



Cholesterol-Derived Hydroperoxides in Alcoholic Liver Disease

浅野, 水辺

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-01-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2381

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002381>

※ 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。



氏名・（本籍）	あさの み ぎわ 浅 野 水 辺	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1719号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成12年1月12日	
学位論文題目	Cholesterol-Derived Hydroperoxides in Alcoholic Liver Disease （アルコール性肝障害におけるコレステロール過酸化物の意義）	

審査委員	主査 教授 上 野 易 弘	
	教授 尾 原 秀 史	教授 伊 東 宏

論文内容の要旨

1. 緒言

我々はこれまでに、アルコール症患者の赤血球膜からコレステロールの酸化物である cholesta-3, 5-dien-7-one 及び、コレステロールの過酸化物である 7-hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol (7-OOH) を検出し、アルコール症では脂質過酸化が亢進していることを報告した。一方、長期アルコール摂取で問題となるアルコール性肝障害の病因として、過酸化脂質が関与するという報告は多い。本研究では、アルコール性肝障害と脂質過酸化との関連を明らかにするために、アルコール性肝障害における肝のコレステロール過酸化物の量的変化を検討した。

2. 対象及び方法

[対象]

アルコール性肝疾患の診断基準に基づき、剖検肝の肉眼的及び組織学的所見から診断されたアルコール性脂肪肝12例、アルコール性肝硬変12例、飲酒歴がないか又は機会飲酒で肝に異常を認めない9例を対象とした。

[方法]

剖検時に採取した肝組織約0.2gに0.005%の butylated hydroperoxytoluene (BHT) を添加したクロロホルム／メタノール（2：1）混合液5mlを加えてホモジナイズした後、さらに5mlのクロロホルム／メタノール（2：1）混合液5mlを加え攪拌し、3000rpmで10分間遠心した。ここから分取したクロロホルム層を減圧濃縮乾固させ、粗脂質を得た。さらに、この粗脂質を Sep-Pak[®]-NH₂を用いてクロロホルム／イソプロパノールにて固相抽出した。得られたコレステロール画分を減圧濃縮乾固させ、これを少量のメタノールに溶解させたものを化学発光検出器付-高速液体クロマトグラフ法 (CL-HPLC) にて分析した。定量は内部標準添加法により行った。測定範囲内では検量線は良好な直線性を示した ($r > 0.998$)。

[統計処理]

群間比較は一元配置分散分析法又は Kruskal-Wallis test を用いた。多重比較検定は Scheffe's test に基づいて行った。2 種のコレステロール過酸化物、即ち 7α -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol (7α -OOH), 7β -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol (7β -OOH) の平均値の比較には Student's t-test を用いた。危険率 5 % ($P<0.05$) をもって有意とした。

3. 結果

年齢及び性別、体重、身長、死後経過時間に関して、3 群間にいずれも差はなかった。

アルコール性脂肪肝、アルコール性肝硬変、正常肝のいずれからもコレステロールの過酸化物である 7α -OOH と 7β -OOH を検出した。肝湿重量当たりの 7α -OOH 及び 7β -OOH は、アルコール性脂肪肝 (7α -OOH = 12.4 ± 7.1 nmol/g, 7β -OOH = 25.0 ± 14.0 nmol/g) では正常肝 (7α -OOH = 1.2 ± 1.7 nmol/g, 7β -OOH = 2.0 ± 3.3 nmol/g) の約 10 倍の高値を示した。一方、アルコール性肝硬変 (7α -OOH = 2.3 ± 3.5 nmol/g, 7β -OOH = 3.2 ± 5.8 nmol/g) では有意な 7α -OOH 及び 7β -OOH の蓄積を認めなかった。コレステロールに対する 7α -OOH 及び 7β -OOH の割合は、正常肝 (7α -OOH = $0.027 \pm 0.029\%$, 7β -OOH = $0.045 \pm 0.054\%$) に比してアルコール性脂肪肝 (7α -OOH = $0.33 \pm 0.20\%$, 7β -OOH = $0.71 \pm 0.43\%$) で有意に高値であった。アルコール性脂肪肝 (7α -OOH = $0.079 \pm 0.13\%$, 7β -OOH = $0.11 \pm 0.22\%$) と正常肝の間には有意差を認めなかった。

4. 考察

アルコール性肝障害の発症に過酸化脂質が関与するとの報告は多い。しかし、これまでの報告は脂質過酸化の指標としてチオバルビツール酸反応物質 (TBARS), 共役ジエン, 脂質ヒドロペルオキシドと生体アミンとの付加体等を用いており、過酸化脂質そのものを定量してはいない。本研究では、CL-HPLC の手法を用い、初めてヒト肝組織からのコレステロール過酸化物を直接検出、定量することに成功した。

アルコール性脂肪肝では 7α -OOH, 7β -OOH とともに正常肝に比べ著しい高値を示した。一方、肝硬変と正常肝の間には有意な差を認めなかった。肝硬変では線維化が進行し、過酸化反応の基質となるコレステロール量が減少している可能性があるので、コレステロールに対するコレステロール過酸化物の割合 (%) を計算した。しかし、アルコール性脂肪肝では 7α -OOH/cholesterol 及び 7β -OOH/cholesterol の増加を認めたが、肝硬変では有意な増加を認めなかった。

アルコール性脂肪肝で 7 -OOH (7α -OOH 及び 7β -OOH) が高値を示す機序について、以下のよう推測した。 7 -OOH はコレステロール酸化の第一段階の反応生成物であり、 7 -OOH の増加は生体内での過剰な酸化ストレスを反映していると考えられている。ミクロゾームエタノール酸化系の中心酵素である cytochromeP450 2E1 (CYP2E1) は高いラジカル産生能を有することが知られており、且つアルコール慢性摂取は肝における CYP2E1 の誘導を引き起こす。CYP2E1 の誘導の程度とフリーラジカルの産生量が相関するとの報告があり、アルコール性脂肪肝では同酵素の増生によりフリーラジカル産生が増大していると考えられる。長期にわたるアルコール摂取が、フリーラジカルの産生増大から生体への過剰な酸化的ストレスを招来し、これがアルコール性脂肪肝でのコレステロール過酸化物蓄積の一因となった可能性がある。

一方、アルコール性肝硬変では正常肝に比べて有意な 7 -OOH の上昇を認めなかった。ラット肝硬変モデルでは、脂質過酸化の指標である malondialdehyde (MDA) が増加したとの報告があり、本研究の結果はこれと矛盾する。この理由の一つとして、脂肪肝では肝での代謝が保たれており酵素反応

に伴うフリーラジカルの産生も大であるが、病期が進行し肝硬変に至ると、肝細胞の機能低下によって酵素反応に伴うフリーラジカル産生が低下し、7-OOHの生成はむしろ抑制されている可能性が考えられる。また、脂質過酸化の指標として用いた物質の相違が両者の結果に影響していることも考えられる。

5. 結語

アルコール性脂肪肝では肝において7-OOHの高度の蓄積が認められた。しかし、アルコール性肝硬変では明らかな7-OOHの増加は認めなかった。脂肪肝での7-OOHの増加は、アルコール性肝障害の初期段階での脂質過酸化の亢進を示唆している。

論文審査の結果の要旨

長期間のアルコール摂取で問題となるアルコール性肝障害の病因として、過酸化脂質が関与するという報告は多い。しかし、これまでの報告は脂質過酸化の指標としてチオバルビツール酸反応物質(TBARS)、共役ジエン、脂質ヒドロペルオキシドと生体アミンとの付加体等を用いており、過酸化脂質そのものを定量してはいない。

本研究では、アルコール性肝障害と脂質過酸化との関連を明らかにするため、ヒト肝組織からのコレステロール過酸化物を直接に検出・定量し、アルコール性肝障害におけるコレステロール過酸化物の量的変化を検討した。

アルコール性肝疾患の診断基準に基づき、剖検肝の肉眼的及び組織学的所見から診断されたアルコール性脂肪肝12例、アルコール性肝硬変12例、飲酒歴がないか又は機会飲酒で肝に異常を認めない9例を対象とした。剖検肝組織約0.2gからFolch法によって粗脂質を抽出した。更に、この粗脂質をSep-Pak®(-NH₂)を用いて固相抽出した。得られたコレステロール画分を減圧濃縮乾固させ、これを少量のメタノールに溶解させたものを化学発光検出器付高速液体クロマトグラフ法(CL-HPLC)にて分析した。定量は内部標準添加法により行った。

アルコール性脂肪肝、アルコール性肝硬変、正常肝のいずれからでも、コレステロール過酸化物である7 α -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol(7 α -OOH)と7 β -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol(7 β -OOH)を検出した。

コレステロール過酸化物の定量結果を比較すると、アルコール性脂肪肝では、7 α -OOH、7 β -OOHともに正常肝に比べ約10倍の高値を示した。一方、アルコール性肝硬変と正常肝の間には有意差を認めなかった。肝硬変では線維化が進行し、過酸化反応の基質となるコレステロール量が減少している可能性があるため、コレステロールに対するコレステロール過酸化物の割合(%)を計算した。その結果、アルコール性脂肪肝では7 α -OOH/cholesterol及び7 β -OOH/cholesterolは正常肝よりも高値であったが、肝硬変では有意差は認めなかった。

7 α -OOH及び7 β -OOHはコレステロール酸化の第一段階の反応生成物であるため、両者の蓄積は生体内での過剰な酸化ストレスを反映していると考えられている。

一方、ミクロゾームエタノール酸化系の中心酵素であるcytochrome P450 2E1(CYP2E1)は高いラジカル産生能を有し、又、アルコールの慢性摂取は肝臓におけるCYP2E1の誘導を引き起こすことが知られている。CYP2E1の誘導の程度とフリーラジカルの産生量が相関するとの報告があることから、アルコール性脂肪肝では同酵素の増加によりフリーラジカル産生が増大していると考えら

れる。従って、長期にわたるアルコール摂取がフリーラジカルの産生増大につながって生体への過剰な酸化ストレスを招来し、これがアルコール性脂肪肝でのコレステロール過酸化物蓄積の一因となった可能性がある。これに対し、病期が進行し肝硬変に至ると、肝細胞の機能低下によってフリーラジカル産生が低下し、 7α -OOH 及び 7β -OOH の生成はむしろ抑制されている可能性が考えられる。即ち、アルコール性脂肪肝での 7α -OOH 及び 7β -OOH の蓄積は、アルコール性肝障害の初期段階での酸化ストレスの増大・脂質過酸化の亢進を示唆していると考えられた。

本研究はアルコール性肝障害におけるコレステロール過酸化物の量的変化を研究したものであるが、アルコール性脂肪肝におけるコレステロール過酸化物 7α -及び 7β -hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol の蓄積を初めて直接に明らかにし、アルコール性肝障害の初期段階で脂質過酸化の亢進が示唆されることを示したものであり、アルコール性肝障害と脂質過酸化との関連について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。