

アルコール及びトリクロロエチレンによる  
実験的肝障害に対する  
リボフラビン誘導体の抑制効果

渡辺 聡

# 目 次

緒 論 .....	1
第1章 急性アルコール性肝障害の発生に対するフラビンアデニン ジヌクレオチドの抑制効果 .....	4
第1節 エタノールの投与によるパラメーターの変動 .....	5
第2節 フラビン3型による肝障害抑制効果の比較 .....	10
第3節 フラビンアデニンジヌクレオチドの肝障害抑制効果の 投与量依存性 .....	14
第4節 エタノールのin vitro代謝に伴う脂質過酸化反応に 対するフラビンアデニンジヌクレオチドの抑制効果 .....	19
第5節 本章のまとめ .....	23
実験の部 .....	26
第2章 トリクロロ酢酸のin vitroでの代謝に伴う脂質過酸化 反応に対するリポフラビン誘導体の抑制効果 .....	31
第1節 ミクロゾームの脂質過酸化反応に及ぼすTCAの 添加の影響 .....	33
第2節 脂質過酸化反応に対するラジカル捕捉剤及び リポフラビン誘導体の添加の影響 .....	34
第3節 脂質過酸化反応に対する活性酸素消去酵素の添加の 影響 .....	35
第4節 DCAの非酵素的ラジカル化反応 .....	36
第5節 本章のまとめ .....	38
実験の部 .....	40

第3章 酸素電極法によるリポフラビンのラジカル捕捉活性の	
検討 .....	4 2
第1節 水溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応	
に対するリポフラビンの抑制作用 .....	4 2
第2節 脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応	
に対するリポフラビンの抑制作用 .....	4 6
第3節 脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応	
に対する $\alpha$ -トコフェロールの抑制作用 .....	4 8
第4節 本章のまとめ .....	4 9
実験の部 .....	5 1
第4章 チオバルビツール酸反応性物質の生成に対する	
リポフラビンの抑制効果 .....	5 3
第1節 チオバルビツール酸反応性物質の生成反応に対する	
リポフラビンの添加の影響 .....	5 3
第2節 t-Butyl Hydroperoxideの添加による反応溶液中の	
リポフラビンの減少 .....	5 5
第3節 本章のまとめ .....	5 6
実験の部 .....	5 7
結 論 .....	5 9
謝 辞 .....	6 2
文 献 .....	6 3

本論文では以下の略語を使用した。

NADPH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide

NAD; nicotin amide adenine dinucleotide

GSH; reduced glutathione

GSSG; oxidized glutathione

TBARS; thiobarbituric acid reactive substances

GOT; glutamate oxaloacetate transaminase

GPT; glutamate pyruvate transaminase

RF; riboflavin

FMN; flavin mononucleotide

FAD; flavin adenine dinucleotide

SOD; superoxide dismutase

GSH-Px; glutathione peroxidase

GR; glutathione reductase

G-6-PD; glucose 6-phosphate dehydrogenase

ATP; adenosine triphosphate

ADP; adenosine diphosphate

Tris; tris(hydroxymethyl)aminomethane

TBA; thiobarbituric acid

TCA; trichloroacetic acid

DCA; dichloroacetic acid

PNDMA; p-nitroso-N,N-dimethylaniline

BHT; butylated hydroxytoluene

B<sub>2</sub>-But; riboflavin tetrabutyrate

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

AAPH; 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride

AMVN; 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)

SDS; sodium dodecyl sulfate

## 緒 論

ヒトを含む地球上の生物はほとんど好気性生物であり，酸素を呼吸してエネルギーを得ている<sup>1) 2)</sup>。しかし，元来生物にとって酸素は毒であり，好気性生物は酸素に対する防御機構を獲得しながら進化してきた<sup>1) 3) 4)</sup>。大氣中に通常存在する酸素分子は基底状態の三重項酸素 (triplet oxygen;  $^3O_2$ ) であり，2個の不对電子を持つ biradical である<sup>5)</sup>。さらに酸素分子は好気性生物の体内で，種々の代謝やエネルギー産生，免疫反応等に伴って，反応性の高い活性酸素となる<sup>5)</sup>。基底状態の酸素分子の反応性は低いため，フリーラジカル的一种ではあるが活性酸素とはされておらず，一般的に“狭義”の活性酸素には，1960年代に Fridovich ら<sup>6)</sup> によって発見されたスーパーオキシド (superoxide anion radical;  $O_2^-$ )，一重項酸素 (singlet oxygen;  $^1O_2$ )，過酸化水素 (hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) 及びヒドロキシラジカル (hydroxyl radical;  $HO\cdot$ ) が含まれる。また，さらに“広義”の活性酸素種として， $O_2^-$  と平衡して存在するヒドロペルオキシラジカル (hydroperoxyl radical;  $HO_2\cdot$ )，過酸化脂質 (lipid hydroperoxide;  $LOOH$ )，過酸化脂質ラジカルアルコキシラジカル (alkoxyl radical;  $LO\cdot$ ) 及びペルオキシラジカル (peroxyl radical;  $LOO\cdot$ )，鉄-酸素錯体，オゾン (ozone;  $O_3$ )，hypochlorite ( $OCl^-$ ) 等が含まれる場合もある<sup>5)</sup>。これらの活性酸素種は，生体内のコントロールされた系で生成する場合には，生体の生理的に重要な代謝<sup>7)</sup> や生理活性物質の産生<sup>8)</sup> に関与したり，殺菌<sup>9) 10)</sup> や抗癌作用<sup>11) 12)</sup> 等の免疫反応にも関与しているが，生体のコントロール機能の低下や過剰産生によるコントロール不能により，生体に強い傷害を及ぼすことが知られている<sup>13) 14)</sup>。生体内での活性酸素の生成は喫煙<sup>15-17)</sup>，飲酒<sup>18)</sup>，薬剤<sup>19-22)</sup>，疾患<sup>23)</sup>，運動<sup>24)</sup>，ストレス<sup>24)</sup>，虚血-再灌流障害<sup>25) 26)</sup> その他さまざまな要因で増大することが報告されており，特に摂取した化学物質の代謝に伴って活性酸素・フリーラジカルが生成し，脂質過酸化反応の誘導

等により，種々の薬剤性臓器障害を発生する<sup>27)</sup>。

ヒトを取り囲む環境中にはさまざまな化学物質が存在し，これらは食物，食品添加物，環境汚染物質，農薬，嗜好品，医薬品等として，好むと好まざるとにかかわらず直接的又は間接的にヒトの体内に取り込まれ，その化学的性質や代謝等に由来して毒性を発現する．例えば，大気汚染物質として知られている二酸化窒素と $O_3$ は，フリーラジカルを生成して脂質過酸化反応を生じることが知られており<sup>28-31)</sup>，また近年，ディーゼル排気微粒子のフリーラジカル生成能と気管支喘息誘発作用との関係が認められている<sup>32)</sup>．化学物質のうち有機物質の多くは生体内で主に肝臓で代謝を受けるため，肝障害を誘発するものが多く，この薬剤性肝障害の発生機構のひとつとして，化学物質の代謝に伴う肝細胞内での脂質過酸化反応の亢進が示唆されている<sup>33)</sup>．

近年，ビタミン類の抗酸化活性による種々の効果が検討されており<sup>34)</sup>，たとえば $\beta$ -カロテンの制癌効果<sup>35) 36)</sup>や， $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) の心筋障害<sup>37)</sup>及び動脈硬化<sup>38)</sup>等への抑制効果が報告されている．しかし，これらはいずれも脂溶性ビタミンであり，生体組織中への蓄積性があることから，過剰摂取による障害の発生が懸念される<sup>39)</sup>．一方，フラビン類は，以前からFAD製剤が，抗生物質投与時のビタミン $B_2$ 欠乏症状の改善の目的等に使用されている<sup>40) 41)</sup>が，リポフラビン (RF) の抗酸化作用や脂質過酸化反応の抑制効果も検討されており<sup>42-46)</sup>，水溶性ビタミンであることから過剰症を懸念する必要がなく，生体の活性酸素・フリーラジカルによる過酸化脂質に由来する障害の発生に対して，予防的な抑制効果を期待できると考えられる．

そこで著者は，ヒトが摂取する可能性がある環境中の化学物質のうち，嗜好品としてヒトが摂取する機会の多いエタノール及び有機塩素系溶剤として汎用されているトリクロロエチレン (trichloroethylene; TCE) に注目し，代謝に伴う活性酸素の生成及び脂質過酸化反応の亢進による肝障害の発生とその機構，及びこれに対するRFとその誘導体の抑制効果及びその機構につい

て、in vivo及び in vitroの実験を行って検討した。その結果、これらの化学物質の代謝に伴って生成した活性酸素・フリーラジカルにより、肝組織中の過酸化脂質量が増大すること、この脂質過酸化反応に由来する肝障害の発生に対して、RF誘導体の併用投与が抑制効果を示すこと、及びRF誘導体の脂質過酸化反応に対する抑制機構として、ラジカル捕捉作用によるラジカル連鎖反応の抑制を認めた。



# 第1章 急性アルコール性肝障害の発生に対するフラビン アデニンジヌクレオチドの抑制効果

アルコールはヒトが摂取する機会の多いものであるが、その急性及び慢性的な障害の発生は以前から多くの研究が行われており、エタノールの代謝物であるアセトアルデヒドによる直接的な肝毒性のほか、NADH/NAD比の増加や栄養不良などの要因が関与すると言われている<sup>47)</sup>。近年、アルコール性肝障害に対して、特に脂質過酸化反応の亢進による過酸化脂質量の増大の関与が指摘されており<sup>48-52)</sup>、ヒトでもアルコール性肝炎患者では、肝臓中の過酸化脂質（共役diene）量の増大や還元型グルタチオン（GSH）量の減少が認められている<sup>51)</sup>。肝臓中で過酸化脂質量が増大する機構のひとつとして、アセトアルデヒドの過剰産生によるGSHの減少が報告されているが<sup>52)</sup>、さらに、エタノールの代謝に伴う活性酸素及びフリーラジカルの生成が関与すると考えられている<sup>48, 50, 53)</sup>。生体内での過酸化脂質の生成は、不飽和脂肪酸の活性酸素やフリーラジカルとの反応に由来するが<sup>34, 54-58)</sup>、近年、過酸化脂質の細胞障害性や疾患との関係が注目されている<sup>55, 57, 58)</sup>。エタノールの代謝経路のひとつとしてミクロゾームのチトクローム P-450に由来する MEOS (microsomal ethanol oxidizing system) 系が知られており、大量のエタノールを摂取した場合にMEOS系での代謝量が増大する<sup>59)</sup> ことから、急性アルコール性肝障害に伴う脂質過酸化反応の亢進には、MEOS系でのエタノールの代謝が関与していると考えられる。

本章では、急性アルコール性肝障害の発生に対する活性酸素と脂質過酸化反応の関与、及びこれに対するフラビン類の抑制効果を検討する目的で、まず、マウスの腹腔内にエタノールを段階的な濃度で単回投与した場合の、体重、肝重量<sup>60)</sup>、肝臓中のチオバルビツール酸反応性物質（TBARS）量<sup>48, 61)</sup>、肝臓中のGSH及び酸化型グルタチオン（GSSG）量<sup>62)</sup>、肝臓中のフラビン量、肝サイトソール分画中の抗酸化酵素活性、血清中の GOT及びGPT活性<sup>63)</sup>をバ

ラメーターとして測定し、実験的な急性アルコール性肝障害の発生に適切な投与量を設定した<sup>64)</sup>。次に、エタノール 86 mmol/kgの腹腔内への投与に対して、フラビン3型 (RF, FMN, FAD) を併用投与した場合の各パラメーターの変動から、急性アルコール性肝障害の発生に対するフラビン3型の抑制効果を比較検討した<sup>64)</sup>。さらに、フラビン3型中で最も有効だったFADを、エタノール86 mmol/kgの腹腔内への投与に対して段階的濃度で併用投与した場合の各パラメーターの変動から、FADの抑制効果の投与量依存性を検討した<sup>65)</sup>。また、*in vitro*の実験から、エタノールのミクロゾームでの代謝に伴う活性酸素の生成と脂質過酸化反応の亢進、及びフラビン類による抑制効果とその機構を検討した<sup>66)</sup>。

## 第1節 エタノールの投与によるパラメーターの変動

### 1 体重・肝重量

0~103.2 mmol/kgのエタノールをマウスの腹腔内に段階的な濃度で単回投与した結果、投与24時間後の体重はエタノールの投与量に対応して増大し、51.6~103.2 mmol/kgの投与群で、対照群に対して有意差が認められた (Fig. 1)。また、肝重量もエタノールの投与量に対応して増大し、68.8~103.2 mmol/kgの投与群で、対照群に対して有意差が認められた (Fig.1)。

### 2 肝臓中のGSH及びGSSG量

肝臓中のGSH量はエタノールの投与量に対応して減少し、86 mmol/kgの投与群で、対照群に対して有意差が認められた (Fig.2)。一方、肝臓中のGSSG量はエタノールの投与量に対応して増大し、103.2 mmol/kgの投与群で、対照群に対して有意差が認められた (Fig.2)。

### 3 肝臓中のTBARS量

肝臓中のTBARS量はエタノールの投与量に対応して増大し、86 mmol/kg 及

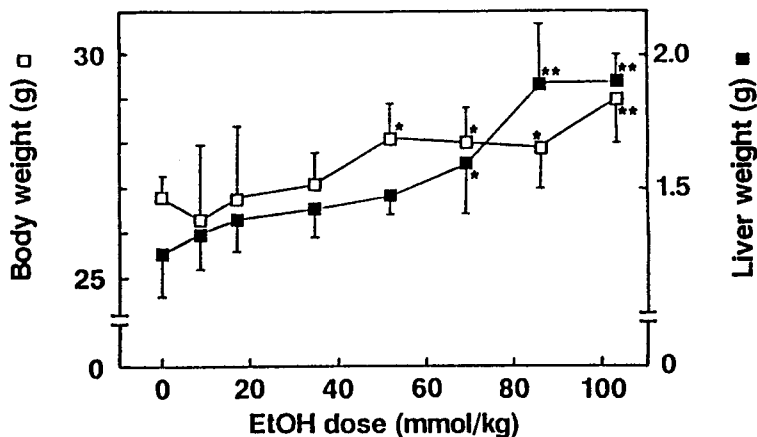


Fig.1. Changes in Body Weight and Liver Weight by the Ethanol Administration in Mice

Each value is a mean  $\pm$  SD of 4 mice.

\*\*\* Significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

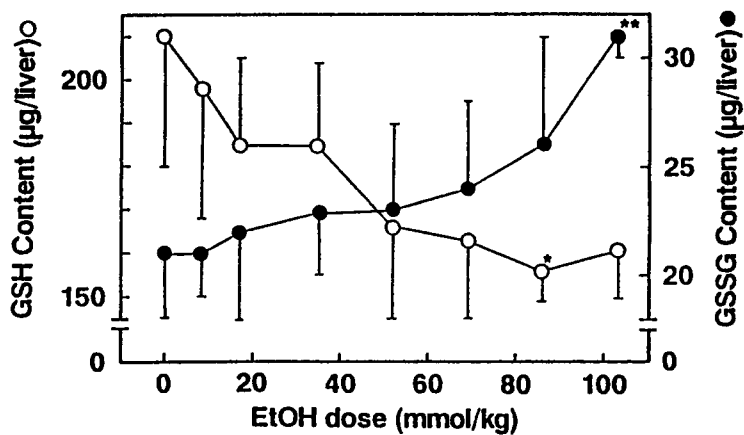


Fig.2. Changes in GSH and GSSG Contents in Liver by the Ethanol Administration in Mice

Each value is a mean  $\pm$  SD of 4 mice.

\*\*\* Significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

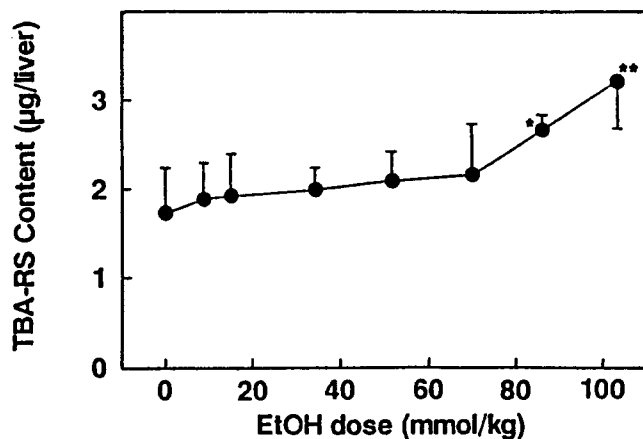


Fig.3. Changes in TBARS Content in Liver by the Ethanol Administration in Mice

Each Value is a mean  $\pm$  SD of 4 mice.

\*\*\* Significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

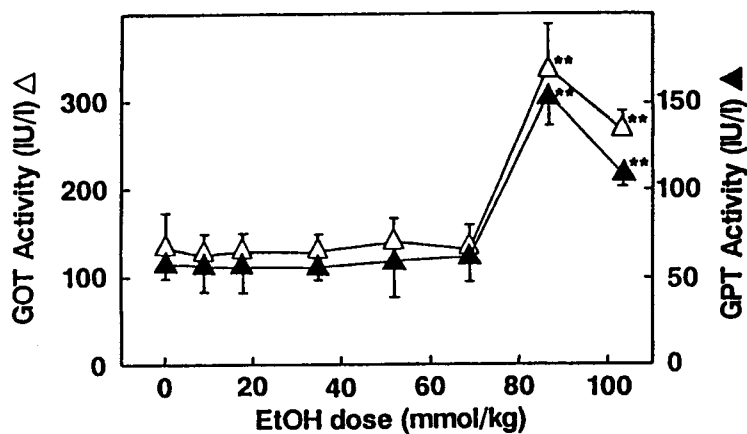


Fig.4. Changes in GOT and GPT Activities in Serum by the Ethanol Administration in Mice

Each value is a mean  $\pm$  SD of 4 mice.

\*\*\* Significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

び103.2 mmol/kgの投与群で，対照群に対して有意差が認められた (Fig.3)

#### 4 血清中のGOT及びGPT活性

血清中のGOT及びGPT活性は，いずれもエタノール 86 mmol/kg 及び 103.2 mmol/kgの投与群で，対照群に対して有意に増大した (Fig.4) .

#### 5 肝サイトソール分画中の酵素活性

肝サイトソール分画中の酵素活性は，Table 1 に示したように，いずれもエタノールの投与量に対応して低下し，SOD活性及びG-6-PD活性は68~103.2 mmol/kg, catalase活性は34.4~103.2 mmol/kg, GSH-Px 活性及び GR活性は51.6~103.2 mmol/kgの投与群で，対照群に対して有意差が認められた.

#### 6 肝臓中のフラビン量

肝臓中の FAD及び総フラビン量はいずれもエタノールの投与量に対応して減少し，51.6 mmol/kgの投与群を除いたすべての投与群で，対照群に対して有意差が認められた (Table 2) .

Table 1. Changes in Enzyme Activities in Liver Cytosol by the Ethanol Administration in Mice

EtOH (mmol/kg)	Unit/mg protein				
	SOD	Catalase	GSH-Px	GR	G-6-PD
0	5.57±0.33	925±95	123±4	8.53±0.56	7.21±0.33
8.6	5.30±0.96	803±144	119±8	8.17±0.82	8.17±1.79
17.2	5.19±0.96	780±123	118±8	7.89±1.35	9.33±2.97
34.4	5.14±0.56	748±66 <sup>a)</sup>	114±8	7.66±1.75	6.65±1.28
51.6	5.14±0.56	758±54 <sup>a)</sup>	107±11 <sup>a)</sup>	7.07±0.66 <sup>b)</sup>	6.61±0.67
68.8	4.75±0.53 <sup>a)</sup>	495±91 <sup>b)</sup>	102±8 <sup>b)</sup>	6.29±0.54 <sup>b)</sup>	5.72±0.78 <sup>b)</sup>
86.0	4.31±0.68 <sup>b)</sup>	405±75 <sup>b)</sup>	97±13 <sup>b)</sup>	6.50±0.45 <sup>b)</sup>	5.61±0.25 <sup>b)</sup>
103.2	4.55±0.10 <sup>b)</sup>	270±20 <sup>b)</sup>	105±10 <sup>b)</sup>	5.85±0.12 <sup>b)</sup>	5.54±0.08 <sup>b)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 2. Changes in Flavin Contents in Liver by the Ethanol Administration in Mice

EtOH (mmol/kg)	nmol/g liver			
	RF	FMN	FAD	Total
0	0.62±0.06	2.46±0.48	34.9±1.8	38.0±1.8
8.6	0.57±0.08	2.46±0.87	32.3±1.8 <sup>a)</sup>	35.3±1.6 <sup>a)</sup>
17.2	0.61±0.06	2.19±0.57	31.4±2.9 <sup>a)</sup>	34.2±3.0 <sup>a)</sup>
34.4	0.45±0.06	2.34±0.24	31.6±1.6 <sup>a)</sup>	34.4±1.6 <sup>a)</sup>
51.6	0.46±0.11	2.40±0.87	30.7±4.3	33.6±4.3
68.8	0.52±0.17	2.25±0.81	29.5±0.5 <sup>b)</sup>	32.3±0.7 <sup>b)</sup>
86.0	0.51±0.15	2.22±0.81	27.4±1.0 <sup>b)</sup>	30.1±1.0 <sup>b)</sup>
103.2	0.65±0.05	2.25±0.30	21.9±0.5 <sup>b)</sup>	24.8±0.5 <sup>b)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

## 第2節 フラビン3型による肝障害抑制効果の比較

### 1 体重・肝重量

マウスの腹腔内にエタノール 86 mmol/kgを投与した場合の、投与 24時間後の体重の有意な増大は、FMNの併用投与群で有意に抑制されたが、RF 及び FADの併用投与群では有意な変動は認められなかった (Table 3)。また、エタノールの投与による肝重量の有意な増大は、RF 及び FAD の併用投与群で有意に抑制されたが、FMN の併用投与群では有意な変動は認められなかった (Table 3)。

### 2 肝臓中のGSH及びGSSG量

エタノールの投与による肝臓中のGSH量の有意な減少は、有意差はないが、フラビン3型の併用投与でいずれも抑制された (Table 4)。また、エタノールの投与による肝臓中の GSSG 量の有意な増大は、RF 及び FAD の併用投与群で有意に抑制されたが、FMN の併用投与群では有意な変動は認められなかった (Table 4)。

### 3 肝臓中のTBARS量

エタノールの投与による肝臓中の TBARS量の有意な増大は、フラビン3型の併用投与で、いずれも有意に抑制された (Table 4)。

### 4 血清中のGOT及びGPT活性

エタノールの投与による血清中のGOT活性の有意な上昇は、RF及びFADの併用投与群でいずれも有意に抑制されたが、FMN の併用投与群では有意な変動は認められなかった (Table 5)。また、エタノールの投与による血清中のGPT活性の有意な上昇は、FAD の併用投与群で有意に抑制されたが、RF 及び FMNの併用投与群では有意な変動は認められなかった (Table 5)。

### 5 肝サイトソール分画中の酵素活性

肝サイトソール分画中の酵素活性は、Table 6 に示したように、エタノールの投与によるSOD活性の有意な低下は、有意差はないが、FADの併用投与群

Table 3. Changes in Body Weight and Liver Weight by the Ethanol and Flavins Simultaneous Administration in Mice

Group	Body weight(g)	Liver weight(g)
Control	19.3±2.1	0.98±0.26
EtOH control	24.8±1.3 <sup>b)</sup>	1.73±0.24 <sup>b)</sup>
I	21.6±0.8 <sup>a) d)</sup>	1.18±0.18 <sup>d)</sup>
II	23.0±1.4 <sup>a)</sup>	1.28±0.07 <sup>a) d)</sup>
III	22.8±0.5 <sup>a) c)</sup>	1.12±0.12 <sup>d)</sup>
IV	23.2±1.6 <sup>a)</sup>	1.41±0.11 <sup>a) c)</sup>
V	23.3±0.9 <sup>b) c)</sup>	1.46±0.16 <sup>a)</sup>
VI	23.6±1.1 <sup>b)</sup>	1.42±0.13 <sup>a) c)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

EtOH; 86 mmol/kg Flavins; 0.57 mmol/kg

I; RF, II; FMN, III; FAD, IV; EtOH + RF, V; EtOH + FMN, VI; EtOH + FAD

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 4. Changes in GSH, GSSG and TBARS Contents in Liver by the Ethanol and Flavins Simultaneous Administration in Mice

Group	µg/liver		
	GSH	GSSG	TBARS
Control	182±38	11±2	1.97±0.20
EtOH control	119±35 <sup>a)</sup>	18±2 <sup>b)</sup>	3.64±0.45 <sup>b)</sup>
I	152±23 <sup>c)</sup>	13±3 <sup>c)</sup>	1.87±0.48 <sup>d)</sup>
II	156±10	13±2 <sup>d)</sup>	1.79±0.13 <sup>d)</sup>
III	152±23 <sup>c)</sup>	12±2 <sup>d)</sup>	1.96±0.40 <sup>d)</sup>
IV	134±31	15±2 <sup>a) c)</sup>	2.25±0.35 <sup>d)</sup>
V	132±23 <sup>a)</sup>	15±2 <sup>a)</sup>	2.32±0.61 <sup>d)</sup>
VI	142±23	13±2 <sup>c)</sup>	2.05±0.54 <sup>d)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

EtOH; 86 mmol/kg Flavins; 0.57 mmol/kg

I; RF, II; FMN, III; FAD, IV; EtOH + RF, V; EtOH + FMN, VI; EtOH + FAD

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.



Table 5. Changes in GOT and GPT Activities in Serum by the Ethanol and Flavins Simultaneous Administration in Mice

Group	IU/l serum	
	GOT	GPT
Control	121±33	81±17
EtOH control	189±43 <sup>a)</sup>	115±10 <sup>a)</sup>
I	136±18 <sup>b)</sup>	69±27 <sup>d)</sup>
II	101±33 <sup>d)</sup>	48±32 <sup>d)</sup>
III	99±5 <sup>d)</sup>	48±11 <sup>a)</sup> <sup>d)</sup>
IV	132±17 <sup>b)</sup>	78±61
V	163±40 <sup>f)</sup>	80±44
VI	133±11 <sup>c)</sup> <sup>e)</sup>	64±18 <sup>d)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

EtOH: 86 mmol/kg Flavins: 0.57 mmol/kg

I; RF. II; FMN. III; FAD. IV; EtOH + RF. V; EtOH + FMN. VI; EtOH + FAD

- a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.  
c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.  
e) f) Significantly different from flavin control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 6. Changes in Enzyme Activities in Liver Cytosol by the Ethanol and Flavins Simultaneous Administration in Mice

Group	Unit/mg protein				
	SOD	Catalase	GSH-Px	GR	G-6-PD
Control	5.77±0.62	1043±252	166±18	5.52±1.71	7.20±0.72
EtOH control	3.67±0.42 <sup>b)</sup>	292±23 <sup>b)</sup>	102±14 <sup>b)</sup>	4.91±0.44	4.25±0.95 <sup>b)</sup>
I	4.86±1.47	804±120 <sup>d)</sup>	153±26 <sup>d)</sup>	5.73±1.11	5.98±1.43 <sup>c)</sup>
II	5.09±0.38 <sup>d)</sup>	648±61 <sup>a)</sup> <sup>d)</sup>	104±16 <sup>b)</sup>	4.36±1.21	5.29±1.46
III	5.28±0.36 <sup>d)</sup>	701±64 <sup>a)</sup> <sup>d)</sup>	144±13 <sup>d)</sup>	5.06±1.35	6.02±1.37 <sup>c)</sup>
IV	3.74±0.18 <sup>b)</sup>	360±132 <sup>b)</sup> <sup>e)</sup>	103±35 <sup>a)</sup> <sup>e)</sup>	5.53±0.96	6.67±0.63 <sup>d)</sup>
V	3.23±0.25 <sup>b)</sup> <sup>e)</sup>	580±220 <sup>b)</sup>	98±36 <sup>a)</sup>	4.58±0.84	6.59±1.53 <sup>c)</sup>
VI	4.11±0.16 <sup>b)</sup> <sup>e)</sup>	633±90 <sup>b)</sup> <sup>e)</sup>	139±14 <sup>a)</sup>	4.73±0.57	6.37±1.59 <sup>c)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

EtOH: 86 mmol/kg Flavins: 0.57 mmol/kg

I; RF. II; FMN. III; FAD. IV; EtOH + RF. V; EtOH + FMN. VI; EtOH + FAD

- a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.  
c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.  
e) Significantly different from flavin control at P<0.01.

で抑制された。また、エタノールの投与による catalase 活性の有意な低下は、FAD の併用投与群で有意に抑制されたが、RF 及び FMN の併用投与群では有意な変動は認められなかった。また、エタノールの投与による GSH-Px 活性の有意な低下は、有意差はないが、FAD の併用投与群で抑制された。また、エタノールの投与による G-6-PD 活性の有意な低下は、フラビン 3 型の併用投与でいずれも有意に抑制された。さらに、エタノールの投与による GR 活性の低下は、有意差はないが、RF の併用投与群で抑制された。

## 6 肝臓中のフラビン量

エタノールの投与による肝臓中の FAD 及び総フラビン量の有意な減少は、フラビン 3 型の併用投与で、いずれも有意に抑制された (Table 7)。

Table 7. Changes in Flavin Contents in Liver by the Ethanol and Flavins Simultaneous Administration in Mice

Group	nmol/g liver			
	RF	FMN	FAD	Total
Control	0.52±0.10	2.25±0.21	31.2±2.6	34.0±2.6
EtOH control	0.45±0.05	2.13±0.39	26.7±2.8 <sup>a)</sup>	29.3±2.9 <sup>a)</sup>
I	1.18±0.31 <sup>b) d)</sup>	3.72±1.38 <sup>c)</sup>	41.9±1.2 <sup>b) d)</sup>	46.8±1.5 <sup>b) d)</sup>
II	1.16±0.15 <sup>b) d)</sup>	4.50±0.39 <sup>b) d)</sup>	42.2±1.9 <sup>b) d)</sup>	49.7±1.7 <sup>b) d)</sup>
III	1.09±0.18 <sup>b) d)</sup>	2.76±0.39 <sup>c)</sup>	47.5±1.5 <sup>b) d)</sup>	51.4±1.5 <sup>b) d)</sup>
IV	0.55±0.10 <sup>d)</sup>	3.51±0.84 <sup>c)</sup>	33.9±5.0 <sup>c) e)</sup>	38.0±5.2 <sup>c) e)</sup>
V	0.46±0.14 <sup>f)</sup>	2.28±0.75 <sup>f)</sup>	28.9±4.4 <sup>f)</sup>	31.6±5.2 <sup>f)</sup>
VI	0.41±0.10 <sup>f)</sup>	3.27±0.60 <sup>a) d)</sup>	37.3±3.9 <sup>a) d) f)</sup>	41.0±3.9 <sup>a) d) f)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice.

EtOH; 86 mmol/kg Flavins: 0.57 mmol/kg

I; RF, II; FMN, III; FAD, IV; EtOH + RF, V; EtOH + FMN, VI; EtOH + FAD

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

e) f) Significantly different from flavin control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

### 第3節 フラビンアデニンジヌクレオチドの肝障害抑制効果の 投与量依存性

#### 1 体重・肝重量

マウスの腹腔内にエタノール86 mmol/kgを投与した場合の、投与24時間後の体重及び肝重量の有意な増大は、FADの併用投与によりいずれも投与量に対応して抑制され、いずれも high dose群では、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 8)。

#### 2 肝臓中のGSH及びGSSG量

エタノールの投与による肝臓中のGSH量の有意な減少は、FADの併用投与により投与量に対応して抑制され、high dose群では、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 9)。また、エタノールの投与による肝臓中のGSSG量の有意な増大も、FADの併用投与により投与量に対応して抑制され、すべての併用投与群で、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 9)。

#### 3 肝臓中のTBARS量

エタノールの投与による肝臓中のTBARS量の有意な増大は、FADの併用投与により投与量に対応して抑制され、すべての併用投与群で、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 9)。

#### 4 血清中のGOT及びGPT活性

エタノールの投与による血清中のGOT及びGPT活性の有意な増大は、いずれもFADの併用投与により投与量に対応して抑制され、GOT活性はmedium dose群及び high dose群、GPT活性はhigh dose群で、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 10)。

#### 5 肝サイトソール分画中の酵素活性

エタノールの投与による肝サイトソール分画中の酵素活性の低下は、Table 11に示したように、FADの併用投与によりいずれも投与量に対応して抑

Table 8. Changes in Body Weight and Liver Weight by the FAD and Ethanol Simultaneous Administration in Mice

Group	Body weight(g)	Liver weight(g)
Control	25.4±1.9	1.53±0.24
EtOH control	29.2±0.9 <sup>b)</sup>	2.19±0.12 <sup>b)</sup>
I	24.3±2.0	1.41±0.25
II	25.6±2.2	1.55±0.21
III	25.8±1.8	1.56±0.22
IV	29.0±1.9 <sup>b)</sup>	2.07±0.10 <sup>b)</sup>
V	28.0±1.9 <sup>a)</sup>	2.04±0.18 <sup>b)</sup>
VI	25.8±1.5 <sup>a)</sup>	1.71±0.21 <sup>c)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice. EtOH; 86 mmol/kg

I; FAD 28.5 μmol/kg, II; FAD 0.285 mmol/kg, III; FAD 0.57 mmol/kg,

IV; EtOH + FAD 28.5 μmol/kg, V; EtOH + FAD 0.285 mmol/kg,

VI; EtOH + FAD 0.57 mmol/kg

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 9. Changes in TBARS, GSH and GSSG Contents in Liver by the FAD and Ethanol Simultaneous Administration in Mice

Group	μg/liver		
	TBARS	GSH	GSSG
Control	1.88±0.20	255±18	15±2
EtOH control	4.22±1.40 <sup>a)</sup>	180±23 <sup>a)</sup>	20±1 <sup>a)</sup>
I	1.89±0.45	261±20	15±1
II	1.80±0.53	248±25	16±1
III	1.92±0.65	260±35	16±2
IV	2.08±0.50 <sup>a)</sup>	185±24 <sup>a)</sup>	18±2 <sup>b)</sup>
V	1.99±0.76 <sup>a)</sup>	206±21 <sup>a)</sup>	16±1 <sup>c)</sup>
VI	1.96±0.60 <sup>a)</sup>	228±26 <sup>b)</sup>	15±1 <sup>c)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice. EtOH; 86 mmol/kg

I; FAD 28.5 μmol/kg, II; FAD 0.285 mmol/kg, III; FAD 0.57 mmol/kg,

IV; EtOH + FAD 28.5 μmol/kg, V; EtOH + FAD 0.285 mmol/kg,

VI; EtOH + FAD 0.57 mmol/kg

a) Significantly different from control at P<0.01.

b) c) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 10. Changes in GOT and GPT Activities in Serum by the FAD and Ethanol Simultaneous Administration in Mice

Group	IU/l serum	
	GOT	GPT
Control	135±27	88±17
EtOH control	194±35 <sup>a)</sup>	121±23 <sup>a)</sup>
I	133±29	86±21
II	138±22	89±17
III	140±23	86±20
IV	178±25	108±29
V	139±21 <sup>b)</sup>	92±27
VI	130±20 <sup>b)</sup>	87±18 <sup>b)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice. EtOH; 86 mmol/kg  
 I; FAD 28.5 μmol/kg, II: FAD 0.285 mmol/kg, III; FAD 0.57 mmol/kg,  
 IV; EtOH + FAD 28.5 μmol/kg V; EtOH + FAD 0.285 mmol/kg,  
 VI; EtOH + FAD 0.57 mmol/kg

a) Significantly different from control at P<0.05.

b) Significantly different from ethanol control at P<0.05.

Table 11. Changes in Enzyme Activities in Liver Cytosol by the FAD and Ethanol Simultaneous Administration in Mice

Group	Unit/mg protein				
	SOD	Catalase	GSH-Px	GR	G-6-PD
Control	5.28±0.36	1149±119	187±16	5.89±0.58	7.19±0.46
EtOH control	4.12±0.16 <sup>b)</sup>	484±85 <sup>b)</sup>	125±16 <sup>b)</sup>	3.62±0.39 <sup>b)</sup>	3.01±0.20 <sup>b)</sup>
I	5.55±0.20	1062±188	179±18	5.95±0.70	7.08±0.85
II	5.30±0.28	1176±112	185±23	6.08±0.88	7.20±0.58
III	5.33±0.25	1129±120	185±30	6.32±1.03	7.18±0.57
IV	4.20±0.30 <sup>b)</sup>	594±90 <sup>b)</sup>	141±16 <sup>b) c)</sup>	4.20±0.54 <sup>b)</sup>	3.14±0.25 <sup>b)</sup>
V	4.60±0.28 <sup>b)</sup>	647±58 <sup>b)</sup>	156±26 <sup>c)</sup>	5.43±0.70 <sup>c)</sup>	4.50±0.44 <sup>b) d)</sup>
VI	5.00±0.38 <sup>c)</sup>	736±103 <sup>a) c)</sup>	169±19 <sup>d)</sup>	5.56±0.32 <sup>d)</sup>	5.54±0.49 <sup>b) d)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice. EtOH; 86 mmol/kg  
 I; FAD 28.5 μmol/kg, II: FAD 0.285 mmol/kg, III; FAD 0.57 mmol/kg,  
 IV; EtOH + FAD 28.5 μmol/kg V; EtOH + FAD 0.285 mmol/kg,  
 VI; EtOH + FAD 0.57 mmol/kg

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

制され、SOD活性及びcatalase活性は high dose群、GR活性及び G-6-PD活性は medium dose群及びhigh dose群、GSH-Px 活性はすべての併用投与群で、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた。

## 6 肝臓中のフラビン量

エタノールの投与による肝臓中の FAD及び総フラビン量の有意な減少は、FAD の併用投与によりいずれも投与量に対応して抑制され、すべての併用投与群で、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 12)。

## 7 肝ミトコンドリアのATP生成活性

エタノールの投与による肝ミトコンドリアのATP生成活性の有意な低下は、FAD の併用投与により投与量に対応して抑制され、medium dose群及びhigh dose 群では、エタノール単独投与群に対して有意差が認められた (Table 13)。

Table 12. Changes in Flavin Contents in Liver by the FAD and Ethanol Simultaneous Administration in Mice

Group	nmol/g liver			Total
	RF	FMN	FAD	
Control	0.68±0.20	2.22±0.54	34.3±3.8	41.9±3.9
EtOH control	0.56±0.11	2.13±0.51	25.8±4.4 <sup>b)</sup>	29.3±3.7 <sup>b)</sup>
I	0.71±0.22	2.33±0.45	35.0±2.3	42.8±2.8
II	0.96±0.30	2.54±0.55	40.9±3.8	47.7±4.5
III	1.88±0.70	2.96±0.50	47.7±4.6	58.3±6.6
IV	0.61±0.27	2.19±0.51	35.0±6.5 <sup>c)</sup>	38.8±6.5 <sup>c)</sup>
V	0.85±0.22 <sup>c)</sup>	2.34±0.60	38.4±2.9 <sup>a) d)</sup>	42.6±3.0 <sup>a) d)</sup>
VI	1.68±0.66 <sup>b) d)</sup>	2.76±0.87	45.8±6.5 <sup>b) d)</sup>	51.2±7.0 <sup>b) d)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice. EtOH; 86 mmol/kg

I; FAD 28.5 μmol/kg. II; FAD 0.285 mmol/kg. III; FAD 0.57 mmol/kg.

IV; EtOH + FAD 28.5 μmol/kg V; EtOH + FAD 0.285 mmol/kg.

VI; EtOH + FAD 0.57 mmol/kg

a) b) Significantly different from control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

c) d) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

Table 13. Changes in Mitochondrial ATP Synthesis in Liver by the FAD and Ethanol Simultaneous Administration in Mice

Group	ADP/O ratio
Control	1.62±0.55
EtOH control	0.68±0.16 <sup>a)</sup>
I	1.68±0.43
II	1.75±0.58
III	1.86±0.82
IV	0.78±0.28 <sup>a)</sup>
V	1.15±0.35 <sup>b)</sup>
VI	1.37±0.35 <sup>c)</sup>

Each value is a mean ± SD of 4 mice. EtOH; 86 mmol/kg

I; FAD 28.5 μmol/kg. II; FAD 0.285 mmol/kg. III; FAD 0.57 mmol/kg.

IV; EtOH + FAD 28.5 μmol/kg V; EtOH + FAD 0.285 mmol/kg.

VI; EtOH + FAD 0.57 mmol/kg

a) Significantly different from control at P<0.01.

b) c) Significantly different from EtOH control at P<0.05 and P<0.01, respectively.

## 第4節 エタノールのin vitro代謝に伴う脂質過酸化反応に対する フラビンアデニンジヌクレオチドの抑制効果

### 1 ミクロゾームの脂質過酸化反応

肝ミクロゾームの in vitro脂質過酸化反応では、TBARSの生成量は、反応系へのミクロゾームの添加量が400  $\mu\text{g protein}$ までは添加量に対応して増大した。一方、加熱処理したミクロゾームを使用した反応系では、TBARSの生成は認められなかった (Fig.5,A)。

### 2 脂質過酸化反応に対するエタノールの添加の影響

ミクロゾーム分画の添加量を200  $\mu\text{g protein}$ とした1の脂質過酸化反応系では、TBARSの生成量は、エタノールの添加量が1.05 mMまでは添加量に対応して増大した。一方、加熱処理したミクロゾームを使用した反応系では、TBARSの生成は認められなかった (Fig.5,B)。

### 3 脂質過酸化反応に対する活性酸素消去酵素及びFADの添加の影響

エタノールの添加量を1.05 mMとした2の脂質過酸化反応系では、TBARSの生成量は、SOD 10 unit, catalase 15 unit及びFAD 6  $\mu\text{M}$ までの添加では、いずれの場合も添加量に対応して減少した (Fig.6)。

### 4 脂質過酸化反応に対するラジカル捕捉剤の添加の影響

ミクロゾーム分画200  $\mu\text{g protein}$ 及びエタノール1.05 mMを添加した脂質過酸化反応系では、TBARSの生成量は、mannitol 6  $\mu\text{M}$ , 尿酸6  $\mu\text{M}$ , SOD 10 unit, catalase 15 unit, フラビン3型及びリポフラビン酪酸エステル (B<sub>2</sub>-But) 各 6  $\mu\text{M}$ の添加では、いずれの場合も約60%減少したが、アジ化ナトリウム6  $\mu\text{M}$ の添加では全く減少は認められなかった (Fig.7)。

### 5 PNDMA法によるHO $\cdot$ の測定

PNDMAに由来する 440 nmの吸光度は、過酸化水素の添加量が0.1  $\mu\text{mol}$ までは添加量に対応して減少した (Fig.8,A)。

### 6 PNDMA法に対するFADの添加の影響



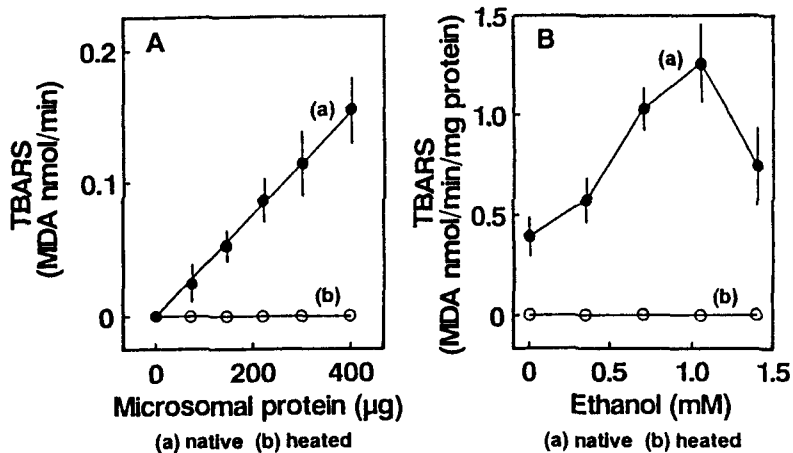


Fig.5. Increase of TBARS by the Addition of Microsomal Protein or Ethano

Reaction mixture contained 0.26 mM of ferrous ammonium sulfate and 1  $\mu$ mol of NADPH in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4). Final volume was 1.0 ml.

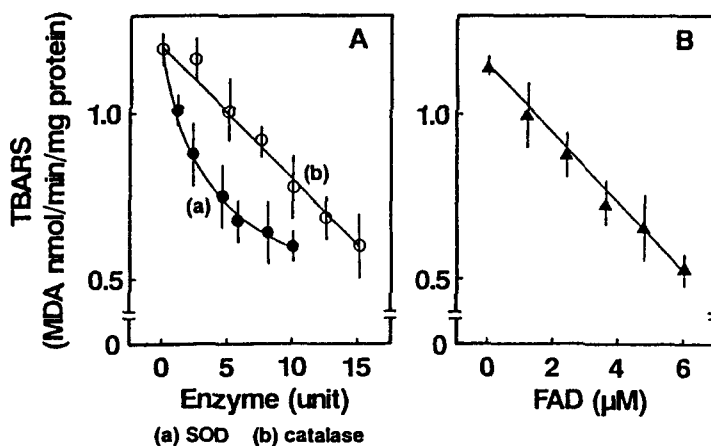


Fig.6. Effects of SOD, Catalase and FAD on the Production of TBARS

Reaction mixture contained 0.26 mM of ferrous ammonium sulfate, 1  $\mu$ mol of NADPH, 1.05 mM of ethanol and 200  $\mu$ g of microsomal protein in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4). Final volume was 1.0 ml.

過酸化水素の添加量を 0.1  $\mu\text{mol}$  とした5の反応系では, 吸光度の減少は FADの添加量が0.6  $\mu\text{mol}$ までは添加量に対応して抑制された (Fig.8,B) .

#### 7 HO $\cdot$ との反応によるFADの減少

FADに由来する448 nmの吸光度は, 過酸化水素の添加量が 0.5  $\mu\text{mol}$ までは 添加量に対応して減少した (Fig.9) .

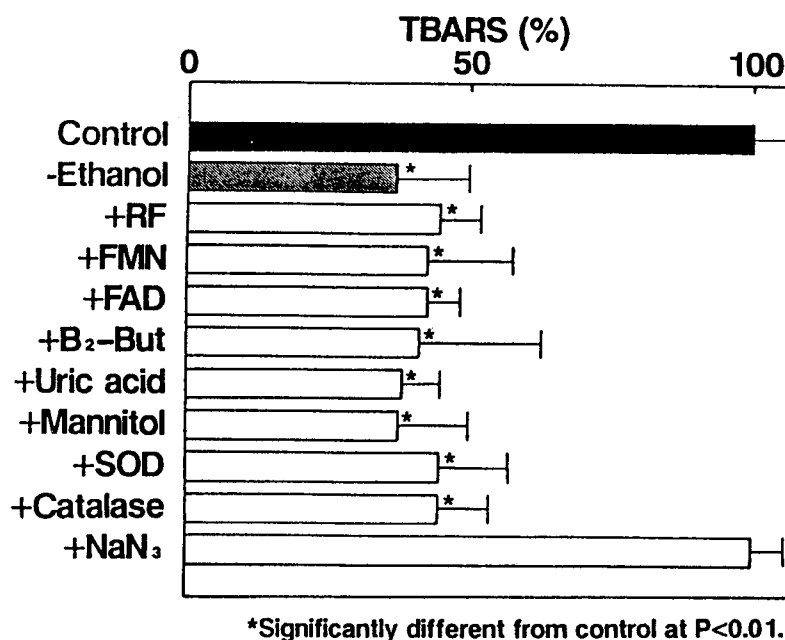


Fig.7. Inhibitory Effects of Scavengers on the Production of TBARS

Reaction mixture contained 0.26 mM of ferrous ammonium sulfate, 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH, 1.05 mM of ethanol, 200  $\mu\text{g}$  of microsomal protein and 6.0  $\mu\text{M}$  of RF, FMN, FAD, B<sub>2</sub>-But, uric acid, mannitol or sodium azide, 5 unit of SOD or 15 unit of catalase in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4). Final volume was 1.0 ml.

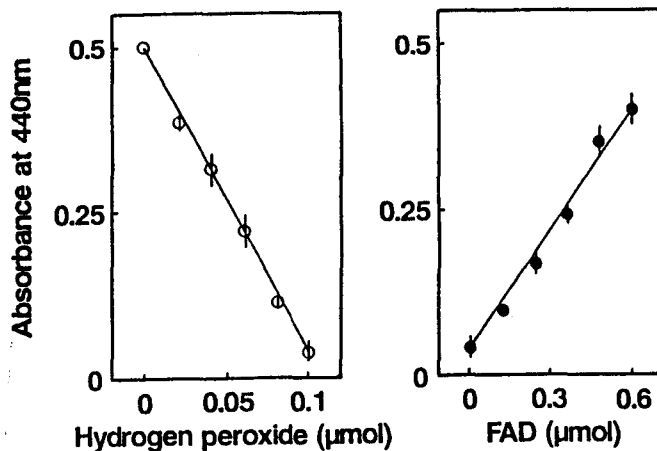


Fig.8. Effect of FAD on the Reaction of PNDMA and Hydroxyl Radical

Reaction mixture contained 0.3 μmol of EDTA, 0.1 μmol of PNDMA and 0.13 μmol of ferrous ammonium sulfate in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4). Final volume was 2.5 ml.

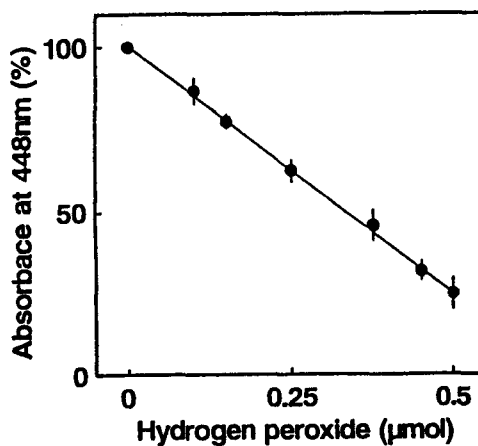


Fig.9. Decrease of FAD by the Reaction with Hydroxyl Radical

Reaction mixture contained 0.3 μmol of EDTA, 0.1 μmol of PNDMA, 0.13 μmol of ferrous ammonium sulfate, 0.6 μmol of FAD and 0~0.5 μmol of hydrogen peroxide in 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4). Final volume was 2.5 ml.

## 第5節 本章のまとめ

急性アルコール性肝障害の発生に対する活性酸素と脂質過酸化反応の関与及びこれに対するフラビン類の抑制効果とその機構について、*in vivo* 及び *in vitro*の実験を行って検討した。

第1節では、マウスにエタノール0~103.2 mmol/kgを腹腔内に単回投与した結果、体重、肝重量、肝臓中のTBARS量及び肝臓中のGSSG量は、投与量に対応して増大し、肝臓中のGSH量、肝サイトソール分画中の抗酸化酵素活性及び肝臓中のフラビン量は、投与量に対応して減少した。これらのパラメーターの変動及び血清中のGOT及びGPT活性の上昇から、本実験条件ではエタノール86 mmol/kg以上の投与群で、急性アルコール性肝障害の発生が認められた。また、この肝障害の発生に対して、肝組織中での脂質過酸化反応の亢進及び肝臓中のフラビン量の減少の関与が示唆され、フラビン類の投与による肝障害の抑制が考えられた。しかし、103.2 mmol/kg 投与群では投与後24時間以内にマウスの死亡が観察され、また86 mmol/kg投与群に対して血清GOT及びGPT活性の低下が見られたため、エタノール103.2 mmol/kgの投与量では肝機能の低下等による致死作用が生じることが示唆され、実験的に急性アルコール性肝障害を発生する投与量として86 mmol/kgが適当と考えられた。

第2節では、エタノール86 mmol/kgの腹腔内への単回投与に対して、フラビン3型それぞれ 570  $\mu$ mol/kgずつを併用投与した結果、各パラメーターの変動がいずれの併用投与群でも抑制されたことから、脂質過酸化反応に由来する急性アルコール性肝障害に対する、フラビン類、特にFADの抑制効果が認められた<sup>6,7)</sup>。

第3節では、エタノール86 mmol/kgの腹腔内への単回投与に対して、FAD 28.5  $\mu$ mol/kg、285  $\mu$ mol/kg及び 570  $\mu$ mol/kgをそれぞれ併用投与した結果、各パラメーターの変動がFADの投与量に対応して抑制されたことから、FADの抑制効果に投与量依存性が認められた。また、肝障害の発生機構のひとつと

して、肝臓中のフラビン量の減少による肝ミトコンドリアの ATP生成活性の低下が認められ、FAD による抑制機構のひとつとして、フラビンの補給による肝ミトコンドリアのATP生成活性の低下の抑制が示唆された。

第4節では、マウスの肝ミクロゾームによるエタノールの *in vitro*での代謝に伴って脂質過酸化反応が増大し、これがラジカル捕捉剤及び FADの添加量に対応して抑制されたことから、脂質過酸化反応の亢進は、エタノールの代謝に伴う活性酸素( $O_2^-$ ,  $HO\cdot$ )の生成に由来するラジカル反応の寄与することが認められた。さらに、FADと $HO\cdot$ の反応性が認められ、反応の結果 FAD及び $HO\cdot$ のいずれもが減少したことから、FADの脂質過酸化反応に対する抑制機構として、活性酸素ラジカルの捕捉作用が示唆された。すなわち、エタノールはミクロゾームでの代謝に際して  $O_2^-$ 及び  $HO\cdot$ を生成して、ラジカル反応により脂質過酸化反応を誘導するが<sup>48, 52, 68-71)</sup>、Fig.10に示したように、FADは生成した $HO\cdot$ と反応して<sup>72-79)</sup>これをイソアロキサジン核の構造中に捕捉<sup>78)</sup>、又はその構造の分解を伴って<sup>75, 76)</sup>、脂質過酸化反応を抑制すると考えられた。

以上のことから、急性アルコール性肝障害の発生機構のひとつとして、活性酸素種の分解・消去に関与する酵素活性の低下により、細胞内の活性酸素濃度が上昇して、脂質過酸化反応が亢進される可能性があり、この脂質過酸化反応の亢進に由来する肝障害の発生が、フラビン類、特に FADの投与で投与量に対応して抑制されることが認められた。また、FAD による抑制作用の機構のひとつとして、エタノールの投与による肝ミトコンドリアの ATP生成活性の低下が、FAD の投与量に対応して抑制されたことから、フラビンを補給して、細胞内のフラビン量の減少によるミトコンドリアのエネルギー産生の低下を抑制することにより、抗酸化酵素活性の低下を抑制して<sup>80)</sup>、細胞内の活性酸素濃度の上昇を抑制した結果、脂質過酸化反応の亢進を抑制することが示唆された。フラビン類は非経口的に摂取された場合、生体内で一度RFまで加水分解されてから肝細胞内に取り込まれて FMNや FADに再合成され

<sup>81)</sup>, また, 水溶性の大きい FADやFMNは細胞膜を通過しにくいいため, 大部分はRFに加水分解されて肝細胞内に取り込まれ, ごく一部だけが加水分解されずに取り込まれることが知られている<sup>82)</sup>. そのため本章の実験ではフラビン型が異なっても, *in vivo*及び *in vitro*系での抑制効果に顕著な差が認められなかったと思われる. しかし, 若干ではあるが FADがフラビン3型中で最も有効だったのは, 生体内のフラビン酵素が大部分 FADを補酵素とするものであり<sup>82)</sup>, また, 肝臓中のフラビンは大部分が FADとして存在し<sup>83)</sup>, エタノールを投与して場合には FADが顕著に減少するためと考えられる. しかし肝臓中の TBARS量の変動と, 肝障害のパラメーターである肝重量, 血清中のGOT及びGPT活性の変動との間に有意な相関性が認められなかったことから, 急性アルコール性肝障害の発生には, 肝臓中の脂質過酸化反応の亢進以外に他の要因が関与する可能性もあると思われる.

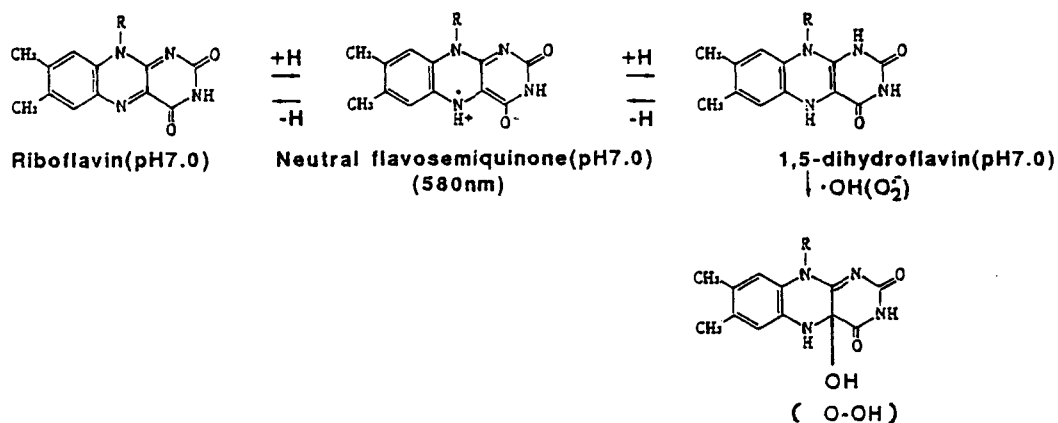


Fig.10. Tentative Mechanism of Riboflavin Scavenging Oxygen Radicals

## 実験の部

### 1 エタノールの投与によるパラメーターの変動

#### (1) 動物

ddY 系雄性マウス（東京実験動物）6週令を1群4匹として実験に使用した。1週間予備飼育後，0~60%のエタノール溶液それぞれ10 ml/kg (0~103.2 mmol/kg) を腹腔内に投与した。投与前6時間及び投与後は絶食し，投与後24時間目に採血後，屠殺して肝臓を摘出した。血液は常法<sup>84)</sup>に従って血清を分取し，肝臓はTaniguchiらの方法<sup>85)</sup>に従って肝サイトソール分画を分取して，それぞれ酵素標品とした。

#### (2) パラメーターの測定

肝臓中のTBARS量は Taniguchiらの方法<sup>85)</sup>に従って測定した。肝臓中のフラビン<sup>86)</sup>はYagiの方法<sup>86)</sup>に従って抽出し，HPLCで分離・定量した<sup>87)</sup>。肝臓中のGSH及びGSSG量は Hissinらの方法<sup>88)</sup>，SOD活性はニトロブルーテトラゾリウム還元法<sup>89,90)</sup>，catalase活性はBeersらの方法<sup>91)</sup>，GSH-Px活性はLawrenceらの方法<sup>92)</sup>，GR活性はPintoらの方法<sup>93)</sup>，G-6-PD活性はKornbergらの方法<sup>94)</sup>に従ってそれぞれ測定した。血清中の GOT及びGPT活性はいずれも測定キットを使用して測定した。試料中の蛋白質含量はLowryらの方法<sup>95)</sup>に従い，ウシ血清アルブミンを標準蛋白質として測定した。測定値は，student's t-testで検定した。

### 2 フラビン3型の抑制効果の比較

#### (1) 動物

ddY 系雄性マウス（東京実験動物）6週令を1群6匹として実験に使用した。RF，FMN及びFADはいずれも19 mM水溶液として調製した。1週間予備飼育後，I群及びIV群にはRF，II群及びV群にはFMN，III群及びVI群にはFADいずれも10 ml/kg (0.19 mmol/kg) を3日間連続して腹部皮下に投与し，最

終投与の 15分後に I 群, II 群及び III 群には生理食塩水 10 ml/kg, IV 群, V 群及び VI 群には 50% エタノール 10 ml/kg (86 mmol/kg) をそれぞれ腹腔内に投与した. 対照群にはフラビン類及びエタノールの代わりに, 生理食塩水をそれぞれ 10 ml/kg ずつ投与した. フラビン類の投与前 6 時間及びエタノールの投与後は絶食し, エタノールの投与後 24 時間目に採血後, 屠殺して肝臓を摘出した. 酵素標品の調製は 1 - (1) と同様に行った.

#### (2) パラメーターの測定

各パラメーターの測定は 1 - (2) と同様に行った.

### 3 フラビンアデニンジヌクレオチドの抑制効果の投与量依存性

#### (1) 動物

ddY 系雄性マウス (東京実験動物) 6 週令を 1 群 4 匹として実験に使用した. 1 週間予備飼育後, I 群及び IV 群 (low dose) には 9.5  $\mu\text{mol/kg}$ , II 群及び V 群 (medium dose) には 95  $\mu\text{mol/kg}$ , III 群及び VI 群 (high dose) には 190  $\mu\text{mol/kg}$  の FAD を, それぞれ 3 日間連続して腹部皮下に投与した. 投与容量はいずれも 0.2 ml/マウスとなるように調整した. 対照群及びエタノール単独投与群には, FAD の代わりに生理食塩水 0.2 ml を腹部皮下に投与した. 最終投与の 15 分後にエタノール単独投与群, IV 群, V 群及び VI 群に 50% エタノール 10 ml/kg (86.0 mmol/kg) を腹腔内に投与した. 対照群, I 群, II 群及び III 群にはエタノールの代わりに生理食塩水 0.2 ml を腹腔内に投与した. FAD の投与前 6 時間及びエタノールの投与後は絶食し, エタノールの投与後 24 時間目に採血後, 屠殺して肝臓を摘出した. 酵素標品の調製は 1 - (1) と同様に行った.

#### (2) パラメーターの測定

各パラメーターの測定は 1 - (2) と同様に行った. 肝ミトコンドリアの ATP 生成活性は, Chance らの方法<sup>9,6)</sup> に準じて以下のように測定した. 酸素を飽和にした等張緩衝液 (225 mM mannitol, 75 mM ショ糖, 10 mM KCl, 20



mM Tris-塩酸, 3 mM Tris-リン酸, 0.1 mM EDTA, 5 mM Tris-コハク酸, 5 mM Tris-グルタミン酸含有, pH 7.4) 1.0 ml を37°Cの温水を循環して保温した酸素電極用セルに入れ, 生理食塩水に懸濁したミトコンドリア0.2 mg protein を添加して, 4分間連続して溶存酸素の減少量を測定した. 4分後に ADP 5.85  $\mu$ molを添加し, さらに4分間連続して溶存酸素の減少量を測定して, ADP/O比を算出した.

#### 4 エタノールのin vitro代謝に伴う脂質過酸化反応に対するフラビンアデニンジヌクレオチドの抑制効果

##### (1) マウス肝マイクロゾーム分画の調製

ddY 系雄性マウス(東京実験動物)を普通飼料(オリエンタル酵母MF)で飼育し, 8週令時に断頭後, 肝臓を0.25 Mシヨ糖溶液で灌流して1 gを分取した. これに0.25 Mシヨ糖溶液 9 mlを加えてテフロンホモジナイザーで10% ホモジネートを作製し, 細胞分画法<sup>97)</sup>によりマイクロゾーム分画を分取した. マイクロゾーム分画の蛋白質含量はLowryらの方法<sup>95)</sup>に従って, ウシ血清アルブミンを標準蛋白質として測定した.

##### (2) 肝マイクロゾームの脂質過酸化反応<sup>98, 99)</sup>

0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)に, 硫酸第一鉄アンモニウム0.26  $\mu$ mol(終濃度0.26 mM), NADPH 1  $\mu$ mol, 及びマイクロゾーム分画0~400  $\mu$ g proteinを加えて全量 1.0 mlとし, 37°Cの水浴中で5分間インキュベーションした. 反応終了後, TBA・TCA・HCl 溶液(0.375%・15%・0.25 M) 2.0 mlを加えて反応を停止し, 2% BHT/エタノール溶液0.1 mlを加えたのち, 沸騰水浴中で15分間加熱した. 加熱終了後試験管を冷水に浸して室温まで冷却し, 室温下で1,000  $\times$ g, 10分間遠心分離した上清について, 535 nmの吸光度を測定してTBARSの生成量とした.

##### (3) 脂質過酸化反応に対するエタノールの添加の影響

マイクロゾーム分画の添加量を200  $\mu$ g proteinとした4-(2)の反応系に,

エタノール0~1.4  $\mu\text{mol}$  (終濃度 0~1.4 mM) をマイクロゾーム分画の添加前に添加して、4 - (2) の操作でTBARSの生成量を測定した。

#### (4) 脂質過酸化反応に対するラジカル捕捉剤の添加の影響

エタノールの添加量を1.05  $\mu\text{mol}$  (終濃度 1.05 mM) とした4 - (3) の反応系に、SOD 0~10 unit 又は catalase 0~15 unit をエタノールの添加前に添加して、4 - (2) の操作で TBARSの生成量を測定した。また、SOD 及びcatalaseの代わりに FAD 0~6.0 nmol (終濃度0~6.0  $\mu\text{M}$ ) をエタノールの添加前に添加して、同様に TBARSの生成量を測定した。ブランクとしてエタノールを添加しない反応系に SOD, catalase又は FADをそれぞれ段階的に添加して、同様にTBARSの生成量を測定した。

#### (5) 脂質過酸化反応に対するラジカル捕捉剤とフラビン類の抑制効果の比較

4 - (4) の反応系に、ラジカル捕捉剤としてFAD, RF, FMN, B<sub>2</sub>-But, 尿酸, mannitol 又はアジ化ナトリウムをそれぞれ 6.0  $\mu\text{M}$ , SOD 5 unit 又は catalase 15 unitをいずれもエタノールの添加前に添加して、4 - (2) の操作でTBARSの生成量を測定した。

#### (6) PNDMA法<sup>100, 101)</sup>によるHO $\cdot$ の測定

0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) に EDTA 0.3  $\mu\text{mol}$  及び過酸化水素0~0.1  $\mu\text{mol}$ を加え、全量2.3 mlに調整して攪拌し、37°Cに保った分光光度計の恒温セルホルダーに入れ、0.05%硫酸第一鉄アンモニウム溶液 100  $\mu\text{l}$ 及び 0.15 mg/ml PNDMA溶液100  $\mu\text{l}$  (=0.1  $\mu\text{mol}$ ) を加えて全量 2.5 mlとし、440 nmにおける吸光度の減少を60秒間連続的に測定した。

#### (7) PNDMA法に対するFADの添加の影響

過酸化水素の添加量を0.1  $\mu\text{mol}$ とした4 - (5) の反応系に、FAD 0~0.6  $\mu\text{mol}$  を過酸化水素の添加前に添加して、440 nmにおける吸光度の減少を測定した。ブランクとして、過酸化水素のかわりに蒸留水を添加した反応系に FAD 0~0.6  $\mu\text{mol}$ を添加し、440 nmにおける吸光度を測定した。

#### (8) HO $\cdot$ との反応によるFADの分解の測定

0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) にEDTA 0.3  $\mu$ mol及びFAD 0.6  $\mu$ molを加え、全量2.3 mlに調整して攪拌後、37°Cに保った分光光度計の恒温セルホルダーに入れ、0.017%過酸化水素 0~100  $\mu$ l (0~0.5  $\mu$ mol) 及び0.05%硫酸第一鉄アンモニウム溶液100  $\mu$ lを加えて全量2.5 mlとし、448 nmにおける吸光度の減少を2分間連続的に測定した。

#### 5 試薬・機器

RF, B<sub>2</sub>-But, PNDMA, ウシ血清アルブミンは東京化成工業製, デオキシコール酸, xanthine, xanthine oxidase, グルコース 6-リン酸, catalase, GR, SOD, ADP はSigma社製, NADPH, NADP はオリエンタル酵母工業製, 過酸化水素は三菱瓦斯化学製, その他の試薬は和光純薬工業製をそれぞれ使用した。また, 分光光度計は日立U-2000型, 蛍光光度計は日立 203型, 生化学用溶存酸素測定装置は飯島電子工業MD-1000型, HPLC は日立D-6000型ポンプ, 日立D-4000型検出器, 日立D-2500型データ処理装置を, それぞれ使用した。HPLCカラムは日本クロマト工業製Diasil/5C<sub>18</sub>を使用した。

## 第2章 トリクロロ酢酸のin vitroでの代謝に伴う脂質過酸化反応 に対するリボフラビン誘導体の抑制効果

有機ハロゲン化合物の TCEは、不燃性の溶剤として油脂の抽出、金属部品などの脱脂洗浄、コーヒーの脱カフェイン、印刷インキやラッカーの希釈等に広く使用されている<sup>102), 103)</sup>が、酩酊や麻酔、粘膜刺激作用等の急性毒性や、経口投与による B6C 3F1マウスでの肝臓癌の発生<sup>104)</sup>等が認められており、近年、地下水や井戸水などへの汚染が進行したことなどから、環境汚染物質として注目されている<sup>105)</sup>。経気道的及び経皮的に体内に侵入した有機溶剤は、一部分は未変化体のまま呼気中に排出されるが、他は主として肝臓で、主に酸化代謝を受けて尿中に代謝物として排出される。一般に有機溶剤の体内での蓄積は、その高脂溶性から脂肪組織で最も大きく、TCE の尿中代謝物濃度の減少速度から算出された生物学的半減期は約41時間と、芳香族溶剤や他の塩素系溶剤に比べて顕著に長い<sup>103)</sup>。TCE は強い肝毒性を示すが、その毒性発現機構に脂質過酸化反応の関与することが検討されており<sup>106)</sup>、Fig.1]に示したように、Larsonら<sup>107), 108)</sup>はTCEが肝臓のチトクロームP-450系で代謝された結果、トリクロロ酢酸 (TCA) からジクロロ酢酸 (DCA) を経て DCAラジカル及びそのペルオキシラジカルとなり、これらのフリーラジカルが脂質過酸化反応を誘導すると述べている。

本章では、TCEの投与による肝障害の発生に対する脂質過酸化反応の関与、及びこれに対するフラビン類の抑制効果を検討する目的で、肝ミクロゾームでのTCAのin vitroでの代謝に伴う脂質過酸化反応及び非酵素的なDCAラジカルの生成反応に対する、ラジカル捕捉剤及びリボフラビン誘導体の抑制効果から、TCA の代謝に伴う脂質過酸化反応の亢進の機構、及び FADによる抑制効果とその機構を検討した<sup>109)</sup>。

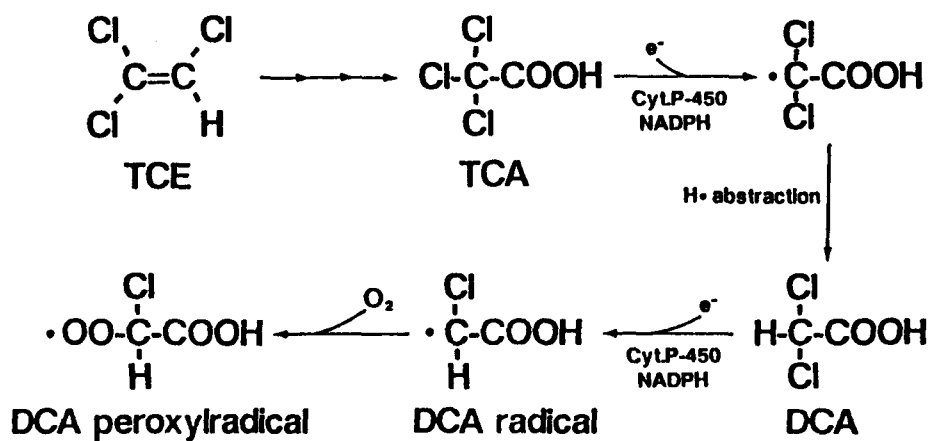


Fig.11. Metabolic Scheme of TCE<sup>107, 108)</sup>

## 第1節 ミクロゾームの脂質過酸化反応に及ぼすTCAの添加の影響

肝ミクロゾームによる *in vitro*での脂質過酸化反応は、溶存酸素の減少速度が、TCAの添加量が 40  $\mu\text{M}$ までは添加量に対応して増大した。一方、加熱処理したミクロゾームを使用した反応系では、溶存酸素の減少は認められなかった (Fig.12)。

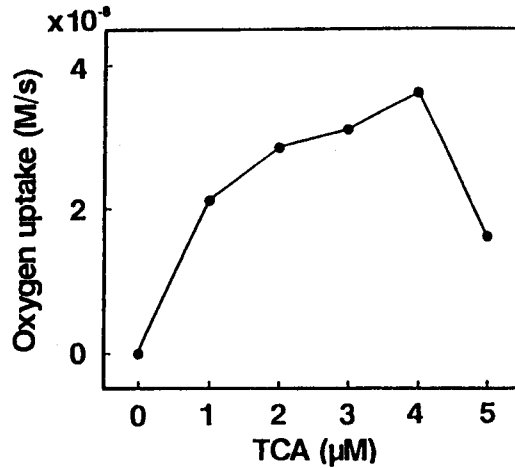


Fig.12. Changes of Oxygen Uptake by the Metabolism of TCA in Microsome

Reaction mixture contained 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 26.6  $\mu\text{M}$  of ferrous ammonium sulfate, 1.0  $\mu\text{mol}$  of NADPH, 0~50  $\mu\text{M}$  of TCA and 200  $\mu\text{g}$  of microsomal protein. Final volume was 1.0 ml.

## 第2節 脂質過酸化反応に対するラジカル捕捉剤及びリポフラビン誘導体の添加の影響

TCAの添加量を 30 mMとした第1節の脂質過酸化反応系では、溶存酸素の減少速度は、mannitol, 尿酸, FAD及びB<sub>2</sub>-Butそれぞれ6 μMまでの添加では、いずれの場合も添加量に対応して顕著に抑制されたが、RF 6 μMまでの添加ではほとんど抑制されなかった (Fig.13) .

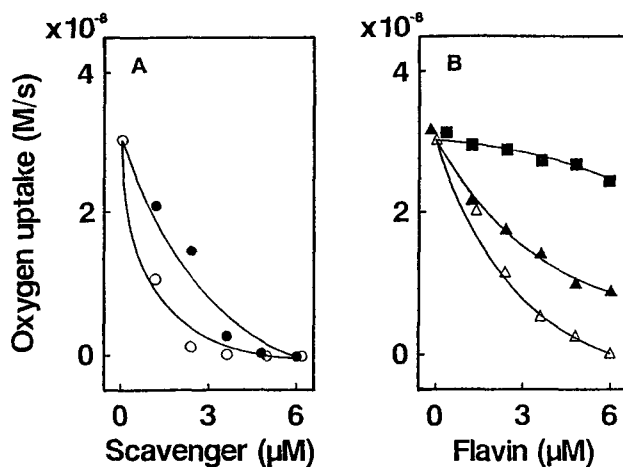


Fig.13. Inhibitory Effects of Radical Scavengers and Flavins on the Lipid Peroxidation by the Metabolism of TCA

Reaction mixture contained 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 26.0 μM of ferrous ammonium sulfate, 1.0 μmol of NADPH, 200 μg of microsomal protein and 0~6 μM of uric acid(○), mannitol(●), B<sub>2</sub>-But(△), FAD(▲) or RF(■). Final volume was 1.0 ml.

### 第3節 脂質過酸化反応に対する活性酸素消去酵素の添加の影響

TCAの添加量を 30  $\mu\text{M}$ とした第1節の脂質過酸化反応系では、溶存酸素の減少速度は、SOD 10 unit及びcatalase 100 unitまでの添加では、いずれの場合もほとんど抑制されなかった (Fig.14) .

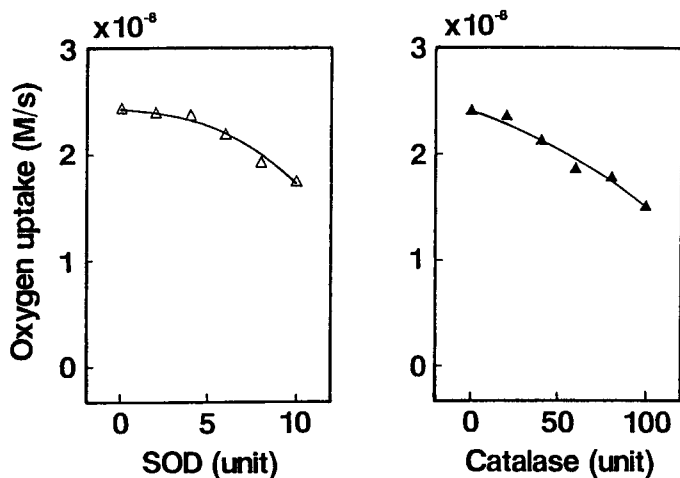


Fig.14. Inhibitory Effects of SOD and Catalase on the Lipid Peroxidation by the Metabolism of TCA

Reaction mixture contained 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 26.6  $\mu\text{M}$  of ferrous ammonium sulfate, 1.0  $\mu\text{mol}$  of NADPH, 0~50  $\mu\text{M}$  of TCA, 200  $\mu\text{g}$  of microsomal protein and 0~10 unit of SOD( $\Delta$ ) or 0~100 unit of catalase( $\blacktriangle$ ). Final volume was 1.0 ml.



#### 第4節 DCAの非酵素的ラジカル化反応

ラジカル開始剤AAPHを用いた DCAの非酵素的なラジカル化反応では、酸素吸収速度は、AAPHの添加量が50  $\mu\text{M}$ までは添加量に対応して増大した (Fig. 15) .

AAPHの添加量を50  $\mu\text{M}$ とした DCAの非酵素的なラジカル化反応では、酸素吸収速度はmannitol及び尿酸それぞれ 6  $\mu\text{M}$ までの添加では、いずれも添加量に対応して顕著に低下した (Fig.16,A) . また、FAD及び B<sub>2</sub>-Butそれぞれ 6  $\mu\text{M}$ までの添加でも、いずれも添加量に対応して顕著に低下したが、RF 6  $\mu\text{M}$ までの添加ではほとんど低下は認められなかった (Fig.16,B) .

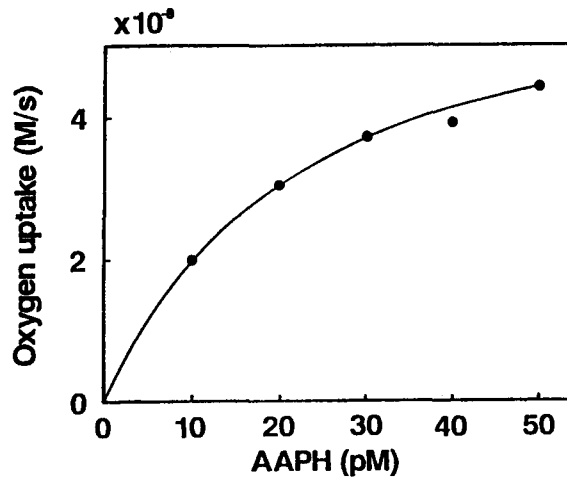


Fig.15. Increase of Oxygen Uptake by the Addition of AAPH

Reaction mixture contained 1 nM DCA in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) and 0~50 pM of AAPH.

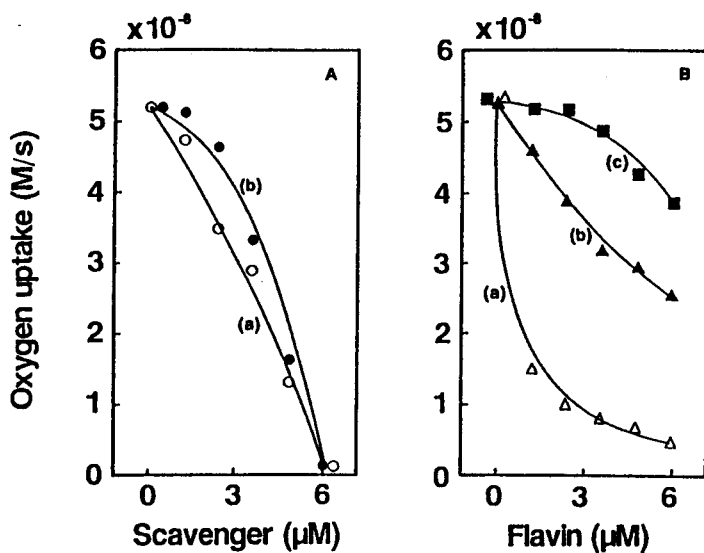


Fig.16. Inhibitory Effects of Radical Scavengers and Flavins on the Non-enzymic DCA Radical Production

Reaction mixture contained 1 nM DCA in 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 50  $\mu\text{M}$  of AAPH and 0~6  $\mu\text{M}$  of uric acid( $\circ$ ), mannitol ( $\bullet$ ), B<sub>2</sub>-But( $\triangle$ ), FAD( $\blacktriangle$ ) or RF( $\blacksquare$ ). Final volume was 1.0 ml.

## 第5節 本章のまとめ

TCEの代謝に伴う脂質過酸化反応の亢進とその機構、及びこれに対するRF誘導体の抑制効果とその機構について、酸素電極を用いたin vitroの実験を行って検討した。

第1節では、肝ミクロゾームでのTCAの代謝に伴う脂質過酸化反応がTCAの添加量に対応して増加したことから、TCEによる脂質過酸化反応はFig.11に示したLarsonらの説<sup>107, 108)</sup>に従うことが認められた。

第2節では、肝ミクロゾームでのTCAの代謝に伴う脂質過酸化反応がラジカル捕捉剤のmannitol及び尿酸の添加で抑制されたことから、この脂質過酸化反応に対するラジカル反応の関与が認められた。また、この脂質過酸化反応が脂溶性及び水溶性のリボフラビン誘導体で抑制され、RFではほとんど抑制されなかったことから、フラビン類による抑制効果には、生成したフリーラジカルとの親和性が大きく関与することが認められた。従って、FADとの親和性が大きいと考えられるDCAラジカルがTCAの代謝に伴って生成し、脂質過酸化反応に寄与したと考えられた。また、最も顕著な抑制効果を示したB<sub>2</sub>-Butは、DCAラジカルやDCAペルオキシラジカルとともに、脂質過酸化ラジカルを捕捉して抑制効果を示したと考えられた。さらにB<sub>2</sub>-Butは脂溶性であるため、ミクロゾーム膜を透過してフリーラジカルを捕捉した可能性もあると考えられた。

第3節では、TCAの代謝に伴う脂質過酸化反応が、活性酸素の分解・消去酵素であるSOD及びcatalaseの添加では、ラジカル捕捉剤に比べてわずかしこ抑制されなかったことから、この脂質過酸化反応には活性酸素はほとんど関与しないことが認められた。

第4節では、水溶性ラジカル開始剤のAAPHによる非酵素的なDCAラジカルの生成反応で、AAPHの添加量に対応して酸素吸収速度が加速したことから、カーボンセンターラジカルであるDCAラジカルが生成した場合、すみやかに

反応系中の酸素分子と反応して DCAペルオキシラジカルを生成することが認められた。また、酸素吸収速度がmannitol又は尿酸の添加量に対応して低下したことから、これらのラジカル捕捉剤はいずれも DCAラジカルを捕捉して脂質過酸化反応を抑制したことが認められた。さらに、フラビン類の添加量に対応して酸素吸収速度の低下が認められたことから、フラビン類もラジカル捕捉剤と同様に DCAラジカルを捕捉して、脂質過酸化反応を抑制したことが認められた。B<sub>2</sub>-Butが最も大きな抑制効果を示したのは、DCAラジカルとの親和性が最も大きいためであり、さらに脂溶性であるためミクロゾーム膜内への透過性が他のフラビン類に比べて最も大きいためと考えられた。

以上のことから、TCEは代謝されてTCAとなるが、さらにTCAが代謝された結果DCAラジカルやDCAペルオキシラジカル等のフリーラジカルを生成し<sup>107)</sup><sup>108)</sup>、脂質過酸化反応を亢進して、肝障害を発生すると考えられる。これに対して、リポフラビン誘導体、特に脂溶性フラビンのB<sub>2</sub>-Butは膜透過性が大きく、DCAラジカルを捕捉して脂質過酸化反応の開始を抑制するとともに、過酸化脂質ラジカルを捕捉してラジカル連鎖反応を抑制し、脂質過酸化反応のpropagationを抑制することにより、脂質過酸化反応の亢進に起因するTCEの肝障害の発生を抑制する可能性があると考えられる。

## 実験の部

### 1 マウスの肝ミクロゾーム分画の調製

ddy 系雄性マウス（東京実験動物）を普通飼料（オリエンタル酵母MF）で飼育した。8週令時に生理食塩水で肝臓を灌流後摘出して1gを分取し、0.25 Mシヨ糖溶液 9 mlを加えて10%ホモジネートを作成した。これを0°Cで9,000 ×g, 20分間遠心分離した上清を分取し、さらに0°Cで105,000 ×g, 60分間遠心分離して得たペレットを0.25 Mシヨ糖溶液 10 mlに懸濁後、再び0°Cで105,000 ×g, 60分間遠心分離した。得られたペレットを0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）に懸濁し、この懸濁液をマウス肝ミクロゾーム分画として実験に使用した。蛋白質含量はウシ血清アルブミンを標準蛋白質に用いて、Lowryらの方法<sup>95)</sup>に従って測定した。

### 2 肝ミクロゾームの脂質過酸化反応<sup>98,99)</sup>

37°Cの温水を循環して保温した酸素電極用セル（容量1 ml）に、酸素を飽和にした0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）、硫酸第一鉄アンモニウム 26.0 nmol（終濃度26.0 μM）、NADPH 1.0 μmol、TCA 0~50 nmol（終濃度0~50 μM）及びミクロゾーム分画 200 μg proteinを加えて全量1.0 mlとし、酸素電極を接続して、15分間連続して溶存酸素の減少量を測定した。ブランクとして、加熱処理（100°C, 10分間）したミクロゾーム分画を用いて、同様に溶存酸素の減少量を測定した。

### 3 脂質過酸化反応に対するラジカル捕捉剤及びフラビン類の添加の影響

TCAの添加量を30 μMとした2の反応系に、ミクロゾーム分画の添加前にmannitol, 尿酸, B<sub>2</sub>-But, FAD又はRF 0~6.0 μM, SOD 0~10 unit 又はcatalase 0~100 unitをそれぞれ段階的に添加して、2の操作で溶存酸素の減少量を測定した。ブランクとして、TCAを添加しない反応系に各ラジカル捕

捉剤又はフラビン類をそれぞれ段階的に添加して、同様に溶存酸素の減少量を測定した。

#### 4 ラジカル開始剤によるDCAの非酵素的なラジカル化反応

37°Cの温水を循環して保温した酸素電極用セル（容量1 ml）に、酸素を飽和した1 nM DCA/0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）1.0 mlを入れ、ラジカル開始剤としてAAPH  $0\sim 5\times 10^{-2}$  pmol（終濃度0~50 pM）を段階的に添加し、酸素電極を接続して、15分間連続して溶存酸素の減少量を測定した。

AAPHの添加量を50 pMとした上記の反応系に、3と同濃度になるように各ラジカル捕捉剤又はフラビン類を添加して、2の操作で溶存酸素の減少量を測定した。

#### 5 試薬・機器

TCA, DCA, AAPHは和光純薬工業製をそれぞれ使用した。その他の試薬及び機器は第1章と同様のものを使用した。

### 第3章 酸素電極法によるリポフラビンのラジカル捕捉活性の検討

生体に対する活性酸素・フリーラジカルの毒性発現機構のひとつとして、脂質過酸化反応を誘導することが知られている<sup>110)</sup>。一方、生体内での過酸化脂質の生成とそれに伴う脂肪肝の発生に対して、RFが抑制的に作用することが報告されている<sup>43) 111) 112)</sup>。RFが過酸化脂質ラジカルやフリーラジカルに対する捕捉活性を有する可能性が指摘されており<sup>42) 70-82) 113)</sup>、また、第1章及び第2章の結果からも、フラビン類の活性酸素や過酸化脂質との反応性が示唆されている。

第1章では補酵素型RFのFAD、第2章ではエステル型RFのB<sub>2</sub>-Butについて、それぞれの脂質過酸化反応に対する抑制効果とその機構を検討したが、本章ではフラビン3型のうち最も脂溶性が大きく、さらに側鎖が最も小さいことから、主に基本骨格であるイソアロキサジン環に由来すると考えられるフラビン類のラジカル捕捉活性を検討する目的でRFを使用し、水溶性及び脂溶性のラジカル開始剤によるミセル状リノール酸の*in vitro*での過酸化反応<sup>114) 115)</sup>に対する抑制効果を、酸素電極法による反応溶液中の溶存酸素の減少量から測定して検討し、さらに、抗酸化ビタミンとして脂質過酸化反応に対する抑制作用が知られている $\alpha$ -Tocのラジカル捕捉活性と比較した<sup>116-122)</sup>。

#### 第1節 水溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応に対するリポフラビンの抑制作用

##### 1 水溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応

密閉した反応系で、SDS でミセル化したリノール酸を水溶性ラジカル開始剤AAPHで過酸化した場合の溶存酸素の減少量は、リノール酸への酸素取り込み量に換算した場合、8分間で約0.06 mMであり、反応時間中は比例的に減

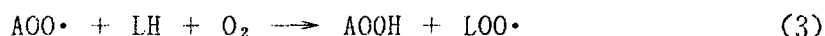
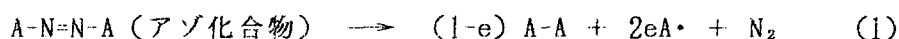
少した (Fig.17) .

## 2 リノール酸の過酸化反応に対するリポフラビンの添加の影響

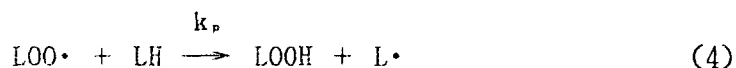
AAPHによるリノール酸の過酸化反応系にRFを段階的に添加した結果、溶存酸素の減少が抑制され、抑制期間はRFの添加量の増大に対応して比例的に増大した (Fig.18) . また、反応溶液中のRFは経時的に減少し、RFの消失に伴う抑制期間の終了及び過酸化反応の開始が認められた (Fig.17) . 抑制期間後の酸素吸収速度は、RFを添加しない場合とほぼ等しかった.

リノール酸 (LH) の過酸化反応は以下のように進行する.

連鎖開始反応 (initiation)

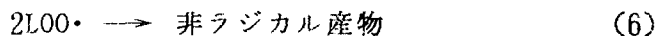


連鎖成長反応 (propagation)

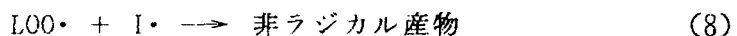
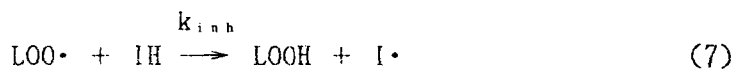


連鎖停止反応 (termination)

抗酸化剤がない場合



抗酸化剤 (IH) がある場合



実験結果から、抑制期間中の酸化速度 ( $R_{i,h}$ ) =  $1.1 \times 10^{-10}$  M/s, 連鎖開始反応速度 ( $R_i$ ) =  $1.7 \times 10^{-8}$  M/s, RFの連鎖停止速度定数 ( $k_{i,h}$ ) と連鎖成長速度定数 ( $k_p$ ) の比 ( $k_{i,h}/k_p$ ) =  $1.5 \times 10^3$  と求められ、リノール酸の  $k_p = 1.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  から<sup>44)</sup>,  $k_{i,h} = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と算出され



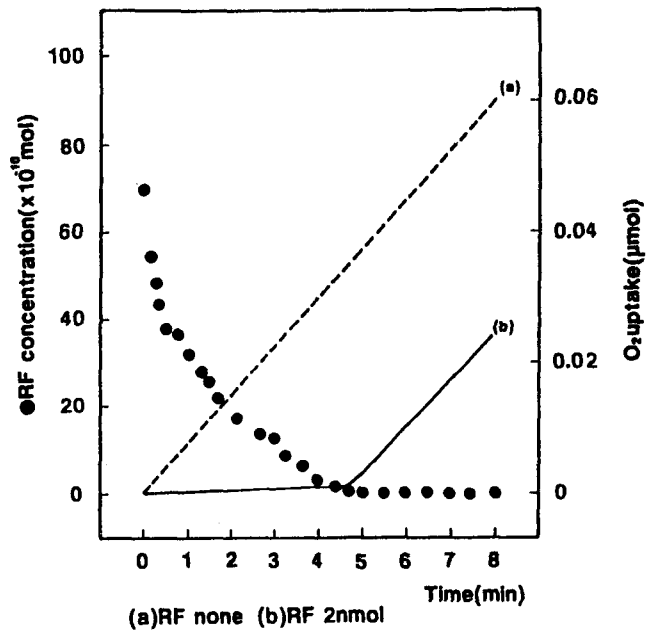


Fig.17. Rates of Oxygen Uptake and Riboflavin Decay in the Oxidation of Linoleic Acid with AAPH

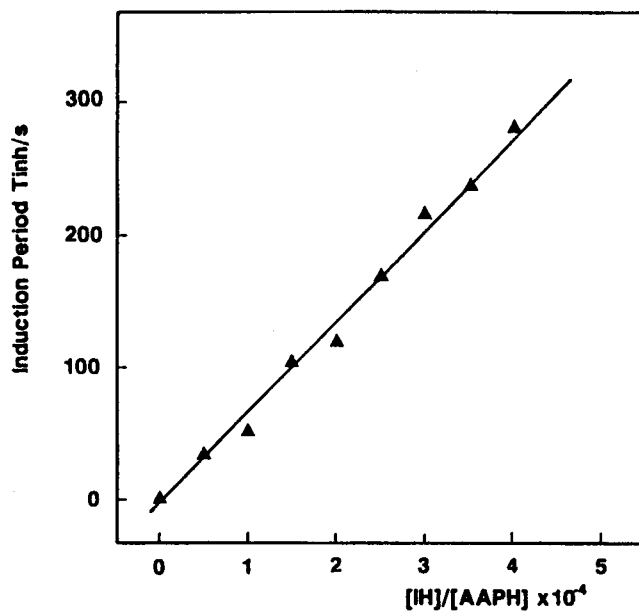


Fig.18. Plot of Induction Period against  $[IH] / [AAPH]$  in the Oxidation of Linoleic Acid Micelle in SDS Aqueous Dispersion

## 第2節 脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応に 対するリポフラビンの抑制作用

### 1 脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応

SDS でミセル化したリノール酸を脂溶性ラジカル開始剤AMVNで過酸化した場合の溶存酸素の減少量は、リノール酸への酸素取り込み量に換算した場合、8分間で約0.3 mMであり、反応時間中は比例的に進行した (Fig.19) .

### 2 リノール酸の過酸化反応に対するリポフラビンの添加の影響

AMVNによるリノール酸の過酸化反応系にRFを段階的に添加した結果、溶存酸素の減少が抑制され、抑制期間はRFの添加量の増大に対応して比例的に増大した (Fig.20) . また、反応溶液中のRFは経時的に減少し、RFの消失に伴う抑制期間の終了及び過酸化反応の開始が認められた (Fig.19) . 抑制期間後の酸素吸収速度は、RFを添加しない場合とほぼ等しかった。実験結果から、 $R_{i_{nh}} = 3.1 \times 10^{-10}$  M/s,  $R_i = 4.3 \times 10^{-9}$  M/s, RF の  $k_{i_{nh}}/k_p = 1.2 \times 10^3$

と求められ、SDS 溶液中のリノール酸の  $k_p = 1.0 \times 10^2$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>から<sup>44)</sup>,  $k_{i_{nh}} = 1.2 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>と算出された<sup>117, 118, 123)</sup> .

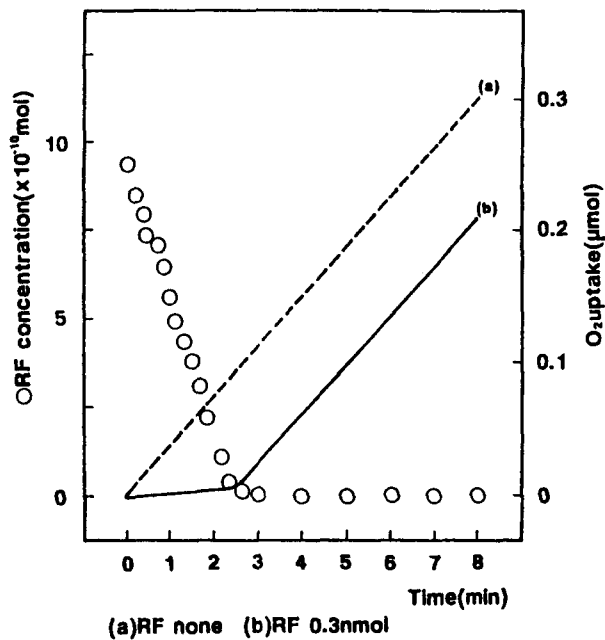


Fig.19. Rates of Oxygen Uptake and Riboflavin Decay in the Oxidation of Linoleic Acid with AMVN

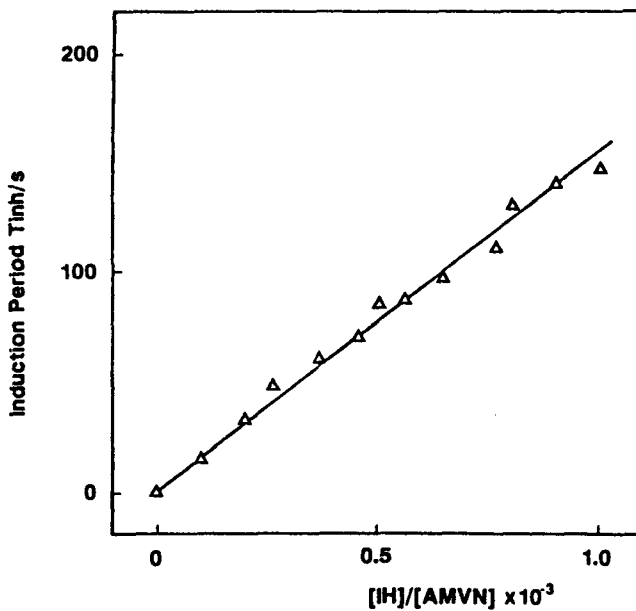


Fig.20. Plot of Induction Period against  $[\text{IH}] / [\text{AMVN}]$  in the Oxidation of Linoleic Acid Micelle in SDS Aqueous Dispersion

### 第3節 脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応に 対する $\alpha$ -トコフェロールの抑制作用

AMVNによるリノール酸の過酸化反応系に  $\alpha$ -Tocを段階的に添加した結果、  
 溶存酸素の減少が抑制され、抑制期間は  $\alpha$ -Tocの添加量の増大に対応して比  
 例的に増大した (Fig.21) . 実験結果から、 $R_{inh} = 2.8 \times 10^{-10}$  M/s,  $R_i =$   
 $1.0 \times 10^{-10}$  M/s,  $k_{inh}/k_p = 1.5 \times 10^3$  と求められ、 $k_{inh} = 1.5 \times 10^5$   
 $M^{-1}s^{-1}$ と算出された<sup>117, 118, 123</sup>).

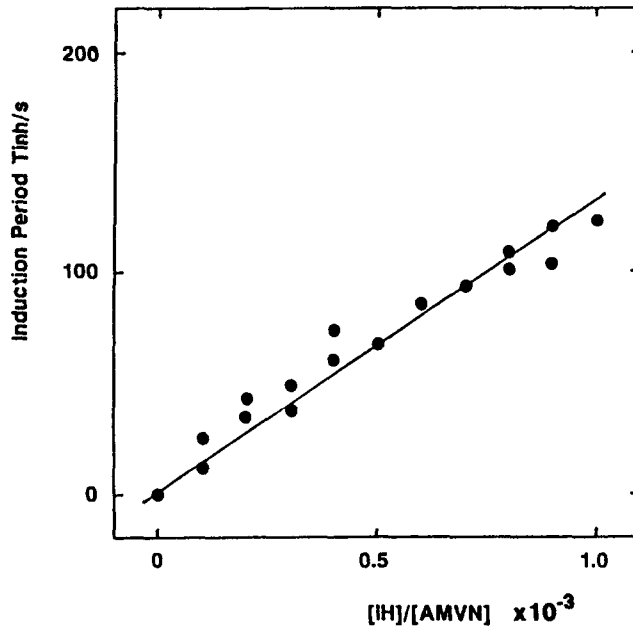


Fig.21. Plot of Induction Period against  $[IH] / [AMVN]$  in the Oxidation of Linoleic Acid Micelle in SDS Aqueous Dispersion

#### 第4節 本章のまとめ

フラビン類のラジカル捕捉活性を検討する目的で、フラビン3型中で最も脂溶性が大きく、さらに最も側鎖が小さいRFを使用して、主にその基本骨格部分に由来すると考えられるラジカル捕捉活性を、ラジカル開始剤によるミセル状リノール酸の *in vitro*での過酸化反応に対する抑制効果を酸素電極法で測定し、 $\alpha$ -Tocのラジカル捕捉活性と比較した。

第1節では、水溶性ラジカル開始剤AAPHを使用した場合のリノール酸の過酸化反応に対するRFの抑制効果、及びリノール酸ラジカルとの反応によるRFの消失が認められた。また、実験結果より求めた $R_{i, n, b}$ 及び $R_i$ から、連鎖停止速度定数 $k_p = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と算出された。

第2節では、脂溶性ラジカル開始剤AMVNを使用した場合のリノール酸の過酸化反応に対するRFの抑制効果、及びリノール酸ラジカルとの反応によるRFの消失が認められた。また、実験結果より求めた $R_{i, n, b}$ 及び $R_i$ から、連鎖停止速度定数 $k_p = 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と算出された。

第3節では、AMVNを使用した場合のリノール酸の過酸化反応に対する $\alpha$ -Tocの抑制効果の結果より求めた $R_{i, n, b}$ 及び $R_i$ から、連鎖速度定数 $k_p = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と算出された。

以上のように、反応溶液中のRFの消失と酸素吸収の抑制期間の終了がほぼ一致したことから、RFのラジカル捕捉活性が認められた<sup>116-121)</sup>。また、RFを添加した場合に、 $R_{i, n, b}$ 及び $k_{i, n, b}$ がいずれも $\alpha$ -Tocを添加した場合とほぼ等しかったことから、本実験条件下ではRFのラジカル捕捉活性は $\alpha$ -Tocと同程度であり、RF 1分子がperoxyl radical 2分子を捕捉したと考えられる<sup>118', 119', 123)</sup>。従って、化学物質の生体内での代謝に伴う脂質過酸化反応の亢進に対して、RFを含むフラビン類は、過酸化脂質ラジカルを捕捉して脂質過酸化反応の開始及び propagationを抑制し、脂質過酸化反応に起因する肝障害の発生を抑制することができると考えられる。また、第1章の *in vivo*の実

験で認められた脂質過酸化反応に伴うフラビン量の減少は、本章の実験結果から、フラビン類と過酸化脂質ラジカルとの反応による可能性があると考えられる<sup>77, 78, 111, 112</sup>。

## 実験の部

### 1 水溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応

in vitro でのリノール酸の過酸化反応はPryorらの方法<sup>114), 115)</sup>に従って以下のように行った。酸素を飽和した50 mM リノール酸溶液 (0.5 M SDS/0.05 Mリン酸緩衝液 pH 7.4) 1 mlを37°Cの温水を循環して保温した酸素電極用セル (容量1 ml) に入れ、マグネチックスターラーで攪拌した。これに0.5 M AAPH水溶液10  $\mu$ lを加えて、容器に接続した酸素電極で、8分間連続して溶存酸素の減少量を測定した。

### 2 リノール酸の過酸化反応に対するリポフラビンの添加の影響

1の反応系に、AAPHの添加前にRF (35  $\mu$ g/ml水溶液<sup>124)</sup>) 0~25  $\mu$ lを添加した後、0.5 M AAPH水溶液10  $\mu$ lを添加して、1の操作で8分間連続して溶存酸素の減少量を測定し、RFの抑制効果を測定した。

### 3 フリーラジカルとの反応によるリポフラビンの減少

分光光度計のセルにミセル状リノール酸3 mlを入れて37°Cの恒温セルホルダー中で攪拌し、RF (35  $\mu$ g/ml 水溶液<sup>124)</sup>) 75  $\mu$ l を添加した後、0.5 M AAPH水溶液30  $\mu$ lを添加して450 nmの吸光度の減少を8分間連続的に測定し、反応溶液中のRFの経時的な減少量を測定した。

### 4 脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応

1の実験条件でAAPHの代わりに30 mM AMVN/メタノール溶液 10  $\mu$ lを添加して、同様に溶存酸素の減少量を測定した。

### 5 リノール酸の過酸化反応に対するリポフラビン及び $\alpha$ -トコフェロールの添加の影響



4の条件で、AMVNの添加前にRF (3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液<sup>124)</sup>) 0~40  $\mu\text{l}$  を添加して、同様にRFの抑制効果を測定した。また、RFの代わりに6  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Toc/エタノール溶液0~50  $\mu\text{l}$ を添加して同様に操作を行い、 $\alpha$ -Tocの抑制効果を測定した。

## 6 フリーラジカルとの反応によるリボフラビンの減少

分光光度計のセルにミセル状リノール酸 3 mlを入れて 37°Cの恒温セルホルダー中で攪拌し、RF (3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  水溶液<sup>124)</sup>) 120  $\mu\text{l}$  を添加した後、30 mM AMVN溶液30  $\mu\text{l}$ を添加して 450 nmの吸光度の減少を8分間連続的に測定し、反応溶液中のRFの経時的な減少量を測定した。

## 7 計算方法<sup>123)</sup>

抑制期間の長さ ( $t_{i_{n,h}}$ ) は (1) 式で与えられ、 $n$  は抗酸化剤 IH が捕捉するラジカル数、 $R_i$ は連鎖開始速度を示す。

$$t_{i_{n,h}} = n [\text{IH}] / R_i \quad (1)$$

また、抑制期間中の酸化速度 ( $R_{i_{n,h}}$ ) は (2) 式で与えられ、(1) 式と (2) 式より (3) 式が得られる。

$$R_{i_{n,h}} = k_p [\text{LH}] R_i / n k_{i_{n,h}} [\text{IH}] \quad (2)$$

$$k_{i_{n,h}} / k_p = [\text{LH}] / t_{i_{n,h}} R_{i_{n,h}} \quad (3)$$

(3) 式に基質濃度  $[\text{LH}]$  , 及びチャートより求めた  $t_{i_{n,h}}$ 及び $R_{i_{n,h}}$ を代入して、 $k_{i_{n,h}}/k_p$ を算出した。さらに、既知の $k_p$ を用いて、RF の連鎖停止速度定数 ( $k_{i_{n,h}}$ ) を算出した。

## 8 試薬・機器

RFは東京化成工業製、その他の試薬は和光純薬工業製をそれぞれ使用した。また、生化学用溶存酸素測定装置は飯島電子工業 MD-1000型、分光光度計は日立U-2000型をそれぞれ使用した。

## 第4章 チオバルビツール酸反応性物質の生成に対する リポフラビンの抑制効果

生体内での過酸化脂質の生成とこれに伴う脂肪肝の発生に対して、フラビン類が抑制的に作用することが報告されており、その作用機構は、過酸化脂質の分解に関与する酵素活性の低下の抑制、及び直接的な過酸化脂質との反応による過酸化脂質の分解・減少と考えられている<sup>41-44, 72-82, 112, 113</sup>。チオバルビツール酸 (TBA) は過酸化脂質, malondialdehyde (MDA), alkenal及び alkadienal等と非特異的に反応することが知られているが、簡便で特別な装置の必要がなく、感度が良い等の理由から、生体内の過酸化脂質量の指標としては、一般的にチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 値が用いられている<sup>126</sup>。

本章では、過酸化物との反応により TBARSを生成する *in vitro* 反応系<sup>127</sup> にRFを添加した場合の、TBARSの生成に対する抑制効果について検討した。反応溶液中のTBARSはTBA法<sup>85</sup>で定量し、過酸化物との反応による反応溶液中のRF量の減少は、RFをルミフラビン蛍光法<sup>79</sup>で定量して検討した<sup>128</sup>。

### 第1節 チオバルビツール酸反応性物質の生成反応に対する リポフラビンの添加の影響

2,4-Hexadienalと *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) との反応によるTBARSの生成は、*t*-BuOOH 0.1  $\mu\text{g}$  (=1 nmol) までの添加では、添加量に対応して増大した (Fig.22)。このTBARSの生成は、RF 6 nmol までの添加では、添加量に対応して抑制された (Fig.23)。

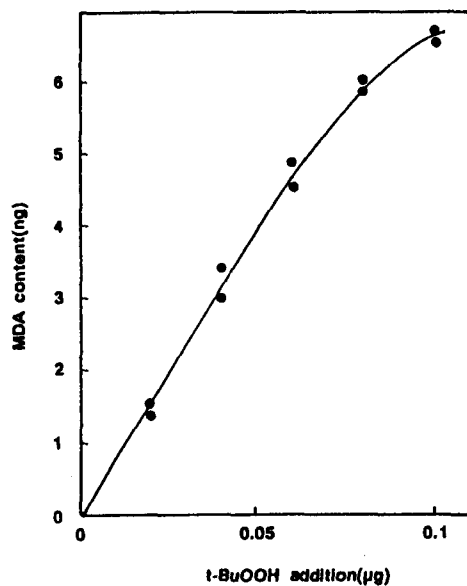


Fig.22. TBARS Formation by the Reaction with 2,4-Hexadienal and t-Butyl Hydroperoxide

Reaction mixture contained 25 μg of 2,4-hexadienal and 0~0.1 nmol of t-BuOOH.

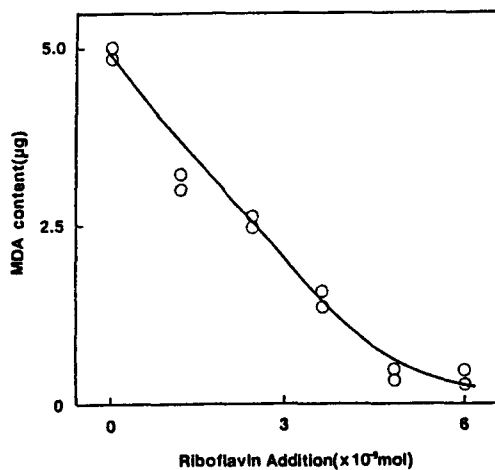


Fig.23. Reduction of the TBARS Formation by the Addition of Riboflavin

Reaction mixture contained 0.5 nmol of t-BuOOH, 25 μg of 2,4-hexadienal and 0~6 nmol of RF.

## 第2節 t-Butyl Hydroperoxideの添加による反応溶液中の リボフラビンの減少

2,4-Hexadienalとt-BuOOHとの反応における反応溶液中のRF量は、t-BuOOH 0.2 nmolまでの添加では、添加量に対応して減少した (Fig.24) .

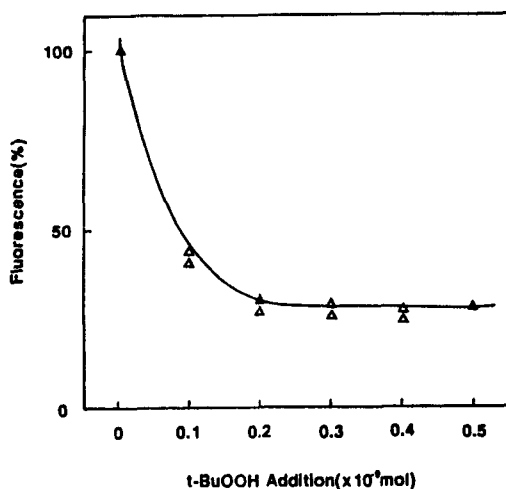


Fig.24. Reduction of Riboflavin by the Addition of t-Butyl Hydroperoxide

Reaction mixture contained 25  $\mu$ g of 2,4-hexadienal, 6 nmol of RF and 0~0.5 nmol of t-BuOOH.

### 第3節 本章のまとめ

脂質過酸化反応に対するRFの抑制機構を検討する目的で、2,4-Hexadienalとt-BuOOHとの反応によるin vitroでのTBARSの生成に対するRFの抑制効果、及び反応に伴うRFの減少を測定した。RFは前章と同様に、フラビン3型中で最も脂溶性が大きく、また側鎖が最も小さいことから、基本骨格部分に由来する抗酸化作用を検討する目的で使用した。

第1節では、2,4-hexadienalとt-BuOOHとの反応によるTBARSの生成が、t-BuOOHの添加量に対応すること、及びこのTBARSの生成がRFの添加量に対応して抑制されることが認められた。

第2節では、TBARSの生成に伴う反応溶液中のRFの減少が認められた。

以上のことから、RFは過酸化脂質等の活性酸素種との直接的な反応の結果、自身の分解を伴って活性酸素種を捕捉・消去することにより<sup>41, 72-76, 79</sup>、活性酸素種による脂質過酸化反応<sup>58</sup>、蛋白質の変性<sup>129</sup>、核酸の損傷<sup>130</sup>等に由来する毒性の発現を抑制することができると考えられる。

また、活性酸素との反応によるRFの減少により、RF欠乏症が誘導される可能性があり<sup>131, 132</sup>、従って活性酸素に由来する組織障害や疾患の発生に対して、RFの投与により、症状の改善をはかれる可能性が示唆された<sup>132</sup>。

## 実験の部

### 1 in vitro反応系のTBARS生成反応<sup>1,27)</sup>

2,4-Hexadienal (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  エタノール溶液) 1 ml に t-BuOOH (0~2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  エタノール溶液) 50  $\mu\text{l}$  及び n-ブタノール 1 ml を加え、沸騰水浴中で30分間加熱した。反応終了後ただちに水冷し、エタノールを加えて全量2 ml に調整した後、0.67% TBA溶液 1 ml を加えて沸騰水浴中で30分間加熱した。加熱終了後ただちに水冷し、535 nm における吸光度を測定して検量線を作成した。

### 2 TBARS生成反応に対するRFの添加の影響

t-BuOOH の添加量を 0.05  $\mu\text{g}$  (=0.5 nmol) とした1の反応系に、RF (0~0.24  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  n-ブタノール溶液) 25  $\mu\text{l}$  を添加して、TBARS の生成量を測定した。

### 3 t-BuOOHによる反応溶液中のRFの減少の測定<sup>8,5)</sup>

2,4-Hexadienal (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  エタノール溶液) 1 ml に RF (0.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  n-ブタノール溶液) 25  $\mu\text{l}$  及び t-BuOOH (0~1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  エタノール溶液) 50  $\mu\text{l}$  を加え、沸騰水浴中で 30分間加熱したのち直ちに水冷した。反応溶液に1 N NaOH 2 ml を加えて室温下で60分間蛍光灯を照射したのち、酢酸0.2 ml 及びクロロホルム5 ml を加えて振とう抽出し、室温下で 2,000 rpm, 10分間遠心分離したのち水層をアスピレーターで除去したクロロホルム層について、無水硫酸ナトリウムで脱水後、蛍光光度計で励起波長430 nm, 蛍光波長530 nm における蛍光強度を測定した。

## 4 試薬・機器

2,4-Hexadienalは東京化成工業製、t-BuOOH, 1,1,3,3-tetraethoxypropa-

neはSigma社製，その他の試薬は和光純薬工業製をそれぞれ使用した．また，分光光度計は日立U-2000型，蛍光光度計は日立203型をそれぞれ使用した．

## 結 論

本論文で、著者は以下の知見を得た。

第1章では、急性アルコール性肝障害の発生機構のひとつに、エタノールの代謝に伴う活性酸素・フリーラジカルの生成、及び活性酸素種の分解・消去に関与する酵素活性の低下による脂質過酸化反応の亢進、及び肝臓中のフラビン量の減少による肝ミトコンドリアのATP生成活性の低下の関与が認められた。この脂質過酸化反応の亢進及びATP生成活性の低下に由来する肝障害の発生は、フラビン類、特にFADのエタノールとの併用投与により、投与量に依存的に抑制され、FADの抑制作用が認められた。このFADによる抑制作用の機構として、フラビン類の補給による肝ミトコンドリアのATP生成活性の低下の抑制により、抗酸化酵素活性の低下を抑制した結果、細胞内の活性酸素濃度の上昇を抑制して、脂質過酸化反応を抑制することが示唆された。さらに、FADの脂質過酸化反応に対する抑制機構には、エタノールの代謝に伴って生成した活性酸素ラジカルに対するFADの捕捉作用も寄与すると考えられる。

第2章では、TCEによる肝障害の発生機構のひとつに、TCAの代謝に伴うフリーラジカルの生成による脂質過酸化反応の亢進が関与する可能性が認められた。また、この脂質過酸化反応の機構として、TCEの代謝物であるTCAがさらに代謝された結果、DCAラジカル及びDCAペルオキシラジカルを生成することが示唆された。さらに、このin vitroでの脂質過酸化反応がラジカルスカベンジャー及びリボフラビン誘導体の添加により、DCAラジカルが捕捉された結果抑制されたことから、TCEの肝障害に対するリボフラビン誘導体の抑制効果の可能性が示唆された。

第3章では、in vitro反応系で、水溶性及び脂溶性ラジカル開始剤によるリノール酸の過酸化反応に対するRFの抑制効果から、それぞれの場合の脂質過酸化連鎖反応に対するRFの連鎖停止速度定数が求められた。また、RFのラ



ラジカル捕捉活性は、ラジカル捕捉活性が既知である  $\alpha$ -Toc とほぼ等しく、RF 1 分子がペルオキシラジカル 2 分子を捕捉することが認められた。さらに、ラジカルの捕捉に伴う RF の減少から、in vivo 系での肝臓中のフラビン量の減少機構との関係が示唆された。

第 4 章では、RF が活性酸素種と直接的に反応した結果、脂質過酸化反応を抑制する機構が示唆された。また、過酸化物との反応による RF の減少から、in vivo での脂質過酸化反応に伴う肝臓中のフラビン量の減少機構が示唆された。

ヒトを取り巻く環境中にはさまざまな化学物質が存在し、そのうち、ヒトの体内でその代謝に伴って活性酸素・フリーラジカルを生成して肝障害を誘導するものがある。肝臓は生体にとって重要な臓器であり、肝機能の低下は生体の恒常性を大きく乱し、最終的に死に至る場合もある。活性酸素・フリーラジカルによる肝障害の多くは脂質過酸化反応に由来するが、近年、脂質過酸化反応と種々の疾患との関係が明らかになりつつあり、過酸化脂質を含む活性酸素・フリーラジカルについては、今後さらに in vitro 及び in vivo での検討が進むと思われる。また、環境中の化学物質、特に環境汚染物質の毒性発現機構と活性酸素・フリーラジカルとの関係は、化学物質の安全性を考える上で重要な要因であり、その障害性が比較的短時間で発現することから、今後、種々の環境汚染物質について検討していく必要があると思われる。本論文ではエタノール及び TCE について検討したが、エタノールはヒトが摂取する機会の多い化学物質であり、また、習慣性があることなど、多くの問題もある。また、TCE は環境汚染物質として、近年注目されている物質であり、有機塩素化合物であることから、オゾン層の破壊等、地球環境問題との関連も注目されている。一方、ビタミン類は従来から栄養素として認識されていたが、生体内ではその補酵素的役割以外に、生体機能の恒常性に重要な役割を持つことが認められつつある。RF 及びその誘導体である FMN、FAD は、

従来から活性酸素種との反応性がin vitroで認められていたが，本論文でエタノール及び TCEの代謝に伴う脂質過酸化反応の亢進による薬剤性肝障害の発生に対する抑制効果とその機構，及びRFのラジカル捕捉活性が認められた。さらに今後は，補酵素型RF及びエステル型RFのラジカル捕捉活性についてRFと比較し，側鎖等がラジカル捕捉活性に及ぼす影響について検討する必要があると考えている。フラビン類は水溶性ビタミンであり，生体への過剰の蓄積による過剰症の懸念がないことから，本論文で認められたRFのラジカル捕捉活性により，今後，活性酸素や過酸化脂質に起因する疾患の予防や症状の改善に使用することが期待できると考えられる。

## 謝 辞

本研究に対し御指導，御鞭撻を賜った星薬科大学衛生化学教室教授 河内佐十博士に深く感謝致します。

また，本研究の遂行にあたり終始御協力を頂いた星薬科大学衛生化学教室の諸氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) 早石 修, “酸素と生命,” 東京大学出版会, 東京, 1984, pp.1-43.
- 2) 妹尾左知丸, “活性酸素と病態,” 井上正康編著, 学会出版センター, 東京, 1992, pp.3-13.
- 3) “スーパーオキシド-化学・生物学・医学-,” 中野 稔, 松浦輝男, 二木鋭雄, 吉川敏一編, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp.47-57.
- 4) 井上正康, “活性酸素と病態,” 井上正康編著, 学会出版センター, 東京, 1992, pp.15-35.
- 5) 大柳善彦, “SODと活性酸素調節剤-その薬理作用と臨床応用-,” 日本医学館, 東京, 1989, pp.3-6.
- 6) J.M.McCord, I.Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969) .
- 7) H.W.Strobel, M.J.Coon, *J. Biol. Chem.*, **246**, 7827 (1971) .
- 8) S.Yoshimoto, T.Yoshimoto, E.Tsubura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 779 (1982) .
- 9) B.M.Babior, R.S.Kipnes, J.T.Curnutte, *J. Clin. Invest.*, **52**, 741 (1973) .
- 10) S.J.Klebanoff, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 571 (1969) .
- 11) J.V.Bannister, P.J.Thornalley, *FEBS Letts.*, **157**, 170 (1983) .
- 12) P.J.Thornalley, N.J.F.Dodd, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 669 (1985) .
- 13) 大柳善彦, “SODと活性酸素調節剤-その薬理作用と臨床応用-,” 日本医学館, 東京, 1989, pp.34-36.
- 14) B.Halliwell, *Am. J. Med.*, **91**, suppl.3C-14S (1991) .
- 15) M.M.Dooley, W.A.Pryor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 981 (1982) .
- 16) W.A.Pryor, M.M.Dooley, D.F.Church, *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, **122**, 676 (1984) .
- 17) 吉川敏一, 谷川 徹, 近藤元治, 活性酸素・フリーラジカル, **3**, 163 (1992) .
  - 18) S.M.Klein, G.Cohen, C.S.Lieber, A.L.Cederbaum., *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 425 (1983) .
  - 19) M.S.Rose, L.L.Smith, I.Eyatt, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1763 (1976) .
  - 20) R.Kohen, M.Chevion, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 1841 (1985) .
  - 21) H.P.Misra, I.Fridovich, *Biochemistry*, **15**, 681 (1976) .
  - 22) S.Teo, L.Pohl, J.Halpert, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4584 (1986) .
  - 23) 古倉 聡, 吉川敏一, 近藤元治, 治療学, **26**, 568 (1992) .
  - 24) 市川 勇, “過酸化脂質と生体,” 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, 学会出版センター, 東京, 1985, pp.123-144.
  - 25) 大柳善彦, “SODと活性酸素調節剤-その薬理作用と臨床応用-,” 日本医学館, 東京, 1989, pp.431-487.
  - 26) J.E.Repine, *Am.J.Med.*, **91**, suppl.3C-45S (1991) .
  - 27) 松尾光芳, “過酸化脂質と生体,” 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, 学会出版センター, 東京, 1985, pp.355-377.
  - 28) H.V.Thomas, P.K.Mueller, R.L.Lyman, *Science*, **159**, 532 (1968) .
  - 29) M.Sagai, T.Ichinose, K.Kubota, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444 (1984) .
  - 30) R.Radi, J.S.Beckman, K.M.Bush, *J. Biol. Chem.*, **266**, 4244 (1991) .
  - 31) D.Gray, E.Lissi, J.Heiklen, *J. Phys. Chem.*, **76**, 1919 (1972) .
  - 32) 嵯峨井勝, 活性酸素・フリーラジカル, **4**, 423 (1993) .
  - 33) 鎌滝哲也, “過酸化脂質と生体,” 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著,

- 学会出版センター，東京，1985，pp.211-227.
- 34) 二木鋭雄，ビタミン，**65**，491 (1991) .
  - 35) A.M.Y.Nomura, G.N.Stemmerman, *Cancer Res.*, **64**, 126 (1989) .
  - 36) 末木一夫，活性酸素・フリーラジカル，**4**，332 (1993) .
  - 37) J.E.Redetzki, K.E.Griswold, C.Nopajaroonsri, H.M.Redetzki, J. *Toxicol. Clin. Toxicol.*, **20**, 319 (1983) .
  - 38) 園部美弥彦，前田孝夫，湯川 進，活性酸素・フリーラジカル，**3**，583 (1992) .
  - 39) 平原文子，活性酸素・フリーラジカル，**3**，568 (1992) .
  - 40) E.L.Wynder, U.E.Klein, *Cancer*, **18**, 167 (1965) .
  - 41) H.Ohama, K.Yagi, J. *Vitaminol*, **16**, 297 (1970) .
  - 42) K.Tahara, S.Matsuoka, H.Ohama, J. *Nutr. Sci. Vitaminol.*, **20**, 81 (1974) .
  - 43) T.Toyosaki, T.Yamamoto, T.Mineshita, J. *Food Sci.*, **52**, 88 (1987) .
  - 44) P.V.Rao, K.S.Bhat, J. *Clin. Biochem. Nutr.*, **6**, 195 (1989) .
  - 45) 遠藤安行，朝倉健一，保田 正，三浦 亮，鳥畑鴻次，船場泰文，石田 勉，鈴木 明，大島信一，日本内科学会雑誌，**76**，14 (1987) .
  - 46) 川越裕也，松渕登代子，篠原慶希，紀氏汎恵，西川恵子，平岡栄一，*医学と薬学*，**7**，1069 (1982) .
  - 47) 高田 昭，堤 幹宏，“肝臓の研究Ⅱ，”織田敏次編，同文書院，東京，1987，pp.839-846.
  - 48) M.Ingelman-Sundberg, I.Johansson, J. *Biol. Chem.*, **259**, 6447 (1984) .
  - 49) A.Boveris, C.G.Fraga, A.I.Varsavsky, O.R.Koch, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **227**, 534 (1983) .
  - 50) P.B.McCay, L.A.Reinke, J.M.Rau, *Free Rad. Res. Comms.*, **15**, 335

(1992) .

- 51) 大柳善彦, “SODと活性酸素調節剤-その薬理作用と臨床応用-,” 日本医学館, 東京, 1989, p.724.
- 52) S.Shaw, E.Jayatillede, W.A.Ross, E.R.Gordon, C.S.Lieber, J. Lab. Clin. Med., **98**, 417 (1982) .
- 53) H.Minakami, H.Arai, M.Nakano, K.Sugioka, S.Suzuki, S.Sotomatsu, Biochem. Biophys. Res. Commun., **153**, 973 (1988) .
- 54) 田中照二, 和田光司, 古坂明弘, 薬局, **43**, 1777 (1992) .
- 55) L.Ernster, “Active Oxygens,Lipid Peroxides,and Antioxidants,” ed.by K.Yagi, Japan Sci.Soc.Press, Tokyo, 1993, pp.1-38.
- 56) 吉川敏一, 内藤裕二, 近藤元治, “活性酸素と病態,” 井上正康編著, 学会出版センター, 東京, 1992, pp.753-765.
- 57) 松尾光芳, “過酸化脂質と生体,” 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, 学会出版センター, 東京, 1985, pp.13-44.
- 58) K.Yagi, “Active Oxygens,Lipid Peroxides,and Antioxidants,” ed.by K.Yagi, Japan Sci.Soc. Press, Tokyo, 1993, pp.39-56.
- 59) H.Sies, Am. J. Med., **91**, suppl.3C-31S (1991) .
- 60) 澤 美彦, 岡上 武, 金岡彦治, 加知一友, 太田義治, 森本道雄, 香川恵造, 瀧野辰郎, “アルコール代謝と肝 Vol.8,” 「アルコール代謝と肝」研究会編, 東洋書店, 東京, 1989, pp.125-129.
- 61) R.C.Reitz, Biochim. Biophys. Acta, **380**, 145 (1975) .
- 62) 解良芳夫, H.Speisky, Y.Israel, K.E.Penttilä, K.O.Lindros, “アルコール代謝と肝,Vol.8,” 「アルコール代謝と肝」研究会編, 東洋書店, 東京, 1989, pp.75-80.
- 63) 井上恭一, 古谷田裕久, “肝臓の研究Ⅱ,” 織田敏次編, 同文書院, 東京, 1987, pp.853-855.
- 64) 渡辺 聡, 河内佐十, ビタミン, **67**, 311 (1993) .

- 65) 渡辺 聡, 山本 香, 古庄義明, 河内佐十, ビタミン, accepted.
- 66) 渡辺 聡, 河内佐十, ビタミン, **68**, 79 (1994) .
- 67) 末松俊彦, 阿部 裕, ビタミン, **53**, 587 (1979) .
- 68) 内海耕髓, 佐藤英介, “活性酸素と病態,” 井上正康編著, 学会出版センター, 東京, 1992, pp.69-93.
- 69) S.Puntarulo, A.I.Cederbaum, Biochem. J., **251**, 787 (1988) .
- 70) J.M.Gebicki, B.H.J.Bielski, J. Am. Chem. Soc., **103**, 7020 (1981) .
- 71) B.H.J.Bielski, R.L.Ardi, M.W.Sutherland, J. Biol. Chem., **258**, 4759 (1983) .
- 72) T.Toyosaki, T.Mineshita, J. Agric. Food Chem., **37**, 286 (1989) .
- 73) T.Toyosaki, J. Agric. Food Chem., **40**, 1727 (1992) .
- 74) 豊崎俊幸, 山本明美, 峰下 雄, 日本栄養・食糧学会誌, **36**, 159 (1983) .
- 75) T.Toyosaki, T.Mineshita, Milchwissenschaft, **44**, 292 (1989) .
- 76) T.Toyosaki, T.Mineshita, Milchwissenschaft, **45**, 80 (1990) .
- 77) N.Ohishi, H.Ohkawa, K.Yagi, Biochem. Int., **3**, 213 (1981) .
- 78) 小手川雅彦, 秋山正康, ビタミン, **67**, 443 (1993) .
- 79) T.Toyosaki, A.Yamamoto, T.Mineshita, J. Micronutr. Anal., **2**, 117 (1986) .
- 80) T.Miyazawa, C.Sato, T.Kaneda, Agric. Biol. Chem., **47**, 1577 (1983) .
- 81) J.Okuda, J.Nagamine, M.Okumura, K.Yagi, J. Nutr. Sci. Vitaminol., **24**, 505 (1978) .
- 82) 奥田 潤, “ビタミン学Ⅱ,” 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 1980, pp.90-96.
- 83) K.Yagi, M.Sato, Biochem. Int., **2**, 327 (1981) .



- 84) 明渡 均, “生物化学実験のてびき I 生物試料調製法,” 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫編, 化学同人, 京都, 1985, p.29.
- 85) M.Taniguchi, T.Hara, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 283 (1983) .
- 86) K.Yagi, *J. Biochem.*, **43**, 635 (1956) .
- 87) 大石誠子, 大川 博, “ビタミン学実験法 II,” 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 1985, pp.134-141.
- 88) P.J.Hissin, R.Hilf, *Anal. Biochem*, **74**, 214 (1976) .
- 89) C.Beauchamp, I.Fridovich, *Anal. Biochem.*, **44**, 276 (1971) .
- 90) 今成登志雄, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善蔵, 医学のあゆみ, **101**, 496 (1977) .
- 91) R.F.Beers Jr, I.W.Sizer, *J. Biol. Chem.*, **195**, 133 (1952) .
- 92) R.A.Lawrence, R.F.Burk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952 (1976) .
- 93) R.E.Pinto, W.Bartley, *Biochem. J.*, **112**, 109 (1969) .
- 94) A.Kornberg, B.L.Horecker, *Methods Enzymol.*, **1**, 323 (1955) .
- 95) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951) .
- 96) B.Chance, G.R.Williams, *J. Biol. Chem.*, **217**, 383 (1955) .
- 97) 松田義宏, “生物化学実験のてびき I 生物試料調製法,” 泉 美治, 中川八郎, 三輪谷俊夫編, 化学同人, 京都, 1985, pp.57-63.
- 98) G.Minotti, *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 144 (1989) .
- 99) E.Cadenas, H.Sies, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 349 (1982) .
- 100) W.Bors, C.Michel, M.Saran, *Eur. J. Biochem.*, **95**, 621 (1979) .
- 101) C.Walling, *Acc. Chem. Res.*, **8**, 125 (1975) .
- 102) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解,” 金原出版, 東京, 1990,

- pp.1428-1429.
- 103) 池田正之, “環境汚染物質と毒性有機物質編,” 山根靖弘, 高島英伍, 内山 充編, 南江堂, 東京, 1980, pp.41-56.
  - 104) S.Banerjee, B.L.Van Duuren, L.Benjamin, *Cancer Res.*, **38**, 776 (1978) .
  - 105) 環境庁編, “環境白書 平成4年版,” 大蔵省印刷局, 東京, 1992, pp.117-145.
  - 106) D.Pessayre, B.Cobert, V.Descatoire, C.Degott, G.Babany, C.Funk-Brentano, M.Delaforge, D.Larrey, *Gastroenterology*, **83**, 761 (1982) .
  - 107) J.L.Larson, R.J.Bull, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **115**, 268 (1992) .
  - 108) J.L.Larson, R.J.Bull, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **115**, 278 (1992) .
  - 109) 渡辺 聡, 山本 香, 加藤慈子, 河内佐十, *衛生化学*, **40**, 172 (1994) .
  - 110) H.Sies, H.de Groot, “Toxicology from Discovery and Experimentation to the Human Perspective,” ed. by P.L.Chambers, C.M. Chambers, H.M.Bolt, P.Preziosi, Elsevier, Amsterdam, 1992, pp.547-551.
  - 111) 杉野圭三, 山田一夫, 土肥雪彦, 丸林誠二, “活性酸素,” 八木國夫, 中野 稔監修, 医歯薬出版, 東京, 1987, pp.275-290.
  - 112) A.Kotaki, M.Okumura, Y.Nakagawa, K.Yagi, *J. Vitaminol.*, **15**, 43 (1969) .
  - 113) 小滝 祥, 奥村ミサヲ, 中川洋吉, 八木國夫, *ビタミン*, **37**, 466 (1968) .
  - 114) Y.Saito, N.Ohishi, K.Yagi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 17

- (1981) .
- 115) W.A.Pryor, T.Strickland, D.F.Church, J. Am. Chem. Soc., **110**,  
2224 (1988) .
- 116) 福沢健治, 寺尾純二, “化学と生物実験ライン 2 脂質過酸化実験法,”  
広川書店, 東京, 1990, pp.10-11.
- 117) G.W.Burton, K.U.Ingold, J. Am. Chem. Soc., **103**, 6472 (1981) .
- 118) E.Niki, A.Kawakami, M.Saito, Y.Yamamoto, J.Tsuchiya, Y.Kamiya,  
J. Biol. Chem., **260**, 2191 (1985) .
- 119) E.Niki, J.Tsuchiya, Y.Yoshikawa, Y.Yamamoto, Y.Kamiya, Bull.  
Chem. Soc. Jpn., **59**, 497 (1986) .
- 120) 吉川敏一, 内藤裕二, 近藤元治, 活性酸素・フリーラジカル, **3**, 597  
(1992) .
- 121) L.Castle, M.J.Perkins, J. Am. Chem. Soc., **108**, 6381 (1986) .
- 122) J.Tsuchiya, E.Niki, Y.Kamiya, Bull. Chem. Soc. Jpn., **56**, 229  
(1983) .
- 123) 渡辺 聡, 河内佐十, ビタミン, **67**, 51 (1993) .
- 124) 二木鋭雄, ビタミン, **62**, 601 (1988) .
- 125) 大川 博, 大石誠子, ビタミン, **57**, 193 (1983) .
- 126) 菊川清見, 小杉弘子, 衛生化学, **39**, 1 (1993) .
- 127) 平山晃久, 三浦進司, 植田 緑, 田上恵理, 吉澤智子, 渡辺徹志,  
衛生化学, **37**, 211 (1991) .
- 128) 渡辺 聡, 河内佐十, ビタミン, **66**, 597 (1992) .
- 129) K.J.A.Davies, J. Biol. Chem., **262**, 9895 (1987) .
- 130) B.K.Sinha, M.A.Patterson, Biochem. Pharmacol., **32**, 3279  
(1983) .
- 131) R.Ogura, H.Ueta, Y.Hino, T.Hidaka, M.Sugiyama, J. Nutr. Sci.  
Vitaminol., **37**, 473 (1991) .

- 132) 藤井新也, 小西靖子, 田中雅久, 藤井康彦, 井上 康, 兼子俊男, 基礎と臨床, **23**, 609 (1989) .