

活性化マクロファージの NO 産生に及ぼすエタノールと性差の影響
—動脈硬化発症との関連から—

杉 本 香 奈
西 田 昌 司

Summary

Effects of Ethanol on the NO Production of Macrophages from Male and Female Rats

SUGIMOTO Kana

NISHIDA Masashi

Alcohol drinking is supposed to be one of risk factors of atherosclerosis. The risk of alcohol intake was mainly evaluated in male subjects, because of high percentage of drinking population in male. However, atherosclerosis is a typical disease that has sexual difference in morbidity and mortality. Therefore, we investigated whether ethanol causes different effects on macrophages, which play a pivotal role in the initiation and the development of atherosclerosis, from different sex origin.

Peritoneal macrophages were isolated from rats stimulated with lipopolysaccharide. NO production was measured as an index of macrophage activation by Griess reagent method ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ concentration) and NO sensitive fluorescent dye (relative NO concentration). Ethanol reduced $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ concentration from 500mM and NO production from 300mM in macrophages from male rats. Ethanol reduced both parameters in macrophages from female rats in less extent. The addition of 17β -estradiol to macrophages suppressed the reduction of NO production from macrophages by ethanol. However, there was no statistical difference in both experiments.

These results suggest that ethanol reduces the activation of macrophages and may suppress the progression of atherosclerosis. Although the protective effect of ethanol was limited in female rats compared with male rats, there was no significant sexual difference in our model.

1. 背景

冠動脈疾患、脳血管障害、腎機能障害などの虚血性疾患は、生活様式の欧米化と高齢化の進展とともに国民の死亡率、有病率の中で占める割合が急激に増加し、まさに国民病となりつつある。このような虚血性疾患の原因となるが、血管の狭窄・閉塞をもたらす動脈硬化である。動脈硬化病巣の形成過程では、血液中の単球と呼ばれる炎症細胞が活性化され、血管壁に接着した後に内膜内に侵入して貪食細胞であるマクロファージへと分化する。一方、コレステロールの過剰摂取により血液中の低比重リポ蛋白 (LDL) レベルが増加すると、LDL は血管内膜に沈着し、酸化変性を受けて酸化 LDL に変化する。マクロファージは複数のスカベンジャー受容体を持つため、LDL を際限なく細胞内に取り込んでコレステロールを蓄積した泡沫細胞となり、脂肪線条と呼ばれる動脈硬化の初期病変を形成する。

また、マクロファージが分泌する生理活性物質は動脈硬化の進行に関与している。このような生理活性物質の 1 つに、一酸化窒素 (NO) がある。NO は L-アルギニンと酸素を基質とし、NO 合成酵素 (NOS) によって L-シトルリンとともに産生される。NOS には内皮型 (eNOS)、神経型 (nNOS)、誘導型 (iNOS) の 3 種類のアイソフォームがあり、eNOS、nNOS は不活性型として恒常的に発現している。一方 iNOS はサイトカインやグラム陰性細菌の菌体成分であるリポポリサッカリド (lipopolysaccharide: LPS) 等の刺激によりマクロファージや平滑筋細胞で誘導され、常に活性型として発現している¹⁾。また、動脈硬化病巣内のマクロファージや脳卒中後の血管壁において、iNOS が発現しているとの報告もある²⁻⁴⁾。iNOS 由来の NO は血管機能障害やコラーゲン蓄積、プラークの不安定化を引き起こすことが知られており、動脈硬化の病態とマクロファージの iNOS 由来 NO との関連が示唆されている⁵⁻⁸⁾。

一方、動脈硬化の発症、進行には性差が存在し、女性では男性より発症率が顕著に低い。しかし、閉経後には女性の動脈硬化発症率が次第に増加し、70 歳代後半で性差はほぼ消失する。閉経後に発症率が増加する背景には、女性ホルモン、特にエストロゲンの低下が関与していると推測される。エストロゲンの血管系への作用には動脈硬化の危険因子を軽減させる間接的な作用と、血管壁を保護する直接的な作用がある。前者には、LDL コレステロールの低下、高比重リポ蛋白 (HDL) コレステロールの増加、リポ蛋白 (a) (Lp(a)) の異化亢進、抗酸化作用などといった脂質代謝に対する作用や糖代謝、凝固系、血圧などを改善する作用がある。一方後者に関しては、血管内皮に作用して内皮依存性血管拡張反応の改善および内皮細胞の保護、血管平滑筋細胞の増殖・遊走の抑制といった作用が知られている⁹⁾。エストロゲンはエストロゲン受容体 (ER) を介して作用するが、ER には構造的に似た ER α と ER β の 2 つのサブタイプがある。いずれも血管組織で発現していることから、エストロゲンの血管に対する作用はこの二種類の受容体により仲介されると考えられている。動脈硬化病巣内において ER α の発現が亢進するとの報告や¹⁰⁾、機械的血管内膜損傷後に損傷局所の ER β の発現が亢進するとの報告

もある¹¹⁾。従って、閉経前の女性においては、エストロゲンが抗動脈硬化作用を発揮していると考えられる。

動脈硬化性疾患の発症・進行には、生活習慣も危険因子として大きく関与している。高コレステロール血症、高血圧、糖尿病、喫煙、肥満などとともに、飲酒も危険因子の1つと考えられている。動脈硬化の危険因子としての飲酒には功罪の両面がある。Isoらは、日本の中年男性において少量から適量（1日1-41g）の飲酒では脳梗塞、冠動脈疾患のリスクを低下させ、多量飲酒（1日70g以上）では脳卒中のリスクを上昇させると報告している¹²⁾。また、Reynoldsらは、2002年までに発表された35論文（コホート研究19、ケースコントロール研究16）のメタアナリシスを行った。その結果、少量から適量の飲酒で脳梗塞のリスクが低下し（1日12g未満では0.8倍、1日12-24gでは0.72倍）、多量飲酒で脳梗塞のリスクが上昇する（1日60g以上で1.69倍）ことを見出した。また、女性では少量から適量飲酒者の脳梗塞のリスク減少率が、男性に比べ大きかった¹³⁾。このようなエタノールの動脈硬化性疾患への作用メカニズムとして、少量から適量飲酒では高比重リポ蛋白（HDL）の増加、血小板機能の抑制を介して発症を抑制しているのに対し、逆に多量飲酒では高血圧や凝固障害を介して発症を促進していると考えられている¹²⁻¹⁴⁾。

我が国の女性飲酒者の割合は1954年に13%であったが1968年には19.2%、1987年には43.2%と急激な増加を示している¹⁵⁾。それに伴い、女性におけるアルコール依存症やアルコール性肝障害などの患者数が増加傾向を示し、社会問題となりつつある^{16,17)}。女性においては、男性より少量（積算飲酒量にして男性の約3分の2）かつ短期間（常習飲酒期間は約3年）で種々の肝障害を生じ、また、治療後に再発しやすいことが知られている¹⁸⁾。また閉経前の女性において多量のアルコール摂取は無排卵、黄体期の機能障害、反復性の無月経や閉経時期の若年化などの月経異常に深く関わっている¹⁹⁾。更に、適量から多量飲酒は閉経前の女性の血清エストロゲンレベル、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）レベルを増加させ^{20,21)}、閉経後の女性でも血清エストロン硫酸塩レベルやDHEA硫酸塩レベルを増加させることにより乳癌の発症が増加するとの報告もある²²⁾。このように女性における飲酒はエストロゲンの分泌異常を含む種々の疾患と深い関連性がある。しかしながら、従来は女性飲酒者が非常に少なかったことや、女性においては動脈硬化患者が少ないことから、女性の飲酒と動脈硬化性疾患の関係については明らかにされていない。

2. 目的

本研究においては、女性における動脈硬化に及ぼす飲酒の影響を細胞・分子生物学的に検討することを目的とした。そのため、動脈硬化形成初期から後期のプラーク破綻に至るまで深く関わっているマクロファージに注目し、マクロファージのNO産生能に対してアルコールがどのような影響を及ぼすかを、培養細胞の性差モデルを用いて検討した。

3. 方法

(1) 動物

実験には8-10週齢、250-300gの雌雄両性のWistar系ラットを用いた。飼育は12時間周期で昼夜を調節した環境でおこない、通常飼料と水は自由に摂取できるようにした。

(2) 細胞の単離、培養

ラット腹腔内にチオグリコレート培地 (Sigma) 10ml を投与し、2日後に腹腔内の滲出液をカルシウムを含まない冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-) 10ml の注入、吸引を4回繰り返すことにより回収した。純度の高い腹腔マクロファージを分離するために、Ficoll (Amersham) 比重遠心法を用いて赤血球や白血球などの細胞を取り除いた。その後、10%ウシ胎児血清 (FBS) および抗生物質 (100 units/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin (インビトロジェン)) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma) を用い、腹腔マクロファージを 5×10^5 個/ml に調整して5%CO₂、37℃下で培養し、実験に供した。

(3) 性差モデル

性差の検討には雌性および雄性ラット由来の腹腔マクロファージと、雄性ラット由来の腹腔マクロファージへの17 β エストラジオール (E2) 添加モデルを用いた。一部の実験では、雌性マクロファージへのE2添加モデルも用いた。前者のモデルでは、播種3時間後に10%FBS および抗生物質 (100 units/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin) を含むフェノールレッド不含DMEM (IMEM) に交換した。また後者のE2添加モデルでは、播種3時間後にE2 (0.01-10nM/0.01%DMSO (Sigma)) を含有したIMEM (10%FBS) に交換し、培養24時間後に再度E2の添加を行った。しかし、一部の実験では播種3時間後のみにE2を添加し、24時間後の添加は行わなかった。

(4) 腹腔マクロファージの活性化

腹腔マクロファージの活性化には、LPSを用いた。マクロファージを播種し、その24時間後にLPS (Sigma; 1 μ g/ml) を添加した。

(5) NO産生能

活性化腹腔マクロファージのNO産生能の検討には、① Griess 試薬による nitrate/nitrite (NO₃⁻/NO₂⁻) 濃度の測定と、② NO 感受性蛍光色素による細胞外 NO 量の測定を用いた。

① NO₃⁻/NO₂⁻濃度の測定

NOは非常に寿命が短く、水中では酸化を受け最終的にNO₂⁻やNO₃⁻に代謝される。そのため直接測定するよりもその代謝産物であるNO₂⁻やNO₃⁻の蓄積を測定する方が容易である。従って、培養液中のNO₃⁻/NO₂⁻濃度をGriess試薬法を用いて測定し、腹腔マクロファージの

NO 産生能の指標とした。腹腔マクロファージを96穴プレート (1×10^5 個/well) (FALCON) に播種し、24時間後に LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) を添加した。24時間後に培養液を回収し、NO アッセイキット/Griess 試薬法 (Cayman) を用いて $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 濃度を測定した。まずサンプル中の NO_3^- を NO_2^- に還元し、 NO_2^- と Griess 試薬 (Sulphanilamide/N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) を10分間反応させ、両者のカップリングより生成されたアゾ化合物の540nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。その後、標準検体より $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 濃度を求め、希釈倍率を掛けて培養液中の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 濃度を求めた。標準検体として亜硝酸ナトリウムを用いた。

②細胞外 NO 量の測定

腹腔マクロファージが産生し細胞外に放出する NO 量の測定には、NO と瞬時に反応して蛍光を発生する Diaminofluorescein-2 (DAF-2) (第一化学) を用いた。腹腔マクロファージを48穴プレート (2.4×10^5 個/well) (IWAKI) に播種し、24時間後に LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) を添加した。22時間反応させた後に、DAF-2 を細胞培養液中に添加した。DAF-2 は DAF-2 のアミノ基が NO と反応し、DAF-2 T に変化する。従って、DAF-2 添加の2時間後に蛍光プレートリーダー (フルオロスキャセント/大日本製薬) を用いて485nm の励起光を照射し、DAF-2 T の緑色蛍光 (波長538nm) を測定した。

(6) エタノールの添加

腹腔マクロファージの LPS 刺激による NO 産生能に及ぼすエタノールの影響を検討した。腹腔マクロファージの播種24時間後に、エタノール (Wako; 50(200)-500mM) を添加し、上記の方法で NO 産生を評価した。

また、エタノールが NO 産生に影響を与えるのではなく、産生された NO に直接作用して消去するか否かを、DAF-2 を用いて検討した。腹腔マクロファージを48穴プレート (2.4×10^5 個/well) に播種し、24時間後に LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) を添加した。22時間後に DAF-2 を細胞培養液中に添加した。DAF-2 添加の30分前にエタノール (50-500mM) を添加し、細胞外 NO 量を測定した。

(7) 統計処理

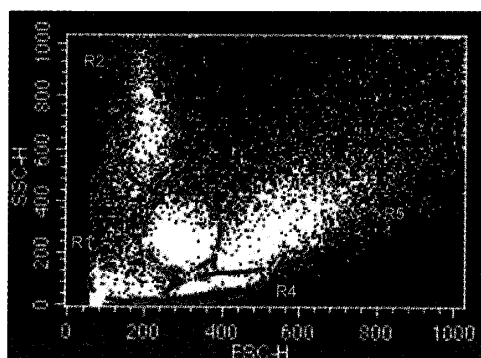
得られた結果は統計ソフト JMP (SAS) を用いて解析した。ANOVA を行なった後に Tukey の HSD 検定を行い、 p 値が0.05未満の場合に有意差ありと判定した。

4. 結果

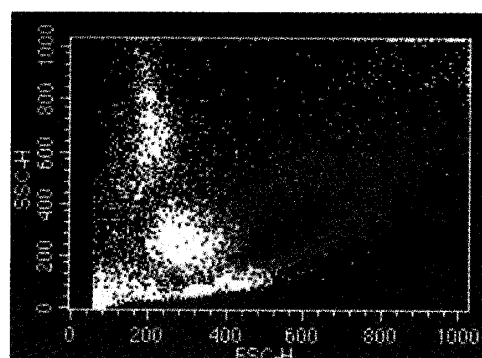
(8) 細胞の単離

チオグリコレート培地投与2日後の腹腔内滲出細胞をフローサイトメトリー (FCM) の forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) 二次元展開表示を用いて解析した。FSC は細胞の大

(A) チオグリコレート培地誘導型滲出性細胞



(B) DiI-AcLDL ポジティブ細胞集団 (赤)



(C) Ficoll 比重遠心法による腹腔マクロファージの分離

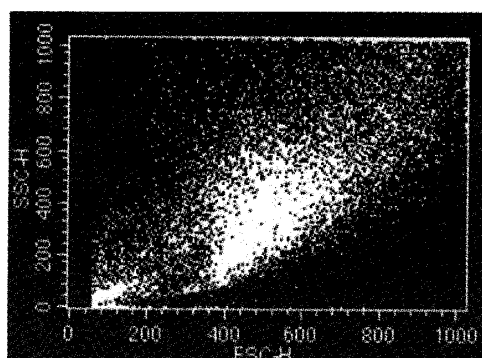


図1. チオグリコレート培地誘導型滲出性細胞におけるマクロファージ集団の同定と分離

FSC (横軸) は細胞の大きさ、SSC (縦軸) は細胞内密度を示す。

大きさ、SSC は細胞の核、顆粒などの細胞内部構造に関する情報を反映する。腹腔内滲出細胞は、図1 (A) に示すように、5群に分類された。マクロファージの細胞集団を同定するために、蛍光物質である1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) で標識した acetylated LDL (DiI-AcLDL) (BTI) を用いて観察した。その結果、5群の中、FSC、SSC とともに大きな一群のみが DiI-AcLDL を取り込んだことから、チオグリコレート培地誘導型腹腔マクロファージと考えられる (図1 (B))。

この腹腔内滲出細胞に Ficoll 比重遠心法を用い、腹腔マクロファージに相当する層を分離した。その結果、図1 (C) に示すように図1 (B) で DiI 陽性の群と同じ FSC、SSC を持つ細胞が得られた。腹腔マクロファージの純度は平均70%であった。

(9) $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度に及ぼすエタノールと性差の影響

①雌雄両性ラット由来のマクロファージを用いた検討

図2 (A) は雌雄両性ラット由来のマクロファージを用いて LPS 刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度に及ぼすエタノールの影響を検討した結果を示す。細胞を播種して24時間後に LPS ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)、エタノール (200-500mM) を添加した。24時間後に培養液中の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度を測定し、NO 産生能の指標とした。縦軸は雄性ラット由来、雌性ラット由来のマクロファージにおける LPS (—) の値をそれぞれの値から減じ、エタノール濃度 0 mM に対する相対値とし

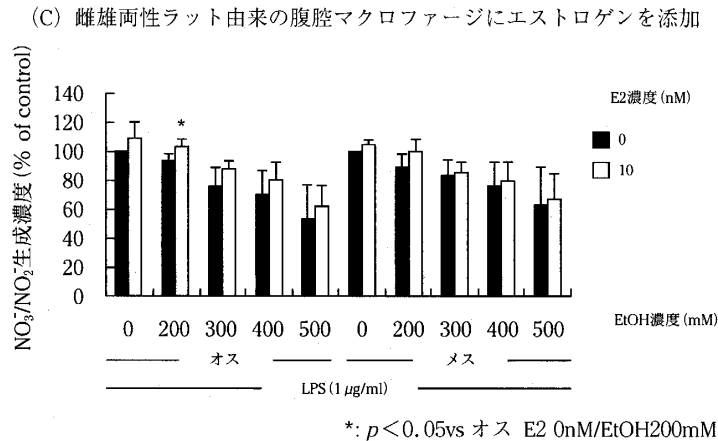
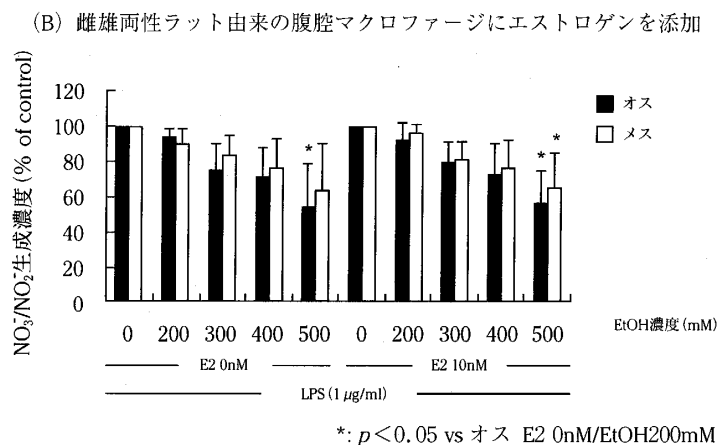
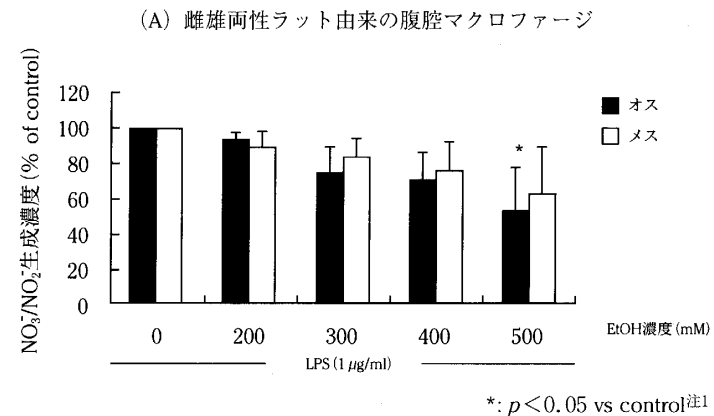
て求めた。雄性ラット由来のマクロファージでは、0-500mMのエタノール添加で、用量依存性にLPS刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の減少を認め、500mM添加では、エタノールを加えないコントロールと比較して有意に $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度が減少した ($p<0.05$)。一方、雌性ラット由来マクロファージでも、同様にエタノールの添加量に依存した $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の減少を認めたが、有意な差は認められなかった。雄性ラット由来のマクロファージと比較して雌性ラット由来のマクロファージの方がエタノールによる $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の減少が少ない傾向を示したが、どのエタノール濃度においても $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の割合に有意な性差を認めなかった。

②雌雄両性ラット由来のマクロファージへのエストロゲン添加の検討

図2 (B)、(C) は雌雄両性ラット由来のマクロファージにエストロゲンを添加し、LPS刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度に及ぼすエタノール、エストロゲンの影響を検討した結果を示す。細胞を播種して3時間後にエストロゲン (10nM) を添加し、24時間後にLPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、エタノール (200-500mM) を添加した。24時間後に培養液中の $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度を測定し、NO産生能の指標とした。

図2 (B) は、図2 (A) で認められたエタノールによる $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の抑制にエストロゲンが影響を及ぼすか否かを検討した結果を示す。縦軸はLPS (—) の条件下で雌雄両性ラット由来のマクロファージが各エストロゲン濃度で産生した $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 量をそれぞれの条件での値から減じ、各エストロゲン濃度のエタノール濃度0 mMに対する相対値として求めた。雄性ラット由来のマクロファージでは、図2 (A) で認めたエタノールの $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の抑制にエストロゲンは有意な影響を及ぼさなかった。一方、雌性ラット由来のマクロファージでは、エストロゲン添加によりエタノール濃度500mMで、エタノールを加えないコントロールと比較して有意に $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の減少が認められた ($p<0.05$)。

また、図2 (C) はエストロゲン添加によるLPSへの反応性の変化、及び $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度に及ぼすエタノールの影響を検討した結果を示す。縦軸はLPS (—) の条件下で雌雄両性ラット由来のマクロファージが各エストロゲン濃度で産生した $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 量をそれぞれの条件での値から減じ、エストロゲン濃度0 nM、エタノール濃度0 mMに対する相対値として求めた。雄性ラット由来のマクロファージではエタノール濃度に関わらず、エストロゲン添加によってLPS刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度の増加を認めた。その作用は特に低濃度のエタノールで顕著に認められ、エタノール濃度200mMでは、エストロゲン濃度0 nMと比較して有意に $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度が増加した ($p<0.05$)。一方、雌性ラット由来のマクロファージでも、同様にエストロゲン添加によりLPS刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度が増加する傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。



(注1: 雌雄性細胞それぞれの EtOH 濃度 0 mM をコントロールとし、同性内での有意差を示す)

図2. LPS 刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度に及ぼすエタノールと性差の影響

(10) 細胞外 NO 量に及ぼすエタノールと性差の影響

① 雌雄両性ラット由来のマクロファージを用いた検討

図3 (A) は雌雄両性ラット由来のマクロファージを用いて、LPS 刺激による細胞外 NO 量に及ぼすエタノールの影響を検討した結果を示す。細胞を播種して24時間後に LPS (1 µg/ml)、エタノール (50–500mM) を添加し、その後22–24時間内に培養液中に放出された NO 量を測定した。縦軸は雄性ラット由来、雌性ラット由来のマクロファージにおける LPS (–) の値をそれぞれの値から減じ、エタノール 0 mM に対する相対値として求めた。雄性ラット由来、雌

性ラット由来のマクロファージは、ともにエタノール添加で用量依存性に細胞外 NO 量が減少し、300mM 以上のエタノール濃度では、各性内でエタノールを加えないコントロールと比較して、有意に細胞外 NO 量が減少した ($p < 0.05$)。また、雌性ラット由来のマクロファージの方がエタノールによる細胞外 NO 量の減少が少なかったが、雄性ラット由来、雌性ラット由来のマクロファージの NO 産生能の間では、どのエタノール濃度においても細胞外 NO 量の割合に有意な差を認めなかった。

②雄性ラット由来のマクロファージへのエストロゲン添加の検討

雌雄両性ラット由来のマクロファージへのエストロゲン添加において LPS 刺激による NO_3^- / NO_2^- 生成濃度へのエタノールの影響に性差が認められなかったことから、図 3 (B)、(C) で

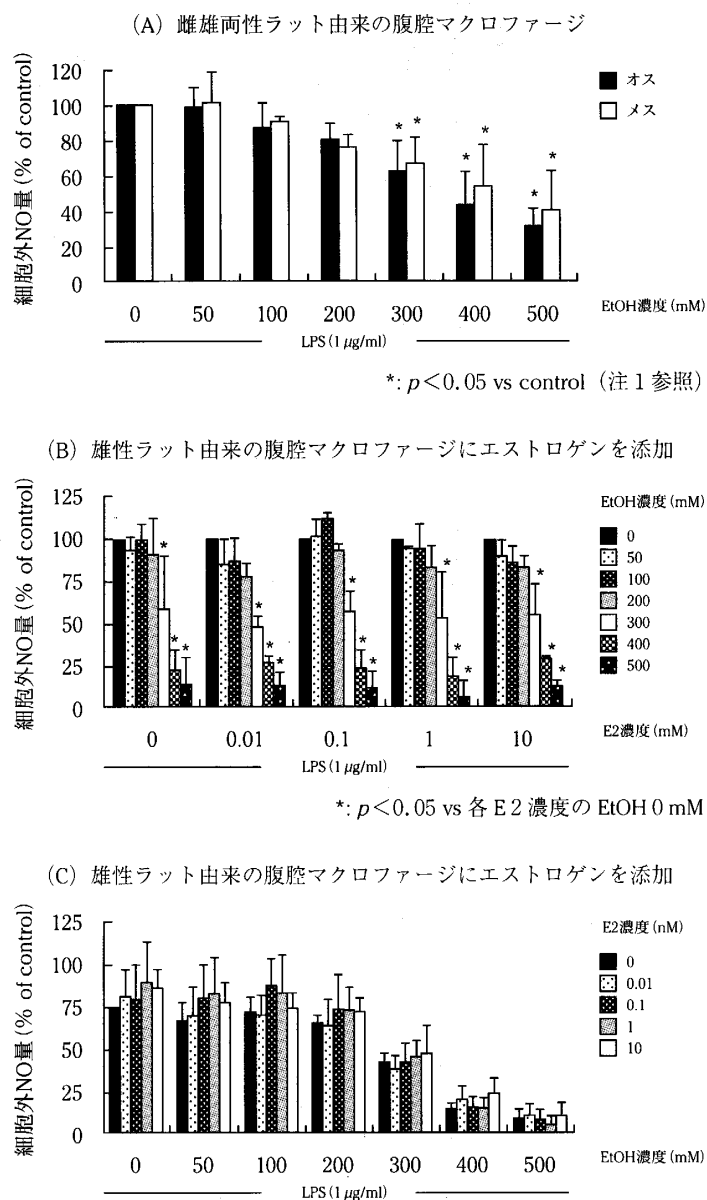


図 3. LPS 刺激による細胞外 NO 量に及ぼすエタノールと性差の影響

は雄性ラット由来のマクロファージにエストロゲンを添加し、LPS 刺激による細胞外 NO 量に及ぼすエタノール、エストロゲンの影響を検討した結果を示す。細胞を播種して3時間後にエストロゲン (0.01–10nM) を添加し、24時間後に LPS (1 μ g/ml)、エタノール (50–500mM) を添加した。NO₃⁻/NO₂⁻生成濃度の検討において播種3時間後のエストロゲン添加のみでは影響が認められなかったことから、播種24時間後にもエストロゲン (0.01–10nM) を添加した。その後22–24時間内に培養液中に放出された NO 量を測定した。

図3 (B) は、図3 (A) で認められたエタノールによる細胞外 NO 量の減少にエストロゲンが影響を及ぼすか否かを検討した結果を示す。縦軸は雄性ラット由来マクロファージの各エストロゲン濃度における LPS (–) の値をそれぞれの値から減じ、各エストロゲン濃度のエタノール濃度 0 mM に対する相対値として求めた。雄性ラット由来のマクロファージは、図3 (A) で示したようなエタノールによる細胞外 NO 量の減少に対し、どのエストロゲン濃度でも有意な影響は与えなかった。

また、図3 (C) はエストロゲン添加による LPS への反応性の変化、及び細胞外 NO 量に及ぼすエタノールの影響を検討した結果を示す。縦軸は雄性ラット由来マクロファージの各エストロゲン濃度における LPS (–) の値をそれぞれの値から減じ、エストロゲン 0 nM、エタノール 0 mM に対する相対値として求めた。雄性ラット由来のマクロファージは、エストロゲンの添加によって LPS による細胞外 NO 量が増加傾向を示し、またその作用はエタノール濃度が低いほど顕著に認められたが、有意な差は認められなかった。

(11) NO に対するエタノールの直接作用の検討

図4は腹腔マクロファージによって産生された NO が、エタノールによって消去されるか否かを検討した結果を示す。細胞を播種して24時間後に LPS (1 μ g/ml) を添加した。22時間後に DAF-2 を添加する30分前にエタノール (50–500mM) を添加した。縦軸は雄性ラット由来、雌性ラット由来のマクロファージにおける LPS (–) の値をそれぞれの値から減じ、エタノール 0 mM に対する相対値として求めた。雄性ラット由来、雌性ラット由来のマクロファージは、ともに 0–500mM のエタノール添加で用量依存性に細胞外 NO 量が減少される傾向を示したが、有意な差は認められなかった。

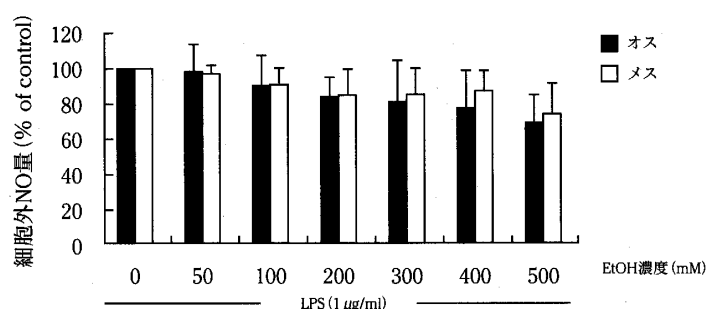


図4. NO に対するエタノールの直接作用の検討

5. 考察

ラットより腹腔マクロファージを単離して、LPS 刺激による NO 産生に及ぼすエタノール、性差の影響を検討した。性差の影響は雌雄両性ラット由来の腹腔マクロファージ、雌雄性ラット由来の腹腔マクロファージへのエストロゲン添加を用いて検討した。

前者の性差モデルにおいて、雄性ラット由来のマクロファージでは500mM のエタノール濃度で $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度を、300mM 以上のエタノール濃度で細胞外 NO 量を減少させた。また、雌性ラット由来のマクロファージでは、300mM 以上のエタノールは細胞外 NO 量を減少させた。しかしながら、雌性ラット由来の方が、雄性ラット由来のマクロファージに比べ、エタノールの LPS 刺激による NO 産生の抑制が少ないことが示されたが、有意な性差は認められなかった。

後者の性差モデルでは、雄性ラット由来マクロファージにおいて500mM のエタノール濃度はエストロゲン (10nM) 存在下で $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度を減少させた。また、300mM 以上のエタノール濃度はエストロゲン (0.01-10nM) 存在下で、細胞外 NO 量を減少させた。また、雌性ラット由来のマクロファージにおいて500mM のエタノール濃度はエストロゲン (10nM) 存在下で LPS 刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度を抑制した。しかしながら、エタノールの LPS 刺激による NO 産生能の抑制作用にエストロゲンは影響を及ぼさなかった。また、エストロゲン添加によって LPS 刺激による $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 生成濃度、細胞外 NO 量の亢進傾向が認められ、またその傾向はエタノール濃度が低いほど顕著であったが、有意な差は認められなかった。

(1) 使用したモデルの妥当性

性差の検討には雌性および雄性ラット由来の腹腔マクロファージと、雄性ラット由来の腹腔マクロファージ（一部の実験では雌性マクロファージも用いた）への 17β -エストラジオール添加モデルを用いた。前者のモデルでは性的二型性による性差の影響、後者のモデルでは生物学的性差の原因となる性ホルモン、特に女性ホルモンであるエストロゲンの影響を検討した。生体内のエストラジオール濃度は、女性の基準値では70-220pmol/L、女性の排卵期では>740 pmol/L、男性では<180pmol/L²³⁾であるため、本研究では、10pM-10nM のエストロゲン濃度を用いた。

また、エタノール濃度に関しては、英国において救急病院に搬送された飲酒患者の平均血中エタノール濃度が36mM であったとの報告がある²⁴⁾。本研究において LPS 誘導型 NO 産生能に影響を及ぼしたエタノール濃度は、300mM 以上であった。これは、中枢神経細胞とマクロファージとの間でアルコールへの感受性が異なることを反映していると考えられる。培養細胞系での研究の限界ではあるが、高濃度・短期間のエタノール曝露で、低濃度・長期間のアルコール障害の影響を検討したことになる。

(2) エタノールによる LPS 誘導型 NO 産生能抑制作用のメカニズム

LPS はグラム陰性細菌の細胞壁外膜を構成する糖脂質で、エンドトキシン的一种である。LPS は、単球、マクロファージ、リンパ球、好中球、樹状細胞などの免疫細胞以外に、血管内皮細胞や線維芽細胞などの非免疫細胞も活性化する。マクロファージの細胞膜表面には LPS に対する受容体 (CD14/Toll like receptor, CD11/CD18複合体、C3 受容体など) が存在する²⁵⁾。LPS がこれらの受容体に結合すると、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードなどのシグナル伝達系を活性化し、最終的に iNOSmRNA 転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B)などを活性化する。iNOS の発現では、主に NF- κ B が核内に移行して iNOSDNA の転写調節領域に結合する。転写された iNOSmRNA は iNOS へと翻訳され、iNOS は NO を L-アルギニンと酸素を基質とし、L-シトルリンとともに産生する。産生された NO は細胞外に放出され、酸化を受けて NO₂⁻や NO₃⁻に代謝される。本研究においても、LPS 刺激によって腹腔マクロファージの NO₃⁻/NO₂⁻生成濃度、細胞外 NO 量の亢進が認められた。

本研究でも示されたように、エタノールは LPS 刺激による NO₃⁻/NO₂⁻生成濃度、細胞外 NO 量を減少させた。また、エタノールは直接的な NO 消去作用を示さず、iNOS 蛋白の発現量を抑制したことから、iNOS 蛋白発現の誘導より上流のシグナル伝達系にエタノールが作用している可能性が示唆される。実際、RAW264.7細胞における急性エタノール投与(0.5-24h)が LPS 誘導型 MAPK ファミリーである p38のリン酸化や STAT1 のリン酸化の抑制を介して iNOS 蛋白発現を抑制したとの報告や²⁶⁾、ラット肺泡マクロファージにおいては LPS 誘導型 p38のリン酸化、同様に MAPK ファミリーである extracellular signal-related kinase1/2 (ERK1/2) のリン酸化を抑制したとの報告もある²⁷⁾。

In vivo での急性エタノール投与 (2 h) においてもラットの肺泡マクロファージにおける LPS 誘導型 NF- κ B の核への移行の抑制を介して iNOSmRNA、iNOS 蛋白の発現を抑制したとの報告や²⁸⁾、in vivo での急性エタノール投与 (2.5h) ではラット肺泡マクロファージにおいて、p38ではなく ERK1/2のリン酸化を抑制することにより、iNOS 蛋白の発現を抑制したとの報告もある²⁹⁾。In vivo での慢性エタノール投与 (4 weeks) は、ラット Kupffer 細胞 (肝マクロファージ) の LPS 誘導型 NF- κ B 活性化経路に影響を及ぼして iNOSmRNA の発現の抑制を示したが、ラット脾マクロファージにおいては影響が認められなかった³⁰⁾。従って、本研究で認められた急性エタノール投与による LPS 誘導型 NO 産生 (NO₃⁻/NO₂⁻生成濃度、細胞外 NO 量) の抑制は、LPS 誘導型シグナル伝達系にエタノールが作用したことを反映していることが示唆される。

(3) LPS 誘導型 NO 産生能における性差

本研究では LPS 刺激による NO 産生 (NO₃⁻/NO₂⁻生成量、細胞外 NO 量) に有意な性差は認められなかった。この結果は J774A.1細胞における LPS 誘導型 NO₃⁻/NO₂⁻産生量にエストロゲンは影響を与えなかったという報告に一致する³¹⁾。

しかしながら、RAW264.7細胞においてエストロゲンやエストロゲンと類似したエストロゲ

ン骨格構造をもつイソフラボン（ゲニステイン、ダイゼイン）が iNOS mRNA の発現量には有意な影響を与えず、ER α 受容体を介して LPS 誘導型 NO $_2^-$ 生成量、iNOS 蛋白発現量を増加させたとの報告もある³²⁾。また、エストロゲンによって Kupffer 細胞の LPS への感受性 (iNOS mRNA の発現、iNOS 蛋白の発現、NO $_2^-$ 生成量、細胞内 Ca $_2^+$ 濃度) が亢進したとの報告もある³³⁾。従って、エストロゲンが iNOS 活性、発現過程に影響を及ぼす可能性も示唆される。

また、エストロゲンは J774A.2 (マウスマクロファージの cell line) における LPS、インターフェロン- γ (IFN- γ) 誘導型 NO $_3^-$ /NO $_2^-$ 産生量、iNOS 蛋白の発現を低下させ、iNOS 活性に影響を与えなかったとの報告や³⁴⁾、RAW264.7 細胞において、エストロゲンは NO 産生を抑制したとの報告³⁵⁾、エクオール (大豆の腸での代謝産物) はエストロゲンレセプターを介し LPS 誘導型 NF- κ B の活性化を抑制したとの報告もある³⁶⁾。このようにエストロゲンの LPS 誘導型 NO 産生への影響は細胞種や実験条件などにより異なっている。

更に、エストロゲンには炎症や虚血性の損傷から脳を保護する作用が知られている。中大脳動脈を閉塞させた C57Bl/6 マウスにおいて、雌性マウスの方が雄性マウスよりも 53% 梗塞レベルが小さかったが、雌性マウスの卵巣切除によってこの梗塞レベルが上昇し、さらにこの卵巣切除マウスにエストロゲンの補充処置を行うと正常な雌性マウスと同様の結果が得られたとの報告がある。また、虚血後の iNOS mRNA レベルにおいてもこれと同様の結果が得られている。雄性マウスにおける iNOS 抑制剤の投与や雄性 iNOS-null マウスにおいて、梗塞レベルが減少したが、同様の処置を行った雌性マウスにおいては変化がなかったとの報告³⁷⁾ もあることから、エストロゲンには iNOS の転写を抑制する作用がある可能性も示唆される。

本研究ではラット由来腹腔マクロファージの LPS 誘導型 NO 産生 (NO $_3^-$ /NO $_2^-$ 生成濃度、細胞外 NO 量) が雄性、雌性によって差がある傾向が認められたが、有意ではなかった。従って、今後卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン投与、また、閉経ラットにおけるエストロゲン投与などの in vivo の性差モデルを作成し、更なる検討を行う必要性が考えられる。

本研究においてラット由来の腹腔マクロファージにおけるエタノールの NO 産生抑制に性差は有意な影響を及ぼさなかった。しかしながら、エタノールは雌性ラットの血管組織において、エストロゲンによる iNOS の誘導や活性化を介して低血圧を引き起こすとの報告もあり³⁸⁾、iNOS 蛋白の発現を指標とした更なる検討が必要である。

アルコールは NO 産生能を抑制することにより、内皮細胞障害、プラークの不安定化の抑制を介して、動脈硬化の後期病変の進展を抑制する可能性が考えられる。またこれらのアルコールの作用機序として、NO 産生を誘導する細胞内シグナル伝達系に作用している可能性も示唆される。しかしながら、これらのアルコールによる動脈硬化への作用における性差は、今回の培養細胞モデルでは明らかにすることが出来なかった。

参考文献

- 1) 星野 洋一、永井 良三. 高血圧性血管障害の細胞分子機構. 動脈硬化診療の新展開 2000; 91-7.
- 2) Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(3): 646-55.
- 3) Depre C, Havaux X, Renkin J, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res.* 1999; 41(2): 465-72.
- 4) Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 1996; 27(8): 1373-80.
- 5) Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S, et al. Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2000; 102(9): 1033-8.
- 6) Gunnnett CA, Lund DD, Howard MA 3rd, et al. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase impairs relaxation in human and rabbit cerebral arteries. *Stroke.* 2002; 33(9): 2292-6.
- 7) Luoma JS, Yla-Herttuala S. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages and smooth muscle cells in various types of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch.* 1999; 434(6): 561-8.
- 8) Trachtman H, Futterweit S, Singhal P. Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 207(1): 120-5.
- 9) 大内 尉義. 循環器病における性差. 日循予防誌 2002; 37(1): 31-41.
- 10) Losordo DW, Kearney M, Kim EA, et al. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation.* 1994; 89(4): 1501-10.
- 11) Linder V, Kim SK, Karas RH, et al. Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res.* 1998; 83(2): 224-9.
- 12) Iso H, Kitamura A, Shimamoto T, et al. Alcohol intake and the risk of cardiovascular disease in middle-aged Japanese men. *Stroke.* 1995; 26(5): 767-73.
- 13) Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, et al. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2003; 289(5): 579-88.
- 14) Kiyohara Y, Kato I, Iwamoto H, et al. The impact of alcohol and hypertension on stroke incidence in a general Japanese population. The Hisayama Study. *Stroke.* 1995; 26(3): 368-72.
- 15) 大森 正英. 女性と飲酒. *Health Sciences* 1997; 13(3): 138-43.
- 16) 渡辺 哲. アルコールと疫学. 治療 2005; 87(8): 2285-90.
- 17) 堀江 義則、石井 裕正、日比 紀文. わが国のアルコール性肝障害の現状についての検討. *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence* 2004; 39(6): 505-10.
- 18) 竹井 謙之、榎本 信行、池嶋 健一ら. アルコール性肝障害における性差. 治療 2005; 87(8): 2389-93.
- 19) Hugues JN, Coste T, Perret G, et al. Hypothalamo-pituitary ovarian function in thirty-one women with chronic alcoholism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1980; 12(6): 543-51.
- 20) Sarkola T, Makisalo H, Fukunaga T, et al. Acute effect of alcohol on estradiol, estrone, progesterone, prolactin, cortisol, and luteinizing hormone in premenopausal women. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; 23(6): 976-82.
- 21) Coutelle C, Hohn B, Benesova M, et al. Risk factors in alcohol associated breast cancer: alcohol dehydrogenase polymorphism and estrogens. *Int J Oncol.* 2004; 25(4): 1127-32.
- 22) Dorgan JF, Baer DJ, Albert PS, et al. Serum hormones and the alcohol-breast cancer association in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(9): 710-5.
- 23) Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al. *Williams textbook of endocrinology* 10th ed. Philadelphia, Elsevier Science. 2003.

- 24) Holt S, Stewart IC, Dixon JM, et al. Alcohol and the emergency service patient. *Br Med J*. 1980; 281 (6241): 638-40.
- 25) 高橋 潔、内藤 眞、竹屋 元祐. 生命を支える マクロファージ 2001
- 26) Wakabayashi I, Negoro M. Mechanism of inhibitory action of ethanol on inducible nitric oxide synthesis in macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002; 366(4): 299-306.
- 27) Kato H, Negoro M, Wakabayashi I. Inhibitory action of ethanol on cyclooxygenase-2 expression through suppression of the extracellular signal-related kinase-mediated pathway in rat alveolar macrophages. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004; 95(5): 226-33.
- 28) Greenberg SS, Ouyang J, Zhao X, et al. Interaction of ethanol with inducible nitric oxide synthase messenger RNA and protein: direct effects on autacoids and endotoxin in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 282(2): 1044-54.
- 29) Kato H, Negoro M, Wakabayashi I. Effects of acute ethanol administration on LPS-induced expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in rat alveolar macrophages. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29 (12Suppl): 285S-93S.
- 30) 高石 雅章、西田 次郎、水野 嘉夫ら. 慢性エタノール投与ラット由来 Kupffer 細胞における NO 生産障害 脾マクロファージとの比較検討. *アルコールと医学生物学* 1997;: 151-4.
- 31) Woodfork KA, Schuller KC, Huffman LJ. Cytokine and nitric oxide release by J774A. 1 macrophages is not regulated by estradiol. *Life Sci*. 2001; 69(19): 2287-94.
- 32) Nakaya M, Tachibana H, Yamada K. Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2005; 71 (1-2): 108-14.
- 33) Ikejima K, Enomoto N, Iimuro Y, et al. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol*. 1998; 274 (4 Pt 1): G669-76.
- 34) Hayashi T, Yamada K, Esaki T, et al. Physiological concentrations of 17 beta-estradiol inhibit the synthesis of nitric oxide synthase in macrophages via a receptor-mediated system. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998; 31(2): 292-8.
- 35) Tomaszewska A, Guevara I, Wilczok T, et al. 17 beta-estradiol-and lipopolysaccharide-induced changes in nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha and vascular endothelial growth factor release from RAW 264.7 macrophages. *Gynecol Obstet Invest*. 2003; 56(3): 152-9.
- 36) Kang JS, Yoon YD, Han MH, et al. Estrogen receptor-independent inhibition of tumor necrosis factor-alpha gene expression by phytoestrogen equol is mediated by blocking nuclear factor-kappaB activation in mouse macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2005; 71 (1-2): 136-43.
- 37) Park EM, Cho S, Frys KA, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26(3): 392-401.
- 38) El-Mas MM, Zhang J, Abdel-Rahman AA. Upregulation of vascular inducible nitric oxide synthase mediates the hypotensive effect of ethanol in conscious female rats. *J Appl Physiol*. 2006; 100(3): 1011-8.

(原稿受理 2006年4月3日)