

《原 著》

四塩化炭素肝障害ラットにおけるラジオレスピロメトリック・パターンの解析

小島 周二* 志気 保子** 久保寺昭子**

要旨 四塩化炭素 (CCl_4) 処理による実験的肝障害回復過程での Glucose ($\text{U-}^{14}\text{C}$) に基づく呼吸 $^{14}\text{CO}_2$ 連続排泄パターンの変化を, この間における血清トランスアミナーゼ活性および解糖系酵素活性変動と関連付け解析を行ない, 次のごとく結果を得た.

- 1) ラジオレスピロメトリーにおいて, Peak time (PT) は CCl_4 処理後 1 日目に処理前に較べ約 10 分以上遅れ, 3 日目に著しく早まり, その後 4 日, 5 日目で正常値に近づいた. 一方 Peak height (PH), Yield value (YV) は 1 日目で著しく減少したが, 3 日目で正常値を示した.
- 2) トランスアミナーゼ, GOT, GPT 活性は共に CCl_4 処理後直ちに肝細胞破壊により上昇し始め, 1 日目から 2 日目の間で最高値を示した. 3 日目から減少し始め 4 日目には, 処理前の値を示した.
- 3) 解糖系酵素, PK, HK, G-6-PD はいずれも CCl_4 処理後 3 日目に著しく活性化され, その後正常値を示した.
- 4) これらラジオレスピロメトリック・パターンはラットの生理的あるいは生化学的变化をよく反映し, ラジオレスピロメトリーが肝疾患の臨床診断に有効な方法, 手段となりうると思われる.

I. 結 言

^{14}C 標識炭化水素化合物を生体内に投与し, ^{14}C O_2 の呼吸排泄から, その基質の代謝を研究しようとする方法は Tolbert¹⁻³⁾ により提唱され Wang⁴⁾ らにより “Radiorespirometry” という生化学的分析法として確立された. わが国においては松岡⁵⁾, 重松⁶⁾ らにより報告があるのみである. この方法の特徴は, 従来呼吸排泄 $^{14}\text{CO}_2$ をモノエタノールアミンなどで一定時間吸着させる trap 法に対し, 連続的に呼吸排泄 $^{14}\text{CO}_2$ を測定でき, 総排泄量のみならず排泄パターンの変化も観察できるという点にある. また, intact な動物で, しかも同一動物で薬物投与後の経時的変化が観察可能となる. 本報においては, 20% CCl_4 によるラット急性肝

炎誘発後における肝障害回復過程での変化を Glucose ($\text{U-}^{14}\text{C}$) を基質に, $^{14}\text{CO}_2$ の呼吸排泄パターンから検討し, 同時にこの間における血清トランスアミナーゼおよび解糖系酵素活性変動と関連づけ, 臨床診断に有益な情報を提供する結果を得たのでここに報告する.

II. 方 法

1. 動 物

Donryu 系雄ラット (日本ラット K.K.), 体重約 180 g を 1 昼夜絶餌後, 20% CCl_4 含有流動パラフィン溶液を 0.5 ml/100 g 体重経口投与する. なお, 流動パラフィンのみを投与したものを対照群とした. CCl_4 投与後 1 日目から 5 日目まで, Radiorespirometry および血清トランスアミナーゼ, 解糖系酵素活性測定を行なった.

2. Plastic Radiorespiro Scintillation Counter (P-RRSC)

P-RRSC は Fig. 1 に示す 3 つの系より構成されている. すなわち, ガス流路系, 放射能測定系, CO_2 捕集系である. Glucose ($\text{U-}^{14}\text{C}$), 2.5 μCi を

* 帝京大学薬学部放射化学教室

** 東京理科大学薬学部放射化学教室

受付: 53 年 9 月 5 日

最終稿受付: 53 年 9 月 5 日

別刷請求先: 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091 の 1 (☎199-01)

小 島 周 二

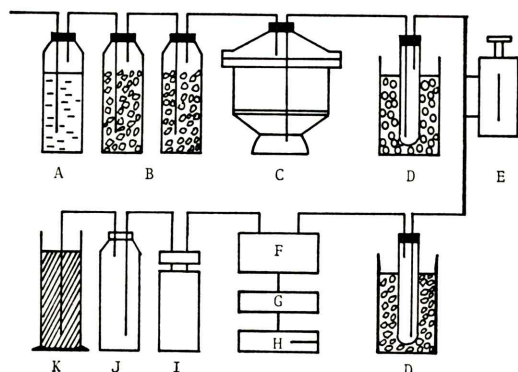


Fig. 1 A schematic diagram for plastic radiorespiro scintillation counter

A: 10% KOH B: Silica gel C: Animal chamber D: Water trap E: Flow meter F: Plastic scintillator G: Counter H: Recorder I: Air pump J: Bottle preventing K: CO₂ trap

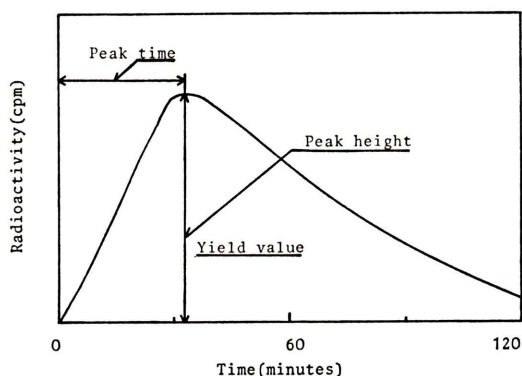


Fig. 2 Analytical parameter of radiorespirometric pattern

Peak time (PT) is the time which reached at maximum radioactivity after administration of ¹⁴C-labeled carbohydrate. Peak height (PH) is the radioactivity at peak time. Yield value (YV) is the percentage of total respiratory ¹⁴CO₂ radioactivity to administered doses for 2 hours.

腹腔内注射後、直ちに動物を animal chamber に移し、連続2時間呼吸排泄¹⁴CO₂パターンを描かせた。放射活性は radiorespiro plastic scintillator (ALOKA) を用いて計数した。モノエタノールアミンに捕集した総¹⁴CO₂の放射活性は液体シンチ

レーションカウンター (ALOKA LSC-651) にて測定した。

ラジオレスピロメトリック・パターンの解析は松岡らの方法に従い、Fig. 2 に示す Peak time (PT), Peak height (PH), Yield value (YV) の3つのパラメータで行なった。

P-RRSC の測定条件は以下に示すとおりである。

測定条件:

Full scale	3 kcpm
Time Const	30 sec
Air flow	0.2 l/min
Chart Speed	2.5 mm/min
Animal Chamber Volume	3300 ml
Hight Voltage Power	
Supply	1700 V
Gain	0.5 × 10
Lower	6.50
Higher	8.10

3. 酵素活性の測定

1) 血清トランスアミナーゼ

Stanley Reitman⁷⁾の方法に従い、20% CCl₄ 投与後4, 8, 24, 48, 72, 96時間目に Glutamic Oxalacetic Transaminase (GOT) および Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT) の活性測定を行なった。すわわち、基質として、GOT の場合には α-ketoglutarate + L-Aspartate, GPT の場合には α-ketoglutarate + DL-Alanine 1.0 ml を 37°C, 3 分の条件でインキュベート後、動物血清 0.2 ml を加え GOT で1時間, GPT で30分インキュベートする。さらに 2,4-Dinitrophenylhydrazine 試薬 1.0 ml を加え 20分室温で放置後、0.4 NHCl 10.0 ml を加え、十分攪拌し、505 nm での吸光度を測定する。なお分光光度計は Beckman Toshiba Specta 20 を用いた。

2) 解糖系酵素

20% CCl₄ 投与後1日～5日目まで隔日に酵素活性を測定した。撲殺後、直ちに冷 1.15% KCl で灌流後、1部を Homogenizing Buffer (pH 7.4, 0.15 MKCl, 1 mM EDTA, 20 mM mercaptoethanol 15 mM MgCl₂) と共に Potter-homogenizer でホ

モジナイズし、20%ホモジネートを作製する。このホモジネートを直ちに冷却遠心機 (Tomy) で、30,000 g、1 時間の条件で遠心分離し、上清を酵素活性の測定に用いた。

Hexokinase (HK) は final volume 3.0 ml 中に 42 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 6.7 mM MgCl₂, 2.7 mM ATP, 0.73 mM NADP, 1.4 Units glucose-6-phosphate dehydrogenase, 222 mM glucose を含むように調整し、25°C で 3 分間インキュベート後、340 nm における吸光度の増加から、単位時間 (分) あたりの増加率を求め Unit を求めた。

Pyruvate kinase (PK) は Pfluderer⁸⁾らの方法に従い、final volume 3.0 ml 中に 87.3 mM Triethanolamine buffer (pH 7.6), 0.53 mM phosphoenolpyruvate, 2.5 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 4.7 mM ADP, 0.2 mM NADH, 11.25 Units Lactic acid dehydrogenase (LDH) を含むように調整し、25°C で 3 分間反応させた。反応後 340 nm における吸光度の減少から単位時間 (分) あたりの Unit を求めた。

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) は Glock⁹⁾らの方法に従い、final volume 2.5 ml

中に 20 mM MgCl₂, 50 mM Glycylglycine buffer (pH 7.6), 0.2 mg NADP, 10 mM glucose-6-phosphate を含むように調整した。20°C で 3 分間反応後、340 nm における吸光度の増加から、単位時間 (分) あたりの Unit を求めた。

酵素活性 1 単位 (U) は上記測定条件で 1 分間における NADH あるいは NADP を 1 μ mol 酸化あるいは還元する酵素量を決めた。比活性は蛋白質 1 mg あたりの酵素単位量とした。なお、蛋白質量は Bovine Serum Albumine (BSA) を Standard とし Lowry¹⁰⁾らの方法にて求めた。また、酵素活性測定に用いた生物試薬は全て Boehringer Mannheim, GmbH, Germany 製を用いた。

III. 結 果

1. ラジオレスピロメトリー

20% CCl₄ 投与後 1 日～5 日目までのラジオレスピロメトリック・パターンの変化を Fig. 3 に示した。図から明らかなように CCl₄ 処理後、第 1 日目にはピークらしいピークは認められず、かなり乱れたパターンを示した。2 日目には 24 分前後に

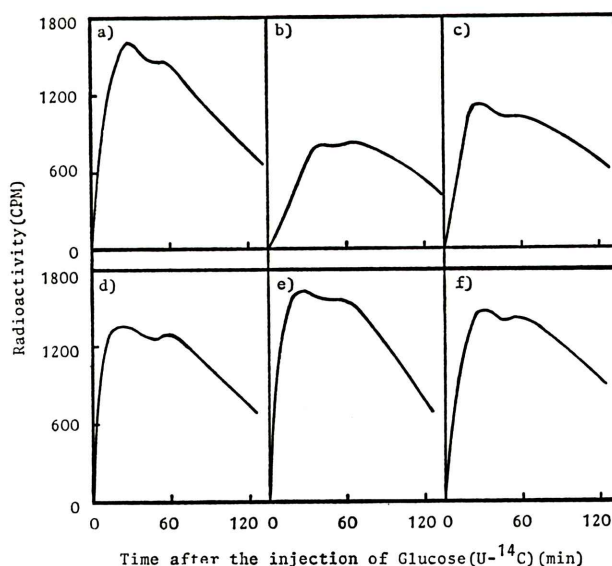


Fig. 3 Changes of radiorespirometric pattern

a) Before administration b) First day c) Second day
d) Third day e) Fourth day f) Fifth day

Table 1 Changes in radiorespirometric parameters

Day	Peak time (PT) (minutes)	Peak height (PH) (CPM)	Yield value (YV) (%)
0	29.0 \pm 1.1	1623 \pm 30	56.6 \pm 1.6
1	39.0 \pm 1.8	830 \pm 181	39.7 \pm 8.1
2	24.0 \pm 0.6	1056 \pm 187	51.5 \pm 0.6
3	18.0 \pm 0.9	1353 \pm 312	58.8 \pm 4.3
4	20.2 \pm 0.2	1619 \pm 529	61.6 \pm 6.5
5	24.1 \pm 0.8	1437 \pm 120	60.7 \pm 2.5

The value is the means \pm standard deviations of 3 rats.

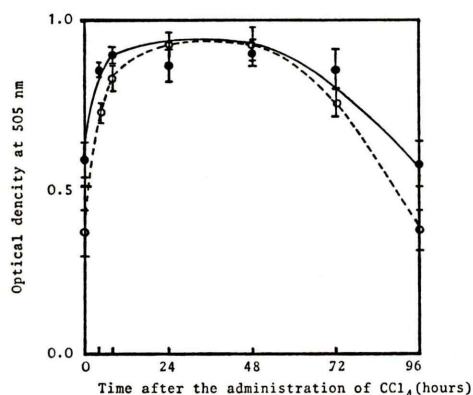


Fig. 4 Changing activities in GOT and GPT
Each value is the means of three rats.
Vertical lines indicate the standard deviation.
●—● GOT activity. ○---○ GPT activity.

ピークが見られ、3日目になると18~19分と60分前後に明らかに2つのピークをもったパターンが得られた。その後、処理前のパターンにもどった。第1のピークまでの時間をPTとし、1日~5日目までのパラメーターの変動をTable 1に示した。PTに関しては、処理前の値が30分前後に対し、1日目で約10分もの遅れを示した後、3日目では10分前後の早まりを示した。PHも1日目ではほぼ1/2に低下し、3日~4日目で処理前の値を示した。YVは1日目でやや低下するものの、3日目以降は処理前より増加する傾向を示した。なお、流動パラフィンのパラメーターに対する影響、この間における日変動は認められなかった。

2. トランスアミナーゼ活性変動

Fig. 4に20% CCl₄投与後のGOT, GPT活性変動を示した。いずれも処理後ただちに活性上昇

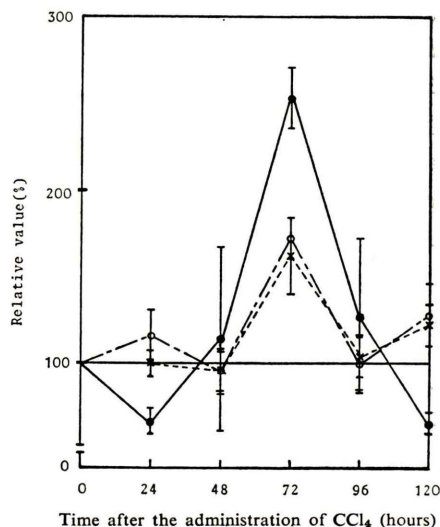


Fig. 5 Changing activities in glycolytic enzymes
Each value is represented the relative value as 100% of control and the means of 3 rats.
Vertical lines indicate the standard deviation.
●—● Pyruvate kinase ○---○ Hexokinase
x---x Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

を示し、1日~2日目で maximum になり、3日目には下降し始め4日目には処理前の活性値を示した。

3. 解糖系酵素活性変動

Fig. 5には20% CCl₄投与後のPK, HK, G-6-PD活性の経時変化を示した。いずれも3日目に活性上昇し、とりわけPKに著しい変動が観られた。

IV. 結 論

実験的肝障害モデルとして20% CCl₄による急性肝炎を用い、回復期におけるラジオレスピロメトリック・パターンを解析し、この変化が生体内の生理的、生化学的変動をよく反映することがわかった。すなわち CCl₄処理直後の肝細胞破壊によるGOT, GPTの活性上昇、この時期におけるパターン自体の乱れ、PTの遅れ、PH, YVの低下、そしてGOT, GPT活性下降期には解糖系酵素の著しい活性上昇がみられ、ラジオレスピロメトリーにおいてはPTが著しく早まり、YVは処理前の値より増加する傾向を示した。以上の結果、肝

障害の程度,あるいは回復期における診断に“Radiorespirometry”が有効な手段となりうると考えられる。

V. 考 案

^{14}C 標識化合物は,生体内で代謝され,最終産物として $^{14}\text{CO}_2$ の形で呼気中に排泄される。この呼気排泄 $^{14}\text{CO}_2$ パターンは生体の代謝能力により速やかに変化する。すなわち,動物体の生理的あるいは生化学変化により, $^{14}\text{CO}_2$ の排泄速度,量,パターンが異なってくる。従ってある一定の動物体系において,ある標識化合物に関する呼気排泄パターンが確立された場合には,そのパターンから,動物体の生理的状态や生化学的变化を予想することが可能となる。今日に至るまで,さまざまな生理的条件下での,種々の標識化合物によるラジオレスピロメトリが得られているが¹¹⁾⁻¹³⁾,生化学的变化と関連づけた報告はまれで,動物の個体差,テクニカルエラーなどに基づく結果と思われる場合も少なくない。

今回われわれはラットを用い実験的肝障害モデルとして 20% CCl_4 による急性肝炎を作り, Glucose ($\text{U-}^{14}\text{C}$) を基質とし,回復過程でのラジオレスピロメトリック・パターンの変動をトランスアミナーゼ,解糖系酵素活性の変化と関連づけ解析を試みた。この結果,この3者間に相関が認められ,ラジオレスピロメトリック・パターンに生化学的変動がきわめて良く反映されていた。また,今回得られたラジオレスピロパターンに2つのピークが見られるが,これは基質に Glucose ($\text{U-}^{14}\text{C}$) を用いたためと現えられる。おそらく第一ピークは早めに出現することから, ^{14}C -1 位標識に基づくものと考えられ,この Glucose ($1\text{-}^{14}\text{C}$) を用いることにより,より明確な変化が予想される。今後これらの点に関して検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Tolbert BM, Hughes AM, Kirk MR et al: Effect of CoA on the metabolic oxidation of labeled fatty acid; Rate studies, Instrumentation and liver fractionation. University of California Radiation Laboratory Report UCRL-2849, April 1955
- 2) Tolbert BM, Kirk MR, and Baker EM: Continuous $^{14}\text{CO}_2$ and CO_2 excretion studies in experimental animals. University of California Radiation Laboratory Report UCRL-2941, June 1955
- 3) Tolbert BM, Kirk MR, and Baker EM: Continuous $^{14}\text{CO}_2$ and CO_2 excretion studies in experimental animals. Federation Proc **14**: 152, 1955
- 4) Wang CH: Radiorespirometry, Method of Biochemical Analysis **15**: 311-368, 1971
- 5) Mathuoka O, and Muramathu E: Continuous measurement of respiratory $^{14}\text{CO}_2$ and CO_2 pattern in mice. Radioisot **15**: 346-353, 1966
- 6) Shigemathu A: 液体シンチレーション計数技術(VI) 生体学研究における利用. Radioisot **24** (6): 67-77, 1975
- 7) Reitman S, and Frankel S: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Pathol **28**: 56-63, 1957
- 8) Pfluderer G, Bucher T: Method in Enzymol (ed. colowick, S. S., Kaplan, N. O), Academic Press, New York, Vol 1, 1955, p. 435
- 9) Glock GE, and Mclean P: Level of enzyme of direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumors. Biochem J **56**: 171-175, 1954
- 10) Lowry OH, Rosenbrough NJ et al: Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem **193**: 265-275, 1951
- 11) Reid JC, and Jones HB: Radioactivity distribution in the tissues of mice bearing melanoma after administration of DL-Tyrosine labeled with radioactive carbone. J. Biol. Chem **174**: 427-437, 1948
- 12) Gould RG, Sinex FM et al: Excretion of radioactive Carbone Dioxide by rats after administration of isotopic bicarbonate acetate and succinate. J. Biol. Chem **177**: 295-301, 1949
- 13) Brues AM, and Buchanan DL: Studies on the overall CO_2 metabolisms, Cold Spring Harbor Symposia **13**: 52-62, 1948

Summary

Analysis of Radiorespirometric Pattern in Rats Bearing Liver Injury Treated with CCl₄

Shyuji KOJIMA*, Yasuko SHIKI** and Akiko KUBODERA**

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University*

***Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo*

Respirometric pattern in rats during the recovery from liver injury treated with 20% CCl₄ for radioactivity from glucose (U-¹⁴C) was studied associating with the changes in transaminase and glycolytic enzyme activities. The results were as follows:

(1) In radiorespirometry, PT was delayed about 10 minutes over as compared with control, hastened markedly at 3rd day, and thereafter become to be normal level. On the other hand, PH and YV which decreased at 1st day were represented the values at 3rd day before the treatment of CCl₄.

(2) Transaminase, GOT, and GPT activities were both increased immediately after the treatment of CCl₄ on the basis of liver cell destruction

and reached at maximum between 1st and 2nd day. At 3rd day, these activities were become to decrease and shown normal levels at 4th day.

(3) Glycolytic enzyme, PK, HK, and G-6-PD were markedly activated at 3rd day and thereafter shown normal level.

(4) These radiorespirometric pattern reflected well the physiological or biochemical states in rats. As the results of this study, radiorespirometry can be useful method for clinical diagnosis of liver disease.

Key words: Radiorespirometry, Liver injury, Glycolytic enzyme.