



# Effect of chronic ethanol feeding on oxysterols in rat liver

有吉, 孝一

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2666

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002666>

※ 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。



【 1 5 5 】

氏 名 ・ ( 本 籍 ) 有 吉 孝 一 ( 福 岡 県 )

博士の専攻分野の名称 博士 ( 医学 )

学 位 記 番 号 博ろ第1863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15年3月6日

【 学位論文題目 】

Effect of Chronic Ethanol Feeding on Oxysterols in Rat Liver  
(アルコール慢性投与ラットにおける肝臓の脂質過酸化)

審 査 委 員

主 査 教 授 上 野 易 弘

教 授 石 井 昇

教 授 横 崎 宏

## 1. 緒言

エタノール代謝の過程で生じるスーパーオキシドを初めとするフリーラジカルは、肝臓における脂質過酸化を助長したり酸素需要を高めたりすることにより、肝障害発症に関与していることが示されている。最近、コレステロールの7位酸化物が生体内酸化ストレスの指標となることが示された。そこで、1) 慢性エタノール摂取が肝コレステロール過酸化物に与える影響を検討すること、2) コレステロール7位酸化物である7-hydroxycholesterol (7-OH) および7-ketocholesterol (7-keto) の測定法を確立し、これら酸化物がエタノール慢性投与によりどのような影響を受けるかを検討することを目的として本研究を行った。

## 2. 方法

### (1) 試薬

同定用標品とした cholesterol は Sigma 社より、7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OH) および7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OH)、7-keto は Sternaloids 社より購入した。5 $\alpha$ -hydroperoxycholesterol (5 $\alpha$ -OOH)、7 $\alpha$ -hydroperoxycholesterol (7 $\alpha$ -OOH)、7 $\beta$ -hydroperoxycholesterol (7 $\beta$ -OOH) は合成した。内部標準物質の5 $\alpha$ -hydroperoxy- $\beta$ -sitosterol は合成し、 $\beta$ -sitosterol は Sternaloids 社より購入した。抗酸化剤 butylhydroxytoluene、化学発光試薬として使用したルミノールおよびチトクローム C は和光純薬(株)より購入した。

### (2) エタノール慢性投与

Wistar 系雄性ラット(体重約100 g)を実験に供した。Lieber 等の方法により、総カロリー35%のエタノールを含む液体飼料で飼育した慢性エタノール投与群(n=7)、エタノールを炭水化物で置換し総カロリーを等しくした飼料で飼育した対照群(n=7)を設定し、pair-feedingを行った。飼育6週間後にラットを屠殺し、肝臓を摘出した。

### (3) コレステロール過酸化物の分析

採取した肝臓小片約0.1 gからFolch法により粗脂質を抽出し、さらに固相にSep-Pak-NH<sub>2</sub>を用い、クロロホルム/イソプロパノールを溶出溶媒とした固相抽出法によりコレステロール画分を分取した。既報に従い、化学発光検出高速液体クロマトグラフ法(HPLC-CL)により7 $\alpha$ -OOH及び7 $\beta$ -OOHの定量を行った。

### (4) コレステロール酸化物の分析

上述のコレステロール画分を紫外吸収高速液体クロマトグラフ法(HPLC-UV)により分析した。液クロのポンプにはHitachi L-7000を用い、検出器はSPD-10A vp (Shimadzu)を用いた。カラムはODS-2 (150 $\times$ 4.0 mm)を用い、移動相にはアセトニトリル/メタノール/水(46:45:9)を流速0.7 ml/minで用いた。7 $\alpha$ -OHおよび7 $\beta$ -OH、コレステロールは紫外吸収波長210 nmで、7-ketoは245 nmで測定した。

### (5) 統計処理

統計処理はStudent's t-testにて行い、危険率5% (P<0.05)をもって有意差ありとした。

## 3. 結果

### (1) コレステロール過酸化物の分析

ラット肝臓の全例よりコレステロール過酸化物である7 $\alpha$ -OOHおよび7 $\beta$ -OOHを検出した。5 $\alpha$ -OOHはいずれからも検出しなかった。エタノール投与群では7 $\alpha$ -OOHおよび7 $\beta$ -OOHは有意に増加した。

### (2) コレステロール酸化物の分析

コレステロール酸化物の標準品および肝臓抽出物のHPLC-UV分析によるクロマトグラムにおいて、210 nmではコレステロールおよび7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-ketoの3種のコレステロール酸化物が検出された。一方、共役ジエンを有する7-ketoは245 nm付近に吸収ピークを持つので、245 nmでは7-ketoが高感度に検出された。いずれも分離は良好であった。 $\beta$ -sitosterolを内部標準として定量したところ、検量線は良好な直線性を示した。

エタノール投与群と対照群を比較すると、7 $\alpha$ -OH及び7 $\beta$ -OHには有意差がなかった。一方、7-ketoの著明な増加を認め、コレステロールはエタノール投与群で約43%減少した。

## 4. 考察

### (1) コレステロール過酸化物

コレステロール過酸化物はアルコール常用者の赤血球膜や肝臓で増加することが知られている。今回我々は、慢性エタノール投与が肝臓でのコレステロール過酸化物(7-OOH)を増加させることを示した。エタノールのアセトアルデヒド、更に酢酸への代謝過程においてフリーラジカルが産生されるため、慢性エタノール摂取は持続的にフリーラジカル産生が増大した状態を招来している。従って、7 $\alpha$ -OOH及び7 $\beta$ -OOHの蓄積は肝臓での脂質過酸化の亢進を示し、長期アルコール摂取に伴う持続的な酸化ストレスの存在を示唆している。

### (2) コレステロール酸化物と肝障害

7-ketoが著明に増加したにもかかわらず、7-OHの増加が認められないのは、7-OOHから7-ketoへの酸化反応は亢進するが、7-OOHから7-OHへの還元反応は亢進しないためと考えられる。また、慢性エタノール摂取は抗酸化物質である肝グルタチオンやグルタチオンペルオキシダーゼを低下させ、酸化ストレスに対する抵抗性を減ずる事も酸化反応亢進の一因となる。

コレステロールの生合成経路において、Hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA)からHMG-CoA還元酵素の働きにより、メバロネート、コレステロールへと合成が起こる。エタノール慢性投与により肝臓で増加した7-ketoは、コレステロール生合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の働きを阻害する為、コレステロール生成が抑制されるのだと考えられる。即ち、7-ketoが増加する結果、コレステロールが減少すると考えられ、何れの変化も生体内での酸素ストレス増大を反映したものであると考えられる。

我々は、肝臓で増加したコレステロール酸化物は、細胞毒性を有する事によりアルコール性肝障害と密接な関係があると考えている。7-ketoはまた、肝細胞中でのアルブミン合成も抑制することが知られており、アルコール症患者の血清アルブミン濃度が低い事、肝臓での蛋白合成抑制が認められる事等を考え合わせると、慢性エタノール投与による肝コレステロ

ール酸化物の増加とアルコール性肝機能障害との関連を示す重要な知見である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

## 5. 結論

(1) コレステロール酸化物（7 $\alpha$ -OH 及び 7 $\beta$ -OH、7-keto）の定量方法を確立した。

(2) エタノール慢性投与では、肝臓においてコレステロール過酸化物（7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH）に加え 7-keto の増加を認めた。これらの増加は肝臓での酸化ストレスの増大を示唆している。

(3) 肝臓のコレステロールは減少した。これは、7-keto の HMG-CoA 還元酵素に対する抑制作用によりコレステロール生成が阻害される為であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1865号	氏 名	有吉孝一
論文題目	Effect of Chronic Ethanol Feeding on Oxysterols in Rat Liver アルコール慢性投与ラットにおける肝臓の脂質過酸化		
審査委員	主 査	上野 易弘	
	副 査	石井 昇	
	副 査	横崎 春	
審査終了日	平成 15 年 2 月 19 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

エタノール代謝の過程で生じるスーパーオキシド等のフリーラジカルは、肝臓における脂質過酸化を助長したり酸素需要を高めたりすることにより、肝障害発症に関与していることが示されている。

本研究は、1) 慢性エタノール摂取が肝コレステロール過酸化物 ( $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH) に与える影響を検討すること、2) コレステロール 7 位酸化物である  $7$ -hydroxycholesterol ( $7$ -OH) 及び  $7$ -ketocholesterol ( $7$ -keto) の測定法を確立し、これら酸化物がエタノール慢性投与によりどのような影響を受けるかを検討することを目的として行なわれた。

Wistar 系雄性ラット (体重約 100 g) を用い、総カロリーの 35% のエタノールを含む液体飼料で飼育した慢性エタノール投与群 ( $n=7$ )、エタノールを炭水化物で置換し総カロリーを等しくした飼料で飼育した対照群 ( $n=7$ ) を設定し、pair-feeding を行った。飼育 6 週間後にラットを屠殺し、肝臓を摘出した。

肝臓小片約 0.1 g から粗脂質を抽出し、化学発光検出器附高速液体クロマトグラフ法 (HPLC-CL) により  $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH の定量を行った。 $7\alpha$ -OH 及び  $7\beta$ -OH、 $7$ -keto、コレステロールは紫外吸収高速液体クロマトグラフ法 (HPLC-UV) により分析した。

ラット肝臓の全例より  $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH を検出した。 $5\alpha$ -OOH は何れからも検出なかった。エタノール投与群では  $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH は有意に増加した。

コレステロール酸化物の標準品及び肝臓抽出物の HPLC-UV 分析によるクロマトグラムにおいて、210nm ではコレステロール及び  $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH、 $7$ -keto の 3 種のコレステロール酸化物が検出された。一方、共役ジエンを有する  $7$ -keto は 245nm 附近に吸収ピークを持つので、245nm では  $7$ -keto が高感度に検出された。いずれも分離は良好であった。

エタノール投与群と対照群を比較すると、 $7\alpha$ -OH 及び  $7\beta$ -OH には有意差がなかった。一方、エタノール投与群で  $7$ -keto の著明な増加を認め、コレステロールはエタノール投与群で約 43% 減少した。

本研究は、慢性エタノール投与が肝臓でのコレステロール過酸化物 ( $7$ -OOH) を増加させることを明らかにした。エタノールのアセトアルデヒド、更に酢酸への代謝過程においてフリーラジカルが産生される為、慢性エタノール摂取は持続的にフリーラジカル産生が増大した状態を招来している。従って、 $7\alpha$ -OOH 及び  $7\beta$ -OOH の蓄積は肝臓での脂質過酸化の亢進を示し、長期アルコール摂取に伴う持続的な酸化ストレスの存在を示唆している。

$7$ -keto が著明に増加したにもかかわらず、 $7$ -OH の増加が認められないのは、 $7$ -OOH から  $7$ -keto への酸化反応は亢進するが、 $7$ -OOH から  $7$ -OH への還元反応は亢進しないためと考えられる。又、慢性エタノール摂取は抗酸化物質である肝グルタチオンやグルタチオンペルオキシダーゼを低下させ、酸化ストレスに対する抵抗性を減ずる事も酸化反応亢進の一因となる。

エタノール慢性投与により肝臓で増加した  $7$ -keto は、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の働きを阻害する為、コレステロール生成が抑制されるのだと考えられる。即ち、 $7$ -keto が増加する結果、コレステロールが減少すると考えられ、何れの変化も生体内での酸素ストレス増大を反映したものであると考えられる。

$7$ -keto はまた、肝細胞でのアルブミン合成も抑制することが知られており、アルコール症患者の血清アルブミン濃度が低い事、肝臓での蛋白合成抑制が認められる事等を考え合わせると、慢性エタノール投与による肝コレステロール酸化物の増加とアルコール性肝機能障害との関連を示す重要な知見である。

本研究は、慢性アルコール摂取によるラット肝コレステロール過酸化物並びに酸化物の量的変化について研究したものであるが、コレステロール酸化物の定量方法を確立すると共に、慢性摂取により肝臓にコレステロール過酸化物及び酸化物が増加することを明らかにして、肝臓での酸化ストレスの増大を示唆したものであり、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。