

## 学位論文題名

Long-Evans cinnamon (LEC) ラットにおける  
銅蓄積に伴う活性酸素種の生成機構の解明と  
その急性肝炎発症への寄与に関する解析

## 学位論文内容の要旨

Long-Evans cinnamon (LEC) ラットは、銅輸送蛋白である ATP7B 遺伝子の異常により、肝臓に銅を蓄積するヒト Wilson 病のモデル動物であり、肝炎、肝癌を自然発症する。肝炎の発症は肝臓への銅の蓄積が原因であることが明らかにされている。遷移金属である銅は、鉄と同様に reactive oxygen species (ROS) の生成を触媒し、酸化障害を誘導することが知られている。LEC ラットにおいても、銅蓄積に伴う ROS の生成により酸化障害が誘導され、肝炎が発症するものと考えられているが、その詳細については明らかではない。本研究では、LEC ラットにおける銅蓄積に伴う ROS の生成機構とその急性肝炎発症への寄与に関して検討した。

ヒト Wilson 病患者の肝臓において、銅蓄積によるミトコンドリアの脂質過酸化と肝障害の指標となる血清中のビリルビン濃度およびプロトロンビン時間とが相関することが報告されており、脂質過酸化は銅による肝障害の重要な要因であると考えられている。肝臓 S-9 画分を用いた *in vitro* インキュベーション系を用い、LEC ラット肝臓での脂質過酸化生成機序について検討した。その結果、急性肝炎発症期に LEC ラット肝臓中で増加する遊離の銅と過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) との Fenton 反応から生じる hydroxyl radicals ( $\cdot OH$ ) が脂質過酸化を引き起こしているものと考えられた。また  $\cdot OH$  生成に重要な  $O_2$  の生成源として glutathione reductase を介した GSH (還元型グルタチオン) - GSSG (酸化型グルタチオン) と  $Cu^{2+}$ - $Cu^+$  のサイクリックな酸化還元過程の関与が示唆された。さらに、 $H_2O_2$  消去酵素である catalase (CAT) 活性が肝炎発症以前には有意に上昇し、急性肝炎発症期には顕著に減少することが明らかとなった。

$\cdot OH$  は最も反応性が高い ROS で、LEC ラットにおいて  $\cdot OH$  が肝炎発症に関与することが文献的に示唆されている。しかし、急性肝炎発症期の LEC ラット肝臓において *in vivo* で  $\cdot OH$  の生成増加が起こっているか否かは明らかではなく、その急性肝炎発症への関与は不明である。この点に関して、salicylic acid trapping 法により、急性肝炎発症期の LEC ラット血漿および肝臓において *in vivo* で  $\cdot OH$  の生成増加が認められるか否かを検討した。さらに、 $\cdot OH$  消去剤である D-mannitol を LEC ラットに 3 週間反復腹腔内投与 (500mg/kg) し、 $\cdot OH$  の急性肝炎発症およびミトコンドリアでの脂質過酸化への関与について解析した。肝炎発症以前では血漿および肝臓中での  $\cdot OH$  の

生成増加は認められなかったが、急性肝炎発症期では急性銅中毒ラットと同レベルの・OHの生成増加が血漿および肝臓中で認められた。急性肝炎期には LEC ラット肝臓中での遊離の銅濃度が増加することが報告されており、遊離の銅と肝臓中に蓄積した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との Fenton 反応により、・OH の生成が増加するものと考えられた。さらに、D-mannitol 処置により、血清肝障害マーカーである aspartate aminotransferase (AST) 活性の上昇抑制および total bilirubin (T-Bil) 濃度の上昇抑制傾向が認められ、肝臓ミトコンドリアでの脂質過酸化増加抑制も観察された。以上の結果により、・OH が銅蓄積に伴うミトコンドリアでの脂質過酸化に一部関与し、さらに急性肝炎の進展にも関与していることが明らかとなった。また、急性銅中毒ラットの血漿および肝臓において *in vivo* での・OH の生成増加が認められることを初めて確認した。

α-Lipoic acid (LA) は ROS の消去作用、金属のキレート作用等の多彩な抗酸化能を有し、酸化的障害が関与する疾患に対して、治療効果が実験動物で報告されている。LA を LEC ラットに約 4 週間、週 5 日経口投与 (10, 30 ならびに 100mg/kg) し、LA の急性肝炎発症抑制効果について検討するとともに肝炎発症と酸化的障害の関連性について考察した。LA は血清 AST および alanine aminotransferase (ALT) 活性の上昇を殆ど抑制しなかったが、肝炎発症に伴う体重減少および黄疸を抑制した。また、LA は肝臓で glutathione peroxidase および CAT の不活化抑制、非ヘム鉄含量の上昇抑制、ならびに酸化ストレスにより誘導され、ビリルビン生合成の律速酵素である heme oxygenase-1 (HO-1) の発現誘導抑制を示した。Wilson 病患者と同様に、急性肝炎を発症した LEC ラット肝臓での脂質過酸化の増加は、ミクロソーム(MS)画分よりも粗ミトコンドリア (CMT) 画分で顕著であった。LA100mg/kg 投与により、MS 画分での脂質過酸化の増加はほぼ抑制された。しかし、CMT 画分においては LA100mg/kg 投与で、銅含量の減少に伴い脂質過酸化の増加抑制傾向は認められたものの、脂質過酸化量は Wistar ラットの約 3 倍であった。以上の結果より、Wilson 病患者と同様に、LEC ラット肝臓ミトコンドリアにおいても銅含量と脂質過酸化は密接に関連し、ミトコンドリアでの脂質過酸化等の酸化的障害が肝炎発症の重要な要因であることが強く示唆された。また、LA は遊離銅により溶血抑制あるいは HO-1 の発現誘導抑制を介し、急性肝炎発症に伴う黄疸を改善することが示唆された。さらに、LA は分子レベルで急性肝炎の進展に関与する酸化的障害を軽減することが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一  
副 査 教 授 桑 原 幹 典  
副 査 教 授 林 正 信 (酪農学園大学)  
副 査 助 教 授 数 坂 昭 夫

## 学位論文題名

### Long-Evans cinnamon (LEC) ラットにおける 銅蓄積に伴う活性酸素種の生成機構の解明と その急性肝炎発症への寄与に関する解析

LEC ラットは、肝炎、肝癌を自然発症するヒト Wilson 病モデル動物である。肝炎発症は、肝臓への銅の蓄積とそれに伴う活性酸素種 (ROS) 生成による酸化障害が主な原因とされているが詳細は明らかでない。申請者は、LEC ラット肝における銅蓄積とそれに伴う ROS 生成機構とその肝炎発症への寄与について検討した。

肝炎発症期にある LEC ラットから採取した肝臓 S-9 画分が、hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) 生成および脂質過酸化反応に高い活性を示すことが明らかになった。また、ROS 生成源として glutathion reductase を介した GSH-GSSG および  $\text{Cu}^{2+}\text{-Cu}^+$  酸化還元過程の関与が示唆された。さらに、catalase (CAT) 活性は肝炎発症前に高く、発症期には顕著に減少することが明らかとなった。つぎに、*in vivo* における  $\cdot\text{OH}$  の急性肝炎発症への関与を salicylic acid trapping 法により検討した。肝炎発症期で、高濃度  $\cdot\text{OH}$  が血漿および肝臓中に認められ、また、 $\cdot\text{OH}$  消去剤である D-mannitol 処置により AST 活性および総ビリルビン濃度の上昇抑制傾向が、さらに、肝ミトコンドリアでの脂質過酸化増加の抑制が観察された。最後に、LEC ラットに抗酸化物質  $\alpha$ -リポ酸を投与し、肝炎発症抑制効果について検討した。glutathion peroxidase および CAT の不活化抑制、非ヘム鉄含量の上昇抑制、ならびに hem oxygenase-1 の発現誘導抑制が観測された。また、肝臓での過酸化脂質増加は、ミクロソーム画分よりも粗ミトコンドリア画分で顕著であった。

以上の結果より、LEC ラット肝炎発症は、肝臓ミトコンドリアにおけ

る銅蓄積に伴う酸化的障害がその要因であることを強く示唆し、ヒト Wilson 病発症機序の解明と治療法開発に大きく貢献すると考えられた。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者山本秀樹氏は博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。