

# 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

著者名(日)	堀口 美恵子, 岩間 昌彦, 菅家 祐輔
雑誌名	大妻女子大学家政系研究紀要
巻	44
ページ	141-149
発行年	2008-03-03
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1114/00002085/">http://id.nii.ac.jp/1114/00002085/</a>

# 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

堀口美恵子<sup>1)</sup>・岩間昌彦<sup>2)</sup>・菅家祐輔<sup>3)</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>大妻女子大学家政学部食物学科食安全学研究室

## The Effect of Sodium Chloride and the Alcohol on Hepatic Drug Metabolism Systems in Rats

Mieko Horiguchi, Masahiko Iwama and Yusuke Kanke

Key Words : Excess NaCl, Alcohol, Drug Metabolism Systems

### 1. 緒論

好氣的生物である我々の体細胞は代謝や呼吸に酵素を利用しており、その過程で生成される活性酸素やラジカルの脅威に常にさらされている<sup>1,2)</sup>。しかし、生体には様々な活性酸素の毒性発現に対して多様な防御系が存在しており、生成系との動的平衡状態で酸化ストレスを回避している<sup>3,4)</sup>。また現代工業社会の環境に存在する多種多様な生体異物(xenobiotics)に対し、自らを守るべく様々な防御系を備えている<sup>5,6)</sup>。しかし、それらにも限界があり、破綻をきたした場合には様々な疾病が発現する。近年、我が国の死因の一位を占めている癌に対し<sup>7)</sup>、その一次予防に関する社会的関心は高く、特に食習慣との関係に注目した多くの疫学的、実験的研究が進められている<sup>8,9)</sup>。かつての日本型食生活に特徴的であった食塩の摂取過剰も癌発症リスクの一つと考えられている<sup>10,11)</sup>。日本人の一人一日当りの食塩摂取量は、近年にかけて 11 g 前後へと減少した<sup>12)</sup>ものの個人差も大きく、日本人の目標摂取量 10 g 未満<sup>13)</sup>に比べると依然摂り過ぎている現状がある。一方、アルコール摂取が身体に及ぼす影響についても様々な研究が行われており、過度のアルコールは肝臓、咽喉頭、喉頭、および食道癌などのリスクを増加させるという報告もある<sup>14)</sup>。

環境に存在する化学発癌物質の多くは、生体内で活性化されて癌原性を獲得する。例えば、大気汚染物質、タバコの煙、焙煎食品などに広く存在する Benzo(a)pyrene(B(a)P) は、それ自身では不活性であるが、生体内の代謝酵素や活性酸素により活性

化されると、遺伝情報を担う DNA の損傷を誘発することが知られている。すなわち、薬物代謝系の第一段階反応においてチトクローム P-450(P-450) と結合し、さらに NADPH チトクローム C-リダクターゼ(Cyt.C-R)により電子が伝達されて酸化物となり、DNA などの生体内高分子と共有結合して、細胞の突然変異や組織の癌化を引起すたとされている。しかし、これらの第一段階反応生成物が還元型グルタチオン(GSH)を補酵素とする酵素、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)により抱合体を形成する第二段階反応において、さらに極性を増した形となれば尿や胆汁を通して排泄され、癌化から免れる可能性がある<sup>15)</sup>。発癌や老化の機序の一つとして、活性酸素の関与が注目されているが、活性酸素は生体膜に存在する不飽和脂肪酸の酸化や、核内 DNA の損傷に影響を与えることが知られている。この活性酸素を防御する系において、大きな役割を果たしている生体抗酸化剤の一つが上記の GSH である<sup>16)</sup>。GSH はそれ自身がラジカル消去作用を有する他、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)と共役して活性酸素によって誘起される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や過酸化水素(LOOH)を還元する。それに伴って生ずる酸化型グルタチオン(GSSG)は、グルタチオンリダクターゼ(GSSG-R)によって再還元され、通常 GSH は過不足のない状態で維持されている。以上のように、発癌性の消長などに深く関わる薬物代謝系や活性酸素消去系を構成する GSH の量、および酵素の活性は、様々な生体異物や栄養状態により変動することが知られている<sup>17-20)</sup>が、食塩についての知見はほとんどない<sup>21)</sup>。我々は既に食塩の摂取過剰による

疾病発現機構の手がかりを得るため、高塩食投与ラットの肝 GSH 関連酵素(薬物代謝系、活性酸素消去系)の変動を360日間にわたり観察した<sup>22)</sup>。また90日間にわたる高塩食下でタンパク質の量や質を変化させた場合の影響についても報告した<sup>23,24)</sup>。さらに高塩食下における急性アルコール投与の影響を報告した<sup>25)</sup>が、今回はアルコール慢性投与の実験系への影響を検討した。

## 2. 実験方法

### 1) 実験動物と飼育方法

生後4週齢のJcL Wistar系雄ラット(日本クレア株式会社)を、対照群(C群20匹)とNaCl群(N群20匹)に分け、C群には市販粉末飼料(オリエンタル酵母工業株式会社:MF)を、N群にはこれに8%のNaClを加える飼料(Table 1)を与え、90日間飼育した。なお、飲料水としては両群に蒸留水を与えた。90日後にC群とN群をさらに2分し、C群、CA群、N群、NA群の4群、各10匹とし、さらに90日間飼育した。この間、飲料水としてはC群とN群には引き続き蒸留水を、CA群とNA群には5w/v%エタノール溶液を与えた。飼料、および飲料水はad libで与え、飼育室の条件は温度 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 15\%$ 、明期7時-19時とした。合計180日間飼育した後、20時間絶食させて屠殺した。なお、屠殺前6日間はラット尾動脈圧脈拍測定装置(NATUME:RN-210)により血圧を測定した。すなわち、ラットを $60^\circ\text{C}$ の予熱箱中で十分暖めた後固定器に入れ、尾をカフに通してセンサーを閉じ、規

則正しい脈が検出されてから、尾を加圧して血圧を測定した。

### 2) 試薬

Glutathione: oxidized form (GSSG)、cumene hydroperoxide (CHP)、glutathion reductase (GSSG-R)、cytochrome C (Cyt.C)は、Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo., U.S.A.)製、1,1,3,3-tetraethoxy propane、2-thiobarbituric acid (TBA)、glutathione: reduced form (GSH)、5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、2,4-dinitrochlorobenzene (CDNB)は、和光純薬工業株式会社(大阪)製、 $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH)はオリエンタル酵母工業株式会社(東京)製、hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )は関東化学株式会社(東京)製のものをそれぞれ使用した。また、血清中のクレアチニンと尿酸の測定には和光純薬工業株式会社の臨床検査キット(クレアチニン-テストワコー、尿酸C-テストワコー)を用いた。その他の試薬は、全て市販特級品をそのまま用いた。

### 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冷0.9% NaCl-50 mM phosphate buffer (0.1 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 含有; pH 7.4)で灌流した後摘出し、細切後、4倍量の冷50 mM phosphate buffer (0.1 mM EDTA 含有; pH 7.4)でホモジナイズした。このホモジネートを $4^\circ\text{C}$ 、 $10,000 \times g$ で20分間遠心分離した。さらにその上清を $4^\circ\text{C}$ 、 $105,000 \times g$ で60分間遠心分離し、その上清をサイトゾール画分(Cyt)とし、酵素反応の酵素標品として用いた。沈査は再懸濁後、さらに $4^\circ\text{C}$ 、 $105,000 \times g$ 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(Mic)とし、同様に酵素標品とした<sup>26)</sup>。

##### b. GSH-Px 活性

Lawrenceらの方法<sup>27)</sup>により基質として0.25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ と1.5 mM CHPを用いて測定した。50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、1 mM EDTA、1 mM  $\text{NaN}_3$ 、0.2 mM NADPH、1 mM GSH、1 E.U./ml GSSG-Rから成る反応溶液(pH 7.0) 0.8 mlと酵素源0.1 mlを石英セルに入れ、 $25^\circ\text{C}$ で5分間放置後、基質溶液0.1 mlを加え、吸光度の減少割合を340 nm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Cytを用い、活性は1分間に

Table 1 Percentage composition of diets

Ingredients	Groups	
	C	N
milk casein <sup>a)</sup>	21.10	21.10
dl-methionine	0.42	0.42
corn oil	5.00	5.00
meneral mixture <sup>b)</sup>	3.50	3.50
vitamin mixture <sup>b)</sup>	1.00	1.00
choline bitartarate	0.20	0.20
cellulose	5.00	5.00
sodium chloride	0	8.00
corn starch	77.65	69.65

<sup>a)</sup> Protein : 85.3%

<sup>b)</sup> AIN-76 (1977)

酸化される NADPH の量で表した。

#### c. GSSG-R 活性

Worthington らの方法<sup>28)</sup>により測定した。石英セルに 21 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、26 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、1 mM EDTA、0.2 M KCl、1 mM EDTA、1 mM GSSG、0.1 mM NADPH からなる基質溶液 (pH 7.0) 3 ml を入れ、25°C で 2 分間放置後、酵素標品 0.1 ml を加え、吸光度の減少割合を 340 nm で測定した。盲検には酵素標品の代わりに蒸留水を使用した。酵素標品は Cyt を用い、活性は 1 分間に酸化される NADPH の量で表した。

#### d. Cyt. C-R 活性

Phillips らの方法<sup>29)</sup>により測定した。反応溶液は 0.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.6)、0.1 M KCN、10 mM NADPH、蒸留水を 140:2:1:42 の割合で混合して用いた。ガラスセルに反応溶液 1.85 ml を入れ、25°C で 2 分間放置後、2 mM Cyt.C 0.05 ml と酵素標品 0.1 ml を加え、吸光度の増加割合を 550 nm で測定した。盲検には酵素標品の代わりに蒸留水を使用した。酵素標品は Mic を用い、活性は 1 分間に生成される還元型 Cyt.C の量で表した。

#### e. AHH 活性

根本らの方法<sup>30)</sup>により測定した。褐色共栓付き試験管に 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4) 0.2 ml、0.5 mM EDTA 0.1 ml、蒸留水 0.48 ml、希釈酵素標品 0.1 ml、1.26 mg/ml の B(a)P-aceton 溶液 0.02 ml を入れ、37°C で 1 分間放置後、5 mM NADPH・60 mM MgCl 20.1 ml を加えた。さらに 37°C で 15 分間放置後、n-hexane: acetone(3:1) 4.5 ml を加え、30 秒間攪拌した後、2,500 rpm、5 分間遠心分離した。この上清 3.0 ml を 1N NaOH 3.0 ml に加え、再び 30 秒間攪拌した後、2,500 rpm、5 分間遠心分離し、アルカリ層の蛍光強度を励起波長 396 nm、蛍光波長 522 nm で測定した。盲検は加温せず、5 mM NADPH・60 mM MgCl 20.1 ml を加える前に n-hexane: acetone 溶液を加えたものを用いた。標準物質としては 3-OH-B(a)P の量で表した。

#### f. GST 活性

Habig らの方法<sup>31)</sup>により、基質として 20 mM CDNB を用いて測定した。石英セルに 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 0.5 ml、20 mM GSH 0.05 ml、希釈酵素標品 0.45 ml を加え、吸光度の増加割合を 340 nm で測定した。盲検には酵素標品の代わりに蒸留水を使用した。酵素標品は Cyt を用い、活性は 1 分間に抱合される CDNB の量で表した。

#### g. UDPGT 活性

Matsui らの方法<sup>32)</sup>により測定した。試験管に 1.8 mM p-nitrophenol 0.2 ml、0.3 M Tris-HCl buffer (60  $\mu\text{M}$  EDTA、30 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.05% Triton X-100 含有; pH 7.2) 0.3 ml、希釈酵素標品 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、0.2 M 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。

#### h. ST 活性

Matsui らの方法<sup>32)</sup>により測定した。試験管に 315  $\mu\text{M}$  p-nitrophenol 0.2 ml、0.3 M Tris-HCl buffer (60  $\mu\text{M}$  EDTA、30 mM  $\text{MgCl}_2$  含有; pH 7.2) 0.3 ml、希釈酵素標品 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、0.2 M 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。

#### (2) その他の定量

##### a. 血清の調製

飼育終了後、脱血死させる際に採取した血液は以下の様に処理した。即ち血液は 4°C で 30 分間放置後、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。

##### b. 過酸化脂質含量

Uchiyama らの方法<sup>33)</sup>により測定した。灌流して細切した肝臓を 9 倍量の冷 1.15 M KCl でホモジナイズした。共栓付試験管にホモジネート 0.5 ml、1.0%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  3.0 ml、0.6% TBA 1.0 ml を入れ、沸騰水浴中で 45 分間加熱後、速やかに室温まで冷却した。さらに n-butanol 4.0 ml を加えて激しく攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、そのブタノール層の吸光度を 535 nm と 520 nm で測定した。また、ホモジネートの代わりに盲検には 0.9% NaCl を、標準には 10 nmol/ml の 1, 1, 3, 3-tetraethoxy propane-methanol 溶液を用いた。なお、含量は TBA 陽性物質であるマロンジアルデヒドとして表した。

##### c. グルタチオン含量

Ellman 法<sup>34)</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×g で 20 分間遠心分離した。その上清 0.5 ml に 0.1 M 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。

d. P-450 含量

Omura らの方法<sup>35)</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 含有量を求めた。なお、酵素標品は Mic を用いた。

e. タンパク質の定量

Lowry らの方法<sup>36)</sup>により測定した。希釈酵素源 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。

f. 血清クレアチニン含量

Jaffe' 法<sup>37)</sup>により測定した。血清 0.5 ml に除タンパク試薬 3.0 ml を加え、室温に 10 分間放置した後、

2,500 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清 2.0 ml を 28°C で 5 分間加温した後、ピクリン酸溶液 1.0 ml、0.75 N NaOH 溶液 1.0 ml を加え、再び 28°C で 20 分間加温した。その後、30 分以内に 520 nm で吸光度を測定した。なお、標準にはクレアチニン標準液を蒸留水で希釈して用いた。

g. 血清中尿酸含量

ウリカーゼ・TOOS 法<sup>38)</sup>により測定した。血清 0.05 ml に発色試薬 3.0 ml を加え、37°C で 5 分間加温した後、555 nm で吸光度を測定した。なお、標準には尿酸標準液を蒸留水で希釈して用いた。

4) 統計処理

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

### 3. 結果

1) 成育に関する成績

体重は C 群、CA 群、N 群、NA 群とも 90 日にかけてほぼ直線的に、さらに 180 日にかけては緩やかに増加した。最終体重は C 群に比べ N 群と NA 群で、CA 群に比べ NA 群で、各々約 10% 有意に小さかったが、アルコール摂取による明らかな差異は見られなかった (Table 2)。

肝相対重量は C 群に比べ、CA 群、N 群、NA 群で有意に大きくなった。肝タンパク質は C 群と N 群、CA 群と NA 群でほぼ同じ値を示したが、C 群に比し CA 群と NA 群で、N 群に比し NA 群でそれぞれ約 20% 有意に減少した。

Table 2 Changes in body weight, liver weight, liver protein and kidneys weight of rats during 180 days of the experimental term.

Groups	Final body weight (g)	Liver weight (g/100 g BW)	Liver protein (mg/g wet liver)	Kidneys weight (g/100 g BW)
C	511 ± 11	2.9 ± 0.1	17.6 ± 0.7	0.69 ± 0.02
CA	504 ± 15	3.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.01
N	463 ± 17 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	17.0 ± 0.7	0.91 ± 0.03 <sup>a</sup>
NA	448 ± 12 <sup>a,b</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	13.6 ± 0.9 <sup>a,c</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>a,b</sup>

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet

CA, control diet supplying alcohol

N, sodium chloride containing diet

NA, sodium chloride containing diet and alcohol

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the C group.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the CA group.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the N group.

Table 3 Changes in food intake, water intake, total energy intake and alcohol energy ratio of rats during later 90 days of the 180 experimental days.

Groups	Food intake (g/day)	Water intake* (ml/day)	Total energy intake** (kcal/day)	Alcohol energy ratio (%)
C	22 ± 1	41 ± 2	76 ± 2	—
CA	18 ± 1 <sup>a</sup>	43 ± 4	79 ± 3	20 ± 1
N	23 ± 1	121 ± 3 <sup>a,b</sup>	78 ± 2	—
NA	16 ± 1 <sup>a,b,c</sup>	72 ± 4 <sup>a,b,c</sup>	78 ± 4	31 ± 2 <sup>b</sup>

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet

CA, control diet supplying alcohol

N, sodium chloride containing diet

NA, sodium chloride containing diet and alcohol

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the C group.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the CA group.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the N group.

\* C, N: Draib water; CA, NA: 5% (w/v) alcohol

\*\* Food energy [C, CA: 360 kcal/100 g; N, NA: 331 kcal/100 g]

Water energy [CA, NA: 0.35 kcal/100 ml]

腎相対重量はC群に比べN群とNA群で、CA群に比べNA群でそれぞれ約25%有意に高かったが、アルコール摂取による明らかな差異は見られなかった。

Table 3は、180日の飼育期間の後半90日間における摂食量について示したものである。飼料摂取量はアルコール摂取により減少したが、アルコールからのエネルギー摂取を加味すると、4群間の摂取カロリーはほぼ同量であった。なお、摂水量は、食塩摂取により有意に増加した。

血圧はC群に比べ、CA群、N群、NA群でそれぞれ有意に上昇した(Table 4)。また、N群に比べ、NA群では有意な低値を示した。

## 2) 活性酸素消去系への影響

肝臓の過酸化脂質量は、N群に比べNA群で26%有意に増加した(Table 5)。GSH量は、C群に比べCA群で31%有意に少なかった。

GSH-PxのSe依存型とTotalの活性、およびGSSG-R活量は、いずれの群間でも明らかな差異が認められなかった(Table 6)。

## 3) 薬物代謝系への影響

第一段階酵素のCyt.C-R、およびP-450量は、いずれの群間でも明らかな差異は見られなかったが、AHH活性ではN群に比べNA群で14%有意に減少した(Table 7)。

第二段階酵素では、GST活性においてNA群が他の3群に比べ有意に低値を示した(Table 8)。

Table 4 Effect of sodium chloride and/or alcohol on blood pressures during 180 days of the experimental period.

Groups	Blood pressure (mmHg)
C	145 ± 1
CA	150 ± 2 <sup>a</sup>
N	176 ± 2 <sup>a</sup>
NA	155 ± 4 <sup>a,c</sup>

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet

CA, control diet and alcohol

N, sodium chloride containing diet

NA, sodium chloride containing diet and alcohol

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the C group.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the CA group.

UDPGT、およびGST活性は、いずれの群間でも明らかな差異は見られなかった。

## 4) 血清中成分への影響

クレアチニン量は、C群に比べNA群で12%有意に増加した(Table 9)。尿酸量では、C群に比べCA群で22%有意に増加した。

Table 5 Effect of sodium chloride and/or alcohol on lipid peroxide and glutathione levels during 180 days of the experimental period.

Groups	LOOH (n mol MDA/mg protein)	GSH (u mol/g liver)
C	2.69 ± 0.28	2.49 ± 0.24
CA	2.72 ± 0.22	1.73 ± 0.12 <sup>a</sup>
N	2.32 ± 0.22	1.97 ± 0.10
NA	2.93 ± 0.14 <sup>c</sup>	2.23 ± 0.27

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet  
CA, control diet and alcohol  
N, sodium chloride containing diet  
NA, sodium chloride containing diet and alcohol  
LOOH, lipid peroxide  
GSH, reduced glutathione

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the C group.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the N group.

Table 6 Effect of sodium chloride and/or alcohol on activities of glutathione relating enzymes during 180 days of the experimental period.

Groups	GSH-Px*	GSH-Px**	GSSG-R (n mol MDA/mg protein)
C	47 ± 9	75 ± 15	71 ± 2
CA	68 ± 6	115 ± 13	70 ± 3
N	61 ± 12	90 ± 17	74 ± 3
NA	63 ± 11	113 ± 15	72 ± 3

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet  
CA, control diet and alcohol  
N, sodium chloride containing diet  
NA, sodium chloride containing diet and alcohol  
GSH-Px, glutathione peroxidase  
GSSG-R, glutathione reductase

\* Se-dependent

\*\* Total

Table 7 Effect of sodium chloride and/or alcohol on activities of drug-metabolising enzymes (phase 1) during 180 days of the experimental period.

Groups	Cyt. C-R (n mol/mg pro/min)	P-450	AHH
C	101 ± 6	0.56 ± 0.03	0.28 ± 0.01
CA	105 ± 7	0.59 ± 0.03	0.29 ± 0.02
N	102 ± 11	0.58 ± 0.03	0.29 ± 0.01
NA	105 ± 14	0.59 ± 0.04	0.25 ± 0.01 <sup>c</sup>

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet  
CA, control diet and alcohol  
N, sodium chloride containing diet  
NA, sodium chloride containing diet and alcohol  
Cyt. C-R, cytochrom C-reductase  
P-450, cytochrom P-450  
AHH, aryl hydrocarbon hydroxylase

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the N group.

#### 4. 考察

食塩やアルコールの慢性的な摂取過剰は、生活習慣病のリスクファクターの一つとされているが、その作用発現機構については完全には解明されていない。しかし、これらの疾病の発生には活性酸素の関与が示唆されている。そこで本研究では、これらの疾病に対する食塩やアルコールの作用機序を解明するための手掛かりを得るため、ラットに高塩食下でアルコールを与え、肝臓の酵素活性への影響を中心に調べた。すなわち、8% (w/w) NaCl 食と 5% (w/v) エタノール飲料水を与える群を組み合わせ、活性酸素消去系、および薬物代謝系のグルタチオン関連酵素への影響を検討した。

ラットの生育に関し、体重増加は NaCl 摂取によって抑制されたが、エタノール摂取による影響は受けなかった。正常食と高塩食の群では飼料摂取量、およびエネルギー摂取量に差異は見られなかったが、高塩食の群では飲水量が正常食の約 3 倍と多かったため、飼料効率が悪かったものと思われる。また、正常食に対し他の 3 群では血圧が上昇し、NaCl、およびエタノール摂取の影響が見られた。しかし、高

Table 8 Effect of sodium chloride and/or alcohol on activities of drug-metabolising enzymes (phase 2) during 180 days of the experimental period.

Groups	GST	UDPGT	ST
	(n mol/mg pro/min)		
C	770 ± 20	11.8 ± 1.0	0.68 ± 0.04
CA	718 ± 23	11.0 ± 0.8	0.67 ± 0.04
N	720 ± 39	9.4 ± 0.9	0.63 ± 0.03
NA	601 ± 14 <sup>a,b,c</sup>	11.8 ± 1.0	0.60 ± 0.04

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet  
CA, control diet and alcohol  
N, sodium chloride containing diet  
NA, sodium chloride containing diet and alcohol  
GST, glutathione S-transferase  
UDPGT, UDP-glucuronyltransferase  
UDPGT, UDP-glucuronyltransferase  
ST, sulfotransferase

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the C group.

<sup>b</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the CA group.

<sup>c</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the N group.

Table 9 Effect of sodium chloride and/or alcohol on serum creatinine and uric levels during 180 days of the experimental period.

Groups	Creatinine	Uric acid
	(mg/dl)	
C	0.85 ± 0.02	2.3 ± 0.1
CA	0.93 ± 0.03	2.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
N	0.90 ± 0.03	2.5 ± 0.1
NA	0.95 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1

Values are expressed as the mean of data from 10 rats ± SE.

Abbreviations: C, control diet  
CA, control diet and alcohol  
N, sodium chloride containing diet  
NA, sodium chloride containing diet and alcohol

<sup>a</sup> Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the C group.

塩食に対しエタノールを摂取すると、逆に血圧は低下していた。これはエタノール摂取下の高塩食では、エタノール由来のエネルギーの影響で、高塩食単独の群より摂取量が少なく Na 摂取も少なかったことが原因として考えられる。高血圧発症に Na 摂取が重要な役割を演じていることは広く認められている<sup>39,40)</sup>が、血圧上昇の機序は複雑であり、完全には解明されていない部分もある。本実験の結果から、腎 Na 排泄機能の低下を主因として血圧が上昇し<sup>40-42)</sup>、その機能低下を補うために腎重量が増加したことが考えられる。また、正常食におけるエタノール摂取が血清尿酸量を増加させたことは、アルコール摂取が尿管における尿酸排泄に阻害作用を示すという報告<sup>43)</sup>と一致する。

活性酸素消去系においては、高塩食下のエタノール投与により過酸化脂質量の増加、正常食下のエタノール投与により GSH 量の減少が認められた。これは、正常食下では GSH による抗酸化作用によって脂質過酸化が抑制された一方、高塩食下では GSH の抗酸化作用が発揮されなかったために過酸化脂質の増加が見られたものと考えられる。肝臓の GSH 量は、食餌条件によって大きく変動することが報告されており<sup>19,20)</sup>、本実験でも NaCl やエタノール摂取との関連が伺われる。また、エタノール摂取によって GSH-Px 活性の増加傾向が見られたことは、慢性的なエタノール摂取に由来するかもしれない活性酸素の生成を抑制するために機能したことも考えられる。

薬物代謝系の P-450 はアルコールによって誘導されることが知られており、急性アルコール投与時では P-450 量の増加が確認された<sup>25)</sup>が、今回の慢性アルコール投与時には P-450 量の増加は認められなかった。この原因は不明であるが、エタノールに特異性の高い P-450 分子種の発現が投与方法により異なる可能性もあり、今後は P-450 量を分子種に分けて測定する必要があると思われる。

なお、正常食下の慢性アルコール投与では認められず、高塩食下のアルコール投与で初めて認められた有意な変化に、過酸化脂質の増加と AHH、および GST 活性の減少がある。これらの変化はいずれも急性アルコール投与時には見られなかった。AHH 活性の低下はアルコールが直接、発癌物質を活性化する可能性がないことを示唆するが、過酸化脂質の増加は様々な活性酸素やフリーラジカルの生成を意味し、さらに GST 活性の減少は発癌物質の解毒が抑制される可能性を示す。以上の結果から、食塩摂取



過剰下での慢性的なアルコール摂取は、生体異物や活性酸素の処理機構に直接、あるいは間接的に影響を及ぼし、従来から指摘されている様々な疾病の発生や進展に関与することが示唆された。

## 5. 要約

正常食下、または高塩食下における慢性アルコール投与の影響を、肝臓の酵素活性の変動を中心に検討した。その結果得られた酵素活性の変化の中には、NaCl やエタノールの組み合わせによってもたらされる生体影響に対し、生体に不利な現象を起こさないようにする防御機構のひとつであると思われるものもあった。以上の点から、食塩の摂取過剰は活性酸素消去系と薬物代謝系を変動させ、さらにアルコールはそれを拡大し、懸念されているような疾病の発生や進展に関与する可能性が示唆された。

## 参考文献

- Oikawa S., Ohnishi S., Murata M., Hiraku Y. and Kawanishi S.: Mechanism of clustered DNA damage induced by oxidative stress and its role in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ. Mutagen Res.*, 26 125-133 (2004)
- Hesse, S., Jernstrom, B., Marines, M., Moldeus, P., Christodoulides, L., and Ketterer, B.: Inactivation of DNA-binding metabolites of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by glutathione and glutathione S-transferases. *Carcinogenesis*, 3 757-760 (1982)
- Ide H. and Katafuchi A.: Repair mechanism of DNA damage induced by oxidative stress. *Environ. Mutagen Res.*, 26 149-157 (2004)
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W.: DNA repair and mutagenesis. ASM press (1994)
- 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 三共出版 (2002)
- Tsuzuki T., Yamauchi K., Isoda T., Egashira A., Kura S. and Nakatsu Y.: Spontaneous tumorigenesis and mutagenesis in DNA repair-deficient mice. *Environ. Mutagen Res.*, 27 101-110 (2005)
- (財)厚生統計協会編: 国民衛生の動向. 54 46-54 (2007)
- 鶴尾隆, 谷口維紹: がんの疫学. 東京大学出版会 (2006)
- Kinae N. and Masuda S.: Studies on antimutagens. *Environ. Mutagen Res.*, 24 129-144 (2002)
- 入野勤, 碓井之雄, 菅家祐輔, 瀬山義幸: 病態生化学. 丸善株式会社 159-168 (1999)
- Tuyns, A.J.: Sodium chloride and cancer of the digestive tract. *Nutri. Cancer*, 4 198-205 (1983)
- 健康・栄養情報研究会: 国民健康・栄養調査報告. 52 第一出版 (2006)
- 厚生労働省策定: 日本人の食事摂取基準 [2005年版]. 16-17 第一出版 (2005)
- 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)
- 加藤隆一, 鎌滝哲也: 薬物代謝学. 東京化学同人 (2005)
- Kaplowitz, N. and Ookhtens, M.: The regulation of hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 25 715-744 (1985)
- 近藤宗平: 危険な酸素と生物の適応的進化. *実験医学*, 4 1065-1066 (1986)
- 藤本健四郎: 過酸化脂質とは. *臨床栄養*, 73 129-133 (1988)
- Lauterburg, B.H., Adams, J.D., and Mitchell, J. R.: Hepatic glutathione homeostasis in the rat—efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, 4 586-590 (1984)
- Tateishi, N., Higashi, T., Sinya, S., Naruse, A. and Sakamoto, Y.: Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem.*, 75 93-103 (1974)
- 長谷川享, 友国勝磨, 古川文夫, 高橋道人: 胃の脂質過酸化反応に対する食塩(胃癌プロモーター)の促進作用. *過酸化脂質研究*, 11 57 (1987)
- Horiguchi, M. et al.: Long-term exposure of wistar rats to high dietary sodium chloride level. II. Change in hepatic drug-metabolizing and glutathione-related enzyme systems. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 62 54-59 (1991)
- 堀口美恵子, 岩間昌彦, 菅家祐輔: 食塩負荷ラットの肝グルタチオン関連酵素系に及ぼすタンパク質レベルの影響. *大妻女子大学家政系紀要*, 38 127-137 (2002)
- 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及ぼす高塩食とタンパク質の影響. *大妻女子大学家政系紀要*, 40 157-168 (2004)
- 堀口美恵子, 岩間昌彦, 菅家祐輔: 食塩負荷ラット

- の肝薬物代謝系に及ぼすアルコール投与の影響。  
大妻女子大学家政系紀要, 42 85-92 (2006)
- 26) Katki, A.G. and Myers, C.E.: Membrane-bound glutathione peroxidase-like activity in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96 85-91 (1980)
- 27) Lawrence, R.A. and Burk R.F.: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71 952-958 (1976)
- 28) Worthington, D.J. and Rosemeyer, M.A.: Human glutathione reductase-purification of crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, 48 166-177 (1974)
- 29) Phillips, A.H. and Langdon, R.G.: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome C reductase-Isolation, characterization and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, 237 2625-2660 (1962)
- 30) Nemoto, N.: Isolation of benzopyrene metabolites. *トキシコロジーフォーラム*, 6 649-658 (1983)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) Uchiyama, M. and Mihara, M.: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, 86 271-278 (1978)
- 34) Ellman, G.L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 70-77 (1959)
- 35) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239 2370-2378 (1964)
- 36) 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)
- 37) 柴田進, 北村元仕: 日本臨床生化学定量法, 163-166 中山書店 (1964)
- 38) 佐々木匡秀, 上田尚紀, 北村元仕, 中村年正: 人体成分のサンプリング (血液), 89 講談社 (1972)
- 39) 奈良信雄: 人体の構造・機能と疾病の成り立ち 342 医歯薬出版株式会社 (2003)
- 40) 川崎晃一, 上園慶子: ナトリウム, カリウムと高血圧. 内科, 62 456-461 (1988)
- 41) Noda, K. and Arakawa, K.: Pathogenesis of hypertension-a review. *日本臨床*, 47 1898-1899 (1989)
- 42) Takahashi, K. and Fujita, T.: Role of sodium and potassium in hypertension. *日本臨床*, 47 1923-1929 (1989)
- 43) 西岡久寿: 尿酸代謝異常. *日本臨床*, 46 116-120 (1988)

### Summary

The effect of sodium chloride (NaCl) and/or alcohol on hepatic glutathione-related enzyme systems in rats was investigated for a period of 180 days. The blood pressure of the NaCl-treated rats were found to be significantly elevated.

Feeding of NaCl and/or alcohol led to increase of LOOH content and led to decrease of glutathione content and GST activity. On the basis of the results obtained in the present study, it may be suggested that long-term feeding of high NaCl and alcohol reduces the detoxification of many xenobiotic compounds, and generates the oxygen radicals and lipid peroxides leading to various pathological processes.