

グルタチオン高含有酵母エキスのアセトアミノフェン 誘発性肝障害に対する有効性

杉村 洋一郎, 山 元 一 弘

協和発酵工業株式会社筑波研究所

The Protective Effect of Glutathione-Enriched Yeast Extract on Acetaminophen-Induced Liver Damage in Rats

Yoichiro SUGIMURA and Kazuhiro YAMAMOTO

Tsukuba Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tsukuba 305-0841

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., **51**, 189~193 (1998)

The effects of orally administered glutathione-enriched yeast extract were studied in a model of acute hepatotoxicity induced by a high intraperitoneal dose of acetaminophen in rats. The reduced glutathione (GSH)-enriched extract showed dose-dependent hepatoprotective effects which were associated with recovery of the liver GSH level. Because no hepatoprotective effects were obtained using bread yeast extract that contained only low levels of GSH, the GSH-enriched yeast extract was shown to be effective by serving as a useful precursor for GSH biosynthesis in the liver. Because the hepatoprotective effect of GSH-enriched yeast extract tended to be stronger than that calculated from its GSH contents, substances other than GSH might also have contributed. Oxidized glutathione (GSSG)-enriched yeast extract given orally also showed a hepatoprotective effect together with recovery of the liver GSH level.

Key words reduced glutathione, oxidized glutathione, yeast extract, acetaminophen.

(Received November 11, 1997)

生体内組織における還元型グルタチオン (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycine: 以下 GSH) レベルの低下はさまざまな障害の発症と密接に関連している¹⁾。たとえば、アルコール飲取や薬物摂取による肝障害²⁾³⁾、喫煙による肺障害⁴⁾、あるいは運動による酸化ストレス⁵⁾等は組織 GSH レベルの低下を伴う障害例として知られている。このことは、組織 GSH レベルが低下をきたすようなストレスに曝される場合、外部からの GSH の積極的な補給が、組織 GSH の低下抑制やその回復を図り、組織障害の抑制をもたらすことを期待させる。

しかしながら、GSH は生体内での重要性は広く認識されているものの、外部から補給することの有用性⁶⁾に対する認知度は決して高くないのが現状である。経口的に摂取された GSH が腸管内で構成アミノ酸へ加水分解される点を考えると、GSH の経口摂取は組織中での GSH 生合成原料の供給源として意義があると考えられる。実際われわれは、肝 GSH レベルの低下を伴った肝障害モデルとして知られるアセトアミノフェン (AAP)

大量投与ラットを用いて、GSH および酸化型グルタチオン (GSSG) の経口投与により、低下した肝 GSH レベルの回復促進およびそれに伴う肝障害抑制効果を確認している (未発表)。

今回は、グルタチオンを豊富に含むように培養した酵母菌体から熱水抽出したグルタチオン含有エキスに関して、AAP 大量投与ラットの肝 GSH レベルおよび肝障害に対する影響を検討し、このグルタチオン高含有酵母エキスの経口摂取時における栄養生理学的な有効性を実証したので、その結果を報告する。

なお、本報告では、GSH および GSSG を区別なく用いる場合はグルタチオンと記載する。

実 験 方 法

1. 供試サンプル

GSH 高含有酵母エキスは、グルタチオン 12.9% (w/w)、すなわち GSH を 10.9% および GSSG を 2.0% 含む「グルタイーストエキス®」(以下、GYE: 協和発酵工業(株)製)を用いた。水溶液中でのグルタチオンの安定化を図った GSSG 高含有酵母エキス⁷⁾(以下、GYD)は、GYE

溶液を直接酸化処理して調製した(後述)。なお、グルタチオン高含有酵母エキスの比較対照品としてグルタチオン含有量の少ない一般的に使用されているパン酵母エキスをを用いた。GSH および GSSG は協和発酵工業(株)製を、AAP は和光純薬(株)製を用いた。

2. 供試サンプル溶液の調製

各供試サンプルは 0.9%生理食塩水に溶解し、AAP は約 80°C 下で 35 mg/mL 溶液に、グルタチオン、GYE および比較対照のパン酵母エキスはそれぞれ 100, 400 および 270 mg/mL 溶液に調製した。GYD 溶液の調製は次のとおり行った: GYE 20 g を 0.9%生理食塩水 90 mL に溶解後、pH 5.3 を示すその溶液をまず 6 N NaOH 3.2 mL で pH 9.0 に調整した。次に、10 時間激しく攪拌後、6 N HCl 3.8 mL で pH を 5.3 に再調整し、0.9%生理食塩水で最終濃度 20 mg/mL に調製して得られたものを GYD 溶液とした。

今回の実験に供した GYE, GYD およびパン酵母エキスの GSH ならびに GSSG 含有量を Table 1 に示した。

3. 実験動物および飼育方法

Sprague-Dawley 系の 7 週齢・雄性ラット (SLC 株) を CE-2 固形飼料(オリエンタル酵母工業(株))で 1 週間予備飼育した後、試験に供した。予備飼育期間中の飼料および飲用水は自由摂取とし、室温 22±1°C、湿度 60%、白色蛍光灯による人工照明(7~19 時)の明暗条件のもとで飼育した。

4. AAP 大量投与実験

ラットを 18 時間絶食させた後、ラット各群の平均体重が均一になるように群分けした。各供試サンプル溶液を経口投与し、同時に AAP 700 mg/kg を腹腔内投与した。AAP 投与 5 時間後に肝臓を、そして AAP 投与 27 時間後に血液をおのおのネブタール麻酔下で採取した。肝臓は、0.9%生理食塩水で洗浄後、分析まで -80°C で凍結保存した。血液は、その凝固が確認された後、遠心分離 (×3,000 rpm, 15 min, 4°C) し、得られた血清を分析まで凍結保存した。

5. 採取サンプルの分析

5.1 肝臓 GSH レベル測定 採取した肝臓サンプル

Table 1. Glutathione contents (w/w(%)) of the yeast extract.

Yeast extract	GSH	GSSG	Total glutathione*1
GYE*2	10.9	2.0	12.9
GYD*3	n.d.*4	12.9	12.9
Bread yeast extract	n.d.*4	0.5	0.5

*1GSH+GSSG. *2GSH-enriched yeast extract.

*3GSSG-enriched yeast extract. *4GSH not detected.

約 0.5 g に、その湿重量の 4 倍容のリン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加後、ガラスホモジナイザーで破碎し、肝ホモジネートを得た。得られた肝ホモジネートに対してただちに等量の 8%スルフォサリチル酸を添加した。それを攪拌後、遠心分離 (×6,000 rpm, 10 min, 4°C) して取得した上清 (酸可溶性画分) 0.5 mL を用いて、Reeve *et al.* の方法⁹⁾ を改良した手法で GSH を測定した。すなわち、200 mM の 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) を 50 μ L 添加後、ギ酸 40 μ L を加えて攪拌し、水飽和酢酸エチルで洗浄して得られた水層を HPLC 分析に供した。なお、HPLC の分析条件は、カラム: STR ODS-M (4.0 mm×250 mm, Shimadzu), 溶離液: ギ酸アンモニウム-ギ酸 (0.025 mM, pH 4) +10%メタノール, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出: UV 280 nm および注入量: 10 μ L と設定した。

5.2 血清トランスアミナーゼ活性値 グルタミン酸・オキサロ酢酸・トランスアミナーゼ (GOT) 活性値 (IU/L) およびグルタミン酸・ピルビン酸・トランスアミナーゼ (GPT) 活性値 (IU/L) の測定は市販生化学検査

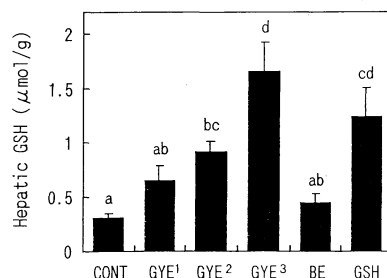


Fig. 1. Effect of oral GYE on hepatic GSH concentration.

Rats were orally administered GYE (GSH-enriched yeast extract), its related compounds (i.e. B.E., bread yeast extract; GSH, reduced glutathione) or 0.9% saline (CONT) before injection of acetaminophen (AAP) 700 mg/kg body weight. The administered amount of each compounds (g/kg body weight) was as follows: GYE¹, 0.78; GYE², 1.94; GYE³, 3.88; BE, 6.67; GSH, 0.50. Each sample was equal to administering glutathione (GSH+GSSG) as the following amount (g/kg body weight): GYE¹, 0.10; GYE², 0.25; GYE³, 0.50; BE, 0.03. Hepatic GSH concentration was measured according to the high-performance liquid chromatography method of Reeve *et al.* (1980)⁹⁾ with modifications (consult "Methods"). Data represent mean ± SE of 6 rats. Different letters above the error bars indicate significant ($p < 0.05$) differences between the various conditions.

用酵素キット（トランスアミナーゼCIIテストワコー（和光純薬（株）製）を用いた。

6. 統計処理

実験データは平均値±標準誤差で表した。統計解析は、一元配置分散分析後、Duncanの多重検定法により各群間の有意差 ($p < 0.05$) を判定した。

実験結果

1. 経口摂取 GSH 高含有酵母エキス (GYE) の効果

AAP 大量投与ラットに、GYE を 0.78, 1.94 あるいは 3.88 g/kg 経口投与した結果、AAP 投与 5 時間後では、AAP 単独投与に比べて肝 GSH レベルの GYE の投与量に依存した回復促進効果が見られた (Fig. 1)。また、GYE による AAP 投与 27 時間後の血清 GOT および GPT 活性値の有意な上昇抑制効果 ($p < 0.05$)、すなわち肝障害抑制効果が確認され、その効果も投与量依存であった (Fig. 2)。

GYE と GSH を比較した結果、グルタチオン (GSH + GSSG) 500 mg/kg を含む GYE (3.88 g/kg) は GSH そのものの 500 mg/kg よりやや強い肝 GSH レベル回復

および肝障害抑制効果を示し、グルタチオンとして 250 mg/kg 含む GYE (1.94 g/kg) の投与が GSH そのものの 500 mg/kg と同等の効果を示した。一方、グルタチオン量が 0.5% (w/w) であるパン酵母エキスを 6.67 g/kg (グルタチオンを 33 mg 含有) 経口投与したところ、肝 GSH レベルの回復効果および肝障害抑制効果はともにほとんど見られなかった。

2. 経口摂取 GSSG 高含有酵母エキス (GYD) の効果

GSSG 500 mg/kg、あるいはそれと等量の GSSG を含む GYD 3.88 g/kg をラットに経口投与し、その効果を比較検討した結果、GYD には GSSG と同等の肝 GSH レベル回復促進効果 (Fig. 3) および肝障害抑制効果 (Fig. 4) が確認された。

3. 経口 GYE および GYD の肝 GSH レベル回復促進効果の比較

等量のグルタチオンを含む GYE あるいは GYD を 3.88 g (含有グルタチオン量 500 mg)/kg をラットに経口投与し、それらの肝 GSH レベル回復促進効果を同一実験で比較した結果、GYE については含有グルタチオン量から期待される以上の効果が再確認されたが、GYD についてはこのような効果は見られなかった (Fig. 5)。

考察

AAP の大量投与は、急激な肝 GSH レベルの低下を伴った急性肝障害を誘発することが知られている⁹⁾。そこで AAP 大量投与ラットに、GYE を経口摂取させた結果、投与量依存的な肝 GSH レベルの回復効果 (Fig. 1)、

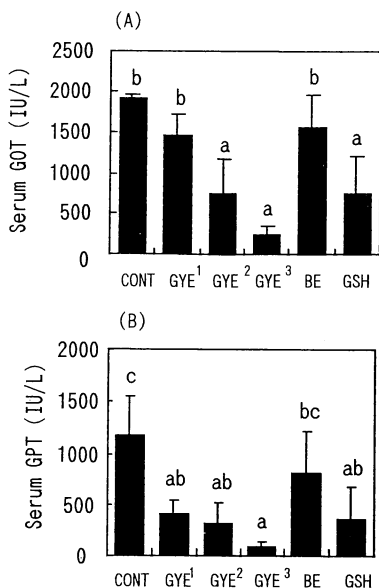


Fig. 2. Effect of oral GYE on AAP-induced serum GOT (A) and GPT (B) activities.

Serum samples for measurement of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) were collected 27 h after AAP dose. The abbreviations used are the same as those used in Fig. 1. Data represent mean $\pm$ SE of 4 rats. Different letters above the error bars indicate significant ($p < 0.05$) differences between the various conditions.

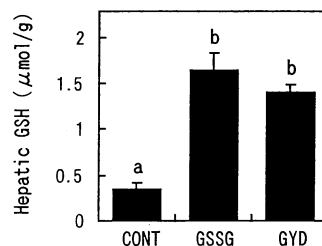


Fig. 3. Effect of oral GYD on hepatic GSH concentration after AAP administration.

GYD represents the GSSG-enriched yeast extract. GSSG was administered 0.50 g/kg body weight. GYD was administered 3.88 g/kg body weight, which equals administering GSSG 0.50 g/kg body weight. Groups of 4 rats were orally administered GYD before AAP administration. Hepatic GSH concentration was determined 5 h after the administration of AAP. Data represent mean $\pm$ SE. Different letters above the error bars indicate significant ($p < 0.05$) differences between the various conditions.

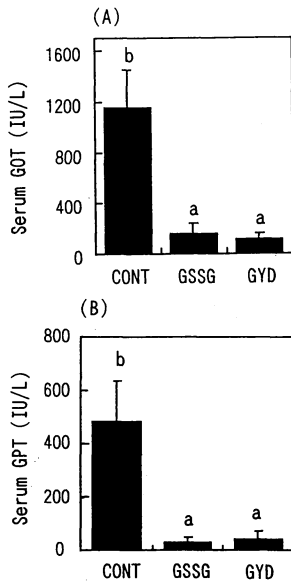


Fig. 4. Effect of oral GYD on AAP-induced serum GOT (A) and GPT (B) activities.

Serum samples for measurement of GOT and GPT were collected 27 h after AAP dose. Each sample was administered as the same amount per body weight as that stated in Fig. 3. Data represent mean $\pm$ SE of 4 rats. Different letters above the error bars indicate significant ($p < 0.05$) differences between the various conditions.

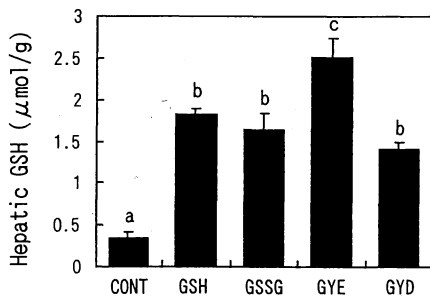


Fig. 5. Comparison between Oral GYE and GYD on hepatic GSH concentration after AAP administration.

GYE or GYD which both contained the same amount of glutathione were administered orally (0.50 g/kg body weight) before AAP administration. Hepatic GSH concentration was determined 5 h after the administration of AAP. Data represent mean $\pm$ SE of 5 rats. Different letters above the error bars indicate significant ($p < 0.05$) differences between the various conditions.

および肝障害抑制効果 (Fig. 2) が確認された。グルタチオン量が 0.5% である通常のパン酵母エキスの経口投与では肝 GSH レベルの回復効果および肝障害抑制効果が見られなかったことから、グルタチオンを高含有する GYE の栄養生理学的な有用性が実証された。

GYE を直接酸化処理して調製した GYD も、それに含まれる量と等量の GSSG の効果に匹敵する肝 GSH レベル回復促進 (Fig. 3) および肝障害抑制 (Fig. 4) 効果を発揮した。すでにわれわれは GSSG そのものを経口摂取した場合、GSH とほぼ同程度の有効性を発揮することを確認しており (未発表)、今回得られた GYD の効果も、それに含まれる GSSG に起因すると考えられた。このことから、GYD も生体へのグルタチオンの有効な補給源であることが確認された。

GYE はそれに含有されるグルタチオン量から期待される以上の強い肝 GSH レベル回復促進および肝障害抑制傾向を示した (Fig. 1, 2 および 5)。このことは、経口 GYE の効果が、その多くは多量に含有されるグルタチオンの作用に依存していると考えられるものの、一部グルタチオン以外の成分も関与している可能性を示唆している。一方、GYD では、GYE で見られた含有グルタチオン量から期待される以上の効果は見られなかった (Fig. 3~5)。すなわち、GYE 中のグルタチオン以外の成分の有効性が GYE を GYD に変換処理する過程で消失した可能性があり、このことは、その未知成分が還元的安全性を有する成分であることを示唆している。GSH 合成の材料であるシスチンおよびメチオニンの GYE 中の含有量は少ないため (それぞれ 0.24% および 0.01%)、それらの肝 GSH レベル回復に対する寄与は考え難い。また、GYE 中に比較的多量に存在する賦型剤であるデキストリンが肝 GSH 合成に必要な ATP の供給源として作用した可能性も考えられるが、GYD にも同量含まれる点よりその可能性は否定される。近年、フラボノイド関連化合物 (flavone¹⁰, 7,8-dihydroxyflavone¹¹, kaempferol-3-*o*-galactoside¹², silymarin¹³) あるいはカキ肉エキス¹⁴ 等の新たな物質群にも肝 GSH レベル回復作用を有することが報告されつつあることから、GYE 中にもグルタチオン以外の新規な肝 GSH 回復促進能を有する物質が存在する可能性も期待される。

今回得られた結果は、グルタチオン高含有酵母エキスの栄養生理学的な有効性を初めて実証したものである。今後、実生活で想定される現実的なストレス障害に対するグルタチオン高含有酵母エキスの有用性を実証する予定である。

要 約

グルタチオン高含有酵母エキスの経口摂取が、組織障

害の抑制,さらには障害組織において低下した GSH レベルの回復に対して有効であることを実証するため,アセトアミノフェン (AAP) 大量投与ラットを用いたモデル系で検討を行い,以下の結果を得た。

1) GSH 高含有酵母エキス (GYE: GSH=10.9% (w/w), GSSG=2.0%) の経口摂取は, AAP 大量投与により低下した肝 GSH の回復促進効果, およびそれに伴う肝障害抑制効果を投与量依存的に発揮した。グルタチオン含有量の低い通常のパン酵母エキス (GSH=0%, GSSG=0.5%) には効果がほとんど認められなかったことから, GSH を高含有する GYE の栄養生理学的な有用性が明らかとなった。この GYE の効果には, 生体へのグルタチオン供給源としての作用が大きく関与していると考えられるが, 含有する GSH 量から期待される以上の肝 GSH 回復促進および肝障害抑制効果を発揮した点から, GSH 以外の成分も寄与していることが示唆された。

2) GSSG 高含有酵母エキス (GSH=0%, GSSG=12.9%) の経口摂取にも, それ自体に含まれる量と等量の GSSG と同程度の肝 GSH 回復促進および肝障害抑制効果が認められ, その生体へのグルタチオン供給源としての有用性が確認された。

文 献

- 1) White AC, Thanncikal VJ, Fanburg BL (1994) Glutathione deficiency in human disease. *J Nutr Biochem* 5: 218-26.
- 2) Videla LA, Guerri C (1990) Glutathione and alcohol. In: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (Vina J, ed), p. 57-67. CRC Press, Boston.
- 3) Isobe M, Sone T, Takabatake E (1995) Depletion of glutathione and hepato-toxicity caused by vinyl ethers in mice. *J Toxicol Sci* 20: 161-4.
- 4) Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ,

- MacNee W (1995) Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells *in vitro* and lung *in vivo* under oxidative stress. *Am J Physiol* 269: L285-92.
- 5) Leeuweburgh C, Ji LL (1995) Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 316: 941-9.
- 6) Meister A (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharm Ther* 51: 155-94.
- 7) 佐藤 巖, 田口徳一 (1992) 飲料用グルタチオン含有酵母エキスの開発. *食品と開発* 2, 40-2.
- 8) Reeve J, Kuhlenskamp J, Kaplowitz N (1980) Estimation of glutathione in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography separation from cysteine and gamma-glutamylcysteine. *J Chromatogr* 194: 424-8.
- 9) Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 195-202.
- 10) Nijhoff WA, Bosboom MA, Smidt MH, Peters WH (1995) Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelicalactone and flavone. *Carcinogenesis* 16: 607-12.
- 11) Paya ML, Ferrandiz MJ, Sanz MJ, Alcaraz MJ (1993) Effects of phenolic compounds on bromobenzene-mediated hepatotoxicity in mice. *Xenobiotica* 23: 327-33.
- 12) Sanz MJ, Ferrandiz ML, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Ubeda A, Gunasegaran R, Alcaraz MJ (1994) Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 24: 689-99.
- 13) Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R (1989) Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med* 55: 420-2.
- 14) Tapiero H, Tew KD (1996) Increased glutathione expression in cells induced by *Crassostrea gigas* extract (JCOE). *Biomed Pharmacother* 50: 149-53.

(1997 年 11 月 11 日受理)