

食塩負荷ラットの肝グルタチオン関連酵素 活性に及ぼすタンパク質レベルの影響

堀口美恵子¹⁾・岩間昌彦²⁾・菅家祐輔³⁾

Effects of Protein of Different levels on Hepatic Glutathione-Related Enzyme Systems in Rats Fed with High Sodium Chloride Diets

Mieko Horiguchi, Masahiko Iwama and Yusuke Kanke

Key Words : Excess NaCl, Protein level, Glutathione-relating enzyme, Drug metabolizing enzyme, Cytochrome P-450, Glutathione peroxidase

緒論

循環器疾患やガンは、日本のみならず先進諸国の死因と深く関わり合っている¹⁾。それら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疫学的、実験的研究は精力的に進められている¹⁻⁶⁾。かつての典型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促進因子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前後へと著しく減少した¹⁾ものの、個人差も大きく、日本人の目標摂取量10g未満⁷⁾に比べると未だ摂り過ぎているのが実情である。

食塩と高血圧との関わりに比べ、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未だほとんど解明されていない。

化学発ガン物質の大部分は生体内で活性化されてガン原性を獲得する¹⁰⁾。例えば、加熱食品からタバコの煙にまで、環境中に広く存在するBenzo(a)pyrene(B(a)P)は、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、更に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、初めて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¹¹⁻¹⁵⁾。

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⁾。

近年は、発ガン機序の一つとして活性酸素の関与する可能性が示唆されている¹⁷⁾。活性酸素とは酸素分子が生体内で電子受容体として4電子還元されて、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し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¹⁴⁻¹⁶⁾。好氣的な生物である我々の体細胞は、代謝あるいは呼吸に酵素を利用しており、従って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⁾。

通常、生体にはこのような種々の活性酸素の毒性発現に対し、幾重もの防御系が存在し、生成系との動的平衡状態で酸素障害が回避されている¹⁹⁾。この活性酸素の防御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(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、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大きく関わる薬物代謝系や活性酸素消去系を構成するグルタチオンの量、及び酵素の活性は種々の生体異物や栄養

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) 食品衛生学研究室

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皆無である。我々は既に食塩の摂取過剰によるガン等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グルタチオン関連酵素(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、食餌タンパク質の量を変化させ、食塩の摂取過剰状態におけるタンパク質レベル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 Crj. Wistar 系雄ラット(日本チャールズリバー株式会社)を飼料中にカゼイン 7.5% を含む低タンパク質群(L 群)、15% の標準タンパク質群(C 群)、45% の高タンパク質群(H 群)とそれらの群に 8% の NaCl を加えた LN 群、CN 群、HN 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)、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、 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(東京)製のものをそれぞれ使用した。又、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 (pH 7.4; 0.1 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 含有) で灌流した後摘出し、細切後、4 倍量の冷 50 mM phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 mM EDTA 含有) でホモジナイズした。このホモジネートを 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 (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°C、105,000×

Table 1. Percentage composition of diets

Ingredients	Groups					
	L	LN	C	CN	H	HN
milk casein	7.50	7.50	15.00	15.00	45.00	45.00
dl-methionine	0.15	0.15	0.30	0.30	0.90	0.90
corn oil	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
meneral mixture ^a	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
vitamin mixture ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
choline bitartarate	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	8.00	0	8.00	0	8.00
corn starch	77.65	77.65	70.00	62.00	39.40	31.40

^aAIN-76 (1977)

g で 30 分間遠心分離し、得られた沈査を再懸濁してマイクロゾーム画分 (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 H_2O_2 と 1.5 mM CHP を用いて測定した。50 mM KH_2PO_4 、50 mM K_2HPO_4 、1 mM EDTA、1 mM 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°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 の量で表わした。

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 KH_2PO_4 、26 mM K_2HPO_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 の量で表わした。

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°C 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 の量で表わした。

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 の量で表わした。

(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°C で放置

後遠心分離 (3,000 rpm、20 分間) し、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% H_3PO_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、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。又、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わした。

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 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、20 分間遠心分離し、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³³⁾により測定した。50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.25; 3 mM $MgCl_2$ 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、400-500 nm で走査した。次いで両方のセルに $Na_2S_2O_4$ 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% Na_2CO_3 -0.1 N NaOH、0.5% $CuSO_4$ 、1.0% $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ (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、

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。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。又、総タンパク質は、ピウレット法^{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。

3. 結果

1) 成育に関する成績

体重は 6 群共 90 日にかけてほぼ直線的に増加したが、体重増加は各群共 NaCl の添加により、15% 前後有意に抑えられた (Table 2)。又、C 群に比し L 群では 13%、H 群では 8% それぞれ有意に減少した。又、CN 群に比し LN 群では 25%、HN 群では 12% それぞれ有意に減少し、LN 群に比べ HN 群では 20% 有意に増加した。肝相対重量は、H 群に比べ HN 群で約 10% 有意に増加したが、L 群と C 群では NaCl 添加による影響はみられなかった。又、飼料中のタンパク質量の違いによって各群の肝相対重量が変動することはなかった。NaCl を添加した場合、CN 群に比べ HN 群では約 10% 有意に増加した。肝タンパク質は、いずれの群間においても明らかな差違は認められなかった。腎相対重量は、各群共に NaCl の添加により各々約 30% の有意な増加が認められた。又、H 群では L 群、C 群に比べ各々 30% 前後の有意な増大がみられた。又、HN 群は LN 群、

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

Groups	Final body weight (g)	Liver weight (g/100 g BW)	Liver protein (mg/g wet liver)	Kidneys weight (g/100 g BW)
L	390±15	3.1±0.1	155±4	0.69±0.02
LN	299± 8 ^a	3.3±0.1	152±2	0.87±0.04 ^a
C	446±11 ^a	3.2±0.1	154±3	0.73±0.01
CN	399± 6 ^{b,d}	3.2±0.1	157±2	0.95±0.02 ^b
H	410± 9 ^b	3.5±0.1	163±3	0.91±0.02 ^{a,b}
HN	360± 9 ^{c,d,e}	3.6±0.1 ^{c,e}	157±4	1.21±0.3 ^{c,d,e}

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

^eSignificantly different ($p < 0.05$) from value for the CN 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
L	28±2	19.3±0.6	1.30±0.03	2.61±0.08
LN	83±4 ^a	20.6±1.1	1.34±0.06	1.82±0.12 ^a
C	29±2	21.7±0.5 ^a	2.72±0.06 ^a	1.47±0.03 ^a
CN	103±4 ^{b,d}	20.8±0.3	2.67±0.04 ^d	1.30±0.03 ^{b,d}
H	34±1 ^{a,b}	19.0±0.3 ^b	7.43±0.11 ^{a,b}	0.48±0.01 ^{a,b}
HN	87±4 ^{c,e}	19.8±0.4	7.70±0.11 ^{d,e}	0.39±0.02 ^{c,d,e}

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

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

CN 群に比しそれぞれ約 35% 有意に増加した。

摂水量は、各群共 NaCl の添加により各々約 3 倍有意に多くなった (Table 3)。又、H 群は、L 群、及び C 群に比べ約 20% 多く有意差が認められた。飼料摂取量は、各群共 NaCl の添加による影響がほとんどみられなかった。又、C 群に比し L 群と H 群では、約 10% それぞれ有意に少なかった。又、高塩食下におけるタンパク質量の違いによっては、いずれの群間でも明らかな差異が見られなかった。タンパク質摂取量は、C 群、CN 群に比べ L 群と LN 群では約 0.5 倍、H 群と HN 群では約 3 倍、L 群、LN 群に比べ H 群、HN 群では約 6 倍であった。PER は、各群共 NaCl の添加により約 20% 有意に低下した。一方、NaCl 添加の有無にかかわらずタンパク質量の増加と共に PER は低下した。即ち、L 群、LN 群に比べ C 群、CN 群では約 40%、H 群、HN 群では約 80% 有意に低下した。

血圧は、各群共 NaCl 添加により各々約 40% 有意に上昇した (Table 4)。又、C 群、CN 群に比し H 群、HN 群ではそれぞれ約 5% 有意に上がった。

2) NaCl の影響

(1) 活性酸素消去系

過酸化脂質量は、NaCl の添加により L 群ではほとんど差がなかったが、C 群、及び H 群ではそれぞれ約 30% の増加傾向がみられた (Table 5)。GSH 量は、C 群に比べ CN 群で約 10% 低い傾向がみられた

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

Groups	Blood pressure (mmHg)
L	133±4
LN	195±4 ^a
C	140±2
CN	192±3 ^b
H	146±2 ^b
HN	204±4 ^{c,e}

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

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

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

Groups	LOOH (n mol MDA/mg protein)	GSH (u mol/g liver)
L	0.80±0.05	2.75±0.21
LN	0.82±0.08	2.67±0.22
C	0.70±0.05	3.67±0.22 ^a
CN	0.89±0.08	3.24±0.23
H	0.68±0.05	3.87±0.25 ^a
HN	0.86±0.09	4.16±0.07 ^{a,e}

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

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

が、その他の群間での明らかな差違はなかった。GSH-Px の Se 依存型の活性は、L 群に比し LN 群で約 20% 高い傾向を示したが、その他の群間ではほとんど差がみられなかった (Table 6)。GSH-Px の Total の活性は、いずれの群間にも有意な変化は認められなかった。GSSG-R 活性は、L 群に比し H 群で 12% 有意に減少した。

(2) 薬物代謝系

第一段階酵素の Cyt.C-R 活性は、NaCl の添加により上昇する傾向にあり、H 群に比し HN 群で 16% 高い活性を示した (Table 7)。P-450 量は、H 群に比し HN 群で 13% 高い傾向が見られたが、その他の群間ではほとんど差がなかった。一方、第二段階酵素の GST 活性は、NaCl の添加により減少傾向であった。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、C 群に比べ CN 群で 25% 有意に減少したが、L 群、及び H 群では NaCl 添加によりそれぞれ 15% 前後多い傾向がみられた (Table

8)。尿酸量は、C 群に比し CN 群で 17% 低い傾向であったが、その他の群間では明らかな差違は見られなかった。尿素窒素量は、L 群、C 群、H 群において NaCl 添加により各々 64%、36%、67% 有意に増加した。A/G 比は、いずれの群間においても明らかな変化が認められなかった。

3) タンパク質量の影響

(1) 活性酸素消去系

過酸化脂質量は、タンパク質量が増えるに従って減る傾向にあった (Table 5)。一方、GSH 量はタンパク質量が増えるに従って増加し、L 群に比べ C 群で約 33%、H 群で約 41% 高く、それぞれ有意差が認められた。GSH-Px の Se 依存型の活性は、タンパク質量が増えるに従って上昇する傾向にあった (Table 6)。一方、Total の GSH-Px 活性は、タンパク質量が増えるに従って低下する傾向にあった。GSSG-R 活性においても、タンパク質量が増えるに従って減少傾向がみられ、L 群に比し H 群で 12% 有意に低かった。

(2) 薬物代謝系

Cyt.C-R 活性、P-450 量、及び GST 活性は、いずれの群間においてもほとんど差が見られなかった (Table 7)。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、H 群では L 群、及び C 群に比べ、各々約 22%、33% の有意な低値を示した (Table 8)。尿酸量は、C 群に比し H 群で 11% 多い傾向がみられた。尿素窒素量は、L 群に比べ C 群は 31%、H 群は 39% 増加し、それぞれ有意差が認められた。A/G 比は、タンパク質量が増えるに従って減少する傾向がみられた。

4) 相互の影響

(1) 活性酸素消去系

過酸化脂質量は、いずれの群間でも明らかな差違は認められなかった (Table 5)。GSH 量では、HN 群は LN 群に比し 56%、CN 群に比し 28%、それぞれ有意に多かった。GSH-Px の Se 依存型の活性は、いずれの群間においてもほとんど差がみられなかった (Table 6)。Total の GSH-Px 活性は、タンパク質量が増えるに従って低下する傾向にあった。又、HN 群は LN 群、及び CN 群に比べ 15% 前後低い傾向にあった。GSSG-R 活性は、CN 群に比し LN 群で 18% 有意に高かった。

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

Groups	GSH-Px ¹⁾ (n mol/mg protein/min)	GSHPx ²⁾ (n mol/mg protein/min)	GSSG-R (n mol/mg protein/min)
L	128±11	239±19	64±3
LN	150±11	257±24	67±3
C	137±5	219±17	60±2
CN	145±9	234±19	57±2 ^d
H	141±11	209±28	56±2 ^a
HN	148±8	210±20	61±4

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

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

¹⁾Se-dependent

²⁾Total

(2) 薬物代謝系

Cyt.C-R 活性は、タンパク質量が増えるに従って上がる傾向であった (Table 7)。P-450 量は、CN 群に比し HN 群では 24% 有意に多かった。GST 活性では、タンパク質量が増えるに従って上昇する傾向がみられた。

(3) 血清中成分

クレアチニン量は、CN 群に比し LN 群は 27% 有意に多かった (Table 8)。尿酸量は、CN 群に比し HN 群で 38% の有意な増加を示した。尿素窒素量はタンパク質量が増えるに従って増加する傾向にあり、HN 群は LN 群に比し 41% の有意な増加を示した。A/G 比は、タンパク質量が増えるに従って低

Table 7. Effect of sodium chloride and/or protein level 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)
L	95±8	0.63±0.02	541±24
LN	102±6	0.65±0.04	518±12
C	99±5	0.64±0.03	543±13
CN	103±7	0.58±0.04	525±11
H	99±7	0.64±0.03	558±22
HN	115±7	0.72±0.03 ^e	531±8

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

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

Table 8. Effect of sodium chloride and/or protein level 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 ¹⁾
L	0.51±0.03	3.00±0.14	9.5±0.6	1.61±0.10
LN	0.57±0.05	2.83±0.20	15.6±2.0 ^a	1.57±0.07
C	0.60±0.06	2.93±0.26	12.4±0.7 ^a	1.54±0.06
CN	0.45±0.01 ^{b,d}	2.42±0.23	16.9±1.4 ^b	1.43±0.06
H	0.40±0.03 ^{a,b}	3.26±0.28	13.2±0.6 ^a	1.50±0.10
HN	0.47±0.05	3.33±0.28 ^e	22.0±2.2 ^{c,d}	1.39±0.09

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

Abbreviations: L, low protein diet; LN, low protein diet containing sodium chloride; C, control protein diet; CN, control protein diet containing sodium chloride; H, high protein diet; HN, high protein diet containing sodium chloride

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

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

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

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

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

¹⁾albumin-globulin-index

下する傾向がみられた。

4. 考察

日本人の死因の上位を占めているガン、心疾患、脳血管疾患は食塩の慢性的摂取過剰がハイリスク因子の一つと目されている。その作用発現機構についてはほとんど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なっている。本研究では、ラットに高塩食下でタンパク質量の異なる飼料を投与し、肝における薬物代謝系と活性酸素消去系を成すグルタチオン関連酵素への影響を中心に一連の実験を行なった。

8% NaCl 食の投与はカゼインタンパク質量の多少にかかわらず、被験動物であるラットの体重増加を抑制し、PER を低下させた。同様の結果は 10% NaCl 食や 1% NaCl 溶液の摂取によっても認められており、いずれも飼料の利用率の低下が観察されている⁴¹⁾。又、標準タンパク質食に比べ高タンパク質食、及び低タンパク質食の体重増加は抑制されたが、PER はタンパク質量が低いほど高かった。

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^{15,42)} が、血圧上昇の機序は複雑で未だ一致した考えがなされていない。本実験では高塩食、及び高タンパク質食によって血圧が上昇し、同時に腎相対重量の増加が認められた。これは恐らく、腎 Na 排泄機能の低下を主因として血圧が上昇し⁴²⁻⁴⁴⁾、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。又、血清尿素窒素含量は高血圧、及び高タンパク質摂取により増加するといわれている⁴⁵⁾ 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 投与により細胞の酸化障害に対する防御機構として重要な GSH-Px の活性上昇とマロンジアルデヒド量を指標とした過酸化脂質量の増加傾向がみられた。GSH-Px の活性とマロンジアルデヒド生成との間には正の相関がある²⁶⁾ とされているが、GSH-Px 活性の上昇傾向は、90 日間に亘る高塩食によって生ずる脂質過酸化を抑制し、その有害性を低下させるために機能していることを意味しているのかもしれない。又、肝 GSH 量は GSH の生合成に必要なアミノ酸を含むタンパク質の摂取量を反映する一方、GSH-Px とカップリングして GSSG の還元をつかさどる。GSSG-R は摂取タンパク質量と反比例するといわれている⁴⁶⁾ が、本実験においてもそれぞれ同様の結果となった。

薬物代謝系の酵素活性は高塩食投与により、全体的には第一段階で上昇傾向、第二段階で低下傾向が

見られた。Cyt.C-R は小胞体電子分配酵素と言うべき性質を持ち、NADPH からの電子を P-450 等に伝達する機能を有している⁴⁷⁾ のでその活性増加の傾向は、P-450 と共に第一段階の薬物代謝を促進させることになる。一方、第二段階の抱合反応酵素である GST の活性が低下傾向にあることを加味すると、高塩食投与によって B(a)P の様な化学発ガン物質が活性化されて細胞の突然変異やガン化を引起こす¹⁴⁻¹⁶⁾ 可能性も懸念される。又、摂取タンパク質量の増加と共に P-450 量は不変^{48,49)}、あるいは上昇⁴¹⁻⁴³⁾、Cyt.C-R 及び GST 活性は上昇⁴⁶⁾ するという報告があるが、本実験では P-450 において NaCl 投与の高タンパク質食で活性増加の傾向がみられただけであった。今後は、P-450 のどのような分子種が NaCl 投与によって変動するのかを調べ、その基質となる生体異物を確定することが望まれる。

5. 要約

8% NaCl 食は、PER の低下と共に血圧の上昇、腎相対重量の増加、及び血清中尿素窒素量の増加を招く等、全身的な影響が懸念された。生体異物の最大の処理器官である肝での薬物代謝系には、明らかな変化が見られなかったが、活性酸素消去系では、GSH-Px 活性の上昇傾向と LOOH 量の増加が認められ、活性酸素もしくはフリーラジカルの生成が促進された可能性が伺われた。食餌タンパク質量が上がるにつれて腎相対重量の増加、及び GSH 量の上昇と GSSG-R 活性の低下傾向がみられた。又、タンパク質量の影響が高塩食下で出現した項目は P-450 量であり、高タンパク質食により増加を示した。

以上の結果から、NaCl 摂取過剰はタンパク質の欠乏や過剰と共に生体異物処理機構や活性酸素消去系に直接、あるいは間接に影響を及ぼし、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，**48** 50-57 (2001)
- 2) Tuyns, A.J.: Sodium chloride and cancer of the digestive tract. *Nutri. Cancer*, **4** 198-205 (1983)
- 3) Tatemats, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M., and Shirai, T.: Effects in rats

- of sodium chloride on experimental gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of 4-nitroquinoline-1-oxide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55** 101-106 (1975)
- 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) 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)
- 12) 児玉雅彦：発ガンと活性酸素。トキシコロジーフォーラム，**8** 166-178 (1985)
- 13) Watanabe, M.: Cytochrome P-450 and the metabolism of chemical carcinogens. *Metabolism Disease*, **19** 1757-1768 (1982)
- 14) 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)
- 15) 森 陽，菅家祐輔：食品衛生の生物科学，25 (1983) 三共出版
- 16) 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)
- 17) Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science*, **221** 1256-1264 (1983)
- 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) Rinette, H.M., Sterrenberg, L., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., and Noordhoek, J.: Sex differences in the cellular defense system against free radicals from oxygen or drug metabolites in rat. *Arch. Toxicol.*, **56** 83-86 (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 (1964) 中山書店
- 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 (1972) 講談社
- 37) 金井 泉, 金井正光: 臨床検査法提要, 29 423-428 (1983) 金原出版
- 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) Suzuki, H.: The effects of vitamin E deficiency and a high salt intake on changes in kidney and testes involving renal autolysis and the metabolism of rats subjected to long-term cod liver oil feeding. *栄養と食糧*, **23** 6-12 (1970)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) Merrill, J.C. and 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)
- 44) 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)
- 45) 化学および血清療法研究所: 正常値ハンドブック

- ク, 41-42 (1985) クリニカ出版
- 46) Bauman, P.F., Smith, T.K., and Bray, T.M.: The effect of dietary protein and sulfur amino on hepatic glutathione concentration and glutathione-dependent enzyme activities in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **66** 1048-1052 (1988)
- 47) 坂本 清: 蛋白質の栄養価. *食の科学*, **84** 31-39 (1985)
- 48) Hietanen, E.: Modification of hepatic drug metabolizing enzyme activities and their induction by dietary protein. *Gen. Pharmac.*, **11** 443-450 (1989)
- 49) Kato, N., Tani, T., and Yoshida, A.: Effect of dietary level of protein on liver microsomal drug-metabolizing enzymes, urinary ascorbic acid and lipid metabolism in rats fed PCB-containing diets. *J. Nutr.*, **110** 1686-1694 (1980)

Summary

The effect of sodium chloride (NaCl) and/or protein levels on hepatic glutathione-related enzyme systems in rats was investigated for a period of 90 days. The body weights of the NaCl-treated groups were in general lower than those of the NaCl-untreated groups throughout the treatment. The blood pressure of the NaCl-treated rats were found to be significantly elevated, especially, with high protein diets.

Feeding of NaCl diets led to slight increase of glutathione peroxidase activities and lipid peroxides contents. Feeding of NaCl and high protein diets resulted in significant increase of P-450 contents and slight decrease of glutathione S-transferase activities.

On the basis of the results obtained in the present study, it may be suggested that long-term feeding of high NaCl and high protein reduces the detoxification of xenobiotic compounds to generate the oxygen radicals and lipid peroxides leading to various pathological processes.