

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

堀口美恵子¹⁾、岩間昌彦²⁾、菅家祐輔³⁾

1) 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) 家政学部食物学科食安全学研究室

The Effect of the Alcohol on Hepatic Drug Metabolism Systems in Rats Fed High Sodium Chloride Diets

Mieko Horiguchi, Masahiko Iwama, Yusuke Kanke

Key Words : Excess NaCl, Alcohol, Drug Metabolism Systems

緒論

アルコールが身体に及ぼす影響については様々な研究が行われており、適度の摂取は心臓病予防などに役立つことが示唆されているが、過度のアルコールは肝臓、咽頭、喉頭、および食道ガンなどのリスクを増加させることも報告されている。特に喫煙との組み合わせによりその傾向は増加するという報告がある¹⁾。近年のわが国の死因の1位を占めているガンに対し²⁾、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³⁻⁵⁾。伝統的な日本型食生活にみられた食塩の摂取過剰もガン発症リスクの一つと考えられている。日本人の1人1日当りの食塩摂取量は、近年にかけて12g前後へと減少した⁶⁾ものの個人差も大きく、日本人の目標摂取量10g未満⁷⁾に比べると依然摂り過ぎていた現状がある。

食塩と高血圧との関わりに比べると、食塩とガンとの間には明らかな証拠は少ない⁸⁾。高塩食は胃、および胃粘膜の脂質過酸化反応を促進する⁹⁾ため、胃ガンのリスクを増加させるという報告もあるが、その作用発現機構についてはまだ解明されていない。

生活環境中に存在する化学発ガン物質の多くは、生体内で活性化されてガン原性を獲得する¹⁰⁾。例えば、大気、飲料水、加熱食品からタバコの煙にまで広く存在するBenz(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、遺伝情報伝達物質である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ガン化を引起こすとされている¹¹⁻¹³⁾。しかし、続いて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解毒されてガンから免れる¹⁴⁾。発ガンや老化の機序の一つとして、近年活性酸素の関与する可能性が注目されているが、活性酸素は生体内において、不飽和脂肪酸の酸化や、DNA損傷に影響を与えることなどが知られている¹¹⁻¹³⁾。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¹⁴⁾。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脚系が存在しており、生成系との動的平衡状態で通常は酸素障害が回避されている¹⁵⁾。この活性酸素防御系において、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¹⁶⁾。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H₂O₂や過酸化物質(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¹⁷⁾。以上のように、発ガン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¹⁸⁻²⁰⁾が、食塩についての知見はほとんどない。我々は既に食塩の摂取過剰によるガンなどの慢性疾患発現への関与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結果を報告した²¹⁾。また90日間の高塩食摂取下でのタンパク質の量や質との関連についても報告した^{22, 23)}。今回は、さらに食塩の摂取過剰状態における急性アルコール摂取の実験系への影響を検討した。

1. 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2群に分け(Table 1)、それぞれの飼料で90日間飼育した。16時間の絶食後、C群とN群のラットをさらに2分し、一方(CA群、NA群)には体重1kgあたり5gのアルコール(40w/v%)を胃内に強制投与した。もう一方(C群、N群)には対照として同様に、体重1kgあたり12.5 mlの蒸留水を投与し、各々4時間後に屠殺した。1群は10匹とし、飼料、および飲水は*ad lib*で与え、温度22±0.5、湿度50±15%、明期7時-19時の飼育室で飼育した。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)、glutathione 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、 γ -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 (H₂O₂)は関東化学株式会社(東京)製のものそれぞれを使用した。また、血清中クレアチニン、尿酸、および尿素窒素含量、A/G比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、尿素窒素B-テストワコー、A/G B-テストワコー)を用いた。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-50mM phosphate buffer (0.1mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA)含有; pH7.4)で灌流した後摘出し、細切後、4倍量の冷50mM phosphate buffer (0.1mM EDTA含有; pH7.4)でホモジナイズした。このホモジネートを4、10,000 x gで20分間遠心分離した。さらにその上清を4、105,000 x 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、様々な酵素反応の酵素源に用いた。沈査は再懸濁後、さらに4、105,000 x 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)を得、同様に酵素標品とした²⁶⁾。

b. GSH-Px活性

Lawrenceらの方法²⁷⁾により基質として0.25mM H₂O₂と1.5mM CHPを用いて測定した。50mM KH₂PO₄、50mM K₂HPO₄、1mMEDTA、1mM NaN₃、0.2mM NADPH、1mM GSH、1E.U./ml GSSG-Rから成る反応溶液(pH 7.0)0.8mlと酵素源0.1mlを石英セルに入れ、25で5分間放置後、基質溶液0.1mlを加え、吸光度の減少割合を340nmで測定した。盲検には酵素源の代わりに蒸留水を使用した。酵素源はCytを用い、活性は1分間に酸化されるNADPHの量で表した。

Table 1 Percentage composition of diets

Ingredients	Groups	
	C	N
milk casein ^{a)}	21.10	21.10
dl-methionine	0.42	0.42
corn oil	5.00	5.00
meneral mixture ^{b)}	3.50	3.50
vitamin mixture ^{b)}	1.00	1.00
choline bitartrate	0.20	0.20
cellulose	5.00	5.00
sodium chloride	0	8.00
corn starch	77.65	69.65

^{a)} Protein : 85.3%

^{b)} AIN-76 (1977)

c . GSSG-R活性

Worthingtonらの方法²⁸⁾により測定した。石英セルに21mM KH_2PO_4 、26mM K_2HPO_4 、1mM EDTA、0.2M KCl、1mM EDTA、1mM GSSG、0.1mM NADPHからなる基質溶液 (pH 7.0) 3mlを入れ、25℃で2分間放置後、酵素源0.1mlを加え、吸光度の減少割合を340nmで測定した。盲検には酵素源の代わりに蒸留水を使用した。酵素源は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²⁹⁾により測定した。反応溶液は0.5M potassium phosphate buffer (pH7.6)、0.1M KCN、10mM 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1.85mlを入れ、25℃で2分間放置後、2mM Cyt.C 0.05mlと酵素源0.1mlを加え、吸光度の増加割合を550nmで測定した。盲検には酵素源の代わりに蒸留水を使用した。酵素源は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 . GST活性

Habigらの方法³⁰⁾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 (pH6.5) 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わりに蒸留水を使用した。酵素源はCytを用い、活性は1分間に抱合されるCDNB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30分間、4℃で放置後遠心分離 (3000rpm、20分間) し、上清を血清として -20℃で保存した。

b . 過酸化脂質含量

Uchiyamaらの方法³¹⁾により測定した。灌流して細切した肝臓を9倍量の冷1.15M KClでホモジナイズした。共栓付試験管にホモジネート0.5ml、1.0% H_3PO_4 3.0ml、0.6% TBA 1.0ml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 4.0mlを加えて激しく攪拌後、3000rpm、10分間遠心分離し、そのブタノール層の吸光度を535nmと520nm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10nmol/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³²⁾により測定した。灌流して細切した肝臓0.5gに0.1M phosphate buffer (pH7.4) 2.25mlを加え、ホモジナイズしたものを1.5mlに等量の4% sulfosalicylic acidを加えて攪拌した。4℃で30分間放置後、4、10,000x g、20分間遠心分離し、その上清0.5mlに0.1M phosphate buffer (pH8.0; 0.1mM DTNB含有) 4.5mlを加え、5分後に412nmで吸光度を測定した。なお、標準には0.1M phosphate buffer (pH7.4) で溶解したGSHを使用した。

d . P-450含量

Omuraらの方法³³⁾により測定した。50mM Tris-HCl buffer (pH7.25; 3mM MgCl_2 含有) で希釈した酵素源をガラスセル2本に分注し、まず一方にCOを1分間通し、400-500nmで走査した。次いで両方のセルに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 数mgを加え、よく攪拌した後、再び400-500nmで走査し、CO差スペクトルの450nmと490nmの吸光度の差からP450含有量を求めた。なお、酵素源はMicを用いた。

e . タンパク質の定量

Lowryらの方法³⁴⁾により測定した。希釈酵素源0.2mlに2% Na_2CO_3 - 0.1N NaOH、0.5% CuSO_4 、1.0% $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ロッセル塩) (50:1:1) の混液1.0ml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0.1mlを加え、30分間放置後、500nm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³⁵⁾により測定した。血清0.5mlに除タンパク試薬3.0mlを加え、室温に10分間放置した後、2,500rpmで10分間遠心分離した。その上清2.0mlを28℃で5分間加温した後、ピクリン酸溶液1.0ml、0.75N NaOH溶液1.0mlを加え、再び28℃で20分間加温した。その後、30分以内に520nm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³⁶⁾により測定した。血清0.05mlに発色試薬3.0mlを加え、37℃で5分間加温した後、555nm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

得られた成績は平均値 ± 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。

Table 2 Changes in body weight, liver weight, liver protein and kidneys weight of rats during 90 days of the experimental term.

Groups	Final body weight (g)	Liver weight (g/100g BW)	Liver protein* (mg/g wet liver)	kidneys weight (g/100g BW)
C	449 ± 6	3.3 ± 0.1	201 ± 3	0.82 ± 0.02
CA		3.5 ± 0.2	185 ± 13	0.72 ± 0.01
N	370 ± 9 ^a	3.2 ± 0.1	196 ± 4	1.09 ± 0.05 ^a
NA		3.9 ± 0.1 ^{ac}	172 ± 6 ^{ac}	1.04 ± 0.04 ^{ab}

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

^a Significantly different (p < 0.05) from value for the C group.

^b Significantly different (p < 0.05) from value for the CA group.

^c Significantly different (p < 0.05) from value for the N group.

* Homogenate

Table 3 Changes in food intake, water intake, food efficiency ratio and protein efficiency ratio of rats during 90 days of the experimental term.

Groups	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)	Food efficiency (ratio)	Protein efficiency ratio
C	22 ± 1	41 ± 2	0.18 ± 0.01	0.74 ± 0.01
N	23 ± 1	114 ± 3 ^a	0.14 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.02 ^a

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

Abbreviations : C, control diet
N, sodium chloride containing diet

^a Significantly different (p < 0.05) from value for the C group.

Table 4 Effect of sodium chloride on blood pressures during 90 days of the experimental period.

Groups	Blood pressure (mmHg)
C	146 ± 3
N	170 ± 4 ^a

Values are expressed as the mean of data from 20 rats ± SE.

Abbreviations : C, control diet
N, sodium chloride containing diet

^a Significantly different (p < 0.05) from value for the C group.

Table 5 Effect of sodium chloride and/or alcohol on lipid peroxide and glutathione levels during 90 days of the experimental period.

Groups	LOOH (n mol MDA/mg protein)	GSH (u mol/g liver)
C	2.88 ± 0.19	2.92 ± 0.13
CA	2.32 ± 0.24	1.98 ± 0.25 ^a
N	2.96 ± 0.44	3.46 ± 1.24 ^a
NA	2.20 ± 0.16	2.34 ± 0.15 ^{ac}

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

^a Significantly different (p < 0.05) from value for the C group.

^c 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 90 days of the experimental period.

Groups	GSH-Px*	GSH-Px**	GSSG-R
	(n mol/mg protein/min)		
C	57 ± 13	73 ± 12	52 ± 1
CA	54 ± 19	75 ± 5	53 ± 3
N	45 ± 10	69 ± 7	50 ± 1
NA	93 ± 4 ^c	94 ± 9 ^c	50 ± 2

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 peroxydase

GSSG-R, glutathione reductase

^c Significantly different (p < 0.05) from value for the N group.

* Se-dependent

** Total

Table 7 Effect of sodium chloride and/or alcohol on activities of drug-metabolising enzymes (phase 1) during 90 days of the experimental period.

Groups	Cyt.C-R	P-450	AHH
	(n mol/mg pro/min)	(n mol/mg pro)	(n mol/mg pro/min)
C	103 ± 5	0.59 ± 0.03	0.20 ± 0.01
CA	107 ± 5	0.59 ± 0.03	0.20 ± 0.01
N	99 ± 3	0.49 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.01
NA	112 ± 4	0.63 ± 0.02 ^c	0.19 ± 0.02

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

^a Significantly different (p < 0.05) from value for the C group.

^c Significantly different (p < 0.05) from value for the N group.

3. 結果

1) 育成に関する成績

体重は、C群、N群とも90日間の飼育期間中、ほぼ直線的に増加した。最終体重は、C群に比べN群で約20%有意に低かった (Table 2)。肝相対重量はC群、N群に比べ、CA群、NA群で大きい傾向が見られ、C群、およびN群とNA群間ではそれぞれ有意差が見られた。肝タンパク質はC群、N群に比べ、CA群、NA群で低値を示す傾向が見られ、C群、およびN群とNA群間ではそれぞれ有意差が認められた。腎相対重量はC群に比べ、N群、およびNA群で、またCA群に比べNA群でそれぞれ有意に増加した。

飼料摂取量は、C群、N群ともほぼ等しかった (Table 3)。摂水量は、C群に比べ、N群で有意に約3倍多かった。飼料効率、およびタンパク質効率は、C群に比べN群で有意に低かった。血圧は、C群に比べN群で16%有意に上昇した (Table 4)。

2) NaClの影響

(1) 活性酸素消去系

肝臓の過酸化脂質量は、いずれの群間でも明らかな変化がみられなかった (Table 5)。GSH量は、C群に比べN群で20%有意に多かった。

GSH-PxのSe依存型とTotalの活性、およびGSSG-R活性は、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)。

(2) 薬物代謝系

第一段階酵素のCyt.C-R、およびAHH活性は、C群とN群間に明らかな差異は見られなかったが、P-450量はC群に比べN群で約20%有意に減少した (Table 7)。

第二段階酵素ではいずれもC群に比べN群で活性が低い傾向を示し、UDPGT、およびST活性ではそれぞれ約20%有意な差が認められた (Table 8)。

(3) 血清中成分

クレアチニン、および尿酸量はC群とN群間に明らかな差異は見られなかった (Table 9)。

3) アルコールの影響

(1) 活性酸素消去系

肝臓の過酸化脂質量はC群、N群に比べ、CA群、NA群でそれぞれ低い傾向が見られた (Table 5)。GSH量はC群、N群に比べ、CA群、NA群で約30%有意に低下した。

GSH-PxのSe依存型、およびTotalの活性は、C群とCA群間では明らかな差は見られなかったが、N群に比べNA群でそれぞれ約110%、40%有意に増加した (Table 6)。GSSG-R活性のC群とCA群、およびN群とNA群はほぼ同値を示した。

(2) 薬物代謝系

Cyt.C-R、およびAHH活性はアルコール投与による明らかな差異は見られなかった (Table 7)。P-

Table 8 Effect of sodium chloride and/or alcohol on activities of drug-metabolising enzymes (phase 2) during 90 days of the experimental period.

Groups	GST	UDPGT	ST
	(n mol/mg pro/min)		
C	613 ± 28	12.6 ± 0.6	0.62 ± 0.04
CA	612 ± 6	14.5 ± 1.3	0.61 ± 0.05
N	853 ± 12	10.5 ± 0.6 ^a	0.50 ± 0.02 ^a
NA	638 ± 24	10.9 ± 1.3	0.66 ± 0.01 ^c

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

ST, sulfotransferase

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

^c 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 acid levels during 90 days of the experimental period.

Groups	Creatinine	Uric acid
	(mg/dl)	
C	0.90 ± 0.03	2.0 ± 0.1
CA	1.16 ± 0.20	2.9 ± 0.2 ^a
N	0.88 ± 0.03	2.1 ± 0.2
NA	1.19 ± 0.21	2.9 ± 0.3 ^{a,c}

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

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

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

450量は、N群に比べNA群で約30%有意に増加した。GST、およびUDPGT活性は、アルコール投与による有意な差は見られなかったが、ST活性はN群に比べNA群で約30%有意に増加した (Table 8)。

(3) 血清中成分

クレアチニン量はC群、N群に比べ、CA群、NA群で増加する傾向が見られ、尿酸量ではそれぞれ有意に増加した (Table 9)。

4) 相互の影響

(1) 活性酸素消去系

肝臓の過酸化脂質量は、C群とNA群、およびCA群とNA群間での明らかな差異は見られなかった (Table 5)。GSH量はC群に比べNA群で約20%有意に減少したが、CN群、NA群間では有意な変化はみられなかった。

GSH-PxのSe依存型、およびTotalの活性は、C群、およびCA群に比べ、NA群間で高くなる傾向が見られたが、GSSG-R活性はC群、およびCA群に比べ、NA群で明らかな差異は見られなかった (Table 6)。

(2) 薬物代謝系

第一段階、第二段階の酵素ともC群、およびCA群とNA群間に有意な差は認められなかった (Table 7, 8)。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、C群に比べNA群で多い傾向が、尿酸量では多い有意差が見られた (Table 9)。

CA群とNA群間では、両含有量ともそれぞれほぼ同じ値を示した。

4. 考察

アルコールや食塩の慢性的摂取過剰は、ガンや循環器疾患の促進因子の一つとして目されているが、その作用発現機構についてまだ解明されていない。しかし、これらの疾病の発生には活性酸素の関与することが示唆されている。これらの疾患に対するアルコールや食塩の作用機序を解明するための手掛かりとして、ラットに8%NaCl食を与え、肝臓中の薬物代謝系と活性酸素消去系のグルタチオン関連酵素への影響を検討した。

8%NaClの投与は実験期間を通じ、体重増加を抑制し、血圧の増加をもたらした。高血圧発症にNaCl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^{13, 37)}が、血圧上昇の機序は複雑でまだ一致した考えがなされていない。本実験の結果は、腎Na排泄機能の低下を主因として血圧が上昇し³⁷⁻³⁹⁾、その機能低下を補うために腎重量が増加したためと考えられる。また、急性アルコール投与時に血清尿酸量が増加したことは、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⁴¹⁾と一致する。

活性酸素消去系では、アルコール投与により正常食、高塩食ともにGSH量が減少した。肝臓のGSH量は、食餌条件によって大きく変動すること⁴⁰⁾、急性アルコール投与によって肝GSH量が減少することが

報告されており、本実験でもアルコールを処理するために作用したことが伺われる。また、高塩食下でGSH-Px活性の増加が認められたことから、90日間にわたる高塩食によって生ずる脂質過酸化を抑制するために機能したことが考えられる。薬物代謝系ではアルコール投与により、高塩食下でのP-450量とST活性の増加が認められた。これらのことから、食塩の摂取過剰は薬物代謝と活性酸素消去系を変動させ、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關与することが示唆された。

5. 要約

8% NaCl食は実験期間を通じて体重増加を抑制し、血圧の増加をもたらした。正常食のもと、急性アルコール投与の結果もたらされた肝グルタチオン量の低下と血清尿酸量の上昇は、高塩食下でも認められたことから、アルコール特有の急性作用とみなされる。一方、高塩食下での急性アルコール投与によって正常食下では認められなかったP-450とST、およびGSH-Pxの活性増加が認められたが、これらのことはNaClとエタノールの両者の組み合わせによって、もたらされがちな生体異物や活性酸素に速やかに対処し、生体に不利な現象を起こさせないようにする生体の機構のひとつであると目される。

以上の結果から、食塩摂取過剰下でのアルコール摂取は、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關与することが示唆された。

参考文献

1. New Question on Alcohol and Breast Cancer, 19 (2001)
2. (財)厚生統計協会編: 国民衛生の動向. 51 46-54 (2004)
3. Tuyns, A. J.: Sodium chloride and cancer of the digestive tract. *Nutri. Cancer*, 4 198-205 (1983)
4. 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)
5. Takahashi, M., Kokubo, M., Furukawa, F., Kurokawa, Y., Tatematsu, Y., and Hayashi, Y.: Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitrosoguanidine. *Gann*, 74 28-34 (1983)
6. 健康・栄養情報研究会: 国民栄養. 68 (2003)
7. 厚生労働省策定: 日本人の食事摂取基準〔2005年版〕. 16-17 (2005) 第一出版
8. National Academy of Sciences: National Academy of Sciences report on diet and health. *Nutrition Reviews*, 47 142-149 (1989)
9. 長谷川享, 友国勝麿, 古川文夫, 高橋道人: 胃の脂質過酸化反応に対する食塩(胃ガンプロモーター)の促進作用. *過酸化脂質研究*, 11 57 (1987)
10. 川尻要: 発ガン物質の代謝的活性化とチトクロームP-450. *蛋白質核酸酵素*, 33 167-173 (1988)
11. Watanabe, M.: Cytochrome P-450 and the metabolism of chemical carcinogens. *Metabolism Disease*, 19 1757-1768 (1982)
12. Ioannides, C. and Parke, D. V.: The cytochromes P-448-A unique family of enzymes involved in chemical toxicity and carcinogenesis. *Biochem. Pharm.*, 36 4197-4207 (1987)
13. 森陽, 菅家祐輔: 食品衛生の生物科学, 25 三共出版 (1983)
14. Hesse, S., Jernstrom, B., Marines, M., Moldeus, P., Christodoulides, L., and Ketterer, B.: Inactivation of DN-binding metabolites of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol by glutathione and glutathione S-transferases. *Carcinogenesis*, 3 757-760 (1982)
15. Friedberg, E. C., Walker, G. C. and Siede, W.: DNA repair and mutagenesis. ASM press (1994)
16. Ames, B. N. and Shigenaga, M. K.: Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. NY Acad. Sci.*, 663 85-96 (1992)
17. Ames, B. N., Gold, L. S. and Willett, W. C.: The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92 5258-5265 (1995)
18. 近藤宗平: 危険な酵素と生物の適応的進化. *実験医学*, 4 1065-1066 (1986)
19. 藤本健四郎: 過酸化脂質とは. *臨床栄養*, 73 129-133 (1988)
20. Kaplowitz, N. and Ookhtens, M.: The regulation of hepatic glutathione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 25 715-744 (1985)
21. 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)
- 22 . 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)
- 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及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 . 上田一雄, 藤島正敏: アルコールと血液 . *日本臨床*, 46 1811-1815 (1988)
- 25 . 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)
- 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 . 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)
- 31 . Uchiyama, M. and Mihara, M. : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, 86 271-278 (1978)
- 32 . Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 70-77 (1959)
- 33 . Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239 2370-2378 (1964)
- 34 . 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)
- 35 . 柴田進, 北村元仕: 日本臨床生化学定量法, 163-166 中山書店 (1964)
- 36 . 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)
- 37 . Sachan, D. S. : Effects of low and high protein diets on the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in rats liver. *J. Nutr.*, 105 1631-1639 (1975)
- 38 . Merrill, J. C., Bray, T. M. : The effect of dietary protein quantity on the activity of UDP-glucuronyl-transferase and its physiological significance in drug metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60 1556-1561 (1982)
- 39 . 細川優, 新関嗣郎, 東篠仁美, 佐藤郁雄, 山口健次: グルテン食飼育時の含硫アミノ酸代謝 . *Sulfur Amino Acids*, 8 147-151 (1985)
- 40 . Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H., and Sakamoto, Y. : Rat liver glutathion-possible role as a reservoir of cystein. *J. Nutr.*, 107 51-60 (1977)
- 41 . 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 90 days. The blood pressure of the NaCl - treated rats were found to be significantly elevated.

Feeding of NaCl and/or alcohol led to decrease of glutathione content and led to increase of P-450 content, ST activity, and GSH-Px 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.