

氏名(本籍)	渡辺 聡 (神奈川県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	乙 第69号
学位授与年月日	平成6年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者
学位論文の題名	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
論文審査員	主査 教授 河内 佐 十 副査 教授 入江 昌 親 副査 教授 篠田 雅 人

論文内容の要旨

ヒトを取り巻く環境中の有機化学物質に由来する肝障害の発生に、化学物質の代謝に伴う活性酸素・フリーラジカルの生成による脂質過酸化反応の関与が示唆されており、環境汚染との関係が検討されている。一方、水溶性ビタミンであるリボフラビンの脂質過酸化反応に対する抗酸化効果が検討されているが、詳細については不明な点が多い。本論文では、ヒトが嗜好品として摂取する機会の多いエタノールによる急性肝障害の発生に対する脂質過酸化反応の関与とその機構、及びリボフラビン誘導体の抑制効果とその機構について *in vivo* 及び *in vitro* で検討した。また、有機塩素系溶剤として半導体の洗浄等に使用されているトリクロロエチレン (TCE) の肝障害に対する脂質過酸化反応の関与、及びTCE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とその機構について *in vitro* で検討した。

第1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 0~103.2mmol/kgを段階的濃度で単回投与し、体重、肝重量、肝臓中のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 量、還元型グルタチオン (GSH) 及び酸化型グルタチオン (GSSG) 量、肝臓中のフラビン量、肝サイトソール中の抗

酸化酵素活性の変動をパラメーターとして測定した。その結果、体重、肝重量、肝TBARS量及びGSSG量は投与量に対応して増大し、肝GSH量及びフラビン量、抗酸化酵素活性は投与量に対応して低下した。したがって、急性アルコール性肝障害の発生には過酸化脂質量の増大、及び過酸化脂質量の増大に伴う肝フラビン量の減少が関与すると考えられ、また、血清中のGOT及びGPT活性の変動と併せて、本実験に適切なエタノールの投与量を86mmol/kgと設定した。次に、エタノール86mmol/kgの投与による急性アルコール性肝障害の発生に対して、フラビン3型(RF, FMN, FAD)各0.57mmol/kgを腹部皮下に併用投与した場合の各パラメーターの変動を測定した。その結果、フラビン類、特にFADに、エタノールによる過酸化脂質量の増大及び肝障害の発生に対する抑制効果が認められた。また、FAD 0~0.57mmol/kgを段階的濃度でエタノール86mmol/kgと併用投与した場合の、各パラメーターの変動を測定した。その結果、脂質過酸化反応及び肝障害に対するFADの抑制効果に投与量依存性が認められ、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生成活性の保持に由来した抗酸化酵素活性の保持が認められた。さらにin vitro実験系では、マイクロゾームによるエタノールの代謝に伴う脂質過酸化反応の亢進が認められ、この脂質過酸化反応が活性酸素消去酵素(SOD, catalase)及びラジカル捕捉剤(mannitol, 尿酸)の添加で抑制されたことから、エタノールの代謝に伴う脂質過酸化反応への活性酸素ラジカルの関与が認められた。また、この脂質過酸化反応が反応系へのFADの添加により抑制され、さらに、PNDMA法及び可視部吸収法でヒドロキシラジカルとFADとの非酵素的な反応性が認められたことから、脂質過酸化反応に対するFADの抑制機構には、FADによる活性酸素ラジカルの捕捉も関与すると考えられた。また、この結果から、in vivoでの肝フラビン量の減少は、生成した活性酸素ラジカルとフラビンとの反応に起因する可能性が示唆された。

第2章では、TCEによる肝障害に対する脂質過酸化反応の関与、及びこれに対するリボフラビン誘導体の抑制効果を検討する目的で、TCEの代謝物であるトリクロロ酢酸(TCA)の、肝マイクロゾームによるin vitroでの代謝に伴う脂質過酸化反応

を測定した。その結果、TCAの代謝に伴う脂質過酸化反応の亢進が認められ、これがラジカル捕捉剤（mannitol, 尿酸）の添加では顕著に抑制されたが、活性酸素消去酵素（SOD, catalase）の添加ではほとんど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関与せず、Larsonらが示したように、TCAの代謝によるジクロロ酢酸（DCA）ラジカル及びDCAペルオキシラジカルの生成が関与することが認められた。また、この脂質過酸化反応がリポフラビン酪酸エステル（B₂-But）及びFADの添加により、RFを添加した場合よりも顕著に抑制され、さらに水溶性ラジカル開始剤のAAPHを用いた非酵素的なDCAラジカルの生成反応に対しても、B₂-But及びFADがRFよりも顕著な抑制効果を示したことから、これらのリポフラビン誘導体は、DCAラジカルを捕捉して脂質過酸化反応を抑制すると考えられた。

第3章では、リポフラビンのラジカル捕捉活性による脂質過酸化反応の抑制について検討する目的で、ラジカル開始剤によるリノール酸のラジカル連鎖反応を酸素電極法で測定した。この反応系に対してリポフラビン及び α -トコフェロールを段階的濃度で添加した場合の抑制効果から抑制期間の酸化速度及び連鎖開始反応速度を求め、連鎖停止速度定数（ $k_{i,th}$ ）を算出した。その結果、水溶性ラジカル開始剤AAPHを用いた場合のリポフラビンの $k_{i,th}=1.5\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、脂溶性ラジカル開始剤AMVNを用いた場合のリポフラビンの $k_{i,th}=1.2\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 及び α -トコフェロールの $k_{i,th}=1.5\times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ と算出されたことから、リポフラビンのラジカル捕捉活性は α -トコフェロールとほぼ同程度であり、1分子中にペルオキシラジカル2分子を捕捉すること、反応溶液中のリポフラビンはフリーラジカルとの反応により減少すること、及びリポフラビンは水層及び脂質層のいずれで生成したフリーラジカルに由来する脂質過酸化反応に対しても抑制効果を示すことが認められた。

第4章では、過酸化物との反応によるTBARSの生成に対するリポフラビンの抑制効果を検討する目的で、2,4-hexadienalとt-butyl hydroperoxide (t-BuOOH)の反応によるin vitroでのTBARS生成系にリポフラビンを段階的に添加した。その結果、リポフラビンはTBARSの生成を抑制し、その抑制効果がリポフラビンの添加量に対応すること、及び抑制効果はリポフラビンとt-BuOOHとの反応に由来することが認

められ、t-BuOOH との反応に伴って反応溶液中のリポフラビンが減少したことから、in vivo 実験での過酸化脂質量の増大に伴う肝フラビン量の減少は、肝フラビンと過酸化脂質ラジカルとの反応に起因すると考えられた。

以上のように、本論文でエタノールによる実験的肝障害の発生に対する脂質過酸化反応の関与及びその機構、脂質過酸化反応に伴う肝障害に対するリポフラビン誘導体の抑制効果とその機構が、in vivo及びin vitroで認められた。また、TCEの肝障害に対する脂質過酸化反応の関与の可能性、及びこの肝障害に対するリポフラビン誘導体の抑制効果の可能性がin vitroで認められた。さらに、リポフラビンのラジカル捕捉活性と過酸化物との反応性がin vitroで認められた。ヒトを取り巻く環境中には種々の化学物質が存在し、その毒性発現機構に活性酸素・フリーラジカルの生成が関与するものがある。リポフラビンは水溶性ビタミンであり、過剰症の懸念のないことから、これら化学物質及びその他の原因による活性酸素や過酸化脂質の生成に由来した疾患に対して、予防や症状の改善の目的で利用できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、リボフラビン誘導体のラジカル捕捉剤及び抗酸化剤としての可能性を確かめるため、エタノール及びトリクロロエチレン(TCE)による実験的肝障害の発生に対する抑制効果並びにその反応機構について検討したものである。

第1章では、マウスによる急性アルコール性肝障害誘発に必要なエタノールの投与量を86～103mmol/kgと設定し、肝障害の発生に伴いマウスの体重、肝重量、肝臓中のチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)量、血清のGOT及びGPT活性が顕著に増大し、一方、肝臓中の還元型グルタチオン量及びフラビン量、サイトソーム中のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼ、グルタチオンレダクターゼ及びG-6-pデヒドロゲナーゼ活性が顕著に減少することを確認している。さらに、このアルコール性肝障害誘発マウスにおける各パラメーターの変動は、0.57mmol/kgのリボフラビン(RF)、FMN又はFADの投与により抑制されることを確かめた。特にFADの抑制効果は、投与量に依存的であることを明らかにしている。またin vitro系での実験結果から、FADの抑制効果は、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の捕捉作用によることを認めている。

第2章では、環境汚染物質であるTCEの肝障害の発生機構のひとつと考えられている、代謝産物であるトリクロロ酢酸(TCA)の代謝過程でのフリーラジカルの生成による脂質過酸化反応に対するFAD及びRF酢酸エステルのin vitroでの抑制効果を確認し、さらに、マンニトール及び尿酸の抑制効果と比較している。また、リボフラビン誘導体のジクロロ酢酸ラジカルに対する捕捉作用から、TCEの肝障害に対してもリボフラビン誘導体が抑制効果を示す可能性を示唆している。

第3章では、in vitro反応系で水溶性ラジカル開始剤の2,2-アゾビス(2-アミノプロパン)2塩酸と脂溶性ラジカル開始剤の2,2-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)によるリノール酸の過酸化反応を酸素吸収で測定し、これがRFの添加により抑制されることを認め、さらに連鎖停止速度定数を算出して、抗酸化ビタミンとして知られている α -トコフェロールと比較した結果、ほぼ等しいラジカル捕捉活性を持つことを明らかにしている。

第4章では、2,4-ヘキサジェナールとt-ブチルヒドロペルオキシドのin vitroの反応によるTBARSの生成がRFの添加により顕著に抑制されることを認め、

その機構として過酸化物とRFの直接的な反応から、RFの抗酸化作用を示唆している。

以上のように本論文の内容は、リボフラビン誘導体が従来の抗酸化ビタミン類に加えて、ラジカル捕捉剤として生体内での活性酸素・フリーラジカル生成に伴う肝障害の誘発に抑制的に作用する可能性を示唆する内容が含まれており、肝臓薬の開発にひとつの指針を与えるものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認め判定した。