[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
[衛生化学]
41 (1) 49-58 (1995)

油脂変質に伴い生成するカルボニル化合物のラット初代培養肝細胞に 対する毒性について

平山晃久, 鎌田賢治, 笠井映江, 渡辺徹志
京都薬科大学

Toxicological Study of Carbonyl Compounds Derived from Oxidized Lipids on Primary Cultured Rat Hepatocytes

TERUHISA HIRAYAMA, KENJI KAMATA, TERUE KASAI and TETSUSHI WATANABE
*Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku,
Kyoto 607, Japan*

(Received July 11, 1994)

Toxicological studies of carbonyl compounds derived from oxidized lipids on primary cultured rat hepatocytes were investigated. As carbonyl compounds, saturated aldehyde, α , β -unsaturated aldehyde, glyoxals and malondialdehyde were used.

Hepatocytes isolated from male Wistar rats by the collagenase perfusion method were cultured in 35 mm dishes in an atmosphere of 5% CO₂—95% air at 37°C. Rat hepatocytes in culture for 24 h were incubated in Williams' E medium containing carbonyl compounds. Hepatotoxicity was estimated as the leakage of hepatic enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH) and glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) from the cells to medium. LDH and GOT activities were determined by an automatic analyzer. The order of hepatotoxic potency was as follows: glyoxals > α , β -unsaturated aldehydes > saturated aldehydes. Malondialdehyde had not hepatotoxicity.

Hepatotoxicity of α , β -unsaturated aldehyde was inhibited by the addition of ascorbic acid and glutathione, whereas that of autoxidized methyl linoleate (peroxide value=2538 meq/kg and carbonyl value=872 mmol/kg) was inhibited by the addition of not only 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine such as antioxidant, but also ascorbic acid and glutathione. From the above results, it is suggested that both hydroperoxides and α , β -unsaturated aldehydes contribute to the hepatotoxicity of autoxidized methyl linoleates.

Keywords——primary cultured rat hepatocyte; α , β -unsaturated aldehyde; leakage of hepatic enzyme; autoxidized linoleate; hepatotoxicity; carbonyl compound

緒 言

前報において油脂自動酸化物中に多量の飽和アルデヒド類が検出され、¹⁾またこれまでに当研究室で油脂自動酸化物中より α , β -不飽和アルデヒド類、²⁾グリオキサール類、³⁾マロンジアルデヒド⁴⁾を検出している。したがって、これらカルボニル化合物は変質した食品中や油脂中にも存在することが予想され、それらを摂取した際の生体に対する影響について考慮する必要がある。

カルボニル化合物の毒性として、変異原性などが報告されており、⁵⁻¹¹⁾その生体に対する影響が注目されている。一方、油脂自動酸化物の毒性についても多くの報告があり、¹²⁻²⁰⁾中でも食用油脂の毒性発現には、腸管で吸収されにくいと推測されているハイドロパーオキサイド¹³⁾よりも、更に分解が進行した二次生成物が関係しているという見解が多い。¹⁵⁻¹⁷⁾Kanazawa らは、リノール酸の自動酸化二次生成物をラットに経口投与すると吸収後肝臓に到達する¹⁶⁾と報告しており、また同グループは肝臓中

NADPH レベルの低下¹⁸⁾ など、二次生成物の種々の hepatotoxicity を検討している。^{19,20)} しかしこれらの実験には、自動酸化油脂をクロマトグラフ的に分画したヒドロパーオキサイドや低分子化合物群などの物質群を用いており、また研究者によって分画方法が異なり物質群の組成に問題があることから、活性のある化合物の本態が厳密には不明であることが多い。

近年、化合物の毒性を比較する際、動物実験の代替法として培養細胞を使用する方法が簡便でより一般的となりつつある。培養細胞を用いれば、特定の臓器に対する化合物の作用を観察することができ、一度に多種の化合物や各濃度について個体差を考慮することなく毒性評価を行える。

そこで著者は、肝臓に対するカルボニル化合物単独の影響を明らかにするため、自動酸化油脂より検出された飽和アルデヒド類、 α, β -不飽和アルデヒド類、グリオキサール類、及びマロンジアルデヒドのラット初代培養肝細胞に対する酵素漏出性を指標とした毒性試験²¹⁾を行った。

さらに、これらカルボニル化合物の肝毒性に対し、各種化合物の抑制効果からカルボニル化合物の肝毒性発現機序を推定し、興味深い結果が得られたので報告する。

実験の部

1. 試薬及び試液 Crotonaldehyde, *n*-heptanal は東京化成社製を用いた。2-Pentenal は Aldrich 社製を用いた。乳酸脱水素酵素 (LDH) はオリエンタル酵母社製 LDH from pig heart [Grade II] を用いた。LDH 及びグルタミン酸オキザロ酢酸アミノトランスフェラーゼ (GOT) 活性測定キットは京都第一科学社製ユニキットレート LDH-N 及び GOT を用いた。

2-Heptenal, 2-octenal は Trippett ら²²⁾ の方法で合成し、GC により 95% 以上の純度を確認した。4-Hydroxy-2-nonenal は Gardner ら²³⁾ の方法で合成した。Malondialdehyde は Marnett ら⁸⁾ の方法により調製した Na 塩を用いた。

他のカルボニル化合物は市販品又はそれを精製して用いた。

ウイリアムス E 培地[粉末]、ファンギゾン、ペニシリンーストレプトマイシン (PG-SM) 液体は GIBCO 社製を用いた。牛血清は財団法人阪大微生物病研究会製 new calf serum (heat inactivated) を用いた。L-アスコルビン酸 (V.C), DL- α -トコフェロー

ル (V.E) 及び 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) はナカライテスク社製を用いた。2, 2'-Azobis(2-amidinopropane) $\cdot$ 2 HCl (AAPH), promethazine $\cdot$ HCl (PMZ), *N, N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD) 及び glutathione (GSH) は和光純薬社製を用いた。MEM は日本製薬社製組織培養用イーグル MEM 培地「ニッスイ」②を用いた。ジメチルスルホキシド (DMSO) は同仁化学研究所製の紫外吸収スペクトル測定用純溶媒を用いた。*tert*-Butylhydroperoxide (*tert*-BuOOH) は片山化学工業社製を用いた。

24 時間自動酸化したりノール酸メチル (ML) は通気しながら 60°C で加熱して調製し、衛生試験法・注解²⁴⁾に従い過酸化価 (POV), カルボニル価 (COV) を測定した。

ラットは、オリエンタルバイオサービスより購入した 5-6 週令の KBL: Wistar 系雄性ラット (SPF) に水と固形飼料 (清水実験材料社製 MF) を自由に与えて、6 週令、体重約 180 g になるまで飼育して実験に用いた。

培地及び試薬の調製は基本的に中村ら²¹⁾の方法で調製した。

被験物質溶液の調製はアルデヒドを DMSO もしくは生理的食塩水 (生食) に溶解して 2 M の被験物質原液を作成し濾過滅菌した。この原液を、滅菌 DMSO もしくは滅菌生食で順次希釈して、2-1000 mM の被験物質溶液を調製した。この濃度はディッシュ中アルデヒド濃度の 200 倍であり、被験物質溶液 (10 μ l) を培地 (2 ml) へ溶解して目的のアルデヒド濃度とした。

Formaldehyde, acetaldehyde, glyoxal, methylglyoxal は生食に、その他のアルデヒドは DMSO に溶解した。

2. 器具及び装置 酵素活性自動測定器は京都第一科学社製 RaBA-S を用い、酵素活性は IU/liter で示した。CO₂ インキュベーターはタバイ社製炭酸ガス培養器 BNA-111 を使用した。

3. ラット初代培養肝細胞の調製 体重 180 g 前後の Wistar 系雄性ラットをネブタールで麻酔し、腹部を正中切開して腹腔を露出させ、肝臓を脱血した。肝臓が一様に脱血した後、コラゲナーゼ溶液を用いて肝臓を消化し肝臓を摘出した。

肝臓は細分して細胞濾過器に通し、粗肝細胞画分を得た。これを MEM に分散し、50 $\times$ g, 1 分間の低速遠心を 4 回繰り返した沈澱物より、純度 96% 以上、²¹⁾ 生存率 80% 以上 (トリパンブルー排除テスト

法²⁵⁾により算出)の肝実質細胞(肝細胞)を得た。

4. 肝細胞毒性実験 WE培地で 6×10^6 細胞個/mlの濃度に調製した細胞浮遊液を、コラーゲンコート処理35mmディッシュに1mlずつ播種し、5%CO₂-95%Airに設定したCO₂インキュベーターを用いて培養した。

播種から6時間後、培地を除きCa, Mg不含リン酸緩衝塩類溶液[PBS(-)]で細胞を洗い、WE培地を2ml加えてさらに18時間培養した。

試験は1サンプル、1濃度につき、2枚のディッシュを用い、実験は3回繰り返して行った。24時間初代培養後、培地を除きPBS(-)で細胞を洗い、WE培地(2ml)を加えた。この際培地に被験物質溶液(10 μ l)を、コントロールには滅菌DMSO又は滅菌生食(10 μ l)を添加してさらに24時間培養した。

24時間後培地を採取して酵素活性を自動測定器で測定し、細胞は顕微鏡下で観察した。

酵素漏出性は、被験物質を添加しないコントロールの酵素活性値を100%とし、被験物質を添加したディッシュの酵素活性値を%で示し、統計処理はコントロール群と被験物質添加群のデータ間における t 検定を行い、危険率1%及び5%で有意差を検定した。

5. 酵素阻害作用の測定 LDH溶液はLDHをpH7.4の0.1M phosphate bufferに溶解し、自動測定器を用いてLDH活性が1000 mIU/mlとなるように調製した。

試験は1サンプル、1濃度につき、2本の試験管を用い、実験は3回繰り返して行った。試験管にLDH溶液(2ml)を採り、そこへ被験物質溶液(10 μ l)を、コントロールにはDMSO又は生食(10 μ l)を添加してアルミキャップで栓をし、37°Cで24時間振盪し、反応液の酵素活性を自動測定器で測定した。酵素阻害性は、被験物質を添加しないコントロールの酵素活性値を100%とし、被験物質を添加した試験管の酵素活性値を%で示し、統計処理はコントロール群と被験物質添加群のデータ間における t 検定を行い、危険率1%及び5%で有意差を検定した。

6. カルボニル化合物及びラジカル産生種の肝細胞毒性に対する抗酸化剤等の抑制効果実験 試験は1サンプル、1濃度につき、2枚のディッシュを用い、実験は2回繰り返して行った。24時間初代培養後、培地を除きPBS(-)で細胞を洗い、WE培地(2ml)を加えた。この時培地に、抗酸化剤溶液(10 μ l)を、コントロールには滅菌DMSO又は滅菌生食(10 μ l)を添加した。続いて培地中へカルボニル化合

物もしくはラジカル産生種溶液(10 μ l)を、コントロールには滅菌DMSO又は滅菌生食(10 μ l)を添加して24時間培養した。24時間後、培地を採取してLDH活性を自動測定器で測定した。抗酸化剤の添加効果は、カルボニル化合物もしくはラジカル産生種を添加し、抗酸化剤を添加しないディッシュのLDH活性値を100%、溶媒コントロールのLDH活性値を0%として、抗酸化剤を添加した試料のLDH活性値を%で示した。またAAPH, PMZ, GSH及びV.Cは生食に、その他の被験物質はDMSOに溶解した。

結果と考察

1. カルボニル化合物のラット初代培養肝細胞に対する酵素漏出性

初代培養肝細胞を用いる酵素漏出性を指標とした毒性試験の原理は、被験物質の添加により細胞に存在する酵素が培地中に遊離するか否かを、酵素活性を測定することにより観察するものである。

Wistar系雄性ラットの肝臓をEGTA前灌流-コラゲナーゼ処理して肝細胞を得、24時間初代培養した。その後カルボニル化合物を共存させてさらに24時間培養し、顕微鏡で形態像を観察後、培地へ漏出した乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性及びグルタミン酸オキザロ酢酸アミノトランスフェラーゼ(GOT)活性を紫外部初速度法で測定した。

超音波処理により細胞を破壊した、すなわち、細胞中の総酵素量はLDH (992.3 $\pm$ 46.3 IU/liter), GOT (360.3 $\pm$ 15.7 IU/liter)で、被験物質を添加していないコントロールの培地の酵素量はLDH (83.0 $\pm$ 0.7 IU/liter), GOT (73.8 $\pm$ 4.6 IU/liter)であった。結果はコントロールにおける酵素活性を100%として、これに対する試料の酵素活性を%で表し、6試行のデータの平均値と標準偏差で示した。

まず飽和アルデヒド類について試験を行ったところ、formaldehyde及びacetaldehydeを除き、ほぼ濃度依存的にLDH, GOTの漏出が認められた(Fig. 1)。Formaldehydeとacetaldehydeが明確な濃度依存性を示さなかった原因としては、それらの揮発性のために正確な判定ができなかったのか、formaldehydeなどによる細胞の固定化により変化が認められなかったのか今後検討する余地がある。飽和アルデヒド類の酵素漏出性は、LDHに関しては1-propanalが5 mMで40%程度上昇、GOTは1-pentanalが5 mMで70%の上昇であった。

α, β -不飽和アルデヒド類については、飽和アルデ

Fig. 1. LDH and GOT Leakage from Hepatocytes following Treatment with Alkanals

■ 0.1 mM, ▨ 0.5 mM, ▩ 1 mM, □ 5 mM alkanal in culture medium.
t-test comparison: *) $p < 0.05$, **) $p < 0.01$ statistically significant.

ヒド類よりも漏出性が強く, acrolein と crotonaldehyde を除いて, 0.1—5 mM の範囲で濃度依存的な酵素漏出を認めた (Fig. 2). 2-Pentenal は 2.5 mM 添加でコントロールの 4.7 倍の LDH 漏出が見られ, 2-heptenal の 5 mM 添加ではコントロールに対して 2.3 倍の GOT 漏出が観察された. 最近生体内外の脂質過酸化での生成, 挙動が注目されている 4-hydroxy-2-nonenal は 5 mM 添加で LDH が 3.9 倍, GOT が約 2 倍上昇し, 4 位に水酸基のない 2-nonenal よりも酵素漏出性が強かった. 2-Pentenal 以上, すなわち炭素数 5 以上のものでは, 5 mM より高濃度で LDH, GOT とともに漏出性が低下する現象が見られたが, この理由は漏出した酵素の活性がアルデヒドによって阻害されたためと思われる. Acrolein と crotonaldehyde が酵素漏出性を示さなかったのは, 前述の formaldehyde と同様, 培地中からの揮散又は細胞の固定化が原因と考えられた.

グリオキサル類及び malondialdehyde の結果を Fig. 3 に示した. グリオキサル類は, α, β -不飽和アルデヒド類よりさらに酵素漏出性が強く, glyoxal は 0.5 mM の添加でコントロールの 5 倍の LDH 漏出が観察され, 1 mM では 7.8 倍の LDH 漏出が見られた. Malondialdehyde はほぼ diacetyl と同様のパターンの酵素漏出性を示し, 1 mM 添加で LDH はコントロールの約 2.2 倍, GOT はコントロールの約 1.3 倍であった. Glyoxal, methylglyoxal, malondialdehyde は 5 mM 添加で酵素漏出性が低下しているが, このことは, 前述の α, β -不飽和アルデヒド類と同様に酵素阻害が原因であると思われる.

2. カルボニル化合物のブタ心臓由来 LDH に対する酵素阻害性

グリオキサル類や α, β -不飽和アルデヒド類の高濃度領域で認められる LDH, GOT 漏出性の低下

Fig. 2. LDH and GOT Leakage from Hepatocytes following Treatment with Alkenals

■ 0.1 mM, □ 0.5 mM, ▨ 1 mM, ▩ 2.5 mM, ▤ 5 mM, □ 10 mM alkenal in culture medium.
t-test comparison: *) $p < 0.05$, **) $p < 0.01$ statistically significant.

は、酵素阻害性が原因である可能性が考えられた。本毒性試験の原理より、被験物質が測定しようとする酵素を阻害する場合、正確な酵素漏出性を反映しているかどうか懸念される。そこで、カルボニル化合物の酵素に及ぼす影響を知るため、市販品のブタ心臓由来 LDH を用いて検討した。

結果は示さないが、試験したカルボニル化合物のうち、飽和アルデヒド類の LDH 阻害性は認められなかったが、 α, β -不飽和アルデヒド類は 1 mM より高濃度で有意に LDH 阻害性が見られ、グリオキサール類は 0.1 mM から、中でも methylglyoxal は 0.01 mM より高濃度で阻害性を認めた。これらのことより、高濃度領域の見かけ上の酵素漏出性の減少は、LDH に対する酵素活性阻害が一因であることが証明できた。なお、GOT についても同様の検討を行ったが、その失活が速いためか、酵素活性を測定することができなかった。

薬物の投与によって LDH や GOT などの血清中の酵素活性が上昇することはよく観察される。一般に、病理学的な血清中酵素の上昇は、細胞の損傷・壊死による流出、あるいは細胞膜透過性の亢進に

よって起こると考えられている。今回、脂質過酸化の二次産物であるカルボニル化合物を初代培養肝細胞に作用させると、培地中の LDH、GOT 活性が上昇した。このことは、カルボニル化合物によって細胞が障害を受けたことを示している。しかしその障害が、細胞壊死によるものなのか、細胞膜透過性の変化によるものなのかは判別できない。

Nakamura らは、肝臓毒である四塩化炭素を初代培養肝細胞に作用させた際の毒性を形態像の観察とともに酵素漏出性で検討している。²⁶⁾ その中で彼らは、四塩化炭素の肝酵素漏出性が、形態像に変化の見られない濃度では肝細胞膜の障害に基づく透過性亢進による酵素の leakage に、形態像に変化の認められた高濃度では肝細胞壊死に伴う breakage に起因していると考えている。著者らもこれと同様の検討を行ったところ、データは示していないが、1 mM 2-pentenal の添加時の酵素漏出性はコントロールに対して LDH が 1.5 倍に上昇しているが、形態像にはほとんど変化が認められなかった。これに対し、2.5 mM の LDH 漏出はコントロールの 4.7 倍になり、形態像にも著しい変化が認められ、培養皿の底

Fig. 3. LDH and GOT Leakage from Hepatocytes following Treatment with Glyoxals and Malondialdehyde

■ 0.01 mM, □ 0.05 mM, ▨ 0.1 mM, ▩ 0.5 mM, ▪ 1 mM, ◻ 5 mM in culture medium.
t-test comparison: *) $p < 0.05$, **) $p < 0.01$ statistically significant.

から剥離して浮遊する細胞が顕著に増加した。これらの傾向は、他の不飽和アルデヒドやグリオキサル類の酵素漏出性を有するものでも観察され、カルボニル化合物の低濃度領域での酵素漏出は細胞膜透過性の変化による leakage に、高濃度領域では細胞破壊による breakage に由来することが示唆された。

また、酵素漏出性が低下した高濃度のみならず、より低い濃度においても前述のように LDH に対して阻害性を示していたことから、カルボニル化合物は観察された酵素漏出性に、さらに酵素活性の阻害を上乗せした強い酵素漏出性を有する可能性も考えられた。カルボニル化合物が酵素を阻害する機構は、カルボニル化合物によって肝細胞中の酵素が漏出した後培地中で酵素が阻害されることによるのか、あるいは、カルボニル化合物が肝細胞に侵入した後、細胞中で酵素が阻害されることによる 2 つの可能性

が考えられるが、現在のところ不明である。

Griffin ら²⁷⁾ は、ピロリチジナルカロイド肝代謝物としての 4-hydroxy-2-alkenal 類が初代培養肝細胞に及ぼす遺伝及び細胞毒性を不定期 DNA 合成及び LDH 漏出性で検討している。彼らは、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) を 600 nmol/10⁶ cells の濃度で作用させたときの LDH 漏出性はコントロールに対して 9 倍上昇したと報告している。著者らの行った検討結果では、4-HNE を 500 nmol/10⁶ cells の濃度で添加したとき、コントロールに対して 2.9 倍となり、作用濃度が僅かに異なることを考慮しても LDH 漏出性に差異が見られた。この原因は実験方法の相違、すなわち、Griffin らは無血清培地で試験を行っているのに対し、著者は 5% 仔ウシ血清添加培地を用いているためと思われた。カルボニル化合物は血清に含まれるタンパク質と結合し、結果として培地中に遊離の 4-HNE が減少して肝細胞

に対する作用が減弱したものと考えられた。

グリオキサール類の中で methylglyoxal は *Salmonella typhimurium* TA 100 株に対して最も強い変異原性を示し、glyoxal はそれに次いで変異原性が強い⁷⁾ことが報告されている。今回著者が行った肝臓に対する毒性の検討では、glyoxal は methylglyoxal より酵素漏出性が強かった。このように、両者が一致しなかったことは興味深い。

今回の検討結果より、カルボニル化合物の肝細胞に対する毒性は、飽和アルデヒド、 α , β -不飽和アルデヒド、グリオキサール類の順に強くなったが、各グループの中での炭素鎖の長短による毒性の強弱は、明確には見い出せなかった。

3. カルボニル化合物及び脂質過酸化関連物質の細胞毒性を抑制する物質に関する検討

上記のように、脂質過酸化の二次生成物であるカルボニル化合物は肝細胞に対して濃度依存的な酵素漏出性を示し、またそれらの毒性の強度は、飽和アルデヒド類、 α , β -不飽和アルデヒド類、グリオキサール類の順であった。このように、カルボニル化合物の種類によって毒性に差異が見られたことは興味深い。

そこで、これらカルボニル化合物と脂質過酸化に関連した化合物の細胞に対する毒性発現機構を解明することを目的として、予備的に抗酸化剤の添加による毒性抑制効果を初代培養肝細胞に対する LDH 漏出性で検討した。

カルボニル化合物とラジカル産生種及び抗酸化剤の作用濃度について LDH 漏出性を用いて検討した。結果はコントロールの LDH 活性を 100% として試料の LDH 活性を%で示し、4 試行のデータの平均値と標準偏差で示した。

カルボニル化合物として、比較的強い酵素漏出性を示した 1-pentanal 5 mM, 2-pentenal 2.5 mM, glyoxal 1 mM を選択した。

過酸化物質には脂肪酸ヒドロパーオキシドのモデル化合物として *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH), ラジカル産生種としてはラジカル反応開始剤である 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH), 及び変質油脂として 24 時間自動酸化したリノール酸メチル [POV 2538 meq/kg, COV 872 mmol/kg] (ML) をそれぞれ選び、毒性を示す濃度の検討を行った。その結果、Table I に示すように、*tert*-BuOOH 1 mM, AAPH 1 mM, ML 65 μ g/ml 添加の際にそれぞれ肝細胞に対して毒性を示し、これらを細胞に作用させる濃度とした。

TABLE I. The Result of LDH Leakage from Hepatocytes Following Treatment with Radical Producers

Compound	Dose	LDH release ^{a)} (% ^{b)})
<i>t</i> -BuOOH	10 ^{c)}	144 $\pm$ 8
	100 ^{c)}	186 $\pm$ 18
	1 000 ^{c)}	469 $\pm$ 17
AAPH	10 ^{c)}	132 $\pm$ 6
	100 ^{c)}	128 $\pm$ 5
	1 000 ^{c)}	399 $\pm$ 19
ML	6.5 ^{d)}	121 $\pm$ 11
	65.0 ^{d)}	342 $\pm$ 31

a) Means $\pm$ S.D. for duplicate experiments.

b) LDH release of control (0.5% DMSO in culture medium) was decided as 100%.

c) Shown as μ M in culture medium.

d) Shown as μ g/ml in culture medium.

tert-BuOOH: *tert*-butylhydroperoxide, AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropane), ML: 24 h autoxidized methyl linoleate.

抗酸化剤には、 α -トコフェロール (V.E), 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), *N*, *N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD), promethazine (PMZ), L-アスコルビン酸 (V.C), glutathione (GSH) の 6 種を選択した。これらの各濃度における肝細胞毒性のデータは示さないが、BHA, DPPD, PMZ はそれぞれ 1000, 100, 1000 μ M の添加で LDH 漏出性が上昇したが、V.E, V.C 及び GSH は 1000 μ M 添加してもほとんど LDH の上昇は認められなかった。したがって抗酸化剤が毒性を示さない最高添加濃度を V.E 1000 μ M, BHA 100 μ M, DPPD 10 μ M, PMZ 10 μ M, V.C 1000 μ M, GSH 1000 μ M として肝細胞にはこの濃度以下で作用させることとした。

肝細胞に対するカルボニル化合物及びラジカル産生種等の毒性を抗酸化剤の添加によって抑制できるかどうか検討し、その結果を Fig. 4 に示した。グラフはコントロールの LDH 活性を 0%, カルボニル化合物あるいはラジカル産生種を加えた時に漏出する LDH 活性 (none) を 100% とし、抗酸化剤を添加した際の培地中の LDH 活性を%で示した。

α , β -不飽和アルデヒド類である 2-pentenal 2.5 mM の添加時の毒性を、GSH 1 mM, V.C 1 mM の添加によりそれぞれ 26%, 38% にまで抑制した。しかし glyoxal 1 mM, 飽和アルデヒド類である 1-pentanal 5 mM の毒性は、今回の抗酸化剤の添加では抑制されなかった。

tert-BuOOH の毒性は BHA, PMZ, DPPD によりそれぞれ 60%, 39%, 42% に抑制され、V.C を 1

Fig. 4. Effect of Antioxidant on LDH Leakage from Hepatocytes by Toxins

V.E (1 mM), BHA (100 mM), DPPD (10 mM), PMZ (10 mM), V.C (1 mM), GSH (1 mM) were added, respectively.

Mean $\pm$ S.D. for 4 experiments.

mM 添加すると 73% に低下した。AAPH の毒性は BHA, PMZ, DPPD, V.C の添加によりそれぞれ 76%, 57%, 48%, 78% に抑制され, *tert*-BuOOH と同様の傾向を示した。

変質油脂である ML 65 μ g/ml を添加するとコントロールの 3.4 倍の LDH 漏出性が観察されたが, その毒性は GSH 100 μ M 添加により 52%, 1 mM では 23% まで抑制された (data not shown)。V.E, BHA を添加した際も毒性は抑制されたが, PMZ, DPPD 各々 10 μ M 添加した時の抑制効果はより顕著で, それぞれ 9%, 17% まで低下していた。

カルボニル化合物中 2-pentenal の毒性は GSH, V.C の添加により軽減されたが, 1-pentanal, glyoxal に関しては抗酸化剤の添加効果は認められなかった。カルボニル化合物の毒性は, SH 基に対する高い反応性が関係していると考えられている。²⁸⁻³⁰⁾ すなわち, タンパク質, 酵素, GSH などの SH 基と結合しその機能を著しく低下させる。この毒性は GSH 枯渇剤である diethylmaleate の添加によりさらに増強する²⁹⁻³¹⁾ ことが知られている。また GSH には酸素ラジカルの捕捉, グルタチオンペルオキシダーゼなどの基質として作用する脂質過酸化物の分解作用がある。³²⁾ さらに V.C はスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$), ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$), 一重項酸素 (1O_2) などの活性酸素を捕捉する作用が知られてい

る。³²⁾ 一方 Fig. 4 に示したように, 2-pentenal の毒性は DPPD や PMZ のような $\cdot OH$ を捕捉する物質^{33,34)} によって抑制されなかった。したがって 2-pentenal の毒性発現には, タンパク質修飾のような直接的な作用のみならず, ある種のラジカル様物質の産生による二次的作用が関与している可能性も考えられ, 今後検討を要する興味深い結果であった。Glyoxal には抗酸化剤の添加効果は認められなかった。しかし, その同類化合物 methylglyoxal が酸素ラジカルを生成すること, また diacetyl が UV 照射, 酸素存在下で二重結合をエポキシ化する報告³⁵⁾ があることより, glyoxal もラジカルを生成して毒性発現する可能性が考えられた。今回は glyoxal の作用濃度が高かったためか抗酸化剤の抑制作用を検討することができなかった。

tert-BuOOH, AAPH の肝細胞に及ぼす毒性は PMZ, DPPD, V.E, BHA のような抗酸化剤によって抑制され, 僅かではあるが V.C や GSH にも抑制作用が認められた。PMZ, DPPD と V.E, BHA との間に抑制の差が見られた。PMZ と V.E に関しては, 今回培養液中という水層での検討であったため, 水層では効果を発揮し難いと指摘される V.E³³⁾ と HCl 塩として培養液中に添加する PMZ との抑制効果の差が現れたことが考えられた。*tert*-BuOOH, AAPH はラジカルを生成することはよく知られて

おり、抗酸化剤はこれらラジカルが肝細胞に示す毒性及び脂質過酸化作用を抑制したものと思われた。

自動酸化 ML の毒性は今回試験したすべての抗酸化剤の添加により抑制された。ML の抑制効果に注目すると、2-pentenal における V.C 及び GSH の抑制効果と、*tert*-BuOOH あるいは AAPH における PMZ, DPPD, V.E, BHA の抑制効果を重ねたパターンを示していた。今回用いた ML は POV = 2538 meq/kg, COV = 872 mmol/kg と過酸化物、カルボニル化合物ともに比較的豊富に含んでいたこと

から、変質油脂に含まれるヒドロパーオキシド及びラジカル種の示す毒性作用を PMZ, DPPD, V.E, BHA のような抗酸化剤が抑制したと考えられ、また変質油脂の肝細胞に対する毒性発現には、2-pentenal のような α, β -不飽和アルデヒド類が関与しており、このアルデヒドの毒性を V.C や GSH が抑制するという興味深い知見が得られた。

今後は、更に詳細な検討を行って脂質過酸化による毒性発現の機構を明らかにして行く必要がある。

引用文献

- 1) 平山晃久, 鎌田賢治, 笠井映江, 渡辺徹志, 衛生化学, **40**, 574 (1994).
- 2) T. Hirayama, S. Miura, Y. Mori, M. Ueta, E. Tagami, T. Yoshizawa, T. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1253 (1991).
- 3) T. Hirayama, N. Yamada, M. Nohara, S. Fukui, *J. Sci. Food Agric.*, **35**, 1357 (1984).
- 4) T. Hirayama, N. Yamada, M. Nohara, S. Fukui, *J. Sci. Food Agric.*, **35**, 338 (1984).
- 5) F.H. Mukai, B.D. Goldstein, *Science*, **191**, 868 (1976).
- 6) R.J. Shamberger, C.L. Corlett, K.D. Beaman, B.L. Kasten, *Mutat. Res.*, **66**, 349 (1979).
- 7) T. Yamaguchi, K. Nakagawa, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2461 (1983).
- 8) L.J. Marnett, H.K. Hurd, M.C. Hollstein, D.E. Levin, H. Esterbauer, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **148**, 25 (1985).
- 9) E. Cajelli, A. Ferraris, G. Brambilla, *Mutat. Res.*, **190**, 169 (1987).
- 10) J.D. Tucker, R.T. Taylor, M.L. Christensen, C.L. Strout, M.L. Hanna, A.V. Carrano, *Mutat. Res.*, **224**, 269 (1989).
- 11) R. Canonero, A. Martelli, U.M. Marinari, G. Brambilla, *Mutat. Res.*, **244**, 153 (1990).
- 12) J.S. Andrews, W.H. Griffith, J.F. Mead, R.A. Stein, *J. Nutr.*, **70**, 199 (1960).
- 13) 布巻豊輔, 柴田宣和, 荒井君枝, ビタミン, **35**, 188 (1967).
- 14) 吉岡倭子, 金田尚志, 油化学, **21**, 316 (1972).
- 15) 関田 寛, 大沢誠喜, 伊藤誉志男, 田辺弘也, 食衛誌, **11**, 275 (1970).
- 16) K. Kanazawa, E. Kanazawa, M. Nataka, *Lipids*, **20**, 412 (1985).
- 17) K. Kanazawa, H. Ashida, S. Minamoto, G. Danno, M. Nataka, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 363 (1988).
- 18) H. Ashida, K. Kanazawa, M. Nataka, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2951 (1987).
- 19) K. Kanazawa, M. Nataka, *Agric. Biochem. Biophys.*, **50**, 115 (1986).
- 20) H. Ashida, K. Kanazawa, S. Minamoto, G. Danno, M. Nakata, *Arch. Biochem. Biophys.*, **259**, 114 (1986).
- 21) 中村敏一, “初代培養肝細胞実験法,” 学会出版センター, 東京, 1987, p.247.
- 22) S. Trippett, D.M. Waker, *J. Chem. Soc.*, 1266 (1961).
- 23) H.W. Gardner, R.J. Bartelt, P. Weisleder, *Lipids*, **27**, 686 (1992).
- 24) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解,” 金原出版, 東京, 1990, p.338, 339.
- 25) 日本組織培養学会編, “組織培養の技術・第2版,” 朝倉書店, 東京, 1988, p.26.
- 26) T. Nakamura, T. Fujii, A. Ichihara, *Cell Biol. Toxicol.*, **1**, 285 (1985).
- 27) D.S. Griffin, H.J. Segall, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **86**, 227 (1986).
- 28) C. Izard, C. Libermann, *Mutat. Res.*, **47**, 115 (1978).
- 29) A. Zitting, T. Heinonen, *Toxicology*, **17**, 333 (1980).
- 30) M. Dore, L. Atzori, L. Congiu, *IRCS Med. Sci.*, **13**, 1139 (1985).
- 31) J.R. Dawson, K. Norbeck, I. Anundi, P. Moldeus, *Arch. Toxicol.*, **55**, 11 (1984).
- 32) 二木鋭雄, 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 2973 (1988).

-
- 33) P.S. Rao, J.M. Lubner, J. Milinowicz, P. Lalezari, H.S. Mueller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 39 (1988).
 - 34) 大柳善彦, "SOD と活性酸素調節剤," 日本医学館, 東京, 1989, p.267.
 - 35) N. Shimizu, P.D. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 4193 (1976).