

アルコール性肝障害発症時におけるビタミン A 栄養状態の影響 とその機序に関する研究

研究年度 平成 30 年度

研究期間 平成 30 年度

研究代表者名 駿河 和仁

共同研究者名 山口 範晃

1. はじめに

長期的なアルコール摂取による肝障害は、初期異常として脂質代謝異常による脂肪肝の発症に始まり、その後、炎症や酸化ストレスの関与により肝炎や肝硬変、肝臓がんへと重篤化していく^(1,2)。また、アルコールの長期摂取時には肝臓のビタミン A 貯蔵量が著しく低下し、この変化もアルコール性肝障害の発症・進展に関連することが指摘されているが^(3,4)、その機序については明らかでない。本研究では、ラットをモデル動物とした動物実験系で長期アルコール摂取時に見られる肝障害発症に対するビタミン A 栄養状態の影響について、特に脂質代謝、炎症、酸化ストレスへの影響の面から検討を行うことを目的とした。

2. 実験方法

3 週齢の Sprague Dawley 系雄性ラット（32 匹，日本エスエルシー(株)）を 4 週齢時まで標準固形飼料(MF)にて順化させた。4 週齢時に 5 群（各群 6～7 匹×5 群）に分け、各群の食餌組成は AIN-93G 基本組成のコントロール粉末食①、①よりビタミン A 量が 50 倍多いビタミン A 添加粉末食②、②と同等のレチノール当量のβ-カロテンを含むβ-カロテン添加粉末食、および①からビタミン A のみ欠乏させたビタミン A 欠乏粉末食④とし、8 週齢時まで自由摂取させた。8 週齢時からエタノールを含まない Liber-DeCarli 組成のビタミン A を含まないコントロール液体飼料食または 5%エタノール含有液体飼料を調製し、前述のコントロール粉末食①を摂取していたラットには、コントロール液体飼料(C 群)または 5%エタノール含有液体飼料(E 群)を与えた。一方、前述の粉末食②～④を摂取していたラットには 5%エタノール含有液体飼料を与えた（それぞれ EA+、EB+、EA-群）。これらの各種液体飼料を平均摂取量が同じになるように pair-feeding を行い 6 週間摂取させた。なお、この摂取期間中は C 群および E 群には、レチニルアセテートを 0.024mg、EA+群には 0.024mg 毎日経口投与した。また、EB+群にはβ-カロテンを 1.2mg 毎日経口投与した。EA-群にはレチニルアセテートおよびβ-カロテンの経口投与は行わなかった。

飼育終了後は、断頭により屠殺後、血液および各組織を摘出し、血清および組織中

（肝臓、小腸など）の脂質代謝関連指標、炎症関連指標、酸化ストレス指標、ビタミン A 量について測定を行った。また、肝臓組織切片を作成し、HE 染色により脂肪滴の蓄積状態について解析した。

実験結果は、Steel-Dwass の多重解析法により統計的有意差 ($p < 0.05$) を検定した。

3. 実験結果および考察

飼育全期間における各種食餌摂取量に有意な差はなく、また飼育終了時(14 週齢)の体重や組織(肝臓、副睾丸脂肪組織、腎周囲脂肪組織)全重量および体重 100g あたりの相対重量についてはいずれも各群間で有意な差は見られなかった(結果は示さず)。

飼育終了時(14 週齢)の血清レチノール濃度は C、E、EA+および EB+の各群間で有意な差は見られなかったが、EA-群では他の群間に対し、有意に低値を示しており、ビタミン A 欠乏状態であると考えられた(Fig.1)。一方、肝臓の総レチノール量は全ての群間で有意な差を示しており、E 群では C 群の 40%レベルまでビタミン A 貯蔵量が低下していたが、EA+および EB+群では C 群に比べ過剰なビタミン A の蓄積が見られた(それぞれ C 群の 30 倍または 4 倍)。一方、EA-群では肝臓ビタミン A 量が顕著に低値を示しており、C 群の 7.5%レベルであった(Fig.1)。以上の結果から、エタノールの摂取により肝臓のビタミン A 貯蔵量が低下するが、その変動量はビタミン A や β -カロテンの摂取量に影響を受けることが示された。

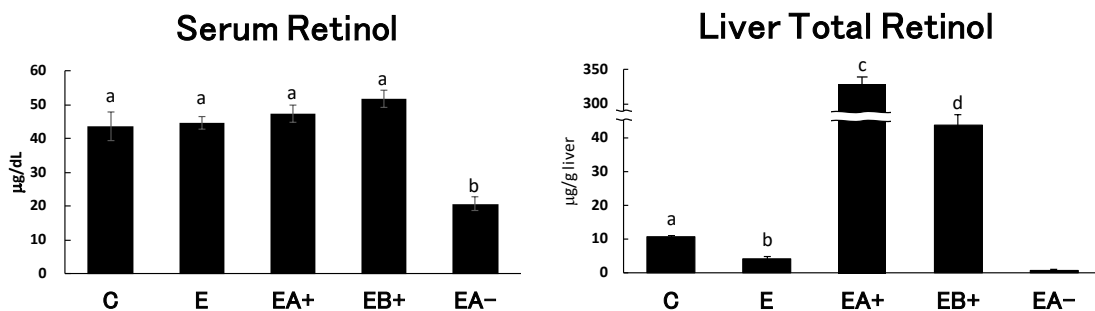


Figure1 血清及び肝臓レチノール量

平均+S.E. (n=6-7) , a-e:異なる記号間で有意差あり ($p < 0.05$)

血清トリグリセリド(TG)濃度は、C 群に比べ EA-群を除くエタノール摂取群で高い傾向が見られ(Fig.2)、肝臓 TG 量は C 群に比べエタノール摂取群全てで有意に高値を示したが、ビタミン A や β -カロテン摂取量の違いによる差は見られなかった(Fig.3)。血清総コレステロール濃度は、C 群に比べエタノール摂取群全て高い傾向を示したが(Fig.2)、肝臓総コレステロール量は各群間で差は見られなかった(Fig.3)。また、肝臓の HE 染色を行った組織切片画像でも、C 群では明確な脂肪滴は検出されなかったが、E 群では類洞周辺を中心に比較的大きな脂肪滴が観察された(Fig.4)。一方、その他の

エタノール摂取群においても E 群に比べ小さな脂肪滴が随所に観察されたが、ビタミン A やβ-カロテン摂取量の違いによる明確な差は見られなかった(Fig.4)。血清遊離脂肪酸(NEFA)濃度および肝臓の酸化ストレス指標のひとつである 2-チオバルビツール酸反応性物質(TBARS)濃度はいずれも各群間で差は見られなかった(Fig.2)。肝機能障害指標である血清トランスアミナーゼ(ALT、AST)活性では、AST 活性が各群間で差が見られなかったのに対し、ALT 活性は C 群に比べエタノール摂取群全てにおいて高い傾向(E、EB+、EA-群)または有意に高い値(EA+群)を示したが、ビタミン A やβ-カロテン摂取量の違いによる明確な差は見られなかった(Fig.2)。

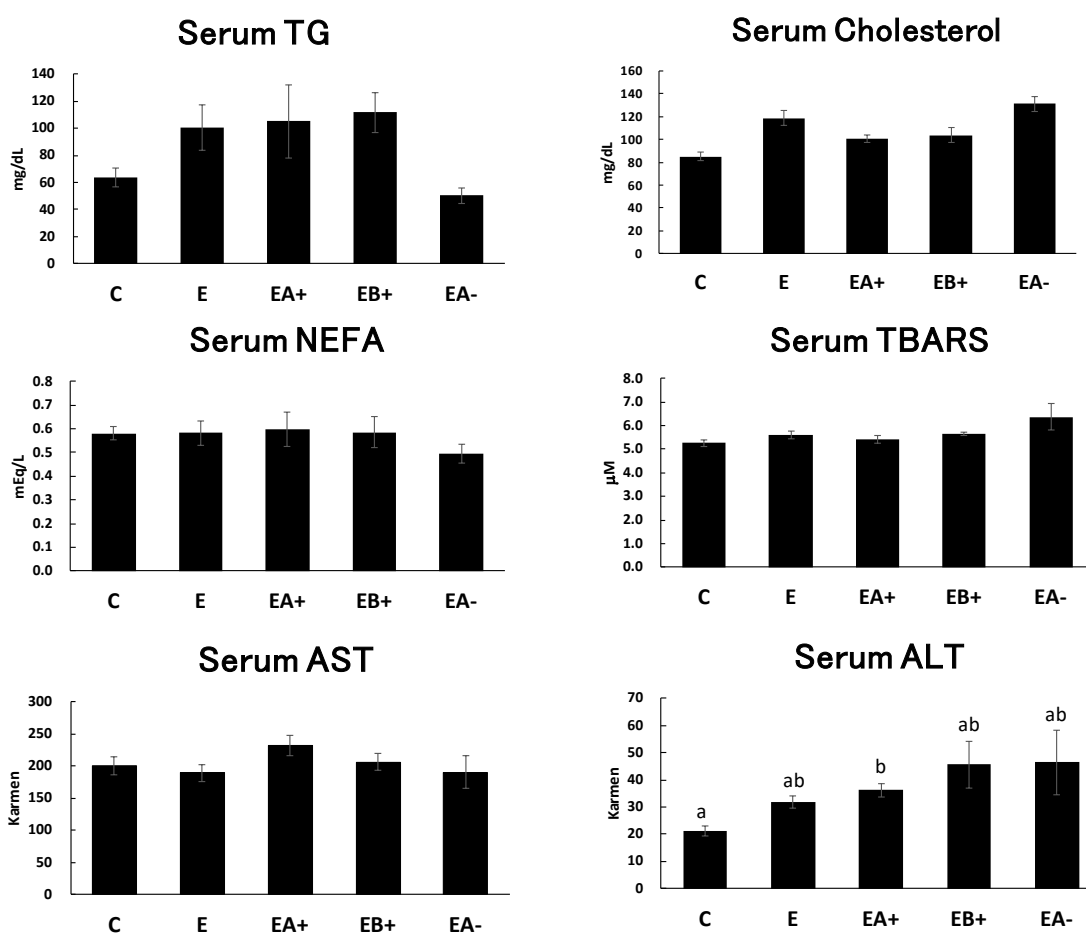


Figure 2 血清指標濃度

平均+S.E. (n=6-7) , a-b:異なる記号間で有意差あり(p<0.05)

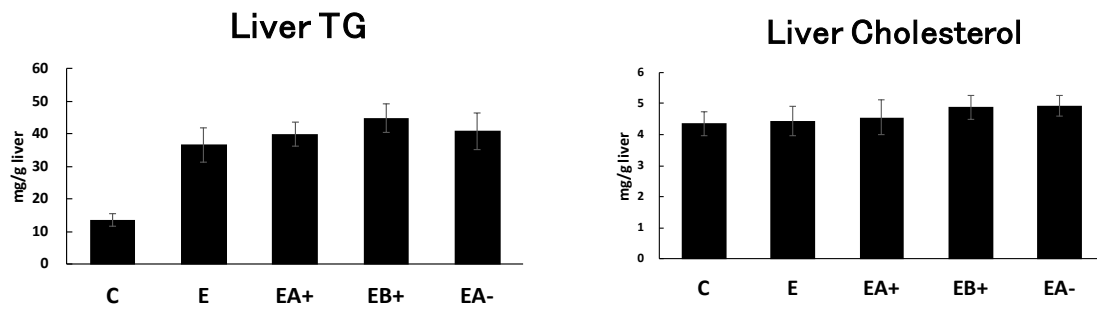


Figure 3 肝臓脂質量

平均+S.E. (n=6-7) , a-b:異なる記号間で有意差あり(p<0.05)。

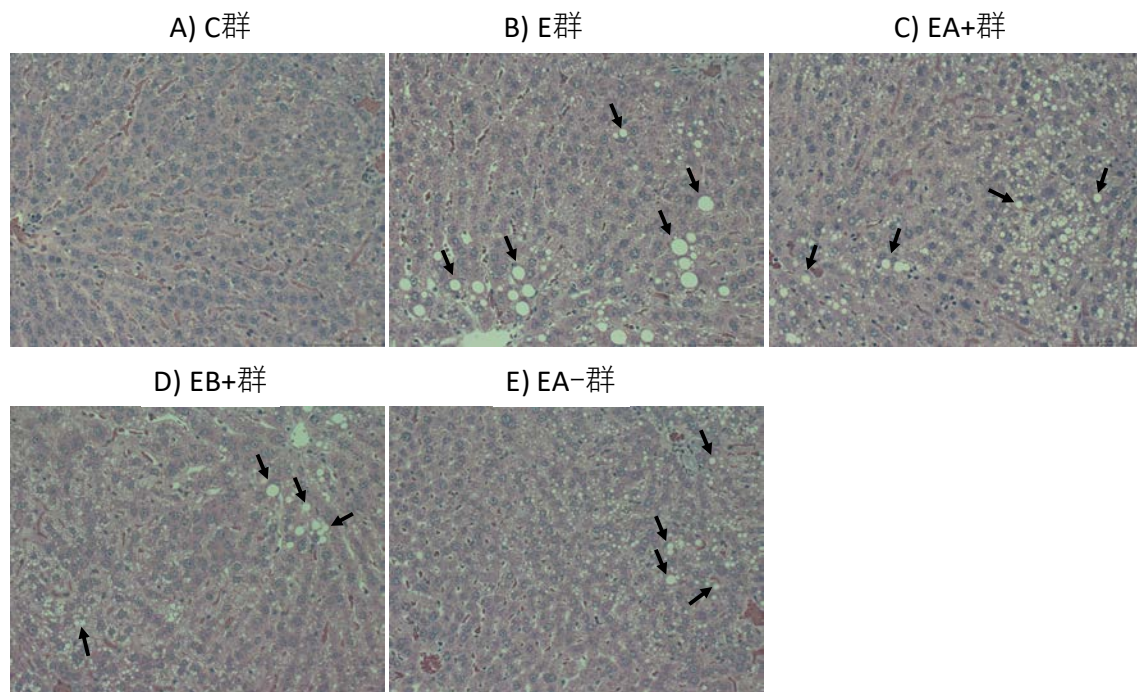


Figure 4 肝臓組織切片 HE 染色画像

図中の矢印は脂肪滴を示す。

4. おわりに

ビタミン A は肝臓の脂肪酸の酸化亢進や脂肪酸およびトリグリセリドの合成を抑制することが報告されている^(5,6)ことから、アルコール摂取による肝臓トリグリセリド濃度蓄積やそれ以降の肝障害進展に対し、ビタミン A 栄養状態の違いが影響するものと仮説を立てたが、本研究結果からは、長期のアルコール摂取によるラット肝臓のトリグリセリド量や肝機能障害指標(ALT)の増大に対し、ビタミン A やβ-カロテンの栄養状態の違い(過剰摂取、不足状態)による明確な影響は見られなかった。本研究での 6 週間のアルコール摂取下では、肝臓のトリグリセリド量の有意な蓄積は見られたが、

それ以降の肝線維化や肝炎症などの重篤な肝障害までは進行していないものと思われる。また、本研究計画時に予定していた、その他の酸化ストレスや炎症マーカーの解析および肝障害の関連遺伝子の解析については今後解析する予定であるが、それらの解析結果から、アルコール性肝障害時に変動する因子の中にビタミン A 栄養状態の違いによる差を示すものがあるかをさらに検討していく。

5. 引用文献

- (1) 杉本和史、竹井謙之 (2015) アルコール性肝障害と非アルコール性脂肪性肝疾患 -その共通点と相違点から見えてくる病態-. 日消誌. **112**, 1641-1650.
- (2) 池嶋健一 (2018) アルコール性肝障害機序の最先端. 肝臓. **59(7)**, 342-350.
- (3) Wang XD (1999) Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutr Rev*, **57(2)**, 51-59.
- (4) Clugston RD, Blaner WS (2012) The Adverse Effects of Alcohol on Vitamin A Metabolism. *Nutrients*. **4**, 356-371.
- (5) Oliveros LB, Domeniconi MA, Vega VA, Gatica LV, Brigada AM, Gimenez MS. (2007) Vitamin A deficiency modifies lipid metabolism in rat liver. *Br J Nutr*, **97(2)**, 263-272.
- (6) Bonet LM, Ribot J, Plou A (2012) Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta*. **1821**, 177-189.