

研究論文紹介

四塩化炭素中毒のラット肝臓における α -トコフェロールの効果¹ 奈良女子大学食物栄養学科, ² エーザイ (株), ³ 鳥取大学医学部病態解析医学飯田ちなつ¹, 藤井こずえ¹, 古賀枝里子¹, 鷺野由紀子¹, 北村 佑子¹
市 育代¹, 阿部 皓一², 松浦 達哉³, 小城 勝相¹

Vitamins (Japan), 83 (8), 472-473 (2009)

Effect of α -tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liverChinatsu Iida¹, Kozue Fujii¹, Eriko Koga¹, Yukiko Washino¹, Yuko Kitamura¹, Ikuyo Ichi¹
Kouichi Abe², Tatsuya Matsuura³, Shosuke Kojo¹¹Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University²Eisai Co., Ltd³Division of Medical Biochemistry, Department of Pathophysiological and Therapeutic Science, Tottori University Faculty of Medicine

[Archives of Toxicology 83 (5), 477-483 (2009)]

生体内で酸化ストレスが亢進する代表的病態が四塩化炭素 (CCl₄) 投与による肝炎である。CCl₄ はミクロソームのシトクロム P450 やミトコンドリアの電子伝達系で 1 電子還元を受けてトリクロロメチルラジカル ($\cdot\text{CCl}_3$) を発生して広汎なラジカル反応、脂質過酸化反応を誘発し、壊死や Caspase-3 依存性のアポトーシスを惹起することが知られている¹⁾。よく研究された病態なので新しく開発された酸化ストレス指標の有効性を確認するために使われるほどである。

我々は、CCl₄、チオアセトアミド、D-ガラクトサミンのような薬剤による肝炎において、肝臓のビタミン C (C) が酸化ストレスの鋭敏な指標であることを明らかにしてきた²⁾が、酸化ストレスがどのように細胞死を引き起こすのかという分子機構については未だ明らかではない。上記 3 種の薬剤による肝炎では、細胞死のシグナルの 1 つとして、MAPK (mitogen-activated protein kinase) が活性化されることが判明している³⁾⁻⁵⁾。本研究では、抗酸化剤の経口投与で CCl₄ による肝障害を軽減できるかという試みとして、 α -トコフェロール (E) の効果について検討した。

8 週齢雄性 Wistar ラットを、1) 12 h 絶食した後、CCl₄ {0.5 ml/kg (ミネラルオイルとの 1:1 混合物を 1 ml/kg)} を経口投与した群、2) E {0.5 ml/kg (ミネラルオイルとの 1:1 混合物を 1 ml/kg)} を CCl₄ 投与 12 h 前に経口投与した群、3) E のみを投与した群、4) CCl₄ の代わりにミネラルオイルのみを投与した正常群を用意し、これら 4 群間の比較を行った。

血漿 ALT は CCl₄ 投与 12 h 以降、AST は 24 h 以降有意に上昇した。この結果は CCl₄ 投与後 12 h 以降に壊死が激しく起こっていることを意味する。しかし、E 投与によりその上昇は有意に抑制された。この結果は E が肝臓の壊死を有意に阻害したことを意味する。肝臓の C は CCl₄ 投与 6 h 以降に減少したが、E 投与によりその減少は CCl₄ 投与 12 h 以降に有意に抑えられた。CCl₄ 投与による C の減少が阻害されたことから、E は抗酸化作用により肝細胞の壊死を抑制すると考えられる。

肝臓の E 濃度は CCl₄ 投与により影響を受けない。また、CCl₄ を投与しない正常なラットに E のみを与えても肝臓での E の増加は全く見られなかった。これは E をミネラルオイルに溶解したため可溶化できず正常な腸では吸収

(注) 本論文と引用文献の別刷請求先:

〒 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

できなかったと考えられる。しかし CCl_4 と E を同時に投与すると、肝臓の E の濃度は有意に増加した。この結果は、E が障害を受けた肝臓に蓄積することを示している。この理由は、E 輸送系が酸化ストレスを感知して E を動員したというより CCl_4 によって腸の細胞膜が障害を受け、E の吸収(透過)が病的に亢進するためにミネラルオイルに溶解した E でも吸収できたためと考えられる。

MAPK に関しては、 CCl_4 投与で C が減少する投与 6 h 後よりはるか以前である 1.5-3 h 後、即ちサイトゾルにまで広汎な酸化ストレスが及ぶ前にリン酸化 JNK, ERK が一時的に増加した。リン酸化 p38 MAPK は CCl_4 投与 6 h 以降減少した。E は肝臓死を有意に抑制するが MAPK に対しては全く影響を与えなかった。

以上の結果から、時間経過から見ると酸化ストレスに最も鋭敏に反応したのは MAPK であった。これはインスリン受容体を介するシグナルネットワークの場合のような高感受性のタンパク質が関与する⁶⁾ものと考えられる。E によって MAPK の活性化は全く影響を受けなかったが、E によって酸化ストレスを軽減すると肝臓の壊死が有意に抑制されることから、たとえ少量のラジカル種で MAPK が活性化されても、C の減少が起こる程度にラジカル反応が亢進しなければ必ずしも壊死に至らないことがわかった。その点を考慮すると C は酸化ストレスの生体影響を予測するよい指標であることが再確認された。

チオアセトアミドの肝障害は酸化ストレスにより引き起こされるが、DMSO の経口投与で完全に抑制され、同時に MAPK の活性化も完全に阻害される³⁾。一方、チオアセトアミドの肝障害は E では阻害できない。もう 1 つの肝臓毒、D-ガラクトサミンによる肝障害も酸化ストレスによるものであり、DMSO では部分的に阻害できる⁷⁾が、E の投与によっては全く効果がなかった。

CCl_4 、チオアセトアミド、D-ガラクトサミンは共に肝臓に酸化ストレスを亢進し、MAPK を活性化し³⁾⁻⁵⁾、肝

臓にアポトーシスと壊死を引き起こすが、発生するラジカル種、ラジカルの細胞内局在などに違いがあり、抗酸化剤への反応も異なるものと考えられる。

経口投与物質、即ち、食品成分等の実際の生体内における抗酸化作用を検討する場合、これらの肝臓毒を組み合わせることでその効果と共に機構についても知見が得られると期待されるが、酸化ストレスが引き起こす生理作用をさらに明らかにしていく必要があると考えられる。

(平成 21.5.8 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) Kojo S (2004) Vitamin C, Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress *Curr Med Chem* **11**, 1041-1064
- 3) Kishioka T, Iida C, Fujii K, Nagae R, Onishi Y, Ichi I, Kojo S (2007) Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver. *Eur J Pharmacol* **564**, 190-195
- 4) 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
- 5) Nishioka H, Kishioka T, Iida C, Fujii K, Ichi I, Kojo S (2006) Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) during D-galactosamine intoxication in the rat liver. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 3019-3022
- 6) 小城勝相 (2005) バイオファクター(シグナル伝達物質)としての過酸化水素. *ビタミン* **79**, 334-337
- 7) Iida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Ichi I, Kojo S (2007) Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on necrosis and oxidative stress caused by D-galactosamine in the rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol* **53**, 160-165