

原著論文

ラットアセトアミノフェン肝障害に対する S-(1,2-Dicarboxyethyl)glutathione の保護効果

守谷 智恵, 川上 賀代子, 坪井 誠二*
就実大学 薬学部 生化学研究室

Protective effect of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats

Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Seiji Tsuboi*

Laboratory of Biochemistry, Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy,
Shujitsu University

(Received 26 September 2014; accepted 29 October 2014)

Abstract: The administration of acetaminophen (APAP, 500 mg/kg, *i.p.*) produced liver necrosis and increased aspartate aminotransferase (AST) activity in serum. The pretreatment of S-(1,2-diethoxycarbonyl)glutathione isopropyl ester (DCE-GS triester, 2.0 mmol/kg, *p.o.*) prevented hepatic necrosis and the elevation of serum AST activity by 99.9%. DCE-GS triester inhibited more strongly APAP-induced hepatotoxicity than glutathione (GSH), DCE-GS and other esters of DCE-GS. To clarify this protective effect, the hepatic GSH concentration was determined 2 h after APAP administration. It was found that the DCE-GS triester administration significantly inhibited the GSH depletion caused by APAP, suggesting that the protective effect of DCE-GS triester on APAP-induced hepatotoxicity was induced partially by higher GSH level in liver via activation of γ -glutamylcysteine synthetase.

Keywords: glutathione; S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione; acetaminophen; hepatotoxicity

緒言

微生物および動植物界には、グルタチオンおよび多数のグルタチオン関連ペプチドが存在する。グルタチオンは細胞内の主要な非タンパク性チオールであり、ラジカルスカベンジャー作用¹⁾、アミノ酸輸送作用²⁾、補酵素としての作用³⁾、生

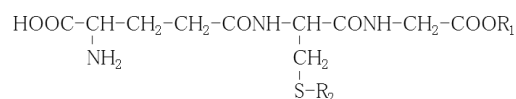
体外異物に対しての抱合反応による解毒作用⁴⁾等多くの生理作用をもつことが知られており、生体防御機構において重要な役割を果たしている。しかし、グルタチオン関連ペプチドについては、存在は明らかになっているもののその生理活性についてはほとんど不明のままである。それらの

生理活性を明らかにすることは今後の大きな研究課題である。そのなかで、S-(1,2-dicarboxylethyl) glutathione (DCE-GS, 図 1) はウシ水晶体中から単離、構造決定されたグルタチオン関連ペプチドであり、我々はこのペプチドの生理活性について研究を行ってきた。その結果、DCE-GS はアデニル酸シクラーゼを活性化させ血小板中 cAMP 濃度を上昇させることにより強い血液凝固および血小板凝集阻止作用を有すること^{5,6)}、また、ラットカラゲニン結膜浮腫およびラット背部受動的アナフィラキシーを抑制すること、さらに、肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することから抗炎症および抗アレルギー作用を有すること⁷⁾を明らかにした。また、DNA 合成促進作用としてラット培養肝細胞を用いて上皮増殖因子により引き起こされる DNA 合成が DCE-GS の添加により増強されることを示した⁸⁾。さらに、ラット部分肝切除後の肝再生中に DNA 合成の促進とともに肝臓中 DCE-GS 量が約 5 倍にまで上昇していることを明らかにした⁹⁾。

我々は DCE-GS が DNA 合成を促進すること、および、ラット部分肝切除後の肝再生中 DCE-GS 量が上昇することから、このペプチドが肝再生後および肝障害後の肝修復時に何らかの役割を果たしていると考えた。そこで、今回 DCE-GS の細胞内への移行性を高める目的でエステル体を用い、アセトアミノフェン急性肝障害への影響について検討した。その結果、DCE-GS トリエステル体の投与によりアセトアミノフェン急性肝障害を抑制することを明らかにしたので報告する。

方法

DCE-GS エステル体：S-(1,2-dicarboxylethyl) glutathione isopropyl ester (モノエステル), S-(1,2-dicarbonylethyl)glutathione (ジエステル), および S-(1,2-dicarbonylethyl)-glutathione isopropyl ester (トリエステル) (図 1) は、千寿製薬 (株) より提供を受けた。



	R ₁	R ₂
DCE-GS	H	CH(COOH)CH ₂ COOH
モノエステル	C ₃ H ₇	CH(COOH)CH ₂ COOH
ジエステル	H	CH(COOC ₂ H ₅)CH ₂ COOC ₂ H ₅
トリエステル	C ₃ H ₇	CH(COOC ₂ H ₅)CH ₂ COOC ₂ H ₅

図 1 DCE-GS および DCE-GS エステル体の構造式

アセトアミノフェン急性肝障害ラットの作製:

Wistar 系雄性ラット (180-200 g) を用いた。ラットはアセトアミノフェン投与 24 時間前に絶食し、水は自由に摂取させた。アセトアミノフェンを生理食塩水にて加温溶解させ 40°C に保ち、ラットへ 500 mg/kg を腹腔内投与し肝障害を惹起した。また、試験物質であるグルタチオン、DCE-GS およびそのエステル体は、2 M 水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.0 に調整し、アセトアミノフェン投与の 1 時間前に 2.0 mmol/kg で経口投与した¹⁰⁾。なお、全ての動物実験に関しては就実大学薬学部動物実験指針に準じて計画、実施した。

AST 活性測定:

アセトアミノフェン投与 24 時間後、麻酔下、腹部大動脈より採血した。血清中 AST 活性は、GOT・GPT C II (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼキット, 和光) を用いて測定した。また、同時に肝臓を摘出し 10% ホルマリンにて固定した後、病理標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理評価した¹⁰⁾。

肝臓中グルタチオンの定量:

アセトアミノフェン投与 2 時間後に肝臓を採取し、DTNB を用いる吸光度法により肝臓中グルタチオン量を測定した¹¹⁾。

γ-Glutamylcysteine synthetase (γ-GCS) 活性

測定: ラット肝臓 (1 g) に 5 倍量の 1 mM MgCl₂ および 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 150 mM KCl 溶液を加えホモジナイズした後、15,000 x g, 20 分, 4°C で遠心し上清を回収した。上清を 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50

mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) により透析を行い、15,000 x g, 20 分, 4°C で遠心した後、上清を酵素溶液とした。酵素溶液に DCE-GS および DCE-GS エステル体を添加し、4°C, 10 分間放置した後 γ -GCS 活性を測定した。 γ -GCS 活性は、L- α -aminobutylate および ATP を基質として生じた ADP を NADH の上昇として測定した¹²⁾。

結果

アセトアミノフェン急性肝障害に対するグルタチオン, DCE-GS およびそのエステル体の抑制効果

肝障害の指標は血清中 AST 活性および病理学的評価により行った。表 1 にグルタチオン, DCE-GS およびそのエステル体のアセトアミノフェン肝障害への抑制効果について示した。アセ

表 1 アセトアミノフェン肝障害に対するグルタチオン, DCE-GS およびそのエステル体の抑制効果

試験物質	AST 活性 (U/L)	抑制率 (%)
コントロール	119 ± 4	—
生理食塩水	7342 ± 773	—
グルタチオン	5462 ± 556	26.0
DCE-GS	6197 ± 310	15.9
DCE-GS モノエステル体	5721 ± 360	22.4*
DCE-GS ジエステル体	4398 ± 151	40.8*
DCE-GS トリエステル体	123 ± 7	99.9***

各値は、平均 ± S. D. (n=6-8) . * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

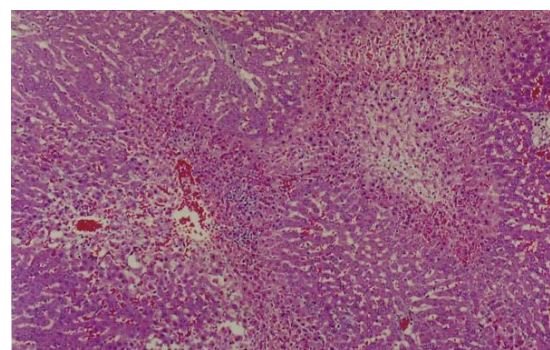
表 2 アセトアミノフェン肝障害に対する DCE-GS エステル体の用量依存性

DCE-GS トリエステル体 (mmol/kg)	AST 活性 (U/L)	抑制率 (%)
0	5359 ± 12	—
0.125	2522 ± 71	52.9
0.25	1162 ± 52	78.3
0.5	402 ± 24	92.5
2	37 ± 3	99.3

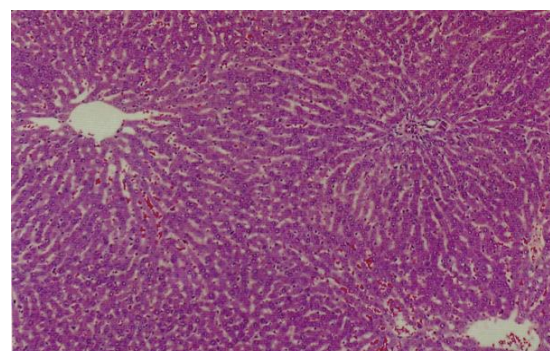
各値は、平均 ± S. D. (n=5) .

トアミノフェン投与により血清中 AST 活性は約 62 倍に上昇した。グルタチオン, DCE-GS, モノエステル, ジエステルおよびトリエステルの投与により AST 活性の上昇は各々 26.0, 15.9, 22.4, 40.8 および 99.9% に抑制された。次に、最も高い抑制効果を示した DCE-GS トリエステル体について用量の効果について検討したところ、表 2 に示すように用量依存的な抑制効果がみられた。

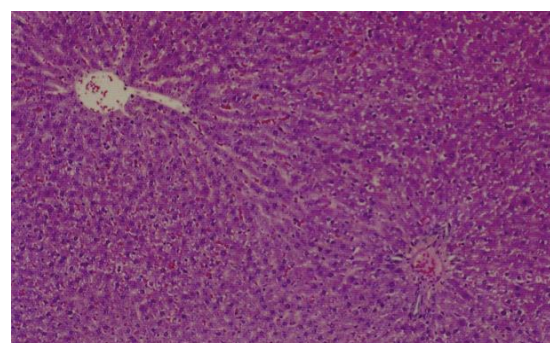
図 2 に示すように DCE-GS トリエステル体によるアセトアミノフェン急性肝障害抑制効果は病理学的知見からも明らかとなった。アセトアミノフェンを単独で投与した場合、肝細胞壊死や炎症性細胞が肝静脈を中心とした周辺部位でみられ急性肝障害の像を示した (図 2(a))。しかし、



(a) アセトアミノフェン単独投与



(b) アセトアミノフェン+DCE-GS トリエステル体投与による肝臓の病理組織像



(c) 正常肝臓の病理組織像

図 2 肝臓の病理組織像

DCE-GS トリエステル体を投与した場合これらの細胞壊死や炎症性細胞はみられず (図 2(b)) ほぼ正常に近い像 (図 2(c)) であった。

アセトアミノフェン投与後の肝臓中グルタチオン量への DCE-GS トリエステル体の影響: ラットにアセトアミノフェンを投与し 2 時間後の肝臓中グルタチオン量を測定した。表 3 に示すようにアセトアミノフェンの投与により肝臓中グルタチオン量はコントロールの 34.0% にまで減少した。しかし DCE-GS トリエステル体 2 mmol/kg の投与によりアセトアミノフェン投与によって引き起こされる肝臓中グルタチオンの減少はほぼ抑制された (コントロールの 92.4%)。また, DCE-GS トリエステル体を 2 mmol/kg で単独投与した場合の肝臓中グルタチオン量は, コントロールの 149% まで有意に上昇した。

表 3 アセトアミノフェン肝障害による肝臓中GSH レベルに対する DCE-GS トリエステル体の効果

	GSH (μmol/g liver)	% of control
コントロール	3.03 ± 0.21	100
アセトアミノフェン	1.03 ± 0.22	34.0
DCE-GS トリエステル体	4.51 ± 0.15	149
アセトアミノフェン + DCE-GS トリエステル体	2.80 ± 0.35	92.4

各値は, 平均 ± S. D. (n=3-5) .

DCE-GS およびそのエステル体のγ-GCS 活性への影響: DCE-GS トリエステル体の投与により肝臓中のグルタチオン量が上昇したことから, グルタチオン合成の律速酵素であるγ-GCS 活性の上昇を介したグルタチオン上昇作用が示唆された。そこで, DCE-GS およびそのエステル体のγ-GCS 活性に対する影響を検討したところ, 表 4 に示すように DCE-GS の添加によりγ-GCS 活性は 3 倍に上昇した。一方, DCE-GS エステル体にはこの効果はみられなかった。

表 4 DCE-GS およびそのエステル体のγ-GCS 活性に対する影響

	γ-GCS 活性 (mU/mg protein)	% of control
コントロール	4.34	100
DCE-GS	13.0	300
DCE-GS モノエステル体	5.95	137
DCE-GS ジエステル体	4.43	102
DCE-GS トリエステル体	4.25	98

考察

ラットにアセトアミノフェンを過剰投与すると肝障害が誘発されることが知られている。一般に常用量のアセトアミノフェンは 80%以上がグルクロン酸あるいは硫酸抱合を受け尿中に排泄される¹³⁾。しかし, 過剰投与によりエステル代謝系が飽和状態になるとアセトアミノフェンはチトクロム P450 を介して代謝され, 活性代謝産物 N-acetyl-imidoquinone (NAPQI) を生じる¹³⁾。この活性代謝産物 NAPQI は通常グルタチオン抱合を受けメルカプツール酸またはシステイン抱合体として尿中に排泄される。アセトアミノフェンの大量投与により活性代謝産物 NAPQI が過剰に生じると, 肝臓中のグルタチオンが枯渇する。その結果, 遊離の NAPQI は親電子的化合物であるため肝細胞タンパク質分子と共有結合を形成し肝障害が誘発される¹⁴⁾。グルタチオンはこのような活性物質による障害から細胞を守るために最も重要な細胞内物質である。従って N-アセチルシステインなどの細胞内グルタチオンレベルを維持する物質をラットに投与するとアセトアミノフェンによる肝障害が抑制されることが報告されている¹⁵⁾。また, グルタチオンは細胞にほとんど取り込まれないことから, 細胞内への移行性の高いグルタチオンのモノエステル体およびジエステル体が合成された。これらのエステル体は効果的に細胞内に取り込まれ加水分解を受けてグルタチオンを生成することが報告され

ている^{16, 17)}. これらのことより, 今回 DCE-GS の細胞中への取り込みの効率を上げる目的で DCE-GS エステル体を用いて, ラットアセトアミノフェン肝障害抑制作用について検討した. その結果, ラットに DCE-GS トリエステル体を前投与すると肝障害が抑制されること, またこの抑制効果は用量依存的であり, グルタチオン, DCE-GS および他の DCE-GS エステル体よりも強くアセトアミノフェンによる肝障害を抑制することを明らかにした (表 1, 2). またこの肝障害抑制作用は, DCE-GS トリエステル体の投与によりアセトアミノフェンによる肝臓中グルタチオンの枯渇を防いだためであることが示された (表 3). 以上の結果より DCE-GS トリエステル体は効果的に肝細胞に取り込まれ肝臓中グルタチオンレベルを維持することによりアセトアミノフェンによる肝障害を抑制することが示唆された. また, この DCE-GS トリエステル体による肝障害抑制効果は, N-アセチルシステインによる抑制効果と比べて強いものであった⁸⁾.

グルタチオンは γ -GCS および glutathione synthetase の 2 つの酵素によって生合成され, このうち γ -GCS はグルタチオン生合成過程での律速酵素である. DCE-GS の肝臓中グルタチオンレベルの上昇作用について検討したところ, DCE-GS はこの γ -GCS を活性化することが明らかとなった. しかし, DCE-GS エステル体は γ -GCS 活性にほとんど影響を及ぼさなかった (表 4). これらの結果より, DCE-GS トリエステル体は肝細胞中で DCE-GS に加水分解された後, γ -GCS を活性化しグルタチオン生合成を促進することで, 肝臓中グルタチオンレベルを上昇させることが示唆された. DCE-GS のような生体内に常在する物質がグルタチオン生合成の調節を司っているということは非常に興味深い. 今後細胞内グルタチオンレベルを上昇させる薬として研究開発を行っていく上で大変有用な物質であると考えられ, 今回示した肝障害抑制だけでなく, グルタチオン枯渇との関連性が示唆されてい

る病態への応用が期待される. 更に, DCE-GS トリエステル体のアセトアミノフェン投与後の治療効果についても今後検討していく予定である.

引用文献

- 1) Ji L.L., Fu R.: Response of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide., *Am. J. Physiol.*, 189 549-554 (1992)
- 2) Meister A.: On the enzymology of amino acid transport., *Science*, 180 33-39 (1973)
- 3) Paulus C., Koller B., Jacobsen H.J.: Physiological and biochemical characterization of glyoxylase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension., *Planta.*, 189 561-556 (1993)
- 4) Jakoby W.B.: Glutathione transferase: an overview. *Meth. Enzymol.*, 113 495-499 (1995)
- 5) Tsuboi S., Ohnaka M., Ohmori S., Sakaue T., Ogata K., Itano T., Hatase O.: Inhibition of platelet aggregation by S-(1,2-dicarboxyethyl) glutathione, intrinsic tripeptide in liver, heart, and lens., *Arch. Biochem. Biophys.*, 279 146-150 (1990)
- 6) Tsuboi S., Fujiwara E., Ogata K., Sakaue A., Nakayama T., Ohmori S.: Inhibitory effects of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione on collagen-induced platelet aggregation; enhancements of cyclic AMP level and adenylate cyclase activity in platelets by S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione., *Biol. Pharm. Bull.*, 16 1083-1086 (1993)
- 7) Sakaue T., Ohhira M., Ogata K., Ohmori S.: Physiological activities of S-(1,2-dicarboxyethyl) glutathione as an intrinsic tripeptide present in liver, heart and lens., *Arzneimit.-Forsch./Drug Res.*, 42 1482-1486 (1992)
- 8) Miyazaki M., Bai L., Tsuboi S., Ohmori S., Ogata K., Sato J., Nanba M.: Enhancing effect of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione on epidermal

- growth factor-stimulated DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes., *Res. Exp. Med.*, 190 381-387 (1990)
- 9) Tsuboi S., Miyazaki M., Kondo Y., Kiyono K., Fujiwara E., Ogata K., Sakaue T., Nanba M., Ohmori S.: Increase of S-(1,2-dicarboxyethyl) glutathione in regenerating rat liver., *Res. Exp. Med.*, 192 281-286 (1992)
- 10) James R.C., Harbison R.D., Roberts S.M.: Phenylpropanolamine potentiation of acetaminophen-induced hepatotoxicity: evidence for glutathione-dependent mechanism., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118 159-168 (1993)
- 11) Matsumoto S., Teshigawara M., Tsuboi S., Ohmori S.: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples using acrylonitrile as a thiol-blocking reagent., *Anal. Sci.*, 12 91-95 (1996)
- 12) Seelig G.F., Meister A.: Glutathione biosynthesis; γ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney., *Meth. Enzymol.* 113 379-390 (1985)
- 13) Potter D.W., Hinson J.A.: Mechanisms of acetaminophen oxidation to N-acetyl-p-benzoquinone imine by horseradish peroxidase and cytochrome P-450., *J. Biol. Chem.*, 249 7130-7139 (1974)
- 14) Rosen G.M., Singletary W.V., Rauckman E.J., Killenberg P.G.: Acetoaminophen hepatotoxicity. An alternative mechanism., *Biochem. Pharmacol.*, 32 2053-2059 (1983)
- 15) Yao W.B., Zhao Y.Q., Abe T., Ohta J., Ubuka T.: Effect of N-acetylcysteine administration on cysteine and glutathione contents in liver and kidney and in perfused liver of intact and diethylmaleate-treated rats., *Amino Acids*, 7 255-266 (1994)
- 16) Minhas H.S., Thornalley P.J.: Comparison of the delivery of reduced glutathione into P388D₁ cells by reduced glutathione and its mono- and diethyl ester derivatives., *Biochem. Pharmacol.*, 49 1475-1482 (1995)
- 17) Wellner V.P., Anderson M.E., Puri R.N., Jensen G.L., Meister A.: Radioprotection by glutathione ester: transport of glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 4732-4735 (1984)
- 18) Hjelle J.J., Brzeznicza E.A., Klaassen C.D.: Comparison of the effects of sodium sulfate and N-acetylcysteine on the hepatotoxicity of acetaminophen in mice., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236(2) 526-534 (1986)