

急性肝不全における肝エネルギー代謝変動に 関する実験的研究

京都大学医学部外科学教室第1講座（指導：戸部隆吉教授）

内 田 憲 一

〔原稿受付：昭和59年4月20日〕

Alterations in Hepatic High-Energy Metabolism in Galactosamine-induced Acute Hepatic Failure in Rabbits

KENICHI UCHIDA

The First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. TAKAYOSHI TOBE)

Acute hepatic failure was induced in rabbits by an intravenous injection of galactosamine (4.25 mmoles/kg), with a mortality rate of 0% at 6 hr, 9.5% at 12 hr, and 50% at 18 hr. SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, SOCT, and LDH elevated significantly after 12 hr. The hepatic energy charge, calculated as $(ATP + 0.5ADP)/(ATP + ADP + AMP)$, decreased markedly from 0.885 of normal to 0.823 at 6 hr ($p < 0.05$), and to 0.809 at 18 hr ($p < 0.001$) in accordance with the decrease of ATP synthesis in liver mitochondria. The blood ketone body ratio (acetoacetate/ β -hydroxybutyrate), reflecting mitochondrial free $NAD^+/NADH$ ratio, decreased from 0.783 of normal to 0.418 at 12 hr ($p < 0.001$), and to 0.459 at 18 hr ($p < 0.01$) concomitant with the decrease of total ketone body concentrations.

Blood glucose level decreased gradually and hyperinsulinemia was noted after 12 and 18 hr. NEFA level decreased at 6 hr, but did not at 12 and 18 hr compared with controls. Total amino acids concentrations elevated significantly after 12 and 18 hr, especially alanine, proline, and AAA (phenylalanine and tyrosine). By contrast, BCAA (valine, isoleucine, and leucine) elevated slightly, resulting in the decrease of amino acid molar ratio (BCAA/AAA). The molar ratio was closely related to the hepatic energy charge ($r = 0.66$, $p < 0.001$).

Hepatic energy charge was restored by an infusion of glucose solution at 6 hr, but decreased to 0.778 with hyperglycemia at 12 hr.

Key words: Acute hepatic failure, Galactosamine, Liver mitochondria, Energy metabolism, Blood ketone body ratio.

索引語：急性肝不全，ガラクトサミン，肝ミトコンドリア，エネルギー代謝，血中ケトン体比。

Present address: The First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University. 54 Kawara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

These results suggest that glucose is the substrate predominantly utilized in the early stage of acute hepatic failure, by contrast, whereas β -oxidation of fatty acids is predominant in the critical stage when blood ketone body ratio is below 0.5, due to inhibition of glucose utilization, and the inhibition of β -oxidation and ketogenesis in the later stage. In addition, abnormality of serum amino acids in acute hepatic failure is possibly due to the suppressed catabolism of amino acids in liver.

結 言

本邦において、消化器領域における悪性疾患の中で、肝癌の頻度は胃癌について第2位であり、さらに、US, CT などにより small liver cancer の発見が容易となり、肝切除症例は著しく増加してきている。現今、肝癌の肝硬変の合併率が70%であるために、術後の肝不全をおそれて、縮小手術の傾向にあるが、より根治性をえるためにはどうしても、拡大手術が必要である。そのためには肝不全の病態を明らかにするとともにそれに対応した治療対策を確立する必要がある。

我々のグループにおいては肝切除後の代謝動態について、すでに臨床、実験の両面より検索し、その術後管理に Redox 理論を導入してその手術死亡率を著しく低下せしめている。しかし、時に肝切除後に急性肝炎様の症状を呈することがあり、本研究はその類似モデルとして D-galactosamine (以下 Gal) による肝障害を用いた。

Decker 等^{12,18)} が報告したように、D-galactosamine による肝障害は、ヒト・ウィルス肝炎に類似しており、主に uridine triphosphate の欠乏状態を惹起させ RNA 合成を低下させることによっておこるとされる¹⁹⁾。Blitzer⁶⁾ は家兎に適量の Gal を投与した急性肝不全モデルが、障害肝の組織学的及び生化学的所見がヒト症例に類似しており、ヒト症例と同様の臨床経過をたどると報告している。

本研究において、Blitzer のモデルを用いて、細胞内のエネルギー産生機構の主要な役割を果たしているミトコンドリア (以下 Mt) 機能が早期より障害され、それに対応して糖代謝、アミノ酸代謝などに著しい代謝失調が発生することが明らかにされた。

方 法

(I) 急性肝不全モデルの作成

実験動物は雄性日本白色種家兎 (2.0~2.5 kg) を用

いた。実験前2週間にわたって配合飼料 (クレア CR-2) と水で飼育し、実験前夜より15時間の絶食とした。実験施行中も絶食としたが水は自由に摂取させた。肝不全誘起物質として Gal HCl (Sigma 社) を用い、Blitzer⁶⁾ の方法に準じて Gal 4.25 mmol/kg を5%グルコース液にて溶解し、1N NaOH にて pH 6.8 に調整した溶液 10 ml を耳介静脈より2分以上かけて注入した。5%グルコース液 10 ml のみを同様の手技にて注入したものを対照群とした。又、急性肝不全時の耐糖能を調べる目的で、耳介静脈に留置したポリエチレンカニューラより50%グルコース液を持続注入ポンプを用いて 2 ml/kg/hr の速度にて、Gal 注入直後から6時間及び12時間後まで注入するモデルも作成した。種々のパラメーターを測定する為に静脈麻酔 (Isozol 5 mg/kg) を用い、Sampling の時期を Gal 投与前、6時間後、12時間後及び18時間後とした。各 stage での採血時にはいずれも血圧は 70 mmHg 以上に保たれており、循環動態は最後まで比較的良好に維持された。

(II) 測定したパラメーター

(a) 肝組織

肝組織中の adenine nucleotides の測定のために、あらかじめ液体窒素に浸しておいたステンレス圧搾鉗子にて in situ のままで肝左一前葉をはさみとり、液体窒素中にて粉碎したもの (2~3 g) を計量後6%過塩素酸 5 ml 及び EDTA 1 ml を加えて homogenize し、これを 0~4°C、10,000 g にて15分遠沈した。その上清を 69% K₂CO₃ にて pH 6.0 に調整後、再遠沈してその上清を adenine nucleotides の測定に用いた⁴⁾。

Energy Charge (以下 E. C.) は次の公式によった⁴⁾。

$$E. C. = (ATP + 0.5ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

又、同じ上清を用いて肝組織中のケトン体 (アセト酢酸と β -ヒドロキシ酪酸) と乳酸及びピルビン酸を測定した^{24,41,15,11)}。いずれの測定にも酵素学的方法を用い、分光光度計にて測定した。

次に、分離肝 Mt の機能を測定する為に、肝 Mt を

小沢等の方法にて分離調整し、酸素電極法にて酸素消費を測定して呼吸調節能 (State 3 呼吸/State 4 呼吸) 及び酸化的磷酸化能すなわち ATP 生成能 (State 3 呼吸 $\times$ ADP/O) を計算した²⁹⁾。又、同じ肝 Mt を用いて電子伝達系内の呼吸酵素チトクローム a(+a₃) 量を小沢等の方法により測定した³⁰⁾。更に、正常家兔の分離肝 Mt を用いて、その酸化的磷酸化能を Gal 0.0425 μ M を添加して測定することにより、Gal の肝 Mt そのものに対する障害作用を検討した。

(b) 動脈血

血中の種々のパラメーターを測定する為に、肝組織採取と同時に腹部大動脈を穿刺してヘパリン化した注射器にて動脈血を採血した。動脈血中ケトン体、乳酸及びビリルビン酸の測定のために、動脈血 2 ml に 6% 過塩素酸 2 ml を加えて氷はなし 0-4°C, 10,000 g にて 15分遠沈した。その上清を 69% K₂CO₃ にて pH 6.0 に調整後、再遠沈してその上清を測定に用いた。又、動脈血 2 ml に 20% ズルホサリチル酸 0.5 ml を加えて除蛋白した血清を材料として、島津高速液体クロマトグラフ (LC-4A 型) を使用して 18 種類の血清遊離アミノ酸濃度 (Asp, Thr, Ser, Glut, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys, Trp, Arg) を測定した。血糖値の測定にはオルソトルイジン法を用いた¹⁶⁾。血中遊離脂肪酸 (以下 NEFA) の定量は Laurell の方法で測定した²⁰⁾。血中インスリンの定量は immu-

noradioassay 法 (IRI-kit, 栄研) にて測定した。SOCT と血中アンモニア濃度の測定には市販の kit を使用した (和研)。血清中の GOT, GPT, アルカリフォスターゼ, LDH, ビリルビン, アルブミン, BUN 及びクレアチニンの測定には自動分析装置を利用した。

すべての結果は、平均値土標準誤差で示し、有意差の検定には unpaired Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意性ありとした。

成 績

Gal 投与後の各 stage での死亡率は各々、6 時間後 0%, 12 時間後 9.5% 及び 18 時間後 50% であった (表 1)。

一般生化学的肝機能検査の中では、SGOT のみが 6 時間後に早くも正常レベルの約 20 倍に上昇したが、それ以外の SGPT, SOCT, アルカリフォスターゼ, LDH は 6 時間後では対照群と比較して有意の上昇を示さなかった。しかし、12 時間後以降ではいずれの活性値も著明な上昇を示した (図 1)。血中ビリルビン値は軽度の上昇を示したにすぎず、血中アンモニア濃度は 18 時間後になって正常レベルの約 4 倍と有意の上昇を示した。一方、BUN 及びクレアチニン値は経過中に有意の変化を示さなかった (図 2)。血中アルブミン値及びヘマトクリット値は図 3 に示すように、全経過中対照群とも変化はなかった。

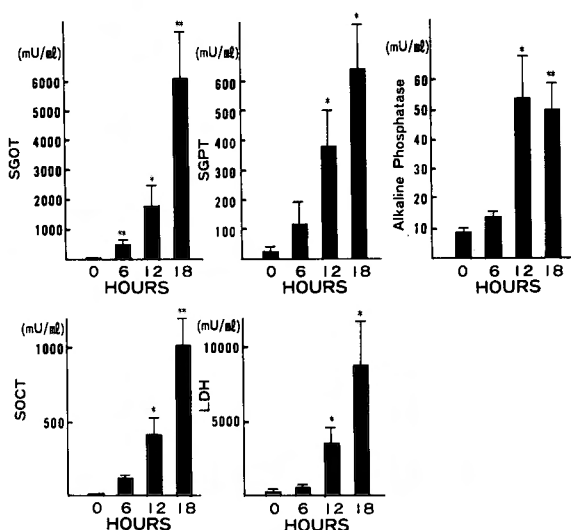


Fig. 1. Changes in the activities of SGOT, SGPT, Alkaline Phosphatase, SOCT and LDH after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with the normal values.

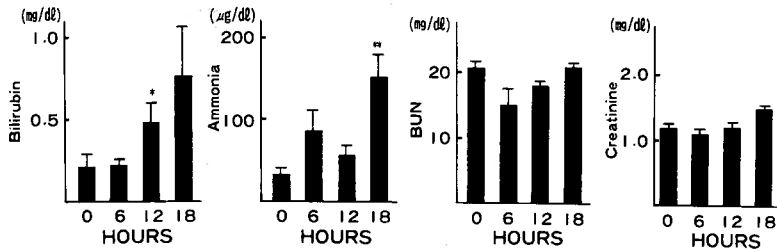


Fig. 2. Changes in the concentrations of total bilirubin, ammonia, BUN, and creatinine in arterial plasma after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.).
* $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, compared with the normal values.

Table 1. Mortality

Hr after injection	No of rabbits of dying (%)
0 - 6	0/28 (0)
- 12	2/21 (9.5)
- 18	7/14 (50)

表2はGal投与後の各stageでの肝adenine nucleotidesの変化を示したものである。肝E.C.はGal投与6時間後には早くも正常レベルの0.885より0.823 ($p < 0.05$)へと低下し、18時間後には0.809 ($p < 0.001$)と更に低下した。肝組織中のATP量は肝E.C.の低下と比例して減少しているが、ADP量やAMP量は対照群とほとんど差がなかった。

分離肝Mtの酸化的磷酸化能はGal投与6時間後7例のうち6例がuncouplingを呈し測定できなかった。残る1例も呼吸調節能が正常レベル 3.82 ± 0.10 より2.15へ、ATP生成能が正常レベル 68.7 ± 3.0 (n mol of

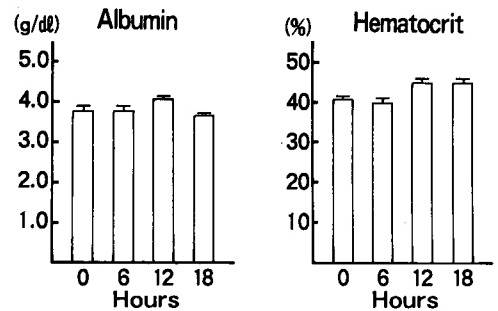


Fig. 3. Changes in the values of serum albumin and hematocrit after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.).

ATP synthesized/mg protein/min)より39.8と低下しており、Gal投与後早期より肝Mtの機能が障害されていることを示した。又、12時間及び18時間後に採取した分離肝Mtはいずれもuncouplingを呈した。図4で示すように肝Mtの電子伝達系内の呼吸酵素チト

Table 2. Changes in the Concentrations of Adenine Nucleotides and the Energy Charge of Rabbit Livers after Galactosamine Injection

	(μ mol/g wet liver)				Energy charge
	ATP	ADP	AMP	Total	
Normal (15 hr-fast) (5)	4.352 $\pm$ 0.180	0.887 $\pm$ 0.148	0.145 $\pm$ 0.022	5.384 $\pm$ 0.172	0.885 $\pm$ 0.009
After the injection					
6 hr (7)	1.897 $\pm$ 0.222 ^c	0.545 $\pm$ 0.075 ^b	0.181 $\pm$ 0.018	2.624 $\pm$ 0.290 ^c	0.823 $\pm$ 0.009 ^a
control (4)	3.949 $\pm$ 0.299	1.037 $\pm$ 0.123	0.293 $\pm$ 0.064	5.097 $\pm$ 0.028	0.868 $\pm$ 0.012
12 hr (7)	2.035 $\pm$ 0.302 ^a	0.665 $\pm$ 0.057	0.134 $\pm$ 0.014	2.834 $\pm$ 0.356 ^c	0.828 $\pm$ 0.010 ^a
control (4)	3.662 $\pm$ 0.520	0.821 $\pm$ 0.044	0.207 $\pm$ 0.044	4.686 $\pm$ 0.564	0.871 $\pm$ 0.014
18 hr (7)	1.255 $\pm$ 0.179 ^c	0.474 $\pm$ 0.058	0.105 $\pm$ 0.017	1.840 $\pm$ 0.230 ^c	0.809 $\pm$ 0.009 ^c
control (4)	3.898 $\pm$ 0.286	0.904 $\pm$ 0.042	0.170 $\pm$ 0.028	4.973 $\pm$ 0.323	0.874 $\pm$ 0.005

Results shown are mean values $\pm$ S.E. with n values in parentheses.

Total=ATP+ADP+AMP; energy charge=ATP+1/2ADP/ATP+ADP+AMP

^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, compared with the values in the control rabbits.

クローム a(+a₃) 量は, 18時間後に有意に減少した (p<0.05). 図5は正常家兎の分離肝 Mt を用いて Gal の Mt 機能に対する直接的影響を示したポラログラフであるが, Gal 添加量の増加につれて呼吸調節能及び ATP 生成能が低下し, 最後には uncoupling 状態となることを示している.

血中ケトン体比 (アセト酢酸/β-ヒドロキシ酪酸) は Gal 投与6時間後では有意の変化を示さず, 12時間後に正常レベル0.783より0.418 (p<0.001) と有意の低下を示した. Gal 投与18時間後には血中ケトン体比が 0.459 (p<0.01) に低下するだけでなく, 血中ケトン体総量 (アセト酢酸+β-ヒドロキシ酪酸) も有意の減少を示していた (p<0.05). 血中ピルビン酸値は経過中軽度の増加を示すにすぎなかったが, 血中乳酸値は Gal 投与12時間後より著増した (p<0.05) (表3). 肝組織中のケトン体, ピルビン酸及び乳酸値の変化を表4に示したが, それぞれの各 stage における変化は表3に示した動脈血中での変化にほぼ一致するものであった. こに血中ケトン体比と肝組織中ケトン体比との間には相関が認められた (図6) (r=0.59, p<0.001).

血糖値は Gal 投与後早期より低下し, 経過とともに更に低値を示すようになった. 血中インスリン値は6時間後では正常レベルであったが, 12時間及び18時間後では 50 μU/ml 以上の高値を示した (p<0.005). 血中 NEFA 値は6時間後に対照群より減少し (p<0.005), 12時間及び18時間後では対照群とほぼ同じような値を示した (図7).

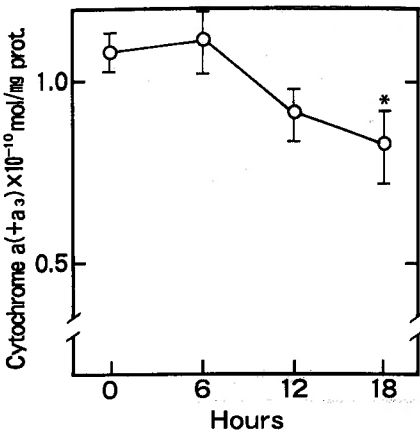


Fig. 4. Changes in the concentrations of cytochrome a(+a₃) after galactosamine injection (mean±S.E.). *p<0.05, compared with the normal values.

図8は血中ケトン体比とインスリン値の相関を示したものであるが, 血中ケトン体比が0.5以下に低下した場合に, インスリン値が15 μU/ml 以上となり高インスリン血症を呈した.

表5は Gal 投与直後より50%糖液を少量持続注入し, 6時間及び12時間後の各 stage での糖投与の効果を示したものである. Gal 投与6時間後では, 糖投与により肝 E. C. は 0.877 と正常レベルまで改善された. 血中ケトン体比は2.167 と急上昇し, ケトン体総量も減少した. 血糖値は糖液持続注入にもかかわらず 98 mg/dl に維持された. 一方, Gal 投与12時間後

Table 3. Changes in the Concentrations of Ketone Bodies, Pyruvate, and Lactate in Arterial Blood after Galactosamine Injection

	(μ mol/ml of whole blood)			AcAc	(μ mol/ml of whole blood)	
	AcAc	B-OHB	Total	B-OHB	Pyruvate	Lactate
Normal (15hr-fast) (5)	0.059±0.007	0.097±0.013	0.156±0.015	0.783±0.072	0.366±0.044	5.990±0.436
After the injection						
6 hr (7)	0.068±0.017	0.122±0.031	0.202±0.045	0.630±0.098	0.359±0.024	6.080±0.787
Control (4)	0.103±0.046	0.122±0.041	0.225±0.087	0.780±0.135	0.456±0.120	5.193±0.758
12 hr (7)	0.072±0.014	0.169±0.023	0.241±0.036	0.418±0.030 ^c	0.255±0.031	7.442±1.136 ^a
Control (4)	0.085±0.024	0.145±0.029	0.230±0.103	0.634±0.048	0.181±0.043	3.415±1.437
18 hr (7)	0.034±0.004 ^a	0.075±0.008	0.109±0.011 ^a	0.459±0.028 ^b	0.376±0.061	10.324±1.465 ^a
Control (4)	0.076±0.029	0.126±0.053	0.202±0.059	0.734±0.149	0.233±0.086	4.474±1.661

Results shown are mean values±S.E. with n values in parentheses.
AcAc=acetoacetate, B-OHB=β-hydroxybutyrate.
^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.001, compared with the values in the control rabbits.

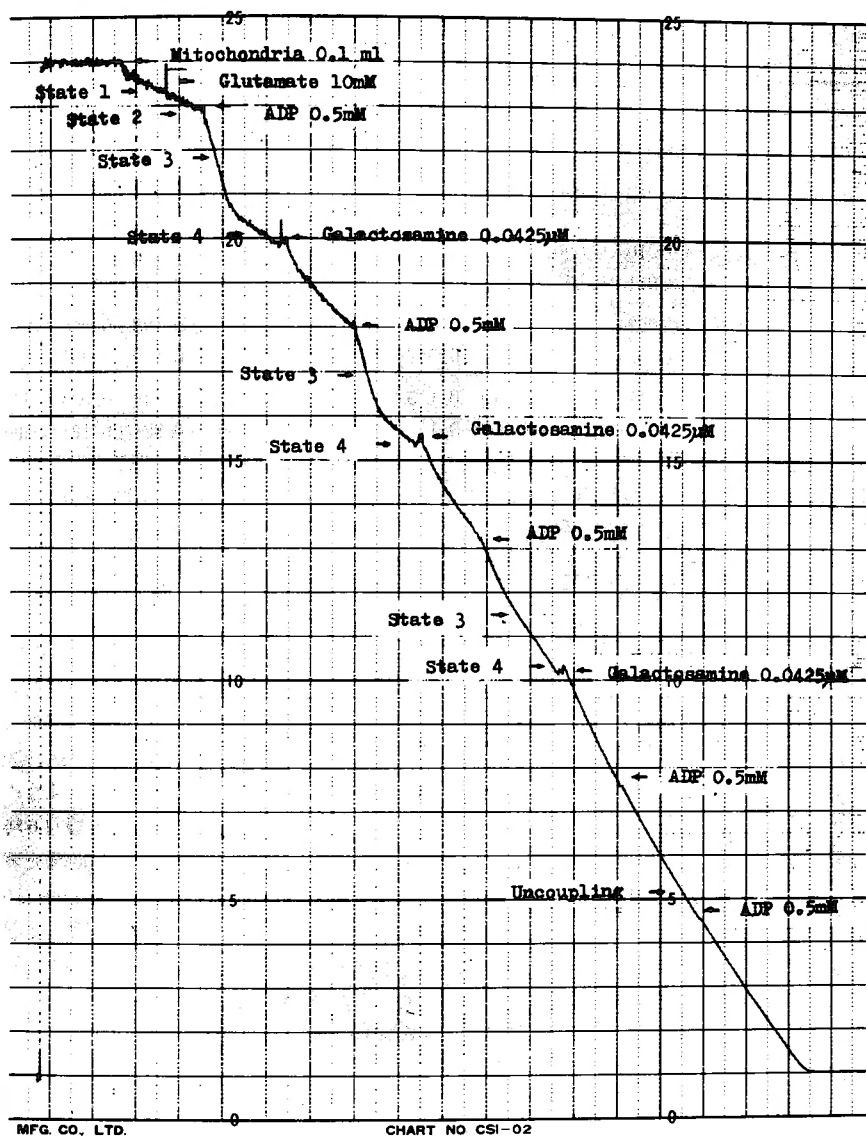


Fig. 5. Effect of galactosamine on oxidative and phosphorylative activity in normal rabbit liver mitochondria, measured polarographically.

では、肝 E.C. は糖投与により 0.778 まで低下し、血中ケトン体比も正常レベルまでには上昇しえなかった。又、血中インスリンは 250 μ U/ml と高値であるにもかかわらず、血糖値は 500 mg/dl 以上の高血糖状態を呈しており、耐糖能が著しく低下していることを示している。

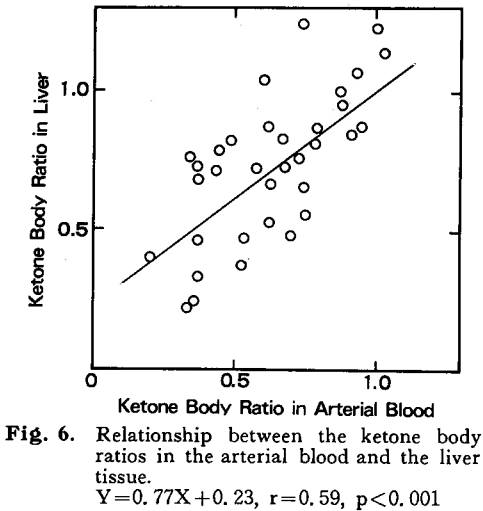
測定した 18 種類の血清遊離アミノ酸の総量は Gal 投与 6 時間後では対照群と変らなかったが、12 時間及び 18 時間後では各々 350%、345% と著明に増加した ($p <$

0.001, $p < 0.001$)。一方、分枝鎖アミノ酸 (BCAA; Valine, Isoleucine, Leucine) と芳香族アミノ酸 (AAA; Phenylalanine, Tyrosine) とのモル濃度比 (BCAA/AAA) は正常群が 3.67 であるのに、Gal 投与 6 時間及び 12 時間後に各々 1.64, 2.50 に低下し、18 時間後では 1.18 と更に低下した (図 9)。Valine, Isoleucine, 及び Leucine は図 10 で示すように、いずれも経過中同じような変化を示した。Gal 投与 6 時間後では対照群より減少し ($p < 0.05$)、正常レベルの約半分まで減少し

Table 4. Changes in the Concentrations of Ketone Bodies, Pyruvate, and Lactate in Rabbit Livers after Galactosamine Injection

	(μ mol/g wet liver)			AcAc	(μ mol/g wet liver)	
	AcAc	B-OHB	Total	B-OHB	Pyruvate	Lactate
Normal (15hr-fast) (5) After the injection	0.256±0.019	0.358±0.034	0.614±0.046	0.756±0.075	0.262±0.025	2.976±0.549
6 hr (6)	0.057±0.010	0.090±0.030	0.147±0.040	0.754±0.173	0.438±0.057	4.041±0.618
Control (4)	0.041±0.011	0.161±0.135	0.202±0.078	0.647±0.027	0.271±0.066	2.652±0.130
12 hr (6)	0.182±0.052	0.306±0.115	0.489±0.165	0.680±0.045 ^a	0.193±0.028	4.310±0.178 ^b
Control (4)	0.173±0.051	0.174±0.042	0.347±0.093	0.986±0.119	0.159±0.051	1.695±0.490
18 hr (7)	0.043±0.011	0.097±0.010	0.139±0.019	0.441±0.108 ^a	0.344±0.084	8.646±1.070 ^a
Control (4)	0.051±0.011	0.108±0.058	0.159±0.070	0.785±0.089	0.384±0.123	3.384±0.840

Results shown are mean±S.E. with n values in parentheses.
AcAc=acetoacetate, B-OHB=β-hydroxybutyrate.
^ap<0.05, ^bp<0.01, compared with the values in the control rabbits.



た。しかし、12時間後には逆に対照群の約2倍にまで増加し、18時間後には減少するものの対照群と比較すると軽度の増加を示している。一方、Phenylalanine及びTyrosineは図11で示すように、Gal投与6時間後では変化せず、12時間後に各々260%、505%と著しく増加し($p<0.001$)、18時間後には355%、630%と更に増加した($p<0.01$)。又、図12で示すようにAlanine及びProlineはAAAと同様にGal投与6時間後では変化せず、12時間後に各々320%、305%と著しく増加した($p<0.001$)。18時間後にはAlanineは520%と更に増加したが、Prolineは310%の増加にとどまった。

肝E.C.とアミノ酸モル比との間には、図13で示したような高い相関々係が認められた($r=0.661$, $p<0.001$)。

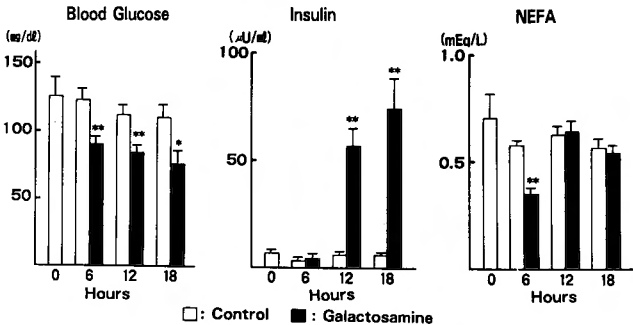


Fig. 7. Changes in blood glucose, plasma insulin, and serum NEFA levels after galactosamine injection (mean±S.E.).
^{*}p<0.01, ^{**}p<0.005, compared with the control values.

Table 5. Effects of Glucose Infusion on Hepatic Adenine Nucleotides, Ketone Body Concentrations in Arterial Blood, Pyruvate and Lactate Level, Blood Sugar Level, NEFA Level, and Plasma Insulin Level after Galactosamine Injection

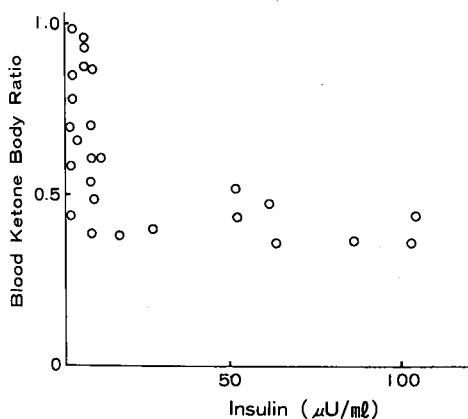
After the injection	(μ mol/g wet liver)				E.C.	(μ mol/ml of whole blood)	
	ATP	ADP	AMP	Total		Pyruvate	Lactate
6 hr (4)	1.643 $\pm$ 0.268	0.365 $\pm$ 0.025	0.068 $\pm$ 0.010	2.076 $\pm$ 0.305	0.877 $\pm$ 0.009	0.269 $\pm$ 0.015	7.787 $\pm$ 0.140
12 hr (4)	0.773 $\pm$ 0.087	0.305 $\pm$ 0.040	0.107 $\pm$ 0.008	1.185 $\pm$ 0.136	0.778 $\pm$ 0.001	0.184 $\pm$ 0.039	7.262 $\pm$ 0.499

	(μ mol/ml of whole blood)			AcAc	(mg/dl)	(μ Eq/L)	(μ U/ml)
	AcAc	B-OHB	Total	B-OHB	Blood Sugar	NEFA	Insulin
6 hr (4)	0.036 $\pm$ 0.001	0.034 $\pm$ 0.012	0.070 $\pm$ 0.012	2.167 $\pm$ 0.866	98 $\pm$ 5	420 $\pm$ 99	89 $\pm$ 13
12 hr (4)	0.031 $\pm$ 0.001	0.050 $\pm$ 0.002	0.081 $\pm$ 0.001	0.641 $\pm$ 0.048	587 $\pm$ 162	425 $\pm$ 5	250 $\pm$ 12

Results shown are mean values $\pm$ S.E. with n values in parentheses.

E.C.=energy charge (ATP+1/2ADP/ATP+ADP+AMP); AcAc=acetoacetate; B-OHB= β -hydroxybutyrate

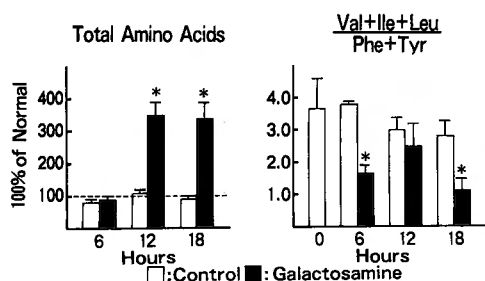
*Rabbits received intravenous administration of glucose solution for 6 hr and 12 hr immediately after galactosamine injection.

**Fig. 8.** Relationship between blood ketone body ratio and plasma insulin level, before and after galactosamine injection.

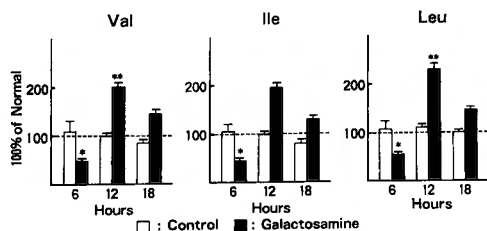
考 案

Gal 投与による急性肝不全家兎モデルの作成は Blitzer 等の方法⁶⁾に準拠したものであるが、本実験での死亡率は彼等の結果よりもやや高く、飼育環境や種属の差によるものと考えられる。しかしながら、血清肝逸脱諸酵素の活性値の著明な上昇は、Gal 投与12時間後より肝壊死を伴う肝障害が著しく亢進する事を示している。

一般に細胞において、そのエネルギー代謝はエネルギー産生反応系と消費反応系との平衡関係により

**Fig. 9.** Changes in the concentrations of serum total amino acids and the amino acid molar ratios (Valine + Isoleucine + Leucine; BCAA / Phenylalanine + Tyrosine; AAA) after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.).

* $p < 0.001$, compared with the control values.

**Fig. 10.** Changes in the concentrations of serum branched chain amino acids (BCAA); Valine, Isoleucine, and Leucine after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with the control values.

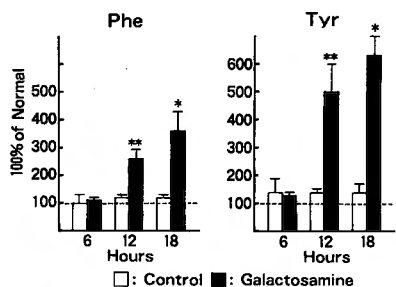


Fig. 11. Changes in the concentrations of serum aromatic amino acids (AAA); Phenylalanine and Tyrosine after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, compared with the control values.

energy pool が規定され、それを一定に保持するように細胞内の種々の反応が調節されている。Atkinson²⁾により提唱された E. C. の概念は細胞内エネルギー状態を最も良く反映する指標であり、個々の細胞が正常な状態にある場合には E. C. は常に 0.85 より 0.90 の間に維持されている。本実験においては、Gal 投与 6 時間後の早期より肝 E. C. は 0.823 に低下し、18 時間後になると肝 E. C. は更に 0.809 まで低下し、死亡率も増加した。全経過中、肝 E. C. の低下に従って肝組織中の ATP 量は減少するにもかかわらず、ADP 量や AMP 量は減少しておらず、肝 E. C. の低下は主に ATP 量の減少によるものと考えられる。実際に、in vitro の実験ではあるが、Gal 投与後早期より分離肝 Mt の酸化的磷酸化能は障害されており^{25, 32)}。又、正常家兎の分離肝 Mt へ Gal を添加する実験により、Gal によって直接的に Mt の酸化的磷酸化能が障害された。しかしながら、Gal 投与後の肝 Mt の酸化的磷酸化能の障害は、Mt の分離調整中に Mt と Gal との直

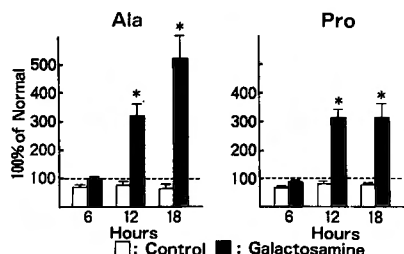


Fig. 12. Changes in the concentrations of serum Alanine and Proline after galactosamine injection (mean $\pm$ S.E.). * $p < 0.001$, compared with the control values.

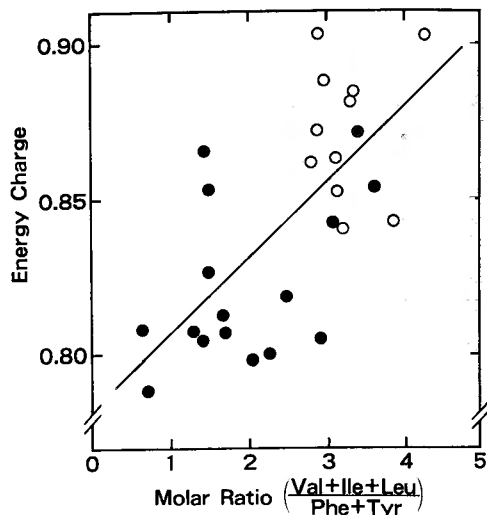
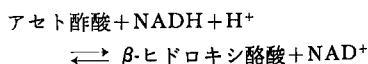


Fig. 13. Relationship between hepatic energy charge (ATP+0.5ADP/ATP+ADP+AMP) and amino acid molar ratio (Valine+Isoleucine+Leucine/Phenylalanine+Tyrosine). Open circle; controls, Closed circle; received galactosamine injection. $Y = 0.024X + 0.783$, $r = 0.661$, $p < 0.001$

接効果による可能性が強く、in vivo では E. C. の低下の度合から uncoupling しているとは考えられない。しかし、Mt 内の電子伝達系成分であるチトクローム $a(+a_3)$ 量も Gal 投与 18 時間後には有意の減少をしており、Gal が肝 Mt のどの部位に作用するのかは明らかでないものの、Gal 投与による肝 Mt の障害が ATP 産生系の抑制をもたらし、肝 E. C. の低下せる主要な原因の一つであることが推察される。

肝 Mt における ATP 産生は電子伝達系における酸化的磷酸化によっているが、これは Mt 内の酸化還元状態と密接に関連しており、実験的にも黄疸肝や肝切除後の残存肝モデルにおいてその高い相関があることを確かめている^{37, 39)}。この Mt 内の酸化還元状態すなわち NAD system の Redox State は $NAD^+/NADH$ 比としてあらわされる⁴²⁾。一方、ケトン体はそのほとんどが肝において生成され⁹⁾、しかも肝 Mt の内膜に局在する β -ヒドロキシ酪酸脱水素酵素は下記の式を触媒する為²¹⁾、肝組織中のケトン体比(アセト酢酸/ β -ヒドロキシ酪酸)は肝 Mt 内の Redox State と比例することが Williamson 等⁴⁰⁾によって明らかにされている。



すなわち

$$\frac{\text{アセト酢酸}}{\beta\text{-ヒドロキシ酪酸}} = \frac{\text{NAD}^+}{\text{NADH}} \times \frac{1}{K}$$

(K: 平衡定数)

しかも、これらのケトン体は肝細胞膜を自由に通過して肝より血中に移行する為、血中ケトン体比は肝 Mt 内の Redox State を良く反映すると考えられる。なかでも、アセト酢酸は末梢組織（主に骨格筋、心、脳等）でエネルギー源として消費される為に、静脈血より動脈血中のケトン体比がよりの確に反映する。実際に本実験においても、図 6 で示したように動脈血中ケトン体比が肝組織中ケトン体比を良く反映することを確かめている。

本実験においては、血中ケトン体比は Gal 投与 6 時間後の早期においてはまだ低下しておらず、肝 Mt 内の Redox State が正常レベルに維持されていることを示していた。しかし、12時間及び18時間後には血中ケトン体比は各々 0.42, 0.46 と 0.5 以下に低下し、肝 Mt 内の Redox State が低下し還元状態に傾いていることを示していた。血中ケトン体比すなわち肝 Mt の Redox State が低下する原因としては、一般に二つの機構が考えられる。第一には、脂肪酸の β 酸化が亢進して、Mt 内に過剰な NADH が蓄積し Redox State が還元状態に傾く場合である⁷⁾。第二には、肝 Mt の電子伝達系が阻害され Mt 内に NADH が蓄積する場合である。この場合には、肝 Mt そのものの障害によるものと、循環動態の不全によっておこる hypotension 及び hypoxia によるものとが考えられる³⁸⁾。しかしながら、本実験における家兎モデルでは肝性昏睡様の症状を呈し死に至る直前までその循環動態は比較的良好に維持されており、hypotension 及び hypoxia による影響は除外して考えることができる。

以上述べたように、in vivo 及び in vitro における肝 Mt を中心とした high-energy metabolism の観点からも、本実験における急性肝不全モデルは次の stage に分類可能であり、糖、脂肪酸及びアミノ酸の肝でのエネルギー代謝動態もこの過程に従って変化するものと推察される。

(I) Early stage.....Gal 投与 6 時間後

肝 E.C. は低下しているが、血中ケトン体比はまだ低下していない。すなわち肝 Mt の ATP 産生は早くも低下しているが、肝 Mt の障害は Mt 内の Redox State を低下させる程には進行しておらず、Redox State は正常レベルに維持されている stage である。

血糖値は減少して軽度の低血糖状態にあるが、一方で NEFA 値も減少している。一般に正常肝の場合、絶食等により糖が不足した場合には糖にかわるエネルギー源として末梢脂肪組織より glucose-fatty acid cycle²⁶⁾ に従って脂肪酸が肝に動員されて β 酸化され、ケトン体を生成するとともに Redox State を低下させる。一方、糖摂取時はグルコース酸化が亢進することにより、NEFA 及びケトン体総量は減少し、容易に Redox State を上昇させ得る。又、同様に末梢組織（特に脳、赤血球等）が必要とする糖が不足した場合には、正常肝においては、主要な糖原性アミノ酸である Alanine が glucose-alanine cycle³⁵⁾ に従って末梢筋組織より肝に動員され、ATP 消費反応系である糖新生により必要な糖を末梢組織に供給する。しかしながら、対照群が正常レベルとほぼ同じ血糖値を保つのに対して、この stage においては肝 E. C. が低下している為に ATP 消費反応系である糖新生が抑制されて低血糖状態になると考えられる。同時に、NEFA 値が減少していることより、糖新生系は抑制されているが解糖系は全く抑制されておらず、むしろ糖を利用したグルコース酸化が亢進していると推察する事ができる。実際に、この stage においては、糖液持続注入により肝 E. C. は改善され、血中ケトン体比は 2.17 と急上昇し、ケトン体総量も減少した。しかも、高濃度の糖液持続注入にもかかわらず、血糖値は 98 mg/dl に維持されている。これらの結果はこの stage においては十分な糖投与が必要であることを示唆している。

血清アミノ酸総量、なかでも Alanine, Proline 及び AAA は変化を示さず、BCAA のみが減少して結果としてアミノ酸モル比を低下させている。これは低血糖状態に対応して、主として筋組織で代謝される BCAA のみが異化作用が亢進し、筋組織でエネルギー源として利用される為と推察される²⁷⁾。

(II) Critical stage.....Gal 投与 12 時間後

肝 E. C. は低下したまま変わらず、血中ケトン体比は 0.42 と 0.5 以下に低下しており、Mt 障害が更に進行して Redox State が還元状態に傾いている stage である。Redox State が低下して NADH が Mt 内に蓄積している為に、ピルビン酸脱水素酵素や TCA cycle 内の NAD-linked の諸酵素（イソシトレート脱水素酵素やマレート脱水素酵素等）の活性が低下して TCA cycle の回転が抑制されるようになり、結果として糖利用によるグルコース酸化が抑制されると考えられる³⁹⁾。この stage より血中乳酸値の著明な上昇がみられ、ピル

ビン酸が TCA cycle に入っていけなくなっていることからグルコース酸化が抑制されていると推察される³⁵⁾。実際に、この stage においては糖液持続注入により肝 E. C. は early stage とは逆に0.778まで低下し、血中ケトン体比も上昇しえなかった。血中インスリンは 250 μ U/ml と高値を示すにもかかわらず、血糖値は 500 mg/dl 以上と著しく増加して高血糖状態を呈すようになり、グルコース酸化が抑制されて耐糖能が著しく低下していることを示している。これらの結果は、血中ケトン体比が0.5以下になるような stage では、過剰な糖投与は障害肝にとってはむしろ負担になることを示唆している。

一方、この stage より高インスリン血症が出現することは大変興味深いことである。今までにも急性肝不全時の高インスリン血症の報告例はあるが、いずれもその現象を指摘するにとどまっている^{10,33)}。Early stage よりも更に低血糖状態にあるので脾よりのインスリン分泌が亢進したためとは考えられず、Gal 投与による脾組織への障害作用も報告されていない。図9で示したように、肝 Mt の障害が進行して血中ケトン体比が0.5以下に低下した場合に高インスリン血症が出現することより、この高インスリン血症は肝でのインスリンの binding や degradation の減少によっておきるものと推察される。インスリンの肝での binding や degradation が肝細胞内の ATP 量に依存するとした Draznin¹³⁾ の報告とも一致するものである。又、この stage ではケトン体総量や NEFA は対照群と比較して差がないものの、early stage と比較すると NEFA はむしろ増加している。一般に正常肝においては、インスリンは脂肪組織での antilipolytic 作用により、脂肪酸の肝への動員を抑制しケトン総量と NEFA を減少させる働きをする²²⁾。それに反して、この stage では高インスリン血症を呈するにもかかわらず、ケトン体総量や NEFA は減少していない。この現象を説明するには、Black⁹⁾が報告したように Gal 投与により lipoprotein lipase や hepatic lipase の活性が低下した為とも考えられるし、インスリンだけでなくグルカゴンや生長ホルモン等の他のホルモンとの相互作用によっておきる急性肝不全を特徴づける病態の一つであるともいえる。一方、エネルギー代謝の観点より次のように説明することができる。すなわち、糖を利用したグルコース酸化が著しく抑制されたこの stage の肝 E. C. を維持する為に、エネルギー効率の良い脂肪酸の β 酸化が亢進していると考えらることで

ある。ホルモン相互のどのような作用によるのかは明らかでないが、この stage において脂肪酸の β 酸化が亢進していると考えすることは、肝 Mt の障害が early stage より進行しているにもかかわらず肝 E. C. や肝組織中の ATP 量が early stage と比較してやや増加こそすれ減少はしていない結果や、NEFA が early stage よりむしろ増加している結果を説明できる。実験的にも肝切除後の残存肝において、このように血中ケトン体比が0.5以下に低下する場合には脂肪酸の β 酸化はグルコース酸化のように抑制されず、むしろ代償性に亢進していることを確かめている²⁸⁾。同時に、この stage における Redox State の低下の原因として、肝 Mt 障害の進行によるものの他に、脂肪酸の β 酸化の亢進による Mt 内の NADH の蓄積も一部関与しているものと推察される。

一方、この stage においてはアミノ酸はいずれも増加しており、血清アミノ酸総量は正常レベルの約350%まで著増する。しかも、BCAA に比較して AAA の増加は著しく、結果としてアミノ酸モル比は低下しており、early stage におけるアミノ酸モル比の低下とは対照的であった。BCAA は筋組織で代謝されるのに対して、Alanine, Proline 及び AAA は主に肝で代謝されるアミノ酸である。AAA である Phenylalanine や Tyrosine は共に、アセトアセチル CoA よりアセチル CoA、又はフマル酸に変換されて TCA cycle に入るアミノ酸であるが、Redox State が低下して TCA cycle の回転が抑制されているので TCA cycle に入らずに肝での代謝が阻害される為、筋組織で有効に代謝される BCAA と比較して血清中に著しく増加するものと考えられる³¹⁾。Alanine は低血糖状態に対応して糖新生に利用されるべく筋組織より肝に動員されいると考えられる。しかしながら、Alanine はピルビン酸に変換されて糖新生系に入るアミノ酸であり、肝 E. C. が低下して ATP 消費反応系である糖新生が抑制されているだけでなく、Redox State が低下してピルベートカルボキシラーゼの活性を低下せしめ糖新生系への抑制が更に加わり¹⁷⁾、ピルビン酸脱水素酵素の活性も低下している為に肝での代謝が阻害され、血清 Alanine 濃度の増加をきたすものと考えられる。又、Cerra 等⁸⁾によりショック等における代謝失調の有意義な示標であるとされる Proline は、 Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate より glutamate となり α -ケトグルタル酸に変換されて TCA cycle に入るアミノ酸であり、AAA や Alanine と同様に Redox State の低下により

肝での代謝が阻害され血清濃度の増加をきたすものと考えられる。

(III) Terminal stage……Gal 投与18時間後

肝 E. C. は0.809と更に低下し、血中ケトン体比も0.46と0.5以下であり、死亡率は50%に達する。血糖値は著しく低下し、出血傾向や肝性昏睡様症状を呈するものも出現するようになる。肝も広範な肝壊死や脂肪沈着を伴うようになり、肝 Mt の障害は更に著明となる stage である。肝 E. C. が代償性に維持されずに critical stage よりも更に低下することや、脂肪酸の β 酸化によって産生されるケトン体の総量が有意に減少することなどより、この stage においてはグルコース酸化の抑制に加えて、代償性に亢進していた脂肪酸の β 酸化も抑制されるようになり、肝エネルギー代謝の観点からも非代償期に入ったものと推察される。又、この stage における Redox State の低下は主として肝 Mt そのものの障害によっておきるものと推察できる。

一方、血清アミノ酸総量は約345%の増加であり critical stage と比較して変化はなかった。しかしながら、Alanine や AAA は更に増加するのに対して、BCAA は対照群よりやや増加している程度にまで減少する。その結果として、アミノ酸モル比は1.2にまで低下するようになる。これらのアミノ酸パターンの異常は、肝硬変などの慢性肝不全の増悪時にみられるものとは違った急性肝不全時に特有なものだといえる³⁰。血清アルブミン値がこの stage においても低下していないこと、血中ケトン体比が低下した時点で特有なアミノ酸パターン異常が出現すること、及び図13で示したように肝 E. C. が低下するに従ってアミノ酸モル比が低下することなどより、急性肝不全時のアミノ酸パターンの異常は、筋蛋白分解作用によっておこるよりも、肝壊死による肝よりの大量のアミノ酸放出があり²³、肝 Mt 障害が経時的に進行して Redox State が低下する為に肝で代謝されるアミノ酸の肝での処理ができなくなっておくるものと推察できる。

結 語

Gal 投与による急性肝不全家兎モデルを作成し、肝エネルギー代謝失調の経過を検討して次の結論を得た。

- (1) 早期においては、肝 E. C. は低下するものの血中ケトン体比は正常であり、グルコース酸化は亢進しており十分な糖投与により肝 E. C. は回復する。
- (2) 更に肝障害が進行すると、血中ケトン体比は0.5以下に低下し、グルコース酸化及び糖新生は抑制され、

代償性に脂肪酸の β 酸化が亢進する。過量の糖投与は障害肝にとって負担となる。

- (3) 終末期には、脂肪酸の β 酸化及びケトン体産生も抑制されるようになり、肝 E. C. は更に低下してエネルギー代謝の面からも非代償期に入る。
- (4) 血中ケトン体比が0.5以下の場合に、高インスリン血症が出現する。
- (5) 血中ケトン体比が0.5以下になると、血清アミノ酸総量は増加する。BCAA に比べて AAA, Alanine, Proline の増加は著しくアミノ酸モル比は低下する。肝 E. C. とアミノ酸モル比は高い相関を示す。従って、アミノ酸パターン異常はアミノ酸の肝での代謝障害が主たる原因と考えられる。
- (6) 急性肝不全の病態を把握するうえで、血中ケトン体比は有意義な示標となりえる。

稿を終るにあたり、終始御指導を賜った戸部隆吉教授および直接御教授、御指導いただいた小沢和恵助教授に感謝いたします。また、御助力をいただいた本学外科第五研究室の諸兄および辻本嬢に心より感謝いたします。

References

- 1) Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. *Biochemistry* **7**: 4030-4034, 1966.
- 2) Atkinson DE: Enzymes as control elements in metabolic regulation. In: *The enzymes*, New York, Academic Press, pp 461-489, 1970.
- 3) Batenburg TJ, Olson MS: Regulation of pyruvate dehydrogenase by fatty acid in isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **251**: 1364-1370, 1976.
- 4) Bergmeyer HV (editor): In: *Methods of Enzymatic Analysis*, New York, Academic Press, ATP pp 543, ADP and AMP pp 573, 1965.
- 5) Black DD, Freeman MR, et al: Lipoprotein lipase and hepatic lipase deficiencies associated with impaired chylomicron clearance in D-(+)galactosamine hepatitis. *Metabolism* **31**: 620-626, 1982.
- 6) Blitzer BL, Waggoner JG, et al: A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* **74**: 664-671, 1978.
- 7) Cardozo ML, Bergh SG: Ketogenesis in isolated rat liver mitochondria. Relationships with the citric acid cycle and the mitochondrial energy state. *Biochim Biophys Acta* **283**: 1-15, 1972.
- 8) Cerra FB, Caprioli J, et al: Proline metabolism in sepsis, cirrhosis and general surgery. The peripheral energy deficit. *Ann Surg* **190**: 577-586, 1979.

- 9) Chapman MJ, Miller LR, et al: Localization of the enzymes of ketogenesis in rat liver mitochondria. *J Cell Biol* **58**: 284-306, 1973.
- 10) Chupin M, Charbonnel B, et al: Glucose tolerance in viral hepatitis. A study of twenty patients during the acute phase and after recovery. *Diabetes* **27**: 661-669, 1978.
- 11) Czok R, Lamprecht AW: Pyruvate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, pp 1464-1468, 1974.
- 12) Decker K, Keppler D: Galactosamine induced liver injury. In: *Progress in Liver Diseases*. New York, Grune & Stratton, pp 183-196 vol 4, 1972.
- 13) Draznin B, Solomons CC, et al: Decreased insulin binding and degradation associated with depressed intracellular ATP content. *Diabetes* **29**: 221-226, 1980.
- 14) Fisher JE, Funovics JM, et al: The role plasma amino acids in hepatic encephalopathy. *Surgery* **78**: 276-290, 1975.
- 15) Gutmann I, Wahlefeld AW: Lactate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, pp 1464-1468, 1974.
- 16) Hultmann E: Rapid specific method for determination of aldosesaccharide in body fluids. *Nature* **183**: 108-109, 1963.
- 17) Irie R, Kono Y, et al: Impaired glucose tolerance related to changes in the energy metabolism of the remnant liver after major hepatic resection. *J Lab Clin Med* **101**: 692-698, 1983.
- 18) Keppler D, Pausch J, et al: Selective uridine triphosphate deficiency induced by D-galactosamine in liver and reversed by pyrimidine nucleotide precursors. *J Biol Chem* **249**: 211-216, 1974.
- 19) Konishi Y, Shinozuka H, et al: The inhibition of rat liver nuclear ribonucleic acid synthesis by galactosamine and its reversal by uridine. *Lab Invest* **30**: 751-756, 1974.
- 20) Laurell S, Tibbling G: Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma. *Clin Chim Acta* **16**: 57, 1967.
- 21) Lehninger AL, et al: D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase of mitochondria. *J Biol Chem* **235**: 2450-2455, 1968.
- 22) McGarry JD, Foster DW: Ketogenesis and its regulation. *Am J Med* **61**: 9-13, 1976.
- 23) Mazzioti A, Bernardi M: Plasma amino acid patterns in experimental acute hepatic failure. *Surgery* **90**: 527-534, 1981.
- 24) Mellanby J, Williamson DH: Acetoacetate. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press, pp 1840-1843, 1974.
- 25) Miyahara M, Enzan H, et al: Mitochondrial damage in galactosamine-induced liver intoxication in rats. *Biochem Biophys Acta* **714**: 505-515, 1982.
- 26) Newsholme EA, Start C. (訳, 中沢 淳, 森 正敬): 動物の代謝調節. pp 312-350, 講談社, 1977.
- 27) Morgan MY, Milson JP, et al: Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* **19**: 1068-1078, 1978.
- 28) Nakatani T, Ozawa K, et al: Differences in predominant energy substrate in relation to the resected hepatic mass in the phases immediately after hepatectomy. *J Lab Clin Med* **97**: 887-898, 1981.
- 29) Ozawa K, Takasaka H, et al: Effect of ligation of portal vein on liver mitochondrial metabolism. *J Biochem* **70**: 755-764, 1971.
- 30) Ozawa K, Kitamura O, et al: Human liver mitochondria. *Clin Chim Acta* **38**: 385-393, 1972.
- 31) Ozawa K, Kamiyama K, et al: Contribution of the arterial blood ketone body ratio to elevated plasma amino acids in hepatic encephalopathy of surgical patients. *Am J Surg* **146**: 299-305, 1983.
- 32) Rasnack J, Koch HK, et al: Hepatotoxicity of D-galactosamine in the isolated perfused rat liver. *Exp Mol Pathol* **32**: 264-275, 1980.
- 33) Record CO, Alberti KGMM, et al: Glucose tolerance and metabolic changes in human viral hepatitis. *Clin Sci Mol Med* **45**: 677-690, 1973.
- 34) Rosen HM, Yoshimura N, et al: Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology. *Gastroenterology* **72**: 483-487, 1977.
- 35) Royle GT, Kettlewell MGW: Alanine metabolism in patients with chronic infection. *Br J Surg* **68**: 55-58, 1981.
- 36) Stubbs M, Veech RL, et al: Control of the redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm. *Biochem J* **126**: 59-65, 1974.
- 37) Tanaka J, Ozawa K, et al: Significance of blood ketone body ratio as an indicator of hepatic cellular energy status in jaundiced rabbits. *Gastroenterology* **76**: 691-696, 1979.
- 38) Ukikusa M, Ida T, et al: The influence of hypoxia and hemorrhage upon adenylate energy charge and bile flow. *Surg Gynecol Obstet* **149**: 346-352, 1979.
- 39) Ukikusa M, Ozawa K, et al: Changes in blood ketone body ratio. Their significance after major hepatic resection. *Arch Surg* **116**: 781-785, 1981.
- 40) Williamson DH, Lund P, et al: The redox state

- of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* **103**: 514-526, 1967.
- 41) Williamson DH, Mellanby J: Beta-hydroxybutyrate. In: *Methods of Analysis*. New York. Academic Press, pp 1836-1839, 1974.
- 42) Wojtczak AB: Control of acetoacetate and β -hydroxybutyrate production in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **31**: 634-640, 1968.