

研究論文紹介

四塩化炭素中毒時の酸化ストレスによる
中性スフィンゴミエリナーゼ活性化を介するセラミド蓄積¹ 奈良女子大学食物栄養学科, ² 鳥取大学医学部病態解析医学市 育代¹, 上川 千明¹, 中川 朋香¹, 小林 慧子¹, 片岡 亮子¹
永田 絵理¹, 北村 佑子¹, 中崎 千尋¹, 松浦 達哉², 小城 勝相¹

Vitamins (Japan), 83 (11), 618-619 (2009)

Neutral sphingomyelinase-induced ceramide accumulation by oxidative stress
during carbon tetrachloride intoxicationIkuyo Ichi¹, Chiaki Kamikawa¹, Tomoka Nakagawa¹, Keiko Kobayashi¹, Ryoko Kataoka¹
Eri Nagata¹, Yuko Kitamura¹, Chihiro Nakazaki¹, Tatsuya Matura², Shosuke Kojo¹¹Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University²Division of Medical Biochemistry, Department of Pathophysiological and Therapeutic Science, Tottori University Faculty of Medicine

[Toxicology, 261, 33-40 (2009)]

劇症肝不全時には腎臓や脳などが障害を受け、いわゆる多臓器不全を起こすことはよく知られている。肝不全時には血液中に炎症性サイトカイン、エンドトキシン、芳香族アミノ酸、アンモニアなど多くの細胞障害作用を有する物質が出現する。劇症肝不全は死亡率が高いため、これらの毒物を除去する人工肝臓(補助肝臓)が種々考案されてきた。毒物の中でも活性炭に吸着する脂溶性物質の存在も知られていたが、その本体は未だに明らかではない。近年、セラミドが多くの細胞にアポトーシスを引き起こすことが明らかになってきた。そのため、肝不全時に現れる脂溶性毒物の1つの候補としてセラミドである可能性を調べた。

補助肝臓の開発に使用されるモデル病態の1つが、薬物投与による劇症肝炎である。我々はラットの四塩化炭素(CCl₄)中毒においては、肝臓で酸化ストレスの上昇¹⁾、MAPKの活性化²⁾、血漿セラミドの増加³⁾が起こることを明らかにしてきた。本研究ではセラミドの増加機構について検討した。

8週齢の雄Wistarラットにミネラルオイル(対照群)、CCl₄(CCl₄:ミネラルオイル=1:1)を4 mL/kg体重経口投与した。対照群はミネラルオイル投与12h後に、CCl₄群は2, 6, 12, 24, 36h後に解剖を行った。セラミドはLC-MS/MSにて測定を行った。スフィンゴミエリンの加水分解でセラミドを生成するスフィンゴミエリナーゼ(SMase)については、至適pHの異なる中性SMase(nSMase)と酸性SMase(aSMase)の活性を測定した。活性はニトロベンゾフラザン(NBD)ラベル化C₆-スフィンゴミエリンを基質とし、生成するNBDラベル化C₆-セラミドをHPLCで分離、蛍光検出器で定量して測定した。

肝細胞死の指標である血漿のALT, ASTはCCl₄投与12h後に有意に増加し、36h後に最も高かった。酸化ストレスの指標である肝臓のビタミンC(C)はCCl₄投与6h以降有意に低下した。腎臓のCもCCl₄投与24, 36h後には対照群に比較して有意に低下した。肝臓のビタミンE(E)はCCl₄投与6h以降に有意に減少し、腎臓のEも投与12h以降に有意に低下した。

本論文と関連文献1)~3)の別刷請求先: 〒630-8506 奈良市北魚屋西町 奈良女子大学食物栄養学科 小城 勝相

肝臓セラミドは CCl_4 投与 2h 後に増加し、一時有意差はなくなるが、その後 12, 24h 後にも有意に増加した。この結果より、肝臓セラミドの増加は肝細胞死が誘発される以前に起こっていることが明らかとなった。血漿、腎臓セラミドは CCl_4 投与 24, 36h 後に、脳のセラミドは 36h 後に有意に増加した。セラミドは血液・脳関門を通過する³⁾ことがわかっているため脳でのセラミド蓄積も血液から移行したものと考えられる。脳のセラミドの分布は他の組織とは異なり C18:0 が圧倒的に多い。血液中に増加するセラミドの中でも C18:0 の増加率が 18.6 倍と最も高いこと、36h 後の脳では nSMase 活性、aSMase 活性ともに対照群と変わらないことも血液からの移行を支持する。36h 後には BUN (blood urea nitrogen) が有意に増加し、腎不全が起こることもわかった。

肝臓の nSMase 活性は CCl_4 投与 2, 24h 後に有意に増加したが、aSMase 活性は CCl_4 投与 2h 以降有意に低下した。腎臓における nSMase 活性は CCl_4 投与 2, 24h 後にやはり有意に増加し、肝臓同様、aSMase 活性が上昇することはなかった。

nSMase は *in vitro* で還元型グルタチオン (GSH) によって阻害されることが分かっている⁴⁾ので、GSH/GSSG (酸化型グルタチオン) の比を測定した。肝臓、腎臓では GSH/GSSG は CCl_4 投与 2h 後以降有意に低下した。この比は CCl_4 による酸化ストレスによって減少するものと考えられる。

以上の結果より CCl_4 による肝障害では、酸化ストレスによる GSH の低下により nSMase 活性が上昇し、その結果、肝臓セラミドが増加し、次いで肝細胞死が誘導され、セラミドが血中に漏出し、これが脳や腎臓における障害を引き起こすことが示唆された。

(平成 21.8.7 受付)

文 献

- 1) Sun F, Tsutsui C, Hamagawa E, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S (2001) Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 186-191
- 2) Iida C, Fujii K, Kishioka T, Nagae R, Onishi Y, Ichi I, Kojo S (2007) Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) during carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Arch Toxicol* **81**, 489-493
- 3) Ichi I, Nakahara K, Fujii K, Iida C, Miyashita Y, Kojo S (2007) Increase of ceramide in the liver and plasma after carbon tetrachloride intoxication in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* **53**, 53-56
- 4) Liu B, Hannun YA (1997) Inhibition of the neutral magnesium dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* **272**, 16281-16287
- 5) Zimmermann C, Ginis I, Furuya K, Klimanis D, Ruetzler C, Spatz M, Hallenbeck JM (2001) Lipopolysaccharide-induced ischemic tolerance is associated with increased levels of ceramide in brain and in plasma. *Brain Res* **895**, 59-65