

氏 名 あ べ のぶ ひこ
阿 部 信 彦

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 3 6 年 3 月 2 4 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 才 5 条 才 1 項

研 究 科 ， 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
内 科 学 系

学 位 論 文 題 目 アルコール習慣ラットの各種臓器における
脱水素酵素活性について

指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 石 橋 俊 実

論 文 審 査 委 員 東 北 大 学 教 授 石 橋 俊 実

東 北 大 学 教 授 菊 地 吾 郎

東 北 大 学 教 授 本 川 弘 一

論文内容要旨

緒 言

習慣的なアルコールの摂取によりアルコール耐性が生ずる事は、経験的にも実験的にも一般に認められている。この様なアルコール耐性は、慢性アルコール中毒の発病の身体的背景として大きな意義を持つと思われる、アルコール耐性の成因を研究する事は薬理学的、生化学的興味だけでなく臨床的に重要な問題である。

以上の見地から著者は長期間に亘つてアルコールを投与した実験動物を用い、これによつておこる各種臓器の脱水素酵素活性の変化を観察した。又アルコール基質における肝及び脳の酸素消費を Warburg 検圧計で測定し、更にアルコール基質における電気刺激時の脳の代謝活性の変化を観察した。ついでこの様なアルコール運用による実験動物の脳、肝などの病理組織学的変化を検索し、最後に実験結果について考察を加えた。

実 験

実験 I, アルコール運用によるラットの各種臓器の脱水素酵素活性値の変化

1 実験動物及びアルコール投与量

実験動物としては雑種ラットを用い、アルコール投与群（以下アルコールラットと呼ぶ）には生後間もなくから 5% エタノールを水の代りに飲用させた。成熟時におけるアルコール飲用量は 1 日 1 匹当たり 10 ml 程度であり、ラットの体重 250g とするとエタノール 1 日 2.0g/体重 kg を投与した事になり、これは体重 60 kg の人が毎日アルコール 15% の清酒を 4.4 合飲用した事に相当する。飼料は鶯鷄用混合飼料を主とし、適宜野菜も与えた。この様にして約 1 年間飼育したが病死したものはなく、ほぼ正常の発育と繁殖をしめした。

対照としての体重 150~200g のラット（雑種）を同様飼料と水をもつて飼育して用いた。アルコールラット、対照ラット共に雌雄の別なく実験に用いたが性別による実験結果の差はなかつた。

2) 脱水素酵素活性の測定

Thunberg 管を用い、Neotetrazolium chloride の還元量をもつて脱水素酵素活性値を表わした。

反応系は、主室に pH 7.4 の磷酸緩衝液：1 ml, 同液による各種臓器の 20~50 倍ホモジネート：1 ml, 0.001モルの KCN：1 ml, 純 D.P.N(Diphospho-Pyridine Nucleotide) 0.3^{mg}/ml：0.5~1.0 ml (コハク酸脱水素酵素以外の測定の場合) を入れ、側室は 0.001モルの Neotetrazolium chloride：1 ml, 0.1モルの基質溶液（コハク酸、乳酸、グルタミン酸、リンゴ酸の各 Na 塩及びエタノール）：1 ml を入れる。

全反応系を加えて密栓し、真空ポンプで排気の後 37°C の恒温槽で 10 分間温度平衡の後 Thunberg 管を傾けて反応を開始させ 5~20 分反応の後 1/10 容のトリクロール醋酸 (20%) を加えて反応を停止させる。この様にして得られた diformazan を 5 ml の醋酸エチルで振盪抽出し、日立分光光度計で波長 520 m μ における吸収を測定した。盲検には煮沸不活性化した酵素液を用い、又基質の代りに蒸留水を入れものを対照に用いた。コハク酸基質の場合マロン酸を阻害剤

に用いた。

以上の方法で正常対照ラット、アルコールラットの大脳皮質、肝、腎及び心筋の各組織のコハク酸、乳酸、グルタミン酸、リンゴ酸及びアルコール脱水素酵素活性を測定した。

3. 実験結果

a コハク酸脱水素酵素活性値

酵素液として大脳皮質の20倍ホモジネート、肝、腎、心筋の50倍ホモジネートを用いた。反応時間は5分。結果は第1表に示すが値は還元されたdiformazanのミリモル数である。正常ラットで、本酵素活性は心筋、腎、肝、大脳皮質の順に強く、この傾向はアルコールラットでも同様である。表の様

表1. コハク酸脱水素酵素活性値

	正常ラット群			アルコールラット群			検 定	
	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	t	α
ホモジネート								
大脳皮質 20倍	5	0.25	0.035	6	0.37	0.032	5.7	$0.001 > \alpha$
肝 臓 50倍	6	0.24	0.074	6	0.31	0.028	2.21	$0.1 > \alpha > 0.05$
腎 臓 50倍	5	0.36	0.071	6	0.50	0.041	4.04	$0.01 > \alpha > 0.001$
心 臓 50倍	5	0.74	0.088	6	0.84	0.092	1.82	$0.2 > \alpha > 0.1$

に後者において各臓器ともに酵素活性増加がみられも分布検定法でアルコールラットの大脳皮質、腎において正常対照に比し有意の酵素活性増加をみた。

b 乳酸脱水素酵素活性値

酵素液濃度及び反応時間はa、の場合と同様、第2表に結果を示すが、アルコールラットの大脳皮質、肝において正常対照に比し有意の酵素活性増加をみた。

表2. 乳酸脱水素酵素活性値

	正常ラット群			アルコールラット群			検 定	
	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	t	α
ホモジネート								
大脳皮質 20倍	5	0.11	0.019	4	0.18	0.018	5.62	$0.001 > \alpha$
肝 臓 50倍	5	0.08	0.009	4	0.13	0.019	5.16	$0.01 > \alpha > 0.001$
腎 臓 50倍	5	0.62	0.115	3	0.53	0.073	1.20	$0.5 > \alpha > 0.2$
心 臓 50倍	4	0.30	0.025	3	0.30	0.063		

c グルタミン酸脱水素酵素活性値

酵素液の濃度は前二者と同様、反応時間を7分とした。第3表の様にアルコールラットの大脳皮質、肝及び心筋において正常対照に比し有意の酵素活性増加をみた。

表3. グルタミン酸脱水素酵素活性値

	正常ラット群			アルコールラット群			検 定	
	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	t	α
ホモジネート								
大脳皮質 20倍	3	0.11	0.013	4	0.19	0.041	3.19	$0.05 > \alpha > 0.02$
肝 臓 50倍	3	0.07	0.022	4	0.16	0.022	5.36	$0.01 > \alpha > 0.001$
腎 臓 50倍	3	0.27	0.046	3	0.24	0.046	0.80	$0.5 > \alpha > 0.2$
心 臓 50倍	3	0.06	0.011	3	0.20	0.042	5.59	$0.001 > \alpha > 0.001$

d リンゴ酸脱水素酵素活性値

本酵素の活性は各臓器とも低いので20倍ホモジネートを用い、反応時間も20分とした。第4表の様に大脳皮質と腎においてアルコールラットは対照に比し、有意の酵素活性増加がみら

れた。

表 4. リンゴ酸脱水素酵素活性値

	正常ラット群			アルコール・ラット群			検 定	
	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	t	α
ホモジネート								
大脳皮質 20 倍	3	0.02	0.003	3	0.13	0.008	2.24	$0.001 > \alpha$
肝 臓 20 倍	3	0.15	0.025	5	0.20	0.031	2.35	$0.1 > \alpha > 0.05$
腎 臓 20 倍	3	0.10	0.005	4	0.23	0.045	4.87	$0.01 > \alpha > 0.001$
心 臓 20 倍	3	0.14	0.010	5	0.12	0.048	0.69	$\alpha > 0.5$

e アルコール脱水素酵素活性値

酵素液は各臓器とも 20 倍、反応時間は 10 分である。正常ラットの酵素活性は腎、肝、心筋、脳の順に強く、アルコールラットでは各臓器とともに酵素活性の増加がみられ、大脳皮質、肝において有意の酵素活性の増加がみられた。

表 5 アルコール脱水素酵素活性値

	正常ラット群			アルコール・ラット群			検 定	
	例数	平均値	標準偏差	例数	平均値	標準偏差	t	α
ホモジネート								
大脳皮質 20 倍	6	0.11	0.016	5	0.15	0.034	2.59	$0.05 > \alpha > 0.02$
肝 臓 20 倍	6	0.20	0.010	4	0.45	0.062	9.96	$0.001 > \alpha$
腎 臓 20 倍	6	0.33	0.060	4	0.39	0.066	1.5	$0.2 > \alpha > 0.1$
心 筋 20 倍	6	0.16	0.042	4	0.23	0.063	2.02	$0.1 > \alpha > 0.05$

以上、長期に亘るアルコールの摂取によりラットの大脳皮質、肝、腎、心筋などの各種脱水素酵素活性は一般に増加の傾向を示し、特に大脳皮質、肝で著しい。

実験 II アルコールラットにおける肝、大脳皮質切片のアルコール酸化

1. 実験動物及び方法

実験動物及びアルコール投与量は実験 I と同じ。動物の肝及び大脳皮質切片のアルコール基質における酸素消費を Warburg 検圧計を用い測定した。切片作成は常法通り、湿重量 70 mg を用い、反応液の組成は主室に Krebs-Ringer-Phosphate 緩衝液 2.5 ml, 2.40 mM エタノール 0.5 ml, (終末濃度は 3.4 mM とする) 0.3 mg/ml 純 DPN 0.5 ml で全量 3.5 ml である。副室には 10% KOH 0.2 ml を濾紙片にしみこませて入れた。

断頭から振盪開始まで 30 分以内、恒温槽は 37.5°C 振盪回数 12 回/分、気相は 100% O₂ で振盪後 10 分間空振、以後 10 分毎に測定、全測定時間は 1 時間半とした。又 incubate 中 30 分目から 1 時間に亘り電気刺激を行った。条件は尖頭電圧 18V、時定数 0.4 msec、周波数 100 サイクルのコンデンサー刺激であつた。

2. 実験結果

以下、a, b とも 30 分~90 分 incubate 値をもつて結果を示した。(正常及びアルコールラット各 4 匹の実験結果の平均値)

a 静止呼吸における酸素消費

大脳皮質切片における酸素消費は正常動物では 75.6 $\mu\text{M/g r/hr}$ 、であり、アルコールラットでは 81.8 $\mu\text{M/g r/hr}$ である。後者においてやや酸素消費の増加がみられたが有意の差ではない。

肝切片の酸素消費は正常ラットでは 123.8 $\mu\text{M/g r/hr}$ 、アルコールラットでは 138.2 $\mu\text{M/g r/hr}$

/hrであり後者の酸素消費量は10% 強の増加を示し、推計学的に僅かに有意とみなされた。

b 電気刺激時における酸素消費

電気刺激時の正常ラットの大脳皮質の酸素消費は $87.7 \mu\text{M}/\text{gr}/\text{hr}$ であり、静止系の酸素消費 $75.6 \mu\text{M}/\text{gr}/\text{hr}$ に比し著明な差はない。アルコールラットでは刺激時の酸素消費は $92.4 \mu\text{M}/\text{gr}/\text{hr}$ であり、静止呼吸の酸素消費 $81.8 \mu\text{M}/\text{gr}/\text{hr}$ に比し著明な差はない。正常一、アルコールラットいづれの場合も刺激時の酸素消費が10%程増加している様に見えるが、これは基質なしの場合にも見られる事であり、電気刺激によつて両群の酸素消費の差を増幅する事は出来なかつた。

実験Ⅵ アルコールラットの病理組織学的検索

肉眼的に正常対照ラットに比べて特別異常な所見はみられなかつた。

顕微鏡的に脳は軟膜に異常なく、神経細胞は一般によく保たれ、各皮質、アンモン角、間脳諸核など殆んど脱落変性を認めない。壊死、軟化巣はなく血管系統も変化なく、細胞浸潤、グリアの異常も認められない。

肝臓は肝細胞はほぼ正常のまま保たれ、配列の乱れもなくグリソン氏鞘、中心静脈の関係も正常である。しかしズダンⅥ染色で対照に比しやゝ肝細胞内の脂肪沈着が多い様に見られるが、病的とは言ひ難い。

腎臓、心臓は殆んど異常所見を認めない。

以上の様にアルコールラットには対照ラットに比べて有意の病理組織学的変化はみられない。

考 察

コハク酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素及びグルタミン酸脱水素酵素はT.C.Aサイクル及びこれに相接する代謝反応のCatalyserであり、細胞呼吸に重要な役割を演じていると思われる。これら各酵素のアルコール運用による影響については、今迄知られていなかった。アルコールの生体に及ぼす主な作用は麻醉作用であるから、一応麻醉薬と同様の影響が考えられるが、長期に亘つて少量の麻醉薬を投与した場合の脱水素酵素作用の変化についての報告はみられない。或る種の疾患において血清又髄液の乳酸脱水素酵素活性が増加するとか、血清リンゴ酸脱水素酵素活性が増加するとか、又フェノチアゼン系薬物で脳、肝のコハク酸脱水素酵素活性が抑制されると言われ、モルセネの投与で脳のグルタミン酸脱水素酵素活性が減少し、眠剤、抗痙攣剤で肝のグルタミン酸脱水素酵素活性が抑制される等と言われている。

長期のアルコール摂取により心臓、肝臓の機能に変化を生じ、これによつて血清乳酸、リンゴ酸脱水素酵素が高まる事も考えられるが、本実験で病理組織学的所見から心、肝、腎などの機能障害があつたとは考えられない。

アルコール脱水素酵素は1910年Battelli, Stern が種々の動物の肝、腎にアルコールを酸化する酵素がある事を発見し、人の肝のアルコール酸化はアルコール慣用によつて高められているのであらうと想定したが、否定的な結果を得た。同年Sieber - Schumowaは少量のアルコールの頻回投与によりアルコール酸化酵素は活性を増し、大量では逆である事を見ている。其の後多くの研究により、アルコールの酸化は主としてアルコール脱水素酵素によること、主なる酸化の場所は肝臓である事がわかり、アルコール耐性と肝臓のアルコール脱水素酵素活性との関係が興味をもつて論じられて来た。Newman, Loomis等はアルコール耐性動物の血中アルコール濃度は対照よりも早く低下する事がないとして、アルコール耐性とアルコール酸化促進との関係を否定しているが、MizusawaはThunberg法でアルコール耐性動物(ラット)の肝のメチレン・ブルー還元が早い事を見出した。

飯田はアルコール習慣家兎の肝・血球のアルコール酸化の増加をみているが、増加の程度は血球で2.4倍、肝では僅かであると言う。然し血球のアルコール酸化は生体内のアルコール酸化の極く一部を担うにすぎない。

以上の様にアルコール耐性とアルコール酸化能の亢進との関係は明らかでないが、枝の言う様にアルコール習慣による体内アルコール分布の変化と相まつて、肝におけるアルコール脱水素酵素活性の増加がアルコール耐性の身体的背景の一つをなす事は想像にかたくない。

アルコール耐性の形成を中枢神経系のアルコールに対する抵抗の増加として考える事も出来るが、こゝにおいてもアルコール分配の減少と相まつてアルコールの酸化が高まつている事が、アルコールに対する抵抗の強さとして現われると考える事も可能である。生体におけるアルコール酸化の大部分は肝臓で行われるが、実験Ⅱからもわかる様に脳組織もアルコールを酸化し得る。然しこれによつて正常な脳機能を維持する事は出来ず、脳の主要な栄養源であるグルコースにとつて代る事は出来ない。

電気刺激、K刺激などに対して代謝応答を与え得る基質は、ブドウ糖、果糖・マンノース、乳酸、焦性ブドウ酸などであり（但し電気刺激に対する代謝応答は其他のT・Aサイクルに属する有機酸を基質としても得られる）、エタノールを基質とした実験Ⅱの条件では電気刺激に対する応答のなかつたのは当然である。たゞ静止呼吸における肝（及び脳でも）のアルコール酸化が正常対照よりも増加している事は、アルコールに対する耐性を説明するものと考えられる。

実験Ⅲの肝細胞内の脂肪沈着は、アルコール摂取により生ずるものと考えられるので吟味する必要がある。

結 論

長期に亘りアルコールを投与した実験動物の各種臓器における種々の脱水素酵素活性の増加、又肝及び脳切片のアルコール基質における呼吸増加は、アルコールの習慣的投与により引き起されたアルコール耐性の表現と考えられる事を論じた。

審 査 結 果 要 旨

慢性アルコール中毒の生物学的特徴を知る為に長期(約1年)に亘つてアルコールを投与(5%エタノール1日約10cc)した“アルコールラット”と正常ラットの脳皮質、肝臓、腎臓、心筋の各種脱水素酵素活性を測定した。実験方法はThunberg管を用いNeo-tetrazolium法によつた。即ち緩衝液としてpH7.4の磷酸塩緩衝液、酵素液として20~50倍の脳皮質、肝臓、腎臓、心筋のホモジネート、基質は0.1モルのコハク酸、乳酸、リンゴ酸、グルタミン酸及びエタノールを用い、コハク酸以外の基質に対しては補酵素として0.3mg/ccの精製D.P.Nを加え0.001モルのNeo-tetrazolium chlorideの還元量に依り脱水素酵素活性値を表わした。恒温槽内で37°C5~20分反応させて後トリクロール醋酸で反応を止め醋酸エチルでFormazanを抽出し520m μ で比色定量した。実験結果は次の様である。

1) コハク酸脱水素酵素は脳皮質、腎臓に於てアルコール群(A群)に有意に酵素活性の増加があり、2) 乳酸脱水素酵素は脳皮質、肝臓に於てA群に有意の酵素活性増加が見られた。

3) グルタミン酸脱水素酵素は脳皮質、肝臓、心筋に於てA群に有意の酵素活性増加がみられ 4) リンゴ酸脱水素酵素では脳皮質、肝臓に於てA群に有意の酵素活性増加 5) アル

コール脱水素酵素は肝臓、脳皮質に於てA群に有意の酵素活性増加がみられた。次にワールブルグ検圧計を用いてアルコール基質に於けるアルコールラットの脳皮質、肝臓の酵素消費量を測定した。その結果はA群の肝臓では正常動物に比しおよそ10%の、脳皮質でも軽度ながら酵素消費の増加がみられた。又アルコール基質に於ける正常及びアルコールラットの脳皮質にMcIlwainの方法に依つて電気刺激を与えたが何れの場合も刺激応答がみられなかつた。

更にアルコールラットの脳、肝臓、腎臓、心筋を組織学的に検索したが、ニツスル、ヘマトキシリン、エオジン、ズダンIII染色などでは、いずれも著明な器質的变化が認められなかつた。

上記の変化はアルコールの習慣的投与に依つてひき起こされたアルコール耐性の表現と考えられ、アルコール嗜癖の形成の一因をなしているものと考えられる。