

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

堀口美恵子¹⁾、岩間昌彦²⁾、菅家祐輔³⁾

The Effect of the Protein Quality on Hepatic Glutathione-Related Enzyme Systems in Rats Fed High Sodium Chloride Diets

Mieko Horiguchi, Masahiko Iwama, Yusuke Kanke

Key Words : Excess NaCl, Casein, Soybean, Gulten, Glutathione- Relating Enzyme , Drug-Metabolizing Enzyme, Cytochrome P-450, Glutathione peroxidase

緒論

ガンや循環器疾患は日本人の死因の上位を占めており¹⁾、それらの疾患の一次予防に関する社会的関心は高い。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^{3,6)}。伝統的な日本型食生活にみられた食塩の摂取過剰もそれら疾患のハイリスク因子の一つと目されている。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²⁾ものの個人差も大きく、日本人の目標摂取量10g未満⁷⁾に比べるとまだ摂り過ぎているのが現状である。

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確固たる証拠は少ない⁸⁾。高塩食は胃、及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。

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、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-

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¹³⁻¹⁵⁾。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¹⁶⁾。

近年、発がんや老化の機序の一つとして活性酸素の関与する可能性が注目されている¹⁻³⁾。活性酸素とは通常の酸素 (三重項酸素) から種々の要因で誘導される反応性の高い分子種の総称で、酸素分子が生体内で電子受容体として4電子還元され、水に変化していく過程で生じるスーパーオキシドラジカル、過酸化水素 (H₂O₂)、ヒドロキシラジカルなどを指す³⁾。生体内において不飽和脂肪酸を酸化させることや、細胞内のDNAに損傷を与えることなどが知られている^{4,6)}。好氣的な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いるため、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¹⁸⁾。しかし、生体にはこのような種々の活性酸素の毒性発現に対して幾重もの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¹⁹⁾。この活性酸素の防脚系において、重要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²⁰⁾。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

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

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、通常はGSHは過不足のない状態で維持されている²¹⁾。

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、種々の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²²⁻²⁴⁾ 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日の長期間に亘り観察してきた¹¹⁾。今回は、食餌タンパク質の種類を変化させ、食塩の摂取過剰状態におけるタンパク質の質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、初体重約80gのJcL. Wistar系雄ラット (日本クレア株式会社) をカゼインタンパク質群 (C群)、大豆タンパク質群 (S群)、グルテンタンパ

ク質群 (G群) とそれらの群に8%のNaClを加えたCN群、SN群、GN群の6群に分け (Table 1)、それぞれの飼料で90日間飼育し、16時間の絶食後屠殺した。1群は10匹とし、飼料、及び飲水は *ad lib* で与え、温度22 ± 0.5 °C、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°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)、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、β-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

Table 1 Percentage composition of diets

Ingredients	Groups					
	C	CN	S	SN	G	GN
Milk casein ^{a)}	21.10	21.10	0.00	0.00	0.00	0.00
dl-methionine	0.42	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00
soybean protein isorate ^{b)}	0.00	0.00	20.00	20.00	0.00	0.00
wheat gluten ^{c)}	0.00	0.00	0.00	0.00	24.00	24.00
corn oil	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
menereal mixture ^{d)}	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
vitamin mixture ^{d)}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
choline bitartrate	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
sodium chloride	0.00	8.00	0.00	8.00	0.00	8.00
corn starch	77.65	77.65	70.00	62.00	39.40	31.40

^{a)}Protein : 85.3%

^{b)}Protein : 90.0%

^{c)}Protein : 75.0%

^{d)}AIN-76 (1977)

(東京) 製のものをそれぞれ使用した。また、血清中クレアチニン、尿酸、及び尿素窒素含量、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/GB-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-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℃、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^{25, 26)}。

b. GSH-Px活性

Lawrenceらの方法²⁷⁾により基質として0.25 mM H₂O₂と1.5 mM CHPを用いて測定した。50 mM KH₂PO₄、50 mM K₂HPO₄、1mM EDTA、1 mM NaNO₃、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℃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。

c. GSSG-R活性

Worthingtonらの方法²⁸⁾により測定した。石英セルに21 mM KH₂PO₄、26 mM K₂HPO₄、1mM 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℃で2分間放置後、酵素源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0.5 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℃で2分間放置後、2 mM Cyt.C 0.05 mlと酵素源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、希釈酵素源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 (3000 rpm、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1.15 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% H₃PO₄ 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、3000 rpm、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³²⁾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を1.5 mlに等量の4% sulfosalicylic acidを加えて攪拌した。4℃で30分間放置後、4℃、10,000 xg、20分間遠心分離し、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。

d. P-450含量

Omuraらの方法³³⁾により測定した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.25; 3 mM MgCl₂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、400-500 nmで走査した。次いで両方のセルにNa₂S₂O₄数mgを加え、よく攪拌した後、再び400-500 nmで走査し、CO差スペクトルの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0.2 mlに2% Na₂CO₃・0.1 N NaOH、0.5% CuSO₄、1.0% KNaC₂H₃O₆・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。

f. 血清クレアチニン含量

Jaffe' 法³⁵⁾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、2500 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。次の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³⁶⁾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。

h. 血中尿素窒素含量

ウレアーゼ・インドフェノール法³⁷⁾により測定した。血清0.02 mlに発色試薬A 2.0 mlを加え、37 °Cで15分間加温後、発色試薬B 2.0 mlを加え、37 °Cで10分間加温し、570 nmで吸光度を測定した。なお、標準には尿素窒素標準液を蒸留水で希釈して用いた。

i. 血清中A/G比

アルブミンはBCG法^{38, 39)}により測定した。血清0.02 mlに発色試薬5.0 mlを加え、10分間放置後630 nmで吸光度を測定した。また、総タンパク質は、

ビウレット法^{38, 39)}により測定した。血清0.1 mlに発色試薬5.0 mlを加え、30分間放置後540 nmで吸光度を測定した。なお、標準には両者共標準血清を蒸留水で希釈したものを用い、アルブミンの盲検にはアルブミン盲検用試薬を用いた。なお、グロブリン値は総タンパク質の値からアルブミンの値を引いて求めた。

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。

2. 結果

1) 成育に関する成績

体重は、6群とも90日にかけてほぼ直線的に増加した (Table 2)。最終体重は、C群に比しCN群で10%有意に低かったが、S群とG群ではNaCl添加の影響はみられなかった。また、C群に比べS群で19%、G群で33%、S群に比べG群では17%それぞれ有意な低値を示した。また、CN群に比べSN群で12%、GN群で30%、SN群に比べGN群では20%それぞれ有意に低下した。肝相対重量、および肝タンパク質は、いずれの群間においても明らかな差異は認められなかった。腎相対重量は、NaCl添加によりC群、およびS群で約30%、G群で15%それぞれ有意に増加した。また、G群はC群に比し15%の有意な増加、S群に比し10%の増加傾向を示したが、C群とS群の間に大差はなかった。また、CN群に比しSN群とGN群でそれぞれ約10%有意に増えたが、SN群、GN群間ではほとんど変化がみられなかった。

摂水量は、NaCl添加によりC群とS群で約3倍、G群で約2倍、それぞれ有意に多くなった (Table 3)。C群、S群、G群間における摂水量の差はほとんどなかった。一方、GN群はCN群、SN群に比し、それぞれ約50%の有意な減少を示した。CN群、SN群間での大差はなかった。飼料、およびタンパク質摂取量は、C群に比べCN群、S群に比べSN群で各々約10%有意に多かったが、G群、GN群間では明らかな差異がみられなかった。また、C群に比しS群で9%、G群で20%、S群に比しG群で8%それぞれ有意な低値を示した。GN群はCN群、およびSN群に比べそれぞれ約20%有意に低下したが、CN群、SN群間での大差はなかった。PERは、NaCl添加によりC群で19%、S群、およびG群で約10%それぞれ有意に低下

Table 2 Changes in body weight,liver protein,and kidneys weight of rats

Groups	Final body weight (g)	Liver weight (g/100g BW)	Liver protein (mg/g wet liver)	Kidneys weight (g/100g BW)
C	362 ± 7	3.7 ± 0.1	142 ± 3	0.68 ± 0.01
CN	327 ± 5 ^a	3.9 ± 0.1	143 ± 3	0.86 ± 0.01 ^a
S	292 ± 5 ^a	4.0 ± 0.2	140 ± 3	0.71 ± 0.02
SN	288 ± 3 ^d	4.1 ± 0.1	146 ± 3	0.93 ± 0.02 ^{b, d}
G	241 ± 7 ^{a, b}	3.9 ± 0.1	138 ± 3	0.78 ± 0.01 ^a
GN	229 ± 3 ^{d, e}	4.2 ± 0.1	141 ± 4	0.90 ± 0.02 ^{c, d}

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

Abbreviations: C,casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G,gluten protein diet; GN. gluten protein diet containing sodium chloride

^aSignificantly different (p<0.05) from value for the C group

^bSignificantly different (p<0.05) from value for the S group

^cSignificantly different (p<0.05) from value for the G group

^dSignificantly different (p<0.05) from value for the CN group

^eSignificantly different (p<0.05) from value for the SN group

Table 3 Changes in water intake,food intake,protein intake,and protein efficiency ratio of rats

Groups	Water intake (ml/day)	food intake (g/day)	protein intake (g /day)	Protein efficiency ratio
C	20 ± 1	17.5 ± 0.2	3.15 ± 0.04	1.02 ± 0.02
CN	65 ± 2 ^a	18.8 ± 0.4 ^a	3.38 ± 0.08 ^a	0.83 ± 0.03 ^a
S	18 ± 1 ^a	16.0 ± 0.3 ^a	2.87 ± 0.05 ^a	0.82 ± 0.02 ^a
SN	63 ± 2 ^d	18.0 ± 0.5 ^b	3.24 ± 0.08 ^b	0.72 ± 0.02 ^{b, d}
G	18 ± 1	14.0 ± 0.4 ^{a, b}	2.52 ± 0.08 ^{a, b}	0.72 ± 0.02 ^{a, b}
GN	35 ± 1 ^{c, d, e}	14.7 ± 0.4 ^{d, e}	2.65 ± 0.08 ^{d, e}	0.65 ± 0.02 ^{c, d, e}

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

Abbreviations: C, casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G,gluten protein diet; GN. gluten protein diet containing sodium chloride

^aSignificantly different (p<0.05) from value for the C group

^bSignificantly different (p<0.05) from value for the S group

^cSignificantly different (p<0.05) from value for the G group

^dSignificantly different (p<0.05) from value for the CN group

^eSignificantly different (p<0.05) from value for the SN group

した。また、C群に比しS群で20%、G群で29%、S群に比しG群で12%それぞれ有意に低かった。また、CN群に比しSN群で13%、GN群で22%、SN群に比しGN群では10%それぞれ有意な低値を示した。

血圧は、C群に比べCN群で18%、S群に比べSN群

で28%、G群に比べGN群で37%それぞれ有意な上昇を示した (Table 4)。また、C群に比しS群、およびG群で各々約5%有意に低下したが、S群とG群の間で大差はなかった。

Table 4 Effect of sodium chloride and / or protein quality on blood pressure

Groups	Blood pressure (mmhg)
C	153 ± 1
CN	180 ± 4 ^a
S	147 ± 1 ^a
SN	188 ± 3 ^b
G	144 ± 1 ^a
GN	197 ± 4 ^{c, d}

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

Abbreviations: C, casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G, gluten protein diet; GN, gluten protein diet containing sodium chloride

^aSignificantly different (p<0.05) from value for the C group

^bSignificantly different (p<0.05) from value for the S group

^cSignificantly different (p<0.05) from value for the G group

^dSignificantly different (p<0.05) from value for the CN group

^eSignificantly different (p<0.05) from value for the SN group

Table 5 Effect of sodium chloride and / or protein quality on lipid peroxide and glutathione levels

Groups	JOOH (n mol MDA/mg protein)	GSH (u mol/liver)
C	0.53 ± 0.05	2.71 ± 0.11
CN	0.69 ± 0.03 ^a	2.58 ± 0.13
S	0.43 ± 0.03	2.88 ± 0.07
SN	0.56 ± 0.05 ^{b, d}	2.72 ± 0.24
G	0.57 ± 0.07	1.93 ± 0.11 ^{a, b}
GN	0.87 ± 0.04 ^{c, d, e}	1.93 ± 0.11 ^{d, e}

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

Abbreviations: C, casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G, gluten protein diet; GN, gluten protein diet containing sodium chloride

^aSignificantly different (p<0.05) from value for the C group

^bSignificantly different (p<0.05) from value for the S group

^cSignificantly different (p<0.05) from value for the G group

^dSignificantly different (p<0.05) from value for the CN group

^eSignificantly different (p<0.05) from value for the SN group

2) NaClの影響

(1) 活性酸素消去系

肝臓の過酸化脂質量は、C群に比しCN群、S群に比しSN群で各々30%、G群に比しGN群で53%それぞれ有意に増加した (Table 5)。GSH量は、いずれの群間でも明らかな変化がみられなかった。

GSH-PxのSe依存型、およびTotalの活性は、いずれの群間においても大差がなかった (Table 6)。GSSG-R活佳は、C群に比しCN群で13 %の有意な低

値を示したが、その他の群間では明らかな差異がみられなかった。

(2) 薬物代謝系

第一段階酵素のCyt.C-R活性は、C群に比べCN群で25%有意に上昇した (Table 7)。S群に比しSN群では15 %低い傾向がみられたが、G群、GN群間での明らかな差異はなかった。P-450量は、いずれの群間においてもほとんど差がみられなかった。第二段階酵素のGST活性は、いずれの群間でも有意差が

Table 6 Effect of sodium chloride and /or protein quality on activities of glutathione relating enzymes

Groups	GSH-Px 1) (n mol/mg protein/min)	GSH-Px 2) (n mol/mg protein/min)	GSSG-R (n mol/mg protein/min)
C	149 ± 11	194 ± 11	60 ± 2
CN	139 ± 7	205 ± 9	52 ± 2 ^a
S	132 ± 8	194 ± 12	72 ± 3 ^a
SN	142 ± 10	207 ± 11	66 ± 4 ^d
G	148 ± 9	200 ± 8	60 ± 4 ^b
GN	151 ± 7	211 ± 8	62 ± 4

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

Abbreviations: C, casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G, gluten protein diet; GN, gluten protein diet containing sodium chloride

^aSignificantly different (p<0.05) from value for the C group

^bSignificantly different (p<0.05) from value for the S group

^cSignificantly different (p<0.05) from value for the G group

^dSignificantly different (p<0.05) from value for the CN group

^eSignificantly different (p<0.05) from value for the SN group

¹Se-dependent

²Total

Table 7 Effect of sodium chloride and/or protein quality on activities of drug-metabolising enzymes

Groups	Cyt.C-R (n mol/mg protein/min)	P-450 (n mol/mg protein)	GST (n mol/mg protein/min)
C	118 ± 4	0.86 ± 0.03	567 ± 32
CN	147 ± 6 ^a	0.85 ± 0.05	564 ± 13
S	176 ± 12 ^a	0.94 ± 0.06	747 ± 59 ^a
SN	150 ± 10	0.90 ± 0.05	675 ± 14 ^d
G	146 ± 5 ^{a, b}	0.86 ± 0.03	618 ± 46
GN	153 ± 6	0.88 ± 0.04	649 ± 44

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

Abbreviations: C, casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G, gluten protein diet; GN, gluten protein diet containing sodium chloride

^aSignificantly different (p<0.05) from value for the C group

^bSignificantly different (p<0.05) from value for the S group

^cSignificantly different (p<0.05) from value for the G group

^dSignificantly different (p<0.05) from value for the CN group

^eSignificantly different (p<0.05) from value for the SN group

認められなかったが、S群に比しSN群で10%低い傾向にあった。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、G群に比べGN群で24%の有意な増加が、その他の群間ではNaCl添加による約10%の増加傾向がみられた (Table 8)。尿酸量は、

C群に比しCN群で10%の低下傾向にあったが、その他の群間においてはほぼ同値を示した。尿素窒素量は、NaCl添加によりいずれの群でも20%前後有意に高くなった。A/G比は、S群に比べSN群で15%高くなったが、その他の群間では大差がなかった。

Table 8 Effect of sodium chloride and/or protein quality on serum creatinine, uric acid, urea nitrogen and A/G levels

Groups	Creatinine (mg /dl)	Uric acid (mg/ dl)	Urea nitrogen (mg/ dl)	A/G ^{b)}
C	0.47 ± 0.05	3.27 ± 0.32	16.4 ± 0.5	1.36 ± 0.11
CN	0.53 ± 0.05	2.93 ± 0.23	18.7 ± 0.8 ^{a)}	1.34 ± 0.11
S	0.55 ± 0.01	2.89 ± 0.17	16.0 ± 0.4	1.45 ± 0.14
SN	0.61 ± 0.05	2.98 ± 0.19	19.8 ± 0.5 ^{b)}	1.67 ± 0.08 ^{d)}
G	0.45 ± 0.02 ^{b)}	3.17 ± 0.12	16.0 ± 0.6	1.35 ± 0.09
GN	0.56 ± 0.05 ^{c)}	3.23 ± 0.17	19.8 ± 1.1 ^{c)}	1.57 ± 0.15

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

Abbreviations: C, casein protein diet; CN, casein protein diet containing sodium chloride; S, soybean protein diet; SN, soybean protein diet containing sodium chloride; G, gluten protein diet; GN, gluten protein diet containing sodium chloride

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

^{b)}Significantly different (p<0.05) from value for the S group

^{c)}Significantly different (p<0.05) from value for the G group

^{d)}Significantly different (p<0.05) from value for the CN group

^{e)}Significantly different (p<0.05) from value for the SN group

^{b)}albumin-globulin-index

3) タンパク質の質の影響

(1) 活性酸素消去系

肝臓の過酸化脂質量は、C群に比しS群で19%少なかった (Table 5)。GSH量は、G群はC群、およびS群に比べ約30%の有意な低値を示した。C群、S群間ではほとんど差がみられなかった。

GSH - PxのSe依存型の活性は、C群、G群に比しS群で11%の傾向がみられた (Table 6)。GSH-PxのTotalの活性は、いずれの群間においても有意な差異は認められなかった。G-SSG-Rの活性は、C群、G群に比べS群で20%高く、それぞれ有意差が認められた。

(2) 薬物代謝系

Cyt.C - R活性は、C群に比しS群で49%、G群で24%、それぞれ有意に増加した (Table 7)。また、S群に比しG群では13%の有意な活性低下が認められた。P-450量は、いずれの群間においても明らかな差異がみられなかった。GST活性は、C群に比べS群で32%有意に高かった。その他の群間では有意差が認められなかった。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、S群に比しG群で18%有意に低下した (Table 8)。また、C群に比しS群では17%高い傾向がみられたが、C群とG群では大差がなかった。

尿酸量は、C群、G群に比しS群で約10%の傾向にあった。尿素窒素量は、いずれの群間でもほぼ同値を示した。A/G比は、いずれの群間においても明らかな差異はみられなかった。

4) 相互の影響

(1) 活性酸素消去系

肝臓の過酸化脂質量は、CN群に比べSN群で19%の有意な低下、GN群で26%の有意な増加が認められた (Table 5)。また、SN群に比べGN群では55%の有意な増加を示した。GSH量は、GN群ではCN群、およびSN群に比べそれぞれ約30%有意に低下したが、CN群、SN群間では明らかな差異はみられなかった。

GSH-PxのSe依存型・およびTotalの活性は、いずれの群間においても有意差は認められなかった (Table 6)。GSSG-R活性は、CN群に比しSN群で27%の有意な上昇が認められた。また、GN群はCN群に比し19%の上昇傾向がみられたが、SN群とは大差がなかった。

(2) 薬物代謝系

Cyt.C-R活性、およびP-450量は、いずれの群間においても明らかな変化がみられなかった (Table 7)。GST活性は、CN群に比しSN群で20%有意に増

加し、GN群で15%の増加傾向がみられた。SN群、GN群間では有意差が認められなかった。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、CN群に比べSN群で15%多い傾向がみられたが、その他の群間では明らかな変化がみられなかった (Table 8)。尿酸量は、CN群、SN群に比しGN群でそれぞれ約10%の増加傾向がみられた。尿素窒素は、いずれの群間でもほぼ同値を示した。A/G比は、CN群に比べSN群で25%有意に増加し、GN群では17%増加する傾向がみられた。SN群とGN群では大差がなかった。

3. 考察

食塩の慢性的摂取過剰は、ガンや心疾患、脳血管疾患の促進因子の一つとして考えられている。その作用発現機構についてまだ解明されていないが、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。グルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチドであり生体内で非タンパク性SH化合物の大部分を占めるグルタチオンは、生体内で生成される活性酸素や過酸化物の消去系、及び生体異物との抱合・解毒反応を行なう薬物代謝系の構成メンバーとして重要な役割を多岐にわたって行っている。本研究では、ラットに高塩食下でタンパク質の質の異なる飼料を与え、薬物代謝系と活性酸素消去系を成す肝臓のグルタチオン関連酵素への影響を検討した。

8%NaClの投与はカゼインタンパク質食では体重増加を抑制したが、大豆、およびグルテン食での抑制はみられなかった。しかし、PERはいずれのタンパク質食においても高塩食により低下した。また、アミノ酸スコアと体重増加、PERが比例することはよく知られている⁴⁰⁾が、本実験でもカゼイン、大豆、グルテンの順に小さくなった。血圧、および腎相対重量は高塩食により上昇したが、その割合はアミノ酸スコアが低いほど大きかった。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, 41)}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。本実験の結果は恐らく、腎Na排泄機能の低下を主因として血圧が上昇し⁴¹⁻⁴³⁾、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、血清尿素窒素含量は血圧上昇を反映するといわれている⁴⁴⁾が、これは本実験においても確認された。

活性酸素消去系では、NaCl投与により過酸化脂質が増加したが、その割合は特にグルテン食において著しかった。また、GSH量の低下傾向とGSH-Px活性の増加傾向もみられ、90日間に亘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が、結果的には抑制しきれずに過酸化脂質量の増加をきたしたものと思われる。肝臓のGSH量は、食餌条件、特に含硫アミノ酸の摂取量によって大きく変動することが知られている⁴⁵⁾。本実験では、メチオニンを添加したカゼインを制限アミノ酸のないReference Proteinとしたのに対し、大豆、およびグルテンは各々メチオニン、リジンが第一制限アミノ酸である。各群の飼料摂取量に差がない場合、大豆食においてGSH量の低下がみられる⁴⁶⁾が、本実験ではグルテン量で最低値を示した。グルテンは、リジンがNRCの成長期ラットでの必要量⁴⁷⁾の約20%しか含まれていないため、正味タンパク質利用率が37とカゼインの72、および大豆の56⁴⁸⁾に比べてきわめて低く、タンパク質源として単独に用いた一場合に実験動物の成長が著しく劣ることが知られている⁴⁹⁾。本実験における飼料摂取量では、グルテン食が他の2群に比べて少なかったため、含硫アミノ酸摂取量は大豆食と大差がなかった。また、グルテン食では、体重増加が著しく劣ったため含硫アミノ酸が体タンパク質合成に使われ、肝GSH量の増加を反映するまでには至らなかったことに起因するかもしれない。一方、山口らは、グルテン食で飼育すると肝システインデオキシゲナーゼ活性の上昇と共に多量のタウリンが尿中に排泄され、含硫アミノ酸のタンパク質合成などへの利用性が、低下して含硫アミノ酸プールが増大し、肝GSH濃度が上昇することを報告している⁵⁰⁻⁵²⁾。また、大豆食では含硫アミノ酸供給量の減少に対して、GSH合成やGSSG-RなどのGSH代謝関連酵素活性が亢進するという報告⁴⁶⁾があるが、本実験でもGSSG-R活性が他の群より高く、GSH量もカゼイン食と同じレベルであった。肝GSH濃度の変化は、代謝関連酵素の他にシステインの肝細胞への取り込みと、肝タンパク質合成・分解をも含めてさらに検討していかなければならないと考えられた。一般に、食餌中のタンパク質の種類によって、肝の薬物代謝酵素活性が変化することが知られている⁵³⁾。P-450量は、その栄養価が高いほど増加するという報告^{54, 55)}もあるが、本実験では、明らかな差異は認められなかった。また、Cyt・C-R、およびGST活性は、カゼイン食で大豆、およびグル

テン食より上昇傾向にあるという報告⁵⁶⁾があるが、本実験では大豆食で高い傾向がみられた。薬物代謝系における高塩食投与の影響は、カゼイン食におけるCyt・C-R活性の上昇のみみられた。

4. 要約

8%NaCl食は、血圧の上昇と共にPERの低下、腎相対重量の増加、および血清中尿素窒素量の増加を招くなど、全身的な影響が懸念された。生体異物の最大処理器官である肝臓の薬物代謝系では明らかな変化が認められなかったが、活性酸素消去系では過酸化脂質量の増加とGSH-Px活性の上昇傾向が認められ、活性酸素、もしくはフリーラジカルの生成が促進されたことが示唆された。食餌タンパク質の質の違いによる影響は、グルテン食によるGSH量の低下と大豆食によるGSS-R、Cyt・C-R、およびGST活性の上昇にみられた。

以上の結果から、タンパク質の質が低い場合の食塩摂取過剰は、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。

参考文献

1. (財)厚生統計協会編: 国民衛生の動向. 50 46-54 (2003)
2. 健康・栄養情報研究会: 国民栄養の現状. 68 (2003)
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. Ohgaki, H., Kato, T., Morino, K., Matsukura, N., Sato, S., Taayama, S., and Sugimura, T.: Study of the promoting effect of sodium chloride on gastric carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in inbred Wistar rats. *Gann*, 75 1053-1057 (1984)
7. 健康・栄養情報研究会: 第六次改定日本人の栄養所要量 食事摂取基準. 16-17 (1999) 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-dehydrodiol 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. 高橋和彦: セレンとグルタチオンペルオキシダーゼ. *蛋白質核酸酵素*, 33 1494-1504 (1988)

22. Takeishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A., and Sakamoto, Y.: Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem.*, 75 93-103 (1974)
23. Pessayre, D., Dolder, A., Artigou, J. Y., Wandscheer, J. C., Degott, C., and Benhamou, J. P.: Effect of fasting on metabolite-mediated hepatotoxicity in the rat. *Gastroenterology*, 77 264-271 (1979)
24. 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)
25. 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)
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, 北村元任: 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, 北村元任, 中村年正: 人体成分のサンプリング (血液), 89 講談社 (1972)
37. 金井泉, 金井正光: 臨床検査法提要, 29 423-428 金原出版 (1983)
38. Doumas, B. T., Watoson, W. A., and Biggs, H. G.: *Clin. Chim. Acta*, 31 87-96 (1971)
39. 柴田進, 和嶋毅: 日本臨床, 27 710-719 (1969)
40. Clinton, S. K., Truex, C. R., and Visek, W. J.: Effects of protein deficiency and excess on hepatic mixed function oxidase activity in growing and adult female rats. *Nutr. Repo. Int.*, 16 463-466 (1977)
41. 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)
42. Merrill, J. C., Bray, T. M.: The effect of dietary protein quantity on the activity of UDP-glucuronyltransferase and its physiological significance in drug metabolism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60 1556-1561 (1982)
43. 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)
44. 化学および血清療法研究所: 正常値ハンドブック, 41-42 クリニカ出版 (1985)
45. 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)
46. FAO: Amino-acid content of foods and biological data on proteins. *FAO Nutr. Studies*, 24 (1970)
47. 細谷憲政, 印南敏, 五島孜朗: 小動物を用いる栄養実験. 130 第一出版 (1987)
48. 吉田宗弘, 原一郎: 食餌タンパク質の種類がクロロベンゼンの代謝と毒性に及ぼす影響. *Jan. J. Hyg.*, 41 822-827 (1986)
49. 坂本清: 蛋白質の栄養価. *食の科学*, 84 31-39 (1985)
50. 新関嗣郎, 東篠仁美, 佐藤郁雄, 山口健次: ラット肝Cysteine Dioxygenase活性におよぼす飼料タンパク質の影響. *Sulfur Amino Acids*, 6 257-261 (1983)
51. 細川優, 新関嗣郎, 東篠仁美, 佐藤郁雄, 山口健次: 食餌タンパク質の含硫アミノ酸代謝におよぼす

- 影響. Sulfur Amino Acids, 7 273-278 (1984)
52. 細川優, 新関嗣郎, 東條仁美, 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)
53. Afielding, A. M. and Hughes, R. E. :Changes in liver microsomal cytochrome P-450 induced by dietary proteins and lipid material. Biochem. Pharmacol., 25 1916-1917 (1976)
54. Norihisa Kato, Takeshi Tani and Akira Yoshida:Effect of dietary quality of protein on liver microsomal mixed function oxidase system, plasma cholesterol and urinary ascorbic acid in rats fed PCB. J. Nutr. 111 123-133 (1981)
55. Cridtobal, L., Miranda and Ryland, E. :Effect of dietary protein quality on drug metabolism in the rat. J. Nutr. 103 1425-1430
56. Slng, Y., Chaudhary, V., Bhatnagar, R. and Misra, U. :Mixed function oxidase in response to quality and quantity of dietary protein. Biochem. Internat. 17 1-8 (1988)

Summary

The effect of sodium chloride (NaCl) and/or protein quality 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, especially, with gluten diets.

Feeding of NaCl diet led to slight increase of lipid peroxides contents, especially, with gluten diets. Feeding of NaCl and gluten diets resulted in significant decrease of glutathione content. On the basis of the results obtained in the present study, it may be suggested that long-term feeding of high NaCl and gluten diet reduces the detoxification of many xenobiotic compounds, and generates the oxygen radicals and lipid peroxides leading to various pathological processes.