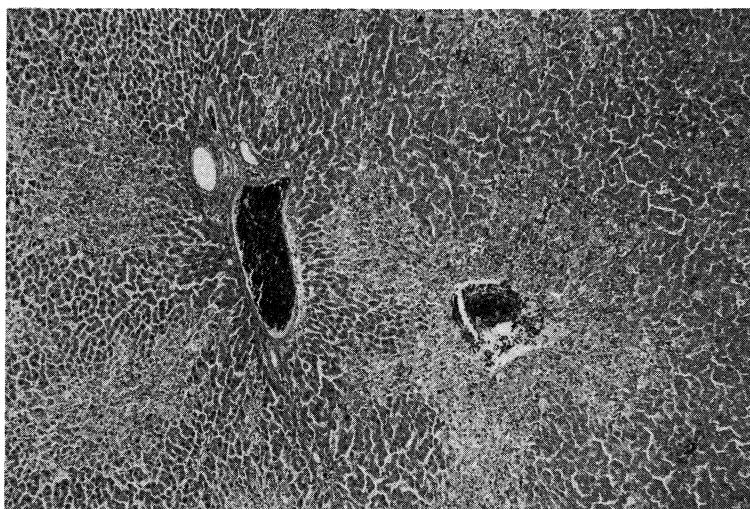


図 5 a CCl₄投与 OHP 無処置群, 24時間後では中心静脈から広がるび漫性の脱落変性と脂肪変性が見られる。H.E.×160



5 b CCl₄投与 OHP 処置群, 24時間後では中心静脈周囲の変性はほとんど見られない。H.E.×160

たという Montani⁸⁾あるいは Burk⁹⁾の報告とも一致しており, OHP は CCl₄障害肝の軽減あるいは改善に有効である事が示唆された。さらにこの事実は生化学的並びに組織学的検索からも裏付けられた。すなわち, 血清 transaminase 活性並びに T-Bil の変動は共に24時間で最高値を呈し, 時間の

経過とともに低下する傾向が見られ, 72時間後には正常域に戻った。OHP 処置群は無処置群に比し, 24時間後の上昇は低値に抑えられ, 48時間後では有意に減少し, すでに正常域に復した。また OHP 無処置群は CCl₄投与後24時間で, 脂肪変性と中心静脈から広がる脱落変性がび漫性に見ら

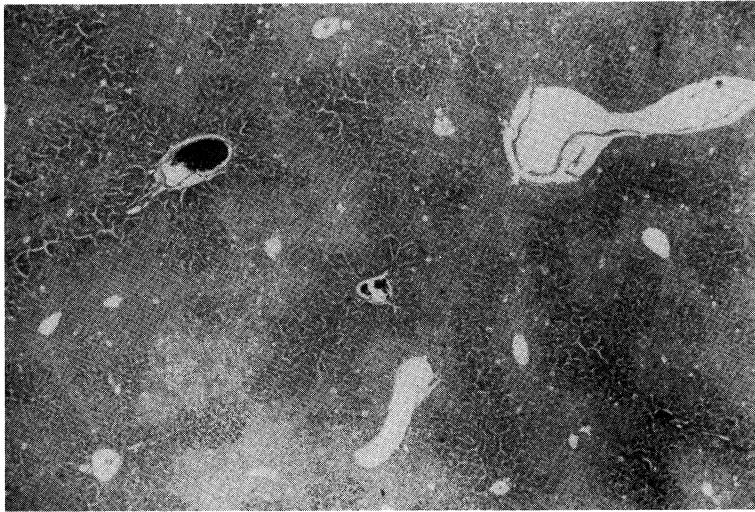
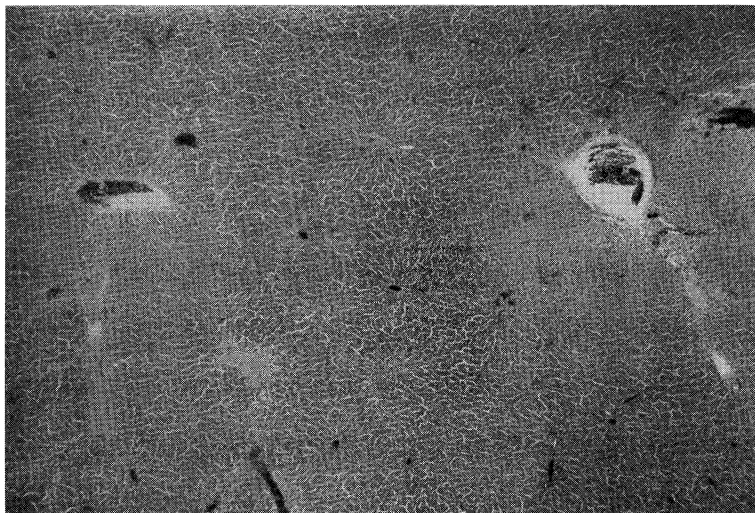


図 6 a CCl₄投与 OHP 無処置群, 43時間後では中心静脈を結ぶ bridging necrosis が認められる。H.E.×160



6 b CCl₄投与 OHP 処置群, 48時間後では中心静脈周囲の肝細胞の脱落, 変性は軽度である。H.E.×100

れ, 48時間では更に中心静脈を結ぶ bridging necrosis が見られるものもあり, 72時間になると中心静脈領域に水腫様並びに脂肪変性が見られ, 一部には肝細胞の線維化などの再生像も認められた。OHP 処置群では無処置群に比し, 組織障害の程度はいずれも軽度であり, 72時間後では肝細胞

の再生像が顕著に認められることから, 肝細胞の修復が対象と比較してより早期から始まっていると思われる。このように血液生化学並びに病理組織学的に OHP は CCl₄による肝障害を軽減し, 修復も促進するものと考えられた。

ところで, CCl₄肝障害の発生機序に関して最近

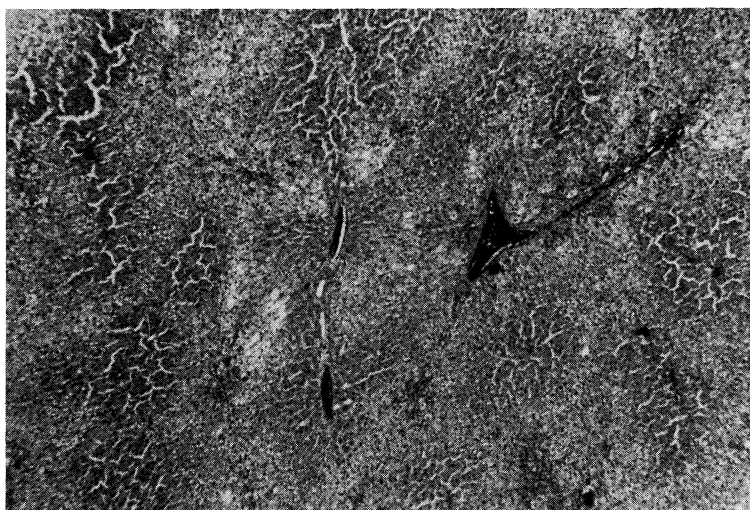
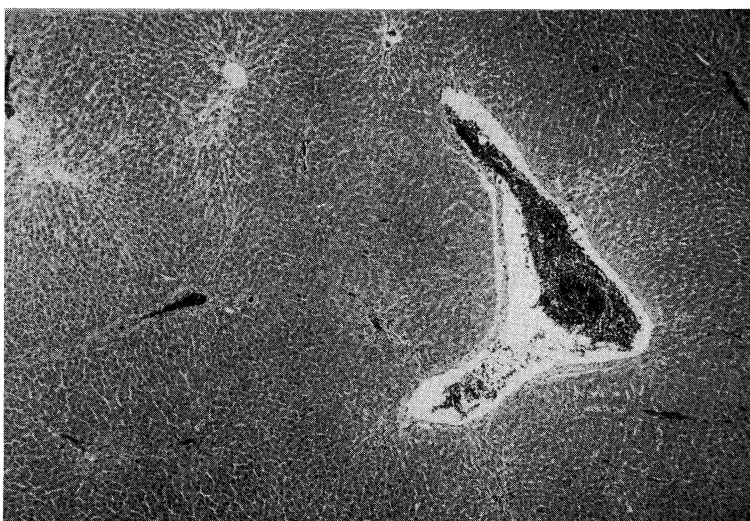


図7 a CCl₄投与 OHP 無処置群, 72時間後では肝細胞の水腫様および脂肪変性が中心静脈領域に見られるが, 再生像も散見される。H.E.×160



7 b CCl₄投与 OHP 処置群, 72時間後ではグリソン周囲に軽度のクッパー細胞とリンパ球の浸潤が見られるが, 肝細胞の再生はより顕著である。H.E.×160

では, 小胞体に局在する薬物代謝酵素系の作用で生じた free radical が障害を引き起こすものとされている。すなわち, CCl₄は薬物代謝酵素系によって, CCl₃と Cl に分解され, free radical をもつ

CCl₃が主として cytochrome P₄₅₀のリン脂質部分と反応した結果, 薬物の水解作用が低下する。この際に増加した過酸化脂質が小胞体をはじめ, mitochondria, ゴルジ装置, さらには細胞膜など

の変性、破壊を招き、蛋白合成、エネルギー代謝、脂肪酸化などの障害を引き起こし、脂肪変化、肝細胞壊死、線維化を招くことが明らかにされた¹⁰⁾。これに対し OHP は、cytochrome P₄₅₀ の破壊を促進し、CCl₄ 代謝を抑制し、CCl₃ の生成を低下させるため、CCl₄ による肝毒性を軽減すると Burk ら⁹⁾ は報告している。一方、肝障害に対し抑制効果を示すといわれている cimetidine について、acetaminophen (AA)、CCl₄ および galactosamine (Gal N) による肝障害に及ぼす影響を比較検討したところ、cimetidine は AA と CCl₄ という P₄₅₀ 依存性の肝毒性に対し、その肝障害の発現を有意に抑制したが、P₄₅₀ 非依存性の肝臓毒である Gal N については、全く抑制効果を示さなかった。したがって、cimetidine による肝障害の抑制効果の主な原因は、P₄₅₀ 活性の阻害にあるという報告もある¹¹⁾。逆に、phenobarbital は薬物代謝酵素系の誘導を促す薬物として有名であるが、Mclean ら¹²⁾ は phenobarbital を飲料水に溶解して与えたラットに CCl₄ を吸入し続けると肝硬変への進展が明らかに促進されるという結果を得ている。これらの報告からも、今回私どもの実験における OHP の CCl₄ 障害肝に対する抑制効果は、O₂ による P₄₅₀ 活性の阻害が大きく関与しているものと推定される。

さらに肝組織中の DNA 量の経時的変化を検討すると、DNA 量は経時的に増加する傾向が見られ、72 時間後では OHP 無処置群は control 値の約 3 倍であったのに対し、OHP 処置群は control 値の約 4 倍を示し、両群間に有意差 (P<0.05) が認められた。肝湿重量当たりの DNA 含量は、1 g 当たりの細胞密度を示すことから、CCl₄ 投与直後から再生起点が働いていると考えられ、時間の経過と共に細胞密度が上昇し、OHP 群ではこの傾向が顕著であることが認められた。さらにこの傾向は病理組織学的所見ともよく一致し、これらの成績から OHP は、特に組織再生の促進にも有効であると考えた。

結 語

- 1) CCl₄ 投与後 72 時間の生存率は、OHP 無処置群で 73.3% であるのに対し、OHP 処置群では 100% であった。
- 2) OHP は、GOT、GPT、T-Bil などの血清生

化学値の上昇を抑制し、特に 48 時間ではいずれも有意に抑制するとともに病理組織学的にも、OHP 処置群では肝障害の程度は軽減されていた。

- 3) DNA 量は 72 時間後で、OHP 無処置群は control 値の約 3 倍であったのに対し、OHP 処置群では、約 4 倍と有意の差をもって増加した。また、病理組織学的所見からも OHP 処置群では 72 時間後には再生像がより顕著に認められた。

参 考 文 献

- 1) 松股孝, 古田斗志也, 竹中賢治, 兼松隆之, 杉町圭蔵, 井口潔: 肝切除後の予後指標としての残存肝 ICG index の意義. 日消外会誌, 16: 1674-1677, 1983.
- 2) 江崎卓弘, 兼松隆之, 松股孝, 園田孝志, 古田斗志也, 杉町圭蔵, 井口潔, 八木博司: 高圧酸素療法が有効であった術後肝不全の 1 例. 肝臓, 25: 1579-1582, 1984.
- 3) 沖浜裕司, 梅原松臣, 内藤善哉, 松田健, 山田和人, 松倉則夫, 鄭淳, 金徳栄, 滝沢隆雄, 田尻孝, 森山雄吉, 山下精彦, 恩田昌彦: 肝硬変症に随伴した高ビリルビン血症に高圧酸素療法が有効であった一例. 日高圧医誌, 22: 77-82, 1987.
- 4) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J.: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem., 161: 83-89, 1945.
- 5) Dische, Z.: Über einige neue charakteristische farbreaktionen der thymonukleinsäure und eine mikromethode zur bestimmung derselben in tierischen organen mit hilfe dieser reaktionen. Mikrochemie, 8: 4-32, 1930.
- 6) Meibaum, W.: Über die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesondere in derivaten der adenylsäure. Physiol. Chem., 258: 117-120, 1939.
- 7) Truss, C. D. and Killenberg, P. G.: Treatment of carbon tetrachloride poisoning with hyperbaric oxygen. Gastroenterology, 82: 767-769, 1982.
- 8) Montani, S. and Perret, C.: Oxygénation hyperbare dans L'intoxication expérimentale au tétrachlorure de carbone. Rev. Fr. Etud. Clin. Biol., 12: 274-278, 1967 (English abstract).
- 9) Burk, R. F., Reiter, R. and Lane, J. M.: Hyperbaric oxygen protection against carbon tetrachloride hepatotoxicity in the rat. Association with altered metabolism. Gastroenterology, 90: 812-818, 1986.

- 10) Recknagel, R. O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 19 : 145-208, 1967.
- 11) 奥野裕康, 村瀬登志彦, 羽間弘, 塩崎安子, 鮫島美子: 実験肝障害に及ぼす cimetidine の影響—acetaminophen, CCl_4 , galactoseamine 肝障害を比較して—. *肝臓*, 28 : 154-163, 1987.
- 12) Mclean, E. K., Mclean, A. E. M. and Sutton, P. M.: An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br. J. Exp. Pathol.*, 50 : 502-506, 1969.