

研究報告

アルコール投与後の血中アセトアルデヒド濃度を与える
MANDAの抑制効果河合 元子¹⁾ 松浦新吾郎²⁾

はじめに

アルコール(エタノール)飲料を経口的に摂取した場合、吸収されたアルコールは体内にほぼ均等に分布し、そのまま体外へ排泄される一部(2~10%)を除いては全摂取量の80%以上は肝臓で代謝される。

アルコールやその代謝産物には、糖質や脂質などの栄養素のように生体内にいったん貯蔵しておいて必要に応じて代謝を行うことができるという貯蔵機構が存在しない。したがって、アルコールはひとたび体内に取り込まれると代謝排泄が完了するまで代謝を続けることになる。エタノールの主な代謝経路の最初の過程はアルコール脱水素酵素(alcohol dehydrogenase)、ミクロソームエタノール酸化系(microsome ethanol oxidizing system: MEOS)、カタラーゼなどの酵素によるアセトアルデヒドの産生である¹⁾。

エタノールの代謝により生じたアセトアルデヒドは、薬理学的ならびに生化学的に極めて反応性の高い毒性物質であり、速やかに無毒な物質に変換される必要がある。このアセトアルデヒドは、肝細胞内においてアルデヒド脱水素酵素(aldehyde dehydrogenase: ALDH)による酸化を受け酢酸に変換される。生じた酢酸のごく一部は肝細胞内で、大部分は末梢組織において、アセチル CoA に変換され、クエン酸サイクルに入ってエネルギーを産生しながら二酸化炭素と水にまで分解される^{1,2)}。飲酒後に血中アセトアルデヒド濃度が高値になると嘔吐、頭痛、顔面紅潮、頻脈などの悪

酔いの症状が出現する。これらの症状は特に ALDH2 の部分および完全欠損者で顕著に出現する。さらに、慢性エタノール摂取による障害作用としては、ALDH 活性の抑制が起こり、アセトアルデヒドの除去が抑制され、蓄積することにより、肝障害が生じること、また不安定なアセトアルデヒドがタンパクと結合しアセトアルデヒドアグクトを形成することにより、細胞内タンパク輸送障害を引き起こすことなどが報告されている³⁾。事実、アセトアルデヒドによって変性したタンパクの肝での局在と肝障害の局在が一致するとの報告⁴⁾がみられている。

飲酒後の酩酊状態は、血中アルコールまたはアセトアルデヒド濃度に依存する。したがって、これらの症状を軽減させるためにはアルコール代謝を促進させることが効果的であり、近年、種々の薬剤⁵⁻⁷⁾、また植物からの抽出、単離成分などの応用が試みられ、血中アルコールおよびアセトアルデヒド濃度の低下作用が報告されている⁸⁻¹²⁾。MANDA(万田酵素)は、黒糖を原料の1つとし、果実、種実などを加え発酵させたもの¹³⁾で、抗酸化作用をはじめとする種々の生理活性をもつ健康食品として市販されている。本研究ではアルコールの投与後の血中アルコールおよびアセトアルデヒド濃度に及ぼす MANDA の抑制効果について検討したので報告する。

方法

1. 動物および飼料

実験動物には7週齢(体重210~300g)の雄性Sprague-Dawley(SD)ラットを用い、室温25±2℃、湿度

1) M. Kawai: 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 2) S. Matsuura: 万田発酵株式会社

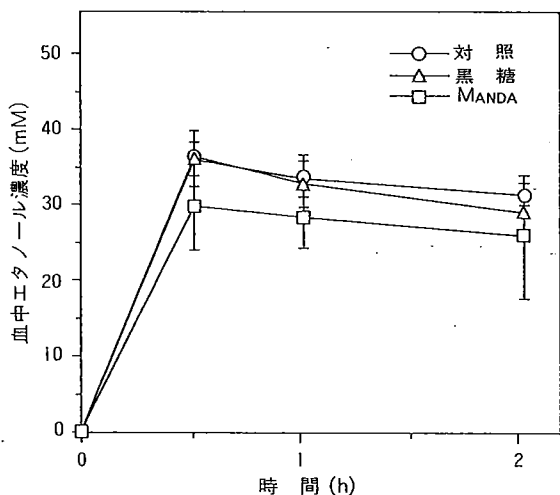


図1 エタノール投与後のラット血中エタノール濃度の経時変化
(各群：n=6) 各群間には有意差なし

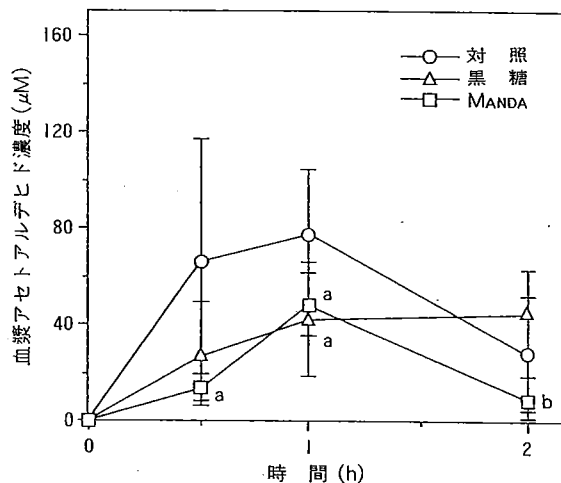


図2 エタノール投与後のラット血漿アセトアルデヒド濃度の経時変化
a：対照群に対する有意差，b：黒糖群に対する有意差。
a, b: p<0.05 (各群：n=6)

50±5%の条件下で飼育した。ラットは飼料(標準飼料MF：オリエンタル酵母工業株式会社製，日本)を実験までの6日間自由摂取させ，実験前の19時間絶食させた。水は実験開始まで自由に摂取させた。

2. エタノールおよび薬剤の投与

実験動物にはエタノールを2g/kg体重となるように40%液を腹腔内投与した。MANDA®(万田酵素；1g/kg体重)は胃ゾンデにて胃に直接投与した。実験は，①エタノール投与直後にMANDA投与，②MANDAを7日間連続投与(1日1回)し，最終投与1時間後にエタノールを投与，③エタノール投与1時間前にMANDA投与，の3方法で行った。また，対照としては水，あるいはMANDAに含まれている糖分量と同量の黒糖または砂糖(0.33g/kg体重)を用い，同様にゾンデにて胃に直接投与した。

3. 血中エタノールおよびアセトアルデヒドの測定

ラットの採血は，エタノール投与の1時間後にエーテル麻酔下で心臓からヘパリン加ディスポーザブルシリンジおよび注射針(24G×3/4)を用いて行った。なお，経時変化の測定のための採血はエタノール投与後，0.5，1，2時間目にラットをエーテル麻酔下で固定し大腿静脈からサーフロー留置針(24G×3/4)およびヘパリン加ディスポーザブルシリンジを用いて行った。

エタノール量の測定はF-キット(ベーリングー・マンハイム社製，ドイツ)を用いて行った。0.5mLの全血と4mLの水冷過塩素酸(0.33mol/L)を混和して遠心(4℃，3,500rpm，15分)し，その上清を測定に用いた。0.3Mリン酸緩衝液(pH9.0；3mL)，Nicotinamid-

adenine dinucleotide(NAD)錠剤(4mg)および上記で調整した試料(0.1mL)を試験管内でよく混和し，5分間反応させた後，吸光度(E1)を測定した。さらに，ALDH(0.05mL)を加えて混和し，反応(3分)終了後に吸光度(E2)を測定した。エタノール量(g/L)はこれらの吸光度E2およびE1の差より得た。

アセトアルデヒドの測定には，心臓採血および大腿静脈からの採血後，ただちに血液を遠心し(4℃，3,500rpm，15分)，この上清液(血漿)を過塩素酸で除タンパク後，1M水酸化ナトリウム溶液で中和(pH7~9)してこれを試料として用いた。0.3Mリン酸緩衝液(pH9.0；1mL)，NAD溶液(0.2mL)，蒸留水(2mL)および上記で調整した試料(0.5mL)を試験管に加えてよく混和し，3分間の反応終了後に吸光度(A1)を測定した。さらに，ALDH(0.05mL)を加えて混和して反応(3分)終了後に，吸光度(A2)を測定した。アセトアルデヒド量(g/L)はこれらの吸光度A2およびA1の差より得た。

4. 統計処理

統計処理は，経時変化の実験結果には二元配置の分散分析，その他の実験群の比較には一元配置の分散分析を行った。

結 果

1. 血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度の経時変化に与えるエタノール投与直後のMANDA，黒糖投与の影響(図1，2)

対照群の血中エタノール量は0.5時間で最高値を示

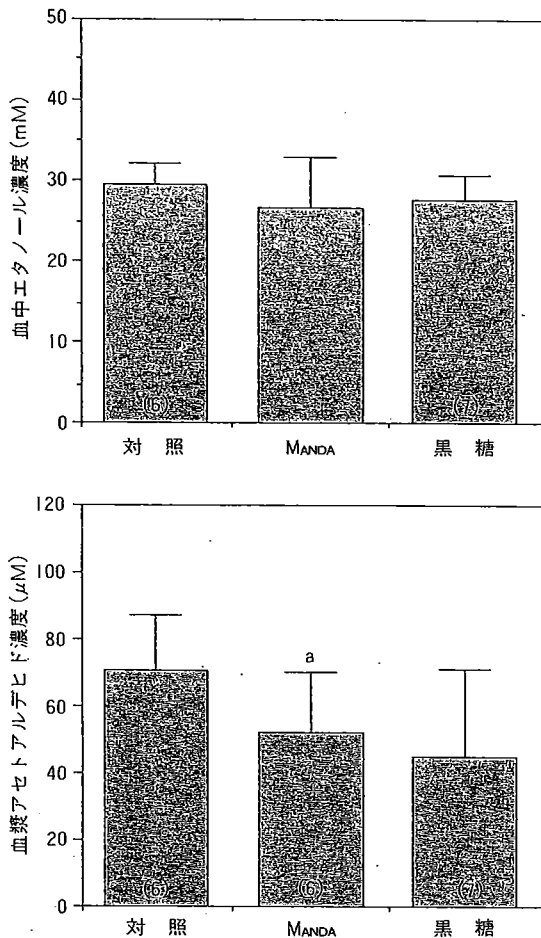


図3 エタノール投与1時間後のラット血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度に対するMANDAの連続7日間前投与の効果

a : 対照群に対する有意差; a : p<0.05 ()内の数字は各群のラット匹数を示す。

し、2時間後まで徐々に減衰した。このエタノール投与後の血中エタノール濃度の経時変化に対し、MANDAと黒糖投与は有意な影響を示さなかった(図1)。対照群の血漿中のアセトアルデヒド量は、1時間後にピークを示し2時間までに減衰した。MANDA群も対照群と同様に1時間後にピークを示し2時間までに減衰したが、このときの値はどちらも対照群に比べ半減していた。一方、黒糖群は1時間後に対照群に比して有意に低値を示したが2時間後まで上昇し続けた(図2)。

2. MANDAの連続7日間投与が血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度に与える効果(図3)

MANDAおよび黒糖の連続投与は、血中エタノール濃度に有意な変化を与えなかった(図3上)。しかし、血漿アセトアルデヒド量は対照群のそれぞれ63%、72%の低値を示した(図3下)。MANDA群のアセトアルデヒド濃度は対照群に対して有意な低値であった。

表1 エタノール投与1時間後のラット血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度に対するMANDA(エタノール投与1時間前投与)の効果

	エタノール(mM) mean±SD	アセトアルデヒド(μM) mean±SD
対照	27.5±7.4	63.3±25.5
M _{ANDA}	35.2±3.69	26.5±9.13 ^b
黒糖	34.9±2.04	21.5±6.86 ^b
砂糖	32.1±2.19	44.9±10.1 ^a

a, b : 対照群に対する有意差; a : p<0.05, b : p<0.01 (各群: n=6)

3. エタノール投与1時間前のMANDA投与が血中エタノールおよびアセトアルデヒド濃度に与える効果(表1)

血中エタノール濃度は、3群とも対照群との有意差を示さなかった。しかし、血中アセトアルデヒド量は、MANDA、黒糖、砂糖の投与により、対照群の42%、34%、71%の値を示し、3群とも有意な減少を示した。なお、MANDA、黒糖群の2群間には有意差はなかった。

考 察

MANDAは、黒糖を原料の1つとし果実、種実などを加え発酵させたいわゆる健康食品である¹³⁾。現在までのMANDAの生体に及ぼす効果については、活性酸素に対する抗酸化作用¹⁴⁾、高齢ラット脳の脂質過酸化に対する抑制効果¹⁵⁾、そして癌細胞の増殖の抑制効果¹⁶⁾などの効果が報告されている。

本研究では、MANDAがラットのエタノール摂取後の血中エタノールおよびアセトアルデヒド量に与える効果を検討した。その結果、MANDAはいかなる投与時期においても血中エタノール量に有意な変化を与えないにもかかわらず、血漿アセトアルデヒド量を対照群の値に比べ半減させた。図2において、エタノール投与後1時間ではMANDAとともに黒糖の血中アセトアルデヒド濃度に及ぼす作用が対照群に対して有意に低値を示した。しかし、MANDA群の血中アセトアルデヒド濃度はその後エタノール投与後2時間までに減少した。一方、黒糖群はそのまま上昇を続け対照群、MANDA群より高値を示した。このことから黒糖の血漿アセトアルデヒドに与える作用は、代謝過程を単に遷延させているものと考えられる。さらに黒糖より精製度の高い砂糖を実験群に加え検討を行ったところ、砂糖群は対照群に比べ有意に血中アセトアルデヒド量を抑制していたものの黒糖群ほどの作用はみられなかった(表1)。

この結果から血中アセトアルデヒド量の抑制効果に黒糖に含まれているミネラルなどの成分も関与していることが考えられる。

本研究においてはエタノールは腹腔内投与を行ったので、胃へ直接投与された M_{ANDA} の消化管からのアルコール吸収を阻害した結果、血漿アセトアルデヒド量が抑制されたとは考えられない。事実、M_{ANDA} 投与群の血中エタノール濃度と対照群とは同一である。したがって、M_{ANDA} は特異的に血漿のアセトアルデヒド濃度を低下させる作用があると考えられる。

肝臓におけるアセトアルデヒドの代謝を促進させるには、ALDH などの活性を促進させること、およびアセトアルデヒドに直接作用することが有効だと考えられている。既にパンテチン⁷⁾やその代謝物であるタウリン⁸⁾は ALDH を活性化することにより肝アセトアルデヒド代謝を促進させること、また、水溶性キノン誘導体はアセトアルデヒドと非酵素的に反応することにより、血中アルコール濃度に影響することなく、アセトアルデヒド濃度のみを選択的に低下させることが明らかにされている¹⁶⁾。われわれは M_{ANDA} とアセトアルデヒドの *in vitro* における非酵素的な反応の検討を試みたが分光学的に測定不可能であった。M_{ANDA} と ALDH との関連については、M_{ANDA} の10日間連続投与がエタノール慢性投与ラットの肝、血清、脳における ALDH 活性の低下を防いだという報告がある¹⁷⁾。したがって、M_{ANDA} はエタノール投与による ALDH の活性の低下を阻止することによって、アセトアルデヒドの代謝が促進されて血中アセトアルデヒド量が減少したことが作用の1つとして考えられる。

近年、非慢性の飲酒および慢性エタノール摂取による過剰アセトアルデヒドの直接的また間接的な毒性および代謝の過程で産生されるフリーラジカルが注目されている¹⁸⁻²⁰⁾。M_{ANDA} は *in vitro* において活性酸素を直接的に消去すること¹⁴⁾、M_{ANDA} の長期投与によりラット脳内の脂質過酸化の抑制¹³⁾およびフリーラジカルが関連しているといわれている情動性ストレスを抑制する²¹⁾という報告がなされている。今回の研究で、M_{ANDA} はこれらの抗酸化作用に加えて、毒性のあるアセトアルデヒドの抑制効果のあることが判明したので宿酔いの予防ないしは治療、さらには慢性アルコール摂取に伴う肝障害の予防に応用できる可能性が示唆された。

結 語

M_{ANDA} はエタノール投与前後の投与時期にかかわらず血中エタノール濃度に有意な影響を与えずに、血漿アセトアルデヒド量を特異的に抑制することを明らかにした。

謝 辞

本研究について、ご指導ご協力下さいました岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門小川紀雄教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 玉井博修, 加藤真三, 石井裕正: アルコールとからだ, からだの科学 192: 20-24, 1997
- 2) Lieber, C. S.: Medical disorders of alcoholism. Pathogenesis and treatment. Major Problems in Internal Medicine 22, pp.1-589, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1982
- 3) Tuma, D. J., Casey, C. A. and Sorrell, M. F.: Effects of ethanol on hepatic protein trafficking: Impairment of receptor-mediated endocytosis. Alcohol Alcoholism 25: 117-125, 1990
- 4) Niemela, O., Juvonen, T. and Parkkila, S.: Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. J. Clin. Invest. 87: 1367-1374, 1991
- 5) Hobara, M., Watanabe, A., Kobayashi, M. et al.: Tissue distribution of acetaldehyde in rats following acetaldehyde inhalation and intragastric ethanol administration. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35: 393-396, 1985
- 6) 芳原準男, 渡辺明治, 小林道男: アルコール代謝に及ぼすタウリンの影響. アルコール代謝と肝 8: 101-104, 1989
- 7) Watanabe, A., Hobara, N., Kobayashi, M. et al.: Lowering of blood acetaldehyde but ethanol concentrations by pantethine following alcohol ingestion: Different effects in flushing and non-flushing subjects. Alcohol. Clin. Exp. Res. 9: 272-276, 1985
- 8) 大熊 浩, 石川久史, 伊東禎男ほか: アルコールを投与されたラットおよびヒトのアルコール濃度に及ぼすケンボナシ(*Hovenia dulcis* Thunb.)抽出物の影響. 日本栄養・食糧学会誌 48: 167-172, 1995
- 9) Sakai, K., Yamane, T., Saitoh, Y. et al.: Effect of water extracts of crude drugs in decreasing blood ethanol concentrations in rats. Chem. Pharm. Bull. 35: 4597-4604, 1987
- 10) Thieden, H. I. D., Grunnet, N., Damgaard, S. E. et al.: Effect of fructose and glyceraldehyde on ethanol metabolism in human liver and in rat liver. Eur. J. Biochem. 30: 250-261, 1972
- 11) Damgaard, S. E., Lundquist, F., Tonnesen, K. et

- al. : Metabolism of ethanol and fructose in the isolated perfused pig liver. *Eur. J. Biochem.* 33 : 87-97, 1973
- 12) 大熊 浩, 伊東禧男, 遠藤 章 : エタノール資化性酵母 *Candida solicola* 菌体摂取が血中アルコール濃度および血中アセトアルデヒド濃度に及ぼす影響. *日本栄養・食糧学会誌* 44 : 373-376, 1991
- 13) Kawai, M., Matsuura, S., Asanuma, M. et al. : Manda, a fermented natural food, suppresses lipid peroxidation in the senescent rat brain. *Neurochem. Res.* 23 : 459-465, 1998
- 14) 河合元子, 松浦新吾郎, 森 昭胤 : 万田酵素のフリーラジカル消去作用について. *基礎と臨床* 28 : 13-17, 1994
- 15) Hwang, W., Hwang, Y., Lee, J. et al. : Antitumor and immunopotentiating effects of Manda enzyme. *Natural Product Sciences* 2 : 29-36, 1996
- 16) Hobara, N., Watanabe, A., Kobayashi, M. et al. : Quinone derivatives lowered blood liver acetaldehyde but not ethanol concentration following ethanol loading to rats. *Pharmacology* 37 : 264-267, 1988
- 17) Joo, C. N. : Effect of Manda enzyme on alcohol toxicity and diabetes. *Proceedings of Satellite Symposium of the 2nd International Congress of Pathophysiology* (Matsuura, Y., Joo, C. N., Hwang, W. I. and Okuda, H. eds.), pp. 50-55, 1996
- 18) Niemela, O. : Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol induced liver disease. *Hepatology* 22 : 1208-1014, 1996
- 19) Kato, S. : Role of xanthine oxidase in ethanol induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 98 : 203-210, 1990
- 20) Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. : Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad. Biol. Med.* 12 : 219-240, 1992
- 21) Kawai, M. and Matsuura, S. : Manda suppresses emotional stress-induced stomach ulcers in rats. *Int. J. Stress Manag.* 4 : 63-69, 1997