

ICR系マウスおよびWister系ラットの肝P-450分子種に及ぼすエンドトキシン投与の影響

著者名(日)	堀口 美恵子, 増田 宏之, 岩間 昌彦, 菅家 祐輔, 碓井 之雄
雑誌名	大妻女子大学家政系研究紀要
巻	44
ページ	135-140
発行年	2008-03-03
URL	http://id.nii.ac.jp/1114/00002084/



ICR 系マウスおよび Wister 系ラットの肝 P-450 分子種に及ぼすエンドトキシン投与の影響

堀口美恵子¹⁾・増田宏之²⁾・岩間昌彦²⁾・菅家祐輔³⁾・碓井之雄⁴⁾

¹⁾大妻女子大学短期大学部家政科栄養学研究室

²⁾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

³⁾大妻女子大学家政学部食物学科食安全学研究室, ⁴⁾東京医療保健大学医療栄養学科

Changes of Hepatic P-450 families Following Endotoxin Exposure in ICR or Wister Mice

Mieko Horiguchi¹⁾, Hiroyuki Masuda²⁾, Masahiko Iwama²⁾,
Yusuke Kanke³⁾ and Yukio Usui⁴⁾

Key Words : cytochrome P450, endotoxin, drug metabolizing enzyme system

1. 緒論

生体にとって一般に栄養素以外のものは元来不要であり、場合によっては有害なものである¹⁾。しかし、現実的に我々が摂取する非栄養物質—それは生体の正常な機能を果たす物質とは異なる性質の物質であるということから生体異物と称される—は、環境汚染物質、残留農薬、それに医薬品まで加えればかなりの数にのぼる。生体異物の進入に対し、生体は一連の酵素よりなる生体異物代謝系(薬物代謝系)を有し、それらをより排泄しやすい形に変換する²⁾。すなわち、生体異物は、第 I 相の酸化、還元、加水分解などにより、水酸基、カルボキシル基、アミノ基などの極性官能基が生成または導入され、極性化されることに伴い、薬理作用などの生物作用の作用部位に対する親和性を失い、排出されやすくなる。第 I 相で生成した代謝産物や未代謝異物は、続く第 II 相でグルクロン酸、グルタチオン、硫酸などと抱合反応を受け、より高い極性をもった抱合体に転換され、有していた生理作用を失って体外へ排出される。これらの反応には全て酵素が触媒として働き、第 I 相においてはモノオキシゲナーゼ系酵素であるチトクローム P-450(以下 P-450)、第 II 相においてはグルタチオン S-トランスフェラーゼ、UDP-グルクロナシルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼなどが主に関与する³⁾。

薬物代謝酵素活性の変動をもたらす要因には、外来異物の進入や喫煙、飲酒、食事(餌)、薬の服用などの外的要因の他、内的要因として種差、系統差、性差、年齢差、栄養状態、疾病の有無、遺伝的要因に

基づく個体差など、様々な要因があげられる³⁾。

近年、院内感染として特に注目されているものとして、敗血症があげられる⁴⁾。これは、皮膚や粘膜の傷、種々の臓器にある感染巣から、細菌がリンパ流より血中に侵入し、エンドトキシンを発生して悪寒戦慄を伴う間歇熱や痲疹などの中毒症状を起こしたり、新たに転移性の感染巣を形成したりする重篤な細菌感染症である⁵⁾。エンドトキシンは、グラム陰性桿菌の細胞壁の再外層を構成し、その成分からリポ多糖体(Lipopolysaccharide: LPS)とも呼ばれる。構造は O 抗原特異多糖鎖と、ヘプトース、エタノールアミンや 2-ケト-3-デオキシオクトン酸などからなるコア多糖と、グルコサミンを含むリポ A で構成され、一つの分子内に親水基と親油基を併せ持つ両親媒性の酸性高分子である。リポ A が活性中心として働き、発熱、白血球増加など多彩な生体への作用を示す事が知られている。特に敗血症においては、細菌の破壊に伴い多量の LPS が遊離し、循環系の組織に働いてショックを引き起こすといわれている⁶⁾。このような感染症に罹患した場合の生体機能の変化については、様々な観点から多くの研究がなされているが、生体防御機構の一つである薬物代謝に対する影響に関する知見は非常に乏しい。そこで筆者らは、感染症時に受ける薬物代謝酵素系への影響について、大腸菌由来の LPS を動物に投与した場合、肝薬物代謝酵素系にどのような変化を与えるかを調べた。すなわち、LPS をマウス、またはラットに投与した場合の影響を、薬物代謝系第 I 相反応の主要な酵素である P-450 分子種の変動を中心に検討した。

2. 方法

(1) 実験動物

1) LPS 投与による ICR 系マウス肝の P-450 分子種の変動

生後 7 週齢 (体重 31~33g) の ICR 系雄マウス (Slc: ICR (SPF)) を日本エスエルシー株式会社より 20 匹購入し、コントロール群と LPS 群の 2 群に分けた。コントロール群のマウスには生理食塩水 (S) を、LPS 群のマウスには大腸菌由来の LPS 溶液を 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む溶液をそれぞれ 0.2ml ずつ尾静脈より投与し、投与 24 時間後、頸椎脱臼により屠殺した。

2) LPS 投与による Wister 系マウス肝の P-450 分子種の変動

生後 7 週齢 (体重 150~170g) の Wister 系雄ラット (Slc: Wister (SPF)) を日本エスエルシー株式会社より 20 匹購入し、コントロール群と LPS 群の 2 群に分けた。コントロール群のマウスには生理食塩水 (S) を、LPS 群のマウスには大腸菌由来の LPS 溶液を 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む溶液をそれぞれ 1.0ml ずつ尾静脈より投与し、投与 24 時間後、頸椎脱臼により屠殺した。

(2) 測定方法

1) LPS 投与による ICR 系マウス肝の P-450 分子種の変動

a. 酵素標品の調製

屠殺後、肝臓を 1.15% 塩化カリウム溶液で灌流した後、摘出した。次に肝臓の 4 倍量の 1.15% 塩化カリウム溶液でホモジネートを調整し、9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心分離した。その上清を 105,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 60 分間超遠心分離し、得られた沈殿を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.25; 3 mM MgCl₂ 含有) に懸濁してミクロゾーム分画とした。

b. P-450 総量

Omura らの方法⁷⁾ により、ミクロゾーム分画を用いて測定した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.25; 3 mM MgCl₂ 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 Na₂S₂O₄ 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) からたんぱく質 1 mg 当たりの P-450 含有量を求めた。

c. P-450 分子種

P-450 分子種については、基質特異性による測定

とウエスタンブロットによる測定を行った。始めに基質特異性による分別は、基質 7-エトキシクマリンを O-脱エチル化させる反応で CYP1A1 と 2B2 を、基質エトキシレゾルフィンに O-脱メチル化させる反応で CYP1A1 と 1A2 を、基質 p-ニトロフェノールを水酸化させる反応で CYP2E1 をそれぞれ測定した。

次にウエスタンブロットによる測定^{8,9)} で、CYP1A1、CYP2B2、CYP2E1 の 3 分子種を同定した。すなわち酵素誘導させたミクロゾームをスタンダードとして、まず SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動たんぱく質をセルロースアセテート膜に転写し、1 次抗体とした。これを Anti-CYP1A1、CYP2B2、CYP2E1 で反応させた後、2 次抗体でペルオキシダーゼ標識させ、ルミネートを酸化発光させてオートラジオグラフィ用フィルムに露光させた。

d. タンパク質の定量

Lowry らの方法¹⁰⁾ により測定した。希釈酵素源 0.2 ml に 2% Na₂CO₃-0.1 N NaOH、0.5% CuSO₄、1.0% KNaC₄H₄O₆·4H₂O (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。

2) LPS 投与による Wister 系マウス肝の P-450 分子種の変動

a. 酵素標品の調製、b. P-450 総量、および d. タンパク質の定量は、①の ICR マウスと同様に行った。c. P-450 分子種については、ウエスタンブロットによる方法で、CYP1A1、CYP2B2、CYP2E1 の他、CYP3A2 の合計 4 分子種を同定した。

(3) 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示し、統計学的検定には、Student's-*t* 検定を用いた。

3. 結果、および考察

(1) LPS 投与による ICR 系マウス肝の P-450 分子種の変動

P-450 の総量は、コントロール群 (1.18 \pm 0.08 nmol/mg protein) に比べ LPS 群 (0.59 \pm 0.05 nmol/mg protein) が 50% の有意な低下を示した (Fig. 1)。基質特異性の違いを利用して調べた分子種レベルの変動では、7-エトキシクマリンを基質として測定した CYP1A1 と 2B2 の活性は、P-450 総量と同

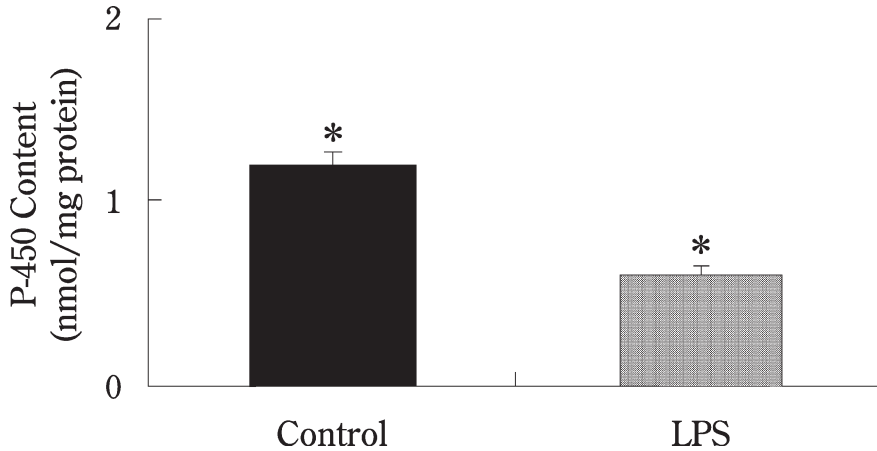


Fig. 1. Effect of LPS on Cytochrome P-450 content in ICR mice. Values are means \pm S.E. of 10 mice and significant differences from the control value are indicated as * ($p < 0.05$) by Student's *t* test.

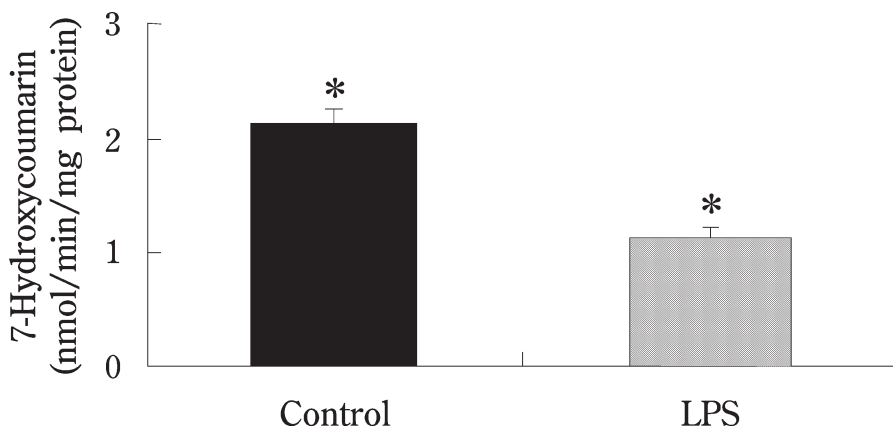


Fig. 2. Effect of LPS on Ethoxyresorufin O-dealkylation in ICR mice. Values are means \pm S.E. of 10 mice and significant differences from the control value are indicated as * ($p < 0.05$) by Student's *t* test.

様、コントロール群 (2.12 ± 0.11 nmol/mg protein) に比べ LPS 群 (1.12 ± 0.06 nmol/mg protein) が 47% の有意な低下を示した (Fig. 2)。エトキシレゾルフィン基質として測定した CYP1A1 と 1A2 の活性も、コントロール群 (4.16 ± 0.29 nmol/mg protein) に比べ LPS 群 (2.14 ± 0.12 nmol/mg protein) が 49% の有意な低下を示した (Fig. 3)。しかし、*p*-ニトロフェノール基質として測定した CYP2E1 の活性は、コントロール群 (5.50 ± 0.03 nmol/mg protein) と LPS 群 (5.59 ± 0.05 nmol/mg protein) では大差がなかった (Fig. 4)。

一方、ウェスタンブロットによって分別した P-450 分子種への影響は、コントロール群に比べ LPS 群で CYP1A1 含量が 45% の有意な減少、CYP2B2 含量が 35% の有意な減少を示した (Fig. 5)。しかし、CYP2E1 含量は LPS 投与による影響がみられなかった。

LPS 投与による P-450 総量の低下は、前回報告した ICR マウス (7 週齢, 19 週齢)、および C3H/HeN マウスにおいて認められたこと¹¹⁾ と一致する。さらに今回認められた P-450 分子種の結果における脱メチル化活性の低下は、アミノレブリン酸 (ALA) 合

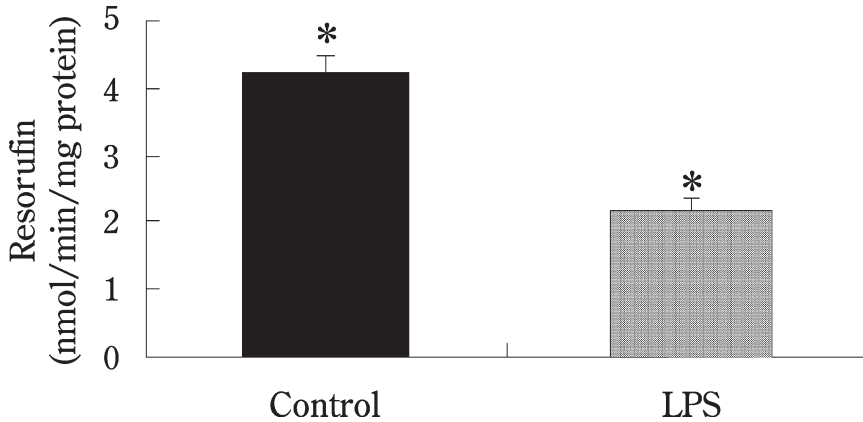


Fig. 3. Effect of LPS on Ethoxycoumarin deethylase in ICR mice. Values are means±S.E. of 10 mice and significant differences from the control value are indicated as *($p < 0.05$) by Student's *t* test.

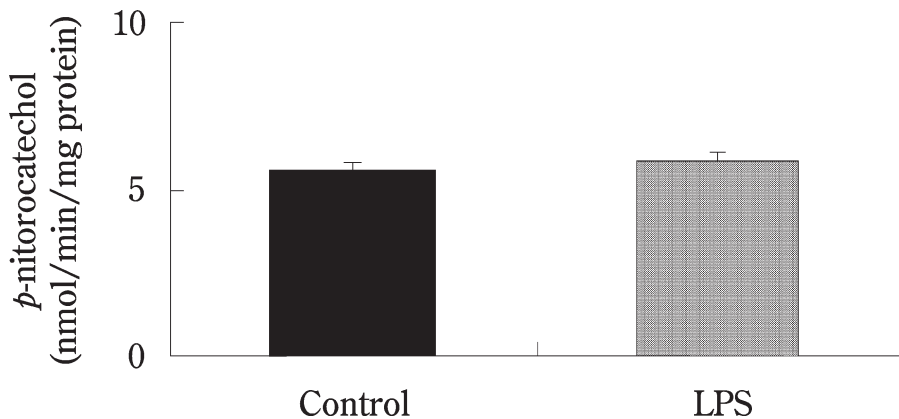


Fig. 4. Effect of LPS on *p*-Nitorophenol hydroxylation in ICR mice. Values are means±S.E. of 8-10 mice and significant differences from the control value are indicated as *($p < 0.05$) by Student's *t* test.

成酵素の活性を阻害し、ヘムオキシゲナーゼの活性を促進することによりヘムたんぱく質を減少させるという報告¹²⁾を支持している。しかし、その作用はどの P-450 分子種に対しても一律ではなく、特に CYP2E1 の活性には影響を及ぼさなかったと考えられる。従って LPS の、あるいは感染症時の生体異物代謝への作用は、生体異物の種類によってかなり異なることが示唆された。

(2) LPS 投与による Wister 系ラット肝の P-450 分子種の変動

P-450 の総量は、コントロール群に比べ LPS 群が 31% の有意な低下を示した。ウエスタンブロットに

よって分別した P-450 分子種への影響は、コントロール群に比べ LPS 群で CYP1A1 含量が 54% の有意な減少、CYP2B2 含量が 28% の有意な減少、CYP3A2 含量が 39% の有意な減少を示した (Fig. 6)。CYP2E1 含量では LPS 投与による低下傾向がみられた。

LPS 投与による P-450 総量の低下は、上記(1)の ICR マウスの結果と一致するが、LPS による低下割合はラットの方が小さかった。この Wister 系ラットによる実験 (2) では、マウスにほとんど存在しない分子種である CYP3A2 における LPS 投与の影響を確認することができた。Morgan らは、成長ホルモ

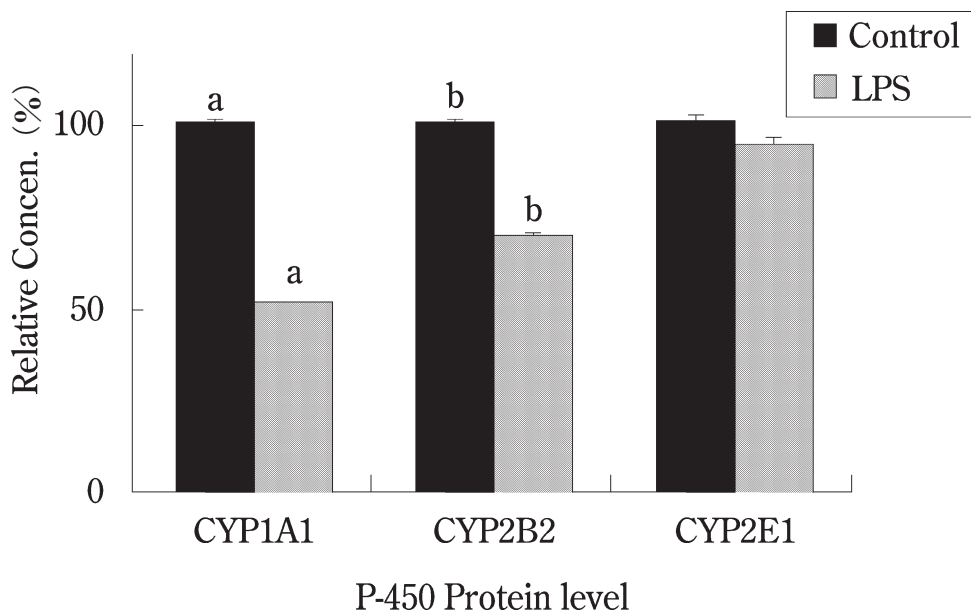


Fig. 5. Effect of LPS on cytochrome P-450 isozymes from families *Cyp1a-1*, *Cyp2b-2*, *Cyp2e-1* in ICR mice. All values are given as percentages of the mean \pm S.E. values for the control of 10 mice and significant differences from the control value are indicated as a, b ($p < 0.05$) by Student's *t* test.

ンで酵素誘導させたラットでの LPS 投与による肝 P-450 分子種 CYP2E1 の低下作用を報告しているが、今回の実験系では CYP2E1 の明らかな低下は認められなかった。以上の結果から、ICR 系マウスと Wistar 系ラットにおいて、ウエスタンブロットによる一次抗体の免疫学的交差性による種差は多少あるものの、マウスとラット間における LPS 投与の影響は、P-450 分子種 CYP1A1、CYP2B2、CYP2E1 に限り少ないものと考えられた。

4. 総括

大腸菌由来の LPS をマウス、またはラットに投与した場合の肝薬物代謝酵素活性への影響について、P-450 分子種の変動を中心に調べた。薬物代謝系には機能の異なる多くの分子種の存在が知られており、特に P-450 には基質特異性などにより約 200 種の分子種がアミノ酸配列により、いくつかの群、および亜群に分類されている。その中で薬物代謝に関わるものは 1~4 群までの分子種が存在し、各々が様々な条件により誘導や阻害を受け、生体異物の代謝に多大な影響を及ぼしている。本研究を通し、LPS

投与により P-450 分子種の全てが一様に低下するものではないことが確認された。また、LPS 投与は癌原物質の代謝的活性化に関与する分子種 CYP1A1 を抑制したが、一般の生体異物の代謝、排泄に関わる CYP2B2 を低下させたことから、LPS は生体に不利に働く可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 入野勤, 菅家雄介, 瀬山善幸, 山川敏郎: コメディカルのための生化学. 三共出版, 99-100 (2002)
- 2) 菅家祐輔, 岩間昌彦: 生体異物と食物・栄養因子. 食衛誌, 41 95 (2000)
- 3) 加藤隆一, 哲也鎌滝: 薬物代謝学—医療薬学・毒理学の基礎として—. 東京化学同人, 131-142 (2005)
- 4) (財)厚生統計協会: 国民衛生の動向・厚生指針, 225 (1996)
- 5) 沖山茂雄: 内科学 中巻, 南山堂, 224-230 (1997)
- 6) 本間遜, 斉藤和久, 河西信彦, 丹羽充: 細菌内毒素, 講談社サイエンティフィック, 5-9 (1973)
- 7) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol.

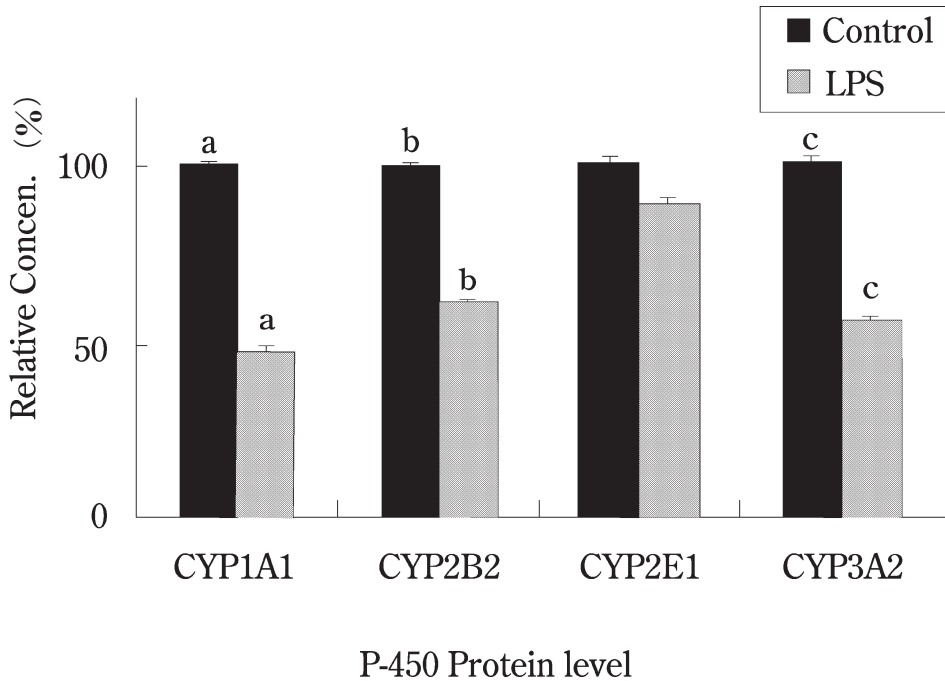


Fig. 6. Effect of LPS on cytochrome P-450 isozymes from families CYP1A1, CYP2B2, CYP3A2, CYP2E1 in Wister rats. All values are given as percentages of the mean±S.E. values for control of 10 mice and significant differences from the control value are indicated as a, b, c ($p < 0.05$) by Student's *t* test.

- Chem., 239 2370-2378 (1964)
- 8) Towbin, H. et al.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 4350-4354 (1979)
 - 9) 岡田雅人, 宮崎香: 無敵のバイオテクニカルシリーズ タンパク質実験ノート 下 羊土社 38-47 (2004)
 - 10) 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)
 - 11) 堀口美恵子, 増田宏之, 岩間昌彦, 菅家祐輔, 碓井之雄: 家政系研究紀要, 43 81-88 (2007)
 - 12) Bissell, D.M., Hammaker, L.E.: Cytochrome P-450 hemo and regulation of hepatic hemo oxygenase activity., Arch. Biochem. Biophys., 176, 91-102 (1976)

Summary

The purpose of this study was to investigate the effect of endotoxin (Lipopolysaccharide; LPS) on the hepatic drug-metabolizing enzyme activities in the animals. The drug-metabolizing enzyme activities [cytochrome P-450 (P-450)] were measured in ICR mice and Wister rats which were injected with LPS. LPS administration reduced the activities of P-450 dependent monooxygenases to varying degrees. Ethoxycoumarin-O-deethylase and ethoxyresorufin-O-deethylase activities, which were representative of P-450 isozymes from families respective CYP1A1/1A2, CYP1A1/2b5, were suppressed by LPS treated Mice. However, p-nitrophenol hydroxylation activity, which was representative of P-450 isozymes from family CYP2E1 was unaffected. Intraperitoneal treatment of rats with LPS reduced that the relative protein content of CYP1A1, CYP2B2 and CYP3A2 were determined by Western blot analysis, whereas LPS had little on that of CYP2E1. LPS can have differential effects on components of the P-450 which could result in significant changes in susceptibility to the effects of xenobiotics including carcinogens.