



# Protective effect of daidzein against acute ethanol-induced lipid peroxidation in rat jejunum

Nakagawa, Kanako

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-01-10

(Date of Publication)

2013-03-18

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2915

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002915>

※ 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。



【 177 】

氏 名・(本 籍) 中川 加奈子 ( 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1994号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成19年1月10日

【 学位論文題目 】

Protective effect of daidzein against acute ethanol-induced lipid  
peroxidation in rat jejunum  
(アルコール急性投与ラットの空腸における脂質過酸化と  
ダイゼインの抗酸化効果)

審 査 委 員

主 査 教 授 西尾 久英  
教 授 林 祥剛  
教 授 東 健

## 1. 緒言

アルコールが人体に及ぼす影響は、これまで多岐に亘って研究され、様々な臓器障害の発生及び進展の機序が解明されてきている。エタノールは腸管透過性を亢進し、腸内細菌由来エンドトキシンは門脈を経てクッパー細胞の活性化を惹起、過剰産生された炎症性サイトカイン、障害性メディエータにより組織障害、臓器障害へと進展していくと示唆されている。我々はこれまでにリン脂質ヒドロペルオキシド(PCOOH)がアルコール依存症患者の血漿中に、またコレステロール過酸化物が同患者赤血球膜に蓄積していること、加えてアルコール慢性投与ラットの肝臓のみならず、心筋や骨格筋にオキシステロールが蓄積していることを見出し、アルコールにより脂質過酸化が亢進することを示した。

今回はラットにアルコールを急性投与し、空腸組織中コレステロール過酸化物及びオキシステロールを測定することにより、アルコールの小腸に対する脂質過酸化への影響を調べた。また同時にアルコール投与前に大豆イソフラボン(ダイゼイン)を投与し、この抗酸化作用についても検討を行った。

## 2. 方法

### (1) 実験計画

Wistar 系雄性ラット(体重 100~200g)に 75 mmol/kg のエタノール(対照群には生理食塩水)を腹腔内投与した。またダイゼイン 100 mg/kg(対照群には 20%w/v 脂肪乳液)は、エタノール投与の 25 時間前と 1 時間前の 2 回、腹腔内に前投与しておいた。エタノール投与 24 時間後に断頭し、空腸を摘出した。投与方法により分類される各群の組合せは次の通りである。

[A 群] 脂肪乳液+生理食塩水 (対照群)

[B 群] ダイゼイン+生理食塩水

[C 群] 脂肪乳液+エタノール

[D 群] ダイゼイン+エタノール

### (2) コレステロール過酸化物及び酸化物の測定

Folch 法に従い空腸組織からクロロホルム/メタノールにより総脂質を抽出し、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(Sep-Pak NH2)を用いた固相抽出によりコレステロール画分を分取精製した。

コレステロール過酸化物である  $7\alpha$ -hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol ( $7\alpha$ -OOH)及び  $7\beta$ -hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol ( $7\beta$ -OOH)は化学発光検出器付高速液体クロマトグラフ(HPLC-CL)で測定した。発光試薬としてルミノール/チトクロム C、カラムは TSK gel Octyl-80Ts、移動相にはメタノール：水：アセトニトリル(89:9:2)を使用し、内部標準物質として $\beta$ -sitosterol-5 $\alpha$ -hydroperoxideを用いた。

また UV 検出器付 HPLC でオキシステロールの cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol( $7\alpha$ -OH)及び

cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol ( $7\beta$ -OH)は測定波長 210nm で、 $3\beta$ -hydroperoxycholest-5-en-7-one ( $7$ -keto)は測定波長 245nm で測定した。カラムは Inertsil ODS-2 を使い、移動相にはアセトニトリル：メタノール：水(46:45:9)を使用し、 $\beta$ -sitosterol を内部標準物質として分析を行った。

統計処理は一元配置分散分析法で行い、危険率 5%( $p<0.05$ )をもって有意差ありとした。

## 3. 結果

ラットに 75 mmol/kg のエタノールを腹腔内投与すると、投与 2.5 時間後に血中アルコール濃度は 3 mg/ml に上昇し、24 時間後には血中からほぼ消失した。

### (1) 対照ラット(A 群)

空腸組織中  $7\alpha$ -OOH と  $7\beta$ -OOH の平均値はそれぞれ 2.10 nmol/g と 9.95 nmol/g、 $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH、 $7$ -keto の平均値はそれぞれ 32 nmol/g、195 nmol/g、226 nmol/g であった。

### (2) ダイゼイン投与の影響(B 群)

ダイゼイン投与が空腸組織中のコレステロール過酸化物( $7\alpha$ -OOH、 $7\beta$ -OOH)に及ぼす影響はなかった。また空腸オキシステロール( $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH、 $7$ -keto)に及ぼす影響は有意ではなかった。

### (3) エタノール投与の影響(C 群)

エタノールを 1 回投与した場合、24 時間後に  $7\alpha$ -OOH(90%増)、 $7\beta$ -OOH(31%増)、 $7\alpha$ -OH(59%増)、 $7\beta$ -OH(38%増)、 $7$ -keto(44%増)はいずれも有意に増加した。

### (4) ダイゼイン前投与の効果(C 群と D 群の比較)

ダイゼイン前投与後にエタノールを投与した場合、空腸組織中のコレステロール過酸化物やオキシステロールは、エタノールのみ投与した C 群のほぼ 70%に有意に低下した。

## 4. 考察

アルコールの急性投与は、小腸粘膜上皮への直接あるいは間接毒性により絨毛細管性液の漏出亢進と、絨毛上皮の出血性壊爛、及び絨毛先端の剥脱を起し、以下に列挙する現象の発生を容易にする。すなわち、粘膜上皮の透過性が亢進、エンドトキシンの門脈血への移行を促進し、エンドトキシン血症を引き起こす。また、TNF- $\alpha$ 、IL-1、活性酸素の遊離を亢進する。さらにアルコールは腸管に対し微量金属セレン(Se)の吸収障害を起こさせ、Se 欠乏に至る。一方、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)は過酸化脂質を消去する酵素として知られ、その活性部位はセレノシスティンの形で存在することから、Se が欠乏すると GSHPx の活性低下が起こり、過酸化脂質の分解が遅れる。すなわちアルコールは小腸において活性酸素の生成系を促進させ、一方では消去系を低下させることにより、小腸上部(空腸)での酸化ストレスが高まることが容易に考えられる。

我々は今回の実験において、アルコール 1 回投与でも空腸にコレステロール過酸化物( $7\alpha$ -OOH、 $7\beta$ -OOH)やオキシステロール( $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH、 $7$ -keto)が対照に比較して著明

に蓄積する(31~90%)ことを見出し、アルコールは空腸におけるコレステロールの過酸化を明らかに亢進させること、すなわちアルコール投与により小腸に酸化ストレスが増加することを示した。

ダイゼインは大豆イソフラボン的一种で、味噌・納豆等の大豆発酵食品中に多く含まれる。フラボノイド類には消化管粘膜に対する酸化ストレスを軽減し得る可能性があると考えられている。今回ダイゼインのみを投与した(B群)時には、空腸組織中のコレステロール過酸化物、オキシステロールともに対照群(A群)と比較して差はなかった。すなわちダイゼインの単独投与には抗酸化効果は認められなかった。次に、ダイゼイン前投与後にアルコールを投与した群(D群)の小腸中コレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH)やオキシステロール(7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto)濃度は、アルコールのみ投与した群(C群)の約70%に有意に低下した。すなわちダイゼインとエタノールを投与すると酸化ストレスが抑制されることがわかった。

ところで、葛や葛根はダイゼイン(配糖体)やダイゼイン(無糖)を含む。これらをアルコール嗜好性ラットやゴールデンハムスターに経口投与すると、アルコールの自発摂取量を減らし、また離脱症状を和らげることから、近年これらの物質が持つアルコール乱用を防ぐ(antidipsotropic)作用が注目されている。Antidipsotropic作用の機序については未解明であるが、これらイソフラボン系化合物がアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)を阻害することにより、アセトアルデヒドが血中に蓄積するため、結果としてアルコール摂取量が減少するのではないかと考え方がある。一方でイソフラボン系化合物はALDH2活性に影響を及ぼさないという報告もある。しかしALDH2の活性阻害は直接には脂質過酸化に影響を及ぼさない。我々は以前にシアナミド前投与の有無が、エタノール投与時のラット足底筋におけるコレステロール過酸化物の上昇に影響しないことを明らかにした。このことより、ダイゼインとエタノールの併用が脂質過酸化を抑制する機序として、ダイゼインのALDH2活性阻害作用は関係しないと考えている。

## 5. 結論

今回の実験において、我々はアルコール1回投与でも空腸にコレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH)やオキシステロール(7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto)が対照に比較して著明に蓄積する(31~90%)ことを見出し、アルコールは空腸におけるコレステロールの過酸化を明らかに亢進させること、すなわち、アルコール投与により小腸に酸化ストレスが起こること、並びにその影響はダイゼインにより抑制されることを示した。

### 論文審査の結果の要旨

受付番号	乙第1999号	氏名	中川 加奈子
論文題目 Title of Dissertation	Protective Effect of Daidzein against Acute Ethanol-induced Lipid Peroxidation in Rat Jejunum アルコール急性投与ラットの空腸における脂質過酸化とダイゼインの抗酸化作用		
審査委員 Examiner	主査 西尾久英 Chief Examiner 副査 林 祥剛 Vice-examiner 副査 栗 健 Vice-examiner		
審査終了日	平成18年12月21日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

## 1. 緒言

アルコールが人体に及ぼす影響は、これまで多岐に亘って研究され、様々な臓器障害の発生及び進展の機序が解明されてきている。エタノールは腸管透過性を亢進し、腸内細菌由来エンドトキシンは門脈を経てクッパー細胞の活性化を惹起、過剰産生された炎症性サイトカイン、障害性メディエータにより組織障害、臓器障害へと進展していくと示唆されている。我々はこれまでにリン脂質ヒドロペルオキシド(PCOOH)がアルコール依存症患者の血漿中に、またコレステロール過酸化物が同患者赤血球膜に蓄積していること、加えてアルコール慢性投与ラットの肝臓のみならず、心筋や骨格筋にオキシステロールが蓄積していることを見出し、アルコールにより脂質過酸化が亢進することを示した。

今回はラットにアルコールを急性投与し、空腸組織中コレステロール過酸化物及びオキシステロールを測定することにより、アルコールの小腸に対する脂質過酸化への影響を調べた。また同時にアルコール投与前に大豆イソフラボン(ダイゼイン)を投与し、この抗酸化作用についても検討を行った。

## 2. 方法

### (1) 実験計画

Wistar 系雄性ラット(体重 100~120g)に 75 mmol/kg のエタノール(対照群には生理食塩水)を腹腔内投与した。またダイゼイン 100 mg/kg(対照群には 20%w/v 脂肪乳液)は、エタノール投与の 25 時間前と 1 時間前の 2 回、腹腔内に前投与しておいた。エタノール投与 24 時間後に断頭し、空腸を摘出した。投与方法により分類される各群の組合せは次の通りである。

[A 群] 脂肪乳液+生理食塩水 (対照群)

[B 群] ダイゼイン+生理食塩水

[C 群] 脂肪乳液+エタノール

[D 群] ダイゼイン+エタノール

### (2) コレステロール過酸化物及び酸化物の測定

Folch 法に従い空腸組織からクロロホルム/メタノールにより総脂質を抽出し、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(Sep-Pak NH<sub>2</sub>)を用いた固相抽出によりコレステロール画分を分取精製した。

コレステロール過酸化物である 7 $\alpha$ -hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol (7 $\alpha$ -OOH)及び 7 $\beta$ -hydroperoxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol (7 $\beta$ -OOH)は化学発光検出器付高速液体クロマトグラフ(HPLC-CL)で測定した。発光試薬としてルミノール/チトクロム C、カラムは TSK gel Octyl-80Ts、移動相にはメタノール:水:アセトニトリル(89:9:2)を使用し、内部標準物質として $\beta$ -sitosterol-5 $\alpha$ -hydroperoxideを用いた。

また UV 検出器付 HPLC でオキシステロールの cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol(7 $\alpha$ -OH)及び

cholest-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol (7 $\beta$ -OH)は測定波長 210nm で、3 $\beta$ -hydroperoxycholest-5-en-7-one (7-keto)は測定波長 245nm で測定した。カラムは Inertsil ODS-2 を使い、移動相にはアセトニトリル:メタノール:水(46:45:9)を使用し、 $\beta$ -sitosterol を内部標準物質として分析を行った。

統計処理は一元配置分散分析法で行い、危険率 5%( $p < 0.05$ )をもって有意差ありとした。

## 3. 結果

ラットに 75 mmol/kg のエタノールを腹腔内投与すると、投与 2.5 時間後に血中アルコール濃度は 3 mg/ml に上昇し、24 時間後には血中からほぼ消失した。

### (1) 対照ラット(A 群)

空腸組織中 7 $\alpha$ -OOH と 7 $\beta$ -OOH の平均値はそれぞれ 2.10 nmol/g と 9.95 nmol/g、7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto の平均値はそれぞれ 32 nmol/g、195 nmol/g、226 nmol/g であった。

### (2) ダイゼイン投与の影響(B 群)

ダイゼイン投与が空腸組織中のコレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH)に及ぼす影響はなかった。また空腸オキシステロール(7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto)に及ぼす影響は有意ではなかった。

### (3) エタノール投与の影響(C 群)

エタノールを 1 回投与した場合、24 時間後に 7 $\alpha$ -OOH(90%増)、7 $\beta$ -OOH(31%増)、7 $\alpha$ -OH(59%増)、7 $\beta$ -OH(38%増)、7-keto(44%増)はいずれも有意に増加した。

### (4) ダイゼイン前投与の効果(C 群と D 群の比較)

ダイゼイン前投与後にエタノールを投与した場合、空腸組織中のコレステロール過酸化物やオキシステロールは、エタノールのみ投与した C 群のほぼ 70%に有意に低下した。

## 4. 考察

アルコールの急性投与は、小腸粘膜上皮への直接あるいは間接毒性により絨毛細管性液の漏出亢進と、絨毛上皮の出血性糜爛、及び絨毛先端の剥脱を起し、以下に列挙する現象の発生を容易にする。すなわち、粘膜上皮の透過性が亢進、エンドトキシンの門脈血への移行を促進し、エンドトキシン血症を引き起こす。また、TNF- $\alpha$ 、IL-1、活性酸素の遊離を亢進する。さらにアルコールは腸管に対し微量金属セレン(Se)の吸収障害を起させ、Se 欠乏に至る。一方、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)は過酸化脂質を消去する酵素として知られ、その活性部位はセレノシスティンの形で存在することから、Se が欠乏すると GSHPx の活性低下が起り、過酸化脂質の分解が遅れる。すなわちアルコールは小腸において活性酸素の生成系を促進させ、一方では消去系を低下させることにより、小腸上部(空腸)での酸化ストレスが高まることが容易に考えられる。

我々は今回の実験において、アルコール 1 回投与でも空腸にコレステロール過酸化物

(7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH)やオキシステロール(7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto)が対照に比較して著明に蓄積する(31~90%)ことを見出し、アルコールは空腸におけるコレステロールの過酸化を明らかに亢進させること、すなわちアルコール投与により小腸に酸化ストレスが増加することを示した。

ダイゼインは大豆イソフラボン的一种で、味噌・納豆等の大豆発酵食品中に多く含まれる。フラボノイド類には消化管粘膜に対する酸化ストレスを軽減し得る可能性があると考えられている。今回ダイゼインのみを投与した(B群)時には、空腸組織中のコレステロール過酸化物、オキシステロールともに対照群(A群)と比較して差はなかった。すなわちダイゼインの単独投与には抗酸化効果は認められなかった。次に、ダイゼイン前投与後にアルコールを投与した群(D群)の小腸中コレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH)やオキシステロール(7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto)濃度は、アルコールのみ投与した群(C群)の約70%に有意に低下した。すなわちダイゼインとエタノールを投与すると酸化ストレスが抑制されることがわかった。

ところで、葛や葛根はダイゼイン(配糖体)やダイゼイン(無糖)を含む。これらをアルコール嗜好性ラットやゴールデンハムスターに経口投与すると、アルコールの自発摂取量を減らし、また離脱症状を和らげることから、近年これらの物質を持つアルコール乱用を防ぐ(antidipsotropic)作用が注目されている。Antidipsotropic作用の機序については未解明であるが、これらイソフラボン系化合物がアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)を阻害することにより、アセトアルデヒドが血中に蓄積するため、結果としてアルコール摂取量が減少するのではないかと考え方があ。一方でイソフラボン系化合物はALDH2活性に影響を及ぼさないという報告もある。しかしALDH2の活性阻害は直接には脂質過酸化に影響を及ぼさない。我々は以前にシアナミド前投与の有無が、エタノール投与時のラット足底筋におけるコレステロール過酸化物の上昇に影響しないことを明らかにした。このことより、ダイゼインとエタノールの併用が脂質過酸化を抑制する機序として、ダイゼインのALDH2活性阻害作用は関係しないと考えている。今回の実験において、我々はアルコール1回投与でも空腸にコレステロール過酸化物(7 $\alpha$ -OOH、7 $\beta$ -OOH)やオキシステロール(7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto)が対照に比較して著明に蓄積する(31~90%)ことを見出し、アルコールは空腸におけるコレステロールの過酸化を明らかに亢進させること、すなわち、アルコール投与により小腸に酸化ストレスが起こること、並びにその影響はダイゼインにより抑制されることを示した。

本研究は、アルコールについて、その人体に及ぼす影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった空腸におけるアルコール摂取による酸化ストレス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。