



## Oxysterols As Indices of Oxidative Stress in Man After Paraquat Ingestion

石井, 憲治

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2934

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002934>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 85 】

氏 名・(本 籍) 石井 憲治 (兵庫県)  
博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
学 位 記 番 号 博い第1545号  
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion  
(オキシステロールを指標としたパラコート中毒死例の酸化ストレスの亢進)

審 査 委 員

主 査 教 授 上野 易弘  
教 授 田原 真也  
教 授 黒坂 昌宏

### 1. はじめに

パラコート(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichrolide, PQ)は、広く使われている除草剤であるが、生体に入ると redox-cycling を介して superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、hydrogen peroxide(過酸化水素)、hydroxyl radical(OH)などのフリーラジカルを生成することが知られている。ヒトの PQ 中毒においては、これらの活性酸素種(ROS)が脂質過酸化を起こして肺浮腫、間質性肺炎、肺線維症等の肺障害を引き起すと考えられている。しかし、ヒト PQ 中毒死例において脂質過酸化の指標はほとんど報告されていない。

本研究の目的は、脂質過酸化の指標としてコレステロール酸化物の oxysterol(7 $\alpha$ -OH, 7 $\beta$ -OH, 7-keto)とコレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH 及び 7 $\beta$ -OOH、両者をあわせて Ch-OOH と略記する)を測定することにより、PQ 中毒死例における肺並びに腎、肝での酸化ストレスを証明することである。

### 2. 方法

試薬：同定用標品 5 $\alpha$ -hydroperoxycholest-6-en-3 $\beta$ -ol(5 $\alpha$ -OOH)、7 $\alpha$ -hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol(7 $\alpha$ -OOH)、7 $\beta$ -hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol(7 $\beta$ -OOH)および内部標準物質(IS)の 5 $\alpha$ -hydroperoxy- $\beta$ -sitosterol はすべて我々が合成した。cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol(7 $\alpha$ -OH)、cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol(7 $\beta$ -OH)、3 $\beta$ -hydroxycholest-5-en-7-one(7-keto) および oxysterol 定量用内部標準物質の $\beta$ -sitosterol は Steraloids 製、コレステロールは Sigma 製、ルミノール、チトクローム C(ウマ心筋製)および BHT は和光純薬製を用いた。

対象および方法：PQ を飲用した 7 例(男性 5 例、女性 2 例。平均年齢 52.3 歳〔36-70 歳〕)の剖検試料を用いた。血漿 PQ 濃度は病院搬送時に HPLC を用いて定量された。患者は入院の 2 日～33 日後に死亡した。各患者の死亡後 1～3 時間にわざれた病理解剖により摘出された肺、肝、腎を分析試料とした。各臓器はホルマリン固定後、病理組織学的にも検討した。年齢と性をマッチさせた 7 人の剖検試料を対照群として用いた。尚、この研究は剖検試料による研究に関する日本法医学会の倫理基準(1997 年)に適合している。

肺及び腎、肝組織各 100-200mg から Folch 法により粗脂質を抽出し、Sep-Pak(-NH<sub>2</sub>) によりコレステロール分画を精製した。LC-MS を用いて oxysterol を検索した。カラムは TSKgel ODS-80Ts、移動相にはメタノールを用いた。化学発光検出器付 高速液体クロマトグラフ(HPLC-CL)を用いて Ch-OOH を、HPLC-UV を用いて oxysterol を測定した。カラムは Inertsil ODS-2(150×4.0mm)、移動相にはアセトニトリル：メタノール：水(46:45:9)を用い、7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH(両者をあわせて 7-OH と略記する) およびコレステロールは 210nm で検出し、7-keto は 245nm にて検出した。

### 3. 結果

HPLC-CL を用いて肺及び腎組織中の 7 $\alpha$ -OOH 及び 7 $\beta$ -OOH の濃度を比較した。対照群の 7 $\alpha$ -OOH(肺 0.13 nmol/g と腎 0.14 nmol/g)は 7 $\beta$ -OOH(肺 0.33 nmol/g と腎 0.36 nmol/g)よりも低い値を示した。これは、7 $\alpha$ -OOH が 7 $\beta$ -OOH へ異性化しているためと考えられる。

PQ 群の肺及び腎の 7 $\alpha$ -OOH と 7 $\beta$ -OOH の濃度はいずれも対照群と同程度であった。次に、LC-MS を用いて 7 $\beta$ -OH と 7-keto を同定した。さらに HPLC-UV を用いて oxysterol

の濃度を検討した。対照群では、肺において 7-keto(162 nmol/g)は 7 $\beta$ -OH(79 nmol/g)と 7 $\alpha$ -OH(85 nmol/g)の約 2 倍の濃度で検出され、腎と肝においては、7-keto は 7 $\beta$ -OH と 7 $\alpha$ -OH の 1.5～2 倍の濃度で検出された。肺及び腎の 7-keto の濃度は、コレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH と 7 $\beta$ -OOH の合計)より約 300 倍以上高い値を示し、7 $\beta$ -OH は 200 倍高い値を示した。

PQ 群では、肺における 7-keto と 7 $\beta$ -OH は対照群のそれらに比べて有意に高く、腎においては 7-keto が有意に高かった。7 $\alpha$ -OH に関しては、PQ 群の肺、腎のいずれにおいても対照群と差がなかった。肝では、PQ 群の 7-keto、7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH のいずれも対照群と差がなかった。

PQ 群を死亡までの日数で分類すると、急性死(飲用 2 日後死亡)2 例、亜急性死(飲用 5、6 日後死亡)2 例、遷延死(飲用 16 日以降死亡)3 例であり、病理組織学的には急性死例と亜急性死例で肺浮腫、肺出血、腎尿細管壞死、肝小葉中心性壞死が認められたが、肺線維症は遷延死例にのみ認められた。

### 4. 考察

本研究の主な結果は、1)ヒトの肺と腎において oxysterol(7-OH と 7-keto として)を検出し、LC-MS を用いて同定した。2)PQ 飲用による oxysterol の増加は、酸化ストレスによる脂質過酸化の亢進によるものであることを示したことである。

Brown らは In vitro において LDL を 4 つの異なる酸化システムに曝露したとき、Ch-OOH は初期(曝露 8 時間)に認められ、一方、7-keto と 7-OH は後期(曝露 24 時間以上)に生成されることを明らかにした。Ch-OOH は、phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase によって 7-OH へ移行するため時間と共に減少する。更に、繰り返し酸化ストレスが生じたとき、7-OH と同じように 7-keto も Ch-OOH から in vivo において生成されるとの報告がある。我々はこれ迄にラットに PQ を投与し、2 時間後の腎において 7 $\alpha$ -OOH 及び 7 $\beta$ -OOH が上昇(それぞれ 70% 及び 147%)したことから、PQ 投与による脂質過酸化の増強を示した。さらに今回の PQ 飲用後 2 日以上経過して死亡した症例では、Ch-OOH の有意な増加は見られなかつたが、7-keto と 7 $\beta$ -OH が有意に増加していたという所見は、以前の研究結果と共に Brown らの報告と一致している。

これまでに、組織や血漿中の MDA(malondialdehyde)や血漿 phospholipid diene-conjugated 18:2 $\Delta$ 9,11-linoleic acid を測定することにより、PQ 投与における肺障害の発現と脂質過酸化との相互関係を示した報告がある。本研究では、肺の線維性変化は、病院へ入院後 2 週間以上経過した 3 人の患者に認められた。一方、入院後 2 週間以内に死亡した 4 人の患者では、肺浮腫または肺出血が認められた。これらの組織学的变化は、Yasaka らの報告と矛盾していないが、肺障害の重症度と脂質過酸化との間に相互関係を見出すことはできなかつた。その理由として、各々の報告でヒトの症例数が極めて限られており、各報告での脂質過酸化の指標(MDA と共に二重結合)が我々の指標(oxysterol)とは異なっていたからであると考えられる。

最後に、酸化ストレスの指標である oxysterol については、癌患者の血漿やヒト白内障水晶体、ヒト動脈壁 atheroma に oxysterol の増加が認められているが、健常人からは認めら

れていない。酸化ストレスを誘発する free radical は白内障や動脈硬化を引き起こす原因の一つであるので、組織への cholesterol 酸化物の蓄積は、酸化ストレスを引き起こす free radical と密接に関係するに違いない。cholesterol は不飽和脂肪酸より反応しにくいので、cholesterol 過酸化物は、リン脂質過酸化物や cholesterol ester 過酸化物より安定していると考えられる。従って、組織における酸化ストレスを証明する場合、リン脂質過酸化物や cholesterol ester 過酸化物よりも簡便且つ正確に検出出来る oxysterol が有用である。

結論として、ヒト PQ 中毒死例の肺と腎から LC-MS を用い 7 $\beta$ -OH と 7-keto を初めて同定した。次に HPLC-UV を用い、肺で 7 $\beta$ -OH と 7-keto、腎で 7-keto の有意の蓄積を認め、PQ 中毒における脂質過酸化の亢進を最初に証明した。従って、oxysterol はヒトの酸化ストレスの適切な脂質指標であると考えられた。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1546 号	氏名	石井 憲治
論文題目	Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion オキシステロールを指標としたパラコート中毒死例の酸化ストレスの亢進		
審査委員	主査 三野 易弓 副査 田原 真也 副査 黒坂 昌弘		
審査終了日	平成 15 年 12 月 16 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

パラコート(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, PQ)は広く使われている除草剤であるが、生体に入ると redox-cycling を介して superoxide( $O_2^-$ )、過酸化水素( $H_2O_2$ )、hydroxyl radical(-OH)等のフリーラジカルを生成することが知られている。ヒトの PQ 中毒においては、これらの活性酸素種(ROS)が脂質過酸化を起こして、肺浮腫・間質性肺炎・肺線維症等の肺障害を引き起こすと考えられている。

本研究では、脂質過酸化の指標としてコレステロール酸化物の oxysterol( $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH、 $7$ -keto)とコレステロール過酸化物 ( $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH、両者を合わせて Ch-OOH と略記) を測定することにより、PQ 中毒死例における肺並びに腎・肝での酸化ストレスについて検討した。

PQ を飲用した 7 例（男性 5 例、女性 2 例。平均年齢 52.3 歳〔36~70 歳〕）の剖検試料を用いた。血漿 PQ 濃度は病院搬送時に HPLC を用いて定量された。患者は入院の 2 日～33 日後に死亡した。各患者の死亡後 1~3 時間にわざった病理解剖により摘出された肺及び肝・腎を分析試料とした。各臓器はホルマリン固定後、病理組織学的にも検討した。年齢と性をマッチさせた 7 人の剖検試料を対照群として用いた。

肺及び腎・肝組織各 100~200 mg から Folch 法により粗脂質を抽出し、Sep-Pak(-NH<sub>2</sub>)によりコレステロール分画を精製した。LC-MS を用いて oxysterol を検索した。化学発光検出器付高速液体クロマトグラフ(HPLC-CL)を用いて Ch-OOH を、HPLC-UV を用いて oxysterol を測定した。

肺及び腎組織中の  $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH の濃度を比較した所、対照群の  $7\alpha$ -OOH(肺 0.13 nmol/g と腎 0.14 nmol/g) は  $7\beta$ -OOH(肺 0.33 nmol/g と腎 0.36 nmol/g) よりも低い値を示した。PQ 群の肺及び腎の  $7\alpha$ -OOH と  $7\beta$ -OOH の濃度はいずれも対照群と同程度であった。

次に oxysterol の濃度を比較検討した。対照群では、肺において  $7$ -keto(162 nmol/g) は  $7\beta$ -OH(79 nmol/g) と  $7\alpha$ -OH(85 nmol/g) の約 2 倍の濃度で検出され、腎と肝においては、 $7$ -keto は  $7\beta$ -OH と  $7\alpha$ -OH の 1.5~2 倍の濃度で検出された。肺及び腎の  $7$ -keto の濃度は、コレステロール過酸化物( $7\alpha$ -OOH と  $7\beta$ -OOH の合計)より約 300 倍以上高い値を示

し、 $7\beta$ -OH は 200 倍高い値を示した。

PQ 群では、肺における  $7$ -keto と  $7\beta$ -OH は対照群のそれらに比べて有意に高く、腎においては  $7$ -keto が有意に高かった。 $7\alpha$ -OH に関しては、PQ 群の肺、腎のいずれにおいても対照群と差がなかった。肝では、PQ 群の  $7$ -keto、 $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH のいずれも対照群と差がなかった。

PQ 群を死亡迄の日数で分類すると、急性死(飲用 2 日後死亡) 2 例、亜急性死(飲用 5、6 日後死亡) 2 例、遷延死(飲用 16 日以降死亡) 3 例であり、病理組織学的には急性死例と亜急性死例で肺浮腫・肺出血・腎尿細管壞死・肝小葉中心性壞死が認められたが、肺線維症は遷延死例にのみ認められた。

本研究では、ヒト PQ 中毒死例の肺と腎から LC-MS を用いて oxysterol ( $7\beta$ -OH と  $7$ -keto) を初めて同定した。次に HPLC-UV を用い、肺で  $7\beta$ -OH と  $7$ -keto、腎で  $7$ -keto の有意の蓄積を認め、PQ 中毒における脂質過酸化の亢進を最初に証明した。

これ迄に、組織や血漿中の MDA(malondialdehyde) や血漿 phospholipid diene-conjugated 18:2 △9, 11-linoleic acid を測定することにより、PQ 投与における肺障害の発現と脂質過酸化との相互関係を示した報告がある。本研究では、肺の線維性変化は病院へ入院後 2 週間以上経過した 3 人の患者に認められた。一方、入院後 2 週間以内に死亡した 4 人の患者では、肺浮腫又は肺出血が認められた。これらの組織学的变化は Yasaka らの報告と矛盾していないが、肺障害の重症度と脂質過酸化との間に相互関係を見出すことはできなかった。その理由として、各々の報告でヒトの症例数が極めて限られており、各報告での脂質過酸化の指標(MDA と共に二重結合)が我々の指標(oxysterol)とは異なっていたからであると考えられる。

本研究は、パラコート中毒死例に於ける脂質過酸化について、コレステロール過酸化物並びに酸化物の量的変化の点から研究したものであるが、パラコート中毒死例の肺と腎組織からコレステロール酸化物を初めて同定すると共に、それらの有意な蓄積を明らかにして、PQ 中毒における脂質過酸化の亢進を最初に証明したものであり、oxysterol はパラコート中毒による酸化ストレスの適切な脂質指標であることを示唆する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。