

宮 崎 大 学 大 学 院
博 士 学 位 論 文

アルコール関連薬物代謝調節作用を標的とした
機能性食品に関する研究

2020 年 3 月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

山崎 楓

目 次

略語	i
第 1 章 序論	1
第 2 章 アルコール単回投与ラットモデルに対するブルーベリー葉抽出物の 投与の影響	
2.1 緒言	5
2.2 実験方法	
2.2.1 ブルーベリー葉抽出物の調製	6
2.2.2 ラットによる投与試験	7
2.2.3 血清エタノール濃度の測定	8
2.2.4 血清アセトアルデヒド濃度の測定	9
2.2.5 肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロ ゲナーゼ活性の測定	10
2.2.6 肝臓ミクロソームの分画と CYP2E1 タンパク質発現量の解析	11
2.2.7 肝臓の mRNA 発現量の解析	13
2.2.8 血清の生化学検査	14
2.2.9 肝臓トリグリセリドレベルの測定	15
2.2.10 統計処理	15
2.3 結果	
2.3.1 血清エタノール濃度とアセトアルデヒド濃度への影響	15

2.3.2	肝臓のアルコール代謝酵素の活性とタンパク質発現量、mRNA 発現量への影響	17
2.3.3	アルコール性肝障害への影響	19
2.3.4	肝臓トリグリセリドレベルへの影響	19
2.4	考察	20
2.5	小括	21

第3章 アルコール継続摂取ラットモデルに対するブルーベリー葉抽出物の 摂食の影響

3.1	緒言	23
3.2	実験方法	
3.2.1	ブルーベリー葉抽出物の調製	24
3.2.2	ラットによる摂食試験	24
3.2.3	血清の生化学検査	25
3.2.4	肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロ ゲナーゼ活性の測定	26
3.2.5	肝臓ミクロソームの分画と CYP2E1 タンパク質発現量の解析	26
3.2.6	肝臓の mRNA 発現量の解析	26
3.2.7	肝臓のカルボニル化タンパク質量の解析	27
3.2.8	肝臓トリグリセリドレベルと総コレステロールレベルの測定	28
3.2.9	統計処理	29
3.3	結果	
3.3.1	体重、摂食量、肝重量への影響	29
3.3.2	アルコール性肝障害への影響	31

3.3.3	肝臓のアルコール代謝酵素の活性とタンパク質発現量、mRNA 発現量への影響	32
3.3.4	肝臓のカルボニル化タンパク質量と HO-1 の mRNA 発現量への 影響	34
3.3.5	肝臓トリグリセリドレベルと総コレステロールレベルへの影響	34
3.4	考察	35
3.5	小括	39

第4章 *In vitro* 評価系におけるアルコール性肝細胞毒性の誘導とブルーベ リー葉抽出物の効果

4.1	緒言	40
4.2	実験方法	
4.2.1	細胞培養方法	41
4.2.2	ブルーベリー葉抽出物の調製	41
4.2.3	培養細胞へのサンプル処理	41
4.2.4	細胞毒性試験	43
4.2.5	細胞周期解析	43
4.2.6	細胞内活性酸素種量解析	43
4.2.7	カルボニル化タンパク質量の解析	44
4.2.8	CYP2E1 タンパク質量の解析	44
4.2.9	培地中の過酸化水素量の測定	45
4.2.10	統計処理	45

4.3	結果	
4.3.1	エタノールおよびアセトアルデヒドの単独処理と併用処理による 細胞毒性への影響	45
4.3.2	エタノールおよびアセトアルデヒドの単独処理と併用処理による 細胞周期への影響	47
4.3.3	エタノールおよびアセトアルデヒドの単独処理と併用処理による 酸化ストレスへの影響	48
4.3.4	エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスへの CYP2E1 の関与	49
4.3.5	エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスへの NADPH オキシダーゼの関与	51
4.3.6	BLEx 処理による培地中の過酸化水素量への影響	51
4.3.7	BLEx 処理によるアルコール性肝細胞毒性への影響	52
4.4	考察	53
4.5	小括	57
第5章	総括	59
	参考文献	64
	謝辞	75

略語

本文中では、以下の略語を使用した。

- 67LR : 67-kDa ラミニンレセプター (67-kDa laminin receptor)
- ADH : アルコールデヒドロゲナーゼ (Alcohol dehydrogenase)
- A/G 比 : アルブミン/グロブリン比 (Albumin/Globulin)
- ALDH : アルデヒドデヒドロゲナーゼ (Aldehyde dehydrogenase)
- ALT : アラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine transaminase)
- ANOVA : Analysis of variance
- AST : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate transaminase)
- AUC : 血清濃度-時間曲線下面積 (Area under the curve)
- BCA : Pierce® Bicinchoninic Acid
- BLEx : ブルーベリー葉抽出物 (Blueberry leaf extract)
- CYP2E1 : シトクローム P450 2E1 (Cytochrome P450 2E1)
- DCF : 2',7'-ジクロロジヒドロフルオロセイン
(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein)
- DCFH-DA : 2',7'-ジクロロジヒドロフルオロセイン二酢酸
(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)
- DNPH : 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-Dinitrophenylhydrazine)
- EDTA : エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)
- FBS : ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum)
- G0 : Gap 0
- G1 : Gap 1
- G2 : Gap 2

- HClO_4 : 過塩素酸 (Perchloric acid)
- HO-1 : ヘムオキシゲナーゼ-1 (Heme oxygenase-1)
- M : Mitosis and cytokinesis
- MEOS : ミクロソーム・エタノール酸化系
(Microsomal ethanol oxidizing system)
- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: ピロリン酸ナトリウム (Sodium pyrophosphate)
- NaCl : 塩化ナトリウム (Sodium chloride)
- NADH : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
(Nicotinamide adenine dinucleotide)
- NaF : フッ化ナトリウム (Sodium fluoride)
- PBS : リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)
- PI : ヨウ化プロピジウム (Propidium iodide)
- PVDF : AmershamTM HybondTM P 0.45 PVDF
- RNA : リボ核酸 (Ribonucleic acid)
- ROS : 活性酸素種 (Reactive oxygen species)
- S : Synthesis
- SD : 標準偏差 (Standard deviation)
- SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate)
- SD ラット : Sprague-Dawley ラット
- SE : 標準誤差 (Standard error)
- T-Chol : 総コレステロール (Total cholesterol)
- TG : トリグリセリド (Triglyceride)
- Tris : トリス
- Tris-HCl : トリス塩酸

- T-TBS : Tween-20 含有 Tris 緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline)
- Wako : FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
- WHO : 世界保健機関 (World Health Organization)

第1章 序論

酒は「百薬の長」と呼ばれるように、適度な飲酒は心血管疾患やがんによる死亡リスクの減少など良い影響を与えている¹⁾。また、「ノミネーション」という言葉があるように、飲酒によってコミュニケーションが円滑に進むことがある。しかし、アルコールの過度な摂取は急性アルコール中毒やアルコール性肝障害といった身体的な障害を起こすだけでなく、アルコール依存症やうつ病の合併などの精神疾患や飲酒運転、家庭内暴力といった社会的な深刻な問題を起こすことが知られている^{2,3)}。実際に、世界保健機関 (WHO) は 2009 年に健康障害別に疾病や障害によって失われた年数を指標とする障害調節生命年をまとめたデータを示しているが、飲酒はその中で 3 番目に大きいことが示された⁴⁾。この結果をもとに WHO は 2010 年にアルコールの摂取に対する世界戦略を発表している⁵⁾。しかし、WHO が 2018 年に発表した統計報告書によると、世界の 1 人当たりの飲酒量は、2010 年から 2016 年の間で 6.4 リットルを維持しており、変化しなかった⁶⁾。また、日本においても、飲酒による健康障害を改善させるために、2010 年から 2012 年まで「21 世紀における国民健康づくり運動 (健康日本 21)」で、多量飲酒者 (1 日に平均純アルコールで約 60 g を超えた量に飲酒する者) の減少、未成年の飲酒をなくすこと、1 日平均純アルコールで約 20 g 程度が「節度ある適度な飲酒」である旨の知識の普及の 3 つを目標に様々な取り組みがなされた⁷⁾。さらに、2013 年からは、第 2 次として、生活習慣病のリスクを高める量を飲酒している者 (1 日当たりの純アルコール摂取量が男性 40 g 以上、女性 20 g 以上の者) の割合の減少、未成年者の飲酒をなくすこと、妊娠中の飲酒をなくすことの 3 つを目標としてさらなる取り組みがなされた⁸⁾。しかし、2018 年 9 月に報告された中間報告では、未成年者の飲酒と妊娠中の飲酒をなくす項目は、改善しているが、生活習慣病のリスクを高める量を飲酒している者の割合

は、2010 年から 2016 年の間であまり変化は認められなかったことが示されている⁹⁾。

飲酒によって摂取されたエタノールは約 20 %が胃から、約 80 %が腸から吸収される^{10, 11)}。その後、血中に取り込まれ、約 90 %が肝臓で代謝される¹²⁾。エタノールは、肝臓においてアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) によってアセトアルデヒドに酸化される。また副経路として肝臓のミクロソーム内に存在しているシトクローム P450 2E1 (CYP2E1) によって酸化されるミクロソーム・エタノール酸化系(MEOS)による酸化もある。さらにアセトアルデヒドは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) によって酢酸に酸化される。変換された酢酸は、TCA 回路などに取り込まれて最終的に水と二酸化炭素に分解されて体外に排出される¹³⁾。これら一連の代謝の流れは、アルコール代謝経路と呼ばれる。アルコール代謝経路で分解を受けなかったエタノールは、血液とともに全身を巡ったのち再び肝臓に到達し、アルコール代謝経路で分解される。それでも分解されなかった約 10 %のエタノールは、呼気や尿と一緒にそのままの形で排出される^{10, 11)}。

摂取されたエタノールは、速やかにアルコール代謝経路によって分解されるが、大量あるいは長期の飲酒になると処理しきれなくなったエタノールやアセトアルデヒドは、血中に滞留していく。またそれに付随して、酸化ストレスの増加や β -酸化の減衰が起こること^{14, 15, 16, 17, 18)}によって、吐き気や脱水症状が翌日まで続くいわゆる「二日酔い」や急性アルコール中毒、アルコール性肝障害になる^{14, 17, 19, 20)}。飲酒による健康障害の状態にならない 1 つの方法として、飲酒を断つ断酒あるいは飲酒量を減らす減酒が挙げられている。しかし、前述のとおり、世界戦略や「健康日本 21」でも飲酒量の減少や過剰飲酒者の低減といった効果が認められていない。それほど、社会生活を送るうえで断酒あるいは減酒は難し

いことが考えられる。このような状況で、健康障害を起こさないための方法として体内でのアルコール代謝を亢進させ、体内からエタノールやアセトアルデヒドを素早くクリアランスさせると同時に、アルコール代謝の中枢を担う肝臓を保護することが有効である。

以上のようなアルコール代謝亢進作用およびアルコール性肝障害予防作用を機能性食品が有することが報告されている。例えば、プロアントシアニジンを高含有するノニジュースが、アルコール代謝を増強させる報告がある²¹⁾。また、レスベラトロールが、サーチュイン1とアディポネクチンの上方制御を介して、アルコール性脂肪肝を軽減させる報告もある²²⁾。以上のことから、ポリフェノールリッチな食品は、アルコール性肝障害を予防する可能性がある。

ブルーベリー葉は、キナ酸やプロアントシアニジン、いくつかのポリフェノールを含む機能性がある成分を含んでいる食品である²³⁾。さらに、ブルーベリー葉は、脂肪肝予防効果²⁴⁾、抗繊維症効果²⁵⁾、C型肝炎ウイルス増殖抑制効果²⁶⁾をもつことが報告されている。しかし、ブルーベリー葉のアルコール代謝やアルコール性肝障害に対する効果は、明らかになっていない。

アルコール性肝障害の実験モデルは、*in vivo* 評価系および *in vitro* 評価系ともに様々ある。例えば、5%エタノールを含む液体飼料を12週間、ラットに投与すると、アルコール性肝障害が誘導される報告がある²⁷⁾。また、*in vitro* 評価系では、HepG2細胞にエタノールを処理すると、細胞毒性が誘導される報告がある²⁸⁾。しかし、生体内においては、飲酒後にはエタノールとアセトアルデヒドが共存している状態にある。このことから、エタノールとアセトアルデヒドの共存によるアルコール性肝細胞毒性の増強作用が注目される。実際に、エタノールとアセトアルデヒドをHepG2細胞に併用処理すると、細胞生存率が減少することが報告されている²⁹⁾。しかし、HepG2細胞は、エタノールをアセトアルデヒドに

酸化する ADH と CYP2E1 の活性が極端に低いという報告があり³⁰⁾、エタノールをアセトアルデヒドに代謝する能力が低い。これまでアルコール代謝が正常に働いている正常肝細胞にエタノールとアセトアルデヒドを併用処理した際の肝細胞毒性を検証した報告はない。

以上のことから、本研究では、機能性食品のアルコール代謝とアルコール性肝障害への作用を明らかにすることを目的として、アルコール摂取モデルラットにブルーベリー葉抽出物 (BLEx) を単回投与または継続的に摂食させたときの影響とアルコール性肝細胞毒性 *in vitro* 評価系での BLEx の影響をそれぞれ検証した。本論文では、本研究の成果を全 5 章にまとめた。

本章では、飲酒による社会的問題点やアルコール摂取による健康障害について、統計的なデータを含めて具体的に紹介するとともに、その対策と現状を示す。そして、飲酒による健康障害の予防、改善に機能性食品が有効であることについて、これまでの報告を含めて論じたいうえで、本研究の位置づけについて示した。

第 2 章では、アルコール単回投与モデルラットに BLEx を単回投与した時のアルコール代謝に与える影響を検証した。

第 3 章では、アルコール継続摂取モデルラットに BLEx を継続的に摂食させた時のアルコール代謝に与える影響を検証した。

第 4 章では、エタノール・アセトアルデヒド共存下での培養肝細胞への影響と BLEx のアルコール性肝細胞毒性への効果をそれぞれ検証した。

第 5 章では、総括として、得られた結果を集約し、ブルーベリー葉の有用性と今後の課題を示した。

第 2 章 アルコール単回投与ラットモデルに対するブルーベリー葉抽出物の投与の影響

2.1 緒言

飲酒によって摂取されたエタノールは、約 20%が胃から、約 70%が小腸から吸収される^{10,11)}。その後、血中に取り込まれた、約 90%が肝臓で代謝される²⁾。エタノールは、肝臓の ADH と肝ミクロソームの CYP2E1 によって、アセトアルデヒドに酸化される。さらに、アセトアルデヒドは肝臓ミトコンドリアの ALDH によって、酢酸に酸化される。最終的に、酢酸は、クエン酸回路を介して、水と二酸化炭素に分解される³⁾。ADH や ALDH は、遺伝子の塩基配列によって活性の強さが異なる。ADH1B は、47 番目のアミノ酸を決めるコドンの塩基配列によって、低活性型 (ADH1B *1) と活性型 (ADH1B *2) に分かれる。ALDH2 は、504 番目のアミノ酸を決めるコドンの塩基配列によって、活性型 (ALDH2 *1) と不活性型 (ALDH2 *2) に分かれる。また、ADH1B と ALDH2 ともにヘテロ接合型 (ADH1B *1/*2, ALDH2 *1/*2) が存在する。日本人の場合、活性型の ADH1B *2/*2 を持つ人の割合が 60%であるが、低活性型の ALDH *1/*2 と不活性型の ALDH2 *2/*2 を持つ人の割合が 44%である。これは、アジア系の国でも同じ割合であり、アフリカやヨーロッパでは見られない性質である³¹⁾。そのため、過剰なアルコール摂取後に、頭痛や吐き気といった症状になりやすくなっている。WHO は、健康障害の要因の内、アルコール摂取が世界で第 3 位である報告をしており⁴⁾、”Global strategy to reduce the harmful use of alcohol” を 2010 年に発表している⁵⁾。エタノール摂取によって、肝障害³²⁾や急性肺障害³³⁾、肝がん³⁴⁾のリスクを増強する。そして、アルコール代謝の促進は、血中からエタノールとアセトアルデヒドを素早くクリアランスさせることで、これらのアル

コール性障害を予防するのに有効な手段である。プロアントシアニジンを高含有するノニジュースが、アルコール代謝を増強させる報告がある²¹⁾。また、レスベラトロールが、サーチュイン 1 とアディポネクチンの上方制御を介して、アルコール性脂肪肝を軽減させる報告もある²²⁾。以上のことから、ポリフェノールリッチな食品は、アルコール性肝障害を予防する可能性がある。また、ニンニクにおいて成分の前駆体である *S*-アリル-*L*-システインスルホキシドを混合した 20%エタノール水溶液を 10 ml/kg 体重になるようにラットに単回投与すると、エタノールの吸収阻害とアルコール代謝亢進が起こる報告がある³⁵⁾。ブルーベリー葉は、キナ酸やプロアントシアニジン、いくつかのポリフェノールを含む機能性がある成分を含んでいる食品である²³⁾。さらに、ブルーベリー葉は、脂肪肝予防効果²⁴⁾、抗繊維症効果²⁵⁾、C 型肝炎ウイルス増殖抑制効果²⁶⁾をもつことが報告されている。しかし、アルコール代謝やアルコール性肝障害への効果に関しては、明らかになっていない。

本章では、BLEx 単回投与が、エタノール単回投与時におけるアルコール代謝に与える影響を検証することを目的とする。

2.2 実験方法

2.2.1 ブルーベリー葉抽出物の調製

本研究で使用した BLEx は、備前化成株式会社 (Okayama, Japan) より提供された熱水抽出物である。調製方法としては、ブルーベリー葉パウダー (ラビットアイブルーベリー) をパウダー重量の 1/16 量の熱水 (95-100°C) で 30 分間抽出し、この作業をもう 1 回行い、フィルターに通した後、熱処理で滅菌した。最後に、抽出液をスプレードライで乾燥させた。2016 年 12 月 9 日に製造し、備前化

成株式会社より提供された後は、高温多湿を避け、遮光して常温で保管した。

2.2.2 ラットによる投与試験

本実験は、宮崎大学動物実験規則の「第 4 章 動物実験等の実施」、「第 5 章 施設等」、「第 6 章 実験動物の飼育及び保管」、「第 8 章 安全管理」及び「第 9 章 教育訓練」に従って行った。

Sprague-Dawley (SD) ラット (雄、7 週齢) を日本 SLC 株式会社 (Hamamatsu, Japan) より購入し、室温 (22-24℃) で維持された飼育室で飼育した。また、12 時間周期 (09:00-21:00) で明暗を切り替えた。SD ラット購入後、1 週間予備飼育を行い、経口投与 1 日前に体重を測定し、Normal control 群 4 頭、Ethanol control 群 6 頭、BLEx 群 6 頭に群分けした。その後、絶食状態にした。絶食状態が 24 時間経過した後、改めて体重を測定して尾採血を行った。尾採血 30 分後に Normal control 群と Ethanol control 群には滅菌水、BLEx 群には BLEx を 0.1 g /100g 体重になるように経口投与した。その 30 分後に Normal control 群には滅菌水、Ethanol control 群と BLEx 群には 40%エタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Wako), Osaka, Japan) 水溶液をそれぞれ 0.5 ml/100 g 体重になるように経口投与した。エタノール経口投与後、30 分、60 分、120 分、240 分、360 分後にそれぞれ尾採血を行った。また、この時、アルコール類の影響が出ないようにするため、尾採血前の尾の拭き上げや尾採血後の止血などの処置はすべて蒸留水を染み込ませた綿で行った。360 分後の尾採血が終わった後、ソムノペンチル (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) 麻酔下で臓器の摘出を行った。

2.2.3 血清エタノール濃度の測定

ヘッドスペースサンプルバイアル (Perkin Elmer, MA) に蒸留水で 10 倍に希釈した血清を 500 μ l 添加し、内部標準物質として 0.25 mg/ml 1-プロパノール (JUNSEI CHEMICAL Corporation, Tokyo, Japan) を 500 μ l 添加した後、テフロンコート・シリコーンゴムセプタム (Perkin Elmer) で素早く密栓した。その後、Head Space sampler Turbo Matrix 40 (Perkin Elmer) にセットし、GCMS-QP2010 (SHIMADZU Corporation, Kyoto, Japan) で分析した。分析条件は、Table 2.1 に示す。また、カラムは、Rtx[®]-BAC Plus 2 Columns (length: 30 m, Id: 0.32 mm, df: 0.60 μ m) (Restek, PA) を使用した。

Table 2.1 Measurement condition of Head Space GC-MS

【Head space】	
ヘッドスペースモード：コンスタント	サンプルシェイカー：OFF
注入時間：0.05 min	GC サイクル時間：20 min
ゾーン温度設定：(O/N/T)	加圧時間：1 min
オープン温度：60℃	引き上げ時間：0 min
ニードル温度：100℃	保温時間：15 min
トランスファー温度：150℃	HS キャリアーガス圧力：70 kPa
【GC】	
気化室温度：200℃	キャリアーガス：ヘリウム
カラム：Rtx [®] -BAC Plus 2	
カラムオープン温度：40℃ (5 min) → (40℃/min) → 200℃ (1 min)	
【MS】	
インターフェース温度：230℃	イオン源温度：200℃
溶媒溶出時間：0.7 min	データ採取温度：1.2-10 min
イベント時間：0.5 sec	測定モード：Scan
質量範囲：29-300 <i>m/z</i>	エミッション電流：150 μ A（高感度）
検出器電圧：-0.1 kV（相対値）	

2.2.4 血清アセトアルデヒド濃度の測定

血清 49 μ l、60% HClO₄ (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) 14 μ l、4 M 酢酸ナトリウムバッファー63 μ l を混合し、12,000 g、4℃ で 10 分間遠心分離した後、上清を回収し、2 mg/ml 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH, Tokyo Chemical Industry Corporation, Tokyo, Japan)/6 N HCl (Wako) を 4 μ l 混合し、1 時間室温で

放置した。その間、5分おきに Voltex をかけた。室温放置が終了した後、4 M 酢酸ナトリウム (Wako) 110 μ l を混合した。試料をあらかじめメタノールと蒸留水それぞれ 2 ml でリンスした Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge (Waters Corporation, MA) に通し、蒸留水と 50%メタノール (Wako) それぞれ 1 ml でリンスした後、100%メタノール 2 ml を注入して、可溶化した画分を試験管に回収した。画分回収した試験管は、40°C で温浴しながら、窒素で乾固し、アセトニトリル (Thermo Fisher Scientific, MA) 200 μ l 加えて再溶解したものをバイアルに入れた。

サンプルを充填したバイアルビン Prominence HPLC system (SHIMADZU Corporation) にセットした。流速 1.0 ml/min、Detector の波長 360 nm に設定し、0.5%トリフルオロ酢酸 (Tokyo Chemical Industry) (A)とアセトニトリル (B) を以下の条件で流した。

B: 40% (2 min) \rightarrow 7%/min \rightarrow 75% (0 min) \rightarrow 5%/min \rightarrow 100% (8 min)

また、この条件の後、3分間かけて B 40%に戻し、7分間維持して1サンプルごとに洗浄を行った。

2.2.5 肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の測定

50 mg の肝臓を 250 μ l のホモジナイズバッファー (0.25 M スクロース、5 mM トリス (Tris)、0.5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-2Na、2 mM 2-メルカプトエタノール) 中でホモジナイズした後、13,000 x g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。10 倍希釈した上清 (25 μ l) と ADH reaction assay バッファー (225 μ l、5 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)、5 mM エタノール、9 mM グリシン、120 mM ピロリン酸ナトリウム (pH 8.8)) もしくは、ADH negative assay バッファー (225 μ l、5 mM NADH、1 mM 4-メチルピラゾール、2

μM ロテノン、60 mM ピロリン酸ナトリウム (pH 8.8)) を 96 well plate 内で混合した。ALDH 活性の測定の場合は、10 倍希釈した上清 (25 μl) と ALDH reaction assay バッファー (225 μl、0.5 mM NADH、10 mM アセトアルデヒド、0.1 mM 4-メチルピラゾール、2 μM ロテノン、60 mM ピロリン酸ナトリウム (pH 8.8)) もしくは、ALDH negative assay バッファー (225 μl、0.5 mM NADH、0.1 mM 4-メチルピラゾール、2 μM ロテノン、60 mM ピロリン酸ナトリウム (pH 8.8)) を 96 well plate 内で混合した。混合してから、0、3、6、9、12、15 分後の 340 nm の吸光度を測定した。吸光度測定中、ADH 活性の場合は 37°C、ALDH 活性の場合は 25°C でインキュベートした。肝臓ホモジナイズ液のタンパク質濃度は、Pierce® Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。肝臓の ADH 活性と ALDH 活性は、以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{ADH 活性と ALDH 活性} = (\Delta A/\text{min} \times V \times D) / (6.3 \times d \times v)$$

- ・ ΔA/min : 340 nm における吸光度の時間変化量
- ・ V : 測定時の総液量 (ml)
- ・ D : 希釈倍率
- ・ 6.3 : 340 nm における 1 mM NADH でのモル吸光係数
- ・ d : 光路長 (cm)
- ・ v : 希釈した肝臓ホモジナイズ液の使用量 (ml)

2.2.6 肝臓ミクロソームの分画と CYP2E1 タンパク質発現の解析

肝臓 2 g をホモジナイズバッファー (250 mM スクロース、75 mM ニコチンアミド、2.5 mM EDTA-2Na、20 mM 2-メルカプトエタノール、50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.4)) 10 ml でホモジナイズし、12,425 x g、4°C で 20 分間遠心分離した。さらに、上清を 109,572 x g、4°C で 1 時間遠心分離した。上清を除去し、ペレットを懸濁バッファー (5 mM (±)-ジチオスレイトール、20 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.4)) 2 ml に懸濁した。

ミクロソーム画分 100 μl を 2% Protease inhibitor (Nacalai tesque) 含有細胞溶解

バッファー (150 mM NaCl、2% Triton X-100、2 mM EDTA-2Na、50 mM NaF、30 mM Na₄P₂O₇、50 mM トリス塩酸 (Tris-HCl) (pH 7.5)) 100 µl と混合し、30 分間氷中放置した。その後、12,000 x g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を 100 µl 回収した。回収した上清を同量の 2 x sample buffer (2.9% グリセロール、0.6% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.03% ブロモフェノールブルー、5.7% 2-メルカプトエタノール、71.4 mM Tris-HCl (pH 6.8)) と混合し、100°C で 5 分間加熱し、電気泳動用サンプルを作製した。ミクロソーム溶解液中のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit で測定した。10% アクリルアミドゲルを用いて、タンパク質の量が 1 µg/lane になるようにアプライし、100 V で 1 時間電気泳動した。AmershamTM HybondTM P 0.45 PVDF (PVDF 膜) (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) に 100 V で 1 時間、ブロッティングし、3% スキムミルク (MEGMILK SNOW BRAND Corporation, Tokyo, Japan) -0.1% Tween-20 含有 Tris 緩衝生理食塩水 (T-TBS) に浸し、1 時間浸透させた。Can Get Signal solution 1 (TOYOBO, Tokyo, Japan) で希釈した一次抗体溶液に浸し、反応させた。CYP2E1 の検出には、Rabbit anti-CYP2E1 IgG (Millipor, MA) を用いて、室温で 1 時間抗体反応させ、GRP-78 の検出には、Mouse anti-GRP IgG (BD Biosciences, NJ) を用いて、4°C で一晩抗体反応させた。さらに、Can Get Signal solution 2 (TOYOBO) で希釈した二次抗体溶液に浸し、室温で 1 時間抗体反応させた。CYP2E1 の検出には、Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, MA) を用いて、GRP-78 の検出には、Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology)。各ステップで PVDF 膜は、0.1% T-TBS で洗浄した。Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, CA) に浸し、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) でバンドの検出を行った。また、バンドの強度の定量を ImageQuant TL (GE Healthcare) で解析した。

2.2.7 肝臓の mRNA 発現量の解析

肝臓を TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) 1 ml 中でホモジナイズし、室温で 5 分間放置した。ホモジナイズ液にクロロホルム (Wako) を 200 μ l 添加し、15 秒間ボルテックスし、室温で 10 分間放置した。放置後、12,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離し、RNA を含む無色の上清部分を 1.5 ml チューブに 500 μ l 回収し、2-プロパノール (Wako) を同量加えて、室温で 10 分間放置した。12,000 x g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を除去後、70%エタノールを 500 μ l 添加し、数秒ボルテックスした。7,600 x g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を完全に除去後、クリーンベンチ内で乾燥させた。乾燥が終わったら、ペレットを DEPC 処理水 (Wako) 300 μ l に溶解した。溶解液中の RNA 濃度を SmartSpec™ Plus Spectrophotometer (Bio-Rad) で測定した。RNA が 1 μ g になるように溶液を PCR チューブに分注し、Rever Tra Ace qPCR RT kit (TOYOBO) を使用して、37°C、15 分間→98°C、5 分間の条件で、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Model TP600 (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を用いて、逆転写反応を行った。リアルタイム PCR 対応の 96 well プレート (INA・OPTIKA Corporation, Osaka, Japan) に cDNA 溶液と THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)、PCR primer (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)、滅菌水を混合し、CFX Connect™ リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad) を用いて Table 2.2 の条件で、mRNA 発現量を解析した。PCR primer の塩基配列は、Table 2.3 に記す。mRNA 発現量は、 $\Delta\Delta C_t$ 法で算出し、 β -actin をハウスキーピング遺伝子とした。

Table 2.2 Conditions of real-time PCR

Step	Temperature, time	Cycle
Initial denaturation	95°C, 1 min	1 cycle
Denaturation	95°C, 15 sec	40 cycle
Annealing and extension	60°C, 1 min	
Measurement of melt curve		

Table 2.3 Primer sequences used for the real-time PCR

Target gene	Primer	Nucleotide sequence
ADH1	Forward	5'-CCTTCACCATCGAGGACATA-3'
	Reverse	5'-GCCACCATCTTAATGCGAACTT-3'
ALDH2	Forward	5'-GTGTTCTGGAGACGTCAAAGA-3'
	Reverse	5'-GCAGAGCTTGGGACAGGTAA-3'
CYP2E1	Forward	5'-CCTACATGGATGCTGTGGTG-3'
	Reverse	5'-CTGGAAACTCATGGCTGTCA-3'
β -actin	Forward	5'-GAGCTATGAGCTGCCTGACG-3'
	Reverse	5'-GGATGTCAACGTCACACTTC-3'

2.2.8 血清の生化学検査

血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性は、Wako トランスアミナーゼ CII-Test Kit (Wako) を使用して測定した。

2.2.9 肝臓トリグリセリドレベルの測定

肝臓 200 mg を PBS 1 ml 中でホモジナイズし、12,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離後、上清を回収した。肝臓トリグリセリド (TG) レベルは、Triglyceride E-Test Wako (Wako) を用いて測定した。

2.2.10 統計処理

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差 (SE) で表した。有意差検定は、student T テストもしくは Tukey-Kramer テストを行った。統計処理は、Statcel3 software (OMS publishing, Saitama, Japan) を使用して行った。P 値が、0.05 よりも小さい時、有意な差があるとした。

2.3 結果

2.3.1 血清エタノール濃度とアセトアルデヒド濃度への影響

血清エタノール濃度、血清エタノール濃度-時間曲線下面積 (AUC)、30 分時の血清エタノール濃度を 0 とした場合の結果を Figure 2.1 に示す。また、血清アセトアルデヒド濃度と AUC を Figure 2.2 に示す。BLEx 投与群の血清エタノール濃度は Ethanol control 群と比較して 30 分後と 240 分後において、それぞれ 0.6 倍、0.7 倍と有意な低値を示した。BLEx 群の AUC は Ethanol control 群よりも 0.8 倍と有意な低値を示した。60 分後の BLEx 投与群の血清アセトアルデヒド濃度は、Ethanol control 群と比較して、0.3 倍と有意な低値を示した。また、全ての時点において BLEx 投与群は低値を示す傾向が見られた。

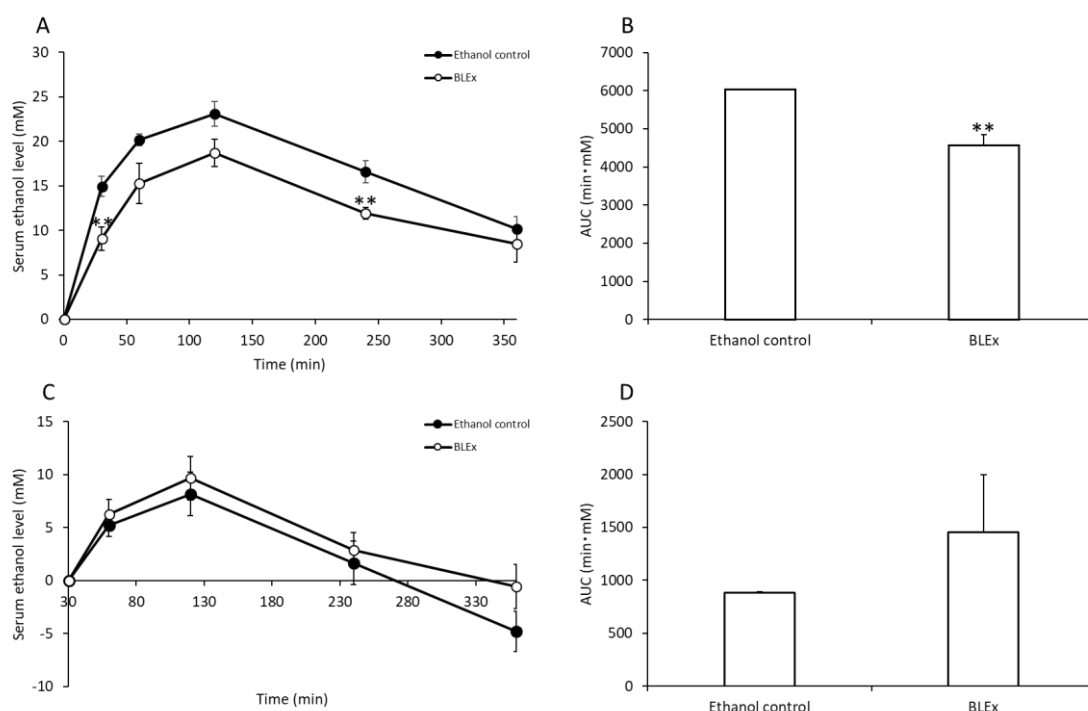


Figure 2.1 Serum ethanol level. (A) Changes in serum ethanol level, (B) AUC values calculated by ethanol level versus time after ethanol administration, (C) changes in serum ethanol level at 30 min adjusted to 0, and (D) AUC values in rats (n = 4-6). The values are expressed as the mean \pm SE. ** $p < 0.01$ compared to the Ethanol control.

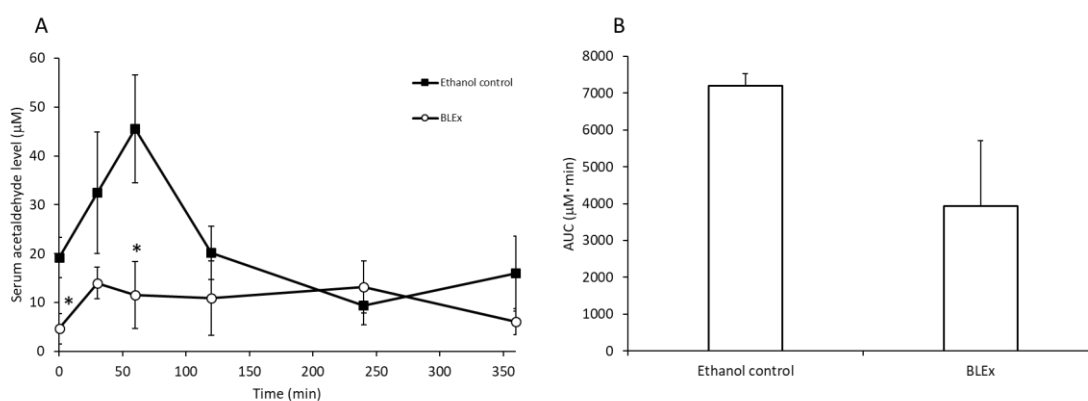


Figure 2.2 Serum acetaldehyde level. (A) Changes in serum acetaldehyde level and (B) AUC values calculated by acetaldehyde level versus time after ethanol administration in rats (n = 4-6). The values are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$ compared to the Ethanol control.

2.3.2 肝臓のアルコール代謝酵素の活性とタンパク質発現、mRNA 発現量への影響

肝臓の ADH 活性と ALDH 活性、肝臓ミクロソーム CYP2E1 のタンパク質発現量、ADH1、ALDH2、CYP2E1 の mRNA 発現量を Figure 2.3 に示す。エタノール投与によって ADH 活性は 2 倍有意に増加したが、BLEx 投与によってその増加が 0.6 倍と有意に抑制された。ALDH 活性も ADH 活性と同じ傾向が見られた。CYP2E1 タンパク質発現は、エタノール投与で 4.6 倍有意に増加したが、BLEx 投与による影響は認められなかった。mRNA 発現量に関しては、エタノール投与によって ADH1 と ALDH2 は減少傾向を示し、CYP2E1 は増加傾向を示した。そして、BLEx 投与によって ADH1 と CYP2E1 はエタノール投与による変化を抑制する傾向を示し、ALDH2 はさらに減少する傾向を示した。

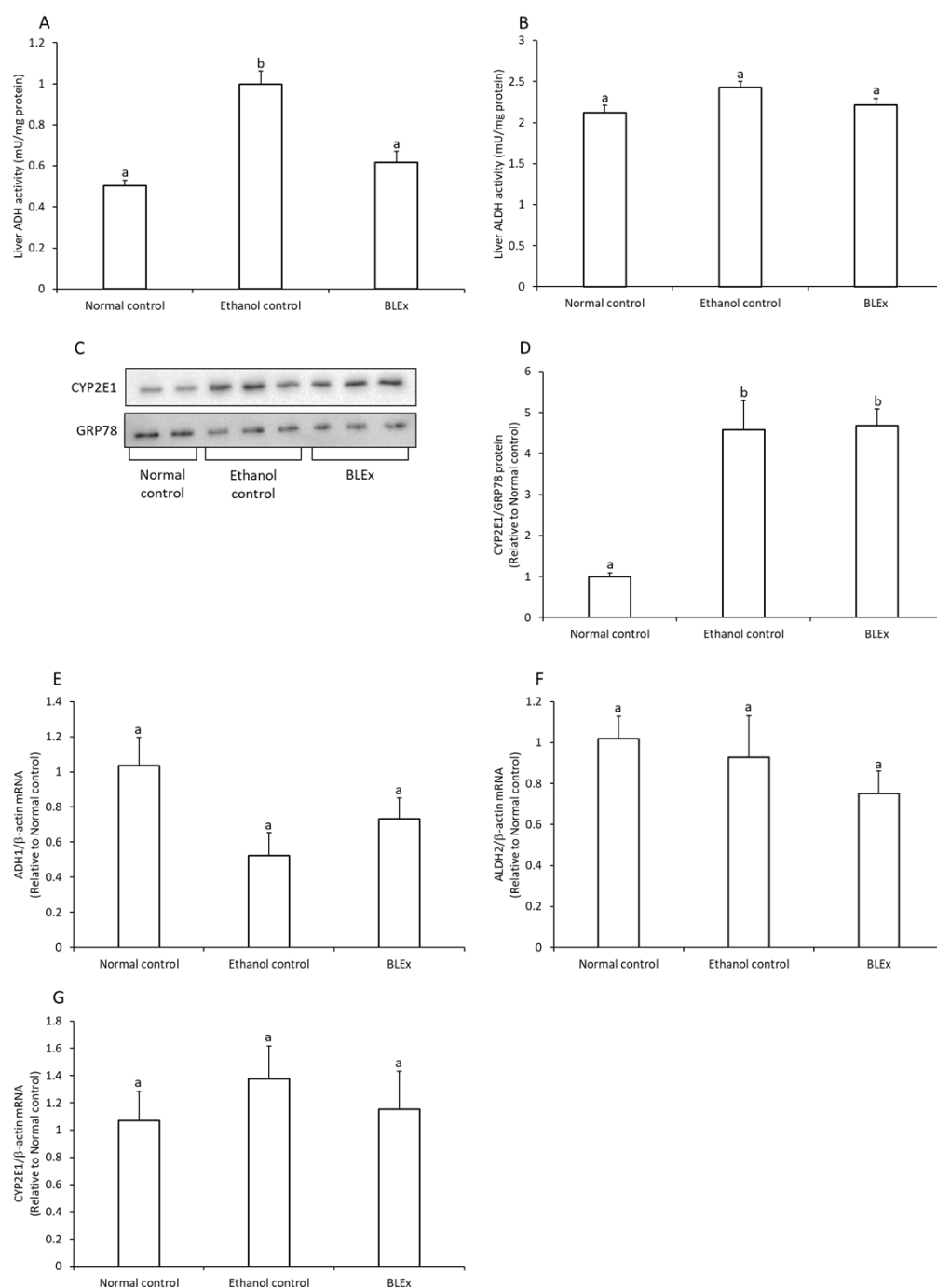


Figure 2.3 Activity or protein and mRNA expressions related to alcohol metabolism in the liver. (A) Liver ADH and (B) ALDH activities; (C and D) liver microsomal CYP2E1 protein expression; and (E) ADH1, (F) ALDH2, and (G) CYP2E1 mRNA expression in rats ($n = 4-6$). The values are expressed as the mean \pm SE. Values not sharing common letters are significantly different to each other ($p < 0.05$).

2.3.3 アルコール性肝障害への影響

血清 ALT 活性の結果を Figure 2.4 に示す。血清 ALT 活性は、エタノール投与によって増加傾向を示したが、BLEx 投与でエタノール投与による増加傾向を抑制する傾向を示した。

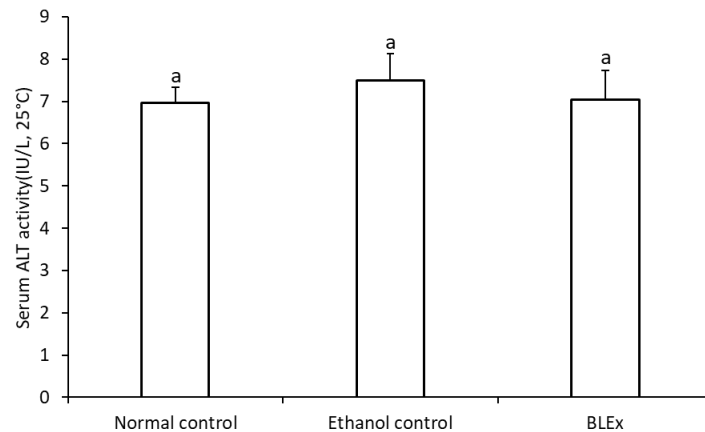


Figure 2.4 Serum ALT activity. Serum ALT activities in rats ($n = 4-6$). The values are expressed as the mean \pm SE. Values not sharing common letters are significantly different to each other ($p < 0.05$).

2.3.4 肝臓トリグリセリドレベルへの影響

肝臓 TG レベルの結果を Figure 2.5 に示す。肝臓 TG レベルは、エタノール投与で 1.7 倍に有意に増加したが、BLEx 投与でエタノール投与による増加を抑制する傾向を示した。

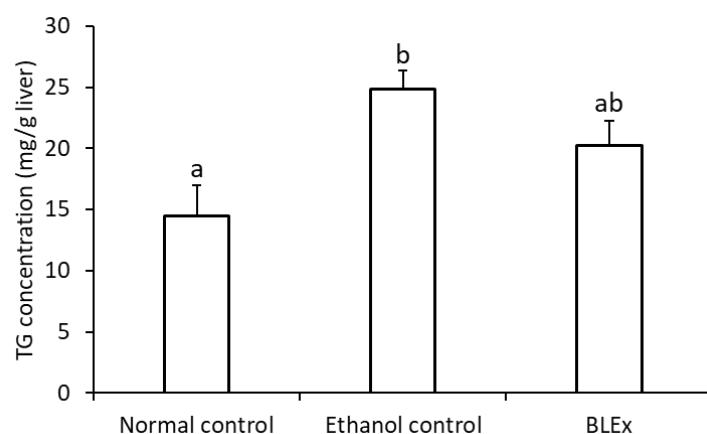


Figure 2.5 Liver TG levels in rats (n = 4-6). The values are expressed as the mean \pm SE. Values not sharing common letters are significantly different to each other ($p < 0.05$).

2.4 考察

エタノールを経口投与することで、血清のエタノール濃度が速やかに上昇することを本章で確認している。そして、経時的に血清エタノール濃度を測定した場合、エタノール投与直後の時間での血清エタノール濃度を測定することで、エタノールの吸収阻害を間接的に評価することができる。実際に、緑茶抽出物にエタノールの吸収阻害作用がある報告においても、30 分後の血清エタノール濃度は緑茶抽出物を投与した群で有意な低値を示していた³⁶⁾。本章でも、BLEx 投与によって、エタノール投与 30 分後の血清エタノール濃度は 1.6 倍程度、有意な低値を示した。そして、30 分後の血清エタノール濃度を 0 にした場合、どの時間においても有意な差が認められなかったことから、BLEx は、エタノールの吸収を阻害することが示唆された。また、BLEx 群の AUC が Ethanol control 群よりも 1.3 倍程度、有意な低値を示していたが、これは、BLEx によるエタノール吸収阻害によるものであると考えられる。

これまでの報告で、緑茶抽出物が血中のアセトアルデヒド濃度を有意に抑制することが知られている³⁶⁾。本章でも、BLEx 投与によって、エタノール経口投

与 60 分後の血清アセトアルデヒド濃度が 4 倍程度、有意な低値を示した。アセトアルデヒドは、エタノールが酸化されて産生されることから、本章の BLEx 投与による血清アセトアルデヒド濃度の減少は、エタノールの吸収阻害によるものであると考えられる。

肝臓の ADH と ALDH は、アルコール代謝の主たる酵素であり、ADH 活性は血中エタノール濃度に、ALDH 活性は血中アセトアルデヒド濃度にそれぞれ応答して変化することが知られている^{37,38)}。本章では、肝臓の ADH 活性が、エタノール投与で有意に増加したが、BLEx 投与でその増加を有意に抑制された。肝臓の ALDH 活性は、ADH 活性と同様の変化が認められたが、有意な差はなかった。このことから、BLEx 投与は、アルコール代謝の主経路の活性に直接影響を示さないことが確認された。肝臓の CYP2E1 は、アルコール代謝の副経路として働く一方、活性酸素種が産生され、アルコール性肝障害を引き起こす原因となる³⁹⁾。本章では、肝臓ミクロソームの CYP2E1 タンパク質発現は、エタノール投与で有意に増加したが、BLEx 投与による影響は認められなかった。このことから、BLEx 投与は、アルコール代謝の主経路と同様に CYP2E1 にも直接的に作用しないことが示唆された。また、肝臓の ADH1、ALDH2、CYP2E1 の mRNA 発現量は、エタノール投与および BLEx 投与で有意な差が認められなかった。以上のことから、BLEx 投与は、アルコール代謝に関連する酵素の活性や発現に直接的に影響しないことが示唆された。

BLEx 投与は、エタノール投与による ALT 活性の増加を抑制する傾向を示した。また、BLEx 投与は、エタノール投与による肝臓 TG レベルの有意な増加を抑制する傾向を示したことから、BLEx 投与はアルコール性肝障害を予防する可能性がある。そして、エタノールの吸収阻害作用を示す緑茶抽出物とポリマー

(ポリエチレングリコール、ポリ- γ -グルタミン酸) の混合物でも同じ傾向を示す³⁶⁾ことから、BLEx 投与によりエタノールの吸収阻害を介したアルコール性肝障害予防作用が期待できる。

2.5 小括

本章では、BLEx 単回投与が、エタノール単回投与時におけるアルコール代謝に与える影響を検証した。エタノール投与 30 分後の血清エタノール濃度において、BLEx 単回投与群で有意な低値を示した。しかし、30 分後の血清エタノール濃度の差はその後も維持した。血清アセトアルデヒド濃度は、エタノール投与後 60 分後において BLEx 群で有意な低値を示した。肝臓 ADH 活性はエタノール投与で有意に増加したが、BLEx 単回投与によって有意に抑制された。肝臓 ALDH 活性は肝臓 ADH 活性の変化と同様になる傾向があったが、有意な差ではなかった。肝臓ミクロソーム CYP2E1 タンパク質発現量は、エタノール投与で有意に増加したが、BLEx 投与による影響は認められなかった。肝臓 ADH1、ALDH2、CYP2E1 の mRNA 発現量は、いずれの群でも有意な差は認められなかった。血清 ALT 活性は、エタノール投与によって増加傾向を示したものが、BLEx 単回投与によって抑制される傾向を示した。以上のことから、本章では BLEx 単回投与はエタノールの吸収を阻害することが示唆され、それに伴ってアルコール性肝障害を抑制する可能性がある。

第 3 章 アルコール継続摂取ラットモデルに対するブルーベリー葉抽出物の摂食の影響

3.1 緒言

第 2 章では、BLEx 単回投与が、エタノール単回投与時におけるアルコール代謝に与える影響を検証した。ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) は、抗酸化酵素の 1 つで、エタノール誘導性酸化ストレスによって上方制御される。そして、HO-1 の上方制御によって、肝臓の酸化ストレスを軽減させる。以前の報告で、ケルセチンは、HO-1 の上方制御を介して、急性アルコール性肝障害から肝臓を保護することが示されている⁴⁰⁾。前章でも記述したノニジュースがアルコール代謝を増強させる報告²¹⁾やレスベラトロールが、サーチュイン 1 とアディポネクチンの上方制御を介して、アルコール性脂肪肝を軽減させる報告²²⁾は、いずれも 4 週間アルコール含有液体飼料を継続的に摂食させた実験である。第 2 章でも記述した通り、ポリフェノールリッチな食品は、アルコール性肝障害を予防する可能性があり、BLEx は、肝障害に対して予防、改善する効果を持つ。しかし、高用量の BLEx を継続的に摂取させたときの効果は、明らかとなっていない。ラットやマウスにアルコールを継続的に摂取させるとアルコール性脂肪肝やアルコール性肝炎を誘導させることができる。例えば、4 週間アルコール液体飼料を与えると、血清脂質量と肝臓脂質量が有意に増加し、アルコール性脂肪肝が誘導される報告がある⁴¹⁾。また、4 週間アルコール液体飼料を与えると、アルコール性脂肪肝が誘導される報告もある⁴²⁾。

本章では、BLEx の安全性を確認するとともに、高用量 BLEx 摂食が、継続的なエタノール摂取時におけるアルコール代謝に与える影響を検証することを目指す。

3.2 実験方法

3.2.1 ブルーベリー葉抽出物の調製

第2章の「2.2.1 ブルーベリー葉抽出物の調製」に準じて行った。

3.2.2 ラットによる摂食試験

本実験は、宮崎大学動物実験規則の「第4章 動物実験等の実施」、「第5章 施設等」、「第6章 実験動物の飼育及び保管」、「第8章 安全管理」及び「第9章 教育訓練」に従って行った。

SD ラット (雄、7 週齢) を日本 SLC 株式会社より購入し、室温 (22-24℃) で維持された飼育室で飼育した。また、12 時間周期 (09:00-21:00) で明暗を切り替えた。

SD ラット購入後、1 週間予備飼育を行い、通常液体飼料群 (NLD 群)、通常液体飼料+BLEx 群 (NLD+BLEx 群)、アルコール液体飼料群 (ALD 群)、アルコール液体飼料+BLEx 群 (ALD + BLEx 群)の4群に各群5頭ずつ振り分けた。食餌は、Lieber-DeCarli 液体飼料をもとに作製した⁴³⁾。食餌の組成は、Table 3.1 に示す。ALD 中のエタノール濃度は、1、2 日目に1%、3、4 日目に3%、5 日目以降は5%となるように調製した。BLEx は、粉体重量の3%を食餌に混ぜ込んだ。これらの食餌を5週間自由摂食させた。摂食期間が終了した後、ドルベネ (Kyoritsu Seiyaku)、ドルミカム (Astellas Pharma, Tokyo, Japan)、ベトルファール (Meiji Seika Pharma Corporation, Tokyo, Japan) の混合麻酔下 (7.5% ドルベネ、8% ドルミカム、10% ベトルファール) で、採血後、臓器を摘出した。

Table 3.1 Composition of the liquid diet used in this study (g/L liquid diet).

	NLD	NLD + BLEx	ALD	ALD + BLEx
Casein Na	41.4	41.4	41.4	41.4
L-cystine	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-mehionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn oil	8.5	8.5	8.5	8.5
Olive oil	28.4	28.4	28.4	28.4
Safflower oil	2.7	2.7	2.7	2.7
Vitamin Mix	2.5	2.5	2.5	2.5
Mineral Mix	8.75	8.75	8.75	8.75
Dextrin	115.2	108.5466	25.6	21.6346
Cellulose	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	0.53	0.53	0.53	0.53
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0	3.0
BLEx	0.0	6.6534	0.0	3.9654
total (in dry diet)	221.78	221.78	132.18	132.18
Ethanol	0.0	0.0	50.0	50.0

3.2.3 血清の生化学検査

血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性および ALT 活性は、Wako トランスアミナーゼ CII-Test Kit (Wako) を使用して測定した。血清総タンパク質とアルブミンレベル及びアルブミン/グロブリン (A/G) 比は、A/G B-Test Wako Kit (Wako) を使用して測定した。

3.2.4 肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の測定

第 2 章の「2.2.5 肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ活性およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の測定」に準じて行った。

3.2.5 肝臓ミクロソームの分画と CYP2E1 タンパク質発現量の解析

第 2 章の「2.2.6 肝臓ミクロソームの分画と CYP2E1 タンパク質発現の解析」に準じて行った。

ただし、CYP2E1 の検出の場合、一次抗体反応は、CYP2E1-specific polyclonal antibody (Proteintech, IL) を用いて、4°Cで一晩抗体反応させ、二次抗体反応は、Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG を用いて、室温で 1 時間抗体反応させた。

3.2.6 肝臓の mRNA 発現量の解析

第 2 章の「2.2.7 肝臓の mRNA 発現量の解析」に準じて行った。

ただし、mRNA 解析は、Agilent AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, CA) を用いて行った。PCR primer の塩基配列は、Table 3.2 に記す。mRNA 発現量は、Prffl method で算出し、 β -actin をハウスキーピング遺伝子とした。

Table 3.2 Primer sequences used for the real-time PCR

Target gene	Primer	Nucleotide sequence
ADH1	Forward	5'-CCTTCACCATCGAGGACATA-3'
	Reverse	5'-GCCACCATCTTAATGCGAACTT-3'
ALDH2	Forward	5'-GTGTTCTGGAGACGTCAAAGA-3'
	Reverse	5'-GCAGAGCTTGGGACAGGTAA-3'
CYP2E1	Forward	5'-CCTACATGGATGCTGTGGTG-3'
	Reverse	5'-CTGGAAACTCATGGCTGTCA-3'
HO-1	Forward	5'-TGGCCCACGCATATACCCGCT-3'
	Reverse	5'-TTGAGCAGGAAGGCGGTCTTAG-3'
β -actin	Forward	5'-GAGCTATGAGCTGCCTGACG-3'
	Reverse	5'-GGATGTCAACGTCACACTTC-3'

3.2.7 肝臓のカルボニル化タンパク質量の解析

肝臓のカルボニル化タンパク質量の解析は、Colombo らの報告⁴⁴⁾をもとに行った。肝臓 100 mg を PBS 1 ml 中でホモジナイズし、12,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を 300 μ l 回収し、10 mM DNPH-2N HCl を 60 μ l 添加後、遮光下、室温で 1 時間放置した。冷 20%トリクロロ酢酸 (Wako) を添加し、氷中で 15 分間放置し、10,000 x g、4°C で 5 分間遠心分離して、上清を除去した。同じ作業を 2 回繰り返し行なった。沈殿物をエタノール : 酢酸エチル (Nacalaitesque) = 1 : 1 の混合溶液 500 μ l で懸濁し、10,000 x g、4°C で 5 分間遠心分離して、上清を除去した。同じ作業を 2 回繰り返し行なった。沈殿物を 0.2% (w/v) SDS in 20 mM Tris-HCl 溶液 (pH 6.8) 100 μ l に懸濁後、95°C で 10 分間加熱した。溶解しきれなかった沈殿物は、超音波ホモジナイザーで完全に溶解させた。タンパク

質溶解液を 50 μ l 回収し、2 x Laemmli sample buffer (10% グリセロール、2% SDS、50 mM DL-ジチオスレイトール、0.05% (w/v) ブロモフェノールブルー、62.5 mM Tris-HCl) 50 μ l と混合後、95°C で 5 分間加熱し、電気泳動用サンプルを作製した。10% アクリルアミドゲルを用いて、タンパク質の量が 1 μ g/lane になるようにアプライし、100 V で 1 時間電気泳動した。PVDF 膜に 100 V で 1 時間、ブロッキング後、5% スキムミルク-0.1% T-TBS に浸し、1 時間振とうさせ、5% スキムミルク-0.1% T-TBS で希釈した anti-dinitrophenyl-KLH, rabbit IgG fraction (Thermo Fisher Scientific) 溶液に浸し、4°C で一晩抗体反応させた。さらに、Can Get Signal solution 2 (TOYOBO) で希釈した Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG 溶液に浸し、室温で 1 時間抗体反応させた。各ステップで PVDF 膜は、0.1% T-TBS で洗浄した。Clarity Western ECL Substrate に浸し、ImageQuant LAS 4000 でバンドの検出を行った。また、バンド強度の定量を ImageQuant TL で解析した。

3.2.8 肝臓トリグリセリドレベルと総コレステロールレベルの測定

肝臓 200 mg を PBS 1 ml 中でホモジナイズし、12,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離後、上清を回収した。肝臓 TG レベルと総コレステロール (T-Chol) レベルは、Triglyceride E-Test Wako と Cholesterol E-Test Wako (Wako) をそれぞれ用いて測定した。

3.2.9 統計処理

全てのデータは、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。最初に、two-way analysis of variance (ANOVA) でアルコールと BLEx、その相互作用があるかを検討した。相互作用で有意な差が認められた場合、Tukey-Kramer test でさらに統計解析を行った。これらの統計解析は、Statcel3 software を用いて行った。P 値が 0.05 より小さい場合を有意な差があるとみなした。

3.3 結果

3.3.1 体重、摂食量、肝重量への影響

体重、摂食量、肝重量の結果を Figure 3.1 に示す。アルコール摂取群の最終体重と摂食量は、非アルコール摂取群と比較して有意に低かったが、BLEx 摂食による影響は認められなかった。肝重量は、いずれの摂食条件でも差がなかった。

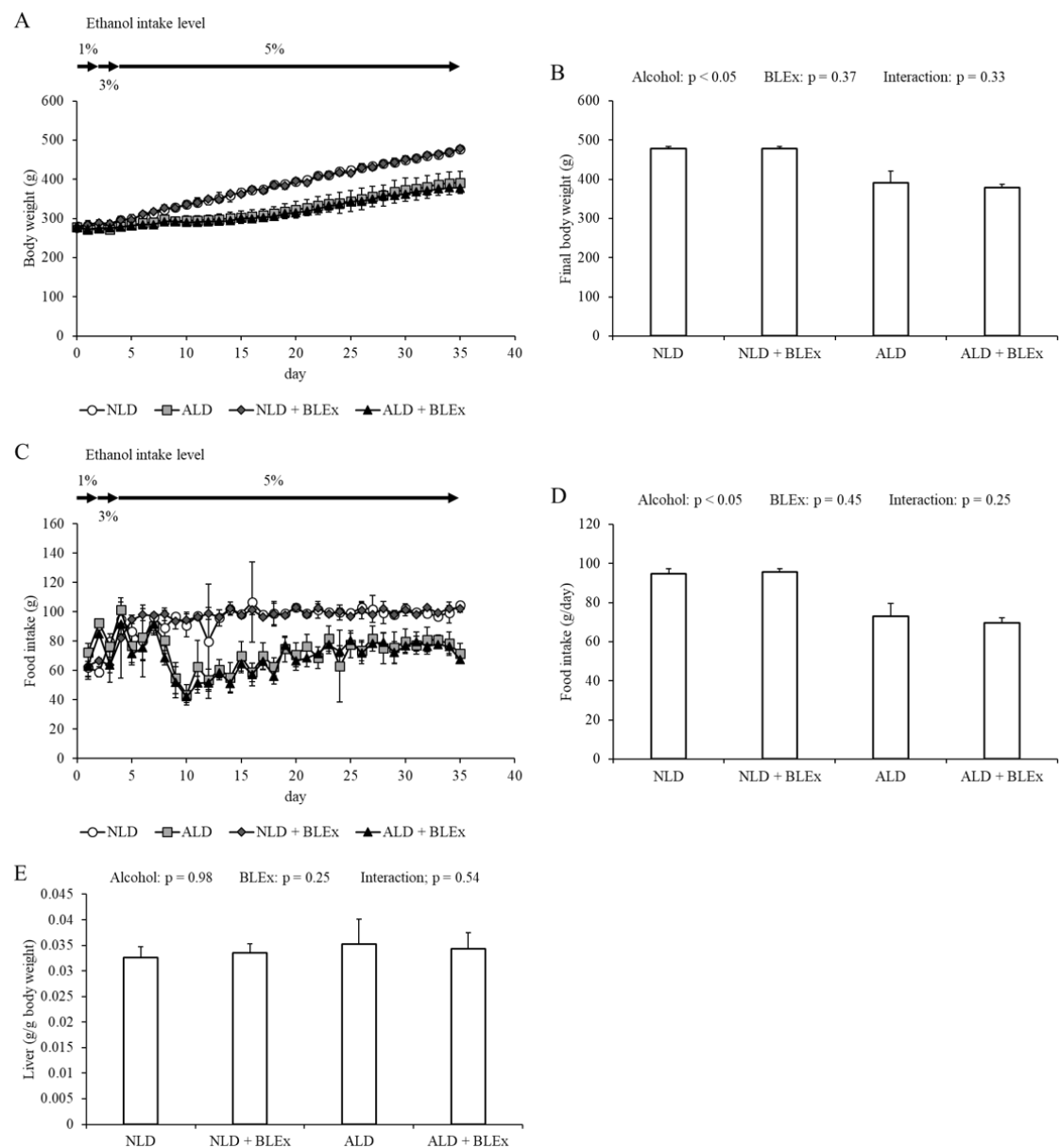


Figure 3.1 Body weight, food intake and liver weight. (A) Changes in body weight, (B) final body weight, (C) food intake change, (D) daily food intake, and (E) liver weight in rats ($n = 5$). The values are expressed as the mean \pm SD.

3.3.2 アルコール性肝障害への影響

アルコール性肝障害の指標である血清 AST 活性、ALT 活性、AST/ALT 比、総タンパク質量、アルブミン量、A/G 比の結果を Figure 3.2 に示す。アルコール摂取群の血清 ALT 活性は、非アルコール摂取群と比較して有意に高かったが、血清 AST 活性と AST/ALT 比は、いずれの摂取条件でも差がなかった。総タンパク質量、アルブミン量、A/G 比もいずれの摂取条件でも差がなかった。

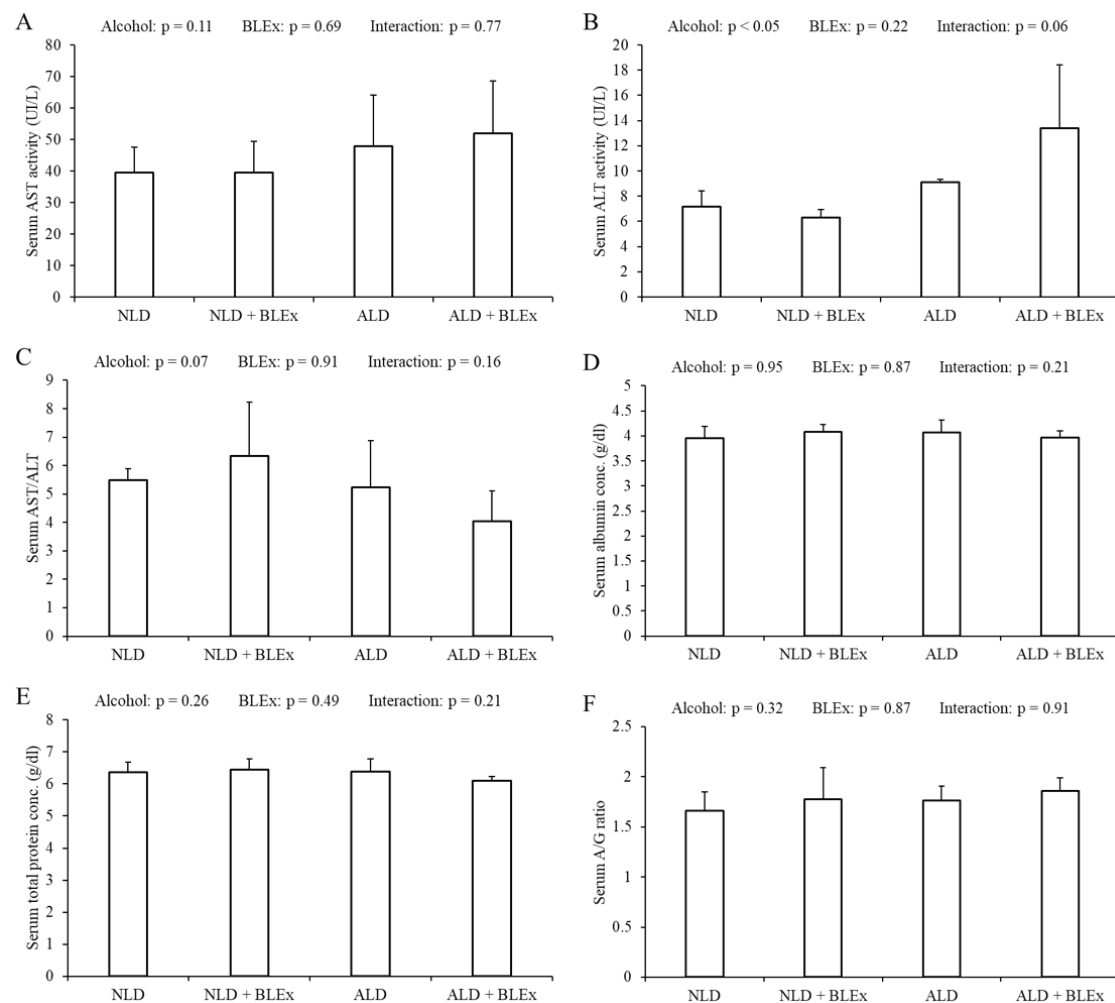


Figure 3.2 Indices of alcoholic liver injury. (A) Serum AST level, (B) ALT level, AST/ALT ratio, (D) albumin level, (E) total protein level, and (F) albumin/globulin ratio in rats ($n = 5$). The values are expressed as the mean \pm SD.

3.3.3 肝臓のアルコール代謝酵素の活性とタンパク質発現量、mRNA 発現量への影響

肝臓 ADH 活性、ALDH 活性、ADH1 mRNA 発現量、ALDH2 mRNA 発現量、CYP2E1 タンパク質発現量、CYP2E1 mRNA 発現量の結果を Figure 3.3 に示す。肝臓 ADH 活性は、いずれの摂取条件でも差がなかった。肝臓 ALDH 活性は、アルコール摂取によって有意に増加したが、BLEx 摂食による影響は認められなかった。肝臓 ADH1 mRNA 発現量は、BLEx 摂取によって非 BLEx 摂取と比較して 1.4 倍と有意に増加した。肝臓 ALDH2 mRNA 発現量は、いずれの摂取条件でも差がなかった。肝臓 CYP2E1 タンパク質発現量は、NLD 群と比較して、ALD 群では 3 倍、ALD + BLEx 群では 2.5 倍、それぞれ有意に増加した。また、NLD + BLEx 群と比較して、ALD 群は 2 倍、ALD + BLEx 群では 1.7 倍、それぞれ有意に増加した。しかし、ALD 群と ALD + BLEx 群との間には有意な差は認められなかった。肝臓 CYP2E1 mRNA 発現量は、アルコール摂取で非アルコール摂取と比較して、2 倍と有意に増加したが、BLEx 摂食による影響は認められなかった。

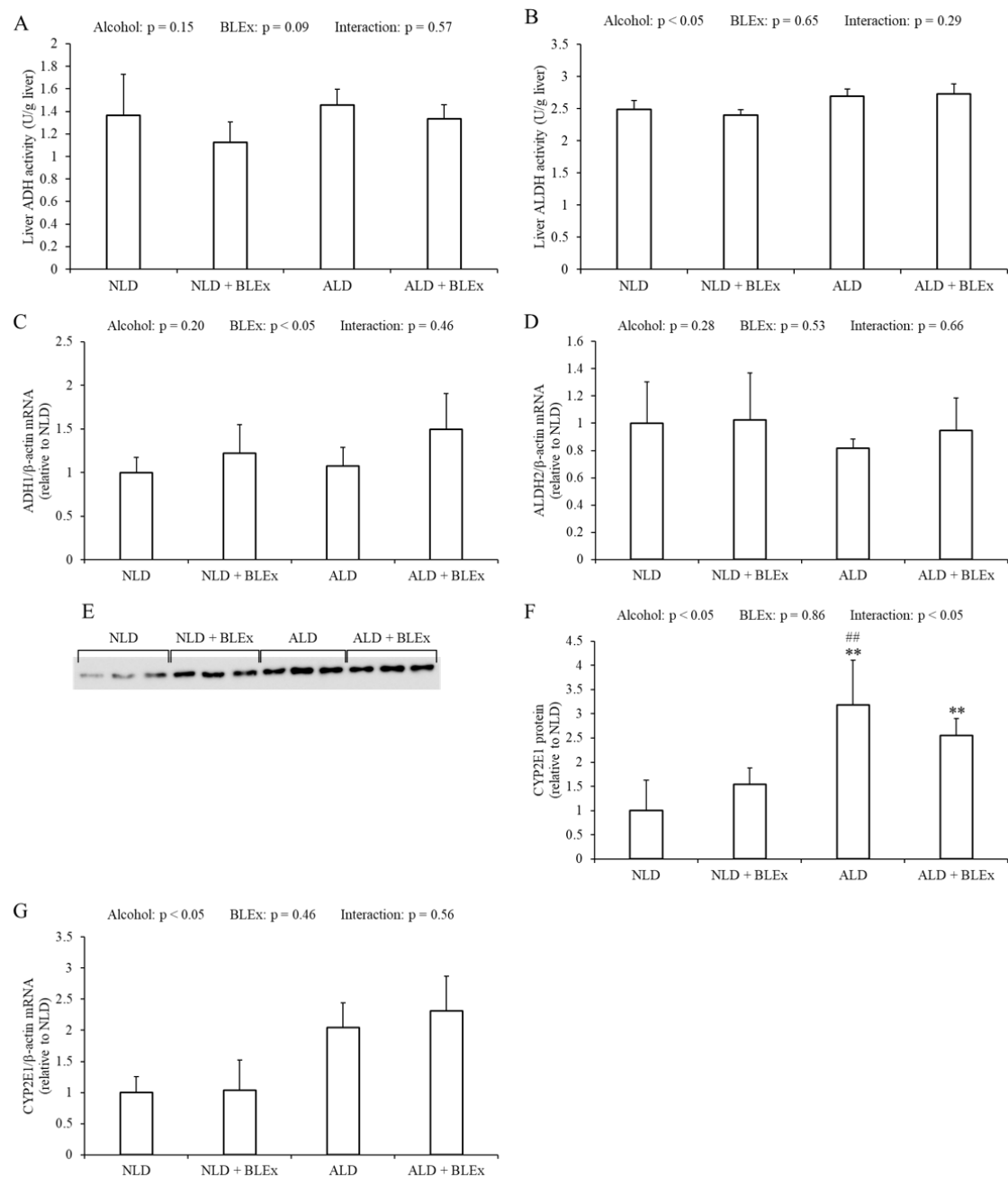


Figure 3.3 Level or expression of protein and mRNA related to alcohol metabolism in the liver. (A) Liver ADH and (B) ALDH activities; liver (C) ADH1, (D) ALDH2, and (G) CYP2E1 mRNA expression; and (E and F) liver microsomal CYP2E1 protein expression in rats ($n = 5$). The values are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$ compared to the NLD group, and ## $p < 0.01$ compared to the NLD + BLEx group.

3.3.4 肝臓のカルボニル化タンパク質量と HO-1 の mRNA 発現量への影響

肝臓カルボニル化タンパク質量と HO-1 mRNA 発現量の結果を Figure 3.4 に示す。肝臓カルボニル化タンパク質量は、いずれの摂取条件でも差がなかった。肝臓 HO-1 mRNA 発現量は、アルコール摂取によって非アルコール摂取と比較して 1.9 倍と有意に増加した。

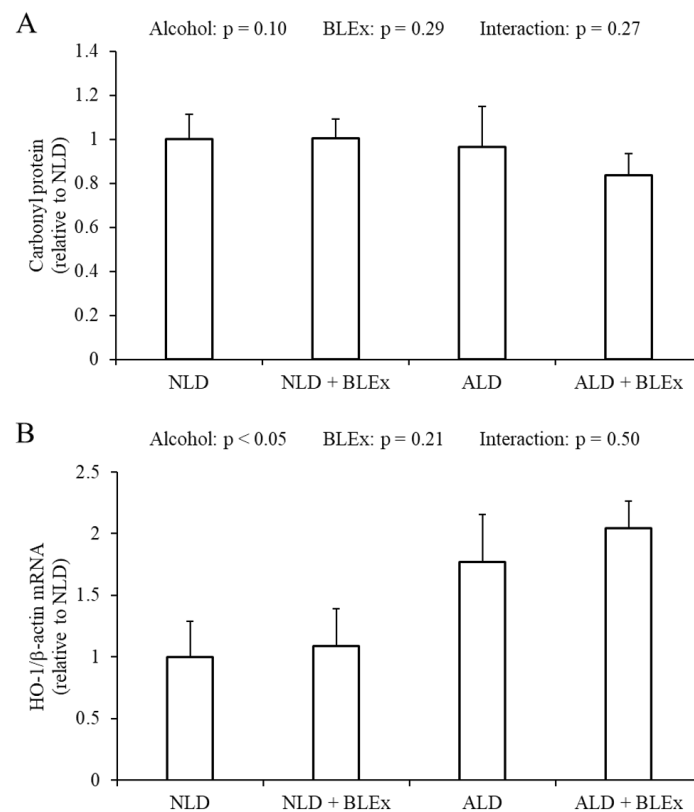


Figure 3.4 Liver carbonyl protein level and HO-1 mRNA expression in rats. (A) Liver carbonyl protein level and (B) HO-1 mRNA expression in rats ($n = 5$). The values are expressed as the mean \pm SD.

3.3.5 肝臓トリグリセリドレベルと総コレステロールレベルへの影響

肝臓 TG レベルと T-Chol レベルの結果を Figure 3.5 に示す。肝臓 TG レベルと T-Chol レベルは、いずれの摂取条件でも差がなかった。

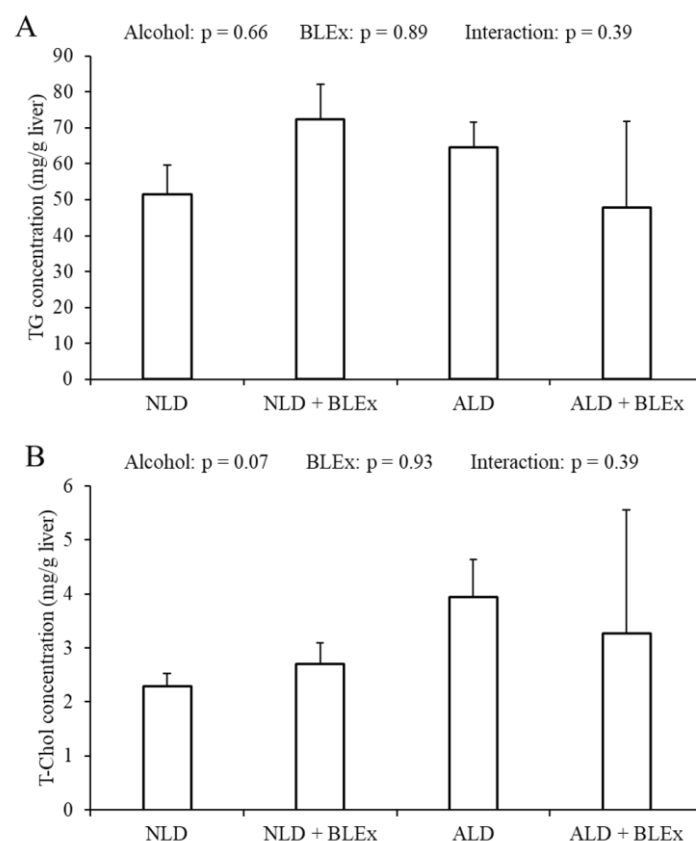


Figure 3.5 Liver TG and T-Chol levels in rats. (A) Liver triglyceride and (B) total cholesterol level in rats ($n = 5$). The values are expressed as the mean \pm SD.

3.4 考察

第2章で、エタノール単回投与したラットに BLEx を 1 g/kg 体重で単回投与すると、アルコール代謝とアルコール吸収に効果があることを示した。本章では、高用量の BLEx 摂取が、継続的なエタノール摂取させたラットのアルコール代謝に対する効果を検証した。本章の BLEx 濃度は、単回投与時の研究をもとに、3%に設定した。また、アルコール摂取の動物モデルは、Reyes-Gordillo らの報告をもとに設定した⁴⁵⁾。5%エタノール液体飼料を5週間摂食させたとき、肝障害の指標である血清 AST 活性、ALT 活性、総タンパク質濃度、アルブミン濃度、A/G 比は、影響が認められなかったことから、本章の条件では、アルコール性肝

障害は誘導できなかった。過去に、アルコール液体飼料を 12 週間摂取させて、アルコール性肝障害を誘導している報告がある²⁷⁾ことから、アルコール性肝障害を誘導するためには、さらに摂取期間を長くする必要があると考えられる。アルコール摂取は、肝重量に影響を与えない報告がある⁴⁶⁾が、体重を減少させる報告⁴⁷⁾もある。本章でも報告と同様の影響が認められている。

本章において、BLEx 摂食によって体重は変化しなかったが、アルコール摂取による体重減少にも影響を与えなかったことから、アルコールによる体重減少に BLEx は影響を与えないことが示唆された。これまでに、4 週齢の SD ラットにエタノールを 8 週間摂取させると、摂食量が減少する報告がある⁴⁸⁾。本章でも、アルコール摂取によって摂食量が減少している。しかし、BLEx 摂食による影響は認められなかった。以上のことから、アルコール摂取による摂食量や体重の減少に BLEx は影響を与えないことが示唆された。

本章では、肝臓のアルコール代謝酵素の ADH、ALDH、CYP2E1 への BLEx の効果を検証した。アルコール摂取によって肝臓の CYP2E1 タンパク質と mRNA の発現量が増加しており、アルコールの長期摂取によって、CYP2E1 の発現量が増加する報告⁴⁹⁾と一致しているが、BLEx 摂食による影響は認められなかった。BLEx のポリフェノール濃度は、403 mg/g タンニン酸等量であり、本章の液体飼料のポリフェノール濃度は、1.598 g/L となる。ポリフェノール摂取による CYP2E1 の制御に関してはいくつか報告がある。ポリフェノールを 350 mg/L 含む赤ワインを SD ラットに 9 週間投与すると、CYP2E1 タンパク質発現量を増加させる報告がある⁵⁰⁾。一方で、総フラボノールを 55.2 mg/L 含む赤ワインを Wistar ラットに 10 週間投与すると、アルコールによって誘導された CYP2E1 タンパク質発現量を阻害する報告がある⁵¹⁾。また、エピガロカテキン-3-ガレート を 3g/L で摂取したとき、アルコール摂取によって増加した CYP2E1 タンパク質発現量

に影響を与えない報告もある⁴⁶⁾。本章での BLEx 摂取量をヒトの場合に換算すると 1.69 g/kg 体重となり、非常に高い用量である。加えて、本章の液体飼料中のポリフェノール濃度も他の研究と比較して高い濃度である。しかし、BLEx は、アルコールによって増加した CYP2E1 のタンパク質と mRNA の発現量に影響を与えなかった。

凍結乾燥させたブルーベリー葉には、プロアントシアニジンが 11.34%含まれている²³⁾。プロアントシアニジンをラットに 12.6 mg/kg 体重で 5 日間投与しても、肝臓の CYP2E1 活性に影響を与えない報告がある⁵²⁾。本章でも、継続的で高用量の BLEx 摂食は、肝臓の CYP2E1 の発現に影響を与えないことが示された。また、アルコール摂取は、肝臓の ADH1 と ALDH2 の mRNA 発現量と ADH 活性にも影響を与えなかったが、肝臓の ALDH 活性を有意に増加させた。これらの変化は、Kishimoto らの報告と一致している⁵³⁾。しかし、肝臓 ADH 活性、ALDH 活性、ADH1 mRNA 発現量、ALDH2 mRNA 発現量のいずれも、BLEx 摂食による影響は認められなかった。これまでに、アルコールとデキストリンを摂食すると、胃内容物排出の減速を介して、血中エタノール濃度が減少する報告がある⁵⁴⁾。加えて、ブドウ種子由来プロアントシアニジンが、胃内容物排出を遅延させる報告もある⁵⁵⁾。第 2 章で、BLEx が、エタノールの吸収を阻害することで、アルコール関連障害を予防するのに有用であることを示唆している。以上のことから、BLEx は、胃内容物排出を遅らせることで、アルコールの吸収を調節する可能性がある。そして、継続的で高用量の BLEx 摂取は、肝臓のアルコール代謝に影響を与えないことが示唆された。

肝臓のアルコール誘導性酸化ストレスの原因に、CYP2E1 が関与しており³⁹⁾、酸化ストレスによって、アルコール性脂肪肝が誘導される⁵⁶⁾。また、CYP2E1 の発現増強による酸化ストレスによって、HO-1 の mRNA と活性が増強する。本章

でも、アルコール摂取によって、肝臓の HO-1 mRNA 発現量と CYP2E1 のタンパク質と mRNA 発現量が上方制御することを示した。しかし、BLEx 摂食による影響は認められなかった。

肝臓のカルボニル化タンパク質は、アルコール誘導性酸化ストレスで増加する報告がある^{57, 58)}。本章において、肝臓のカルボニル化タンパク質量は、アルコール摂取によって変化しなかったことから、本章の条件では、アルコール摂取による酸化障害能が、生体がもともと持っている抗酸化能を超えることができなかったため、酸化ストレスを誘導することができなかったと考えられる。いくつかの報告でポリフェノールによって、HO-1 やスーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化タンパク質の発現が誘導されることが示されている。実際に、エタノール誘導性肝繊維症モデルにおいて、茶ポリフェノールは、アルコールによって増加した血清マロンジアルデヒド量と減少した血清スーパーオキシドジスムターゼレベルをそれぞれ改善させる報告がある⁵⁹⁾。加えて、クロロゲン酸は、HO-1 のタンパク質発現量と mRNA 発現量を濃度依存的に増加させる報告もある⁶⁰⁾。本章で、BLEx 摂食が、肝臓の HO-1 mRNA 発現量に影響を与えなかったことから、エタノールによって CYP2E1 が誘導されているにもかかわらず、高用量の BLEx は、抗酸化能に影響を与えないことが示唆された。

以前の報告で、アルコール性脂肪肝の進行に、CYP2E1 の発現増加が関与していることが示されている^{61, 62, 63)}。本章では、アルコール摂取によって、肝臓の CYP2E1 のタンパク質発現と mRNA 発現は増加しているが、肝臓 TG 量と T-Chol 量は増加せず、アルコール性脂肪肝を誘導することができなかった。また、肝臓 TG 量と T-Chol 量はいずれも BLEx 摂取による影響が認められなかったことから、高用量の BLEx は、肝臓の脂肪蓄積に影響を与えないことが示唆された。

3.5 小括

本章では、高用量の BLEx 摂食が継続的なエタノール摂取時のアルコール代謝に与える影響について検証することを目的に実験を行った。5%エタノール液体飼料を SD ラットに摂食させた時、体重の減少、摂食量の減少、血清 ALT 活性の増加、肝臓 ALDH 活性の増加、肝臓 CYP2E1 タンパク質発現量の増加、肝臓 CYP2E1 mRNA 発現量の増加、肝臓 HO-1 mRNA 発現量の増加が確認された。しかし、3% BLEx 含有液体飼料を摂食させても、いずれの測定項目でも影響は認められなかった。以上のことから、本章では、アルコール誘導性酸化ストレスとアルコール性脂肪肝は誘導されなかったが、継続的なアルコール摂取によって肝臓の CYP2E1 と抗酸化タンパク質の発現を増加させた。そして、継続的な高用量の BLEx 摂食は、エタノールの悪影響を増強させないことが示唆された。

第 4 章 *In vitro* 評価系におけるアルコール性肝細胞毒性の誘導とブルーベリー葉抽出物の効果

4.1 緒言

アルコール性肝障害は、アルコール摂取によって誘導される脂肪肝や肝炎、肝繊維症などの総称である。そして、アルコール性肝障害の初期症状として肝細胞の毒性がある。アルコール性の肝細胞毒性のメカニズムとして、アポトーシスの誘導と細胞周期の遅延、停止が挙げられる。アポトーシスの誘導に関しては、5% エタノール液体飼料を 12 週間、ラットに投与すると、肝細胞にアポトーシスが誘導される報告がある²⁷⁾。また、部分肝切除したラットにエタノールを摂取させると、細胞周期が抑制され、肝臓の再生が阻害される報告⁶⁴⁾があり、実質的に細胞周期を抑える。

これまでに、*in vitro* 評価系でのアルコール性の肝細胞毒性に関する報告は多数ある。例えば、HepG2 細胞にエタノールを処理すると、細胞の生存率が減少する²⁸⁾。また、ヒト胎児肝細胞の WRL-68 細胞にアセトアルデヒドを処理すると、酸化障害を介して細胞の生存率が減少する報告もある⁶⁵⁾。しかし、生体内においては、飲酒後にはエタノールとアセトアルデヒドが共存している状態にある。実際に、ラットにエタノールを投与した際の、時間ごとの血清エタノール濃度と血清アセトアルデヒド濃度は、同時に共存している時間帯がある³⁵⁾。また、第 2 章の研究でも、血清中にエタノールとアセトアルデヒドが共存していることを確認していることから、エタノールとアセトアルデヒドの共存によるアルコール性肝細胞毒性の増強作用が注目される。実際に、エタノールとアセトアルデヒドを HepG2 細胞に併用処理すると、細胞生存率が減少することが報告されている²⁹⁾。しかし、HepG2 細胞は、エタノールをアセトアルデヒドに酸化

する ADH と CYP2E1 の活性が極端に低い報告があり³⁰⁾、アルコール代謝能が低い。アルコール代謝が正常に働いている正常肝細胞にエタノールとアセトアルデヒドを併用処理した際の肝細胞毒性を検証した報告はない。

以上のことから、本章では、エタノールとアセトアルデヒドの併用処理による肝細胞への影響とそのメカニズムを解明することを目的とする。また、第 2 章では、*in vivo* 評価系における BLEx のアルコール代謝に対する影響を検証したことから、本章では *in vitro* 評価系におけるアルコール性肝細胞毒性に対する BLEx の効果も併せて検証した。

4.2 実験方法

4.2.1 細胞培養方法

ラット正常肝細胞株として RLN-10 を国立研究開発法人医療基盤・健康・栄養研究所 (Osaka, Japan) より購入し、用いた。RLN-10 細胞は、 2.5×10^3 cells/cm² で播種し、37℃、CO₂ 濃度 5% の環境下で、10% ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma-Aldrich, MO) 含有高グルコース D-MEM 培地 (Wako、以降、培地と表記) を用いて培養した。

4.2.2 ブルーベリー葉抽出物の調製

第 2 章の「2.2.1 ブルーベリー葉抽出物の調製」に準じて行った。

4.2.3 培養細胞へのサンプル処理

エタノール、アセトアルデヒド (Sigma-Aldrich)、ジアリルスルフィド (Tokyo Chemical Industry)、4-メチルピラゾール (Tokyo Chemical Industry) は、播種から

48 時間後に所定の濃度になるように培地に添加し、24 時間培養した。 α -トコフェロール (Sigma-Aldrich) は、播種から 24 時間後に 10 μ M になるように培地に添加し、48 時間培養した。アポシニン (Tokyo Chemical Industry) は、播種から 47 時間後に 10 μ M になるように培地に添加し、25 時間培養した。BLEx は、播種から 24 時間後に所定の濃度になるように培地に添加し、24 時間培養した。また、Figure 4.1 にサンプル処理時間のイメージ図を示す。エタノールやアセトアルデヒドの揮発を防ぐために、Elamin らの報告⁶⁶⁾を参考にエタノールとアセトアルデヒド処理中は、ディッシュ及びプレートの縁をビニールテープもしくはパラフィルムでシールした。

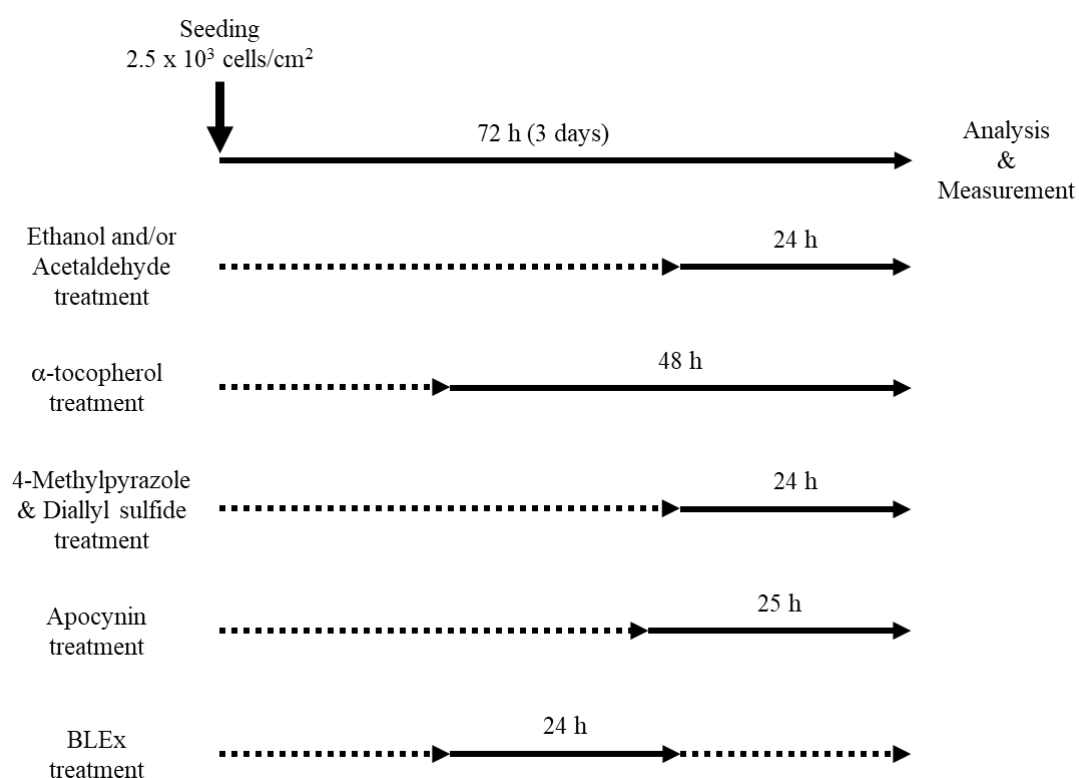


Figure 4.1 Time course of sample treatment.

4.2.4 細胞毒性試験

サンプル処理した細胞を、0.02% EDTA-リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、0.25%トリプシン溶液 (Sigma-Aldrich) でプレートから剥がした。細胞懸濁液 50 μ l を 0.5%トリパンブルー (Wako) 溶液 50 μ l と混合し、血球計算盤を用いて、未染色の細胞 (生細胞) と染色した細胞 (死細胞) の数をそれぞれカウントした。

4.2.5 細胞周期解析

サンプル処理した細胞を 1.5 ml チューブに全量回収し、300 x g で 3 分間遠心分離した。その後、上清を除去し、70%エタノール 1 ml に懸濁し、-30°Cで一晩放置した。その後、ミニ遠心分離機 (Thermo Fisher Scientific) で約 15 秒間遠心分離し、2.5 mg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) 溶液 25 μ l に懸濁し、37°Cで 30 分間インキュベートした。インキュベート後、50 μ g/ml ヨウ化プロピジウム (PI、ナカライテスク) 溶液を 500 μ l 添加し、40 μ m のメッシュフィルター (pluriSelect Life Science, Leipzig, Germany) に通した。細胞周期は、フローサイトメトリー (Attune[®] NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific) にて解析した。

4.2.6 細胞内活性酸素種量解析

サンプル処理した細胞を 1.5 ml チューブに全量回収し、10 μ M 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン二酢酸 (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich) 溶液 500 μ l に懸濁し、37°Cで 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で 2 回洗浄後、10 μ g/ml PI-FACS buffer (2% FBS、2 mM EDTA、PBS) 1 ml に懸濁した後、40 μ m のメッシュフィルターに通した。細胞内活性酸素種 (ROS) 量は、DCF の蛍光強度として、フローサイトメトリーで解析した。

4.2.7 カルボニル化タンパク質量の解析

接着した細胞を PBS で洗浄後、2% Protease inhibitor 含有 PBS を 400 μ l 添加し、セルスクレイパーで細胞を剥がし、ジルコニアビーズ (ϕ 2 mm) 入りの 2 ml チューブに全量回収した。ビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100R, TOMY SEIKO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、冷却しながら 4,000 rpm で 3 分間細胞を破碎した。その後、12,000 x g、4°C で 15 分間遠心分離した後、上清を 300 μ l 回収した。カルボニル化タンパク質の DNPH 誘導体化と電気泳動は、第 3 章の「3.2.7 肝臓のカルボニル化タンパク質量の解析」に準じて行った。

4.2.8 CYP2E1 タンパク質量の解析

サンプル処理した細胞は、PBS で洗浄後、2% Protease inhibitor 含有細胞溶解 buffer を 200 μ l 添加し、1.5 ml チューブに全て回収し、氷中で 30 分間放置した。12,000 x g、4°C で 30 分間遠心分離し、上清を 100 μ l 回収し、2 x sample buffer 100 μ l と混合した後、100°C で 5 分間加熱し、電気泳動用サンプルを作製した。電気泳動と抗体反応は、第 3 章の「3.2.5 肝臓ミクロソームの分画と CYP2E1 タンパク質発現量の解析」に準じて行った。ただし、ブロッキング反応は、ブロッキングワン P 溶液 (Nacalai tesque) に浸し、20 分間行った。また、ローディングコントロールとして β -actin を検出しており、一次抗体反応では、Monoclonal anti- β -actin antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich) を用いて、室温で 1 時間反応させ、二次抗体反応では、Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG を用いて、室温で 1 時間反応させた。

4.2.9 培地中の過酸化水素量の測定

培地に BLEx を 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、「3.2.1 細胞培養方法」と同じ条件で 24 時間インキュベートした。また、BLEx 100 $\mu\text{g/ml}$ には、同時にカタラーゼ (Wako) を 1000 U/ml になるように添加した。サンプル処理した培地を 900 μl 回収し、FOX assay 溶液 (1.1 M HClO_4 、2.5 mM 硫酸アンモニウム鉄 (II)、2.5 mM Xylenol orange) を 100 μl 添加し、室温で 30 分間放置した。反応後の溶液を 96 well プレートに 200 $\mu\text{l/well}$ で分注し、プレートリーダー (SpectraMax ABS, MOLECULAR DEVICES, CA) で 560 nm の吸光度を測定した。

4.2.10 統計処理

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差 (SE) で表した。有意差検定は、Tukey-Kramer テストを行った。統計処理は、Statcel3 software を使用して行った。P 値が、0.05 よりも小さい時、有意な差があるとした。

4.3 結果

4.3.1 エタノールおよびアセトアルデヒドの単独処理と併用処理による細胞毒性への影響

エタノール単独処理、アセトアルデヒド単独処理、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による生細胞数と死細胞率の結果を Figure 4.2 に示す。200 mM、400 mM、800 mM のエタノールは、生細胞数をそれぞれ 50%、20%、0.3%まで有意に減少させた。さらに、400 mM、800 mM のエタノールは、死細胞率をそれぞれ 6.1 倍、40 倍と有意に増加させた。アセトアルデヒドは、生細胞数および死細胞率いずれにおいても有意な差は認められなかった。エタノール 200 mM とア

セトアルデヒド 100 μM の併用処理は、生細胞数を 70%まで有意に減少させたが、死細胞率に影響を与えなかった。

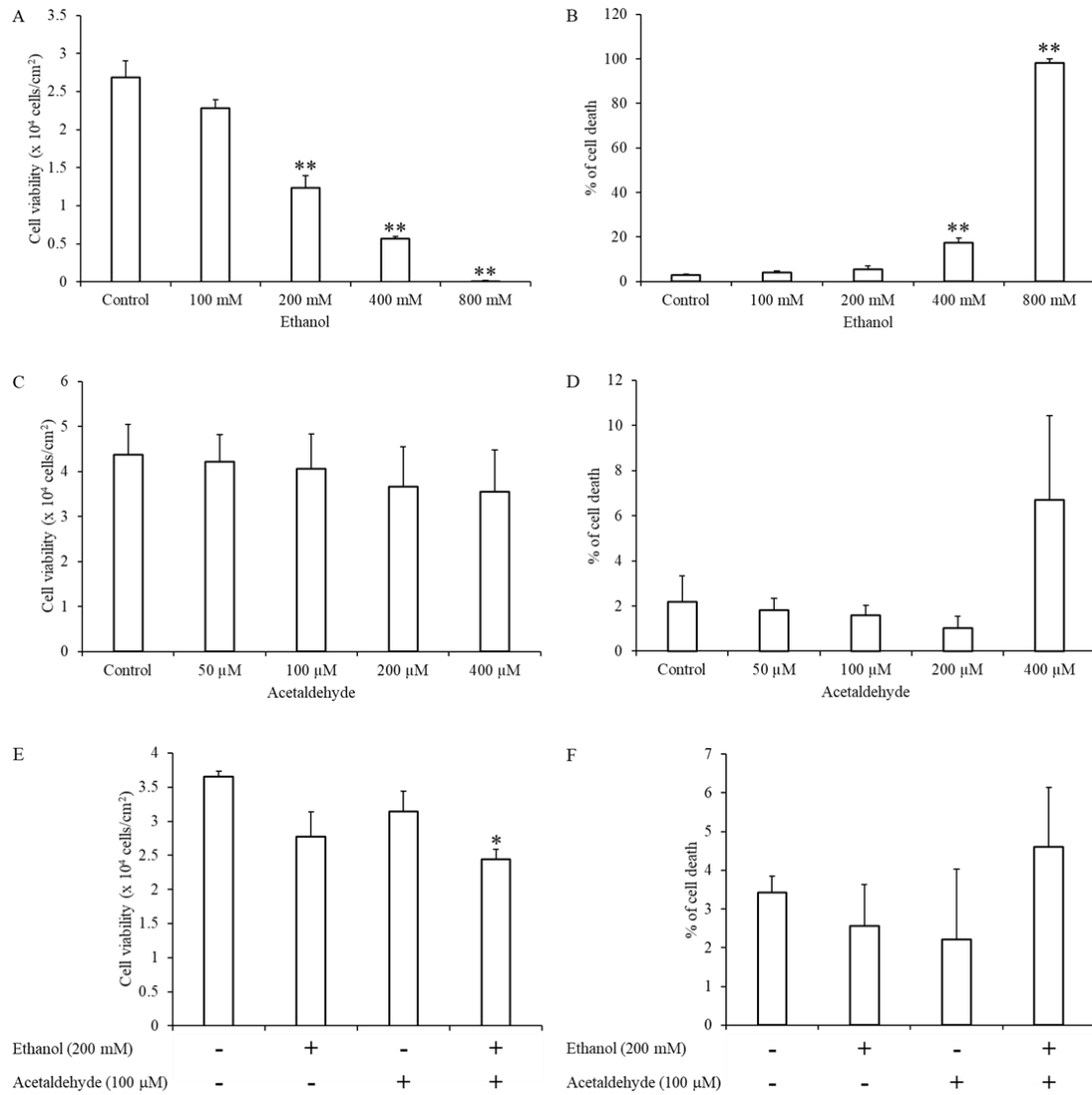


Figure 4.2 Effect of ethanol and/or acetaldehyde treatment on cell viability of RLN-10 cells. (A) Cell viability and (B) % of cell death of ethanol treatment, (C) cell viability and (D) % of cell death of acetaldehyde, and (E) cell viability and (F) % of cell death of ethanol + acetaldehyde treatment in RLN-10 cells (n = 3). The values are expressed as the mean \pm SE. * p < 0.05 and ** p < 0.01 compared to the non-treatment.

4.3.2 エタノールおよびアセトアルデヒドの単独処理と併用処理による細胞周期への影響

エタノール単独処理、アセトアルデヒド単独処理、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞周期解析の結果を Figure 4.3 に示す。エタノール単独処理およびエタノール・アセトアルデヒド併用処理は、G0/G1 期細胞の割合を 1.1 倍有意に増加させ、G2/M 期細胞の割合を 0.8 倍有意に減少させたが、S 期細胞の割合には影響を示さなかった。アセトアルデヒド単独処理は、細胞周期に影響を与えなかった。

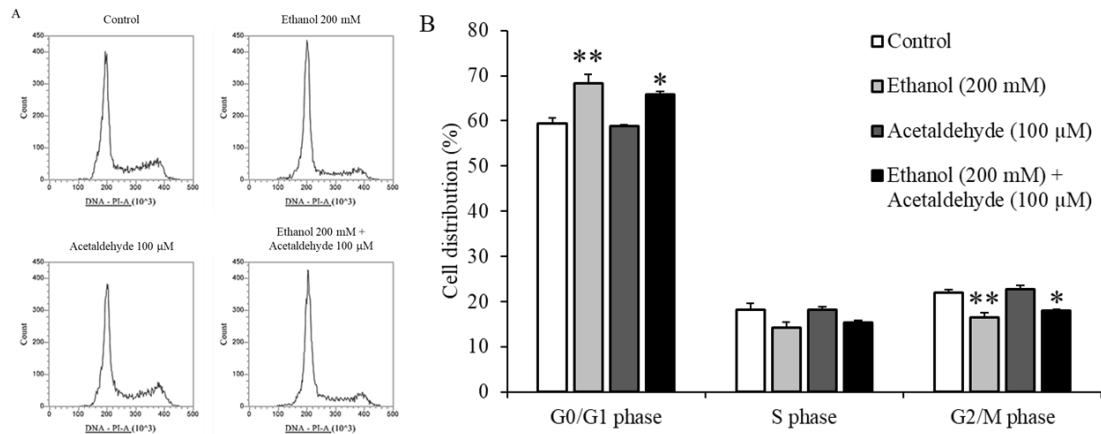


Figure 4.3 Effect of ethanol and/or acetaldehyde treatment on cell cycle in RLN-10 cells. (A) Representative histogram of flow cytometry and (B) percentage of G0/G1 phase, S phase and G2/M phase in RLN-10 cells ($n = 3$). The values are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the non-treatment.

4.3.3 エタノールおよびアセトアルデヒドの単独処理と併用処理による酸化ストレスへの影響

エタノール単独処理、アセトアルデヒド単独処理、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞内 ROS 量とカルボニル化タンパク質量、エタノール・アセトアルデヒド併用処理下における α -トコフェロール処理の生細胞数と死細胞率の結果を Figure 4.4 に示す。細胞内 ROS 量は、エタノール単独処理およびエタノール・アセトアルデヒド併用処理で、それぞれ 1.7 倍、1.9 倍有意に増加したが、アセトアルデヒド単独処理では、変化しなかった。カルボニル化タンパク質量に関しては、いずれの処理でも変化しなかった。エタノール・アセトアルデヒド併用処理によって 0.6 倍と有意に減少した生細胞数は、抗酸化物質の α -トコフェロールを処理することで 1.9 倍と有意に回復したが、死細胞率に影響を与えなかった。

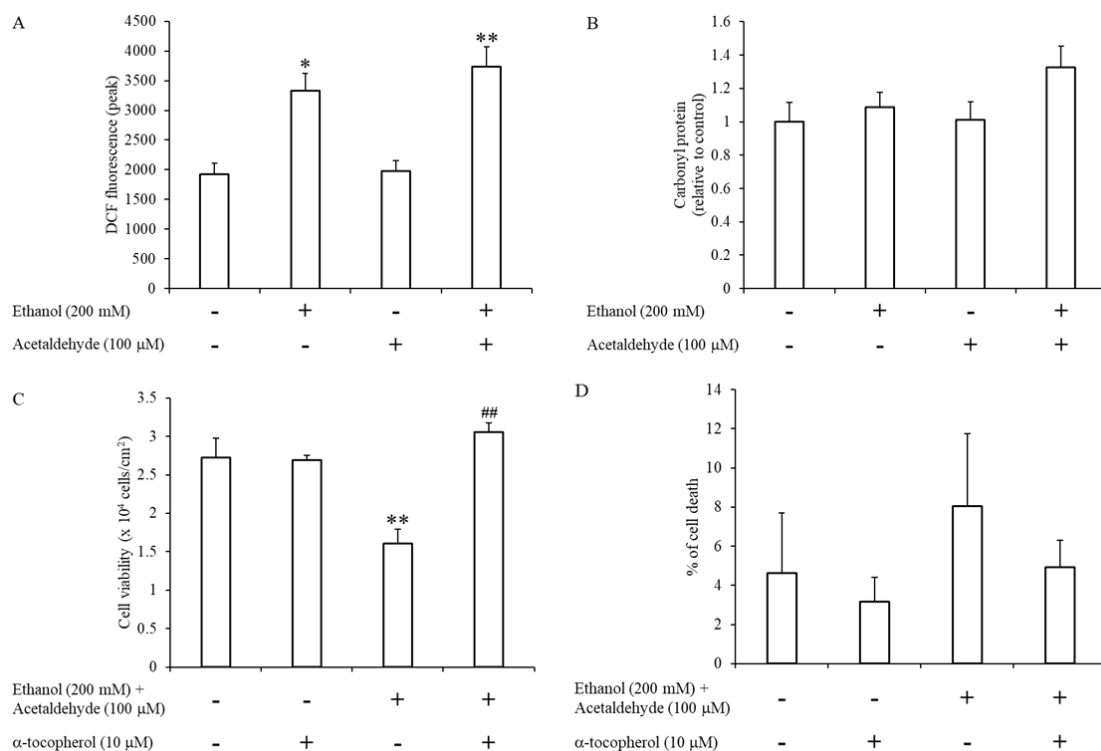


Figure 4.4 Effect of ethanol and/or acetaldehyde treatment on oxidative stress in RLN-10 cells. (A) Intracellular ROS, (B) carbonyl protein, and (C) cell viability and (D) % of cell death treated with or without α -tocopherol in RLN-10 cells ($n = 3$). The values are expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the non-treatment. ## $p < 0.01$ compared to the Ethanol + Acetaldehyde treatment.

4.3.4 エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスへの CYP2E1 の関与

エタノール単独処理、アセトアルデヒド単独処理、エタノール・アセトアルデヒド併用処理における CYP2E1 タンパク質発現量、エタノール・アセトアルデヒド併用処理下におけるジアルシルスルフィド、4-メチルピラゾール(いずれも CYP2E1 の阻害剤)、 α -トコフェロール処理の細胞内 ROS 量の結果を Figure 4.5 に示す。CYP2E1 タンパク質の発現量は、いずれの処理でも変化しなかった。エ

タノール・アセトアルデヒド併用処理下で 2.3 倍と有意に増加した細胞内 ROS 量をジアリルスルフィドと 4-メチルピラゾール処理は、0.8 倍と有意に低下させた。また、 α -トコフェロール処理もエタノール・アセトアルデヒド併用処理によって有意に増加した細胞内 ROS 量を 0.7 倍と有意に低下させた。

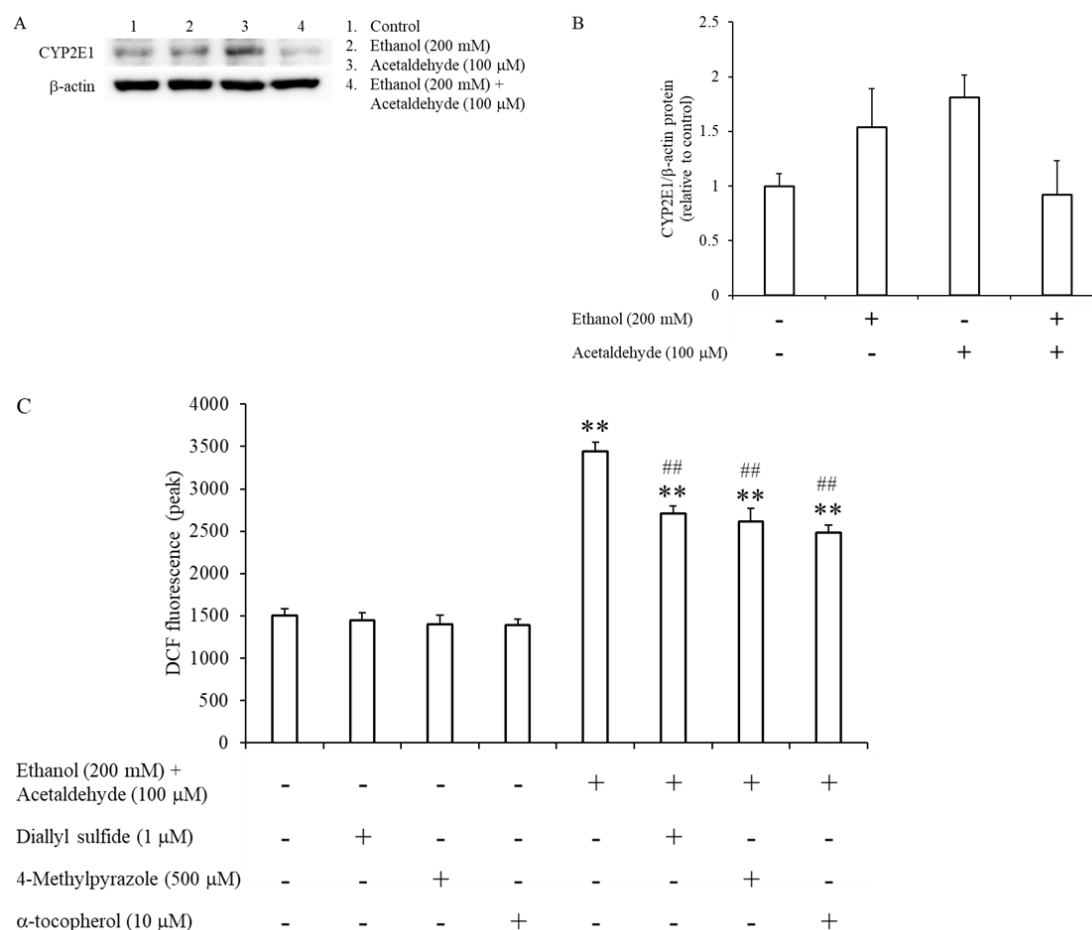


Figure 4.5 Involvement of CYP2E1 in the oxidative stress induced by ethanol and acetaldehyde in RLN-10 cells. (A and B) CYP2E1 protein expression, and (C) intracellular ROS treated with or without diallyl sulfide, 4-methylpyrazole or α -tocopherol in RLN-10 cells ($n = 3$). The values are expressed as the mean \pm SE. $**p < 0.01$ compared to the non-treatment. $##p < 0.01$ compared to the Ethanol + Acetaldehyde treatment.

4.3.5 エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスへの NADPH オキシダーゼの関与

エタノール・アセトアルデヒド併用処理下におけるアポシニン (NADPH オキシダーゼの阻害剤) 処理の細胞内 ROS 量の結果を Figure 4.6 に示す。エタノール・アセトアルデヒド併用処理で 1.7 倍と有意に増加した細胞内 ROS 量に対して、アポシニン処理は影響を示さなかった。

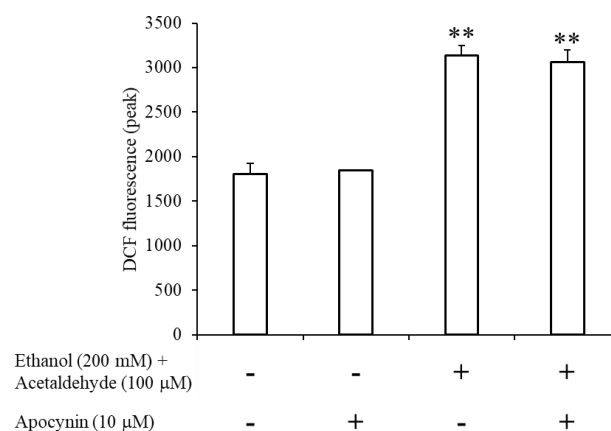


Figure 4.6 Involvement of NADPH oxidase in the oxidative stress induced by ethanol and acetaldehyde in RLN-10 cells. Intracellular ROS treated with or without apocynin in RLN-10 cells ($n = 3$). The values are expressed as the mean \pm SE. ** $p < 0.01$ compared to the non-treatment.

4.3.6 BLEx 処理による培地中の過酸化水素量への影響

BLEx 処理、BLEx 処理下におけるカタラーゼ処理の培地中の過酸化水素量の結果を Figure 4.7 に示す。BLEx 100 $\mu\text{g/ml}$ を培地に処理すると、過酸化水素量が 8.4 倍有意に増加したが、BLEx 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 処理では、変化しなかった。BLEx 100 $\mu\text{g/ml}$ で 6.3 倍と有意に増加した培地中の過酸化水素量は、カタラーゼ処理で 0.5 倍と有意に減少した。

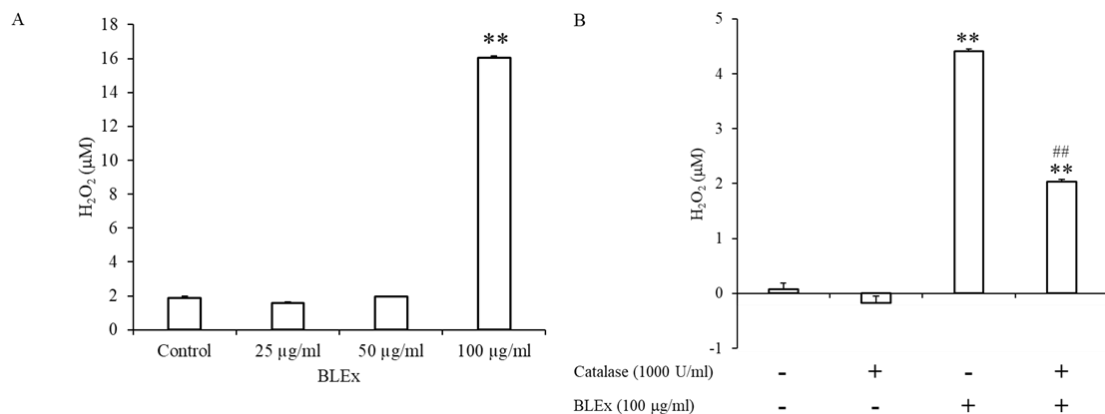


Figure 4.7 Influence of BLEx on production of hydrogen peroxide in culture medium. (A) Hydrogen peroxide level treated BLEx and (B) hydrogen peroxide level treated with or without catalase in 10% FBS-D-MEM culture medium (n = 3). The values are expressed as the mean \pm SE. ** $p < 0.01$ compared to the Control. ## $p < 0.01$ compared to the BLEx treatment.

4.3.7 BLEx 処理によるアルコール性肝細胞毒性への影響

エタノール・アセトアルデヒド併用処理下における BLEx 処理の生細胞数、死細胞率、細胞内 ROS 量の結果を Figure 4.8 に示す。BLEx 25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理は、生細胞数および死細胞率に影響を示さなかったが、BLEx 100 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理は、生細胞数を 0.6 倍と有意に減少させたが、死細胞率には影響を示さなかった。エタノール・アセトアルデヒド併用処理で有意に減少した生細胞数に対して、BLEx は、いずれの濃度でも影響を示さなかった。BLEx 100 $\mu\text{g/ml}$ 単独処理では、細胞内 ROS 量に影響を示さなかった。さらに、エタノール・アセトアルデヒド併用処理によって 1.9 倍と有意に増加した細胞内 ROS 量に対しても影響を示さなかった。

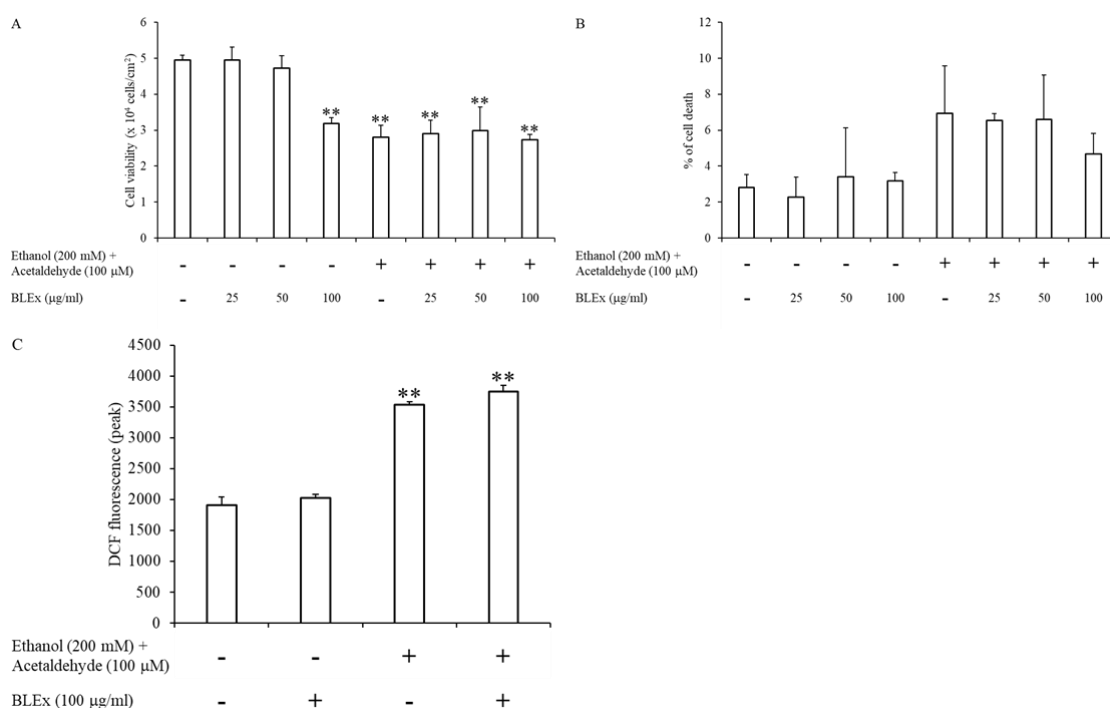


Figure 4.8 Effect of BLEx on ethanol and acetaldehyde induced cell viability and oxidative stress in RLN-10 cells (n = 3). (A) Cell viability, (B) % of cell death and (C) intracellular ROS treated BLEx with or without ethanol + acetaldehyde. The values are expressed as the mean \pm SE. ** $p < 0.01$ compared to the non-treatment.

4.4 考察

アルコール性肝細胞毒性の原因として、アポトーシスの誘導と細胞周期の遅延、停止が挙げられる。実際に、CYP2E1 を形質導入した HepG2 細胞にエタノールを処理すると、細胞内 ROS の産生増加、カスパーゼ 1 およびカスパーゼ 3 の活性化を介したアポトーシスが誘導される報告がある⁶⁷⁾。また、細胞周期に関しては、ADH を形質導入した HepG2 細胞にエタノールを処理すると、細胞周期が G2/M 期で停止する報告がある^{68, 69)}。本章の結果では、高濃度のエタノール単独処理およびエタノール・アセトアルデヒド併用処理によって、ラット正常肝細胞株の生細胞数が有意に減少した。また、エタノール単独処理およびエタノール・アセトアルデヒド併用処理によって、細胞内 ROS の産生が増加した。

ール・アセトアルデヒド併用処理によって、G0/G1 期細胞の割合の有意な増加と G2/M 期細胞の割合の有意な減少が確認された。このことから、本章での *in vitro* 評価系において、細胞周期の遅延によるアルコール性肝細胞毒性の誘導が示された。

飲酒した時の生体内においては、エタノールとアセトアルデヒドが同時に存在している。本章では、正常肝細胞においてエタノールとアセトアルデヒドの併用処理によって、生細胞数の有意な減少、細胞内 ROS 量の有意な増加を確認した。特に生細胞数の有意な減少に関しては、エタノールとアセトアルデヒドの相乗効果が認められた。過去の報告では、ラットにエタノール溶液を 6 g/kg 体重になるように投与するとアルコール性肝障害が誘導されるが、その時の血漿エタノール濃度は、約 0.53 g/L (11.5 mM) で、血漿アセトアルデヒド濃度は、約 3.6 mg/L (81.7 μ M) であった⁷⁰⁾。 *In vitro* 評価系においては、CYP2E1 とアルコールデヒドロゲナーゼを形質導入した HepG2 細胞にエタノール 100 mM を処理すると細胞生存率が減少する報告がある⁷¹⁾。このことから、アルコール性肝障害が誘導されている状況下では、エタノールとアセトアルデヒドが共存しており、本章におけるエタノールおよびアセトアルデヒド濃度は、生体内と比較すると高い濃度ではあるが、短時間の培養で肝細胞毒性を再現できる濃度であるため、*in vitro* 評価において、適切な範囲内である。細胞内 ROS 量は、エタノール単独処理とエタノール・アセトアルデヒド併用処理が同程度に上昇していた。カルボニル化タンパク質は、酸化修飾を受けたタンパク質で、酸化ストレスの指標となり、アルコール性肝障害でも産生される報告がある⁵⁸⁾。アルコール性肝細胞毒性の要因として、アルコールによって誘導される酸化ストレスがある。そして、抗酸化物質によってアルコール性細胞毒性が改善される報告がある。実際に、HepG2 にエタノールを処理すると、細胞生存率が減少し、細胞内 ROS 量が増加するが、

ケルセチンを処理することで、細胞内 ROS 量と細胞生存率が改善する⁷²⁾。本研究でも、抗酸化物質である α -トコフェロールを処理するとエタノール・アセトアルデヒド併用処理による生細胞数の有意な減少を回復させることが確認された。また、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞内 ROS 量の増加に対しても有意に改善させることも確認された。以上のことから、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞毒性において、酸化ストレスは重要な要因であることが分かる。しかし、エタノールとアセトアルデヒドの併用処理による細胞毒性の増強に、細胞内 ROS 量は関与せず、アセトアルデヒドが ROS 産生とは異なる部分で相乗的に作用していると考えられる。アセトアルデヒドは、タンパク質とアダクトを形成することが知られており、ラット初代肝細胞にアセトアルデヒドタンパク質アダクト由来の最終糖化産物を処理すると生細胞率が減少する報告がある⁷³⁾。このことから、本章におけるアセトアルデヒドアダクトがエタノール単独の細胞毒性を増強する可能性がある。

アルコール誘導性酸化ストレスが発生する要因として、CYP2E1 と NADPH オキシダーゼの 2 つがある。CYP2E1 は、エタノールをアセトアルデヒドに酸化する解毒酵素で、アルコール代謝の副経路として働く¹²⁾。CYP2E1 は、エタノールを酸化する際に ROS を産生させる報告がある³⁹⁾。本章では、CYP2E1 のタンパク質発現には変化が見られなかった一方、CYP2E1 の阻害剤であるジアリルスルフィドと 4-メチルピラゾールを用いて、細胞内 ROS 量の変化を検証したが、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞内 ROS 量の増加を有意に改善させた。以上のことから、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスの誘導に CYP2E1 の活性が関与していることが示唆された。

一方、ラットにエタノールを摂取させることで肝障害が誘導され、NADPH オキシダーゼの阻害剤であるジフェニレンヨードニウムにより改善された報告が

ある⁷⁴⁾。また、ヒト肝腺がん細胞にエタノールを処理することで、細胞内 ROS 量が増加するが、NADPH オキシダーゼの阻害剤であるアポシニンを処理すると改善される報告もある⁷⁵⁾。本章では、NADPH オキシダーゼ阻害剤のアポシニンを用いて、細胞内 ROS 量の変化を検証したが、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞内 ROS 量の増加に影響を与えなかった。以上のことから、エタノールとアセトアルデヒドの併用処理による酸化ストレスの誘導に NADPH オキシダーゼは関与していないことが示唆された。

高濃度のポリフェノールを細胞培養で用いる培地に処理すると、過酸化水素が発生する。実際に、リンゴポリフェノールを培地に処理すると、過酸化水素が産生される報告がある⁷⁶⁾。本研究で用いている BLEx にもポリフェノールが含まれているため、まず培地に処理した際の過酸化水素産生について検証した。結果としては、高濃度の BLEx 処理で培地中の過酸化水素濃度が有意に増加したが、カタラーゼ処理によって有意に改善させた。このことから、細胞培養用の培地に BLEx を高濃度処理すると、過酸化水素が産生されることが分かった。

ポリフェノールが含有している食品が、アルコール性肝障害を予防、改善させる報告は多数ある。例えば、クロロゲン酸がアルコール性肝障害を改善させる報告がある⁷⁷⁾。また、エタノール処理でアポトーシスを誘導させたヒト肝細胞の Chang 細胞株にレスベラトロールを処理すると、肝細胞毒性を改善させる報告もある⁷⁸⁾。本章では、エタノール・アセトアルデヒド併用処理で誘導された肝細胞毒性に対する BLEx の効果を検証した。BLEx 100 µg/ml 単独で、生細胞数を有意に減少させたが、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による生細胞数の減少に対しては、いずれの BLEx 濃度でも影響を与えなかった。また、細胞内 ROS 量の変化についても検証したが、エタノール・アセトアルデヒド併用処理の有無に関わらず、BLEx 100 µg/ml 処理による影響は認められなかった。このことか

ら、BLEx は、高濃度単独では毒性を示すものの、アルコール性肝細胞毒性に影響を与えないことが示唆された。また、アルコール誘導性酸化ストレスに対しても影響を与えないことが示唆された。

4.5 小括

本章では、エタノールとアセトアルデヒドの併用処理による肝細胞への影響とそのメカニズムを解明することと *in vitro* 評価系におけるアルコール性肝細胞毒性に対する BLEx の効果を検証することを目的とした。ラット正常肝細胞株において、エタノールとアセトアルデヒドを併用処理すると、生細胞数の有意な減少、G0/G1 期細胞の割合の有意な増加、G2/M 期細胞の割合の有意な減少、細胞内 ROS 量の有意な増加が確認された。このことから、エタノールとアセトアルデヒドの共存によって酸化ストレスの誘導、細胞周期の遅延を介して、肝細胞毒性が誘導されることが示唆された。しかし、細胞内 ROS 量の増加においては、エタノール単独処理でも同レベルの変化が確認されたことから、エタノールとアセトアルデヒドの共存下における肝細胞毒性の増強には、細胞内 ROS 量は関与していないが、アセトアルデヒドが細胞内 ROS 量以外の部分で補助的に作用している可能性がある。また、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞内 ROS 量の増加に対して、CYP2E1 の阻害剤を処理すると、有意に改善させたが、NADPH オキシダーゼの阻害剤を処理すると変化しなかったことから、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスの誘導は、CYP2E1 の活性が関与していることが示唆された。細胞培養用の培地に高濃度の BLEx を処理すると、過酸化水素濃度が有意に増加した。一方で、エタノール・アセトアルデヒド併用処理下において BLEx を処理すると、高濃度単独処理で生細胞数が有意に減少するにも関わらず、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による

生細胞数の有意な減少に対しては影響を与えなかった。そして、細胞内 ROS 量に対しては、エタノール・アセトアルデヒド併用処理の有無に関わらず、BLEx 処理による影響は認められなかったことから、BLEx は、高濃度単独では毒性を示すものの、アルコール性肝細胞毒性に影響を与えないことが示唆された。また、アルコール誘導性酸化ストレスに対しても影響を与えないことが示唆された。以上のことから、エタノールとアセトアルデヒドの併用処理は、酸化ストレスの誘導と細胞周期の遅延を介して、アルコール性肝細胞毒性を誘導することが示唆された。そして、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスの誘導は、CYP2E1 によるものであることが分かった。また、BLEx は、酸化ストレス誘導によるアルコール性肝細胞毒性に影響を与えないことが分かった。

第5章 総括

適度な飲酒は、心血管疾患などによる死亡リスクを減少させる作用がある一方で、過剰な飲酒は健康障害のリスク要因である。しかし、社会生活を送る上で飲酒を避けることはしばしば難しい。飲酒による健康障害を緩和する方法として、エタノールやその代謝物であるアセトアルデヒドの毒性から組織を保護することと、アルコール代謝を亢進させてエタノールやその代謝物を生体内で速やかに分解することが有効と考えられる。本研究では、機能性食品のアルコール代謝とアルコール性肝障害への作用を明らかにすることを目的として、第2章から第4章の研究を行った。

第2章では、BLEx 単回投与がエタノール単回投与時におけるアルコール代謝に与える影響を検証した。エタノール投与 30 分後の血清エタノール濃度において、BLEx 単回投与群で有意な低値を示した。しかし、30 分後に観察された血清エタノール濃度の差はその後も維持された。血清アセトアルデヒド濃度は、エタノール投与後 60 分後において BLEx 群で有意な低値を示した。肝臓 ADH 活性はエタノール投与で有意に増加したが、BLEx 単回投与によって有意に抑制された。肝臓 ALDH 活性は肝臓 ADH 活性の変化と同様の傾向があったが、有意な差ではなかった。肝臓ミクロソーム CYP2E1 タンパク質発現量は、エタノール投与で有意に増加したが、BLEx 投与による影響は認められなかった。肝臓 ADH1、ALDH2、CYP2E1 の mRNA 発現量は、いずれの群でも有意な差は認められなかった。血清 ALT 活性は、エタノール投与によって増加傾向を示したものが、BLEx 単回投与によって抑制される傾向を示した。以上のことから、BLEx 単回投与はエタノールの吸収を阻害することが示唆され、それに伴ってアルコール性肝障害を抑制する可能性がある。しかし、エタノールの吸収阻害作用を直接的に検証していないため、エタノール単回投与直後からの糞便中のエタノール濃度を測

定する必要がある。また、15%エタノール溶液とトマトの不溶成分画分を混合後、5分間ろ過すると、エタノール溶液のみと比較するとろ液の量が少なく、実際にラットにトマト不溶成分画分を投与すると、胃内残留物エタノール濃度が有意に高く、血中エタノール濃度が有意に低くなるという報告⁷⁹⁾があることから、BLEx とエタノール溶液の混合液の濾過速度を測定することも必要になると考えられる。

第3章では、高用量の BLEx 摂食が継続的なエタノール摂取時のアルコール代謝に与える影響について検証することを目的に実験を行った。5%エタノールを含む液体飼料を SD ラットに摂食させた時、体重の減少、摂食量の減少、血清 ALT 活性の増加、肝臓 ALDH 活性の増加、肝臓 CYP2E1 タンパク質発現量の増加、肝臓 CYP2E1 mRNA 発現量の増加、肝臓 HO-1 mRNA 発現量の増加が確認された。しかし、3% BLEx 含有液体飼料を投与しても、いずれの測定項目でも影響は認められなかった。以上のことから、継続的なアルコール摂取によって、アルコール誘導性酸化ストレスとアルコール性脂肪肝は誘導されなかったが、肝臓の CYP2E1 と抗酸化タンパク質の発現を増加させた。そして、継続的な高用量の BLEx 投与は、エタノールの悪影響を増強させないことが示唆された。アルコール摂取によって、腸管が障害を受けることが知られており、この腸管障害がアルコール性肝障害に悪影響を与える。実際に、アルコール性肝障害を誘導させたラットの結腸組織において、アポトーシスと酸化障害が誘導されていることが示されており、血清エンドトキシン濃度も、通常状態と比較して有意に増加している。そして、抗生物質の Indole-3-carbinol がアルコール性肝障害とアルコール性腸管障害を改善させている⁸⁰⁾。これらのことから、アルコール性腸管障害を予防、改善させることがアルコール性肝障害の予防、改善につながる。本研究室の研究で、本章の *in vivo* モデルラットにおいて、ALD + BLEx 群で血清エ

ンドトキシン濃度が、ALD 群と比較して有意な低値を示した。また、大腸のカルボニル化タンパク質量と炎症時に産生される一酸化窒素を合成するタンパク質である iNOS のタンパク質発現量が、アルコール摂取で有意に増加したが、BLEx 摂食で有意に抑制されたことから、BLEx 継続摂食がアルコール性腸管障害を改善することが示唆されている。本章での結果と合わせると、BLEx が肝臓に対して影響を与えない要因は、BLEx の成分が吸収されていない可能性が考えられる。これを検証するためには、血清のクロロゲン酸やポリフェノール類の濃度を測定する必要がある。

第 4 章では、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による肝細胞への影響とそのメカニズムを解明することと *in vitro* 評価系におけるアルコール性肝細胞毒性に対する BLEx の効果を検証することを目的とした。ラット正常肝細胞株において、エタノールとアセトアルデヒドを併用処理すると、生細胞数の有意な減少、G0/G1 期細胞の割合の有意な増加、G2/M 期細胞の割合の有意な減少、細胞内 ROS 量の有意な増加が確認された。このことから、エタノールとアセトアルデヒドの共存によって酸化ストレスの誘導、細胞周期の遅延を介して肝細胞毒性が誘導されることが示唆された。しかし、細胞内 ROS 量の増加においては、エタノール単独処理でも同レベルの変化が確認されたことから、エタノールとアセトアルデヒドの共存下における肝細胞毒性の増強には、細胞内 ROS 量は関与していないが、アセトアルデヒドが細胞内 ROS 量以外の部分で補助的に作用している可能性がある。また、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による細胞内 ROS 量の増加に対して CYP2E1 の阻害剤を処理すると有意に改善されたが、NADPH オキシダーゼの阻害剤処理では変化しなかったことから、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスの誘導は、CYP2E1 の活性が関与していることが示唆された。細胞培養用の培地に高濃度の BLEx を処理す

ると、過酸化水素濃度が有意に増加した。一方で、エタノール・アセトアルデヒド併用処理下において BLEx を処理すると、高濃度単独処理で生細胞数が有意に減少するにも関わらず、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による生細胞数の有意な減少に対しては影響を与えなかった。そして、細胞内 ROS 量に対しては、エタノール・アセトアルデヒド併用処理の有無に関わらず BLEx 処理による影響は認められなかったことから、BLEx は、高濃度単独では毒性を示すものの、アルコール性肝細胞毒性に影響を与えないことが示唆された。また、アルコール誘導性酸化ストレスに対しても影響を与えないことが示唆された。以上のことから、エタノール・アセトアルデヒド併用処理は、酸化ストレスの誘導と細胞周期の遅延を介して、アルコール性肝細胞毒性を誘導することが示唆された。そして、エタノール・アセトアルデヒド併用処理による酸化ストレスの誘導は、CYP2E1 によるものであることが分かった。また、BLEx は、酸化ストレス誘導によるアルコール性肝細胞毒性に影響を与えないことが分かった。しかし、BLEx を処理した時の検証に関しては不十分であり、エタノール・アセトアルデヒド併用処理でも解析した細胞周期への影響について検証する必要がある。凍結乾燥したブルーベリー葉には、プロアントシアニジンの他に、エピカテキンやその重合体も含有している²³⁾。そして、緑茶カテキンは 67-kDa ラミニンレセプター (67LR) を介して、がん細胞増殖抑制作用や抗炎症作用といった機能性を発揮することが報告されている⁸¹⁾ことから、BLEx についても 67LR への関与を検証する必要がある。

以上の研究結果をまとめると、BLEx は、アルコールによる悪影響を受けた肝臓に対して直接的に影響を与えないが、エタノール吸収阻害といった間接的な影響を与えることが示唆された。現在、ブルーベリー葉は、お茶として飲まれていたり、熱水抽出物は清涼飲料の原料として利用されていたりすることから、熱

水抽出物の BLEx と同じ効果があるのではないかと期待できる。しかし、本研究の BLEx 処理条件は、ヒトに換算すると非常に高濃度になるため、ヒト換算で現実的な量での実験も行う必要がある。また、ブルーベリー葉自体を摂食させたときのアルコール代謝やアルコール性肝障害に対する効果について検証することで、ブルーベリー葉の効果をより多く見いだせると期待できる。また、本研究で構築したアルコール性肝細胞毒性 *in vitro* モデルは、他の食品成分の機能性評価への利用が期待される。

参考文献

- 1). Liu Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, Wakai K, Kawamura T, Iso H, Ogimoto I, Yagyu K, Obata Y, Ishibashi T. 2005. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly Japanese men and women. *Annals of Epidemiology* 15(8):590-597.
- 2). 厚生労働科学研究 お酒による健康・社会問題～飲みすぎは健康と人間関係を壊します～
- 3). 厚生労働科学研究 正しいお酒との付き合い方～そんなに飲んでも大丈夫? ～
- 4). World Health Organization. 2009. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Switzerland.
- 5). World Health Organization. 2010. Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. Switzerland.
- 6). World Health Organization. 2018. Global status report on alcohol and health 2018. Switzerland.
- 7). 健康日本 21 企画検討会, 健康日本 21 計画策定検討会 2000 年 2 月 21 世紀における国民健康づくり運動 (健康日本 21) について 報告書
- 8). 厚生労働省 2012 年 7 月 国民の健康の増進の総合的な推進を図るための基本的な方針 (厚生労働省告示第四百三十号)
- 9). 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会 2018 年 9 月 「健康日本 21 (第二次)」 中間評価報告書
- 10). Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Jonkers DM. 2013. Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutrition Reviews* 71(7):483-499.

- 11). Levitt MD, Li R, DeMaster EG, Elson M, Furne J, Levitt DG. 1997. Use of measurements of ethanol absorption from stomach and intestine to assess human ethanol metabolism. *American Journal of Physiology* 273(4):G951-957.
- 12). Zakhari S. 2006. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health* 29(4):245-54.
- 13). Morozova TV, Mackay TF, Anholt RR. 2014. Genetics and genomics of alcohol sensitivity. *Molecular Genetics and Genomics* 289(3):253-269.
- 14). Gao B, Bataller R. 2011. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141(5):1572–1585.
- 15). Thomes PG, Osna NA, Davis JS, Donohue TM Jr. 2013. Cellular steatosis in ethanol oxidizing-HepG2 cells is partially controlled by the transcription factor, early growth response-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(2): 454–463.
- 16). Lu Y, Cederbaum AI. 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine* 44(5):723–738.
- 17). 大竹孝明, 高後裕 2012. アルコール代謝とその異常 *Gastrointestinal Research* 20:287-291.
- 18). 榎本信行, 竹井謙之, 渡辺純夫 2007. 酸化ストレス *肝胆膵* 54:623-627.
- 19). Seo SJ, Cho JY, Jeong YH, Choi YS. 2013. Effect of korean red ginseng extract on liver damage induced by short-term and long-term ethanol treatment in rats. *Journal of Ginseng Research* 37(2):194-200.
- 20). 堤幹宏 2012. わが国におけるアルコール性肝障害の現状と診断基準の変遷 *日本消化器病学会雑誌* 109:1509-1517.

- 21). Chang YY, Lin YL, Yang DJ, Liu CW, Hsu CL, Tzang BS, Chen YC. 2013. Hepatoprotection of noni juice against chronic alcohol consumption: lipid homeostasis, antioxidation, alcohol clearance, and anti-inflammation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 61(46):11016-11024.
- 22). Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. 2008. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 295(4):833-842.
- 23). Matsuo Y, Fujita Y, Ohnishi S, Tanaka T, Hirabaru H, Kai T, Sakaida H, Nishizono S, Kouno I. 2010. Chemical constituents of the leaves of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and characterization of polymeric proanthocyanidins containing phenylpropanoid units and A-type linkages. *Food Chemistry* 121(4):1073-1079.
- 24). Yuji K, Sakaida H, Kai T, Fukuda N, Yukizaki C, Sakai M, Tsubouchi H, Kataoka H. 2013. Effect of dietary blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) leaves on serum and hepatic lipid levels in rats. *Journal of Oleo Science* 62(2):89-96.
- 25). Takami Y, Uto H, Takeshita M, Kai H, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. 2010. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatology Research* 40(4):337-345.
- 26). Takeshita M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Tsubouchi H, Kataoka H. 2009. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *The Journal of Biological Chemistry* 284(32):21165-21176.

- 27). Menk M, Graw JA, Poyraz D, Möbius N, Spies CD, von Haefen C. 2018. Chronic alcohol consumption inhibits autophagy and promotes apoptosis in the liver. *International Journal of Medical Sciences* 15(7):682-688.
- 28). Wang Y, Tong J, Chang B, Wang BF, Zhang D, Wang BY. 2015. Effects of ethanol on the expression of caveolin-1 in HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports* 11(6):4409-4413.
- 29). Xie W, Sun J, Zhang X, Melzig MF. 2014. Necrosis factor-alpha (TNF-alpha) response in human hepatoma HepG2 cells treated with hepatotoxic agents. *Pharmazie* 69(5):379-384.
- 30). Donohue TM, Osna NA, Clemens DL. 2006. Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38(1):92-101.
- 31). 林田真梨子, 木下健司 2014. 飲酒と健康ーアルコール体質検査と飲酒の功罪ー *日本醸造協会誌* 109(1):2-10.
- 32). Setshedi M, Wands JR, Monte SM. 2010. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3(3):178-185.
- 33). Kaphalia L, Calhoun WJ. 2013. Alcoholic lung injury: metabolic, biochemical and immunological aspects. *Toxicology Letters* 222(2):171-179.
- 34). Seitz HK, Stickel F. 2007. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 7(8):599-612.
- 35). Uto-Kondo H, Hase A, Yamaguchi Y, Sakurai A, Akao M, Saito T, Kumagai H. 2018. S-Allyl-L-cysteine sulfoxide, a garlic odor precursor, suppresses elevation in blood ethanol concentration by accelerating ethanol metabolism and preventing ethanol absorption from gut. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 82(4):724-731.

- 36). Park JH, Kim SJ, Hwang I, Bae KC, Bae JH, Song DK. 2013. Green tea extract co-administered with a polymer effectively prevents alcoholic liver damage by prolonged inhibition of alcohol absorption in mice. *Alcohol and Alcoholism* 48(1):59-67.
- 37). Murakami H, Ito M, Furukawa Y, Komai M. 2010. Leucine accelerates blood ethanol by enhancing the activity of ethanol metabolic enzymes in the livers of SHRSP rats. *Amino Acids* 43(6):2545-2551.
- 38). Ushida Y, Oshima S, Aizawa K, Suganuma H, Nemoto A, Ishikiriya H, Kitagawa Y. 2014. Aqueous components of tomato accelerate alcohol metabolism by increasing pyruvate level. *Food and Nutrition Sciences* 5(10):870-879.
- 39). Koop DR. 2006. Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol Research & Health: the Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 29(4):274-280.
- 40). Liu S, Tian L, Chai G, Wen B, Wang B. 2018. Targeting heme oxygenase-1 by quercetin ameliorates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Food & Function* 9(8):4184-4193.
- 41). Bang CY, Byun JH, Choi JS, Choung SY. 2016. Protective effects of *Ecklonia stolonifera* extract on ethanol-induced fatty liver in rats. *Biomolecules & Therapeutics* 24(6):650-658.
- 42). Wu WB, Chen YY, Zhu B, Peng XM, Zhang SW, Zhou ML. 2015. Excessive bile acid activated NF-kappa B and promoted the development of alcoholic steatohepatitis in farnesoid X receptor deficient mice. *Biochimie* 115:86-92.

- 43). Lieber CS, DeCarli LM. 1982. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 6(4):523-531.
- 44). Colomba G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. 2016. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B* 1019:178-190.
- 45). Reyes-Gordillo K, Shah R, Varatharajalu R, Garige M, Leckey LC, Lakshman MR. 2016. Low- ω 3 fatty acid and soy protein attenuate alcohol-induced fatty liver and injury by regulating the opposing lipid oxidation and lipogenic signaling pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1840513.
- 46). Yun JW, Kim YK, Lee BS, Kim CW, Hyun JS, Baik JH, Kim BH. 2007. Effect of dietary epigallocatechin-3-gallate on cytochrome P450 2E1-dependent alcoholic liver damage: enhancement of fatty acid oxidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(12):2999-3006.
- 47). Rouach H, Andraud E, Aufrère G, Beaugé F. 2005. The effects of acetaldehyde in vitro on proteasome activities and its potential involvement after alcoholization of rats by inhalation of ethanol vapours. *Alcohol and Alcoholism* 40(5):359-366.
- 48). Kim MJ, Sim MO, Lee HI, Ham JR, Seo KI, Lee MK. 2014. Dietary umbelliferone attenuates alcohol-induced fatty liver via regulation of PPAR α and SREBP-1c in rats. *Alcohol* 48(7):707-715.
- 49). Cederbaum AI. 2010. Role of CYP2E1 in ethanol-induced oxidant stress, fatty liver and hepatotoxicity. *Digestive Diseases* 28(6):802-811.

- 50). Cowpland C, Su GM, Murray M, Puddey IB, Croft KD. 2006. Effect of alcohol on cytochrome p450 arachidonic acid metabolism and blood pressure in rats and its modulation by red wine polyphenolics. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 33(3):183-188.
- 51). Orellana M, Varela N, Guajardo V, Araya J, Rodrigo R. 2002. Modulation of rat liver cytochrome P450 activity by prolonged red wine consumption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131(2):161-166.
- 52). Sugiyama T, Shinozuka K, Sano A, Yamada S, Endoh K, Yamada K, Umegaki K. 2004. Effects of various ginkgo biloba extracts and proanthocyanidin on hepatic cytochrome P450 activity in rats, Shokuhin Eiseigaku Zasshi. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 45(5):295-301.
- 53). Kishimoto R, Fujiwara I, Kitayama S, Goda K, Nakata Y. 1995. Changes in hepatic enzyme activities related to ethanol metabolism in mice following chronic ethanol administration. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 41(5):527-543.
- 54). Kaufman SE, Kaye MD. 1979. Effect of ethanol upon gastric emptying. *Gut* 20(8):688-692.
- 55). Serrano J, Casanova-Marti A, Gil-Cardoso K, Blay MT, Terra X, Pinent M, Ardevol A. 2016. Acutely administered grape-seed proanthocyanidin extract acts as a satiating agent. *Food & Function* 7(1):483-490.
- 56). Yang L, Wu D, Wang X, Cederbaum AI. 2012. Cytochrome P4502E1, oxidative stress, JNK, and autophagy in acute alcohol-induced fatty liver. *Free Radical Biology & Medicine* 53(5):1170-1180.

- 57). Galligan JJ, Smathers RL, Fritz KS, Epperson LE, Hunter LE, Petersen DR. 2012. Protein carbonylation in a murine model for early alcoholic liver disease. *Chemical Research in Toxicology* 25(5):1012-1021.
- 58). Jayaraman J, Veerappan M, Namasivayam N. 2009. Potential beneficial effect of naringenin on lipid peroxidation and antioxidant status in rats with ethanol-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61(10):1383-1390.
- 59). Li YM, Zhang XG, Zhou HL, Chen SH, Zhang Y, Yu CH. 2004. Effects of tea polyphenols on hepatic fibrosis in rats with alcoholic liver disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 3(4):577-579.
- 60). Shi A, Shi H, Wang Y, Liu X, Cheng Y, Li H, Zhao H, Wang S, Dong L. 2018. Activation of Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome activation contribute to the protective effect of chlorogenic acid on acute liver injury. *International Immunopharmacology* 54:125-130.
- 61). Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J, Cederbaum AI. 2008. Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. *Hepatology* 47(5):1483-1494.
- 62). Lu Y, Wu D, Wang X, Ward SC, Cederbaum AI. 2010. Chronic alcohol-induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice. *Free Radical Biology & Medicine* 49(9):1406-1416.
- 63). Ceni E, Mello T, Galli A. 2014. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World Journal of Gastroenterology* 20(47):17756-17772.
- 64). Koteish A, Yang S, Lin H, Huang J, Diehl AM. 2002. Ethanol induces redox-sensitive cell-cycle inhibitors and inhibits liver regeneration after partial hepatectomy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26(11):1710-1718.

- 65). Olivares IP, Bucio L, Souza V, Cárabez A, Gutiérrez-Ruiz MC. 1997. Comparative study of the damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line. *Toxicology* 120(2):133-144.
- 66). Elamin E, Jonkers D, Juuti-Uusitalo K, van Ijzendoorn S, Troost F, Duimei H, Broers J, Verheyen F, Dekker J, Masclee A. 2012. Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: in vitro study in a three dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PLoS One* 7(4):e35008.
- 67). Wu D, Cederbaum AI. 1999. Ethanol-induced apoptosis to stable HepG2 cell lines expressing human cytochrome P-4502E1. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23(1):67-76.
- 68). Clemens DL, Calisto LE, Sorrell MF, Tuma DJ. 2003. Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology* 38(2):385-393.
- 69). Clemens DL, Schneider KJ, Nuss RF. 2011. Ethanol metabolism activates cell cycle checkpoint kinase, Chk2. *Alcohol* 45(8):785-793.
- 70). Bak MJ, Truong VL, Ko SY, Nguyen XN, Ingkasupart P, Jun M, Shin JY, Jeong WS. 2016. Antioxidant and hepatoprotective effects of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in ethanol-induced cells and rats. *International Journal of Molecular Sciences* 17(5):E758.
- 71). Swaminathan K, Clemens DL, Dey A. 2013. Inhibition of CYP2E1 leads to decreased malondialdehyde-acetaldehyde adduct formation in VL-17A cells under chronic alcohol exposure. *Life Sciences* 92(6-7):325-336.
- 72). Lee S, Lee J, Lee H, Sung J. 2019. Relative protective activities of quercetin, quercetin-3-glucoside, and rutin in alcohol-induced liver injury. *Journal of Food Biochemistry* 43(11):e13002.

- 73). Hayashi N, George J, Takeuchi M, Fukumura A, Toshikuni N, Arisawa T, Tsutsumi M. 2013. Acetaldehyde-derived advanced glycation end-products promote alcoholic liver disease. *PLoS One* 8(7):e70034.
- 74). Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, Mason RP, Thurman RG. 2001. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *AMERICAN JOURNAL of PHYSIOLOGY Gastrointestinal and Liver Physiology* 280(5):1005-1012.
- 75). Mochizuki Y, Tsuji M, Nakajima A, Inagaki M, Miyazawa M, Hirai T, Oguchi K. 2012. Ethanol increases NADPH oxidase-derived oxidative stress and induces apoptosis in human liver adenocarcinoma cells (SK-HEP-1). *The Showa University Journal of Medical Sciences* 24(2):155-167.
- 76). Bellion P, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C. 2009. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular Nutrition & Food Research* 53(10):1226-1236.
- 77). Kim H, Pan JH, Kim SH, Lee JH, Park JW. 2018. Chlorogenic acid ameliorates alcohol-induced liver injuries through scavenging reactive oxygen species. *Biochimie* 150:131-138.
- 78). Liu LQ, Fan ZQ, Tang YF, Ke ZJ. 2014. The resveratrol attenuates ethanol-induced hepatocyte apoptosis via inhibiting ER-related caspase-12 activation and PDE activity in vitro. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 38(3):683-693.
- 79). Oshima S, Shiiya S, Kanda T. 2015. Water-insoluble fractions of botanical foods lower blood ethanol levels in rats by physically maintaining the ethanol solution after ethanol administration. *Functional Foods in Health & Disease* 5(11):406-416.

- 80). Choi Y, Abdelmegeed MA, Song BJ. 2018. Preventive effects of indole-3-carbinol against alcohol-induced liver injury in mice via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms: Role of gut-liver-adipose tissue axis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 55:12-25.
- 81). 立花宏文 2019. 緑茶ポリフェノールの生体調節作用に関する分子栄養学的研究 *日本栄養・食糧学会誌* 72(5):205-210.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました宮崎大学大学院農学工学総合研究科の山崎正夫教授、西山和夫准教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに、研究の御指導および本論文の御高閲を賜りました宮崎大学大学院農学工学総合研究科の菅本和寛准教授、國武久登教授、榊原啓之教授に深く感謝いたします。

さらに、一連の実験を通じて、故・窄野昌信教授、榊原啓之教授、菅本和寛准教授には実験器具および施設の使用に対して快い許可をいただきましたことに対しても併せて感謝の意を表します。本研究を遂行する上で御助言、御協力をいただきました宮崎大学テニユアトラック推進機構農学系食品科学研究領域の小川健二郎テニユアトラック助教に深く感謝いたします。また、本研究を進めるうえでご協力をしていただきました宮崎大学農学部応用生物科学科食品機能化学研究室の皆様にも心より感謝いたします。

最後になりましたが、宮崎大学大学院農学工学総合研究科生物機能応用科学専攻のさらなる御発展をお祈り申し上げます。