

## ●原 著

## 実験的慢性四塩化炭素肝障害に対する高圧酸素療法の影響

松田 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\* 金 徳栄\* 内藤 善哉\* 阿部 靖子\*\*

臨床的に高度肝障害の治療に対する OHP の有効性が注目されているので、実験的に慢性肝障害に対する OHP の影響を検討した。

ラットに CCl<sub>4</sub> を 0.25ml/100g を週 2 回 8 週間腹腔内投与し、CCl<sub>4</sub> 単独投与群、CCl<sub>4</sub> 投与 OHP 併用群、CCl<sub>4</sub> 投与後半のみ OHP 併用群とで比較した。生存率に関しては各群に差は認められなかったが、血清 GOT、T-BiL、TP から見た肝障害の程度は OHP 施行群において軽減されており、しかも OHP を早期から施行した群においてより顕著であった。また肝組織の再生を示す DNA 量も同様の傾向を示した。さらに病理組織学的にも、OHP 施行により肝硬変の程度は軽減され、再生性変化も認められた。

以上のことより、OHP は慢性肝障害の程度を軽減するとともに、慢性肝障害の発症予防効果も示唆された。

キーワード：高圧酸素療法、四塩化炭素、慢性肝障害、フリーラジカル、肝再生

### Effects of Hyperbaric Oxygenation on Experimental Liver Injury by Carbon Tetrachloride

Noriko MATSUDA\*, Masahiko ONDA\*, Yukichi MORIYAMA\*, Noritake TANAKA\*, Takashi TAJIRI\*, Akira TOKUNAGA\*, Koji SASAJIMA\*, Takao TAKIZAWA\*, Masayuki YOSHIYASU\*, Deog-Young KIM\*, Zenya NAITO\*, and Yasuko ABE\*\*

The First Department of Surgery and Biochemistry, Nippon Medical School

Recently, the hyperbaric oxygenation (OHP) has been proved beneficial in the various disorders, and the effect of OHP for chronic liver dysfunction was experimentally studied. The volume of 0.25ml/100g of 50% (W/V) CCl<sub>4</sub> was injected into the abdominal cavity of rats twice a week for successive eight weeks. Four groups were designed; OHP alone, CCl<sub>4</sub> injection alone, CCl<sub>4</sub> injection and OHP, CCl<sub>4</sub> injection

for four weeks and CCl<sub>4</sub> and OHP for following four weeks. All the animals survived in OHP alone. The CCl<sub>4</sub> injection caused a decrease in survival rats in other experimental groups. Although there was no difference on the survival rates, OHP brought a prolonged survival term compared with CCl<sub>4</sub> injection alone. The laboratory data on serum transaminases (GOT, GTP), total bilirubin and total protein (TP) improved in the groups using OHP. Further, OHP promoted tissue regeneration with an increase in DNA amount. Liver cirrhosis become less serious when OHP was started earlier. These results suggested that OHP may reduce chronic liver damage and prevent the progression to liver cirrhosis caused by CCl<sub>4</sub>.

### Keywords:

high pressure oxygen therapy  
 carbon tetrachloride  
 chronic 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

肝病変の進展に肝微小循環不全による酸素供給低下が、大きく関与しているといわれており<sup>1)</sup>、高度肝障害に対する治療の手段として OHP の有効性が最近注目されている。また、術後肝不全に陥った症例に対し OHP 施行を契機に肝機能が好転し、それに伴い全身状態も改善したという報告もある<sup>2)</sup>。教室でも肝硬変症に伴う食道静脈瘤破裂の治療中に血清ビリルビン値が上昇した症例に対し OHP を施行して、高ビリルビン血症の改善をみた症例を経験している<sup>3)</sup>。しかしながら、障害肝に対する OHP の作用機序はまだまだ十分解明されていないのが現状である。

そこで実験的に障害肝に対する OHP の影響を検討した。私どもはすでに急性肝障害モデルに関しては、OHP 施行により、生存率が上昇し、生化学的には血清 GOT、GPT、総ビリルビン (T-Bil) 値の上昇を抑制し、肝組織中の DNA 量増加に寄与しており、病理組織学的にも肝障害の程度は軽減され、再生像も顕著に認められたことを報告している。今回は慢性肝障害に対する OHP の効果について実験を行った。さらに形態学的に、CCl<sub>4</sub> 投与開始後 4 週ではまだ肝硬変の形成は認められなかった。そこで OHP の開始時期を、CCl<sub>4</sub> 投与直後からと第 4 週以後の肝硬変形成時とそれぞれ行い、OHP の肝硬変形成の予防効果についても合わせ検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 実験動物および薬剤

体重 200g 前後の Wistar 系雄性ラット (79 匹) を用いた。四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) は 50% (W/V) CCl<sub>4</sub> となるよう等量の olive oil に使用時溶解し、0.25 ml/100g 体重当り週 2 回 8 週間腹腔内投与した。

### 2. 実験方法

実験群は Fig. 1 に示すように設定し、ラットを I~IV 群に分けた。OHP は、空気加圧下絶対 3 気圧で 2 時間純酸素吸入し、週 2 回ずつ施行した。I 群は OHP 単独処置群、II 群は CCl<sub>4</sub> 投与 OHP 無処置群、III 群は CCl<sub>4</sub> 投与 OHP 処置群、IV 群は CCl<sub>4</sub> 投与開始後 5 週目より OHP 処置群とした。なお、II、III 及び IV 群に対する対照群として olive oil のみ投与した。CCl<sub>4</sub> と OHP の併用期間は、

CCl<sub>4</sub> 投与後 15 分以内に OHP を施行した。また、CCl<sub>4</sub> 投与 8 週後まで生存したラットのみ実験に供した。

### 3. 生存数の比較

CCl<sub>4</sub> 投与開始 1 週後より経時的に観察し、各群における生存数を比較した。

### 4. 血液生化学的検査

nembutal 麻酔下にて開胸し、心臓より採血し、GPT、GOT、アルカリフォスファターゼ (ALP)、T-Bil、総コレステロール (T-Cho)、総蛋白 (TP)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、硫酸亜塩混濁試験 (ZTT)、シモール混濁試験 (TTT) の各項目に関して auto analyzer (日立 73650E) にて測定して、各群間を比較検討した。

### 5. 肝組織の生化学的検索

肝湿重量当り 4 倍容の 0.25M Sucrose-3.3mM CaCl<sub>2</sub> 溶液を加え、20% (W/V) homogenate を得た。この homogenate を用いて DNA、RNA、Malondialdehyde (MDA) を測定した。Schmidt-Thannhauser 法<sup>4)</sup>に従い RNA、DNA 分画を調整し、DNA は Diphenylamine 法<sup>5)</sup>、RNA は Orcinol 法<sup>6)</sup>にて、MDA は内藤法<sup>7)</sup>にて測定した。また肝蛋白質量は Lowry 法<sup>8)</sup>に従って測定した。

### 6. 病理組織学的検索

CCl<sub>4</sub> 投与開始 8 週後に屠殺剖検し、肝を摘出後 10%ホルマリン液にて固定した。常法に従って H-E 染色を施し、光顕的に観察し各群間における肝障害の程度を比較検討した。

## 結 果

### 1. 生存数の比較

CCl<sub>4</sub> 投与開始 8 週後の各群の生存率は I 群 100%、II 群 30%、III 群 40%、IV 群 35% であった。また生存日数をみると II 群は 5 週以前に半数が死亡しているのに対し、III 群、IV 群では 7 週以後に死亡するものが多かった (Fig. 2)。以上のように生存率に関しては 3 群間に有意差は認められなかったが、OHP を施行した III 群、IV 群の方が II 群に比し生存日数が長い傾向にあった。

### 2. 血液生化学値

Table 1 に示すように、GOT、T-Bil、TP に関していずれも II、III 群間に P<0.01 の危険率で有意差が認められた。また、GPT、GOT、T-Bil は III 群>IV 群の順で II 群に比し上昇が抑えられ、I

動物 : Wistar系ラット ♂, 200 g 前後  
 薬剤 : CCl<sub>4</sub> (olive oilとの等量混合液として  
 0.25ml/100 g)

投与方法 : 腹腔内投与, 週 2 回, 8 週間

OHP 処置 : 3 ATA, 2 時間, 週 2 回

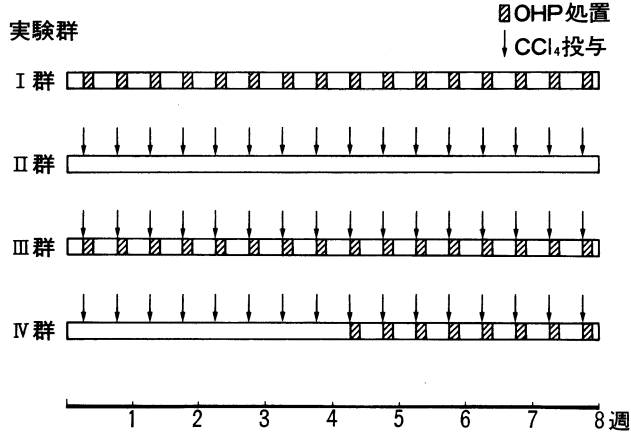


Fig. 1 材料と方法

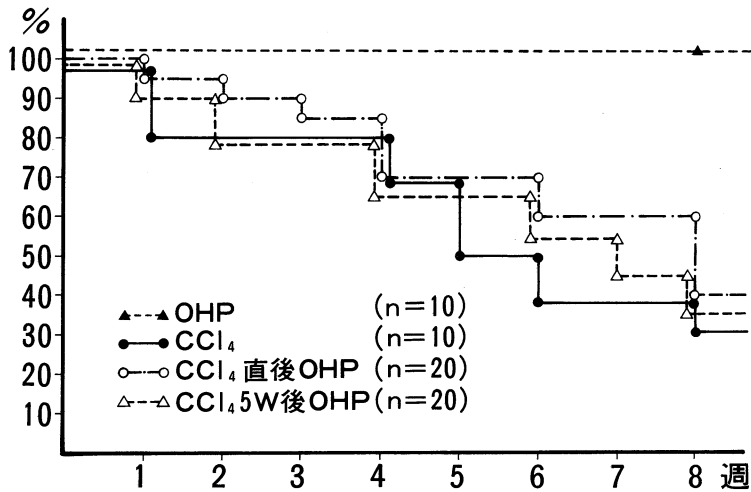


Fig. 2 生存率の比較

群に近い値を示した。TP はIII群>IV群の順に増加し、I 群の値に近づく傾向が認められた。

3. 肝組織の生化学的検索

DNA 量はII, III群間に P<0.01, II, IV群間に P<0.01の危険率で有意差が認められ、OHP を早期から施行した群において、II群より高値を示す

傾向が見られた。なお各群における control 値はI 群でわずかに高いが4 群とも同様の値を示した。

RNA 量はIII群, IV群はI 群に近い値を示したのに比しII群はやや高値を示した。各群における control 値はI 群で著しく高い以外はほぼ同様な値を示した。

Table 1 血液生化学検査値

	GPT	GOT	ALP	T-Bil	T-Cho	TP	A/G	ZTT	TTT
I	57	192	389	0.3	120	5.3	0.83	0.5	0.8
II	109	668*	367	0.7*	111	4.0*	0.76	0.5	0.7
III	48	207*	338	0.4*	98	4.7*	0.74	0.3	0.6
IV	62	319	366	0.5	100	4.4	0.77	0.5	0.5

\*P&lt;0.01

MDA 値はII群とIV群が最も高値を示し、OHPを最初から施行したIII群ではその上昇はやや抑えられていた。II～IV群のそれぞれの control 値は同様の値を示し、I群とIII群の中間の値であった。(Table 2)。

#### 4. 病理組織学的検索

I群は病理組織学的に異常所見は特にみられなかった。II群は肝全体に偽小葉の不規則な形成が認められ、postnecrosis 様の肝硬変像を呈している。またグリソン領域での細胆管の増生、偽小葉内では肝細胞の空胞化がみられ、細胞浸潤も軽度認められた (Fig.3 a,b)

III群では偽小葉の形成はみられず、間質の繊維化、細胞浸潤、肝細胞の空胞化はほとんど認められなかった。一方肝細胞の核分裂像、多核化、濃染色等がみられ、再生性変化が認められた (Fig.4 a,b)。

IV群は小葉構造は不規則で一部は間質により不完全な偽小葉の形成が認められた。しかし局所的に多核細胞も散在しており、肝細胞の再生像も認められた (Fig.5 a,b)。

#### 考 察

肝硬変末期にみられる肝不全症例に OHP を施行すると、特に重症例において Pugh の重症度分類で改善が認められ、さらに c/cdc や HPT, LCAT などほぼ同様の改善傾向を示したという報告がある<sup>10)</sup>。

また鎌田ら<sup>11)</sup>は、肝 tissue oxygenation の動態から、肝の変性壊死はまず肝細胞の呼吸活性が低

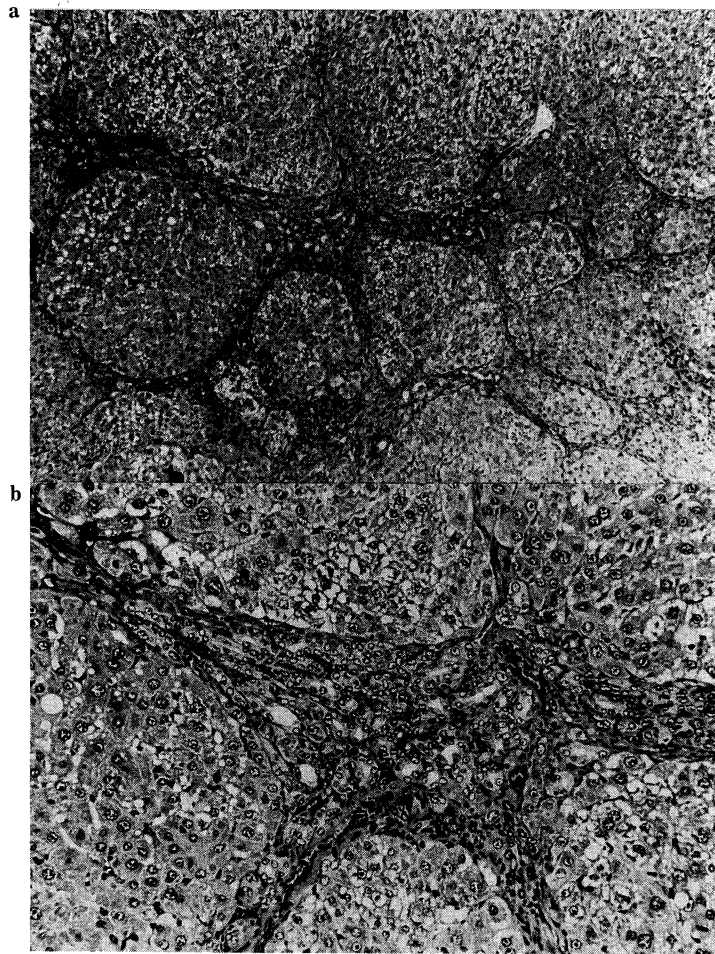
Table 2 肝組織の生化学的検索

	DNA mg/mg protein	RNA mg/mg protein	MDA nmol/mg protein
I	0.19	1.60	1.5
II	0.39** **	2.10	5.4
III	0.52*	1.71	4.4
IV	0.49**	1.71	5.5

\*\*P&lt;0.001, \*\*\*&lt;0.01

下し細胞変性が起こり、ついで肝微少循環不全が加わり、広汎な変性壊死が起こるものと考えた。そして再生修復は、呼吸活性の改善を機として起こり、まず肝組織分圧が上昇し、ついで肝血流量が増大することを実験的に証明し、報告している。

今回私共は CCl<sub>4</sub>による慢性肝障害ラットを用いて OHP の影響を検討した。各群とも生存率に有意差は認められなかったが、OHP 施行群の方が生存日数が長い傾向がみられた。次に、血清 transaminase 活性並びに T-Bil 値を各群間で比較すると、GOT, T-Bil は CCl<sub>4</sub>単独投与群に比し OHP 併用群の方が control 値に近い値を示し、その上昇は抑えられていた。また、TP も OHP 併用群の方が CCl<sub>4</sub>単独群より有意に高く (P<0.01) control 値に近い値を保っていた。肝細胞の変性、壊死が生じると、その病態を反映して GOT, GPT, LDH, ビリルビン, ICG, 総胆汁酸値が上昇するが、



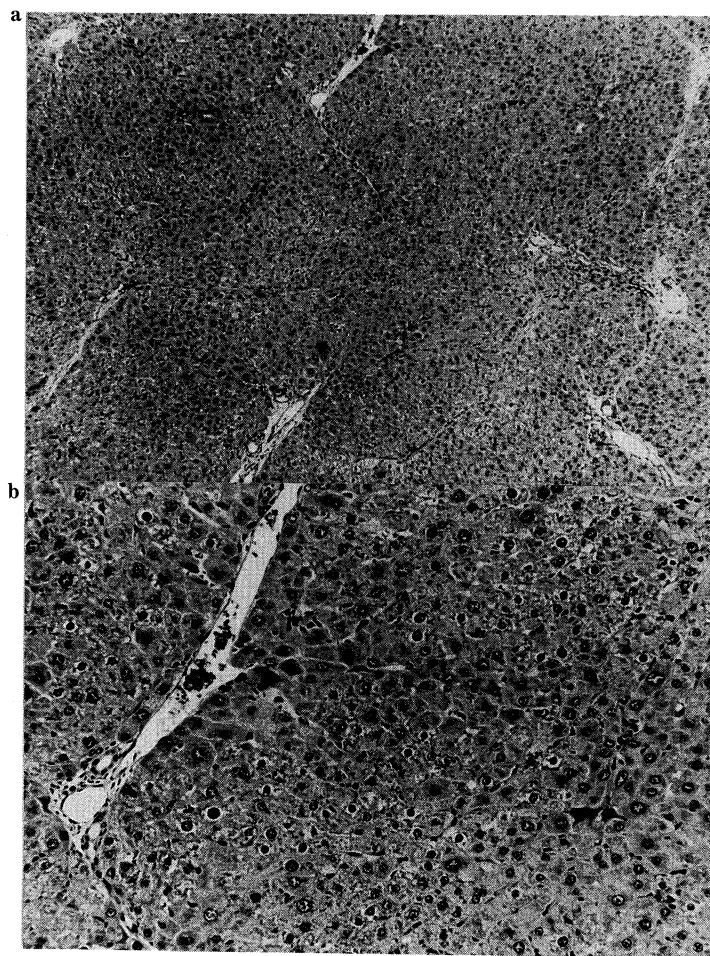
**Fig.3a** 肝全体に偽小葉の不規則な形成が認められ、postnecrosis様の肝硬変像を呈している。 H.E. ×100

**3b** グリソン領域の細胆管増生，偽小葉内肝細胞の空胞化，細胞浸潤などが認められた。 H.E. ×40

OHPを施行することにより特にGOT, T-Bilの上昇が抑えられた。なかでもOHPを最初から施行した群においてその傾向が顕著であり、いずれも $P < 0.01$ の危険率で有意差が認められた。さらに、病理組織学的所見からも $\text{CCl}_4$ 単独投与群ではpostnecrosis様の肝硬変像を呈しているのに対し、OHPを最初から施行した群では偽小葉の形成はみられず、OHPを後半から施行した群では一部に不完全な偽小葉の形成を認められた。そしてOHPを施行した群ではいずれも再生性変化が認められた。このように血液生化学検査値並

びに病理組織学的所見から、OHPは $\text{CCl}_4$ による慢性肝障害を軽減し、再生を促進するものと思われた。さらにOHPの早期開始は、肝硬変の予防にも効果が期待できる。

ところで $\text{CCl}_4$ は、小胞体に局在する薬物代謝酵素系によって代謝され、その過程で大量のtrichloromethyl free radicalが形成され、cytochrome  $\text{P}_{450}$ 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のリン脂質とくに多価不飽和脂肪酸と結合して新たに脂肪酸ラジカルが形成され、脂肪変化、

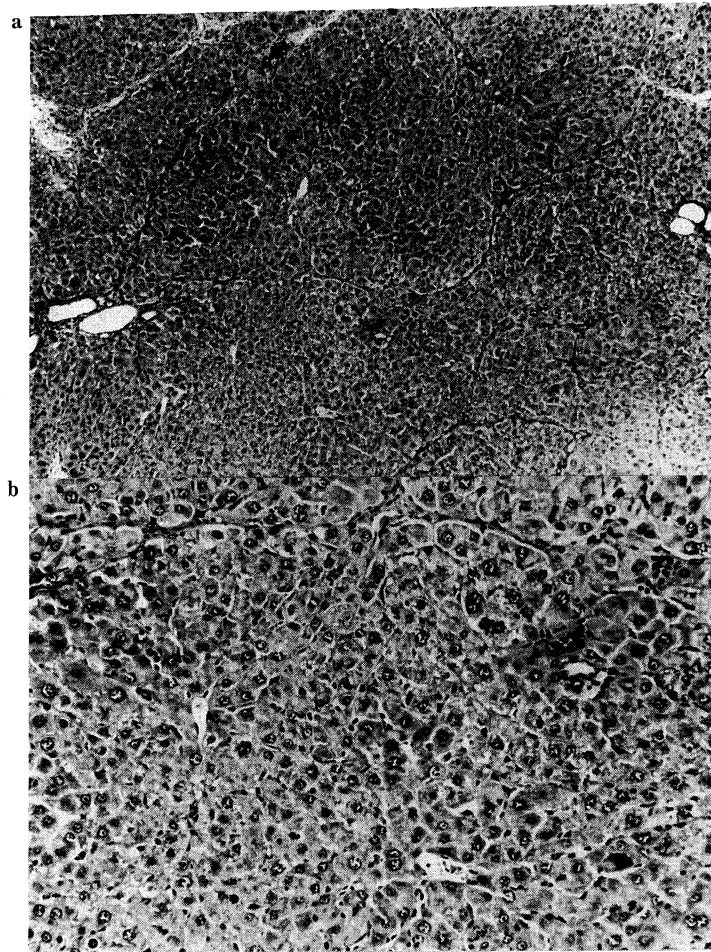


**Fig.4a** 偽小葉の形成, 間質の繊維化, 細胞浸潤, 肝細胞の空胞化はほとんど認められなかった。 H.E.  $\times 100$   
**4b.** 肝細胞の核分裂像, 多核化, 濃染色等が見られ, 再生性変化が認められた。 H.E.  $\times 40$

肝細胞壊死, 繊維化を招くことが明らかにされた<sup>12)</sup>。これに対し OHP は, cytochrome P<sub>450</sub> の破壊を促進し CCl<sub>4</sub> 代謝を抑制し, CCl<sub>3</sub> の生成を低下させるため, CCl<sub>4</sub> による肝毒性を軽減すると Burk ら<sup>13)</sup> は報告している。また, 柏野は<sup>14)</sup> 急性, 慢性 CCl<sub>4</sub> 肝障害, 肝切除における過酸化脂質の動態から, 血中過酸化脂質は肝組織の過酸化脂質を反映しておらず, むしろ逆の関係を呈する可能性もあり, 肝組織の病態の指標とする場合, 注意が必要であろうと述べている。今回私共は慢性 CCl<sub>4</sub> 肝障害の肝組織中 MDA 値を測定したが OHP 施

行の有無による差は認められなかった。

さらに肝組織中の DNA, RNA 量に関しては, RNA 量は各群間に差は見られなかった。DNA 量は, 単独投与群に比し, OHP を施行した群では,  $P < 0.01$  の危険率で有意に高かった。このように, OHP をより早期から施行した方が肝湿重量 1 g 蛋白当りの DNA 含量は多く, 肝再生が活発であるものと思われる。さらにこの傾向は病理組織学的所見とも良く一致し, DHP は組織再生の促進にも有効であると考えられた。



**Fig.5a** 小葉構造は不規則で、一部では間質により不完全な偽小葉の形成が認められた。 H.E. ×100

**5b** 局所的に多核細胞も散在しており、肝細胞の再生像も認められた。 H.E.×40

## 結 語

- ① CCl<sub>4</sub>投与による慢性肝障害では、生存率に関してはOHP施行により多少上昇するものの有意差は認められなかった。
- ② GPT, GOT, T-BiL, TP から見た肝障害の程度はIII>IV>II群の順に軽減されており、また肝組織の再生を示すDNAも同様の順で増加した。
- ③ 剖検所見から、OHP施行群では腹水の出現が明らかに減少しており、病理組織学的所見から

もOHP施行により、肝硬変の程度は軽減されていた。

以上のように、OHPは慢性肝障害の程度を軽減するとともに、慢性肝障害の発症予防にも効果が期待される。

## 【参 考 文 献】

- 1) Kamada, T., Sato, N., Koyama, M., Kawano, S. and Matsumura, T.: Hemoperfusion and oxygen sufficiency in chronically diseased liver in situ measured by organ reflectance spectrophotometry. *Gastroenterology*, 79:

- 1132,1980
- 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一例。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。日高医誌, 22: 77-82, 1987
  - 4) 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: 実験的四塩化炭素肝障害に対する高圧酸素療法の影響。日高医誌, 22: 153-161, 1987
  - 5) Schmidt, G. and Thannhauser, S.J.: A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem., 161: 83-89, 1945
  - 6) Dische, Z.: Uber einige neue charakteristische farbreaktionen der thymonu kleinsäure und eine mikromethode zur bestimmung derselben in tierischen organen mit hilfe dieser reaktionen. Mikrochemie, 8: 4-32, 1930
  - 7) Mejsbaum, W.: Uber die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesondere in derivaten der adenylsäure. Physiol. Chem., 258: 117-120, 1933
  - 8) 内藤周平, 太田昭夫, 大森亮雅, 岡庭 弘, 小川一吉, 後藤興治, 小村 裕, 中田不二男: 血清脂質異常に及ぼす  $\alpha$ -Tocopheryl nicotinate の効果についての二重盲検試験 (第1報) — 過酸化脂質と疾患ならびに自覚症状との関係 —。医学のあゆみ, 91: 628-634, 1974
  - 9) 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
  - 10) 中山幸一, 八木博司, 北野正剛, 兼松隆之, 坂口正剛, 奥村 恂: 肝硬変末期にみられる肝不全に対する高気圧酸素 (OHP) 療法の効果。日高医誌, 21: 113-119, 1986
  - 11) 鎌田武信, 岸田 隆, 佐藤信紘, 目連晴哉, 季 和泉, 阿部 裕: 肝 tissue oxygenation と肝障害 — 四塩化炭素肝障害の発症と再生, 修復過程の解析 —。肝臓, 23: 1249-1255, 1982
  - 12) Recknagel, R.O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev., 19: 145-208, 1967
  - 13) 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
  - 14) 柏野博正: ラット四塩化炭素硬変肝, 肝切除における過酸化脂質の研究。外科と代謝・栄養, 17: 396-404, 1983