

# アルコール性脂肪肝と 抑制成分カカオポリフェノール

仲川 清隆

東北大学大学院農学研究科准教授

## 【背景】

アルコール性脂肪肝は、アルコールの過飲で生じる最初の肝臓の病態である。アルコール性肝炎やアルコール性肝硬変といったより重度の肝障害の危険因子としても知られる。肝臓へのアルコールの影響の分子機構を詳細に理解することで、アルコール性脂肪肝、ひいては肝炎や肝硬変の有効な予防や治療法の提供に結びつくと期待され、目下、多くの研究が精力的に行われている<sup>1-3)</sup>。

アルコール性肝炎や肝硬変の形成時には、肝臓への過酸化脂質の過度な蓄積が報告されている<sup>4-6)</sup>。それ故、アルコール性脂肪肝の症状の進展機構については未だ不明な点が多いものの、ひとつの可能性として脂質過酸化（酸化ストレス）による、遺伝子発現調節の破綻が関係していると示唆されている<sup>7)</sup>。しかし、実験動物へのアルコール投与は、脂肪肝の過酸化脂質量に大きく影響しないとの報告もある<sup>7,8)</sup>。

そこで本研究では、アルコールを含む液体飼料をラットへ与えると比較的簡便に脂肪肝が現れることから<sup>2)</sup>、このモデルを用いて、肝臓脂質と過酸化脂質濃度の変動から、アルコール性脂肪肝への酸化ストレスの関わりを明らかにしようとした。過酸化脂質としては、リン脂質の一次酸化生成物であり、生体内の酸化ストレスを鋭敏に反映するホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）とホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド（PEOOH）を化学発光（CL）-HPLC法で定量した（図1）<sup>9-11)</sup>。さらに抗酸化成分としてエピカテキンとその重合体を含むカカオポリフェノール（CP）<sup>12)</sup>のアルコール性脂肪肝形成への影響を評価した。

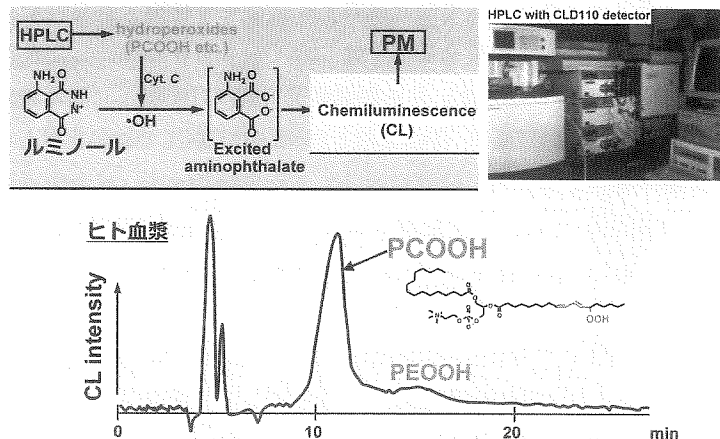


図1 CL-HPLC法の原理とヒト血漿の分析例

## 【方法】

Wistar系ラット（6週齢，雄，40匹，日本エス・エル・シー）を固形飼料で1週間予備飼育（個別飼育）した。その後、ラットを4群に分けた。固形飼料の代わりに、5%のアルコールを含む液体飼料（Lieber-DeCarli formula，オリエンタル酵母工業社製，図2）<sup>13</sup>、アルコールを同カロリーの糖質で置き換えた液体飼料、これらへCP [カカオ豆のアセトン抽出乾固粉末，ポリフェノールを46%含む（Folin-ciocalteu法，エピカテキン換算）]を1.4 g/Lの濃度で加えた液体飼料、これら4種の液体飼料を与えた。4群の摂取カロリーが同程度になるように、液体飼料はペアフィーディングした。4週（n=3）あるいは8週（n=7）飼育し、16時間の絶食後、イソフルランを用いて麻酔し、肝臓を摘出した。肝臓は生理食塩水で灌流し、-80℃で保存し分析用試料とした。なお、本動物実験は、三共ラボサービス社の動物実験指針に則り行われた。

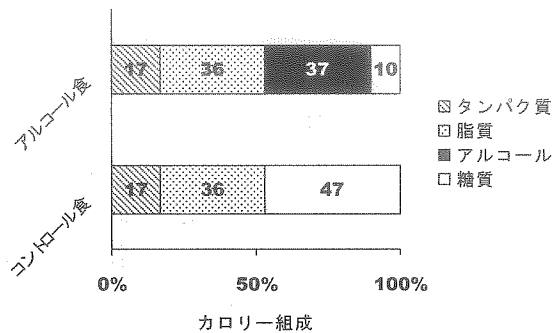


図2 液体飼料の栄養組成

肝臓からFolch法で総脂質を抽出し<sup>14</sup>、トリアシルグリセロール（TG）量をキット（トリグリセライドE-テストワコー，和光純薬工業社製）で測定した。肝臓のレチノール量は、肝臓を強アルカリ下で鹸化し、ヘキサンで抽出し、UV-HPLC法で定量した<sup>15</sup>。肝臓の $\alpha$ -トコフェロール量は、ヘキサン/酢酸エチル混液で抽出し、蛍光検出-HPLC法で測定した<sup>16</sup>。

肝臓の過酸化リン脂質はCL-HPLC法で定量した<sup>9-11</sup>。本法の特徴は、それぞれの脂質クラス中のヒドロペルオキシド基を、ポストカラムで発光試薬と反応させて検出するもので、従来困難であったヒトや動物の血液や組織の過酸化脂質を世界ではじめて定量できる様にしたものである。ここでは、肝臓から総脂質をFolch法で抽出し<sup>14</sup>、リン脂質画分をHPLC分離し、この画分に含まれるヒドロペルオキシド基を有するリン脂質分子（PCOOHとPEOOH）をCLで検出定量した。

データは平均値±標準誤差で示した。統計処理はエクセル統計2010（社会情報サービス社製）を用いた。実験群間の差については、一元配置分散分析（one-way ANOVA）で解析し、次いでTukey多重比較法で検定した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

## 【結果と考察】

本研究では、4群の摂取カロリーが同程度になるように、液体飼料をペアフィーディングした。その結果、4週および8週の体重変化とエネルギー摂取量に4群間で有意差は見られなかった（表1）。したがって、群間で測定値に違いが認められた場合は、摂取カロリーではなく、主にアルコール摂取の影響と予想された。

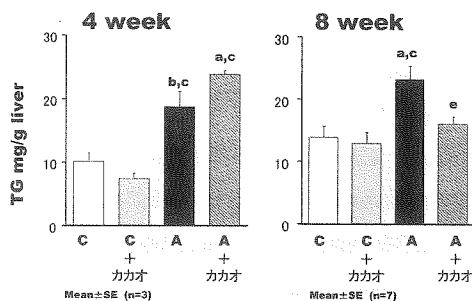
表1 体重変化とエネルギー摂取量

4週間	Control	Control + Cacao	Ethanol	Ethanol + Cacao
Starting weight, g	173.2 ± 10.7	174.0 ± 9.4	174.8 ± 7.2	176.0 ± 6.7
Final weight, g	206.1 ± 15.4	205.6 ± 4.3	207.8 ± 11.9	212.5 ± 24.2
Carotid intake, kcal/kg/day	208.7 ± 6.7	208.1 ± 7.4	199.5 ± 3.3	195.2 ± 6.9
Ethanol intake, g/kg/day			10.0 ± 0.2	9.8 ± 0.3
Cacao polyphenol intake, mg/kg/day		285.4 ± 10.1		267.8 ± 9.4

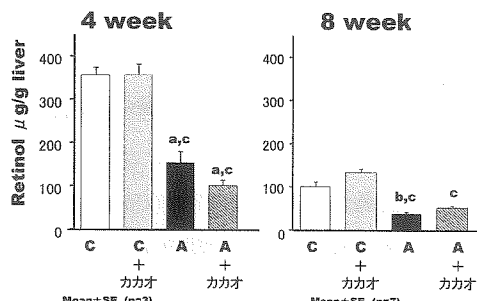
8週間	Control	Control + Cacao	Ethanol	Ethanol + Cacao
Starting weight, g	169.8 ± 6.5	170.1 ± 6.3	170.1 ± 6.5	169.9 ± 6.2
Final weight, g	270.0 ± 6.1	279.4 ± 17.4	278.5 ± 18.8	280.9 ± 4.0
Carotid intake, kcal/kg/day	208.4 ± 8.7	212.3 ± 10.6	203.2 ± 9.3	209.6 ± 6.3
Ethanol intake, g/kg/day			10.2 ± 0.5	10.5 ± 0.3
Cacao polyphenol intake, mg/kg/day		291.3 ± 14.5		287.5 ± 8.7

肝臓のTGは、アルコールを摂取した群において、摂取していない群（コントロール）に比べて、4週目から有意に高まった（図3）。アルコールを8週間摂取した肝臓のTG濃度は23mg/gであり、肝臓組織の顕微鏡観察では初期のアルコール性脂肪肝が観察された。したがって、本実験におけるアルコール性脂肪肝の進行の程度は、初期段階と考えられた。なお、アルコール性脂肪肝の発生機序については、アルコール代謝に伴う脂肪酸合成の増加、および脂肪酸のβ酸化の抑制によるTG蓄積のためと考えられている<sup>17)</sup>。一方、肝臓のレチノールは、アルコールを摂取した群で有意に低値を示した（図4）。大量飲酒者の肝臓レチノール濃度は低いことが知られており<sup>1)</sup>、これは摂取したアルコールによりレチノール代謝酵素が競合阻害され、レチノールが蓄積し、アルコールで活性化されたcytochrome P450によって蓄積されたレチノールが分解され肝外へ排出されるためと報告されている<sup>18)</sup>。上述したように、本実験のアルコール性脂肪肝は初期段階と考えられ、この段階で既に肝臓のレチノール濃度が減少することは、症状の進展につながる大きな要因のひとつと思われた。



a: Significant as compared to group C ( $p < 0.01$ ) c: Significant as compared to group C+Cacao ( $p < 0.01$ )  
 b: Significant as compared to group C ( $p < 0.05$ ) e: Significant as compared to group A ( $p < 0.05$ )

図3 肝臓のTG量



a: Significant as compared to group C ( $p < 0.01$ ) c: Significant as compared to group C+Cacao ( $p < 0.01$ )  
 b: Significant as compared to group C ( $p < 0.05$ )

図4 肝臓のレチノール量

次いで、抗酸化分子（α-トコフェロール）と過酸化リン脂質濃度の変動から、アルコール性脂肪肝への酸化ストレスの関わりを評価した。一般に、肝臓のα-トコフェロールとTG量は相関することが知られており<sup>19)</sup>、ここでは肝臓TG当たりのα-トコフェロール量を算出して検討した。その

結果、アルコール摂取8週目から $\alpha$ -トコフェロールが有意に低下することがわかった (図5)。 $\alpha$ -トコフェロールは細胞膜の主要な抗酸化物質であり、アルコール摂取により肝臓組織が酸化ストレスに曝され、抗酸化物質が消費された可能性が示唆された。アルコール性脂肪肝への酸化ストレスの関与をさらに検証するため、肝臓の過酸化リン脂質 (PCOOHとPEOOH) を定量した。 $\alpha$ -トコフェロールと同様に、アルコール摂取4週ではとくに変化は認められなかったが、8週目から高い傾向 (PCOOH,  $p=0.17$ ; PEOOH,  $p=0.12$ ) を示すことがわかった (図6)。これらの結果から、アルコール由来のフリーラジカルが直接過酸化リン脂質を増加させた、もしくはアルコールが抗酸化物質 ( $\alpha$ -トコフェロール) を消費させた結果、過酸化リン脂質が蓄積した可能性が考えられた。

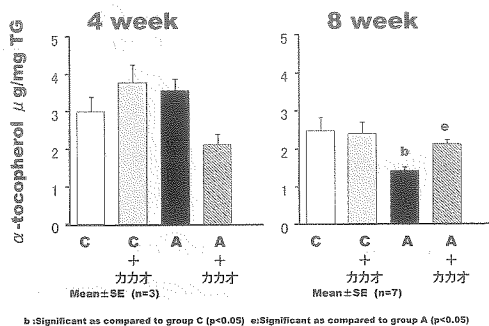


図5 肝臓の $\alpha$ トコフェロール量

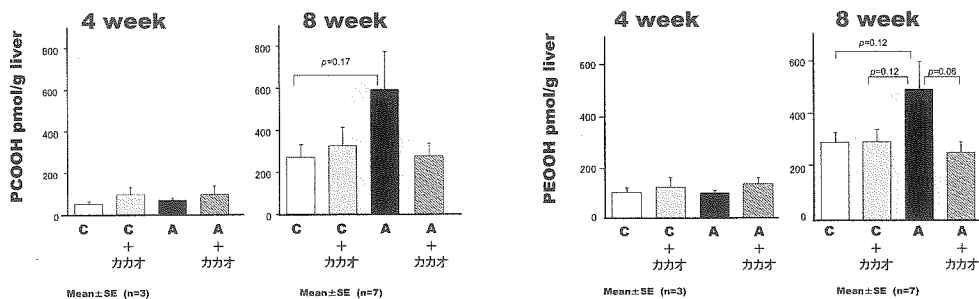


図6 肝臓の過酸化リン脂質量 (PCOOH、PEOOH)

以上の結果から、初期段階のアルコール性脂肪肝で酸化ストレスの発生が定量的に示唆された。他方、抗酸化成分としてエピカテキンとその重合体を含むCPを摂取した群では、8週目から肝臓のTGは低値となり (図3)、CPにはアルコール摂取によるTG蓄積を抑制する可能性が示唆された。肝臓のレチノールは、CP摂取による変動は観察されず (図4)、アルコール性脂肪肝に伴う肝臓レチノール減少機構にはCPは関与しないと考えられた。肝臓抗酸化・過酸化パラメータについては、8週目でアルコール摂取による肝臓 $\alpha$ -トコフェロールの減少がCPにより抑制され (図5)、さらに過酸化リン脂質の増加 (とくにPEOOH) も抑制される傾向 ( $p=0.06$ ) が観察された (図6)。つまりCPはアルコール由来の酸化ストレスを抑制し、抗酸化物質の消費を防ぐことで、過酸化脂質の形成を抑制したと考えられた。一方、cytochrome P450はアルコールのみならず、過多の脂肪酸によ

っても誘導される報告があり<sup>20)</sup>、CPが肝臓へのTGの蓄積を抑制することで酸化ストレスを軽減した可能性も考えられた。これらの結果から、CPはアルコールによるTG蓄積を抑制し酸化ストレスを軽減する、アルコール性肝障害の予防に資する食素材としての可能性が期待された。但し、CPの詳細な作用メカニズムは不明のため、遺伝子発現調節に与える影響も含め、今後更なる研究が必要と考えられた。

#### 【参考文献】

- 1) Lieber, C.S., Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res. Health*, 27, 220-231 (2003)
- 2) Song, B.J., Moon, K.H., Olsson, N.U., Salem, N. Jr, Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Hepatol.*, 49, 262-273 (2008)
- 3) Zhu, H., Jia, Z., Misra, H., Li, Y.R., Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. *J. Dig. Dis.*, 13, 133-142 (2012)
- 4) Situnayake, R.D., Crump, B.J., Thurnham, D.I., Davies, J.A., Gearty, J., Davis, M., Lipid peroxidation and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut*, 31, 1311-1317 (1990)
- 5) Tsukamoto, H., Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol*, 10, 465-467 (1993)
- 6) Lieber, C.S., Leo, M.A., Aleynik, S.I., Aleynik, M.K., DeCarli, L.M., Polyenylphosphatidylcholine decreases alcohol-induced oxidative stress in the baboon. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21, 375-379 (1997)
- 7) Orlicky, D.J., Roede, J.R., Bales, E., Greenwood, C., Greenberg, A., Petersen, D., McManaman, J.L., Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 35, 1020-1033 (2011)
- 8) Coudray, C., Richard, M.J., Faure, H., Favier, A., Blood and liver lipid peroxide status after chronic ethanol administration in rats. *Clin. Chim. Acta*, 219, 35-45 (1993)
- 9) Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K., Yasuda, K., Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J. Lipid Res.*, 33, 1051-1059 (1992)
- 10) Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K., Kinoshita, M., Age-related change of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide levels in normal human red blood cells. *Mech. Ageing Dev.*, 86, 145-150 (1996)
- 11) Kinoshita, M., Oikawa, S., Hayasaka, K., Sekikawa, A., Nagashima, T., Toyota, T., Miyazawa, T., Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidemia. *Clin. Chem.*, 46, 822-828 (2000)
- 12) Kelm, M.A., Johnson, J.C., Robbins, R.J., Hammerstone, J.F., Schmitz, H.H., High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1571-1576 (2006)

- 13) Lieber, C.S., DeCarli, L.M., Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*, 24, 197-211 (1989)
- 14) Folch, J., Lees, M., Sloane, Stanley, G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957)
- 15) Schäffer, M.W., Roy, S.S., Mukherjee, S., Nohr, D., Wolter, M., Biesalski, H.K., Ong, D.E., Das, S.K., Qualitative and quantitative analysis of retinol, retinyl esters, tocopherols and selected carotenoids out of various internal organs form different species by HPLC. *Anal. Methods*, 2, 1320-1332 (2010)
- 16) Katsanidis, E., Addis, P.B., Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radic Biol Med*, 27, 1137-1140 (1999)
- 17) Baraona, E., Lieber, C.S., Alcohol and lipids. *Recent Dev. Alcohol*, 14, 97-134 (1998)
- 18) Wang, X.D., Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol*, 35, 251-258 (2005)
- 19) Nagita, A., Ando, M., Assessment of hepatic vitamin E status in adult patients with liver disease. *Hepatology*, 26, 392-397 (1997)
- 20) Lieber, C.S., Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, 34, 9-19 (2004)