

かき肉エキスのアセトアミノフェンによる肝障害抑制作用の検討

春 松 槇, 福 田 卓, 松 井 博 之, 松 田 芳 和
(日本クリニック(株)・中央研究所*)

Study of oyster extract on acetaminophen-induced hepatic damage

Shin HARUMATSU, Suguru FUKUDA, Hiroyuki MATSUI, Yoshikazu MATSUDA
Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

Summary

Glutathione is found in various tissues and plays an important role in terms of anti-oxidant effects and drug metabolism. In a previous study, we reported that oyster extract enhanced glutathione in rat hippocampus.

Acetaminophen has been extensively used as an analgesic. However, it has been reported that an overdose of it caused serious hepatic damage. Therefore, the aim of this study was to determine whether oyster extract inhibits hepatic damage due to acetaminophen.

In serum, the administration of oyster extract tended to suppress up-regulation of AST and ALT with acetaminophen. In liver, the administration of oyster extract increased total glutathione. In addition, it suppressed the down-regulation of glutathione with acetaminophen.

These results indicate that oyster extract inhibits hepatic damage due to acetaminophen.

グルタチオンはグルタミン酸, システイン, グリシンからなるトリペプチドであり, 生体が有する主要な抗酸化物質である。その細胞内濃度は比較的高く維持されており, 抗酸化作用だけでなく, 薬物などの解毒にも大きく関わっている¹⁾。

アセトアミノフェン (APAP) は解熱鎮痛薬として幅広く使用されており, 適正な使用量であれば非常に安全な薬剤である。しかし過剰に摂取すると重篤な肝障害を起こすことが報告されている²⁾。APAPによる肝障害はラットなどでも再現が来ており, 肝障害の原因としてグルタチオンの枯渇が報告されている³⁾。

われわれはこれまでに, かき肉エキス (OE) の投与によりラットの腎臓および海馬でグルタチオンが増強することを示してきた⁴⁾。そこで本実験では OE の APAP に対する肝障害抑制作用を検討した。

実験方法

動物

5週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (清水実験材料(株)) を購入し, 1週間馴化させたものを実験に用いた。ラットは一般的な環境下で飼育を行い, MF 飼料 (オリエンタル酵母工業(株)) と水道水を自由摂食, 飲水させた。

馴化させたラットを体重により Control 群, OE 群, APAP 群, APAP + OE 群の4群に分け, Control 群と APAP 投与群に滅菌蒸留水を, OE 群と APAP + OE 群に 500 mg/kg 量の OE (日本クリニック(株)) を AM9:00 に7日間, ゾンデにより強制経口投与した。またアセトアミノフェン肝障害では摂食状態が障害の程度に影響を与えるため, 投与7日目の夕方に飼料を抜き, 一晩絶食を行った。

アセトアミノフェン肝障害モデル

APAP (Sigma Aldrich) を 42℃ に温めた滅菌生理食塩水に溶解して APAP 投与液を作成した。絶食をかけた次の日, AM9:00 より作成した APAP 投与液を APAP 群と APAP + OE 群に 400 mg/kg 量で腹腔内投与し, アセトアミノフェン肝障害モデルを作成した。Control 群と OE 群には 42℃ に温めた滅菌生理食塩水を腹腔内投与した。投与後6時間後にジエチルエーテル (和光純薬工業(株)) で麻酔をかけ, 腹腔内動脈より血液を採取した。採取した血液はセパラピットチューブ (有フチガミ器械) に入れ, 血清を得た。また, 肝臓は冷却した PBS で灌流後, 液体窒素で凍結後 -20℃ で各項目の測定まで保存した。

血液パラメーター

血清 AST, ALT および LDH は酵素法 (JSCC 標準化

*所在地: 京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

対応法)によりそれぞれ測定を行った(株ファルコバイオシステムズ)。

肝臓総グルタチオン量の測定

凍結した肝臓を5% SSA 溶液に入れ、ホモジェナイザーで破碎した。破碎後、蒸留水で5倍に希釈し8000×g、4℃、10 min 遠心した。遠心後上清を回収し、総グルタチオン量測定サンプルとした。総グルタチオン量の測定はGlutathione quantification kit(株同人化学)を用いて行った。

肝臓 Glutathione-S-transferase 活性の測定

凍結した肝臓をリン酸緩衝液(0.1 M リン酸緩衝液, 2 mM EDTA, pH 7.0)に入れ、ホモジェナイザーで破碎した。10000×g、4℃、15 min で遠心後上清を回収し、Glutathione-S-transferase (GST) 活性測定サンプルとした。GST 活性の測定はGlutathione-S-transferase kit (Sigma Aldrich)を用いて行った。

肝臓 DNA の断片化の測定

凍結した肝臓をリン酸緩衝液(50 mM リン酸緩衝液, 120 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.4)に入れ、ホモジェナイザーで破碎した。13000×g、20 min、4℃で遠心し上清を肝臓DNA断片化サンプルとして用いた。DNA断片化の測定はcell death detect kit (Roche)を用いて行った。

統計解析

全ての結果は2元配置分散分析により検定後、有意であった場合にFisher's PLSDにより群間の検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

実験結果

Table 1に示したように、有意な差は認められなかったがControl群と比較してAPAP群で血清AST、ALTの増加傾向が認められた。しかし、OEを投与したAPAP+OE群ではAPAPにより増加した血清AST、ALTを減少させる傾向を示した。血清LDHについてはどの群においても有意な差は認められなかった。

Table 1 Serum AST, ALT, and LDH concentrations.

group	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)
Control	190 ± 40	40 ± 11	3784 ± 781
APAP	233 ± 96	68 ± 39	3581 ± 1663
OE	216 ± 62	43 ± 8	4501 ± 1632
OE + APAP	188 ± 46	52 ± 11	4501 ± 1632

Values are means ± S.D.

また、Table 2に示したように肝臓中GST活性および肝臓DNAの断片化についてはAPAPおよびOE投与による影響は認められず、各群に有意な差は認められなかった。

Table 2 GST activity and DNA fragmentation in liver.

group	GST (mM/min/g tissue)	DNA fragmentation (vs. control)
Control	8.41 ± 2.95	1.00 ± 0.53
APAP	5.90 ± 1.84	1.29 ± 0.73
OE	6.79 ± 1.64	0.86 ± 0.49
OE + APAP	5.91 ± 2.08	1.13 ± 0.62

Values are means ± S.D.

肝臓中総グルタチオンにおいてはFig. 1に示したように、Control群とOE群を比較して、OEの投与により有意な肝臓中総グルタチオンの増加が認められた。また、APAP群においてはControl群と比較して有意に肝臓中総グルタチオン量が低下していた。しかし、OEを投与したAPAP+OE群では減少した肝臓中総グルタチオン量が有意に回復していた。

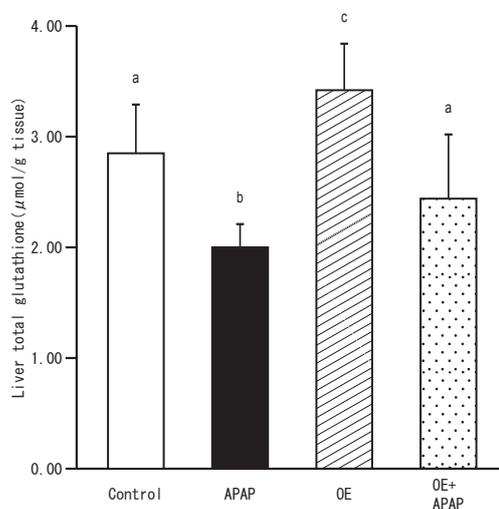


Fig. 1 The amount of total glutathione in liver. Values are means ± S.D. Different letters show significant differences at $p < 0.05$ by two-factor factorial ANOVA followed by Fisher's PLSD.

考察

APAPは通常使用する場合は非常に安全性の高い薬と考えられているが、高用量の処方や常用などにより肝臓に障害を起こす場合がある。APAPの代謝には主に3つの経路があることが知られており、一つはグルクロン酸による抱合、もう一つは硫酸による抱合である。硫酸により抱合されたAPAPは血中に放出され、腎臓で尿として排出される。また、グルクロン酸に抱合されたAPAPもほとんどが硫酸抱合同様に尿として排出され、一部が胆汁に排出される。そして3つ目の経路はCYP2E1 (Cytochrome P450 2E1)による代謝であり、APAPによる肝障害の原因はこの3つ目の経路であると言われている^{5,6)}。APAPのCYP2E1による代謝産物であるNAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine)は非常に反応性の高い物質であり、細胞内のタンパク質や核酸に結合することで細胞を破壊し

強い肝障害を引き起こす。この NAPQI を解毒するためには GST とグルタチオンが必要であり、GST は NAPQI にグルタチオンを抱合させる。これにより無毒なメルカプトール酸に NAPQI を変化させ、体外に排出する。この反応には十分なグルタチオンの存在量が重要となっており、グルタチオンが枯渇すると NAPQI を解毒することが出来ない。これらのことより APAP による肝障害を抑制するためにはグルタチオンを増やすことが効果的であることが考えられる。

本実験の結果より OE は肝臓の総グルタチオン量を増強する作用があることが示され、APAP 投与により起こるグルタチオンの減少を抑制することが示された。われわれはこれまでに腎臓および海馬で OE 単独投与における総グルタチオン量の増強を示していたが、肝臓についてそのような結果は得られていなかった。肝臓はさまざまな物質の解毒に重要な組織であるため、肝臓での OE による総グルタチオン量の増強は有害物質の解毒、それによる肝臓保護に非常に有用であると考えられる。グルタチオンを増強させる物質として N-アセチルシステイン (NAC) が報告されている⁷⁾。NAC はグルタチオンの構成物質であるシステインを供給することでグルタチオンを増強させると考えられている。OE にはシステインの材料となるタウリンなどの硫化アミノ酸が含まれている。しかし、飼料から摂取する硫化アミノ酸量に対して、投与した OE 中の硫化アミノ酸量は極めて少ない。そのためグルタチオンの増加には OE 内に含まれる硫化アミノ酸による増加の可能性は低いと思われる。このことから、何らかの物質がグルタチオンの増加に関与している可能性があると思われる。本実験の結果では肝障害の指標である血清 ALT、AST において APAP による増加傾向と OE による減少傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。APAP による肝障害はしっかりと用量依存性が認められることがわれわれの予備検討でも分かっている (data not shown)。そのため APAP 投与によりわずかな肝障害を示したものの、APAP の投与量が少なかったために、有意差が認められるような AST、ALT の上昇に至らなかったと考えられる。GST 活性においても各群において有意差が認められなかった。前述したように GST は APAP の代謝産物である NAPQI のグルタチオン抱合に必要な酵素であるが、この結果から肝臓においては OE および APAP による GST 活性の制御は起こらないことが示された。また肝臓 DNA の断片化については、APAP は肝臓障害を起こす時にアポトーシスとネクローシスを起こすことが知られている⁸⁾。そこで肝臓障害の程度を測定するため、肝臓 DNA の断片化を測定したが、各群ともに有意な差は認められなかった。この結果は APAP による肝障害があまり強くなかったために、はっきりと差が認められるような DNA の傷害まで

至らなかったことが考えられる。血清 LDH についても ALT、AST と同様に肝障害の指標として用いられるが、同様の理由で差が認められなかったと考えられる。

以上の結果は OE が APAP による肝障害を抑制する可能性を示し、OE の継続的な飲用により APAP をより安全に服用できる可能性を示した。

今後は、本実験ではあまり肝障害の強くない条件下で試験を行ったが、血中パラメーターに変化が認められるような APAP の影響が強い条件下または、変動を受けやすいパラメーターの検討も行う必要があると思われる。また、上記に記したように APAP の解毒には別の経路も存在していることから、グルクロン酸および硫酸抱合への OE の影響も検討するべきと考えられる。また、依然として OE によるグルタチオン増強の機序が不透明である。そのため、OE によるグルタチオンの合成、分解、放出、流入への影響を検討していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND.(2004) Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* 134(3): 489-92.
- 2) James LP, Mayeux PR, Hinson JA.(2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug. Metab. Dispos.* 31(12): 1499-506.
- 3) Acharya M, Lau-Cam CA.(2010) Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *J. Biomed. Sci.* 17 Suppl. 1: S35
- 4) 福田卓, 春松楨, 松井博之, 松田芳和 (2012) かき肉エキスによるラット海馬中総グルタチオン増強効果 微量栄養素研究 29 : 106-109.
- 5) Ben-Shachar R, Chen Y, Luo S, Hartman C, Reed M, Nijhout HF.(2012)The biochemistry of acetaminophen hepatotoxicity and rescue: a mathematical model. *Theor. Biol. Med. Model.* 9: 55.
- 6) Bessems JG, Vermeulen NP.(2001) Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* 31(1): 55-138.
- 7) Lauterburg BH, Corcoran GB, Mitchell JR.(1983) Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. *J. Clin. Invest.* 71(4): 980-91.
- 8) Tripathy D, Grammas P.(2009) Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *J. Neuroinflammation.* 6: 10.