

食品添加物のマウス肝リソゾーム酵素活性 および酵素遊離におよぼす影響

中川 一夫, 大場 優子, 中川智重子

Alteration in the activity and the release of lysosomal
enzymes induced by food additives.

Kazuo Nakagawa, Yuko Oba and Chieko Nakagawa

I. はじめに

肝リソゾームは、他の動物組織や臓器に見られるリソゾームと同様に、多種の加水分解酵素を含む細胞内顆粒であるが、それらの加水分解酵素はリソゾーム内に局在するため細胞内の諸成分と直接接触することが制限されており、通常、その活性は顆粒外の物質に対しては潜在的である。しかし、リソゾーム膜の安定性または透過性は種々の化学物質により影響をうけることが知られており、膜の物理化学的性質の変化がリソゾームの生理的機能に変化をもたらすことは想像に難くない。

食品中の常在成分のなかにはリソゾーム系に影響をもつ物質がいくつかあり、例えば、ビタミンAには膜の不安定化作用¹⁾が、ビタミンEには安定化作用²⁾が見られ、これらの作用が各物質の毒性または生理作用の発現に関するとの推測がなされている。さらに、食品汚染物質として食品から検出されることのあるγ-ヘキサクロシクロヘキサンや有機リン農薬あるいはアフラトキシン B₁ などにも、肝リソゾーム酵素の顆粒からの逸脱を促進する作用のあることが報告されており³⁻⁵⁾、これらの物質の毒性発現にも何らかの関りがあるのではないかとの推察がなされている。

食品には非栄養的の化学物質が多数含まれているが、特に意図的に添加される食品添加物の使用にあたっては、安全性の観点からの十分な検討が要求される。上記のビタミン類を除いて食品添加物のリソゾーム系への影響をみた報告はほとんどないので、本実験では、食品関連化合物のリソゾーム酵素活性や *in vitro* の酵素遊離に与える影響を検討し、食品添加物の安全

性を考える一助とした。

II. 実験方法

実験動物には ddY 系雄性マウス (体重 25~30g) を用い、断頭屠殺後開腹して肝臓を露出し、門脈側より冷生理食塩水を還流した後肝臓を分離した。リソゾーム顆粒の分離ならびに顆粒からの酵素遊離の方法は、Fukuzawa らの記載⁶⁾を若干改変して行った。すなわち、テフロンホモジナイザーを用いて肝重量の9倍容の冷 0.44 M ショ糖液でホモジネートを作製した後、2,000×g で5分間遠心分離を行った。上清をさらに13,000×g で10分間遠心分離して得られた沈渣を 0.44 M ショ糖液に懸濁した後、再び13,000×g で10分間遠心分離した。次に沈渣を 0.177 M KCl 含有 0.44 M ショ糖液に懸濁しリソゾーム顆粒標本とした。酵素遊離実験は、上記リソゾーム懸濁液 1.5 ml, 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.1) 0.2 ml, 被検化合物溶液 0.3 ml から成るリソゾーム顆粒浮遊液を、37°C で15分間インキュベートした後直ちに氷冷し、13,000×g で10分間遠心分離して得られた上清中の酵素活性を測定することにより行った。なお、脂溶性の化合物はジメチルスルホキシド (DMSO) 5 μl に溶解して用い、対照には同量の DMSO を添加した。また、上記浮遊液中に存在する酵素の全活性を求める場合は、被検化合物とともに0.1%トリトン X-100 を添加してインキュベートした後、酵素活性を測定した。

酵素活性の測定は、Barrett らの記載⁶⁾に従って行った。酸性ホスファターゼ (Aph) 活性の測定反応液は、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1.2 ml, 32 mM 4-ニトロフェニルリン酸 0.5 ml および酵素液 0.3 ml から成り、37°C で20分間インキュベートした。反応は冷 1

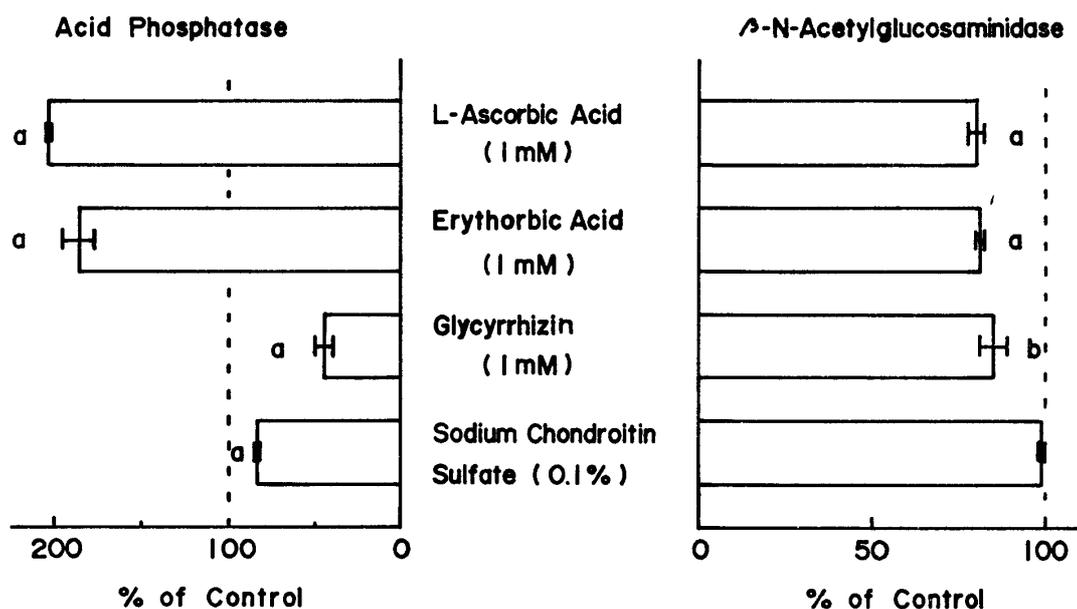


Fig. 1. Effect of food additives on lysosomal enzyme activities of a mouse liver.

Each bar represents the mean \pm S.E.M. of four separate experiments.

Control value of acid phosphatase and β -N-acetylglucosaminidase activity was

58.6 ± 2.9 and 50.0 ± 2.9 nmol/mg prot./min, respectively (n=6).

Significance: a, $p < 0.01$; b, $p < 0.05$

Mトリス塩酸-0.4Mリン酸緩衝液 (pH 8.5) 2 mlを加えて停止した後、波長 420 nm で吸光度を測定し、既知量の4-ニトロフェノールを用いて作製した検量線と比較することにより酵素活性を算出した。 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAcG) 活性測定反応液は、0.3M NaCl 含有0.3Mクエン酸緩衝液 (pH 4.3) 0.5 ml, 15 mM 4-ニトロフェニル- β -N-アセチルグルコサミニド 0.5 ml および酵素液 0.5 ml から成り、37°C で 20分間インキュベートした後、0.5M炭酸緩衝液 (pH 10.0) 1.5 ml を加えて反応を停止した。吸光度を波長 420 nm で測定し、Aph 活性と同様に酵素活性を算出した。

蛋白質の定量は Lowry らの方法⁷⁾に従って行い、牛血清アルブミンを標準物質として用いた。なお、有意差検定は Student's *t*-test により行った。

III. 実験結果

1) 食品添加物等のリソゾーム酵素活性におよぼす影響

リソゾーム指標酵素として酸性ホスファターゼ (Aph) と β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAcG) を選び、両酵素活性に対する各種化合物の *in vitro* 添加の影響を検討し、その結果を Fig. 1 に示した。酵素標本は 13,000 \times g 沈渣を0.1%トリトンX-100で可

溶化して用いた。

Aph 活性は 1 mM グリチルリチンまたは0.1%コンドロイチン硫酸ナトリウム添加により有意に抑制され、1 mM L-アスコルビン酸および 1 mM エリソルビン酸の添加により 著明な 増加が見られた。一方、NAcG 活性は、1 mM グリチルリチン、1 mM L-アスコルビン酸または 1 mM エリソルビン酸の添加により明らかに抑制された。しかし、デヒドロ酢酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸ブチル、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、サッカリンナトリウム、コリンリン酸塩、没食子酸プロピル、ニコチン酸アミド、アセチルコリン、アトロピン硫酸塩、ヒオスチアミン、D-アミグダリン、ヒスタミン、チラミン、ジメチルアミン、ヒスチジン、タウリン、グルタミン酸ナトリウム、グリシン、アスパラギン酸ナトリウム、 γ -アミノ酪酸の各 1 mM 添加によっては、酵素活性はほとんど影響をうけなかった。

2) 食品添加物等のリソゾーム顆粒からの酵素遊離におよぼす影響

まず、酵素活性に影響を与えなかった上記化合物 (ヒオスチアミンを除く) の肝リソゾームの顆粒からの酵素遊離におよぼす影響について検討し、変動の見られた物質についてのみ Table 1 に結果を示した。値は無添加の場合に見られる13,000 \times g 上清中酵素活

Table 1. Alteration in the release of acid phosphatase and β -N-acetylglucosaminidase from lysosomes by some compounds that have no effect on these enzyme activities.

Compounds (1mM)	Enzyme Activity Released (% of Control \pm S.E.M.)	
	APh	NACG
Control (no add.)	100	100
Butyl p-hydroxybenzoate	290 \pm 22 ^a	316 \pm 65 ^c
Acetylcholine	103 \pm 3	93 \pm 2 ^b
Atropine sulfate	112 \pm 5	123 \pm 6 ^b

Each value represents the mean \pm S.E.M. of four separate experiments. APh, Acid phosphatase; NACG β -N-Acetylglucosaminidase.

Significance: a, $p < 0.01$; b, $p < 0.02$; c, $p < 0.05$

Table 2. Alteration in the release of lysosomal enzymes by the addition of food additives.

Compounds		Enzyme Activity (% of Control \pm S.E.M.)		$(E_1/E_2) \pm$ S.E.M.
		Released (E_1)	Total (E_2)	
Control	APh	100	100	1
	NACG	100	100	1
L-Ascorbic acid (1mM)	APh	189 \pm 23 ^c	336 \pm 33 ^a	0.56 \pm 0.07 ^a
	NACG	67 \pm 7 ^c	100 \pm 1	0.67 \pm 0.08 ^c
Erythorbic acid (1mM)	APh	205 \pm 23 ^c	352 \pm 43 ^b	0.60 \pm 0.09 ^b
	NACG	71 \pm 5 ^b	97 \pm 1 ^c	0.74 \pm 0.06 ^b
Glycyrrhizin (1mM)	APh	258 \pm 5 ^c	48 \pm 6 ^a	5.27 \pm 0.41 ^a
	NACG	23 \pm 7 ^a	81 \pm 5 ^c	0.30 \pm 0.10 ^a
Sodium chondroitin sulfate (0.1%)	APh	104 \pm 7	88 \pm 3 ^c	1.19 \pm 0.06 ^c
	NACG	93 \pm 2 ^c	99 \pm 1	0.94 \pm 0.02 ^c

Each value represents the mean \pm S.E.M. of four separate experiments.

APh, Acid phosphatase; NACG, β -N-Acetylglucosaminidase

Significance: a, $p < 0.01$; b, $p < 0.02$; c, $p < 0.05$

性を対照としそれに対する百分率で表わした。パラオキシン安息香酸ブチル (1mM) は APh および NACG の著明な遊離増加をもたらしたが、アセチルコリン (1mM) は NACG の遊離を抑え、アトロピン硫酸塩 (1mM) は NACG の遊離を促進した。

次に、酵素活性に影響の認められた L-アスコルビン酸、エリソルビン酸、グリチルリチン、コンドロイチン硫酸ナトリウムの酵素遊離におよぼす影響を検討し、得られた結果を **Table 2** に示した。遊離酵素活性 (E_1) は、被検薬物を添加しない場合の上清中酵素活性を対照としそれに対する百分率で示した。全酵素活性 (E_2) は、酵素遊離反応時に各被検薬物とともに 0.1% トリトン X-100 を添加して得られた反応液を用いて測定し、トリトン X-100 のみ添加した対照液の酵素活性に対する百分率で表わした。すなわち、 E_2 は薬物の酵素活性自体への影響を示し、酵素遊離への影響は E_1/E_2 の値から明らかとなり、その値が 1 よりも大きければ遊離を促進し、1 よりも小さければ遊離を抑

制したことを示す。

E_1 と E_2 との比をとると、L-アスコルビン酸またはエリソルビン酸添加条件下では APh および NACG のいずれの E_1/E_2 値は対照よりも有意に小さくなり、酵素遊離が抑制されているものと推測された。しかし、グリチルリチンまたはコンドロイチン硫酸ナトリウムを添加した場合には、APh の E_1/E_2 値は対照より大きくなり、NACG の E_1/E_2 値は小さくなった。このことは、両化合物により APh の遊離が促進され、NACG の遊離が抑制されたことを示すものと思われる、両酵素は異った挙動を示した。

3) 脂溶性化合物の酵素遊離におよぼす影響。

Table 3 は、脂溶性の高い食品添加物について同様の検討を行い得られた結果を示す。

全酵素活性 (E_2) は、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、ジフェニール、オルトフェニルフェノール、チアベンダゾールのいずれの化合物の添加によっても変化は認められず、酵素活性自

Table 3. Effect of lipid-soluble food additives on the release of lysosomal enzymes.

Compounds (0.3mM)		Enzyme Activity (% of Control \pm S.E.M.)		$(E_1/E_2) \pm$ S.E.M.
		Released (E_1)	Total (E_2)	
Control	APh	100	100	1
	NAcG	100	100	1
Dibutyl hydroxy toluene	APh	103 \pm 3	103 \pm 1	1.00 \pm 0.03
	NAcG	101 \pm 6	101 \pm 1	1.00 \pm 0.06
Butyl hydroxy anisol	APh	127 \pm 5 ^b	110 \pm 3	1.16 \pm 0.04 ^c
	NAcG	132 \pm 6 ^a	104 \pm 1	1.27 \pm 0.05 ^b
Diphenyl	APh	94 \pm 3	104 \pm 1	0.91 \pm 0.03
	NAcG	97 \pm 1 ^c	102 \pm 1	0.95 \pm 0.01 ^a
o-Phenylphenol	APh	110 \pm 5	102 \pm 2	1.07 \pm 0.03
	NAcG	117 \pm 3 ^a	97 \pm 2	1.21 \pm 0.04 ^b
Thiabendazole	APh	97 \pm 2	99 \pm 1	1.05 \pm 0.05
	NAcG	100 \pm 3	99 \pm 1	1.01 \pm 0.04

Each value represents the mean \pm S.E.M. of four separate experiments.

APh, Acid phosphatase; NAcG, β -N-Acetylglucosaminidase

Significance: a, $p < 0.01$; b, $p < 0.02$; c, $p < 0.05$

体は影響をうけないものと思われる。しかし、酵素遊離の指標である E_1/E_2 値をみると、ブチルヒドロキシアニソール (0.3 mM) は APh および NAcG の遊離を促進するようであり、オルトフェニルフェノール (0.3 mM) は NAcG の遊離を増加させ、さらにジフェニール (0.3 mM) は NAcG の遊離を抑制するとの結果を得た。なお、データを示していないが、いずれの化合物も 0.1 mM 添加では遊離にほとんど影響を与えなかった。

IV. 考 察

今回検討した食品添加物等 31 種の化合物のうち、APh または NAcG 活性自体に影響を与えたのは、L-アスコルビン酸、エリソルビン酸、グリチルリチンおよびコンドロイチン硫酸ナトリウムの 4 種であり、いずれも食品添加物として使用されている。さらにこれら 4 種の化合物は、肝リソゾーム顆粒からの酵素遊離にも影響を与えることが判明した。しかしながら、化合物による酵素活性の増強または減弱作用と酵素遊離量の増減との間には一定の相関性は認められなかった。具体的にいえば、L-アスコルビン酸やエリソルビン酸は APh 活性を増強し NAcG 活性を抑制するが、両酵素の遊離を抑制した。また、APh と NAcG が遊離において同じ挙動を示すと限らず、グリチルリチンあるいはコンドロイチン硫酸ナトリウムが作用した場合には、両酵素の遊離は相反した変化を示した。

この様に同一の化合物に対してそれぞれの酵素が異なった挙動を示す原因の 1 つとして、各酵素がリソゾー

ム顆粒内で異った存在様式をとっていることが推察される。したがって、酵素遊離の変動は「膜の安定化」または「ぜい弱化」だけでは簡単に表現できない現象であり、膜構造の変化だけでなく膜と酵素あるいは酵素と化合物との相互作用を個別に考慮する必要がある。多くのリソゾーム酵素が糖蛋白質であることや、膜上にこれらの酵素を認識し結合する酵素受容体が存在すること、あるいは膜内の SH 基と酵素分子内の SH 基との間での SS 結合形成による活性調節の可能性などはその考慮の対象となる要因であろう。

一方、酵素活性に影響が認められなかったアセチルコリン、アトロピン、パラオキシ安息香酸ブチルや脂溶性の高いブチルヒドロキシアニソール、ジフェニール、オルトフェニルフェノールも酵素遊離に影響を与えることが明らかとなった。生理活性の知られているアセチルコリンやアトロピンにより影響をうけることは興味深い、作用濃度が高くその生理作用に言及することは困難である。

以上のようにいくつかの食品関連化合物がリソゾーム酵素の動態に影響を与える可能性が明らかとなったが、これらの化合物がリソゾーム顆粒からの酵素遊離に変化をもたらした機序については推測の域を出ない。パラオキシ安息香酸ブチル、ブチルヒドロキシアニソール、ジフェニール、オルトフェニルフェノールについては、これらはいずれも脂溶性が高いことから、脂質に富むリソゾーム膜にこれらの化合物が容易に移行した後膜成分となんらかの化学反応をおこして膜構造や膜流動性などの性状に変化をもたらしたことが想像

できる。リソゾーム膜の成分や構造は基本的には他の生体膜と変らないが、ミトコンドリア膜などの他の細胞内器官に見られる膜と著しく異なる点は、ステロールやスフィンゴミエリンに富み、むしろ細胞膜に類似することが指摘されている⁸⁾。しかし上記の化学物質が膜内のどの脂質成分とどのような反応を起こすかは不明である。

従来より生体膜系への薬物の影響を *in vitro* で探索する方法として、溶血反応の利用と並んでリソゾーム酵素の遊離を測定する方法が用いられてきた。その理由は、遊離量の変動が単に膜成分や膜構造の変化を示唆する情報をもたらすだけでなく、遊離変化自体が毒性発現に関与する場合があるためと思われる。リソゾーム酵素の基質となり得る生体成分は蛋白質、リン脂質、複合糖質、核酸などであるが、すでに述べたように酵素は通常顆粒内に封じ込められているのでこれらの生体成分と接触することがなく、分解されない。分解を受けるにはファゴリソゾームの形成などによりリソゾーム顆粒内にとりこまれることが必要で、とりこまれた後酵素の加水分解作用が作動すると考えられている⁹⁾。しかし、リソゾーム膜の不安定化あるいは破壊はこのような生理的調節機構の混乱を招来し、逸脱した酵素による無秩序な生体成分の分解が起こるおそれがある。したがって膜の不安定化は生体にとって好しくなく、細胞損傷の原因になると考えられている¹⁰⁾。リソゾーム膜に対して不安定化作用をもつ因子としては、すでに挙げたビタミンAやサポニン類などの化学物質のほか、紫外線やX線照射などの物理的因子も知られている。いずれの因子もリソゾーム膜の脂質成分と化学反応をおこし膜を不安定化するものと考えられている¹¹⁾。また、炎症の発症にはリソゾーム酵素の活性変化や顆粒外遊離の増加等の動態変化が関与していると考えられており、ハイドロコチゾンや非ステロイド系の抗炎症薬にはリソゾーム膜安定化作用が認められている。このようにリソゾーム機能の変化が疾病の原因になると考えられる場合もある。

さて、本実験成績から食品に関係するいくつかの化学物質が、*in vitro* ではあるが、リソゾーム酵素活性やリソゾームからの酵素遊離に影響を与えることが判ったが、これらの変化が生体内でどのような意味をもつかは、現時点ではわからない。用量反応性についての検討や、本質的には、リソゾーム酵素のリソゾーム内での局在性に関連した酵素活性調節機構ならびに細胞内動態などについての解明が必要と思われる。

V. 要 約

雄マウスの肝臓から遠心法により分画したリソゾーム標本 (13,000×g 沈渣) を用いて、酵素活性および酵素遊離におよぼす食品添加物や他の食品関連化合物の影響を *in vitro* で検討し、以下の結果を得た

1) 酸性ホスファターゼ活性は L-アルコールビン酸またはエリソルビン酸の各 1 mM 添加により有意に上昇し、グリチルリチン (1 mM) またはコンドロイチン硫酸ナトリウム (0.1%) の添加により抑制をうけた。一方、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は、スコルビン酸 (1 mM)、エリソルビン酸 (1 mM) あるいはグリチルリチン (1 mM) の添加により抑制された。

2) リソゾーム顆粒からの酸性ホスファターゼの遊離は、グリチルリチン (1 mM)、コンドロイチン硫酸ナトリウム (1 mM)、パラオキシ安息香酸ブチル (1 mM) およびブチルヒドロキシアニソール (0.3 mM) の添加により増加し、L-アスコルビン酸 (1 mM)、エリソルビン酸 (1 mM) の添加により減少した。一方、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼの遊離は、パラオキシ安息香酸ブチル (1 mM)、ブチルヒドロキシアニソール (0.3 mM)、オルトフェニルフェノール (0.3 mM) またはアトロピン (1 mM) の添加により有意に増加し、L-アスコルビン酸 (1 mM)、エリソルビン酸 (1 mM)、グリチルリチン (1 mM)、ジフェニール (0.3 mM)、コンドロイチン硫酸ナトリウム (0.1%) あるいはアセチルコリン (1 mM) の添加により抑制された。

参 考 文 献

- 1) Dingle, J. T., *Biochem. J.*, **79**, 509-512 (1961)
- 2) Fukuzawa, K., Suzuki, Y., Uchiyama, M., *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 279-287 (1971)
- 3) Carevic, O., *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1377-1381 (1977)
- 4) Barzu, T., Cuparencu, B., Hantz, A., *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 185-194 (1973)
- 5) Pitout, M. J., Schabort, J. C., *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 1801-1805 (1973)
- 6) Barrett, A. J., Heath, M. F., "Lysosomes: a laboratory handbook", p. 113 and p. 118-120, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977)
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)

- 8) Henning, R., Heidrich, H.G., *Biochem. Biophys. Acta*, **345**, 326 (1974)
- 9) De Duve, C., Wattiaux, R., *Ann. Rev. Physiol.* **28**, 435-492 (1966)
- 10) Weissman, G., *Fed. Proc.*, **23**, 1038-1044 (1964)
- 11) 高橋忠雄監修, 肝臓—構造・機能・病理生理, p. 116-117, 医学書院, 東京 (1976)