

平成二十七年年度 博士論文

酸化ストレス動物モデルの確立と
カカオポリフェノールの生体内抗酸化作用

東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻

天然物生物機能科学講座 機能分子解析学分野

鈴木 晃一郎

指導教員 宮澤 陽夫 教授

目次

序論	3
第一章	
アルコール性脂肪肝の酸化ストレス評価と カカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明	9
第二章	
非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス肝臓の 酸化ストレス評価	30
第三章	
四塩化炭素が肝臓と腎臓に及ぼす酸化ストレス評価と カカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明	42
総括	57
引用文献	59
謝辞	66

序論

食の欧米化、ストレスの多い社会環境または高齢化により、生体内で活性酸素が過剰に産生され、生活習慣病の様な疾患を引き起こすことが示唆されている。これに伴い、身体の成分の酸化抑制効果すなわち生体内抗酸化作用を持つ食品成分の関心が高まっている。

食品成分の生体内抗酸化作用の検証実験では、生体内の酸化ストレスを誘発させた実験動物に食品成分を給与し、酸化ストレスが低減したことを確認する手法が用いられる。Hermans らは実験動物に酸化ストレスを誘発する方法を3つに分類した (Table 0-1) [1]。1つ目は抗酸化物質欠損食や、酸化ストレスを発生する食品成分を含む食餌を投与する方法。これはビタミンE 欠乏飼料[2]や、アルコール含有飼料[3]を用いた実験系が挙げられる。2つ目は遺伝子改変や薬剤投与によって酸化ストレスを伴う疾患を誘発させる方法。これは心筋症[4]や、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) [5]を誘発する実験系が挙げられる。最後は活性酸素を発生する毒性物質を投与する方法であり、パラコート[6]や四塩化炭素 (CCl₄) [7]を用いた実験系が挙げられる。実験動物の生体内酸化ストレスは、過酸化脂質から生成するマロンジアルデヒド (MDA) とチオバルビツール酸 (TBA) が反応して生成する赤色縮合体のチオバルビツール酸反応物質 (thiobarbituric acid reactive substance : TBARS) を比色法で定量した報告が多い。しかし TBA は MDA 以外の物質とも反応することや、サンプル調製や発色の加熱工程で MDA が増加する可能性が指摘されているため[8]、生体内の酸化ストレスを正しく評価していない場合がある。

私たちの研究室では細胞膜の主要構成リン脂質 (ホスファチジルコリン) の酸化一次生成物である過酸化リン脂質 (PLOOH) (Fig. 0-1) を高選択的に測定できる化学発光検出 HPLC (CL-HPLC) 法を開発した (Fig. 0-2) [9]。この分析法の特徴は、それぞれの脂質クラス中のヒドロペルオキシド基を、ポストカラムで発光試薬と反応させて検出する点にあり、従来困難であったヒト血液や組織の過酸化脂質の定量を世界ではじめて実現した。酸化ストレスを負荷させた実

験動物の生体内過酸化脂質を CL-HPLC 法で定量することで、食品成分の生体内抗酸化作用も正しく評価できると考えられる。

カカオはチョコレートやココアの原料として世界中で広く食されている。またポリフェノール含量が豊富な農作物として知られ (Table 0-2) [10][11]、生体内抗酸化作用が期待されている。しかし既存研究では十分な科学的根拠が得られていない。例えば、Serafini らはカカオポリフェノールの含有率を高めたチョコレートを摂取したヒト血液の抗酸化力が有意に増加したことを報告したが [12]、抗酸化力の指標とした測定方法 (FRAP 法) は ferric-tripyridyltriazine の還元力を評価しており、生体内の酸化ストレスを直接的に評価したとはいえない。また Baba らはカカオポリフェノールの含有率を高めたココアを 12 週間摂取したヒト血液中の LDL の抗酸化力が有意に増加したことを報告したが [13]、生体内に存在しない 2, 2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 由来のラジカルの消去能を抗酸化力とみなしており、生体内の酸化ストレスを直接的に評価したとはいえない。

本研究は、酸化ストレスを誘発させた実験動物の過酸化脂質を CL-HPLC 法で定量し、酸化ストレス動物モデルの確立を目指した。酸化ストレスの誘発方法は過去の検証報告例が比較的多かった、アルコール含有液体飼料投与方法、streptozotocin (STZ) 投与による NASH 誘発法及び CCl₄ 腹腔内投与方法を選択した。アルコール含有液体飼料投与方法と CCl₄ 腹腔内投与方法の予備実験時に PLOOH の有意な増加が確認できた為、本実験でカカオポリフェノールを多く含むカカオ抽出物 (CPE) を給与し、CPE の生体内抗酸化作用を明らかにした。

Table 0-1. Principles and Strategies to induce oxidative stress in experimental animals

Principle	Strategy	Reference
dietary induction caused by nutritional imbalance due to either an antioxidant deficient diet or a pro-oxidant overload diet	vitamin E deficient diet	2
	alcohol-containing liquid diet	3
induction of diseases related to oxidative stress	dilated cardiomyopathy induced by genetic manipulation	4
	nonalcoholic steatohepatitis induced by streptozotocin	5
exposure to a free radical generating compound	paraquat	6
	carbon tetrachloride	7

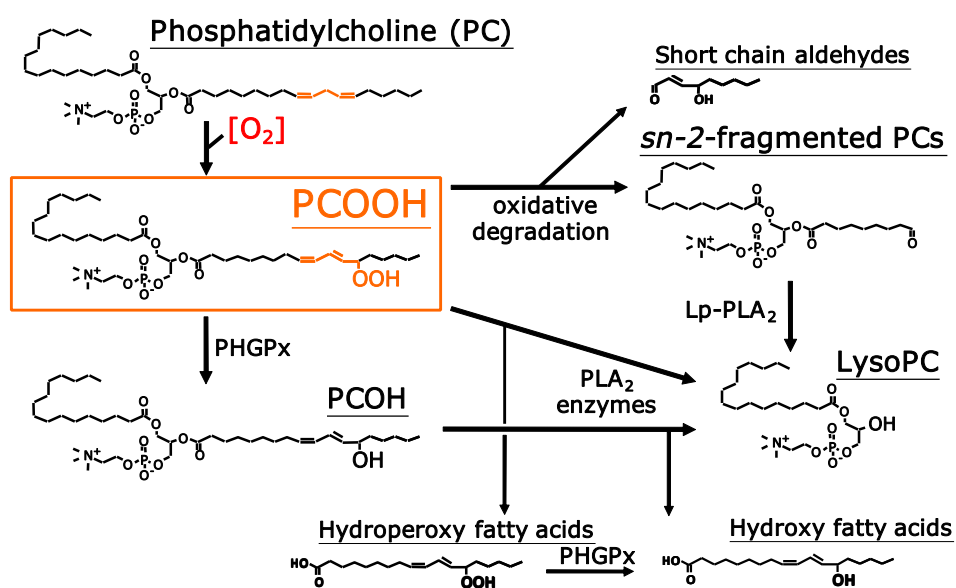


Fig. 0-1 Representative chemical structures of oxidized phospholipids formed during oxidation of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PCOOH) *in vivo*

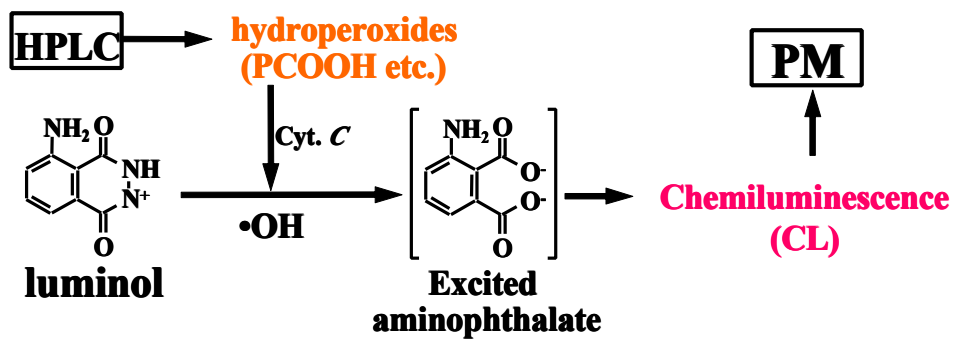


Fig. 0-2 Chemiluminescence reaction of lipid hydroperoxide with cytochrome *C* and luminol, which is incorporated into the CL-HPLC

Table 0-2. Polyphenol content per serving of cacao-based products (dark chocolate, milk chocolate and cocoa powder), green tea and red wine

Foods or beverage	Serving size	Polyphenol content per serving (mg)
Dark chocolate	40g	340-600
Milk chocolate	40g	200-480
Cocoa powder	40g	320-1000
Green tea	180ml	150-200
Red wine	100ml	200-800

SOURCE: Manach 2004[10] and Wollgast 2000[11]

第1章 アルコール性脂肪肝の酸化ストレス評価とカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明

緒言

発酵食品の代表として古代から親しまれてきたアルコールを摂取すると、肝臓に中性脂肪が蓄積したアルコール性脂肪肝が形成される。その発症メカニズムとして、アルコールによって肝臓細胞中のエネルギーセンサーを担う AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) が低下して同化を促進するよう代謝が誘導され、脂肪酸の合成促進と脂肪酸の燃焼抑制が起こり、肝臓に脂肪が蓄積することが知られている (Fig. 1-1) [14]。

アルコール性脂肪肝の状態ではアルコールを摂取し続けると、肝線維症や肝硬変といったより深刻な病態に進行することが報告されている [15]。また疫学調査や動物実験において、症状の進行に伴い肝臓中に過酸化脂質が蓄積することが明らかになってきたため (Fig. 1-2) [16][17]、脂質過酸化はアルコール性肝障害の進行に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしアルコール性脂肪肝における脂質過酸化の進行度についてはよくわかっていない。Song らはアルコール含有液体飼料を投与したラット脂肪肝の TBARS 量が有意に増加したことを報告した [18]。一方相反する研究結果として Coudray らはアルコールを長期投与したラット肝臓で TBARS 量と抗酸化酵素活性に変化が見られなかったことを報告している [19]。比色法による TBARS 測定は非特異的な検出が問題点として指摘されており、上記報告が相反した理由の一つとして考えられた。

アルコール性肝障害の研究では、5%のアルコールを含む液体飼料をラットへ与えると比較的簡便に脂肪肝が現れることから、この実験系が疾病の解析や予防成分の研究にしばしば用いられている [20]。そこで本実験ではアルコール含有液体飼料をラットへ投与し、肝臓の脂質成分や PL00H の変動からアルコール性脂肪肝と酸化ストレスの関わりを明らかにし、本実験系が酸化ストレスモデルとして適しているか評価した。またカカオポリフェノールを多く含むカカオ抽出物 (CPE) をアルコールとともに給与し、CPE のアルコール性脂肪肝への抗酸

化作用を明らかにした。

1-1 目的

ラットへアルコール含有液体飼料を投与し、アルコール性脂肪肝モデルを作成し、肝臓中の酸化ストレスを評価した。アルコール性脂肪肝の形成は、特徴的な症状である中性脂肪(TG)の蓄積とレチノールの減衰で評価した。肝臓中の抗酸化物質 α -トコフェロール量と過酸化脂質 PLOOH の増減からアルコール性脂肪肝における酸化ストレスの関わりを明らかにした。またカカオからアセトン抽出した、カカオポリフェノールを 60.5%含むアセトンパウダー (CPE) をアルコールとともに給与し、アルコール性脂肪肝への抗酸化作用を評価した。

1-2 実験方法

1-2-1 試薬成分

CPE は Barry Callebaut Belgium NV (Lebbeke, Belgium) より入手した。ポリフェノール濃度はフォーリンチオカルト法によりエピカテキン換算濃度で算出した[21]。プロシアニジン は Kelm らの方法で測定した[22]。CPE のポリフェノール組成は 60.5%、エピカテキンとその重合体のプロシアニジンが 53.1%、他フェノール化合物が 7.4%であった(wt/wt)。その他組成は糖質が 12%、蛋白質が 9.5%、アルカロイドが 8.0%、食物繊維が 5.5%、灰分が 3.0%、脂質が 1.0%であった(wt/wt) (**Fig. 1-3**)。その他の試薬に関しては可能な限り最上級のものを用いた。

1-2-2 実験動物および飼育法

6 週齢の Wistar/Std 系の雄ラット 40 匹を用いた (日本エス・エル・シー(株))。昼夜 12 時間ずつの明暗サイクル (明期 07:00-19:00) の動物室 (温度 23 \pm 3 $^{\circ}$ C, 湿度 55 \pm 10 %RH) で個別飼育した。実験開始前に液体飼料の馴化期間を 7 日間設け、その後コントロール群、コントロール+CPE 群、アルコール群及びアルコ

ール+CPE 群の各群 10 匹で群分けし、摂取エネルギーを揃えたペアフィーディングで飼育した。アルコール群とアルコール+CPE 群は、糖質の一部をアルコールに置換したアルコール含有液体飼料を与えた。アルコール濃度は投与 3 日目までは 3% (v/v)、4 日目から 6 日目までは 4%、以降は 5% に調製し投与した。CPE は液体飼料に 1.4g/L 溶解させ給与した。液体飼料投与 4 週後各群 3 匹を 16 時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で肝臓を摘出し生理食塩水で灌流した。投与 8 週後、各群 7 匹の肝臓を同様に摘出した。摘出した肝臓は -80°C に保存し、その後の分析用試料とした。この研究に関する動物実験は、三協ラボサービス株式会社の動物実験委員会の動物実験指針に則り、許可されてから行われた。

1-2-3 液体試料の組成と調整方法

液体試料は 1989 年に改善された Lieber-DeCarli formula を基本とした[20]、オリエンタル酵母工業株式会社製の F2LCW (コントロール群) 及び F2LEW (アルコール群) を用いた(**Table 1-1**)。試料調製方法は以下のとおり。

・コントロール群の試料調製方法

1. 恒温槽に水を張り 45°C に設定し温めておく。
2. 脱イオン水を 778g 秤量し保存瓶 (1L 用) に移し 40°C ~ 50°C で加温する。
(恒温槽は 45°C に設定)
3. 飼料粉末 F2LCW222g を秤量しおおまかに 4 等分する。
4. ミキサーボールに飼料粉末を約 1/4 入れ温まった脱イオン水を約 1/5 流し入れ、蓋をし 1 分攪拌する。
5. 1 分後攪拌用容器に移す。
6. 4)・5) を 4 回行う。
7. ミキサーボールの内側に付着した飼料をシリコンベラにて落とし最後の 1/5 の脱イオン水を攪拌し攪拌用容器に移す。
8. 攪拌用容器に移した液体飼料をもう一つの攪拌用容器に移し、交互に移し混和させる。

9. 保存瓶（2L用）に移し泡が無くなるまで冷蔵にて静置させておく。

・アルコール群の試料調製方法

1. 恒温槽に水を張り 45℃に設定し温めておく。
2. 脱イオン水を 818g 秤量し保存瓶（1L用）に移し 40℃～50℃で加温する。
（恒温槽は 45℃に設定）
3. WAKO 特級エタノールをビーカー（100ml用）に 50g 秤量する。
4. 飼料粉末 F2LEW132g を秤量しおおまかに 4 等分する。
5. ミキサーボールに飼料粉末を約 1/4 入れ温まった脱イオン水を約 1/5 流し入れ、蓋をし 1 分攪拌する。
6. 1 分後攪拌用容器に移す。
7. 5)・6) を 4 回行う。
8. ミキサーボールの内側に付着した飼料をシリコンベラにて落とし WAKO 特級エタノール全量と最後の 1/5 の脱イオン水を攪拌し攪拌用容器に移す。
9. 攪拌用容器に移した液体飼料をもう一つの攪拌用容器に移し、交互に移し混和させる。
10. 保存瓶（2L用）に移し泡が無くなるまで冷蔵にて静置させておく。

※3%エタノール添加 F2LEW を作成するには上記の F2LCW と 5%エタノール添加 F2LEW を 2 : 3 の割合で混和させる。

※4%エタノール添加 F2LEW を作成するには上記の F2LCW と 5%エタノール添加 F2LEW を 1 : 4 の割合で混和させる。

・コントロール+CPE 群の試料調製方法

1. 恒温槽に水を張り 45℃に設定し温めておく。
2. 脱イオン水を 771g 秤量し保存瓶（1L用）に移し 40℃～50℃で加温する。
（恒温槽は 45℃に設定）
3. 飼料粉末 F2LCW222g を秤量しおおまかに 4 等分する。

4. CPE 7g を秤量しおおまかに 4 等分する。
5. ミキサーボールに飼料粉末を約 1/4 入れ温まった脱イオン水を約 1/5 流し入れ、蓋をし 1 分攪拌する。
6. CPE を約 1/4 入れ蓋をし 1 分攪拌する。
7. 1 分後攪拌用容器に移す。
8. 4)・5) を 4 回行う。
9. ミキサーボールの内側に付着した飼料をシリコンベラにて落とし最後の 1/5 の脱イオン水を攪拌し攪拌用容器に移す。
10. 攪拌用容器に移した液体飼料をもう一つの攪拌用容器に移し、交互に移し混和させる。
11. 保存瓶 (2L 用) に移し泡が無くなるまで冷蔵にて静置させておく。

・アルコール+CPE 群の試料調製方法

1. 恒温槽に水を張り 45°C に設定し温めておく。
2. 脱イオン水を 811g 秤量し保存瓶 (1L 用) に移し 40°C~50°C で加温する。
(恒温槽は 45°C に設定)
3. WAKO 特級エタノールをビーカー (100ml 用) に 50g 秤量する。
4. 飼料粉末 F2LEW132g を秤量しおおまかに 4 等分する。
5. CPE 7g を秤量しおおまかに 4 等分する。
6. ミキサーボールに飼料粉末を約 1/4 入れ温まった脱イオン水を約 1/5 流し入れ、蓋をし 1 分攪拌する。
7. CPE を約 1/4 入れ蓋をし 1 分攪拌する。
8. 1 分後攪拌用容器に移す。
9. 5)・6) を 4 回行う。
10. ミキサーボールの内側に付着した飼料をシリコンベラにて落とし WAKO 特級エタノール全量と最後の 1/5 の脱イオン水を攪拌し攪拌用容器に移す。
11. 攪拌用容器に移した液体飼料をもう一つの攪拌用容器に移し、交互に移

し混和させる。

12. 保存瓶（2L用）に移し泡が無くなるまで冷蔵にて静置させておく。

※CPE入り3%エタノール添加F2LEWを作成するには上記のCPE入りF2LCWとCPE入り5%エタノール添加F2LEWを2：3の割合で混和させる。

※CPE入り4%エタノール添加F2LEWを作成するには上記のCPE入りF2LCWとCPE入り5%エタノール添加F2LEWを1：4の割合で混和させる。

1-2-4 肝臓成分の測定方法

・肝臓ホモジネート作成

組織を氷上で解凍し、4倍量重量の0.9%NaCl、1mM EDTA水溶液を加えた。ビーズ式細胞破碎装置（TOMY MicroSmash）で冷却下懸濁し、20%ホモジネート液を作成した。

・肝臓総脂質の抽出

Folch法を基本としたクロロホルム/メタノール混液（2：1）による抽出を行った。

1. 20%ホモジネート液500 μ lに0.002%（w/v）のブチルヒドロキシトルエン（BHT）を含むクロロホルム/メタノール混液（2：1）2.5mlを加え5分間振とう抽出し、遠心分離後（1000g, 10分, 4 $^{\circ}$ C）下層を分取した。

2. 上層にクロロホルム/メタノール混液（10：1）1.8mlを加え抽出を繰り返した。すべての下層分取液を集め、クロロホルム：メタノール：水混液（3：48：47）2.4mlを加え、攪拌して遠心分離した後-30 $^{\circ}$ Cで1時間保管した。

3. 遠心分離後上清を捨て、窒素乾固後クロロホルム/メタノール混液（2：1）100 μ lに溶解した。

・肝臓のTGの測定

Folch法で抽出した総脂質を窒素乾固後2-プロパノールに再溶解し、和

光純薬工業製トリグリセライドE-テストワコーで測定した。

・肝臓のレチノールの測定

20%ホモジネート 500 μ l を 10ml の褐色試験管に入れ、0.9%NaCl、1 mM EDTA を 500 μ l 加えた。6 %ピロガロール/エタノール溶液を 0.2ml 加え攪拌し、更に 60% KOH を 0.2ml 加え 70°C で 30 分加熱した。ヘキサン/酢酸エチル (9 : 1) を 4ml 加え 5 分間攪拌し、遠心分離後上清を抽出した。この抽出を 3 回繰り返した。窒素乾固し、メタノールに再溶解させ HPLC で定量した。HPLC は Schäffer らの方法に準じ、以下の条件で行った[23]。

・ LC 構成

ポンプ : PU-2080 Plus (Jasco 社製)

カラムオーブン : CO-2065 Plus (Jasco 社製)

検出器 : MD-2018 (Jasco 社製)

インテグレータ : SmartChrom (KYA TECH Corporation 社製)

・ LC 条件

カラム : nacalaitesque COSMOSIL 5C18-Ar II (4.6 \times 250mm)

移動相 : A アセトニトリル/水/酢酸=90/10/2

B アセトニトリル/メタノール=90/10

C テトラヒドロフラン=100

0-4.5min 100% A

4.5-6.5 100% A \rightarrow 100% B

6.5-12 100% B \rightarrow 60%B、40%C

12-15 60%B、40%C

15-20 60%B、40%C \rightarrow 100% B

20-26 100% B \rightarrow 100% A

流速 : 1.0 ml/min

カラムオーブン : 30°C

波長：325 nm

・肝臓の α -トコフェロールの測定

20%ホモジネート 500 μ l を 10ml の褐色試験管に入れ、0.9%NaCl、1 mM EDTA を 500 μ l 加えた。6 %ピロガロール/エタノール溶液 0.2ml とヘキサン/酢酸エチル (9 : 1) を 4ml 加え 5 分間攪拌した。遠心分離して上清を抽出した。この抽出を 3 回繰り返し上清を窒素乾固して、ヘキサンに再溶解させた。HPLC は Prates らの方法に準じ、以下の条件で行った[24]。

・ LC 構成

ポンプ：PU-2080 Plus (Jasco 社製)

カラムオーブン：CO-2065 Plus (Jasco 社製)

検出器：RF-20A (島津製作所社製)

インテグレータ：SmartChrom (KYA TECH Corporation 社製)

・ LC 条件

カラム：ZORBAX RX-SIL (4.6 \times 250mm 5 μ m Agilent)

移動相：ヘキサン/2-プロパノール=99/1

流速：1.3 ml/min

カラムオーブン：35 $^{\circ}$ C

励起 298nm、蛍光 325nm

・肝臓の PLOOH の測定

Folch 法で抽出した総脂質を CL-HPLC 法で測定した。本法は HPLC によりホスファチジルコリン(PC)とホスファチジリエタノールアミン (PE) を他の脂質成分より分離した後、発光試薬と過酸化脂質を反応させて両脂質中のヒドロパーオキシド基由来の化学発光を選択的に検出することで、ホスファチジルコリンヒドロパーオキシド(PCOOH)とホスファチジリエタノールアミンヒドロパーオキシド(PEOOH)を定量

する (**Fig. 0-2**)。HPLC 条件は Miyazawa らの方法に準じ [9]、以下のとおり行った。

・ LC 構成

ポンプ : PU-2080 Plus (Jasco 社製)

カラムオーブン : 860-C0 (Jasco 社製)

検出器 : CLD-100 (東北電子産業社製)

インテグレータ : クロマトコーダー 21 (システムインスツルメンツ社製)

・ LC 条件

カラム : Finepak SIL-NH2-5 (4.6×250mm、JASCO)

移動相 : 2-プロパノール/メタノール/水 = 130/45/25 流速 1ml/min

発光試薬 : 50mM ホウ酸緩衝液 (pH10) に 2 μ M のルミノール (和光純薬工業) と 25 μ M のチトクローム c (Sigma) を溶解

して作成した。流速 2.1ml/min

カラムオーブン : 40°C

1-2-5 統計処理

結果は平均値±標準偏差で示した。正規性の検定と等分散性の検定 (ルビーン検定) を行い、全て正規分布していることを確認した。二元配置分散分析を行い、有意であった場合に平均値の差を Turkey の多重比較検定で解析した。それぞれ $p < 0.05$ を統計的有意とした。

1-3 結果と考察

1-3-1 摂食量と体重変化

液体飼料投与 4 週後と 8 週後の各群の平均体重に差は見られなかった (**Table**

1-2)。またカロリー摂取量も各群で差は見られなかった (**Table 1-2**)。よってペ
アフィーディングは適切に行われたと考えられた。

1-3-2 肝臓の TG

アルコール性脂肪肝に特徴的な肝臓の TG 蓄積を確認した。コントロール群と
コントロール+アルコール群を比較すると、アルコール投与による TG の有意な
蓄積が投与 4 週目で確認され、投与 8 週目には 25.9mg/g liver まで増加した
(**Table 1-2**)。病理診断上、脂肪肝は肝臓の TG 蓄積量が 50mg/g liver 以上と定
義されていることから [25]、本実験で形成された脂肪肝は初期の症状と考えら
れ、アルコール性脂肪肝形成初期の酸化ストレス発生を評価するために適した
サンプルと考えられた。

次に、アルコール性脂肪肝の TG 蓄積に対する CPE の効果を確認した。投与 4
週後はアルコール+CPE 群とアルコール群共に肝臓への TG が有意に蓄積したが、
投与 8 週後にアルコール+CPE 群はアルコール群よりも TG の蓄積量が有意に抑制
されていた (**Table 1-2**)。このことから CPE は肝臓へのアルコール誘導性の TG
蓄積を抑制する作用が考えられた。

1-3-3 肝臓のレチノール

TG 蓄積以外のアルコール性脂肪肝の特徴として、レチノールの減少が挙げら
れる [26]。肝臓に貯蔵されたレチノールの約 90% を占めるレチニルエステルは
アルコール摂取により加水分解され、代謝酵素シトクロム P450 (CYP) で分解され
る。この CYP 活性はアルコール摂取により活性化されることが知られている [26]。
また加水分解されたレチノールはレチノール結合タンパク質と結合し血中へ放
出されるが、アルコール摂取によりこの血中への放出が促進されることが知ら
れている (**Fig. 1-4**) [27]。コントロール群とコントロール+アルコール群を比較
すると、アルコール投与により肝臓レチノール量が有意に減少したため (**Table
1-2**)、TG 蓄積以外にレチノールの減衰からもアルコール性脂肪肝形成が確認で
きた。一方コントロール群では、アルコール投与 4 週後よりも 8 週後にレチノ

ール量が有意に減少していた (**Table 1-2**)。ラットへ高脂肪食を投与するとレチノール結合タンパク質が増加した報告があり [28]、本実験で用いた液体飼料の脂質含有率は総カロリーの 36% を占める高脂肪食だったことを考慮すると (**Table 1-1**)、液体試料投与によりレチノール結合タンパク質が増加し、コントロール群でも肝臓レチノールが減少したと考えられた。

アルコール+CPE 群の肝臓レチノール量は、投与 4 週後にアルコール群同様減少し、8 週後も低下したままだった (**Table 1-2**)。よって CPE はアルコール誘導性レチノール減少のメカニズムには作用しないと考えられた。

1-3-4 肝臓の α -トコフェロール

肝臓中の TG 蓄積とレチノールの減衰からアルコール性脂肪肝の形成が確認できたので、抗酸化物質の α -トコフェロールを定量し酸化ストレスを評価した。 α -トコフェロール量は TG の蓄積量に比例することが報告されているため [29]、TG 当たりの濃度で α -トコフェロールを評価した。投与 8 週後のコントロール+アルコール群の α -トコフェロール量はコントロール群に比べ有意に減少していた (**Fig. 1-5**)。この減少はアルコール投与 4 週後には見られなかったため、投与 4 週後から 8 週で肝臓で酸化ストレスが発生した可能性が考えられた。

アルコール+CPE 群はアルコール群と比較すると、投与 8 週後の α -トコフェロール量の減少が有意に抑制された。このことから CPE は、アルコール投与により発生した酸化ストレスに対し抗酸化作用を示した可能性が考えられた。

1-3-5 肝臓の PLOOH

アルコール投与による酸化ストレス発生を更に検証するため、肝臓の PLOOH を CL-HPLC 法で定量した。アルコール投与 4 週後には各群差は見られなかったが、8 週後のコントロール+アルコール群の PCOOH と PE00H はコントロール群に比べ有意に増加した (**Fig. 1-5**)。この結果から脂質過酸化はアルコール投与 4 週後から 8 週で発生したことが考えられ、 α -トコフェロール量の減衰結果と一致した。肝臓 TG 蓄積はアルコール投与 4 週目で有意に蓄積し、8 週目まで進行し

たことから (**Table 1-2**)、アルコール投与 4 週迄には酸化ストレスをあまり伴わずに肝臓へ TG 蓄積が進行し、4 週以降蓄積された TG が酸化ストレスを発生させ、肝臓の α -トコフェロールを減少させ、PCOOH と PE00H を増加させた可能性が考えられた。

CPE の抗酸化作用を検証したところ、投与 8 週後のアルコール群に比べアルコール+CPE 群では PE00H の増加が有意に抑制されていた (**Fig. 1-5**)。また PCOOH はアルコール群に比べアルコール+CPE 群で抑制傾向 ($p=0.05$) を示した。これらの結果から CPE はアルコール投与による脂質過酸化に対し抗酸化作用を発揮したことが考えられた。CPE が肝臓 TG の蓄積を抑制した結果を考慮すると (**Table. 1-2**)、CPE が直接的に抗酸化作用を発揮したというよりも、TG の蓄積を抑制したことで間接的に酸化ストレスの発生を低減した可能性が考えられた。

1-4 結論

平均体重とカロリー摂取量に差が見られなかったことから、ペアフィーディングは適切に行われたと考えられた。アルコール性脂肪肝に特徴的な症状である肝臓中の TG の蓄積とレチノールの減少が確認できたので、アルコール性脂肪肝モデルが作成できたと考えられた。アルコール実験系では、アルコール投与 4 週後では酸化ストレスをあまり伴わずに脂肪肝が形成され、投与 8 週後に酸化ストレスを伴って病状が進展する可能性が考えられた。よってアルコールを 8 週間投与したラット脂肪肝は酸化ストレス動物モデルに適用できると考えられた。

CPE を給与すると、レチノールの減少は抑制できなかったが、 α -トコフェロールの減少と PLOOH の増加が抑制されたので、CPE が生体内で抗酸化作用を発揮したと考えられた。この作用は CPE が直接的に抗酸化力を発揮したというよりも、肝臓への TG の蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減している可能性が考えられた。

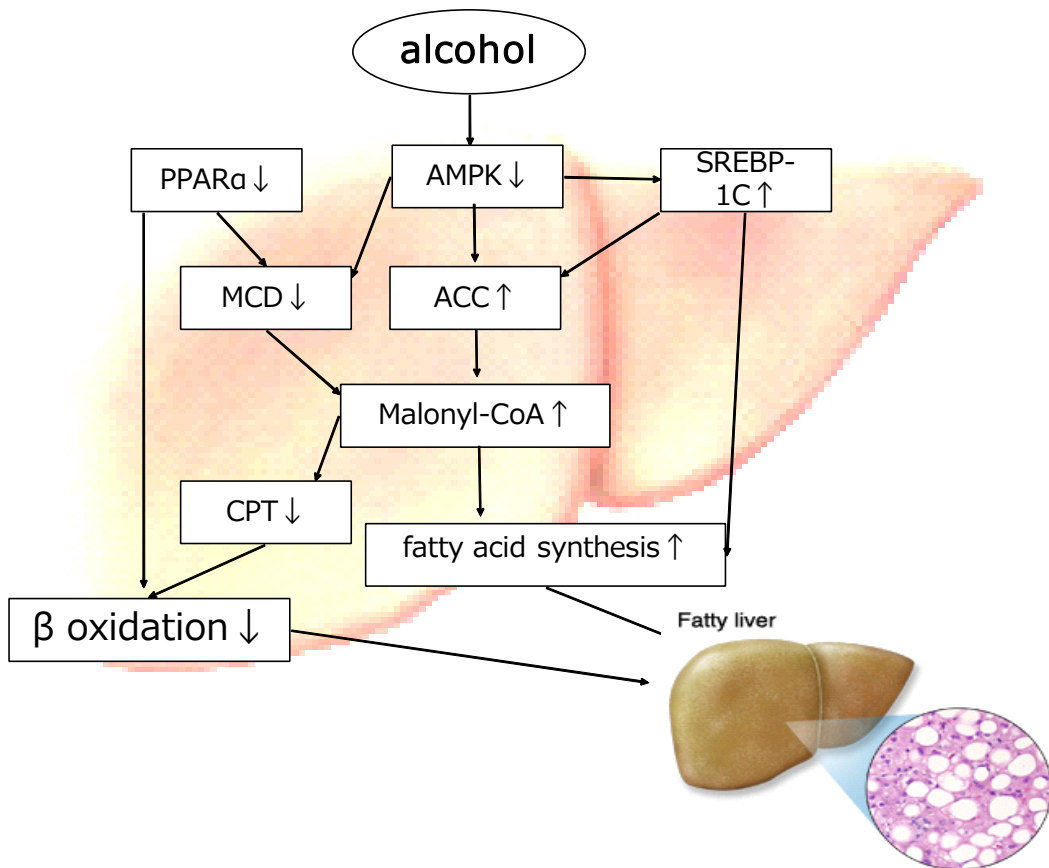


Fig. 1-1 Schematic illustration of theoretical mechanisms for alcoholic fatty liver

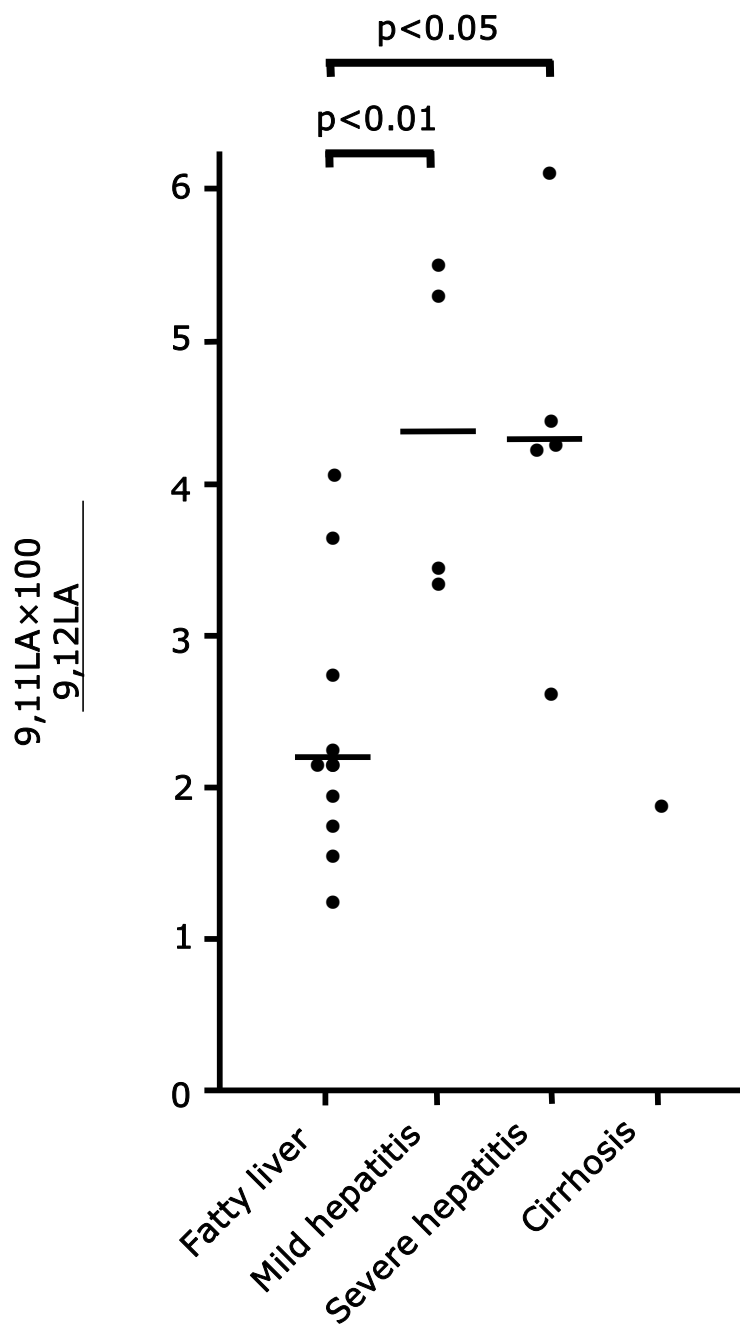


Fig. 1-2 Conjugated dienes; (9,11 linoleic acid (LA))x 100/(9,12 linoleic acid) in hepatic biopsy specimens by histological grade. SOURCE: Situnayake 1990[16].

Table 1 -1 Composition of the alcohol and non-alcohol liquid diets supplemented with or without CPE.

	Non-alcohol		Alcohol	
	Control	CPE	Control	CPE
<i>Caloric ingredients (energy %)</i>				
Protein	17.0	17.0	17.2	17.2
Carbohydrates	47.0	47.0	10.5	10.5
Fat	36.0	36.0	36.5	36.5
Ethanol	-	-	35.8	35.8
Total	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>Non-caloric ingredients (g/L)</i>				
Cacao polyphenol	-	1.4	-	1.4
Vitamin mix	2.5	2.5	2.5	2.5
Mineral mix	8.8	8.8	8.8	8.8

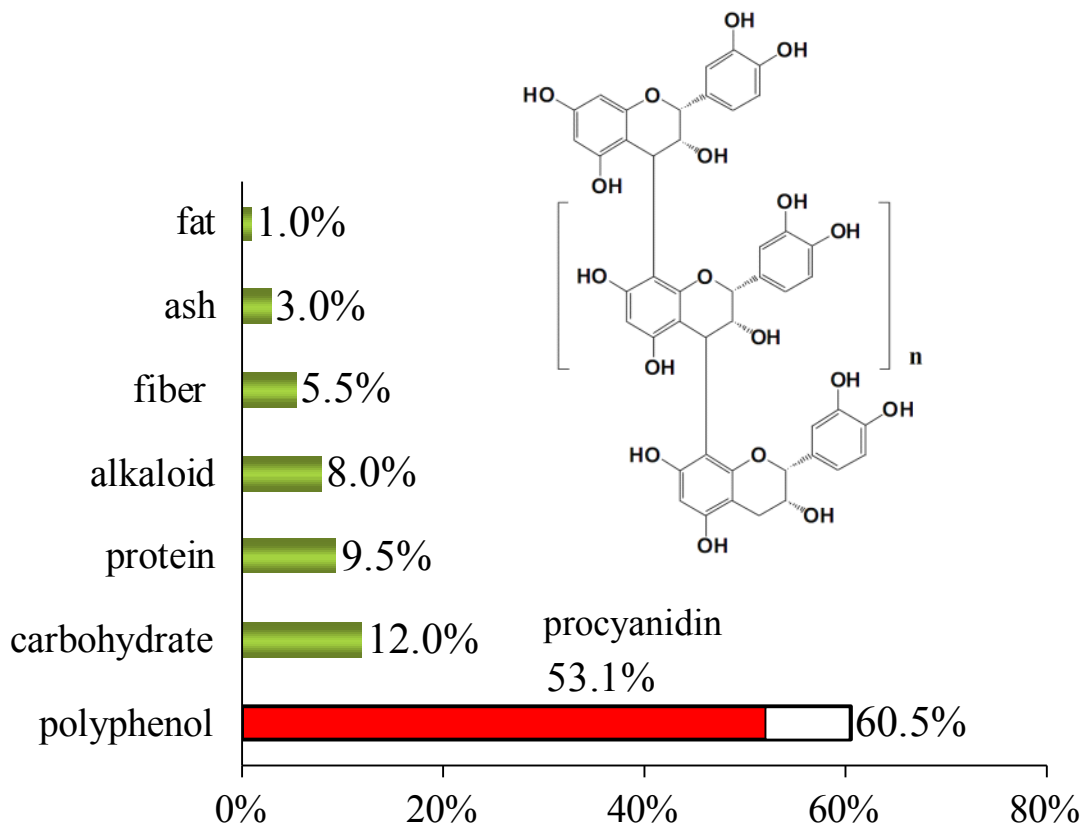


Fig. 1-3 Chemical composition of CPE extracted from cacao beans with acetone

Table 1-2 Body weight, food intake, and liver parameters of in the liver of rats fed a liquid alcohol diet with and without CPE for 4 and 8 Weeks. Data points represent the mean \pm SD. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-alcohol group ($p < 0.05$).

	4 weeks (n=3)				8 weeks (n=7)			
	Non-alcohol		Alcohol		Non-alcohol		Alcohol	
	Control	CPE	Control	CPE	Control	CPE	Control	CPE
Initial weight (g)	173.2 \pm 10.7	174.0 \pm 9.4	174.8 \pm 7.2	176.0 \pm 6.7	169.8 \pm 6.5	170.1 \pm 6.3	170.1 \pm 6.5	169.9 \pm 6.2
Final weight (g)	206.1 \pm 15.4	205.6 \pm 4.3	207.8 \pm 11.9	212.5 \pm 24.2	270.0 \pm 6.1	279.4 \pm 17.4	278.5 \pm 18.8	280.9 \pm 4.0
Carorie intake (kcal/kg weight)	208.7 \pm 6.7	208.1 \pm 7.4	199.5 \pm 3.3	195.2 \pm 6.9	208.4 \pm 8.7	212.3 \pm 10.6	203.2 \pm 9.3	209.6 \pm 6.3
Ethanol intake (g/kg weight)	-	-	10.0 \pm 0.2	9.8 \pm 0.3	-	-	10.2 \pm 0.5	10.5 \pm 0.3
Cacao polyphenol intake (mg/kg weight)	-	285.4 \pm 10.1	-	267.8 \pm 9.4	-	291.3 \pm 14.5	-	287.5 \pm 8.7
TG (mg/g of liver)	10.1 \pm 2.5	7.4 \pm 1.5	18.7 \pm 4.2 [#]	23.8 \pm 1.1 ^{*#}	13.9 \pm 4.6	12.9 \pm 4.6	25.9 \pm 3.9 [#]	14.7 \pm 2.8 [*]
Retinol (μ g/g of liver)	355.4 \pm 33.8	355.8 \pm 47.1	154.1 \pm 47.6 [#]	101.8 \pm 23.0 [#]	100.2 \pm 33.4	133.3 \pm 22.9 [*]	38.8 \pm 9.3 [#]	52.1 \pm 12.2 [#]

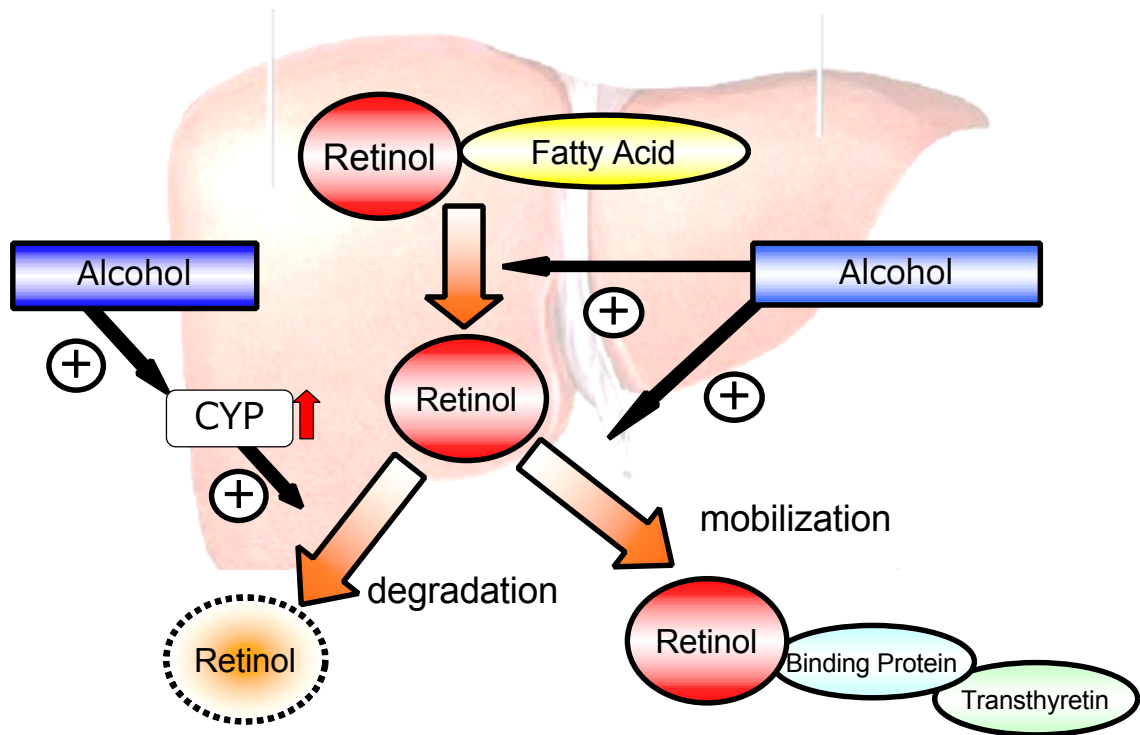


Fig. 1-4 Schematic illustration of mechanisms of the alcohol effects on retinoid metabolism
 SOURCE: Wang. 2005[27].

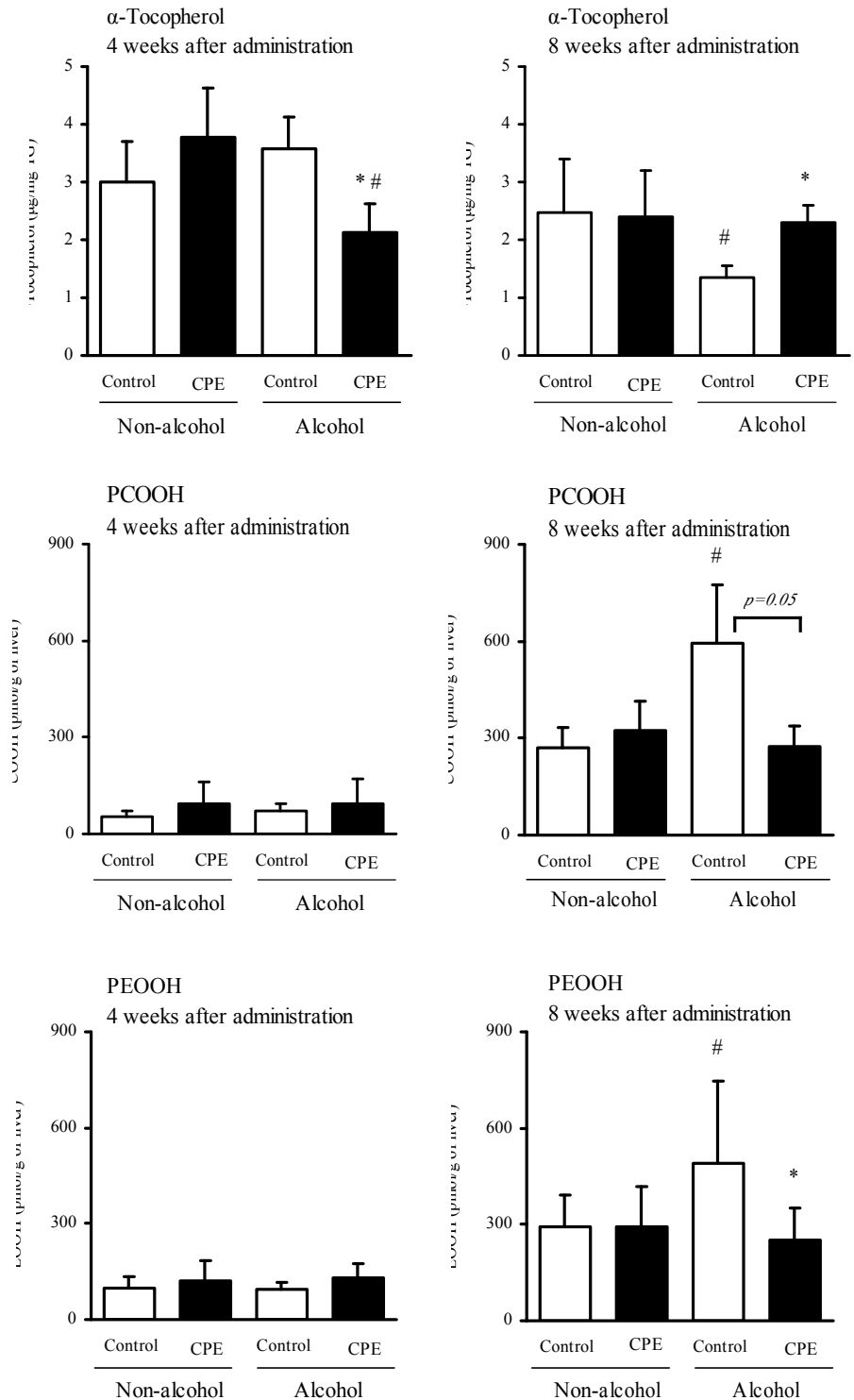


Fig. 1-5 Levels of α -Tocopherol and PLOOH (PCOOH and PEOOH) in the liver of rats fed a liquid alcohol diet with and without CPE. Data points represent the mean \pm SD. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-alcohol group ($p < 0.05$).

第1章 小括

ラットへアルコール含有液体飼料を投与し、アルコール性脂肪肝モデルを作成し、肝臓中の酸化ストレスを評価した。また CPE をアルコールとともに給与し、アルコール性脂肪肝への抗酸化作用を評価した。アルコール性脂肪肝に特徴的な症状である肝臓 TG の蓄積とレチノールの減少が確認できたことから、アルコール性脂肪肝モデルが作成できたと考えられた。アルコール摂取 4 週間後では酸化ストレスをあまり伴わずに脂肪肝が形成され、8 週後に抗酸化物質 α -トコフェロール量の減少と過酸化脂質 PCOOH と PE00H の増加がみられたことから、アルコール性脂肪肝は肝臓に TG が蓄積した後、酸化ストレスを伴って病状が進展する可能性が考えられた。すなわちアルコールを 8 週間投与したラット脂肪肝は酸化ストレス動物モデルに適用できると考えられた。

CPE を給与すると、レチノールの減少は抑制できなかったが、 α -トコフェロールの減少と PCOOH と PE00H の増加が抑制された為、CPE が生体内で抗酸化作用を発揮したと考えられた。この作用は CPE が直接的に抗酸化力を発揮したというよりも、肝臓への TG の蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減している可能性が考えられた。

第2章 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルマウスの酸化ストレス評価 緒言

近年メタボリックシンドロームと密接に関わる、生活習慣を起因とした非アルコール性脂肪性肝疾患の有病率が急増している [30]。この疾患の中には予後良好の単純性脂肪肝だけでなく、肝硬変や肝がんを発展する進行型の脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis : NASH) が存在することが明らかとなり (Fig. 2-1), 世界中で注目される疾患となった。NASH のモデル動物やヒト患者の肝臓では過酸化脂質が増加すると報告されており [30][31]、酸化ストレスが病状進行に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし過去の多くの報告は比色法による TBARS 測定値を指標にしており、生体内酸化ストレスを正しく評価していない可能性が考えられた。

近年 streptozotocin (STZ) 投与と高脂肪食負荷の組み合わせにより NASH 病態を惹起させる NASH モデルマウス作成法が報告された [32]。STZ は膵臓のランゲルハンス島を破壊してインスリン抵抗性を惹起するため、骨格筋中の脂質が血中に放出され肝臓に集まり脂肪肝が形成されると考えられている [33]。STZ 誘導性 NASH モデルマウスの脂肪肝の TG 量は 6 週齢目で 90mg/g liver を超えることが報告されており (Fig. 2-2) [32]、第 1 章のアルコール性脂肪肝 (25.9 ± 3.9 mg/g liver) よりも病状が進展する可能性が考えられたので、過酸化脂質の更なる高まりが期待された。

そこで本実験では NASH モデルマウスの肝臓中の TG 量と過酸化脂質を定量し、第 1 章のアルコール性脂肪肝の結果と併せ、脂肪肝の進展と過酸化脂質の蓄積の関連性を評価した。STZ 誘導性 NASH モデルマウスはアルコール性脂肪肝よりも脂肪肝の病状が進展する可能性が考えられたので、本実験では脂質過酸化一次生成物 PCOOH に加え二次生成物の MDA を定量することで、脂肪肝の脂質過酸化の進行度を詳細に検証した。MDA の測定は FL-HPLC 法を採用し [34]、従来の比色法よりも定性性と定量性を高めた分析を行った。

2-1 目的

NASH モデルマウスの肝臓中の TG 量と過酸化脂質を定量し、脂肪肝の進展と脂質過酸化の蓄積を評価した。過酸化脂質は CL-HPLC 法により PCOOH と FL-HPLC 法により MDA を定量した。

2-2 方法

2-2-1 試薬成分

試薬は可能な限り最上級のものをを用いた。

2-2-2 実験動物および飼育法

NASH モデルマウスの作成は株式会社ステリック再生医科学研究所で行われた。0 週齢の雄性 C57BL/6J を NASH 群とコントロール群の 2 群 (n=6) に分け、NASH 群には STZ を 200 μ g 腹腔内投与した。コントロール群は生理食塩水を腹腔内投与した。4 週齢から 7 週齢まで両群に粗脂肪分 32% の高脂肪食 (HFD32:CLEA Japan) を給餌した。7 週齢時に剖検して肝臓を摘出した。この研究に関する動物実験は、米国国立衛生研究所 (NIH) 動物実験指針に則り行われた。

2-2-3 肝臓成分の測定方法

・肝臓の TG の測定

1-2-4 と同様に行った。

・肝臓の PCOOH 改良抽出方法

Folch 法による組織からの抽出液には PCOOH 以外の多くの脂溶性物質が含まれている。CL-HPLC の LC 部においてある程度の分離はできるが、PCOOH と近い保持時間を持つ夾雑物質が抗酸化作用を持つ場合、ルミノールと反応するヒドロペロオキシドを消去し蛍光のクエンチングが発生する可能性が考えられた (Fig. 0-2)。当研究室の Kato らはヒト血漿からの PCOOH 抽出において Folch 法と固相

抽出を組み合わせ、より精製度を高めた抽出方法を報告した[35]。Kato らの方法に基づき肝臓からの PC00H 抽出方法を以下の通り改良した (Fig. 2-3)。

1. 20%ホモジネート液 $500 \mu\text{l}$ に 0.002% (w/v) の BHT を含むクロロホルム/メタノール混液 (2:1) 2.5ml を加え 5 分間振とう抽出し、遠心分離後 (1000g, 10 分, 4°C) 下層を分取した。
2. 上層にクロロホルム/メタノール混液 (10:1) 1.8ml を加え抽出を繰り返した。すべての上層分取液を集め、クロロホルム:メタノール:水混液 (3:48:47) 2.4ml を加え、攪拌して遠心分離した後 -30°C で 1 時間保管した。遠心分離後上清を捨て、窒素乾固後クロロホルム/2-プロパノール混液 (2:1) $100 \mu\text{l}$ に溶解した。
3. メタノール 1.5ml とクロロホルム/2-プロパノール (2:1) 1.5 ml でコンディショニングした Sep-Pak Vac 1 cc (100 mg) NH_2 cartridge に先ほどのサンプル $50 \mu\text{l}$ をロードした。カラムを 1.5 ml クロロホルム/2-プロパノール (2:1) で洗浄した後、1.5 ml メタノールで溶出させ、窒素乾固後メタノール $100 \mu\text{l}$ に溶解した。

ラット肝臓の Folch 抽出液に PC00H 標品を添加し上記改良抽出法の正確性を求めたところ、PC00H は 95.3% の良好な回収率が得られた (データ未掲載)。また上記改良抽出法を採用してから CL-HPLC の蛍光クエンチングは発生しなかったため、肝臓中の PC00H を高い回収率で抽出し、より安定した PC00H の定量が可能になったと考えられた。

- ・肝臓の PC00H の測定

1-2-4 と同様に行った。

- ・肝臓の MDA 測定

従来の TBARS 法は発色の加熱工程で MDA が増加する問題点が指摘されていた為、

加熱前に抗酸化物質の BHT を加え、人為的な増加を抑制した。抽出条件は以下のとおりである。

1. 臓器を約 0.5 g 採取し (採取量を記録)、1.15% KCl を 2.5ml 加えビーズ式細胞破碎装置 (TOMY MicroSmash) で冷却下懸濁し、ホモジネート液を作成する。
2. ホモジネート液を 50 μ l エッペンドルフチューブに入れ、蒸留水を 90 μ l 加える。8.1%(w/v) の SDS 水溶液を 4 μ l 加え攪拌する。
3. 0.4%(w/v) の TBA 溶液 (10% (v/v) 酢酸水溶液 (pH3.5)) を 600 μ l 加え、2.8mM の BHT 溶液 (100% エタノール) を 20 μ l 加え攪拌する。
4. 95°C で 1 時間加熱する。
5. 氷上で 10 分間冷却する。
6. 10ml ガラス試験管に内容物を移す。エッペンドルフチューブに 200 μ l の蒸留水を加え洗浄し、ガラス試験管内溶液に合わせる。
7. ブタノール/ピリジン (15 : 1 v/v) 混液を 1 ml 加え、攪拌する。
8. 3000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を HPLC で分析する。

TBA は MDA 以外のアルデヒドにも反応し発色するため、比色法による定量では非特異的検出の問題点が指摘されていた。そこで本実験では FL-HPLC 法を採用し [34]、ODS カラムにより分子種の定性し、蛍光検出器により定量することで検出精度を高めた。HPLC 条件は以下のとおりである。

- LC 構成

- ポンプ : PU-2080 Plus (Jasco 社製)

- カラムオーブン : CO-2065 Plus (Jasco 社製)

- 検出器 : RF-20A (島津製作所社製)

- インテグレーター : SmartChrom (KYA TECH Corporation 社製)

- LC 条件

カラム：ODS (4.6×250mm 5 μm COSMOSIL 5C18-MS-II)

移動相：30% メタノール

流速：1.0 ml/min

カラムオーブン：40°C

励起 515nm、蛍光 553nm

上記条件下の FL-HPLC 法の定量限界は 200pmol であった。比色法の定量限界は約 10nmol だったことから、FL-HPLC 法を採用したことで約 50 倍に検出感度を高めた MDA の定量が可能になったと考えられた。

2-2-3 統計処理

結果は平均値±標準偏差で示した。F 検定にて等分散の検定を行い、等分散性が仮定できたら Student の t 検定を行った。p < 0.05 を統計的有意とした。

2-3 結果と考察

肝臓の TG 値は NASH 群で約 54.8±5.4mg/g liver を示し、コントロール群に比べ有意な蓄積が見られた (Fig. 2-4)。第 1 章のアルコール性脂肪肝の TG 蓄積量は 25.9±3.9mg/g liver だったことから、NASH 群の脂肪肝の病状はアルコール性脂肪肝に比べ更に進行したと考えられた。

ところが、過酸化脂質は PCOOH と TBA とともに NASH 群とコントロール群に差は認められなかった (Fig. 2-4)。第 1 章のアルコール性脂肪肝の結果と比較すると TG 蓄積量と過酸化脂質量が相関しなかったので、脂肪肝の発症誘因の違いにより過酸化脂質の発生機序が異なる可能性が考えられた。

過去の研究から、アルコールや脂肪酸が肝臓に流入する量が増加すると、代謝酵素の CYP2E1 が活性化され活性酸素を産生し、過酸化脂質の形成が進行すると考えられている [36] [37]。すなわちアルコール性脂肪肝と NASH の過酸化脂質の発生機序には共に CYP2E1 が関係すると考えられている。一方 Nakajima らは、高脂肪食投与、高脂肪食とアルコール投与、及び普通食とアルコールを投与し

たラット肝臓の CYP2E1 タンパク質発現量を比較したところ、高脂肪食とアルコール投与群の CYP2E1 が高脂肪食投与群または普通食とアルコール投与群よりも強く活性化されていたことを報告した[38]。よって本実験の高脂肪食を投与した NASH 脂肪肝よりも、高脂肪食とアルコールを投与された TG 蓄積の症状がゆるやかであったアルコール性脂肪肝の方が CYP2E1 が強く活性化された可能性が考えられ、結果アルコール性脂肪肝で脂質過酸化が進行した可能性が考えられた (Fig. 2-5)。本実験の 7 週齢時 NASH 脂肪肝では過酸化脂質の高まりが確認できなかったため、STZ 誘導性 NASH モデルマウスを酸化ストレス動物モデルに適応するには、飼育期間を延長して病状を進展させてから再度検証する必要があると考えられた。

2-4 結論

NASH 群の肝臓中の TG 量は $54.8 \pm 5.4 \text{ mg/g liver}$ を示した。これは第 1 章のアルコール性脂肪肝 ($25.9 \pm 3.9 \text{ mg/g liver}$) よりも TG 蓄積が進行していたが、PCOOH と TBA の高まりは確認できなかった。肝臓中の TG 量と過酸化脂質量が相関しなかったことから、アルコール性脂肪肝と NASH 脂肪肝では過酸化脂質の発生機序が異なることが示唆された。過去の報告から NASH 脂肪肝よりもアルコール性脂肪肝の方が CYP2E1 が強く活性化され、活性酸素を発生させた可能性が考えられた。STZ 誘導性 NASH モデルマウスを酸化ストレス動物モデルに適応するには、更に病状を進展させてから検証する必要があると考えられた。

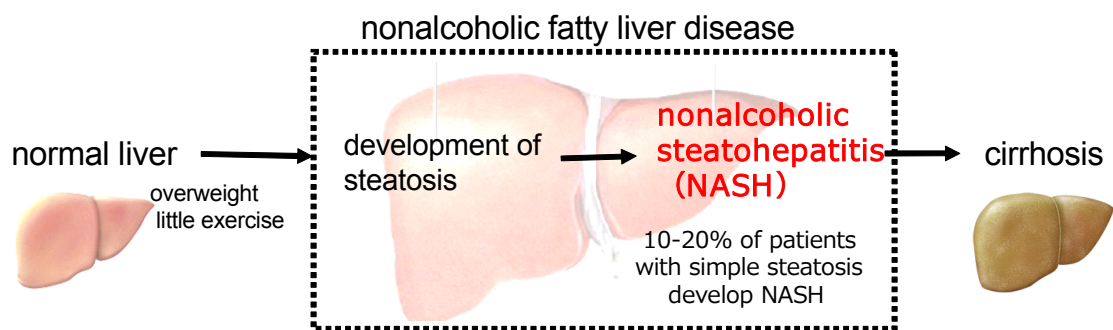


Fig. 2-1 Schematic representation of the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

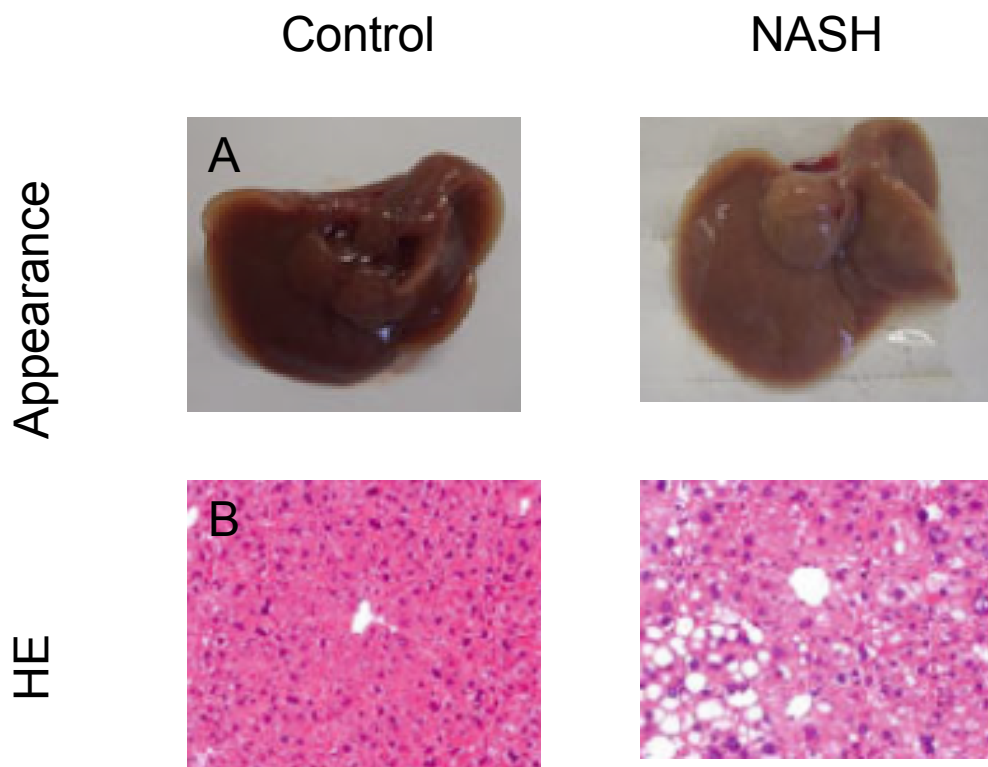


Fig. 2-2 Macroscopic and histological features of NASH model mice. A) Representative macroscopic appearance of livers from normal mice and NASH model mice at 6 weeks. B) H&E stained. Original magnifications $\times 200$
 SOURCE: Takakura. 2014[32].

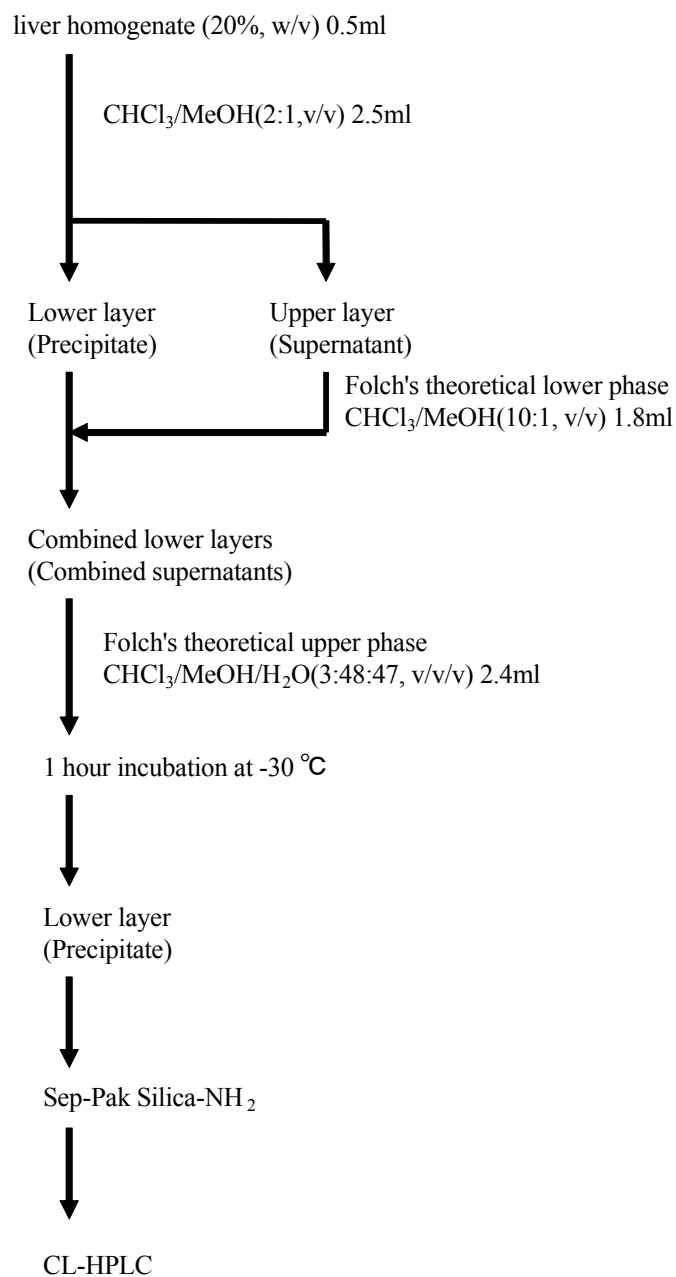


Fig. 2-3 Optimized procedure for the extraction of PCOOH from liver tissue

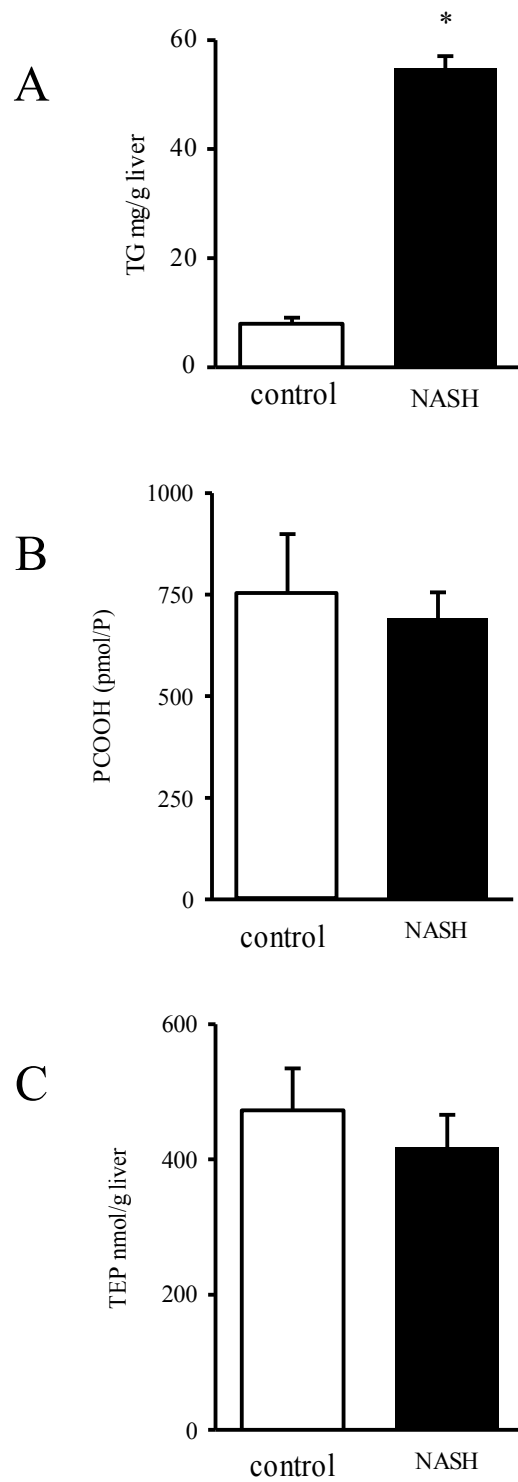


Fig. 2-4 Levels of triglyceride(A), PCOOH(B) and TBA(C) in the liver of NASH model mice. Data points represent the mean \pm SD. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$).

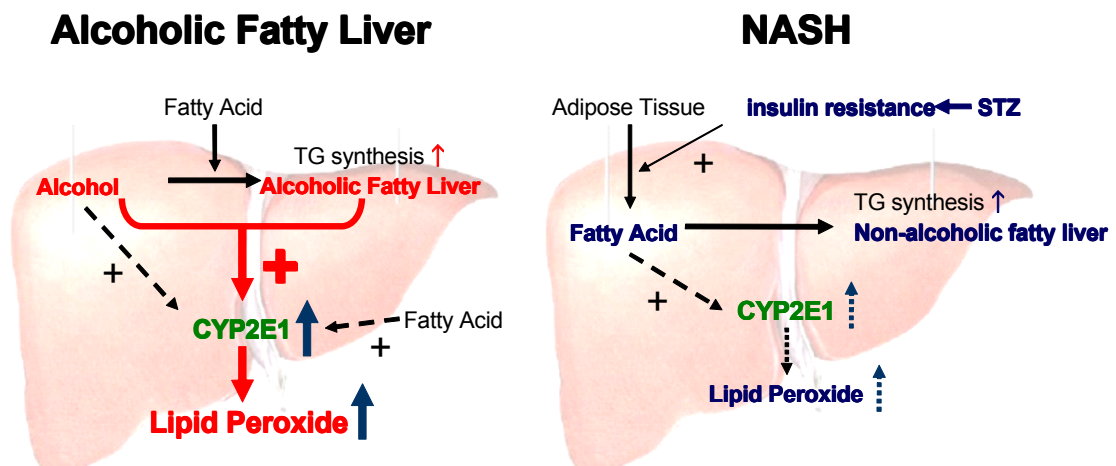


Fig. 2-5 Scheme relating alcoholic fatty liver and NASH with CYP2E1 activity through the observed lipid peroxide.

第2章 小括

STZ 誘導性 NASH モデルマウスの肝臓中の TG 量と過酸化脂質を定量し、脂肪肝の進展と過酸化脂質の蓄積を評価した。NASH 群の肝臓中の TG 量は $54.8 \pm 5.4 \text{ mg/g liver}$ を示した。これは第 1 章のアルコール性脂肪肝 ($25.9 \pm 3.9 \text{ mg/g liver}$) よりも TG 蓄積が進行していたが、PCOOH と TBA の高まりは確認できなかった。肝臓中の TG 量と過酸化脂質量が相関しなかったことから、アルコール性脂肪肝と NASH 脂肪肝では過酸化脂質の発生機序が異なることが示唆された。過去の報告から NASH 脂肪肝よりもアルコール性脂肪肝の方が CYP2E1 が強く活性化され、活性酸素を発生させた可能性が考えられた。STZ 誘導性 NASH モデルマウスを酸化ストレス動物モデルに適応するには、更に病状を進展させてから検証する必要があると考えられた。

第3章 四塩化炭素が肝臓と腎臓に及ぼす酸化ストレスとカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用の解明

緒言

CCl₄は19世紀中頃に麻酔薬として用いられていたが、肝障害作用が強かったため使用が中止された[39]。その後 CCl₄肝毒性の作用機序について研究が進み、CCl₄が生体内で代謝されてラジカル化し、脂質過酸化を進行させ肝臓障害を惹起することがわかってきた[40]。同時に酸化ストレスを誘発する薬剤としても注目され、CCl₄を用いた酸化ストレス動物実験は数多く報告されてきた。しかし大半の実験は非特異的検出の問題点が指摘されている比色法の TBARS 値を生体内酸化ストレスの指標にしているため、CCl₄動物モデルには定性性と定量性を高めた生体内酸化ストレスの評価方法が必要と考えられた。

また CCl₄の酸化ストレスが顕著に現れる標的臓器の選定も、酸化ストレス動物モデルの検証において重要である。CCl₄の臓器障害は肝臓のみならず腎臓でも起きることが報告されているが[41]、殆どの研究は肝臓に焦点を当てており、CCl₄酸化ストレスに対する肝臓と腎臓の感受性の違いを調べた研究は殆ど無い。よって CCl₄酸化ストレス動物モデルの最適な標的臓器ははっきりとわかっていない。

近年 National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) は CCl₄ 1200 mg/kg をラットへ腹腔内投与すると、2時間後に血漿の過酸化脂質が有意に増加し、その後経時的に減少することを報告した[7]。NIEHS は GC-MS を用いて従来の TBARS 法よりも定性性と定量性の精度を高めて過酸化脂質を評価しており、信頼性の高い実験結果と考えられたが、臓器の酸化ストレスについて報告は無かった。そこで本実験では NIEHS の実験条件を参考に、CCl₄を 1200 mg/kg ラットへ腹腔内投与し、2時間後の肝臓と腎臓の過酸化脂質を CL-HPLC 法と FL-HPLC 法で評価し、酸化ストレスが顕著に現れる標的臓器を明らかにしようとした。

CCl₄酸化ストレスに対するカカオポリフェノールの生体内抗酸化作用について

では、カカオ豆から脂肪分を取り除いたパウダー（ココアパウダー）を給与したラットに CCl_4 を腹腔内投与したところ、肝臓の酸化障害が抑制された報告があった[42]。しかしココアパウダーはカカオ豆の様々な成分を含むため、カカオポリフェノールの CCl_4 酸化ストレスに対する抗酸化作用についてはよくわかっていない。またカカオポリフェノールの腎臓への抗酸化作用については報告が無かった。そこで本実験では CPE を給与し、腎臓の CCl_4 酸化ストレスに対するカカオポリフェノールの抗酸化作用を検証した。

3-1 目的

CCl_4 腹腔内投与 2 時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスを比較し、 CCl_4 の酸化ストレスがより顕著に現れる標的臓器を検証した。初めに CCl_4 による臓器障害を血漿と臓器の生化学パラメーターから確認した。次に臓器障害が酸化ストレスに起因することを確認するため、肝臓と腎臓の過酸化脂質を CL-HPLC 法と FL-HPLC 法で定量した。また過酸化脂質以外の酸化ストレス指標として、肝臓と腎臓の酸化タンパク質、酸化 DNA、抗酸化酵素及び抗酸化物質を定量した。

さらに肝臓と腎臓の CCl_4 酸化ストレスに対する CPE の抗酸化作用を調べた。CPE の給与量については、 CCl_4 酸化ストレスに対するポリフェノールの抗酸化作用を調べた過去の研究を参考に[43][44][45]、CPE を体重 1 kg あたり 500mg (ポリフェノール換算で 303mg) 7 日間経口投与した。予備試験では上記量 CPE を投与して毒性は見られなかった（データ未掲載）。CPE の抗酸化作用機序を調べるため、肝臓と腎臓の CCl_4 ラジカルを産生する *CYP2E1* の RNA 量を調べた。

3-2 方法

3-2-1 試薬成分

CPE は 1-2-1 と同じものを用いた。試薬は可能な限り最上級のものを用いた。

3-2-2 実験動物および飼育法

Fisher 系雄性ラット（12 週齢）20 匹を 4 群（Water+Non- CCl_4 , Water+ CCl_4 ,

CPE+Non-CCl₄及び CPE+CCl₄)に分けた。市販固形普通飼料 (CE-2, 日本クレア) および蒸留水を自由摂食させた。CPE+Non-CCl₄と CPE+CCl₄群に CPE を 7 日間 500mg/kg/day 経口投与した。24 時間絶食後、Water+CCl₄と CPE+CCl₄群に菜種油と混合した CCl₄を 1200mg/kg 腹腔内投与した。腹腔内投与 2 時間後、イソフルラン麻酔下で剖検した。ヘパリン入り採血管に採血し、遠心分離して血漿を採取し-80°Cで保存した。肝臓と腎臓を 5mm 幅に剃刀で切り落とし、ホルマリン緩衝液に漬けて組織学検査用試料とした。肝臓と腎臓の一部を RNA 抽出用として RNA later (Ambion, Japan) に入れ、-30°Cで保存した。残りの肝臓と腎臓は生理食塩水で灌流し、液体窒素で急速に凍らせ-80°Cに保存した。この研究に関する動物実験は、東北大学大学院農学研究科の動物実験委員会の動物実験指針に則り、許可されてから行われた。

3-2-3 血漿成分の測定方法

・血漿中肝腎障害マーカーの測定 (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 乳酸脱水素酵素 (LDH), 尿酸 (UA), 総脂質 (TL), TG, コレステロール (Cho) 及びリン脂質 (PL))

長浜ライフサイエンスラボラトリーの血液自動分析装置で測定した。

3-2-4 肝臓及び腎臓成分の測定方法

・肝臓及び腎臓中の障害マーカーの測定 (TG, PL 及びタンパク質)

TG は 1-2-4 と同様に行った。PL は Bartlett 法で測定した [46]。タンパク質は Lowry 法で測定した [47]。

・肝臓及び腎臓中の PCOOH と MDA の測定

2-2-3 と同様に行った。

・肝臓及び腎臓中の酸化タンパク質と酸化 DNA の測定

酸化タンパク質は Cayman Chemical 社の Protein Carbonyl Assay Kit を用い

て定量した。本測定法は DNPH (2, 4-dinitrophenylhydrazine) とサンプル中のカルボニルタンパク質の反応物質の吸収極大波長 360 nm の吸光度を求め定量する。

酸化 DNA は日研フード(株)社の 8-OHdG モノクローナル抗体を用い、免疫組織染色し評価した。染色及び評価は(株)組織科学研究所社で行った。

・肝臓及び腎臓中のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) と α -トコフェロールの測定

GPx 活性は Biovision 社の Glutathione Peroxidase Assay Kit を用いて定量した。本測定法はサンプル中の GP x とグルタチオン還元酵素反応と共役反応により消費される NADPH 量を吸光度測定することで GPx 活性を定量する。 α -トコフェロール量は 1-2-4 と同様に行った。

・肝臓及び腎臓中の定量リアルタイム PCR (RT-PCR) 法を用いた *CYP2E1* 遺伝子発現の測定

①Total RNA の抽出

1. RNA later 中 -30°C で保存してあったサンプル約 5 mg に、1% メルカプトエタノールを含む QIAGEN RLT lysis buffer 350 μl を加えた。
2. ホモジナイザー (TOMY Micro Smash) を用いて十分に組織を粉砕した。
3. QIAGEN 社の QIAcube で RNA 抽出した。
4. 抽出液を -80°C で保管した。

②RNA の濃度測定

抽出した Total RNA 溶液 1 μl を、Thermo Fisher Scientific 社の NanoDrop を用いて濃度検定を行った。純度検定は核酸の吸光度が極大を示す A_{260} 、核酸の吸光度が極小を示す A_{230} 、及びタンパク質の吸光度が極大を示す A_{280} の吸収比で確認した。また RNA 濃度が 800~1000ng/ μl であることを確認した。

③cDNA 作成

1. Rnase-Free water で希釈して、RNA $5 \mu\text{g}/33 \mu\text{l}$ ($=152\text{ng}/\mu\text{l}$) になるように調整する。
2. エッペンチューブに移し、 65°C で 5 分間変性かける。
3. 37°C で 5 分間保温した。
4. 反応液を Takara 社の PrimeScript RTase に移し、 37°C で 15 分間反応させた。
5. 滅菌した MilliQ 水を $450 \mu\text{l}$ 加えた。
6. -20°C で保管した。

④電気泳動による RNA の状態確認

1. RNA 溶液を希釈し、 $2.5 \mu\text{g}$ 相当の RNA 溶液 ($12 \mu\text{L}$) に泳動用マーカー ($3 \mu\text{L}$) を加えた。
2. 65°C で 15 分間の変性かけた。
3. 直ちに氷冷 (5 分間以上) し、0.7%アガロースゲルにアプライし、TAE バッファーを用いて $150 \text{V} \cdot 400\text{mA} \cdot 35$ 分の条件で泳動した
4. UV トランスイルミネーターを用いて各サンプルの RNA のコンディションが均一であることを確認した

⑤定量 RT-PCR

プライマー Forward 及び Reverse 各 $10 \mu\text{l}$ と滅菌 MilliQ $230 \mu\text{l}$ の混合液を $5 \mu\text{l}$ 、Takara 社の SYBR Premix Ex Taq II を $10 \mu\text{l}$ 、及び cDNA 液を $5 \mu\text{l}$ を 96 well plate に入れ、専用のシールとヘラでシーリングした。プライマーの配列は **Supplementary Table 1** に示した。Bio-Rad 社の cfx96 を用い以下の反応条件で測定した。

95°C 5 分 / (95°C 10 秒 \rightarrow 59°C 50 秒) \times 40 回 / 65°C 5 秒 / 95°C 5 分

3-2-5 統計処理

1-2-5 と同様に行った。

3-3 結果と考察

3-3-1 CCl₄による臓器障害と CPE の保護作用

CCl₄によって肝臓に障害が発生すると、細胞中の酵素が血液中に流れ出すことが報告されている[48]。Water+Non-CCl₄群と比べWater+CCl₄群で血漿で肝細胞酵素のAST、ALT及びLDHの有意な増加が確認されたので(**Table 3-1**)、CCl₄腹腔内投与により肝臓障害が発生したと考えられた。またCCl₄は肝臓からのリポ蛋白質分泌を阻害し、血中の脂質を減少させることが報告されている[49]。**Table 3-1**よりWater+CCl₄群の血漿TL、TG、Cho及びPL濃度が有意に減少したため、逸脱酵素以外に血中脂質量の減衰からも肝臓障害が確認できた。また腎細胞に特徴的なUAがWater+CCl₄群で血漿中に有意に増加したため(**Table 3-1**)、CCl₄腹腔内投与により腎臓障害が発生したと考えられた。一方、CCl₄による肝腎障害が起きると臓器中のTGが増加し、PLとタンパク質が減少することが報告されているが[48][50]、本実験ではこれらTG、PL及びタンパク質の増減が肝臓よりも腎臓で顕著にみられた為(**Table. 3-2**)、CCl₄腹腔内投与の臓器障害は肝臓よりも腎臓で重症化しているように思われた。

Water+CCl₄群と比べCPE+CCl₄群では、血漿中のTL、TG、Cho及びPL量は差が見られなかったが、CCl₄により増加したAST、ALT及びLDH量が有意に抑制された(**Table 3-1**)。さらにCPE+CCl₄群ではCCl₄により増加した血漿UA濃度の増加が抑制され(**Table 3-1**)、腎臓中のTG、PL及びタンパク質の変動も抑制されていた(**Table 3-2**)。これらの結果からCPEはCCl₄の肝腎障害に対し保護作用を示したと考えられた。カカオポリフェノールによるCCl₄の腎臓障害を抑制する作用は我々の知る限り初めての報告である。このCPEの保護作用が抗酸化作用によるものか確認するため、肝臓と腎臓の酸化ストレスを測定した。

3-3-2 CCl₄による酸化ストレスとCPEの抗酸化作用

肝臓と腎臓の過酸化脂質をCL-HPLC法とFL-HPLC法で定量した。

Water+Non-CCl₄群と比べ Water+CCl₄群で、腎臓の PCOOH 及び MDA 量が有意に増加したが、肝臓では差は見られなかった (Fig. 3-1)。臓器障害の結果を考慮すると、CCl₄による腎臓障害は過酸化脂質の増加と関連があると考えられた。また腎臓は CCl₄腹腔内投与による酸化障害が肝臓よりも現れやすく、酸化ストレス動物モデルの標的臓器に有用であると考えられた。一方、Water+Non-CCl₄群と Water+CCl₄群で肝臓と腎臓のカルボニルタンパク質と 8-OHdG に差は見られなかった (肝臓の 8-OHdG はデータ未掲載) (Fig. 3-2)。これらの結果から CCl₄による臓器障害の発生機序には、カルボニルタンパク質や 8-OHdG よりも、過酸化脂質が寄与している可能性が考えられた。

Water+Non-CCl₄群の肝臓と腎臓の GPx 活性を定量したところ、肝臓は腎臓より 2 倍以上 GPx 活性が強かった (Table 3-2)。また Water+CCl₄群でも肝臓は腎臓より GPx 活性が高かったことから、CCl₄投与後の肝臓で PCOOH 及び MDA 量が低かった要因として肝臓の高い GPx 活性が寄与している可能性が考えられた。この可能性を支持する結果として、Water+CCl₄群の α -トコフェロールは肝臓では減少しなかったが、腎臓では有意に減少していた (Table 3-2)。過去に酸化鉄を腹腔内投与したラットで肝臓よりも腎臓の酸化障害が進行していた報告があり [51]、本実験はこの報告を支持する結果と考えられた。

腎臓で過酸化脂質の増加が確認できたので、CPE の保護作用が抗酸化作用によるものか検証した。Water+CCl₄群と CPE+CCl₄群を比べると、CCl₄による腎臓 PCOOH と MDA の増加は CPE 給与によって有意に抑制されていた (Fig. 3-1)。さらに CCl₄投与により減少した腎臓の GPx 活性と α -トコフェロール量は、CPE+CCl₄群で有意に回復していた (Table 3-2)。これらの結果から CCl₄による腎臓障害に対する CPE の保護作用は抗酸化作用であった可能性が考えられた。カカオポリフェノールは複数のフェノール性水酸基を有しラジカル消去活性を示すことが報告されているが (Fig. 1-3) [52]、本実験で示された CPE の抗酸化作用は単にラジカル消去能によるものなのか疑問が生じた。Baba らはカカオポリフェノールをラットへ経口投与して尿中の濃度を測定したところ、体内への吸収率は 30~50%であり、そのほとんどが抱合反応を受けた代謝物であったことを報告した

[53]。またカカオポリフェノールは生体内で代謝されて抱合されると、抱合前に比べラジカル消去能が減少することが報告されている[54]。そこでCCl₄の酸化ストレスに対するCPEの抗酸化作用のメカニズムを調べるため、CCl₄を代謝してラジカルを生成するCYP2E1遺伝子発現量を調べた[55]。過去の報告からCCl₄ラジカルはCYP2E1のmRNAの分解を促進することが知られている[56]。

Water+Non-CCl₄群と比べWater+CCl₄群では肝臓と腎臓でCYP2E1のmRNAが有意に減少していたため (Table 3-3)、肝臓と腎臓においてCYP2E1がCCl₄ラジカルを生成したことが考えられた。一方CPE+CCl₄群はCYP2E1のmRNA分解が抑制されていたので (Table 3-3)、CPEがCYP2E1活性を阻害してCCl₄ラジカルの生成量を減少させた可能性が考えられた。過去の研究で、ココアパウダーを摂取したラットの尿中で検出されたカカオポリフェノールの代謝物が、CYP2E1活性を抑制した報告があり[57]、本実験結果はこの報告と一致した。CPEがPCOOH、MDA、GPxそしてCYP2E1の活性に及ぼすメカニズムについては更なる研究が必要と考えられた。

3-4 結論

本研究はCCl₄腹腔内投与2時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスを評価し、CCl₄酸化ストレス動物モデルの最適な標的臓器を明らかにしようとした。またCCl₄酸化ストレスに対するCPEの抗酸化作用を定量的に示すことを目的とした。肝臓と腎臓で過酸化脂質のPCOOHとMDAを定量したところ、腎臓で有意な高まりが確認された。よって腎臓を標的臓器にしたCCl₄酸化ストレス動物モデルが有用であると考えられた。CPE給与は腎臓のPCOOHとMDAの増加を抑制した。CPEはCYP2E1の活性を抑制する作用が見られたため、CCl₄由来のラジカルを減少させ、生体内抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。CPEがPCOOH、MDA、GPxそしてCYP2E1の活性に及ぼすメカニズムについては更なる研究が必要であるが、CCl₄酸化ストレスに対するCPEの生体内抗酸化作用を、特に腎臓のPCOOHとMDAを分析することで定量的に示すことができた。

Table 3-1 Body weights and plasma parameters of rats administered CPE (500 mg/kg body weight) for 7 days and injected i.p. with CCl₄ (1200 mg/kg body weight) 2 hours before sacrifice.

		Non-CCl ₄		CCl ₄	
		Water	CPE	Water	CPE
Weight	Initial body weight (g)	209.6 ± 6.0	208.6 ± 4.3	211.6 ± 2.7	211.0 ± 6.0
	Body weight after 24 h fasting (g)	209.2 ± 4.8	194.8 ± 1.8	211.0 ± 2.9	202.8 ± 7.8
	Liver weight relative to body weight (%)	2.8 ± 0.0	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.2	3.1 ± 0.3
	Kidney weight relative to body weight (%)	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Plasma	AST (IU/l)	82.80 ± 6.69	89.40 ± 3.27	12194.00 ± 4811.45 [#]	1928.20 ± 577.92 [*]
	ALT (IU/l)	44.4 ± 1.5	45.2 ± 3.2	10440.4 ± 5641.7 [#]	363.8 ± 95.0 [*]
	LDH (IU/l)	248.8 ± 56.1	288.2 ± 62.8	61722.0 ± 28616.8 [#]	6750.2 ± 2242.1 [*]
	UA (mg/dl)	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1 [*]	8.1 ± 2.9 [#]	2.3 ± 0.3 [*]
	TL (mg/dl)	138.2 ± 9.8	143.0 ± 3.4	70.2 ± 3.6 [#]	87.0 ± 11.3
	TG (mg/dl)	44.6 ± 7.4	21.4 ± 2.9	8.4 ± 1.5 [#]	13.4 ± 4.7
	Cho (mg/dl)	38.4 ± 0.9	52.0 ± 2.6 [*]	26.6 ± 1.4 [#]	31.4 ± 2.9
	PL (mg/dl)	76.6 ± 3.2	89.4 ± 3.3	43.4 ± 1.9 [#]	58.4 ± 11.2

Data points represent the mean ± S.E.M. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-alcohol group ($p < 0.05$).

Table 3-2 Hepatorenal parameters and antioxidants of rats administrated CPE (500 mg/kg body weight) for 7 days and injected i.p. with CCl₄ (1200 mg/kg body weight) 2 hours before sacrifice.

		Non-CCl ₄		CCl ₄	
		Water	CPE	Water	CPE
Liver	Protein (mg/g)	191.0 ± 24.0	216.3 ± 22.3	219.7 ± 12.4	202.4 ± 17.9
	Triglyceride (mg/g)	6.1 ± 0.8	7.4 ± 0.9	4.9 ± 0.1	7.2 ± 1.7
	Cholesterol (mg/g)	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2
	Phospholipid (µg/g)	1035.8 ± 109.5	967.3 ± 69.6	963.2 ± 65.5	827.8 ± 38.3
	α-tocopherol (µg/mg TG)	1.26 ± 0.17	1.20 ± 0.20	0.77 ± 0.15	0.97 ± 0.17
	glutathione peroxidase (mU/mg protein)	133.16 ± 13.24	125.95 ± 13.26	69.81 ± 18.17 [#]	141.67 ± 17.94 [*]
Kidney	Protein (mg/g)	163.6 ± 9.8	145.8 ± 5.7	109.1 ± 9.2 [#]	159.4 ± 5.6 [*]
	Triglyceride (mg/g)	3.0 ± 0.5	5.6 ± 1.5	8.5 ± 1.2 [#]	4.6 ± 0.8
	Cholesterol (mg/g)	3.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.1
	Phospholipid (µg/g)	977.5 ± 99.1	941.2 ± 45.8	745.8 ± 26.8 [#]	913.4 ± 58.6 [*]
	α-tocopherol (µg/mg TG)	1.84 ± 0.33	2.47 ± 0.14	0.78 ± 0.10 [#]	1.97 ± 0.36 [*]
	glutathione peroxidase (mU/mg protein)	48.95 ± 2.12	53.29 ± 4.58	30.45 ± 4.92 [#]	50.78 ± 2.26 [*]

Data points represent the mean ± SEM. ^{*} Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); [#] significantly different from the corresponding non-CCl₄ group ($p < 0.05$).

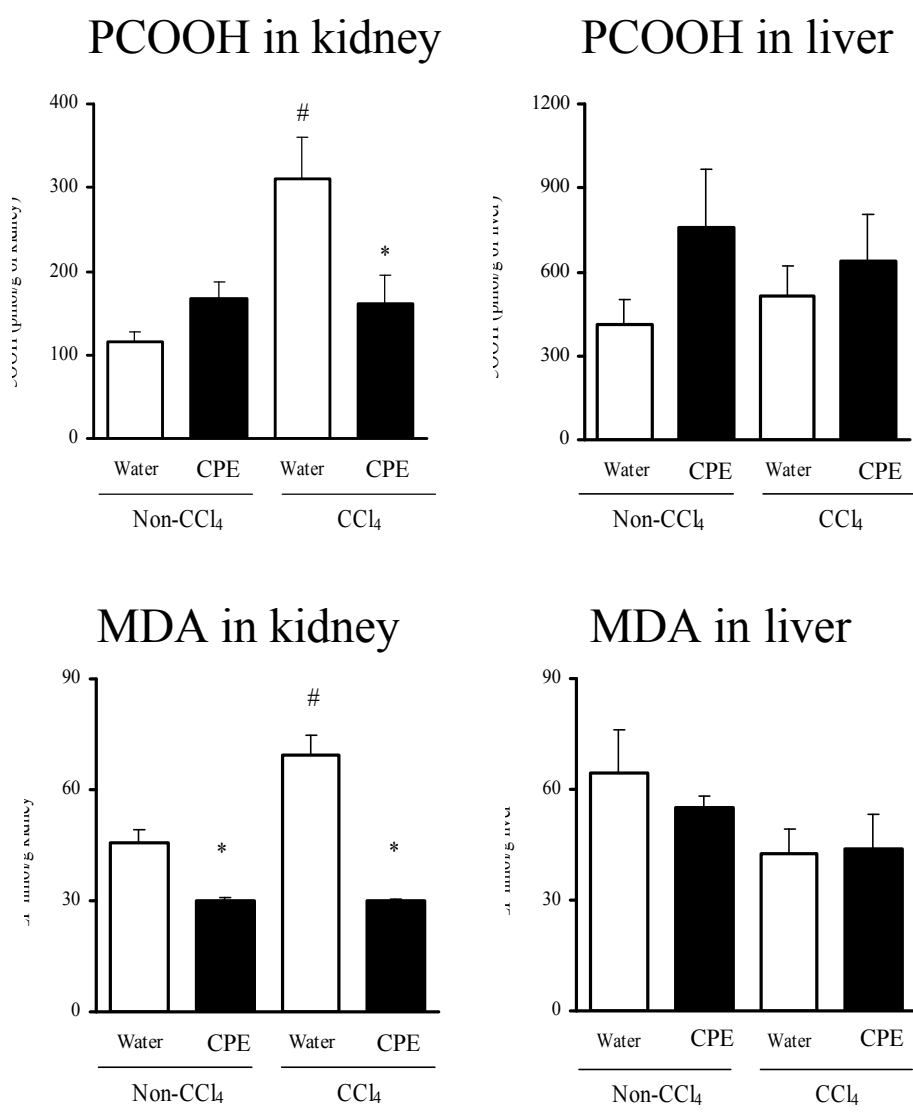
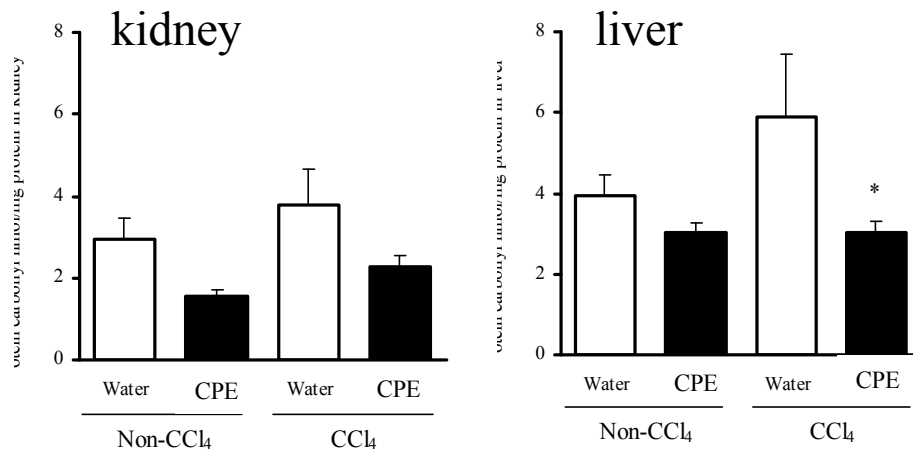


Fig. 3-1 Hepatorenal PCOOH and MDA levels in rats administrated CPE (500 mg/kg body weight) for 7 days and injected i.p. with CCl₄ (1200 mg/kg body weight) 2 hours before sacrifice. PCOOH and MDA levels were measured with the methods as described in Materials and Methods. Data points represent the mean \pm SEM. *Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); #significantly different from the corresponding non-CCl₄ group ($p < 0.05$).

Protein carbonyl



8-OHdG in kidney

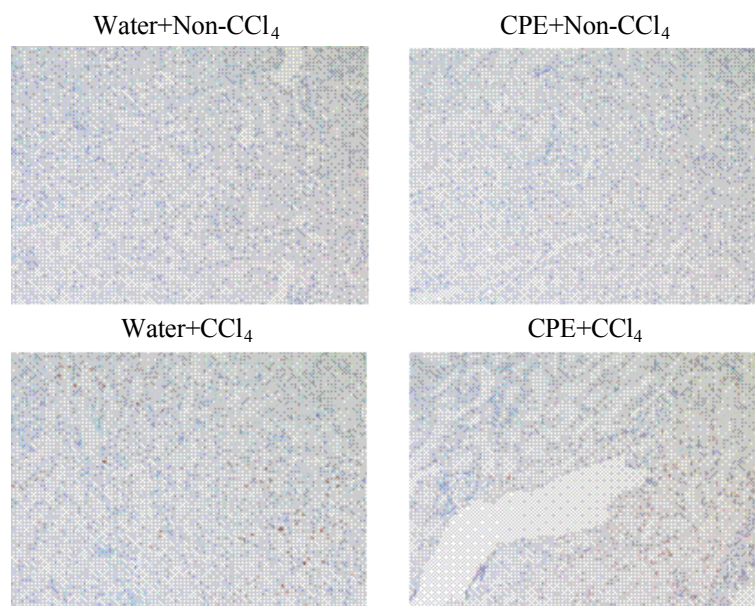


Fig. 3-2 Hepatorenal protein carbonyl content and renal immunohistochemical staining for 8-OHdG in rats administrated CPE (500 mg/kg body weight) for 7 days and injected i.p. with CCl₄ (1200 mg/kg body weight) 2 hours before sacrifice. Protein carbonyl was measured using a commercial kit (Cayman Chemical, MI, USA). 8-OHdG was determined by an immunoassay. Data points represent the mean \pm SEM. *Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$).

Table 3-3 Gene expressions of *CYP2E1* of rats administrated CPE (500 mg/kg body weight) for 7 days and injected i.p. with CCl₄ (1200 mg/kg body weight) 2 hours before sacrifice.

	Non-CCl ₄		CCl ₄	
	Water	CPE	Water	CPE
Liver	1.00 ± 0.10	0.75 ± 0.09	0.20 ± 0.07 [#]	0.63 ± 0.11 [*]
Kidney	1.00 ± 0.15	1.25 ± 0.05	0.55 ± 0.09 [#]	0.97 ± 0.10 [*]

Data points represent the mean ± SEM. * Significantly different from the corresponding control value ($p < 0.05$); # significantly different from the corresponding non-CCl₄ group ($p < 0.05$).

Supplementary Table 1. Primer sequences for real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>CYP2E1</i>	GACCAAAGGCCAGCCTTTTG	GTTATTGTAAAGCTGGATCCAGGGG
<i>GAPDH</i>	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

第3章 小括

CCl₄腹腔内投与2時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスを評価し、CCl₄酸化ストレス動物モデルの最適な標的臓器を明らかにし、CCl₄酸化ストレスに対するCPEの抗酸化作用を定量的に示すことを目的とした。肝臓と腎臓で過酸化脂質のPCOOHとMDAを定量したところ腎臓で有意な高まりが確認されたので、腎臓を標的臓器にしたCCl₄酸化ストレス動物モデルが有用であると考えられた。CPE給与は腎臓のPCOOHとMDAの増加を抑制した。CPEはCYP2E1の活性を抑制する作用が見られたため、CCl₄由来のラジカルを減少させ、生体内抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。本研究では、CCl₄酸化ストレスに対するCPEの生体内抗酸化作用を、特に腎臓のPCOOHとMDAを分析することで定量的に示すことができた。

総括

本博士論文の目的は、CL-HPLC 法により高選択的に定量した PLOOH を指標に酸化ストレス動物モデルを確立し、CPE の生体内抗酸化作用を明らかにすることである。

第 1 章ではアルコール含有液体飼料によるラット脂肪肝の酸化ストレスを評価した。アルコール性脂肪肝に特徴的な症状である肝臓 TG の蓄積とレチノールの減少が確認できたので、アルコール性脂肪肝モデルが作成できたと考えられた。アルコール摂取初期では酸化ストレスをあまり伴わずに脂肪肝が形成され、その後に α -トコフェロールの減少や PCOOH と PE00H の増加を伴う酸化ストレスが発生し、病状が進展する可能性が考えられた。本実験から、アルコール含有液体飼料を 8 週間投与したラットのアルコール性脂肪肝は酸化ストレス動物モデルに適用できると考えられた。CPE を給与すると、レチノールの減少は抑制できなかったが、 α -トコフェロールの減少と PCOOH と PE00H の増加が抑制されたので、CPE が生体内で抗酸化作用を発揮したと考えられた。この作用は CPE が直接的に抗酸化力を発揮したというよりも、肝臓への TG の蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減している可能性が考えられた。

第 2 章では STZ 誘導性 NASH モデルマウス肝臓の酸化ストレスを評価した。NASH 群の脂肪肝は TG 量で $54.8 \pm 5.4 \text{ mg/g liver}$ を示し、第 1 章のアルコール性脂肪肝 ($25.9 \pm 3.9 \text{ mg/g liver}$) よりも病状は更に進行したと考えられたが、PCOOH と TBA の高まりは確認できなかった。過去の報告から、STZ 誘導性 NASH モデルマウスよりも、アルコールと高脂肪食を組み合わせたアルコール投与ラットの方が、肝臓の CYP2E1 が強く活性化され、活性酸素を発生させた可能性が考えられた。STZ 誘導性 NASH モデルマウスを酸化ストレス動物モデルに適応するには、病状を進展させてから検証する必要があると考えられた。

第 3 章では CCl_4 腹腔内投与 2 時間後のラット肝臓と腎臓の酸化ストレスを評価し、 CCl_4 酸化ストレス動物モデルの最適な標的臓器を明らかにしようとした。肝臓と腎臓で過酸化脂質の PCOOH と MDA を定量したところ、腎臓で有意な高ま

りが確認された。よって腎臓を標的臓器にした CCl_4 酸化ストレス動物モデルが有用であると考えられた。また CCl_4 酸化ストレスに対する CPE の抗酸化作用を調べたところ、CPE 給与によって腎臓の PCOOH と MDA の増加が抑制された。CPE は CYP2E1 の活性を抑制する作用が見られたため、 CCl_4 由来のラジカルを減少させ、生体内抗酸化作用を発揮した可能性が考えられた。

本研究ではアルコール含有液体飼料投与 8 週間後のラット脂肪肝と、 CCl_4 腹腔内投与 2 時間後のラット腎臓で、過酸化脂質の高まりが確認できたため、酸化ストレス動物モデルとして有用であることを示した。これらの酸化ストレス動物モデルを食品成分の生体内抗酸化作用の評価に活用することで、酸化ストレスが憎悪の原因となる生活習慣病の予防に資する食品成分の機能性解明に貢献できると考えられる。また本研究で CPE のアルコール摂取による脂肪肝を緩和させる作用と、腎臓への生体内抗酸化作用を初めて明らかにすることができた。今後 CPE の吸収性・代謝動態について更に検証を進めることで、CPE は抗酸化作用をもつ機能性食品素材として国民の健康向上に貢献できると考えられる。

引用文献

- [1] Hermans NI, Cos P, Maes L, De Bruyne T, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, Pieters L. Challenges and pitfalls in antioxidant research. *Curr Med Chem.* **14**, 417-430 (2007).
- [2] Yamagishi M, Osakabe N, Takizawa T, Osawa T. Cacao liquor polyphenols reduce oxidative stress without maintaining α -tocopherol levels in rats fed a vitamin E-deficient diet. *Lipids.* **36**, 67-71 (2001)
- [3] Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol* **24**, 197-211 (1989)
- [4] Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* **11**, 376-381 (1995)
- [5] Fujii M, Shibazaki Y, Wakamatsu K, Honda Y, Kawauchi Y, Suzuki K, Arumugam S, Watanabe K, Ichida T, Asakura H, Yoneyama H. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol.* **46**, 141-152 (2013)
- [6] Somayajulu-Nițu M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar TS, Matei A, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. *BMC Neurosci.* **27**, 1471-2202 (2009)
- [7] Kadiiska MB1, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ 2nd, Rokach J, Shigenaga

- MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med.* **38**, 698–710 (2005).
- [8] Rauchová Hl, Vokurková M, Koudelová J. Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiol Res.* **61**, 89–101 (2012)
- [9] Miyazawa T, Suzuki T, Fujimoto K, Yasuda K. Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J Lipid Res.* **33**, 1051–1059 (1992)
- [10] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**, 727–747 (2004)
- [11] Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International.* **33**, 449–459 (2000)
- [12] Serafini Ml, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature.* **424**, 1013 (2003)
- [13] Seigo B, Naomi O, Yoji K, Midori N, Akiko Y, Toshimi K, Kumiko F, Yuko M, and Kazuo K. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans^{1,2} *Am J Clin Nutr.* **85**, 709–717 (2007)
- [14] Feinman L, Lieber CS. Ethanol and lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* **70**, 791–792 (1999)
- [15] Robert S, Srinivasan D, and Arthur J. Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* **105**, 14–32 (2010)
- [16] Situnayake RDl, Crump BJ, Thurnham DI, Davies JA, Gearty J, Davis M.

- Lipid peroxidation and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut*. **31**, 1311-1317 (1990)
- [17] Tsukamoto H. Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol*. **10**, 465-467 (1993)
- [18] Song BJ, Moon KH, Olsson NU, Salem N Jr. Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Hepatol*. **49**, 262-73 (2008)
- [19] Coudray C, Richard MJ, Faure H, Favier A. Blood and liver lipid peroxide status after chronic ethanol administration in rats. *Clin Chim Acta*. **219**, 35-45 (1993)
- [20] Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*. **24**, 197-211 (1989)
- [21] Ortega N, Romero MP, Macià A, Reguant J, Anglès N, Morelló JR, and Motilva MJ. Motilva M. J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *J. Agric. Food Chem*. **56**, 9621-9627 (2008)
- [22] Kelm MA, Johnson JC, Robbins RJ, Hammerstone JF, Schmitz HH. High performance liquid separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according degree of polymerization using a diol stationary phase. *J Agric Food Chem*. **54**, 1571-1576 (2006)
- [23] Schäffer MW, Roy SS, Mukherjee S, Nohr D, Wolter M, Biesalski HK, Ong DE, and Das SK. Qualitative and quantitative analysis of retinol, retinyl esters, tocopherols and selected carotenoids out of various internal organs from different species by HPLC. *Anal Methods*. **2**, 1320-1332 (2010).
- [24] Prates J. A. M, Quaresma M. A. G, Bessa R. J. B, Fontes C. M. G. A, Alfaia C. M. P. M. Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and b-carotene in Barrosã-PDO veal. *Food Chemistry*. **94**,

469-477 (2006)

- [25] Kwiterovich PO Jr, Sloan HR, Fredrickson DS. Glycolipids and other lipid constituents of normal human liver. *J Lipid Res.* **11**, 322-330 (1970)
- [26] Lieber CS. Relationships Between Nutrition, Alcohol Use, and Liver Disease. *Alcohol Research & Health.* **27**, 220 (2003)
- [27] Wang XD. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol.* **35**, 251-258 (2005)
- [28] El-Sayed MM, Ghareeb DA, Talat HA, Sarhan EM. High fat diet induced insulin resistance and elevated retinol binding protein 4 in female rats; treatment and protection with Berberis vulgaris extract and vitamin A. *Pak J Pharm Sci.* **26**, 1189-1195 (2013)
- [29] Nagita A, Ando M. Assessment of hepatic vitamin E status in adult patients with liver disease. *Hepatology.* **26**, 392-397 (1997)
- [30] Bell LN, Molleston JP, Morton MJ, Klipsch A, Saxena R, Vuppalanchi R, Chalasani N. Hepatic lipid peroxidation and cytochrome P-450 2E1 in pediatric nonalcoholic fatty liver disease and its subtypes. *J Clin Gastroenterol.* **45**, 800-807 (2011)
- [31] Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* **105**, 1067-1075 (2000)
- [32] Takakura K, Koido S, Fujii M, Hashiguchi T, Shibasaki Y, Yoneyama H, Katagi H, Kajihara M, Misawa T, Homma S, Ohkusa T, Tajiri H. Characterization of non-alcoholic steatohepatitis-derived hepatocellular carcinoma as a human stratification model in mice. *Anticancer Res.* **34**, 4849-4855 (2014)
- [33] Yunqiu Xia, Qing Li, Weizhen Zhong, Jing Dong, Zhulin Wang, Chunbo Wang. L-carnitine ameliorated fatty liver in high-calorie diet/STZ-induced type 2 diabetic mice by improving mitochondrial function. *Diabetol*

Metab Syndr. **3**, 31 (2011)

- [34] Khoschsorur G. A, Winklhofer-Roob B. M, Rabl H, Auer Th, Peng Z, Schaur R. J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of Malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia.* **52**, 181-184 (2000)
- [35] Kato S, Nakagawa K, Suzuki Y, Asai A, Nagao M, Nagashima K, Oikawa S, Miyazawa T. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of human plasma 1-palmitoyl-2-hydroperoxyoctadecadienoyl-phosphatidylcholine isomers via promotion of sodium adduct formation. *Analytical Biochemistry.* **11**, (2014) [Epub ahead of print]
- [36] Hartmut J, Gregory J.G, Arthur I.C, Jack A.H, Dominique P, John J. L. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **65**, 166-176 (2002)
- [37] Heebøll S, Thomsen KL, Pedersen SB, Vilstrup H, George J, Grønbaek H. Effects of resveratrol in experimental and clinical non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* **6**, 188-198 (2014)
- [38] Nakajima T, Ikatsu H, Okino T, Wang RS, Murayama N, Yonekura I, Sato A. Enhancement of ethanol-induced lipid peroxidation in rat liver by lowered carbohydrate intake. *Biochem Pharmacol.* **43**, 245-250 (1992)
- [39] Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev.* **19**, 145-208 (1967)
- [40] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology.* **189**, 113-127 (2003)
- [41] Ruprah M, Mant TG, Flanagan RJ. Acute carbon tetrachloride poisoning in 19 patients: implications for diagnosis and treatment. *Lancet.* **1**, 1027-1029 (1985)
- [42] Kilicgun H, Altiner D. The antioxidant activity of cocoa. *Phcog Mag.*

- 5, 298–300 (2009)
- [43] Kalpana P, Alka M. Hepatoprotective activity of *Mentha arvensis* Linn. leaves against CCl₄ induced liver damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **2**, 223–226 (2012)
- [44] Gnanaprakash K, Madhusudhana C, Ramkanth S, Alagusundaram M, Tiruvengadarajan VS, Angala PS, Mohamed, Saleem TS. Aqueous Extract of *Flacourtia indica* Prevents Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rat. *International Journal of Biological & Life Sciences*. **7**, 51 (2011)
- [45] Singhal KG, Gupta GD. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* against CCl₄-induced liver injury in rats. *Asian Pac J Trop Med*. **5**, 677–685 (2012)
- [46] Sarah W, Danielle HL, Yechezkel B, Yeshayahu T. Nanostructure of cationic lipid-oligonucleotide complexes. *Biophys J*. **87**, 609–614 (2004)
- [47] Lowry OH, Rosevrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. **193**, 265–275 (1951)
- [48] Al-Yahya M, Mothana R, Al-Said M, Al-Dosari M, Al-Musayeib N, Al-Sohaibani M, Parvez MK, Rafatullah S. Attenuation of CCl₄-Induced Oxidative Stress and Hepatonephrotoxicity by Saudi Sidr Honey in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. (2013) [Epub ahead of print]
- [49] Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfl A. Hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride: inhibited lipoprotein secretion and changed lipoprotein composition. *Z Naturforsch C*. **56**, 283–290 (2001)
- [50] Kamalakkannan, Rukkumani, Viswanathan, Rajasekharan, Venugopal. Effect of curcumin and its analogue on lipids in carbon tetrachloride - induced hepatotoxicity: A comparative study. *Pharmaceutical Biology*. **43**, 460–466 (2005)

- [51] Ping M, Qing L, Jiaoe C, Yaping G, Juan D, Shumao D, Zhuge X, Xu Y. Intraperitoneal injection of magnetic Fe₃O₄-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. *International Journal of Nanomedicine*. **7**, 4809– 4818 (2012)
- [52] Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. **6**, 399–402 (1997)
- [53] Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. Absorption and urinary excretion of (-)-epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (-)-epicatechin in rats. *J Agric Food Chem*. **49**, 6050–6056 (2001)
- [54] Jalil AM, Ismail A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*. **13**, 2190–219 (2008)
- [55] Knight JA, Cheung AK, Pieper RK, Servilla K. Increased urinary lipoperoxide levels in renal transplant patients. *Ann Clin Lab Sci*. **19**, 238–241 (1989)
- [56] Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, Lepage S, Lucas-Clerc C, Bégué JM, Fromenty B, Robin MA. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Lab Invest*. **92**, 396–410 (2012)
- [57] Cheng J, Chen C, Kristopher KW, Manna SK, Scerba M, Friedman FK, Luecke H, Idle JR, Gonzalez FJ. Identification of 2-piperidone as a biomarker of CYP2E1 activity through metabolomic phenotyping. *Toxicol Sci*. **135**, 37–47 (2013)

謝辞

本研究は、終始、宮澤陽夫教授のもとで行われたものであることを記すとともに、博士課程後期課程の修了に臨み、懇切なご指導とご鞭撻を賜ったことに心より感謝の意を表します。特に研究を進めるための環境を整備いただき、食品栄養学研究の道に導いていただいたことに心より感謝申し上げます

また、貴重なご指導とご助言を頂いた仲川清隆准教授並びに木村ふみ子助教に深謝いたします。両先生の貴重なご指導と数多くのご助言なくしては、本実験の実施は不可能であったことを記すとともに、深甚の謝意を表します。

また、本論文を校閲して頂きました山下まり教授と桑原重文教授に心より感謝いたします。

また、機能分子解析学研究室の学生達の熱心な協力を得たことを記すとともに心より感謝いたします。研究を進めていく上で、大きな励みとなりました。

また大学学部学生、修士学生時代の私に、研究の楽しさと難しさを教えてくださいました、立教大学教授で現東京農業大学の河村富士夫教授に深くお礼申し上げます。

また研究開発に向かう姿勢を厳しくご指導くださるとともに、東北大学で研究に打ち込める環境を作って下さった森永製菓株式会社 木村次男技監並びに亀井優徳技監に心よりお礼申し上げます。

また研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申しあげます。

最後にこれまで私をあたたく応援してくれた両親、弟、義父、義母、義妹、そして私を明るく励まし続けてくれた妻 蘭、息子 海斗に心から感謝します。

平成 27 年 1 月