

# 各種栄養状態下におけるラット肝薬物代謝系に及ぼすエンドトキシンの影響

著者名(日)	堀口 美恵子, 清宮 宏章, 碓井 之雄, 菅家 祐輔
雑誌名	大妻女子大学家政系研究紀要
巻	46
ページ	123-131
発行年	2010-03-03
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1114/00002043/">http://id.nii.ac.jp/1114/00002043/</a>



# 各種栄養状態下におけるラット肝薬物代謝系に 及ぼすエンドトキシンの影響

堀口美恵子<sup>1)</sup>・清宮宏章<sup>2)</sup>・碓井之雄<sup>3)</sup>・菅家祐輔<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>大妻女子大学短期大学部家政科栄養学研究室, <sup>2)</sup>東京農業大学応用生物科学部栄養科学科生体機能防衛学研究室,  
<sup>3)</sup>東京医療保健大学医療栄養学科, <sup>4)</sup>大妻女子大学名誉教授

## Effects of Various Nutritional Conditions on the Hepatic Drug Metabolism in Rats Injected Bacterial Endotoxin

Mieko Horiguchi<sup>1)</sup>, Hiroaki Kiyomiya<sup>2)</sup>, Yukio Usui<sup>3)</sup> and Yusuke Kanke<sup>4)</sup>

Key Words : Endotoxin, Lipopolysaccharide, Drug Metabolizing Enzyme System, Cytochrome P 450,  
Glutathione S-transferase, Biotin, Ethanol

### I. 緒論

近年、生活活動様式の変化により、我々は数多くの化学物質に取り囲まれて生活している。そして、それらは直接的、あるいは間接的に我々の体内に取り込まれ、様々な影響を及ぼしている。しかし、我々はそのような化学物質に対して完全ではないが、身を守るすべとして“薬物代謝”を備えている<sup>1)</sup>。このような化学物質は、薬物、環境汚染物質、残留農薬、食品添加物など様々な化学物質であり、本来私達の生体成分や栄養素などの性質とは無縁で、生体異物といわれている。生体異物の約 90% は経口的に摂取され、一部は消化管粘膜で代謝されるが、大部分はそのまま粘膜を通過して門脈へと通じて肝臓へ運ばれる。吸収された生体異物は、肝細胞の小胞体中に存在しているシトクローム P-450 を中心とした薬物代謝系の第一段階反応酵素により酸化、還元、加水分解などの化学変化を受けて極性を増し、次いで第二段階反応酵素によってグルクロン酸、アミノ酸、硫酸などの生体成分と抱合体を形成して、さらに極性を増した形で最終的には糞便や尿中に排泄される<sup>2,3)</sup>。このことから薬物代謝は、従来、一種の解毒機構とみなされてきた。しかし、生体異物によっては生体内で薬物代謝によって代謝活性化されることにより有害性を発揮することがあり、これらの物質は第一段階反応により活性化されて DNA と結合し、突然変異を起こすなどの毒性を示す。しかし、DNA と結合する前に第二段階反応においてグルタチオンなどと抱合体を形成すれば、極性を増して体外に排泄される。従って、薬物代謝

は解毒機構というより、毒化・無毒化機構と解すべきとされている<sup>2,3)</sup>。我々は食生活を通して摂取を余儀なくされている様々な生体異物を、このように肝臓を中心とする薬物代謝系を通して解毒・排泄しているが、それには各種の栄養状態や疾病等の内外の因子が大きく関わっている<sup>3,4)</sup>。

感染症は近年までに克服されたかに見えたが、ヒト・モノの移動、開発による環境変化、社会活動様式の変容などにより様変わりし、今や新興・再興感染症と称され、再びクローズアップされている<sup>5,6)</sup>。このような感染症の生体機能に与えるインパクトはかなり大きいものと思われるが、飲酒やビタミン欠乏などの栄養状態の異常を伴った場合の薬物代謝系への影響についてはほとんど知見がない。

日常生活におけるアルコールの適度な摂取は、ストレス解消、疲労回復、食欲増進などに効果的である一方、過度の飲酒は肝障害、膵炎などの臓器障害などに広汎な慢性非感染性疾患を惹起することが知られている<sup>7-9)</sup>。アルコールの生体への影響については、様々な方面から精力的に調べられているが、薬物代謝領域も含め、その大部分は上記の慢性非感染性疾患の発生関与要因という観点からのもので、感染症との関連ではほとんど知見がない。

又、ビタミンは生物が正常な生理機能を営む上で極めて重要で、その必要量は微量ではあるが生体内では合成できず、食物から栄養素として摂取する必要がある。水溶性ビタミンの中でビタミン C 以外は生体内で補酵素として働き、欠乏により相応の代謝異常が発生する<sup>10)</sup>。ビオチンはいわゆるビオチン酵素と称されるピルビン酸カルボキシラーゼ、アセ

チル CoA カルボキシラーゼ、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ、 $\beta$ -メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼの 4 つのカルボキシラーゼの補酵素として機能している<sup>11-14</sup>)。これらの作用を介して、ビオチンは脂質や糖質の代謝、骨形成に関与することが知られている<sup>15</sup>)。又、ビオチンの欠乏は大量に卵白を摂取した時に起こるが、これは卵白中に含まれるアビジンがビオチンと強固に結合してビオチンの吸収を阻害することによって生ずる<sup>16</sup>)。ビオチンの生体における役割に関しては従来からかなり広範な研究が行われているが、生体異物の代謝・排泄に関する知見はほとんど見当たらない。

我々は各種栄養状態下における薬物代謝（生体異物代謝）の変動について研究を進めている<sup>17-23</sup>) が、本研究では「飲酒下での感染症」を想定し、アルコールとリポ多糖体の同時投与が生体防御機構の一つである薬物代謝酵素系にどのような影響を及ぼすかをラットの肝臓を用いて検討した（実験 1）。又、ビオチン欠乏下でのリポ多糖体の影響についても併せて比較検討した（実験 2）。因みにリポ多糖体は典型的な感染症である敗血症などを引き起こすグラム陰性菌の細胞壁の最外層の構成物質（エンドトキシン）で、発熱や白血球増加など多彩な作用を示すことが知られている<sup>24-26</sup>)。

## II. 実験方法

### 1) 実験動物と飼育方法

(1) 実験 1: 長期アルコール摂取ラットの肝薬物代謝に及ぼすリポ多糖体の影響

実験 1 では、アルコールとリポ多糖体 (Lipopolysaccharide: LPS) の単独、あるいは同時投与が、肝薬物代謝酵素系にどのような変動を及ぼすかをラット肝臓を用いて比較検討した。

被験動物としては生後 4 週齢の Wistar 系雄ラット 40 匹を用い、標準飼料 MF (Table 1) により 1 週間予備飼育した。予備飼育後 2 群に分け、一方には飲水として蒸留水 (Cont 群)、他方には 7% エタノール水 (EtOH 群) を与え、それぞれ 100 日間飼育した。飼育期間中の飼料も、予備飼育と同様に MF を使用した。飼育終了前日に各群をさらに 2 分し、一方には対照として生理食塩水 (Cont 群、EtOH 群) を、もう一方には生理食塩水に溶解した大腸菌由来の LPS 溶液 1 ml (8 mg/kg B.W.) を腹腔内投与 (Cont+LPS 群、EtOH+LPS 群) した。投与 24 時間後に脱血死させ、肝臓を 1.15% KCl で灌流

Table 1 Composition of the experimental diet (Ex. 1).

Component	Amount
Energy	383 kcal
Water	5.4 g
Protein	24.1 g
Lipid	5.7 g
Carbohydrate	56.1 g
Fiber	2.8 g
Ash	5.9 g
Ca	1,100 mg
P	900 mg
Fe	12.4 mg
Na	280 mg
K	900 mg
Retinol	1,140 $\mu$ g
Carotene	270 $\mu$ g
Vitamin A	400 IU
Vitamin B <sub>1</sub>	1.96 mg
Vitamin B <sub>2</sub>	1.09 mg
Niacin	12.4 mg
Vitamin C	2 mg
Mg	200 mg
Zn	4,700 $\mu$ g
Se	0.54 $\mu$ g
Tocopherol	8.7 mg
Dietary fiber	13.8 g

Values are expressed per 100 g

後に抽出し、ミクロソーム画分、及びサイトソーム画分を調整して各実験に使用した。

なお、飼料、及び飲水は *ad lib* で与え、温度 23  $\pm$  1 $^{\circ}$ C、湿度 50  $\pm$  15%、明暗サイクル 12 時間の飼育室で飼育した。飼料、飲水の補給は 1 日おきに、体重の測定は 3 日おきに行った。解剖前日は絶食させ、飲水のみを与えた。

Table 2 Composition of the experimental diet (Ex. 2).

Component	Amount (%)
Glucose	64.85
Air dried egg white	25.0
Mineral <sup>1</sup>	5.0
Vitamin <sup>2</sup>	1.0
Choline	0.15
Corn Oil	4.0

\*1 AIN76 Mineral mixture

\*2 AIN76 Vitamin mixture with or without 5 mg of biotin/100 g vit.mix.

## (2) 実験2: ビオチン欠乏ラットの肝臓物代謝系に及ぼす LPS の影響

実験2では、水溶性ビタミンであるビオチンが欠乏すると生体防御機構として機能する薬物代謝酵素にどのような影響を及ぼすか、又薬物代謝系に対する LPS 投与の作用がビオチン欠乏によってどのように変動するのかをラット肝臓を用いて比較検討した。

被験動物としては生後3週令のSD系雄ラット40匹を用い、1週間予備飼育した。予備飼育後2群に分け、ビオチン(+)群(以下C群)とビオチン(-)群(以下D群)にした。D群の組成(Table 2)は、グルコース64.85%、卵白25%、ミネラル5%、ビタミン1%、コリン0.15%、コーンオイル4%をそれぞれ配合したものを使用した。C群には、この組成にさらに餌100gあたり5mgのビオチンを混合して使用した。なお、ミネラルにはAIN76 Mineral Mixtureを、ビタミンにはAIN76 Vitamin Mixture(ビオチン無添加)を用いた。飼育期間は8週間とし、飼育終了前日に各群をさらに二分し、一方に对照として生理食塩水を(以下CS群、DS群)、もう一方には生理食塩水に溶解した大腸菌由来のLPS溶液1ml(8mg/kg B.W.)を腹腔内投与した(以下CL群、DL群)。投与24時間後脱血死させ、肝臓を1.15% KClで灌流後に摘出し、ミクロソーム画分、及びサイトソーム画分を調整して各実験の測定に使用した。

なお、飼料、及び飲水は*ad lib*で与え、温度23±1°C、湿度50±15%、明暗サイクル12時間の飼育室で飼育した。飼料、飲水の補給は1日おきに、体重の測定は3日おきに行った。解剖前日は絶食さ

せ、飲水のみを与えた。

## 2) 試薬

2,4-dinitrochlorobenzene (CDNB)、Glutathione reduced form (GSH)、5,5'-dithio-bis (DTNB)、Albuminは和光純薬工業株式会社製、Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS)、Uridine 5'-diphosphogonic acid (UDPGA)、Lipopolysaccharide (LPS)はCigma Chemical Co.製、p-Nitrophenol、Sodium dithioniteは関東化学工業株式会社製、3,4-Dichloronitrobenzene (DCNB)はナカライテクス株式会社製、Trans-4-phenyl-3-buten-2-one (TPBO)はAldrich Chemical Company製のものをそれぞれ使用した。又、血清脂質の測定には和光純薬工業株式会社の臨床検査キット(総コレステロール; コレステロールE-テストワコーキット、トリアシルグリセロール; トリグリセライドE-テストワコー)を用いた。その他の試薬は、全て市販特級品を用いた。

## 3) 測定方法

## (1) 酵素活性

## a. 酵素標品の調製

飼育終了後、脱血死させた動物の肝臓を1.15% KClで灌流した後摘出した。肝臓を細切後、4倍量の冷1.15% KClでホモジネートを調整し、4°C、10,000×gで20分間遠心分離した。さらにその上清を4°C、105,000×gで60分間遠心分離し、その上清をサイトゾール画分とし、酵素反応の酵素標品として用いた。沈査は50mM Tris-HCl buffer (pH 7.25; 3mM MgCl<sub>2</sub>含有)で再懸濁後、さらに4°C、105,000×gで30分間遠心分離し、得られた沈査を再懸濁してミクロゾーム画分とし、同様に酵素標品とした。

## b. グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 活性

Habigらの方法<sup>27)</sup>により、基質として20mM CDNBを用いて測定した。石英セルに0.2M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 0.5ml、20mM GSH 0.05ml、希釈酵素源0.45mlを加え、吸光度の増加割合を340nmで測定した。盲検には酵素源の代りに蒸留水を使用した。酵素標品はサイトゾール画分を用い、基質は1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)を用いて総活性、3,4-dichloronitrobenzene (DCNB)を用いてサブユニット3、trans-4-phenyl-3-buten-2-one (TPBO)を用いてサブユニット4を定量した。活性は1分間に抱合される各基質の量で表した。

## c. スルホトランスフェラーゼ (ST) 活性

Matsui らの方法<sup>28)</sup>により測定した。試験管に 315  $\mu$ M p-nitrophenol 0.2 ml、0.3M Tris-HCl buffer (60  $\mu$ M EDTA、30 mM MgCl<sub>2</sub> 含有; pH 7.2) 0.3 ml、希釈酵素標品 (サイトゾール画分) 0.3 ml を入れ、37°C で 2 分間放置後、0.5 mM PAPS 0.2 ml を加え、さらに 37°C で 20 分間加温した。これを沸騰水浴中に 1 分間放置後水冷し、0.2M glycine buffer (pH 10.4) 2.0 ml を加え、3,000 rpm、20 分間遠心分離した上清の吸光度を 400 nm で測定した。盲検には PAPS の代わりに蒸留水を使用した。なお、活性は 1 分間に抱合される p-nitrophenol の量で表した。

## d. UDP- グルクロニルトランスフェラーゼ (UDPGT) 活性

Matsui らの方法<sup>28)</sup>により測定した。試験管に 1.8 mM p-nitrophenol 0.2 ml、0.3M Tris-HCl buffer (60  $\mu$ M EDTA、30 mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Triton X-100 含有; pH 7.2) 0.3 ml、希釈酵素標品 (サイトゾール画分) 0.3 ml を入れ、37°C で 2 分間放置後、10 mM UDPGA 0.2 ml を加え、さらに 37°C で 20 分間加温した。これを沸騰水浴中に 2 分間放置後水冷し、0.2M glycine buffer (pH 10.4) 7.0 ml を加え、3,000 rpm、20 分間遠心分離した上清の吸光度を 400 nm で測定した。盲検には UDPGA の代わりに蒸留水を使用した。なお、活性は 1 分間に抱合される p-nitrophenol の量で表した。

## (2) その他の定量

## a. 血清成分の測定

飼育終了後、脱血死させる際に採取した血液は以下のように処理した。即ち血液は 30 分間 4°C で放置後、3,000 rpm で 20 分間の遠心分離を行い、上清を血清として -20°C で保存した。なお、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) とグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) の各酵素活性、及びヘモグロビン、アンモニアの定量は臨床化学自動分析装置スポットケム S-4410 (アークレイ社製) を用いて測定した。又、総コレステロールとトリアシルグリセロールの定量には、和光純薬工業株式会社製の臨床検査キットを用いた。

## b. グルタチオン (GSH) 量

Ellman 法<sup>29)</sup>により測定した。灌流して細切した肝臓 0.5 g に 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 2.25 ml を加え、ホモジナイズしたもの 1.5 ml に等量の 4% sulfosalicylic acid を加えて攪拌した。4°C で 30 分間放置後、4°C、10,000  $\times$  g で 20 分間遠心分離した。

その上清 0.5 ml に 0.1M phosphate buffer (pH 8.0; 0.1 mM DTNB 含有) 4.5 ml を加え、5 分後に 412 nm で吸光度を測定した。なお、標準には 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) で溶解した GSH を使用した。

## c. シトクローム P-450 (P-450) 量

Omura らの方法<sup>30)</sup>により測定した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.25; 3 mM MgCl<sub>2</sub> 含有) で希釈した酵素標品をガラスセル 2 本に分注し、まず一方に CO を 1 分間通し、400-500 nm で走査した。次いで両方のセルに Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を数 mg 加え、よく攪拌した後、再び 400-500 nm で走査し、CO 差スペクトル (450 nm と 490 nm の吸光度の差) から P450 量を求めた。なお、酵素標品はマイクロゾーム画分を用いた。

## d. タンパク質の定量

Lowry らの方法<sup>31)</sup>により測定した。希釈酵素液 0.2 ml に 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.1 N NaOH、0.5% CuSO<sub>4</sub>、1.0% KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O (ロッセル塩) (50:1:1) の混液 1.0 ml を加え、10 分間放置した。その後蒸留水で 2 倍希釈した phenol 試薬 0.1 ml を加え、30 分間放置後、500 nm で吸光度を測定した。なお、標準には牛血清アルブミンを用いた。

## 4) 統計処理

結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示し、平均値の有意差検定は Student's t-test により行った。

## III. 結果

## 1) 実験 1

## (1) 体重増加

被験動物は飼育期間を通じ、順調に成長した。エタノール摂取群で若干の減少傾向にあったが、有意差は認められなかった。

## (2) 肝臓重量比

対照群に比べ、エタノール摂取群、LPS 投与群、同時投与群はいずれも有意に高値を示した。

## (3) 血清成分

肝機能の指標である血中 GOT 活性はエタノール摂取で高値傾向を示し、LPS 投与はエタノール摂取の有無に関わらず有意に高値を示した。GOT と共に肝機能の指標とされている血中 GPT 活性は、エタノール摂取では変動はなく、LPS 投与では有意に高値を示した。しかし、エタノール摂取下では、LPS による上昇作用が抑制された (Fig. 1)。総コレステロール濃度は、エタノール摂取群で対照に比べ有意に低値を示した。逆に LPS 投与は、エタ

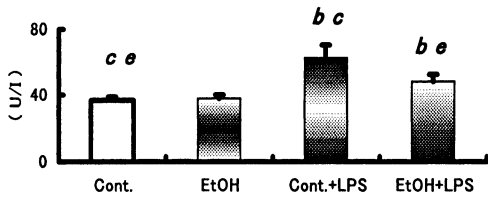


Fig. 1 Effect of alcohol and/or LPS on serum GPT activity after dietary treatment for 100 days. Values are means  $\pm$  SE. Abbreviations : Cont, control diet ; EtOH, control diet with alcohol ; Cont+LPS, control diet with LPS ; EtOH+LPS, control diet with alcohol with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p < 0.05$ ).

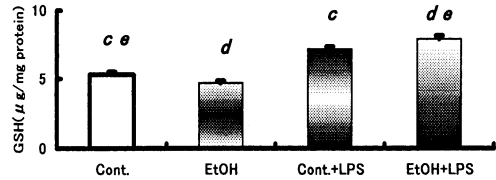


Fig. 3 Effect of alcohol and/or LPS on glutathione level after dietary treatment for 100 days. Value are means  $\pm$  SE. Abbreviations : Cont, control diet ; EtOH, control diet with alcohol ; Cont+LPS, control diet with LPS ; EtOH+LPS, control diet with alcohol with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p < 0.05$ ).

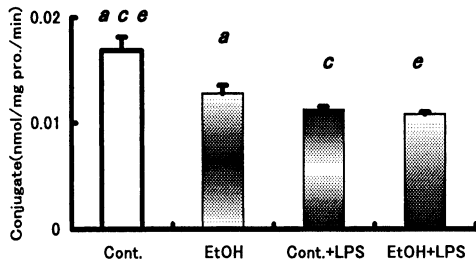


Fig. 2 Effect of alcohol and/or LPS on GST (TPBO) activity after dietary treatment for 100 days. Values are means  $\pm$  SE. Abbreviations : Cont, control diet ; EtOH, control diet with alcohol ; Cont+LPS, control diet with LPS ; EtOH+LPS, control diet with alcohol with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p < 0.05$ ).

ノール摂取の有無に関わらず有意に高値を示した。トリアシルグリセロール濃度は、エタノール摂取で増加傾向、LPS 投与は減少傾向を示した。LPS による減少傾向はエタノール摂取下でさらに強まり対照に比べて有意に低値を示した。

#### (4) GST 活性

CDNB を基質として測定した GST 活性では、対照に比べエタノール摂取は有意に低値を示した。LPS 投与は低値傾向を示したが、有意差は認められなかった。エタノール摂取下では LPS による減少傾向が強められ有意差を生じさせた。DCNB を基質とした GST 活性は対照に比べエタノール摂取、

LPS 投与、同時投与でいずれも有意に低値を示した。しかし、両者の相加的作用はなかった。TPBO を基質とした GST 活性も DCNB を基質とした活性同様、対照に比べ各群間において有意に低値を示した (Fig. 2)。

#### (5) GSH 量

エタノール摂取では有意な変動は認められなかった。LPS 投与は約 15% 有意に高値を示した。エタノール摂取下ではさらに高まり対照に比べ約 20% 有意に高値を示した (Fig. 3)。

#### (6) P-450 量

エタノール摂取は若干の増加傾向であったが、LPS 投与は約 45% の低値を示した。エタノール摂取下では、若干 LPS による低下作用が抑制はされたものの、対照に比し約 40% 有意に低値を示した (Fig. 4)。

## 2) 実験 2

### (1) 体重増加

被験動物は飼育期間を通じ、順調に成長した。しかし、40 日付近からビオチン欠乏群の D 群で減少傾向が現われた。これはビオチン欠乏による食欲低下が起こったものと思われる。なお、飼料効率も両群間で有意差はなかったが、若干 D 群で低値傾向を示した。これは体重増加に反映されているものである。

### (2) 肝臓重量比

各群間に有意差は認められなかった。しかし、LPS 投与の有無に関わらずビオチン欠乏で若干低値を示した。

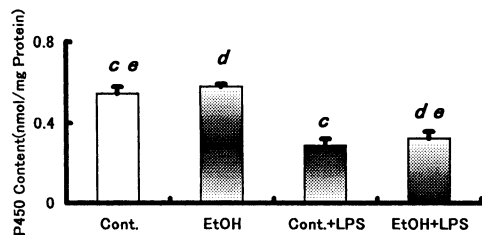


Fig. 4 Effect of alcohol and/or LPS on P-450 level after dietary treatment for 100 days. Values are means±SE. Abbreviations : Cont, control diet ; EtOH, control diet with alcohol ; Cont.+LPS, control diet with LPS ; EtOH+LPS, control diet with alcohol with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

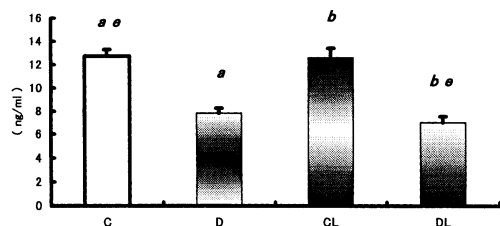


Fig. 5 Effect of biotin and/or LPS on serum biotin level after dietary treatment for 8 weeks. Values are means±SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin- deficient diet with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

### (3) 血清成分

ビオチン定量の結果は、ビオチン欠乏群と同時投与群において対照群に比し約 40 ~ 50% 有意に低値を示した。LPS 投与はビオチン量を変動させなかった。このことからこの実験飼料はビオチン欠乏を惹起することが明らかとなった (Fig. 5)。肝機能の指標となる GOT 活性はビオチン欠乏、及び LPS 投与で有意に高値を示した。両処理では、ビオチン欠乏下で LPS の活性上昇作用はさらに高められた。GPT 活性は、ビオチン欠乏、LPS 投与でいずれも有意に高値を示し、両者の同時処理はさらに活性を高めた (Fig. 6)。ヘモグロビン濃度は、ビオチン欠乏で LPS の有無に関わらず有意に低値を示し、貧血状態が惹起された。又、LPS 投与下ではビオチ

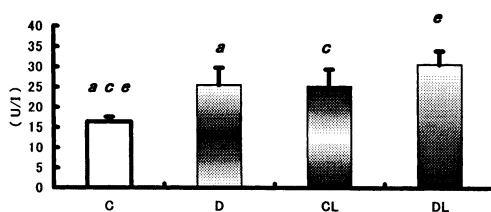


Fig. 6 Effect of biotin and/or LPS on serum GPT activity after dietary treatment for 8 weeks. Values are means±SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin- deficient diet with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

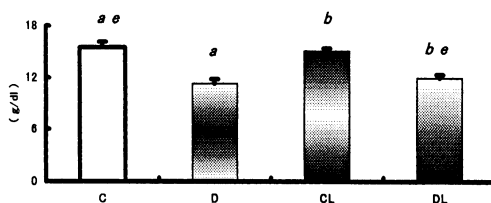


Fig. 7 Effect of biotin and/or LPS on serum hemoglobin level after dietary treatment for 8 weeks. Values are means±SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin- deficient diet with LPS. Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

ン欠乏により、有意な低値を示した (Fig. 7)。アンモニア濃度は、ビオチン欠乏で増加傾向を示し、LPS 投与では有意な高値を示した。ビオチン欠乏下では、LPS による上昇現象はさらに促進され高値を示した。総コレステロール濃度は、ビオチン欠乏で有意な高値を示した。LPS は単独摂取でも有意な高値を示したが、ビオチン欠乏下ではさらなる有意な高値を示した。

### (4) GST 活性

CDNB を基質とした GST 活性においては、ビオチン欠乏は低値傾向を示した。LPS 投与は有意に低値を示したが、ビオチン欠乏下ではさらに低値を示した。DCNB を基質とした GST 活性においては、ビオチン欠乏も、LPS 投与も有意に低値を示した。しかし、両者による相加的作用はなかった (Fig. 8)。

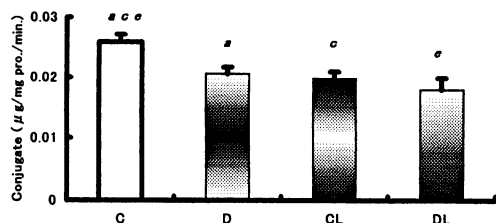


Fig. 8 Effect of biotin and/or LPS on GST (DCNB) activity after dietary treatment for 8 weeks. Values are means $\pm$ SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin-deficient diet with LPS Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

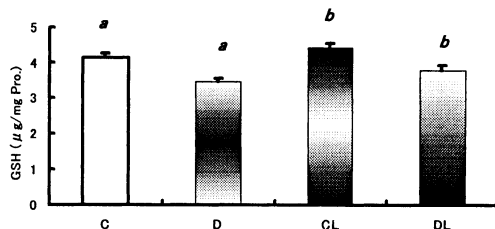


Fig. 10 Effect of biotin and/or LPS on glutathione level after dietary treatment for 8 weeks. Values are means $\pm$ SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin-deficient diet with LPS Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

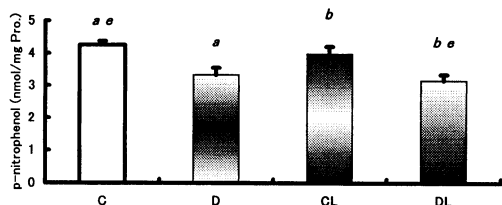


Fig. 9 Effect of biotin and/or LPS on UDPGT activity after dietary treatment for 8 weeks. Values are means $\pm$ SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin-deficient diet with LPS Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

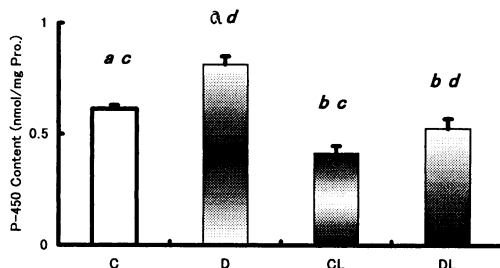


Fig. 11 Effect of biotin and/or LPS on P-450 level after dietary treatment for 8 weeks. Values are means $\pm$ SE. Abbreviations : Cont, control diet ; D, biotin- deficient diet ; CL, control diet with LPS ; DL, biotin-deficient diet with LPS Values with the same superscript are statistically different ( $p<0.05$ ).

TPBO を基質とした GST 活性においては、ビオチン欠乏、LPS 投与は低値傾向を示したが有意差はなかった。しかし、両者の同時処理は有意に低値を示した。

(5) ST 活性

ST 活性はどの群間にも有意差はなかった。

(6) UDPGT 活性

ビオチン欠乏は LPS 有無に関わらず、有意に低値を示した。又、LPS 投与下ではビオチン欠乏により、有意な低値を示した (Fig. 9)。

(7) GSH 量

ビオチン欠乏は LPS 投与の有無に関わらず、有意な低値を示した。LPS 単独投与の変動はなかった (Fig. 10)。

(8) P-450 量

ビオチン欠乏は約 25% の有意な高値を示した。一方、LPS 投与は 30% の有意な低値を示した。又、LPS 投与による活性低下作用はビオチン欠乏で若干抑制された (Fig. 11)。

IV. 考察

1) 実験 1

長期エタノール摂取の結果、若干ではあるが、血中の GOT 活性、GPT 活性の値が上昇し、さらに、肝臓重量比も同様に有意に高値を示した。これより、100 日間に及ぶエタノール摂取により、被験動物はアルコール性肝障害を呈していることが示唆さ



れた。薬物代謝第一相酵素のP-450は、エタノール投与で若干の上昇傾向を示したことから、従来から知られているP-450誘導効果のあることが伺えた。又、LPS投与は有意な減少を招き、同時投与においても低下傾向が大きいことから、エタノール、LPSによって多大な薬物代謝異常が起こる可能性が示唆された。

薬物代謝第二相酵素のGSTは、エタノール摂取では、3基質において有意に低値を示したことから、P-450によって促進された代謝が第二相反応では抑制されていた。LPS投与との同時投与も同様にGST活性は減少しており、生体にとって望ましくない状態になっていたことが明らかである。

これより、エタノールによる第一相酵素の促進にも関わらず、LPSによりことごとく抑制されていること、第二相酵素の低下、もしくは低下傾向から、薬物代謝が円滑にいかず、生体防御機構に悪影響を及ぼしていることが示唆された。

## 2) 実験2

ビオチンは生体内において4つのカルボキシラーゼの補酵素として働き、その欠乏症状としてラットでは皮膚炎、脱毛、食欲減退、成長遅延などが知られている<sup>32)</sup>。本実験ではこのような症状は軽微であったが、血清中のビオチン量が有意に減少し、被験動物は明らかなビオチン欠乏状態にあった。

ビオチン欠乏は、貧血状態、高コレステロール血症、肝障害を呈する恐れがある上、P-450量の増加により生体異物の代謝を促進しても、第二相酵素が低下、もしくは低下傾向を示すことから、解毒が抑制され全体的に有害物質の影響を受けやすい状態であることが推察された。

LPS投与は従来の知見と同様に、P-450量を顕著に低下させ、一部の第二相酵素においても活性低下を招くことが確認された。又、ビオチン欠乏下でのLPS投与においては、P-450量はビオチン欠乏時の増加とLPS投与時の減少が相殺されたが、第二相酵素活性がそれぞれ相加的に低下し、生体異物の排泄が大きく損なわれる恐れのあることが示唆された。

## V. 総括

被験動物に短期、及び長期にエタノールを摂取させると血中GOT、GPT活性が上昇し、従来から知られているように肝機能障害が起こることが示唆された。P-450量はエタノールで上昇し、LPSでは

減少することが明らかになっている<sup>33)</sup>。本実験でも大旨、同様な結果が得られた。第二相反応では、GST活性が3つの基質においてエタノール、LPSによる有意な減少、もしくは減少傾向を示した。これより、生体は解毒が抑制され、有害物質の影響を受けやすい状態であることが示唆された。又、ビオチン欠乏は高コレステロール血症や貧血症状を起こした上に、肝機能の低下をきたした。薬物代謝に対しては、第一相酵素の増加によって毒物の排泄は促進されるように思われるが、第二相反応酵素の活性低下により生体異物の代謝・排泄が抑制され、代謝全般に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

エタノール投与、ビオチン欠乏という異常栄養状態下での感染症を想定したLPSの投与は、第一相酵素のP-450量は低下させ、第二相酵素の活性低下、もしくは低下傾向やGSHの減少を招き、生体異物の代謝・排泄が阻害される結果、有害物質の解毒や薬物の効果に多大な影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。

## VI. 参考文献

- 菅家祐輔, 坂本義光編: 食安全の科学—食生活を脅かす化学物質の生体作用—, 7-17 (2009), 三共出版
- 入野 勤, 菅家祐輔, 瀬山義幸, 山川敏郎: コメディカルのための生化学, 99-100 (2002), 三共出版
- 加藤隆一, 鎌滝哲也: 薬物代謝学, 東京化学同人 (2005)
- 入野 勤, 碓井之雄, 菅家祐輔, 瀬山義幸: 病態生化学, 159-168 (1999), 丸善株式会社
- (財)厚生統計協会編: 国民衛生の動向, 125-134 (2008), (財)厚生統計協会
- 高島 豊: エッセンシャル 社会・環境と健康, 177-182 (2004), 医歯薬出版株式会社
- Konishi, N., Kitahori, Y., Shimoyama, T., Takahashi, M., and Hiasa, Y.: Effects of sodium chloride and alcohol on experimental esophageal carcinogenesis induced by N-nitrosopiperidine in rats. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 77 446-451 (1986)
- Beloqu, O and Cederbaum, A.I.: Micrasomal interactions between iron, paraquat, and menadione; Effect on hydroxyl radical production and alcohol oxidation. */Arch. Blochem. Biophys.* 242, 187-188 (1985)
- Y Kanke, K Suzuki, S Hirakawa, and S Goto: Oral contraceptive steroids: Effects on iron and zinc

- levels and on tryptophan pyrrolase and alkaline phosphatase activities in tissues of iron-deficient anemic rats. *Am. J. Clinical Nutrition*, 33: 1244-1250 (1980)
10. 堀口美恵子: 栄養学—食と健康—, 114-129 (2009), 三共出版
  11. 日本ビタミン学会編: ビタミン学 [III], 463 (1980), 東京化学同人
  12. Sweetman, L. and Nyhan, W.L.: *The Vitamin*, *Ann. Rev. Nutr.* 6, 317-343 (1986)
  13. Dakshinamurtj, K. and Chauhan, J.: *Vitamin & Hormones Vitamin (Vitamin H)*, 45, 337-384 (1989)
  14. Ketterer, B. Meyer, D.J. and Clark, A.G.: *Biotin Deficiency*, *J. Biol. Chem.* 146 (1988)
  15. 大泉 純: 代謝, 27, 91-99 (1990)
  16. 日本栄養・食糧学会編: 栄養・食糧学データハンドブック, 46 (2006), 同文書院
  17. 堀口美恵子, 増田宏之, 岩間昌彦, 菅家祐輔, 碓井之雄: ICR系マウス及びWister系マウスの肝P-450分子種に及ぼすエンドトキシン投与の影響, *大妻女子大学家政系紀要*, 44, 135-140 (2008)
  18. 堀口美恵子, 増田宏之, 岩間昌彦, 菅家祐輔, 碓井之雄: C3H/HeN系マウス及びICR系マウスの肝薬物代謝酵素に対するエンドトキシン投与の影響, *大妻女子大学家政系紀要*, 43 81-88 (2007)
  19. 菅家祐輔, 金子千里, 堀口美恵子, 岩間昌彦: ラット肝薬物代謝系に及ぼす乾燥大豆粉末の影響, *大妻女子大学家政系紀要*, 45, 17-23 (2009)
  20. Effects of YUGAO (*Lagenaria scineraria*) Powder on Rat Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes: Y. Kanke, I. Takai, M. Iwama, M. Horiguchi, A. Kenmoku: *Research Bulletin of Otsuma Women's University for Home Economics*, 45, 11-15 (2009)
  21. 堀口美恵子, 幸山義人, 岩間昌彦, 菅家祐輔: ラット肝のエタノール代謝, 及び薬物代謝の酵素活性に及ぼすエタノールと経口ステロイドホルモン剤の影響, *大妻女子大学家政系紀要*, 45, 107-115 (2009)
  22. 堀口美恵子, 岩間昌彦, 菅家祐輔: ラット肝の薬物代謝系に及ぼす食塩と慢性アルコール投与の影響, *大妻女子大学家政系紀要*, 44, 141-149 (2008)
  23. 堀口美恵子, 岩間昌彦, 菅家祐輔: ラット肝のグルタチオン関連酵素活性におよぼす高塩食とタンパク質の質の影響, *大妻女子大学家政系紀要*, 40, 157-168 (2004)
  24. 吉田昌男: *新臨床医学文庫 292 エンドトキシンの話*, 4 (1981), 金原出版
  25. 小川祐示, 木曾 真, 長谷川明: 特集エンドトキシン代謝, 26, 15-16 (1989), 岐阜大学農学部生物資源利用学科
  26. 沖山茂雄: *内科学 (中巻)*, 224-230 (1997), 南山堂
  27. Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jacoby, W. B.: Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249 7130-7139 (1974)
  28. Matui, M. and Watanabe, H.: Developmental alteration of hepatic UDP-glucuronosyltransferase and sulhotransferase towards androsterone and 4-nitrophenol in wister rats. *Biochem. J.*, 204 441-447 (1982)
  29. Ellman, G. L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 70-77 (1959)
  30. Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239 2370-2378 (1964)
  31. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 265-275 (1951)
  32. 木村修一, 古川勇次, 前橋 賢: 代謝, 27 119-126 (1990)
  33. Watson, A.M. Warren, G. Howard, G.: Activities of Conjugating and Antioxidant Enzymes Following Endotoxin Exposure, *J. Biochem. Molecular Toxicology*, 13 2 (1999)

### Summary

This study was carried out to study the effect of the infection using with endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) on the hepatic enzyme systems involved in xenobiotic metabolism under the various nutritional condition. The LPS injection into experimental animals significantly reduced the cytochrome P-450 (P450) content in liver tissue. Acute ethanol injection emphasized the decrease in the total P450 content of mouse liver by LPS, while chronic alcohol treatments showed no change. On the other hand, biotin deficiency inhibited the lowering effect of LPS on total P450 content of rat liver.

These results suggest that effect of the infection on xenobiotic metabolism may be changed by various nutritional conditions.