

アルコールの肝障害作用に関する研究

(2) 肝硬変促進因子としての意義について

金沢大学医学部内科学第一講座(主任 武内重五郎教授)

江 幡 謙 次

(昭和41年4月9日受付)

本論文の要旨は国際肝臓研究会, 第6回日本支部総会において報告した。

アルコールと肝硬変の間になんらかの因果関係のあることは、従来の多くの臨床的ならびに動物実験的研究成績より明らかである。しかし、肝硬変の病因におけるアルコールの役割についてはいまだ不明の点が少ない。アルコールの示す肝障害作用機序については、従来よりアルコールの過剰摂取に伴う低栄養を介しての間接作用であるとする考えと、これのみでなくアルコール自体の直接的中毒作用をも考えなくてはならないとする見解があり、論議されていることはさきの報告¹⁾でものべたとおりである。

これはさておき、一方、ビールス肝炎患者の一部が完全に治癒することなく慢性化し、さらには肝硬変にまで進展する例のあることは今日一般にみとめられていることである。この場合、ビールス肝炎患者がその回復期あるいはその後の経過においてアルコール摂取を続けるとき、肝炎治癒が遅延したり、慢性化や肝硬変への進展が促進されるか否かは、肝炎患者の治療にあたる場合に遭遇する重要な問題の一つである。この点については、アルコールがビールス肝炎の再燃あるいは慢性化の原因となるとするもの²⁾とこれを否定するもの³⁾があり、いまだ確実な回答が与えられていないのが現状のようである。

そこで著者はこの問題を解明する手がかりをえようとして、肝炎ビールスにかかわる肝障害惹起因子として四塩化炭素をもちい、四塩化炭素の慢性長期投与による肝硬変の発生がエチルアルコール(以下単にアルコールと記す)の投与により如何なる影響をうけるかをWistar系雌性ダイコクネズミ(以下単にラットと記す)をもちいて検討した。

実験方法

I. 実験動物

体重 115~140 g のラットをつぎの2群にわけて観察した。

1) 四塩化炭素単独投与群: 10例

2) 四塩化炭素+アルコール投与群(以下単にアルコール併用群とよぶ): 12例

各群とも滅菌的に処置した10%四塩化炭素オリーブ油溶液を体重 100 g 当り 0.3 ml ずつ週2回, 10週間(計20回)ラットの腹腔内に注入した。実験期間中は各群ともそれぞれ1個ずつの飼育箱で一団として飼育し、四塩化炭素単独投与群には水を、アルコール併用群には12.5%アルコールを唯一の飲料水としてそれぞれ給水瓶より自由に与え、また、両群とも表1に示す組成(György & Goldblattの処方⁴⁾に従った)の食餌を任意に摂取させた。なお、可及的に平均気温を20°Cに保つようにした。四塩化炭素最終投与3日後に、約20時間絶食ののち、エーテル麻醉下で開腹し、腹大動脈より可及的採血後、肝および脾を摘出し、上皿天秤でおのおのの重量を測定した。摘出した肝についてコレステロール・トリグリセリドおよびリン脂質量を測定し、一部は組織学的検索のため10%ホルマリン液で固定した。実験期間中に死亡したものおよび肝組織の変化の程度をうかがう目的で実験途中で殺したのものについては、肝組織像のみの検討にとどめた。

II. 脂質分画測定法

新鮮肝組織片を生理食塩水で洗い、可及的血液成分を除去後、その0.5 gを上皿天秤で秤量し、Folch法⁵⁾により約5 mlのクロロホルム・メタノール(2:

Studies on the Effects of Alcohol upon the Liver. (2) Its Significance as a Factor Promoting the Development of Hepatic Cirrhosis. Kenji Ebata, The First Department of Internal Medicine (Director: Prof. J. Takeuchi), School of Medicine, Kanazawa University.

表1 投与した食餌組成

	%	カロリー
カゼイン	18	72
ラード	20	180
砂糖	54.4	218
肝油 ¹⁾	2	18
L-チスチン	0.3	
塩化コリン	0.3	
塩類 ²⁾	4	
ビタミン末 ³⁾	1	
計	100	488

1) 肝油 1g 中にはビタミン A 2,000IU 以上, ビタミン D 400IU 以上を含む。

2) 塩類は次のものの混合物である。

Ca(CH ₃ CHOHCOO) ₂ ·5H ₂ O	35.15
CaCO ₃	5.28
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	14.60
K ₂ HPO ₄	6.45
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	18.76
NaCl	9.34
MgSO ₄	7.19
FeC ₆ H ₅ O ₇ ·nH ₂ O	3.19
MnSO ₄ ·4~6H ₂ O	0.33
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.035
CuSO ₄	0.039
KI	0.00039

3) ビタミン末 1g 中の各種ビタミン量

ビタミン A	500IU
ビタミン D	40IU
ビタミン B ₁	0.6mg
ビタミン B ₂	1.1mg
ビタミン B ₆	0.6mg
パントテン酸	2.1mg
ビタミン E	6.2mg
葉酸	0.1mg
ビオチン	0.04mg
ビタミン C	7.5mg
ビタミン B ₁₂	0.0002mg
ニコチン酸アミド	3.6mg

1) 混液を加えてホモジナイズしたのち, さらにクロロホルム・メタノール混液を加えて 20 ml とし, 50 °C, 10分間抽出した. 30分後濾過し, 20 ml のメソコルペンに移しクロロホルム・メタノール混液を正確に 20 ml の画線まで加えて混和後, 脂質分画の定量に供した。

(1) トリグリセリド量 トリグリセリドの定量は Van Handel & Zilversmit 法⁶⁾ をもちいた。

(2) リン脂質量 Fiske & Subbarow 法⁷⁾ でリン脂質リンを定量後, これに25を乗じてリン脂質量とした。

(3) コレステロール量 大山らの方法⁸⁾ をもちいた。

Ⅲ. 組織学的検索法

肝組織はパラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン染色標本およびアザン染色標本ならびに凍結切片ズダンⅢ染色標本を作製して検鏡した. 肝組織各所見の判定はつぎに示す基準に従った。

肝細胞の肥大の程度: 所見が確実とはいえないものを±, 所見を明瞭にみとめるものを+とした。

肝細胞壊死の程度: 単細胞壊死の散見されるものを±, 単細胞壊死の多くみとめられるものを+, 亜広汎性壊死⁹⁾をみとめるものを++, 広汎性壊死⁹⁾をみとめるものを+++とした。

脂肪沈着の程度: 所々に脂肪が散見されるが, 全体として肝実質の約10%に達しないものを±, 肝実質の約10~30%を占めるものを+, 肝実質の約30~50%を占めるものを++, 肝実質の約50%以上を占めるものを+++とした。

胆細管増生の程度: 所見が確実とはいえないものを±, 所見を明瞭にみとめるものを+とした。

細胞浸潤の程度: Glisson 鞘の弱い細胞浸潤を±, Glisson 鞘のび漫性の細胞浸潤を+, Glisson 鞘より小葉内へおよぶ弱い細胞浸潤を++, Glisson 鞘 および小葉内の強い細胞浸潤を+++とした。

線維増生の程度: Glisson 鞘は拡大傾向を示し小葉間に線維の伸長がはじまっているものを±, Glisson 鞘は明瞭に拡大し小葉内に線維の侵入がはじまっているものを+, さらに程度を増し小葉内への線維の侵入が著明なものを++, 線維化がいちじるしく小葉構造の改築がみられるものを+++とした。

Ⅳ. 有意性の検定

推計学的有意性の検定に際しては, 1%の危険率で有意性のあるものを明らかに有意, 5%のそれを有意とした。

実験成績

I. アルコール投与の体重増加におよぼす影響

アルコール併用群12例中, 3例は四塩化炭素をそれぞれ6回, 9回および15回投与後に死亡し, 別に3例を肝組織変化の程度を検索する目的で, 四塩化炭素を12回(1例)および17回(2例)投与3日後に殺した. 従つて四塩化炭素を20回投与されたものは6例である. 一方, 四塩化炭素単独投与群10例では死亡例はなく, 肝組織変化の程度を知る目的で, 四塩化炭素を15回(1例)および17回(2例)投与後3日目に殺した3例を除いて, 残りの7例が四塩化炭素を20回投与さ

れた。

四塩化炭素を20回投与されたものについて、各週はじめにおける体重の平均値の推移を図1に示した。すなわち、四塩化炭素単独投与群7例の実験開始時体重は 124 ± 4 g (平均値 $\pm 95\%$ 信頼限界; 以下同様) であり、その後漸次増加を示し、9週はじめに 168 ± 14

図1 体重の推移

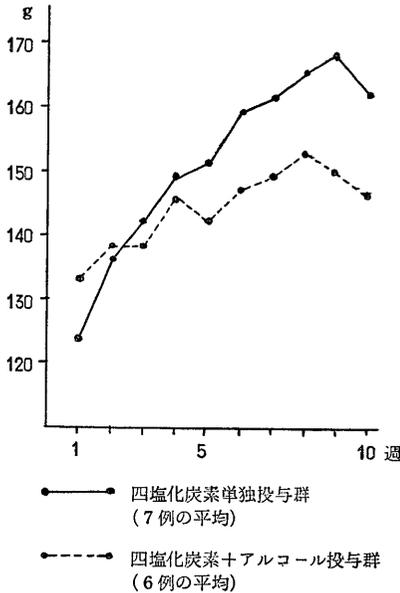
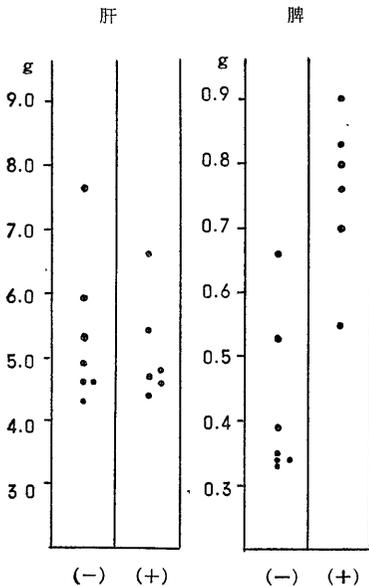


図2 体重 100g 当りの肝・脾重量



〔注〕 (-): 四塩化炭素単独投与群
(+): 四塩化炭素+アルコール投与群

g と最高値に達したのち10週はじめには 162 ± 10 g と減少の傾向を示した。これに対して、アルコール併用群6例の実験開始時体重は 133 ± 7 g であつて、以後漸次増加の傾向がみられたが、四塩化炭素単独投与群と比較すると発育は悪く、8週はじめに 153 ± 13 g と最高値を示したのち、すでに9週目より減少を示し、10週はじめには 146 ± 7 g となつた。実験開始時より10週はじめまでの体重増加量は、四塩化炭素単独投与群の 38 ± 10 g に対して、アルコール併用群ではわずか 13 ± 7 g にすぎず、両者の間には推計学的に明らかに有意の差がみとめられた。

食餌摂取量については、各群とも一団として共同飼育したため、個々のラットについての摂取量の測定は不可能であり、また、食餌容器外にこぼれ落されているものもあつて、正確な測定は困難であつたが、容器外にこぼれ落された量を無視して測定した、全期間を通じてのラット1頭当りのおおよその1日平均摂取量は、四塩化炭素単独投与群では 10.8 g (52.7 cal) であり、一方、アルコール併用群では 8.1 g (39.5 cal) で前者に比して減少がみとめられた。また、アルコール併用群の1日平均アルコール消費量はラット1頭当り約 12.8 ml (8.8 cal) であつた。従つて1日平均総カロリー摂取量でも、四塩化炭素単独投与群の 52.7 cal に比してアルコール併用群では 48.3 cal と減少を示した。

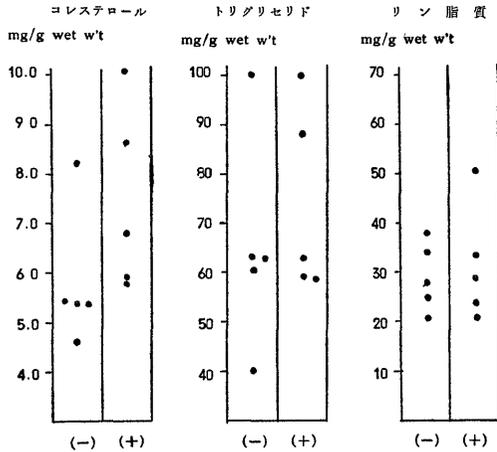
II. 肝および脾重量の比較

四塩化炭素20回投与後の各ラットにおける体重100g当りの肝および脾重量を図2に示した。体重100g当りの肝重量の平均は四塩化炭素単独投与群では 5.31 ± 1.07 g、アルコール併用群では 5.08 ± 0.86 g であつて、両者の間に有意の差をみとめないが、体重100g当りの脾重量の平均では四塩化炭素単独投与群の 0.42 ± 0.12 g に比して、アルコール併用群では 0.76 ± 0.16 g と増加を示し、両者の間には推計学的に明らかに有意の差がみとめられた。

III. 肝内脂質量の比較

四塩化炭素20回投与後、肝内脂質分画量測定を行なつた各群5例ずつの値を図3に示した。四塩化炭素単独投与群の各脂質分画量の平均は、コレステロール 5.82 ± 1.71 mg/g wet w't, トリグリセリド 65.3 ± 26.8 mg/g wet w't, リン脂質 29.3 ± 8.5 mg/g wet w't であり、一方、アルコール併用群では、コレステロール 7.44 ± 2.32 mg/g wet w't, トリグリセリド 73.8 ± 23.6 mg/g wet w't, リン脂質 31.6 ± 14.4 mg/g wet w't であつた。いずれの脂質分画についても両群の間に有意の差はみとめられなかつた。

図3 肝内脂質量



〔注〕 (-): 四塩化炭素単独投与群
(+): 四塩化炭素+アルコール投与群

IV. 組織学的所見

両群における肝の各組織所見を表2に一括して示した。この表からもわかるように、四塩化炭素20回投与後の肝組織所見のうち、肝細胞壊死・脂肪沈着および胆細管増生などの程度には、四塩化炭素単独投与群とアルコール併用群との間にほとんど差はみられないが、肝細胞の肥大・細胞浸潤および線維増生は明らかにアルコール併用群の方が強度であった。ことに線維増生については、四塩化炭素単独投与群では、線維化がいちじるしくて小葉構造の改築のはじまっているものはみられず、ほとんど線維増生のないものが5例あつたのに対し、アルコール併用群では線維化がいちじるしくすでに小葉構造の改築のはじまっているものが6例中3例あり、その他の例でも線維増生傾向が強かつた(写真1, 2)。すなわち、アルコール併用投与によつて肝線維化の促進されることがうかがわれた。四塩化炭素を15~17回投与の場合でもアルコール投与の有無によつて同様の差異がみとめられた。なお、アルコール併用では四塩化炭素9回投与の場合にもすでに強い線維化を示す例があつた。

考 察

まず、ラットの発育についてみると、体重増加は四塩化炭素単独投与群に比してアルコール併用群ではいちじるしく障害され、実験開始時より10週はじめまでの体重増加量は両群の間で推計学的に明らかに有意の差がみられた。アルコール併用群では四塩化炭素単独投与群に比して食餌摂取量が減少していること、摂取したアルコールのカロリーを含めてもなお総カロリー

表2 肝組織像

群	四塩化炭素投与回数	ラット番号	実 質			間 質		
			肝細胞の肥大	肝細胞壊死	脂肪沈着	胆細管増生	細胞浸潤	線維増生
四塩化炭素単独投与	20	501	+	++	++	±	+	±
		502	+	++~+++	+++	±	++	++
		503	±	±	+	-	±	-
		504	±	++	+++	±	++	++
		505	±	-	+++	±	±	-
		506	±	++	+++	±	+	±
		507	±	±	+++	±	±	±
四塩化炭素+アルコール	17	508	±	-	+++	-	±	±
		509	±	±	+++	-	±	-
四塩化炭素+アルコール	20	511	+	±	++	+	+++	+++
		512	+	++	++	±	++	+++
		513	±	++	+++	±	++	+
		514	+	±	+++	±	+++	++
		515	+	+	+++	±	++	+++
		516	+	±	+++	±	±	+
	17	517	+	++	++	+	++	+++
		518	+	±	+++	-	±	+
	15	519	+	+	+++	+	±	++
	12	520	±	-	++	±	±	+
9	521	+	+	++	+	++	+++	
6	522	+	+	++	-	-	-	

量が少ないこと、さらにアルコールの成長保持作用は等カロリーの含水炭素あるいは正常食餌に比して劣るという報告^{10)~14)}を考慮すれば、両群の間にみられた発育の差は容易に理解されうることである。

ラットに四塩化炭素を投与すると肝細胞壊死や肝の脂肪沈着を生じ、慢性に長期間投与するとき肝線維化をきたし、肝硬変に導きうる¹⁵⁾¹⁶⁾ことは周知のとおりである。Lamsonら¹⁷⁾はイヌにおいて四塩化炭素をアルコールとともに1回経口投与すると、四塩化炭素を単独投与した場合に比して肝障害作用が増強されることを観察した。彼らは四塩化炭素がアルコールに可溶性であること、アルコールが胃・腸よりすみやかに吸収されることから、アルコールが四塩化炭素の肝障害作用を増強するのは、アルコールが四塩化炭素の吸

収を促進するためと考えている。しかし、アルコールが四塩化炭素による肝障害を増強するのは、四塩化炭素を経口投与したときだけでなく、非経口投与した場合でもみとめられることから、アルコールは単に四塩化炭素の吸収を促進するだけではないことがのべられている¹⁸⁾。アルコールが四塩化炭素の肝障害作用を増強するとすれば、四塩化炭素の慢性長期投与による肝硬変の発生は、アルコールを同時に投与することにより当然促進されることが期待される。著者は四塩化炭素の腹腔内長期慢性投与による肝病変が、給水瓶より唯一の飲料として投与されたアルコールにより如何なる影響をうけるかをラットを用いて検討した。その結果、四塩化炭素単独投与群とアルコール併用群の間に肝内脂質量の差はみとめられなかつたが、肝線維化の程度は明らかにアルコール併用群に強かつた。また、門脈圧亢進を反映して脾重量においても、アルコール併用群では四塩化炭素単独投与群に比して推計学的に明らかに有意の増加を示した。従つて、同時に投与されたアルコールは四塩化炭素の肝硬変惹起作用を促進することは明らかである。

四塩化炭素中毒とビールス肝炎をそのまま同一視することはもちろんできないが、両者は肝細胞の傷害ないし壊死をきたす点は共通している。そこで著者の成績から類推すると、ビールス肝炎患者がその回復期あるいはその後の経過においてアルコール摂取を続けることは、Barker ら²⁾の指摘するごとく肝炎の再燃あるいは慢性化を助長し、ひいては肝硬変への進展を促進する因子となることが想像される。このことは肝硬変患者には大酒家で黄疸ないしビールス肝炎の既往をもつ症例が多いという成績¹⁸⁾¹⁹⁾とあわせ考え興味深く、中村ら¹⁸⁾もすべてのごとく、アルコールはそれ自身肝硬変の病因となるだけでなく、ビールス肝炎から肝硬変の発生を促進する点においても病因的意義を有することが推測される。

アルコールが如何なる機序で四塩化炭素による肝硬変の発生を促進したかについては明らかでない。おそらく、アルコール自体がなんらかの機序で四塩化炭素の肝障害作用の増強に関係しているものと思われるが、一方、アルコール併用群では四塩化炭素単独投与群に比して食餌摂取量が少なく、体重増加における差からも明らかなごとく低栄養の状態にあつたものと考えられ、このことが四塩化炭素に対する肝の感受性を高めた可能性も否定しえない。従つて、肝病変を促進させたものはアルコール自体の作用と低栄養を介しての間接的作用のうちいずれであるか、あるいは両者が関連しているとすれば、いずれが主役をなしているか

の点についてはなお疑問の残るところであり、この問題を解明するためには摂取食餌量ないしカロリー量を考慮した一層綿密な実験が必要であろう。

結 論

10%四塩化炭素オリーブ油液を体重 100 g 当り 0.3 ml ずつ週 2 回、10 週間 (計 20 回) ラットの腹腔内に投与して生ずる肝硬変が、同時に唯一の飲料として給水瓶より投与された 12.5% アルコールにより如何なる影響をうけるかについて検討しつぎの成績をえた。

1) 四塩化炭素単独投与群に比してアルコール併用群では、ラットの発育が障害され、実験開始時より 10 週はじめまでの体重増加量は両群の間で推計学的に明らかに有意の差がみられた。

2) 肝重量には両群の間で差はみとめられなかつたが、脾重量はアルコール併用群では四塩化炭素単独投与群に比して明らかに有意の増加を示した。

3) 肝内脂質量には両群の間で差がみとめられなかつたが、組織学的検査では肝線維化の程度は明らかにアルコール併用群に強く、アルコールは四塩化炭素の肝硬変惹起作用を促進するものと考えられた。

稿を終るに臨み終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜つた 恩師武内重五郎教授に深甚な謝意を表します。またご指導をいただいた教室高田昭助教授および 本学第二病理学教室倉田自章助教授に感謝し、あわせて日夜ご協力いただいた 教室研究員各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 江幡謙次： 十全医会誌，未刊(印刷中)(1966)。
- 2) Barker, M. H., Capps, R. B. & Allen, F. W. : J.A.M.A., 129, 653 (1945).
- 3) Gardner, H. T., Rovelstad, R. A., Moore, D. J., Streitfeld, F. A. & Knowlton, M. : Ann. Intern. Med., 30, 1009 (1949).
- 4) György, P. & Goldblatt, H. : J. Exper. Med., 75, 355 (1942).
- 5) Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. : J. Biol. Chem., 226, 497 (1957).
- 6) Van Handel, E. & Zilversmit, D. B. : J. Laborat. Clin. Med., 50, 152 (1957).
- 7) Fiske, C. H. & Subbarow, Y. : J. Biol. Chem., 66, 375 (19-25).
- 8) 大山ハルミ・米山良昌・北村元任・有松芳子： 日新医学，47, 464 (1960)。
- 9) Popper, H. & Schaffner, F. : Liver: Structure and Function, p. 211, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York, Toronto, London, 1957.
- 10) Morgan, A. F., Brinner,

- L., Plaa, C. B. & Stone, M. M.** : Amer. J. Physiol., 189, 290 (1957). **11) Mallov, S.** : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 88, 246 (1955).
12) Mitchell, H. H. : J. Nutr., 10, 311 (1935). **13) Lieber, C. S., Jones, D. P. & De Carli, L. M.** : J. Clin. Invest., 44, 1009 (1965). **14) 小松清彦** : 慈恵医大誌, 73, 1590 (1958). **15) 上田英雄** : 肝臓病学, 上巻, 287頁, 東京, 南江堂, 1962. **16) Popper, H. & Schaffner, F.** : Liver: Structure and Function, p. 392, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, Toronto, London, 1957. **17) Lamson, P. D., Gardner, G. H., Gustafson, R. K., Maire, E. D., McLean, A. J. & Wells, H. S.** : J. Pharmacol. Exper. Therap., 22, 215 (1924). **18) 中村隆・中村省三・菅原香苗・片倉吉昭・磯野恒雄・鈴木敏己・金子長次・滝沢敬夫・長谷山博・佐藤匡・木村亨・渡辺正光** : 最新医学, 13, 543 (1958). **19) 武内重五郎・高田 昭** : 国際肝臓研究会, 第6回日本支部総会, 1964.

A b s t r a c t

Effects of alcohol on the development of hepatic cirrhosis in female rats of the Wistar strain induced by the administration of carbon tetrachloride were investigated.

Animals were divided into two groups; alcohol-fed group (12 rats) and control group (10 rats). The former group was given carbon tetrachloride (0.03 ml per 100g body weight) intraperitoneally twice a week for 10 weeks and ethyl alcohol (12.5% solution by volume) as their only source of drinking water. The latter group received carbon tetrachloride alone in the same manner.

Alcohol ingestion resulted in a decrease in food consumption accompanied by a reduction in the total caloric intake, despite the addition of alcohol calories. As a result the alcohol-fed animals gained less body weight than the control animals and this difference was statistically significant. The difference of the liver weight (% of body weight) between both groups was not observed, but it was found that the spleen weight (% of body weight) was significantly larger in the animals receiving alcohol than in the control animals. Although the difference of the liver lipid content was not evident between both groups, the alcohol-fed group showed much more remarkable fibrosis than the control group on histological investigation. Accordingly, it may be concluded that alcohol can promote the development of hepatic cirrhosis in rats with carbon tetrachloride administered.

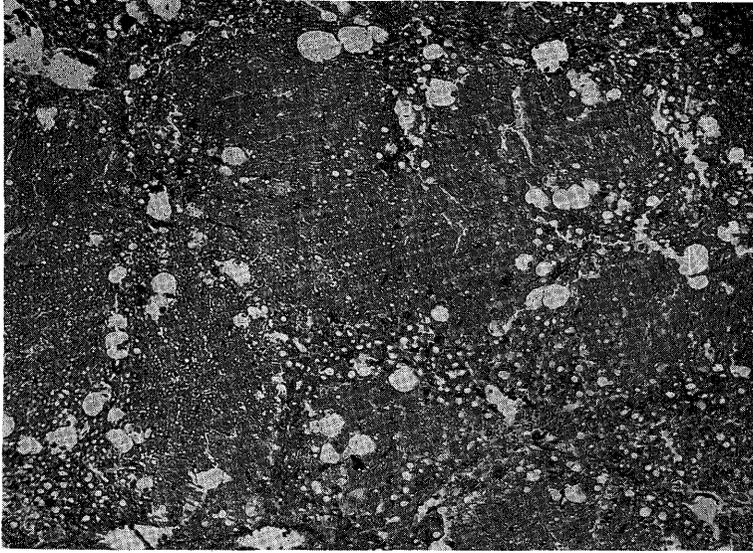


写真1 四塩化炭素 (20回) 単独投与 (No. 501). 線維の増生は著明でない.
×100 (アザン染色)

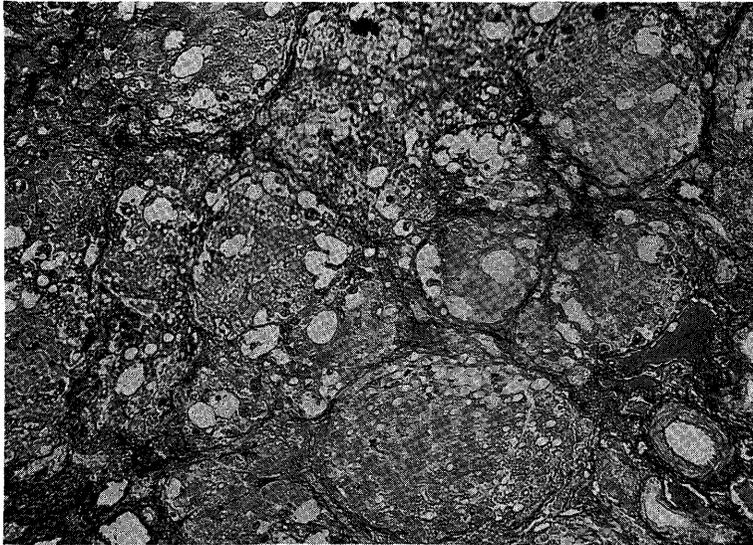


写真2 四塩化炭素 (20回) + アルコール投与 (No. 515). 著明な線維の増生.
×100 (アザン染色)