

ラット CCl₄障害肝モデルにおける肝マイクロゾーム機能の 術前肝予備能評価法としての意義

千葉大学医学部第1外科

菅沢 寛健 宮崎 勝 奥井 勝二

ラット CCl₄慢性肝障害モデルを作製し、アミノピリン呼吸テスト (ABT) による肝マイクロゾーム機能量を40%肝部分切除前後に測定し、肝蛋白合成能との関係も検討した。正常肝 (n=5) に比べ CCl₄障害肝群 (n=14) では術前 ABT は軽度低下をみるが有意差はない。40%肝切除後の低下は CCl₄障害肝群で著明であり (p<0.05) その回復も遅延した。肝切除後生存群の術前 ABT は68±29%、死亡群は16.9±2.7%と有意の低下を示した (p<0.05)。肝蛋白合成能は正常肝群404±90dpm/mg protein に比べ CCl₄障害肝群では1,470±405dpm/mg protein と有意に高値を示し ABT 値とは負の相関を認めた (r=0.881, p<0.001)。肝組織内蛋白含量は CCl₄障害肝群で低下したが有意差はなかった。ABT でみる肝マイクロゾーム機能量は CCl₄障害肝ラットでの肝切除時の予備力評価に有用である。また CCl₂障害肝での肝蛋白合成能の亢進は ABT でみる肝予備力低下に連なるものと考えられた。

Key words: CCl₄-induced liver injury aminopyrine breath test, hepatic protein synthesis, partial hepatectomy, hepatic microsomal functional mass

緒 言

障害肝患者の肝切除時の術前肝予備能評価のためには、肝の機能総量を反映しうる検査が重要であり、現在これらの検査法としては、肝細胞の色素排泄能総量を示すといわれている ICG Rmax¹⁾肝のガラクトース代謝能を示すといわれるガラクトース負荷試験²⁾などが行われており、肝のマイクロゾーム機能総量も肝予備能評価という点で Gill ら³⁾、宮崎ら⁴⁾によりその有用性が報告されている。アミノピリン呼吸テスト (ABT) は肝のマイクロゾームにおける aminopyrine N-demethylase 活性を間接的に測定し、マイクロゾームの機能総量を反映しうる検査といわれており、アルコール肝障害患者、肝硬変患者の予後、組織学的重症度をよく反映するといわれている^{5,7)}。著者らもすでに ABT がラット in-vivo 肝灌流モデルにおいて、その in vitro の microsomal enzyme activity の低下とよく相関し⁸⁾、また正常肝および D-Gal 障害肝、肝切除後の肝再生マーカーとして有用であり、耐術能評価法として応用可能であることを報告してきた^{9,10)}。今回はラッ

ト CCl₄慢性肝障害モデルを用い40%肝部分切除を施行し、術前 ABT により測定したマイクロゾーム機能総量の予備能評価としての意義を検討し、さらに肝機能不全と密接に関係する肝蛋白合成能と ABT との関係についても、合わせて検討を加えた。

実験方法

(1) CCl₄肝硬変モデルに対する肝部分切除

雄性ウィスター系ラット約150gを用い、フェノバルビタール水溶液 (藤永製薬) 35mg/dl 自由飲水下に、オリーブ油 (丸石製薬) にて希釈して作成した20% CCl₄ (和光純薬工業) 1.25mg/kg 週2回、12週間皮下投与にて肝硬変モデルを作成した^{11,12)}。CCl₄および、フェノバルビタール最終投与4週間の後に Higgins and Anderson¹³⁾法に従い40%肝部分切除を施行した (n=14)。なお対照として正常ラット (n=6) に40%肝部分切除を施行した。

(2) 血清 GOT GPT の測定

肝部分切除前および切除後1, 3, 7, 14日目に経時的に眼静脈より約1cc血液を採取し、sGOT sGPT を STA-test Wako (和光純薬工業) を用いて Reitman-Frankel 法¹⁴⁾に基づいて測定した。結果は Karmen 単位で表示した。(3) アミノピリン呼吸テ

スト (ABT)

アミノピリン呼吸テストはunlabelled aminopyrine および [dimethylamine- ^{14}C] aminopyrine を2.5mg/rat 0.5 μCi /rat をラット腹腔内に投与し, Stewart らの方法¹⁵⁾に準じ呼吸を持続的に30分間 IN-NaOH 150 ml にトラップさせ, 0.7ml NaOH 中の $^{14}\text{CO}_2$ 量を液体シンチレーションカウンターにて測定する方法で行った。

CCl₄障害肝 (n=14), 正常肝 (n=6) 全例に肝部分切除前に ABT を施行し, CCl₄障害肝正常肝 6 例に対しては, 肝部分切除後 1, 3, 7, 14 日目にも経時的に ABT を施行した。結果は sham 群(正常ラットの無処置)の排泄量を100%として, 対 sham 比で示した。

(4) 肝蛋白合成能の測定

肝切除後に採取した切除肝組織を用い, Hasselgren ら¹⁶⁾の方法に準じて厚さ0.5mmの肝スライスを作製し, in vitro で [^{14}C]-Leucine(New England Nuclear) を10 μCi 含有する RPMI1640培養液中で27 $^{\circ}\text{C}$, 95% O₂ ± 5% CO₂下で2時間培養した。培養終了後肝スライスを homogenate し蛋白分画中への [^{14}C] Leucine の取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。また蛋白含量は Lowry 法¹⁷⁾にて測定し結果は dpm/mg protein で表示した。

(5) 生存率の検討

生存率は肝切除21日目時点にて検討した。

(6) 統計学的処理

結果は Mean ± SD で表示し, 有意差検定は, student t test を用いて $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

結 果

(1) 血清 GOT, GPT 値の変動

40%肝部分切除前の sGOT 値は CCl₄障害肝群で 637 ± 237 Kamen unit/ml に対し正常肝群では 144 ± 72 であった。肝切除後は第1日目に著増を示すが, 両群間に有意差はなく比較的速やかにその値は低下する (Fig. 1)。sGPT 値も同様で術前 CCl₄障害肝群で 293 ± 58 に対し正常肝群 65 ± 48 と有意差を認めない。40%肝切除後変動では sGOT と同様に, 術後第1日目に著増し, その後漸減していく。両群間に明らかな有意差を認めなかった (Fig. 2)。

(2) 肝切除後 ABT 値の変動

正常肝の ABT 値は肝切除前 $100 \pm 12\%$ より40%肝切除後 68 ± 18 と32%の低下を示した。一方 CCl₄障害肝は術前 65 ± 28 が肝切除後 28 ± 10 と57%ものより強い低下を示した。その後両群とも徐々に回復を示すが,

Fig. 1 Changes of sGOT level following partial hepatectomy.

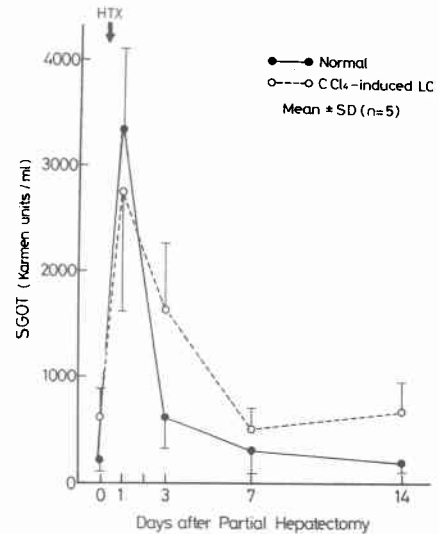
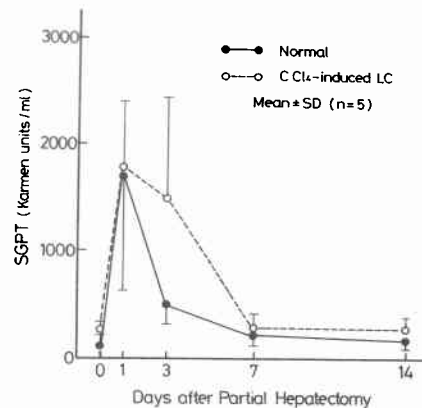


Fig. 2 Changes of sGPT level following partial hepatectomy.



両群間の差異は前値で $p < 0.05$ の有意差を認めたのに比べ, 肝切除後1日, 3日目においては $p < 0.01$ のより明らかな差異を示した (Fig. 3)。

(3) 肝切除前 ABT 値と耐術能

CCl₄障害肝ラットで, 40%肝部分切除後の生死と切除前の ABT 値との関連をみると, 死亡群3匹生存群11匹であり, 生存群の ABT 値 $68 \pm 29\%$ に比べ死亡群では $17 \pm 2.7\%$ と $p < 0.05$ の有差を認めた (Fig. 4)。

(4) CCl₄障害肝の肝蛋白合成能および蛋白含量

CCl₄障害肝の肝蛋白合成能を正常肝と比較すると, 正常肝群 404 ± 90 dpm/mg protein に対し, CCl₄障害

Fig. 3 Changes of ABT scores following 40% partial hepatectomy in CCl₄-induced liver injury.

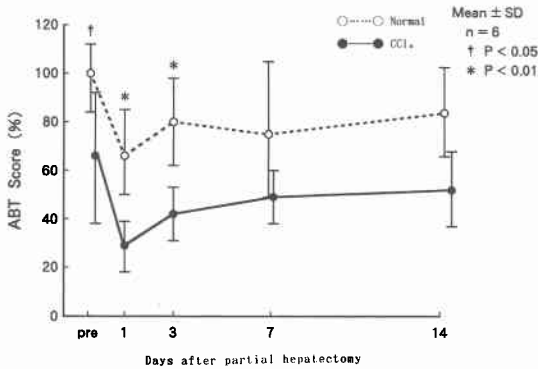
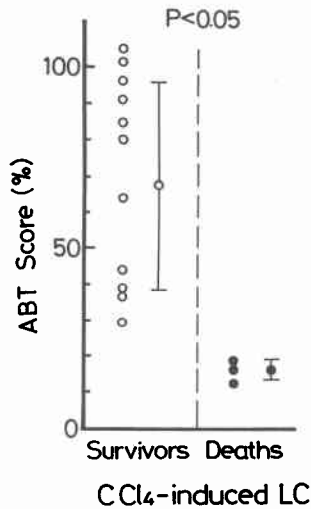


Fig. 4 ABT score and surgical mortality following partial hepatectomy in rats with CCl₄-induced liver injury.



肝群は $1,470 \pm 405$ と著明な亢進を示し、 $p < 0.001$ の有意差を認めた (Fig. 5)。また肝組織内蛋白含量の相違を検討すると、正常肝群 268 ± 61 mg protein/wet weight に比べ、CCl₄障害肝群では 180 ± 58 と両群間に差異を示しえなかった (Fig. 6)。

(5) ABT 値と肝蛋白合成能の相関

CCl₄障害肝において、肝切除時に採取した肝組織にて測定した肝蛋白合成能と、肝切除前に施行した ABT 値の関係をみると $r = 0.881$ で $p < 0.001$ の有意な逆相関を示した (Fig. 7)。

考 察

現在肝細胞機能総量をあらわし、肝切除前予備力判

Fig. 5 Hepatic protein synthesis in CCl₄-induced liver injury.

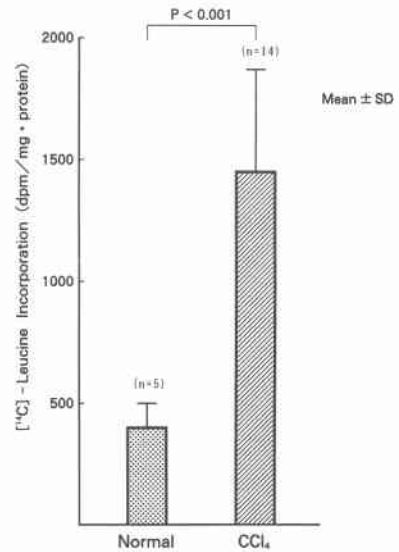
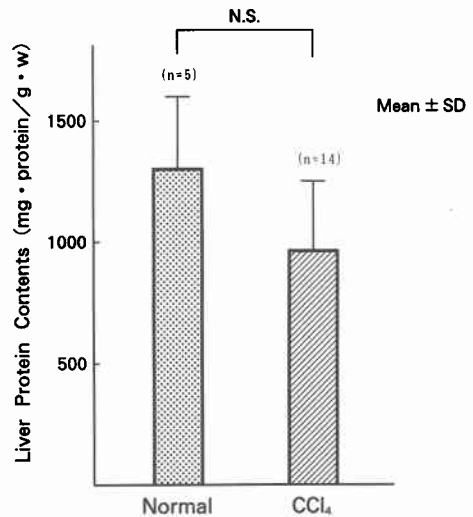
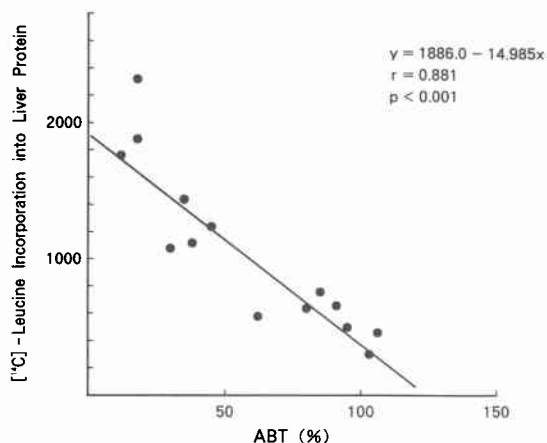


Fig. 6 Liver protein contents in CCl₄-induced liver injury.



定の指標として用いられる検査法は ICG Rmax が一般的である。しかしながら ICG Rmax は、正常肝¹⁾あるいは CCl₄障害肝¹⁰⁾切除後の肝重量変化に、よく一致するといわれているが、肝重量の変化が肝機能総量の変化に一致するか否かは、疑問の残るところである。中谷ら¹⁹⁾はラット肝切除後の、ICG Rmax の回復に比べてヘパラスチンテストの回復はより遅延したと述べており、また竹崎ら²⁰⁾は、ICG Rmax とガラクトー

Fig. 7 Relation between ABT and hepatic protein synthesis in CCl₄-induced liver injury.



ス負荷試験を比較し、ICG Rmax は肝重量と密接に関係するが肝重量と functional reserve cell mass とは一致しないと述べている。高田ら²¹⁾も sick hepatocyte theory, intact hepatocyte theory という概念で、ICG Rmax の functional mass としての限界について述べている。水本ら²⁾の残肝機能容積率という方法も、ICG Rmax の functional mass 評価法としての限界を、RI の up take という機能を加味して補ったものである。このように現在最も臨床に用いられている ICG Rmax でも、肝細胞機能総量評価法としては限界があり、他のさまざまな検査法が検討されている由縁である。

著者ら⁹⁾¹⁰⁾の D-Galactosamine 障害肝に対して施行した ABT score の推移も肝細胞機能総量を反映するとされるガラクトース負荷試験²⁰⁾²²⁾に類似した結果を示しており、肝のマイクロゾーム機能総量により肝の functional reserve cell mass を反映しうると考えられる。

アミノピリンは体内に吸収されると、すみやかに body water に応じて均一に分布し肝マイクロゾームの aminopyrine-N-demethylase により、特異的に脱メチル化される薬剤であり、また脱メチル化されたメチル基はすみやかに CO₂ になり呼気中に排泄される。すなわちアミノピリンから CO₂ 産生の反応速度の律速酵素は aminopyrine-N-demethylase であることから、メチル基を放射性同位元素でラベルし、ラベルされた CO₂ の産生速度を測定すれば、同酵素活性で代表される肝のマイクロゾーム機能総量を測定できるとい

うのが、この検査法の原理である。

Lauterburg ら²³⁾はラットを用いた実験で、フェノバルビタール投与や部分肝切除によって肝の aminopyrine-N-demethylase 活性の総量を変化させ、この変化がアミノピリン呼気テストにより定量的に測定されることを示し、アミノピリン呼気テストが microsomal functional mass を示しうる検査法であることを明らかにした。Hepner ら²⁴⁾はこの方法を人間に応用し、血清アルブミンや BSP retention と関連することから新しい定量的肝機能評価法であると述べた。さらにアミノピリン呼気テストはアルコール性肝障害患者の組織学的重症度や予後を反映し、肝硬変患者の予備能や予後を良く反映する、簡便で侵襲の少ない検査法であることが報告されてきている⁶⁾⁷⁾。しかしながら外科領域で、アミノピリン呼気テストにより測定した肝マイクロゾーム機能総量を耐術能検査法として応用した研究は、著者ら⁹⁾以外には Gill-RA ら⁴⁾が ABT score と surgical risk を検討して、外科治療適応基準を報告している。

著者らはすでにラットを用いた基礎的研究で¹⁴C-aminopyrine 腹腔内投与30分間に排泄された¹⁴CO₂量で示される ABT score は、肝のマイクロゾーム機能総量をよく反映し、正常肝部分切除時にはその切除量に一致した低下を示し、切除後の回復には約4週間を要し、肝重量の回復に約2週間の遅延を示すことを報告してきた⁹⁾。またガラクトサミンにて作成したラット急性肝障害モデルを用いて肝部分切除を施行し、同モデルでも ABT score は肝の機能的再生過程をよく示すとともに、肝部分切除前に施行した ABT score は、切除後の予後を良く反映し、アミノピリン呼気テストが耐術能検査法として応用可能であることを示してきた¹⁰⁾。今回はより臨床的に近いモデルという観点から、CCl₄慢性投与によるラット肝硬変モデルを作成し、同モデルでの ABT の意義について検討した。

Cameron ら¹¹⁾によって確立された CCl₄繰り返し投与による肝硬変モデルは、投与経路、投与量、投与間隔などさまざまな改良が加えられて用いられてきている。CCl₄などの薬剤による肝障害モデルにおいて、しばしば問題となる障害モデルの不均一性を、できる限り均一にする目的で用いたフェノバルビタールは、本研究では ABT 測定の4週間前に中止しており、酵素誘導による aminopyrine-N-demethylase 活性への影響は消失していると考えられた²⁵⁾。40%肝部分切除後第1日目の ABT score 減少は、正常肝では切除量に

ほぼ一致した低下を示したが、CCl₄肝硬変ラットでは切除量よりも大きな減少を示した。これは同モデルのラット肝臓の各葉の容積比が、代償性肥大などのために、Higginsら¹³⁾の記述と異なっている可能性もあるし、肝部分切除による侵襲が肝細胞に対して、正常の場合に比べより強く細胞障害性に働いたとも考えられる。肝部分切除後の肝マイクロゾーム機能回復過程は、正常肝 D-Galactosamine 障害肝に比べて、CCl₄肝硬変モデルでは著しい遅延を認めた。これは小池ら¹⁸⁾の報告と同一傾向であった。耐術能評価としてのABTは今回用いたCCl₄障害肝モデルでは、極めて明白に生存群、死亡群を分け、術前耐術能評価法としての有用性が示唆されたが、切除量の差異による予測の信頼性の確認などがさらに必要であろう。

このようにABTによる肝マイクロゾーム機能量の評価が、肝予備力評価として有用であることが確認されたわけであるが、肝蛋白質合成能との関係を検討したデータでは、CCl₄障害肝においてABT値と肝蛋白質合成能が明らかな負の相関を示していた。CCl₄障害肝では肝蛋白質合成能は低下するという報告が多いが、Smucklerら²⁶⁾は必ずしも低下をみないと述べている。これはCCl₄障害モデルにおける、薬剤投与量や蛋白質合成能の測定した時期によると考えられる。すなわち慢性障害肝では肝細胞総量が減少し、単位細胞あたりの各種機能は代償性に亢進すると考えられ、肝蛋白質合成能の亢進もその障害過程において、代償期には起こりうるものと考えられる。肝単位重量あたりの肝蛋白質含量は今回のモデルでは、CCl₄障害肝で有意ではないが減少しており、代償性の肝蛋白質合成亢進を推測するデータといえよう。著者らはこの様に肝細胞に特異的に、肝蛋白質合成亢進の刺激が働いている場合には肝予備力は低下すると考えている。すなわち肝細胞に機能負荷が加わった場合には、結果的に肝予備力低下をもたらすものと考え、その場合測定された肝蛋白質合成亢進状態は、予備力のむしろ低下を示唆するものと理解すべきと考えており、このような観点より今回のABTと肝蛋白質合成能の逆相関は理解すべきと判断される。

文 献

- 1) Rikkens LF, Moody FG: Estimation of functional hepatic mass in resected and regenerating rat liver. *Gastroenterology* 67: 691-699, 1974
- 2) 水本龍二, 野口 孝, 中川 毅: 肝機能予備力と手

- 術危険度の判定, 特に肝切除後残存肝機能予備力の術前評価法. *外科治療* 39: 71-78, 1978
- 3) Ranek L, Buch PA, Tygstrup N: Galactose elimination capacity as a prognostic index in patient with fulminant liver failure. *Gut* 17: 959-964, 1976
 - 4) Gill RA, Goodman MW, Golfus GR et al: Aminopyrine breath test predict surgical risk for patient with liver disease. *Ann Surg* 198: 701-704, 1983
 - 5) 宮崎 勝, 菅沢寛健, 神野弥生ほか: アミノピリン呼吸テストによる肝障害患者の耐術能評価の有用性. *日消外会誌* 19: 29-34, 1986
 - 6) Schneider JF, Baker AL, Harires NW et al: Aminopyrine N-demethylation: A prognostic test of liver function in patient with alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 79: 1145-1150, 1980
 - 7) Morelli A, Narducci F, Pelli MA et al: The relationship between aminopyrine breath test and severity of liver disease in cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 76: 110-113, 1981
 - 8) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE et al: Comparison of in vivo thermochemotherapy of isolated rat liver through portal vein and hepatic artery. *Can J Surg* 26: 224-228, 1983
 - 9) 菅沢寛健, 宮崎 勝, 藤本 茂ほか: 肝切除後の再生マーカーとしてのアミノピリン呼吸テストの意義に関する基礎的検討. *日消外会誌* 17: 677, 1984
 - 10) 菅沢寛健, 宮崎 勝, 神野弥生ほか: D-ガラクトサミン障害肝, 肝切除におけるアミノピリン呼吸テストによる肝 microsomal functional mass 測定の意義. *日消病会誌* 82: 2049-2057, 1985
 - 11) Cameron GR, Karunaratne WAE: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bact* 42: 1-21, 1936
 - 12) Chatamra K, Proctor E: Phenobarbitone-induced enlargement of the liver in the rat: its relationship to carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Exp Pathol* 62: 283-288, 1981
 - 13) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 12: 186-202, 1931
 - 14) Reitman S, Frankel S: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 56-63, 1957
 - 15) Stewart DJ, Inaba T: N-demethylation of aminopyrine in vivo and in the isolated hepatocyte of the rat. *Biochem Pharmacol* 28: 461-464, 1979

- 16) Hasselgren PO, Almersjo O, Gastaussen B et al: Amino acid incorporation into liver protein during short-term ligation of the hepatic artery in the dog. *Eur Surg Res* 11 : 366—380, 1979
- 17) Lowry OH, Resebragh NJ, Farr AI et al: Protein measurement with Folinphenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265—275, 1951
- 18) 小池洋一, 原田明生, 山本隆男ほか: 肝再生状況の指標としての ICG Rmax の意義. *薬理と治療* 10 : 81—85, 1982
- 19) 中谷泰康: 肝細胞総予備力判定の指標に関する実験的研究. *金沢医大誌* 1 : 246—252, 1976
- 20) 竹崎英一, 中西敏夫, 川本広夫ほか: 肝予備能検査法としてのガラクトース負荷試験の実験的検討—ICG Rmax との比較検討. *肝臓* 24 : 1235—1241, 1983
- 21) 高田 昭: ICC Rmax 内科応用. *薬理と治療* 12 : 435—446, 1984
- 22) 海保 隆, 宮崎 勝, 宇田川都夫ほか: Galactose 負荷試験よりみた肝切除前後の肝機能の変動. *日消外会誌* 23 : 2064—2073, 1990
- 23) Lauterburg BH, Bircher J: Expiratory measurement of maximal aminopyrine demethylation in vivo: Effect of phenobarbital, partial hepatectomy, port-caval shunt and bile duct ligation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 196 : 501—509, 1976
- 24) Hepner GW, Vesell ES: Quantitative assessment of hepatic function by breath analysis after oral administration of ¹⁴C-aminopyrine. *Ann Intern Med* 83 : 632—638, 1975
- 25) Farrell GC, Zaluzny L: Microsomal protein synthesis and induction of cytochrome P-450 in cirrhotic rat liver. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62 : 291—301, 1984
- 26) Smuckler EA, Iseri OA, Benditt EP: An intracellular defect in protein synthesis induced by carbontetrachloride. *J Exp Med* 116 : 55—83, 1962

Assessment of a Hepatic Microsomal Functional Mass by Aminopyrine Breath Test after Partial Hepatectomy in Rats with CCl₄-induced Liver Injury

Hirotake Sugawara, Masaru Miyazaki and Katsuji Okui
First Department of Surgery School of Medicine, Chiba University

In CCl₄-induced liver injury of rats, a hepatic microsomal functional mass measured by the ¹⁴C-aminopyrine breath test (ABT) was assessed, following 40% partial hepatectomy, and hepatic protein synthesis was also measured. The CCl₄ group had lower ABT values than the normal group, but the difference was not significant. After 40% partial hepatectomy, the ABT values decreased in the CCl₄ group more than in the normal group ($p < 0.05$), and the return to the normal values was retarded in the CCl₄ group, survivors after 40% partial hepatectomy had higher ABT values ($68 \pm 29\%$) preoperatively than that of deaths ($16.9 \pm 2.7\%$). The difference was significant ($p < 0.05$). Hepatic protein synthesis in the CCl₄ group was 3.6-fold greater than that in the normal group and was inversely correlated with the values of ABT ($r = 0.881$ $p < 0.001$). However there was no difference in hepatic protein content between the two groups. In conclusion, ABT is a good indicator of hepatic functional reserve in CCl₄-induced liver injury. Enhancement of hepatic protein synthesis would induce depression of the hepatic functional reserve measured by ABT.

Reprint requests: Masaru Miyazaki First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University
1-8-1 Inohana, Chiba, 280 JAPAN