

アスコルビン酸ステアリン酸エステルを投与した マウスにおける鉛毒性の軽減

植木 芽美, 山中 美幸, 綿貫 靖子, 滝本 恭子, 松倉 理恵,
岡本麻友子, 毛利 友美, 中川 一夫

Ameliorative effect of ascorbyl stearate ester-feeding on lead toxicity in mice

Megumi Ueki, Miyuki Yamanaka, Yasuko Watanuki, Kyoko Takimoto,
Rie Matukura, Mayuko Okamoto, Tomomi Mohri, and Kazuo Nakagawa

We aimed to evaluate roles of hepatic ascorbic acid in ddY strain mice after a single injection of lead acetate ($100 \mu\text{mol/kg}$ body weight, i.p.). Lead decreased glutathione content, inhibited glutathione S-transferase activity, and increased calcium content in the liver four days after the injection. These lead-induced alterations were significantly antagonized by the treatment of mice with a diet containing 1 (w/w)% ascorbyl stearate ester (ASE) for three days before and four days after lead injection, whereas ascorbate content was largely elevated in the livers of animals treated with both lead and ASE. Furthermore, the production of NADPH was enhanced by not only lead injection but also ASE-feeding. These results suggest that ASE-feeding could ameliorate cell damage through the restoration of intracellular redox states.

I. はじめに

細胞内の酸化還元状態が特定の生体機能に影響を与え、分子内 SH 基の酸化還元によって酵素活性や蛋白質の機能が修飾されることはよく知られており、たとえば、解糖系やペントースリン酸回路にかかわるいくつかの酵素の活性が変化する¹⁾。また、細胞内の酸化還元状態の変化は、正常な細胞において生理的に重要な役割を果たしているだけでなく、毒性発現機序においても重要と考えられる。水銀などの重金属イオンによるチオール/ジスルフィド変換を介して酵素活性が阻害されると、重金属中毒症状の発現につながる。このようなところから、細胞内酸化還元反応が細胞内シグナル伝達として機能しているとの考えが提唱されている^{1,2)}。

著者らは既に、酢酸鉛の急性投与によりマウス肝のグルタチオン量が減少し、これを基質とするグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性も低下する

ことを報告した^{3,4)}。グルタチオン量の減少は、還元型グルタチオンと結合した鉛イオンの排泄を反映したものと考えられ、重金属の解毒機構の一つとみなすことができる。しかし、細胞内に高濃度で存在する還元型グルタチオンの減少は、細胞内を酸化状態へと向かわせ、酸化ストレスにより他の肝機能に二次的な影響を生じさせるおそれもある。

マウス肝においては、アスコルビン酸はグルタチオンに比べると濃度は低いものの重要な水溶性還元物質であり、肝細胞内で合成も可能であるので、グルタチオン量の低下した細胞では一層その重要性が増すと見える。グルタチオンとアスコルビン酸は酸化還元連関を形成し、細胞内還元状態の維持に寄与していると考えられている^{5,6)}。従って鉛負荷によってグルタチオン代謝が変動するだけでなくアスコルビン酸代謝に影響が及ぶことも考えられる。またアスコルビン酸が鉛の尿中排泄を促進するという報告⁷⁾もあり、アスコルビン酸の鉛解毒機構への関与もうかがえる。本報告では、酢酸鉛急性投与時におけるこれら水溶性還元物質と NADPH 産生能の変

動を検討するとともに、外来性アスコルビン酸が肝細胞内の酸化還元状態維持に寄与できるかという観点から、脂溶性アスコルビン酸ステアリン酸エステル (ASE) を含む飼料を投与したマウスを用いて酢酸鉛投与の影響を検討した。

II. 実験方法

1. 使用動物

実験動物は、ddY 系雄性マウス (体重 30–35 g) を日本エスエルシー (浜松) から購入した。温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 10\%$ 、12時間 (6時~18時) 照明の環境に設定した飼育室で飼育し、3日間以上予備飼育した後に実験に用いた。粉末飼料 (オリエンタル酵母社製, MF) と水道水は自由に摂取させた。

2. 使用薬物

ASE はナカライテスク社 (京都) から購入した。ASE は粉末飼料に 1% (W/W) の割合で混ぜて与えた。酢酸鉛は蒸留水に溶解し、 $100 \mu\text{mol/kg}$ 体重を腹腔内投与した。

3. 総グルタチオン (還元型グルタチオン+酸化型グルタチオン) 量の測定

肝臓の総グルタチオン量は、既報の酵素サイクリング法³⁾ により定量した。生理食塩水で還流した肝臓を摘出、秤量し、テフロンホモジナイザーを用いて $10 \text{ mM } 5, 5\text{'-dithiobis}(2\text{-nitrobenzoic acid})$ でホモジナイズした。恒温水還流装置のついた日立ダブルビーム分光光度計内のセルで反応を行い、 412 nm での吸光度増加速度からグルタチオン量を求めた。

4. 総アスコルビン酸 (アスコルビン酸+デヒドロアスコルビン酸+ジケトグルン酸) 量の測定

辻村ら⁸⁾ のジニトロフェニルヒドラジンをを用いる吸光度法により肝臓の総アスコルビン酸を定量した。この方法で測定したアスコルビン酸は、還元型アスコルビン酸、デヒドロアスコルビン酸およびジケトグルン酸を合わせたものである。肝臓を 5% メタリン酸でホモジナイズして得た磨砕液を試料とし、既報の手順に従い、 530 nm での吸光度を測定した。

5. カルシウムの定量

肝カルシウム量の定量はオルトクレゾールフタレインコンプレクソンを呈色液とする既報の方法⁹⁾ に従い、カルシウム測定用キット (ヤトロン社製) を使用した。肝臓に 2 N HClO_4 - 1 N NaOH (1 : 1) 液を加えてホモジナイズして遠心分離し、上清液に

呈色試薬を混和した後波長 570 nm で吸光度を測定した。

6. グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性の測定

肝ホモジネート中のグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性は、既報³⁾ のとおり Asaoka ら¹⁰⁾ による *o*-dinitrobenzene を基質とする吸光度法によって測定した。

7. NADPH 産生能の測定

基本的には NADPH の吸光度増加をみるグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性の測定法に準じて行ったが、この方法では反応生成物を基質する 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素によって生じる NADPH を排除できないので NADPH 産生能とした。

肝臓を 4 倍量の 0.154 M KCl - 50 mM Tris 緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) を用いてホモジナイズし、 $10,000 \text{ g}$ で 20 分間遠心分離して得られた上清を試料液とした。恒温水還流装置つき分光光度計内のセルに、 0.25 M Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) 1.0 ml 、 0.1 M MgCl_2 0.5 ml 、 3 mM NADP 0.1 ml 、蒸留水 0.7 ml および試料液 0.1 ml をとって 30°C でプレインキュベートした後、 0.05 M グルコース-6-リン酸 0.1 ml を添加して反応を開始し、波長 340 nm での吸光度の増加分から分子吸光係数 $6,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて NADPH 量に換算した。試料液の蛋白質量を Lowry らの方法¹¹⁾ により定量し、NADPH 産生能は $\text{nmol/mg protein/min}$ を単位として表示した。

8. グルタチオンレダクターゼ活性の測定

肝 $10,000 \text{ g}$ 上清中のグルタチオンレダクターゼ活性の測定は吸光度法で行った。 1 mM 酸化型グルタチオンを基質とし、 0.2 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) 中で進行する反応で消費された NADPH の吸光度を測定波長 340 nm で記録し、分子吸光係数 $6,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて NADPH 量に換算することにより酵素活性 ($\text{nmol/mg protein/min}$) を求めた。

III. 実験結果

1% (W/W) ASE 含有飼料を 3 日間投与した後、酢酸鉛 ($100 \mu\text{mol/kg}$) を腹腔内投与し、更に 4 日間 ASE 含有飼料の投与を続けたマウスの肝臓の総グルタチオン量、総アスコルビン酸量、GST 活性およびカルシウム量を測定した結果を図 1 に示した。

既に報告した様に酢酸鉛投与により肝グルタチオン量は有意に ($p < 0.05$) 減少した。しかし、ASE 単独投与群ではグルタチオン量に変化なく、しかも ASE を前投与したマウスでは鉛投与によるグルタチオン量の減少も見られなくなった。一方、総アスコルビン酸量は鉛単独投与や ASE 単独投与の影響を受けず、増加の傾向を示したにすぎない。ところが ASE を前投与したマウスに鉛を投与すると総アスコルビン酸量は有意に ($p < 0.05$) 増加した。グルタチオンを基質する GST 活性は鉛投与により低下したが、ASE を前投与した場合には活性低下は見られなくなった。またカルシウム量は鉛投与により対照群の約 5 倍に増加したが、ASE を前投与したマウスでは約 2 倍の増加にとどまった。

細胞内のグルタチオンは圧倒的に還元型の占める割合が多いが、還元状態の維持はグルタチオンレダクターゼ活性に負うところが大きい。またこの酵素は NADPH を還元力供給源としているので、グルタチオンレダクターゼ活性と NADPH 産生能に対する鉛イオンのインビトロ添加の影響を検討した。比較的低濃度 ($10^{-6} \sim 10^{-5}$ M) の鉛イオンの添加によりグルタチオンレダクターゼ活性は抑制され、主

にグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性の抑制を反映した NADPH 産生能の低下が見られた (表 1)。

次に酢酸鉛あるいは ASE 投与マウスにおけるグルタチオンレダクターゼ活性と NADPH 産生能を検討したところ、グルタチオンレダクターゼ活性には変動は見られなかったが、NADPH 産生能は鉛投与群、ASE 投与群、および鉛と ASE 併用投与群のいずれにおいても上昇していた (表 2)。

IV. 考 察

体内に入った鉛の解毒機構として、肝臓の還元型グルタチオンが鉛との結合体を形成し、肝外への排泄が促進される機構が考えられる。このことが原因となってマウス肝臓のグルタチオン量は鉛の急性的投与後に減少するのであるが³⁾、グルタチオンはマウス肝にあっては高濃度に存在する還元性物質であるので、急速なグルタチオン量の減少は細胞内の酸化還元状態を酸化的状態へ導き、酸化ストレスが発生する。しかし細胞内にはグルタチオンのほかにも水溶性および脂溶性の還元性物質やラジカル捕捉剤が多種類存在しており、化学反応や酵素反応によって細胞内酸化還元状態の維持を行っている。さらに

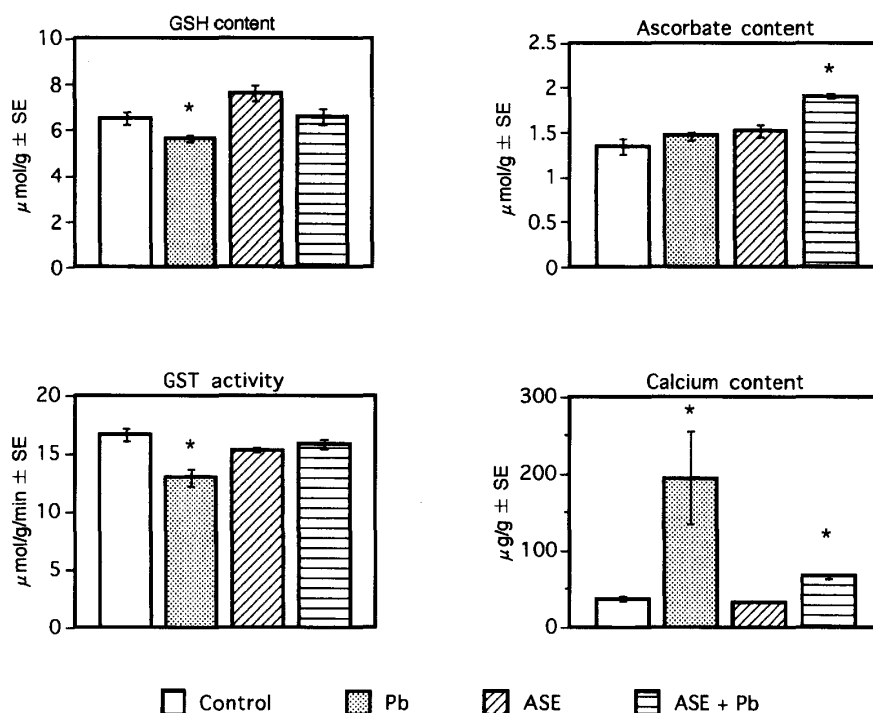


図 1 アスコルビン酸ステアリン酸エステル (ASE) 摂取マウスに対する鉛投与の影響
1% ASE を含む餌を 3 日間投与した後、酢酸鉛 (100 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) を投与し、4 日後に肝グルタチオン (GSH) 量、アスコルビン酸量、カルシウム量およびグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性を測定した。

* 有意差検定は Student の *t*-test を用いて行い、危険率 $p < 0.05$ を有意とした ($n = 3 \sim 6$)。

表1 試験管内添加した鉛イオンのグルタチオンレダクターゼ活性および NADPH 産生能に対する影響

	Control	Pb ²⁺ (10 ⁻⁶ M)	Pb ²⁺ (10 ⁻⁵ M)
グルタチオンレダクターゼ活性 (nmol/mg protein/min ± SE, n=3)	113 ± 6.7	110 ± 6.2*	102 ± 7.0*
NADPH 産生能 (nmol/mg protein/min ± SE, n=5)	15.2 ± 0.5	14.8 ± 0.5*	11.9 ± 0.4*

* 有意差検定は Student の paired t-test を用いて行い、危険率 p < 0.05 を有意とした。

表2 アスコルビン酸ステアリン酸エステル (ASE) 投与したマウスの NADPH 産生能に対する鉛投与の影響

	NADPH 産生能 (nmol/mg prot./min ± SE)
普通食 + 生食投与群 (対照群)	31.4 ± 0.8
普通食 + 酢酸鉛投与群	36.3 ± 1.2*
ASE 食 + 生食投与群	37.2 ± 0.4*
ASE 食 + 酢酸鉛投与群	39.8 ± 1.8*

1% ASE を含む餌 (ASE 食) を 3 日間投与した後、酢酸鉛 (100 μmol/kg, i.p.) を投与し、その 4 日後に肝 NADPH 産生能を測定した。

* 対照群との有意差検定は Student の t-test を用いて行い、危険率 p < 0.05 を有意とした (n=5)。

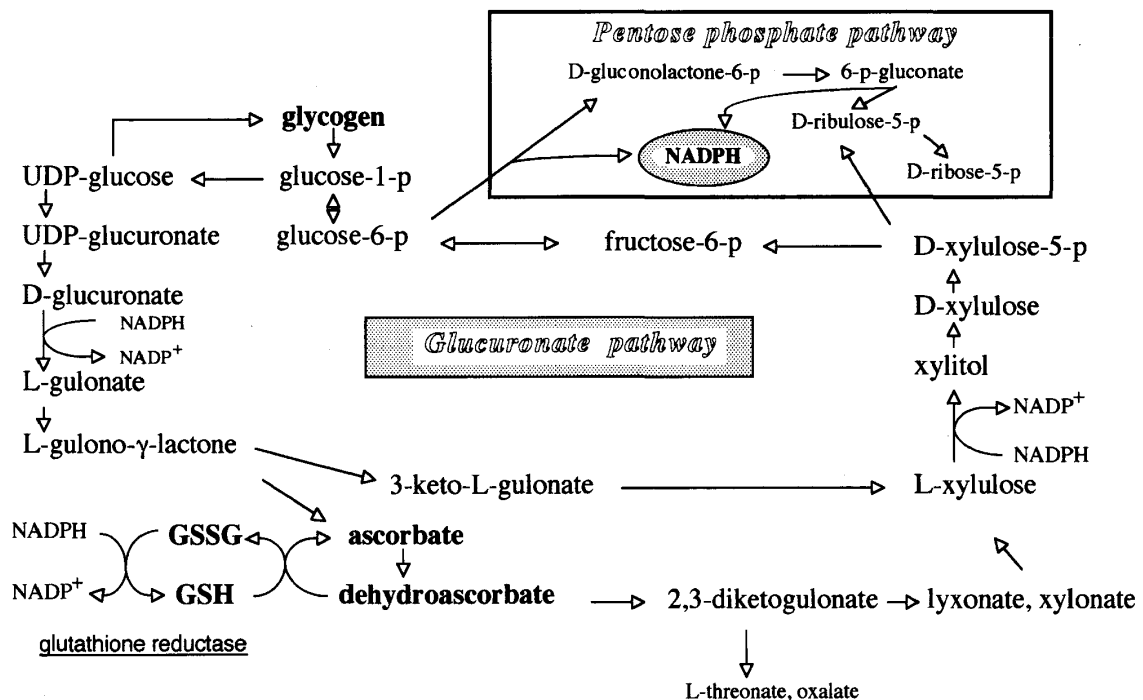


図2 アスコルビン酸の生合成とリサイクルに関連するウロン酸回路とペントースリン酸回路
 GSH: 還元型グルタチオン; GSSG: 酸化型グルタチオン
 細胞内が酸化傾向にあるときには酸化型アスコルビン酸の一部はウロン酸回路に入り、解糖系の逆行によって還元型アスコルビン酸へ再生されることも可能である。

これらの諸因子が相互に酸化還元連関を形成していることが知られており^{5,6)}、細胞内親水領域に存在するグルタチオンとアスコルビン酸との間で行われる酸化還元反応や、疎水領域である生体膜内で酸化されたビタミンEが親水領域のアスコルビン酸によって還元されるビタミンE再生反応は比較的よく知られた例である。従って、鉛投与によってグルタチオンが減少したとき、細胞内親水領域に存在するもう一つの還元性物質であるアスコルビン酸の動態がどのように変動するのか興味のあるところである。

今回、酢酸鉛の腹腔内投与4日後において肝総グルタチオン量が減少したとき総アスコルビン酸量には変化は認められなかったが、ASEを3日間前投与したマウスに鉛投与を行いさらにASE投与を4日間続けると総アスコルビン酸は有意に増加し、グルタチオン量も正常値に回復した。しかしASEを単独投与した場合にはアスコルビン酸量に有意な変化は認められなかった。鉛投与を受けていない対照群のマウスの肝では、ASEの摂取により一時的に増えたアスコルビン酸によってアスコルビン酸合成反応がフィードバック阻害を受けたため、肝のアスコルビン酸量は実質増えなかったのであろう。ところが鉛投与を受けた後ではこのフィードバック阻害がはたらくにくくなっていて、ASE由来のアスコルビン酸やアスコルビン酸合成系の亢進によって増加したアスコルビン酸が、減少したグルタチオンを補っていると考えられる。この推測と関係すると思われる報告がある。すなわちマウス肝においては、グルタチオン枯渇に伴う酸化ストレスによりグリコーゲン分解が促進され、グルコース代謝の分路であるウロン酸回路への六炭糖の流入が増加し、さらにその分枝であるアスコルビン酸生合成が高まることが報告されている^{12~15)}。生じた酸化型アスコルビン酸は還元型グルタチオンとカップルして還元されるが、他方、ウロン酸回路のバイパスを形成してウロン酸回路へ戻り、ペントースリン酸回路の糖と相互変換を行いながらウロン酸回路を進み、アスコルビン酸合成へ再利用される(図2)ことも可能である。アスコルビン酸合成が可能なマウス肝では、ウロン酸回路を経由したアスコルビン酸の再生は重要となる。

このことと関連して明かとなったもう一つの重要な結果は、鉛およびASE投与に伴うNADPH産生能の増加である。NADPH産生にかかわり、ペントースリン酸回路を律速しているグルコース-6-

リン酸脱水素酵素活性は、細胞傷害をもたらす種々の薬物投与によっても上昇することが知られており、核酸合成に必要な五炭糖を供給するこの回路の活性化は、傷害された組織の修復に寄与する補償的な生体反応と考えられる。したがって鉛投与後におけるNADPH産生能の増加は、この修復系が活性化されたことを意味している。

また、グルコース-6-リン酸脱水素酵素は、細胞内酸化還元状態により活性調節を受けることが知られており^{1,2)}、酸化ストレスに伴う混合ジスルフィド形成が本酵素の活性化をもたらすと考えられている。これによるNADPHの増加は細胞への還元力の供給増加を意味する。最近明らかにされたSalveminiらの報告¹⁶⁾によると、細胞内のグルタチオンプールの枯渇を起こすとグルコース-6-リン酸脱水素酵素の遺伝子発現が誘導され、やがて細胞内グルタチオン量が回復した。鉛投与によるNADPH産生能の増加はグルタチオン量の低下に起因するのかもしれないが、ASE投与時におけるNADPH産生能の増加の機序を説明することは現在のところ困難である。

グルタチオンとアスコルビン酸は共に細胞内では還元型が大きな比率を占めており、相補的に還元型の維持に寄与し合っている。たとえば、酸化型アスコルビン酸の還元には還元型グルタチオンに依存した酵素反応が関与するが、これにより生じる酸化型グルタチオンは、NADPHを補欠因子とするグルタチオンレダクターゼにより還元型に復帰する。酢酸鉛を腹腔内投与したマウスではグルタチオンレダクターゼ活性の低下は見られなかったことから、NADPH産生能の増加は還元型グルタチオンの再生を確保する。またウロン酸回路にかかわる酵素のなかにもNADPHを補酵素とするものがあるので、鉛を投与したマウスにおいて、とくにASEを併用投与した場合にみられるNADPH産生能の増加は、還元型アスコルビン酸の合成に有利となる。

このようにASE投与によるアスコルビン酸量の増加やNADPH産生能の亢進は生体防御にとって重要である。事実、還元型グルタチオンを基質とするGST活性は鉛単独投与によって低下したが、ASE前投与により活性低下が阻止された。また、鉛投与による細胞傷害によって上昇したと思われるカルシウム量¹⁷⁾も、ASE前投与を行った場合に鉛投与による上昇が大幅に抑さえられた。これらの結果から、ASE投与は正常な動物においては細胞内酸化還元状態に影響を与えないが、鉛投与後のグル

タチオン量減少に伴う細胞内酸化傾向を阻止し、鉛による細胞傷害を軽減することが示唆された。

V. 要 約

ASE 添加飼料を3日間投与したマウスに酢酸鉛(100 $\mu\text{mol/kg}$)を腹腔内投与すると、肝臓の総アスコルビン酸は有意に増加した。しかし ASE や鉛を単独に投与した場合には変化は認められなかったことから、鉛投与時にはアスコルビン酸合成反応のフィードバック阻害は解除されているのかもしれない。一方、鉛投与により減少したグルタチオン量は、ASE の併用投与により回復した。NADPH 産生能は鉛イオンの試験管内添加では有意に抑制されたにもかかわらず、鉛または ASE の単独投与により上昇し、ASE と鉛の併用投与によっても上昇した。傷害された肝組織の修復のためにペントースリン酸回路が活性化されて NADPH の産生が増加し、この増加は ASE 投与に伴うウロン酸回路を介したアスコルビン酸再生系の活性化にも寄与する可能性がある。グルタチオン量の減少と並行して GST 活性も鉛投与により低下したが、ASE を投与したマウスでは鉛の影響は見られなくなった。細胞傷害の指標ともいえる肝カルシウム量は、鉛投与により増加したが ASE 併用投与により増加が有意に抑制された。これらの結果は、ASE 投与が細胞内酸化還元状態の改善をもたらし、鉛による細胞傷害を軽減していることを示唆する。

文 献

- 井上正康 編：活性酸素とシグナル伝達，講談社サイエンティフィック，東京（1996）
- M. Inoue: *Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects. Part B, D. Dolphin, R. Poulson, and O. Avramovic(Eds.), p. 613, Wiley, New York(1989)*
- K. Nakagawa: *Japan. J. Pharmacol.*, **51**, 173 (1989)
- K. Nakagawa: *Toxicol. Lett.*, **62**, 63 (1992)
- A. Meister: *Cancer Res.*, **54**, 1969s(1994)
- B. S. Winkler, S. M. Orselli, and T. S. Rex: *Free Rad. Biol. Med.*, **17**, 333 (1994)
- S. Niazi, J. Lim, and J. P. Bederka: *J. Pharmac. Sci.*, **71**, 1189 (1982)
- 辻村卓, 内山由子, 藤田秋治: *ビタミン*, **143**, 210 (1971)
- 中川一夫, 小林加代子, 西村美紀: *本誌*, **45**, 14 (1990)
- K. Asaoka and K. Takahashi: *J. Biochem.*, **94**, 1985 (1983)
- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- J. Martensson and A. Meister: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11566 (1992)
- G. Banhegyi, M. Csala, L. Braun, T. Garzo, and J. Mandl: *FEBS Lett.*, **381**, 39 (1996)
- L. Braun, M. Csala, A. Poussu, T. Garzo, J. Mandl, and G. Banhegyi: *FEBS Lett.*, **388**, 173 (1996)
- G. Banhegyi, L. Braun, M. Csala, F. Puskas, and J. Mandl: *Free Rad. Biol. Med.*, **23**, 793 (1997)
- F. Salvemini, A. Franze, A. Iervolino, S. Filosa, S. Salzano, and M. V. Ursini: *J. Biol. Chem.*, **274**, 2750 (1999)
- F. A. X. Schanne, A. B. Kane, E. E. Young, and J. L. Farber: *Science*, **206**, 700 (1979)