

# 学位論文の要約

Preventive Effect of Antioxidative Nutrient - Rich Enteral Diet  
Against Liver Ischemia and Reperfusion Injury

(肝虚血再灌流障害に対する抗酸化栄養素強化食の保護効果)

京都大学大学院医学研究科博士課程

医学専攻 肝胆膵・移植外科学

宮内 智之

## 学位論文の要約

### Preventive Effect of Antioxidative Nutrient - Rich Enteral Diet Against Liver Ischemia and Reperfusion Injury (肝虚血再灌流障害に対する抗酸化栄養素強化食の保護効果)

#### 【背景】

肝臓手術において、虚血再灌流障害 (Ischemia and reperfusion injury; IRI) は術後肝不全や肝移植後拒絶反応のリスクとなるため克服すべき課題である<sup>1)</sup>。虚血後の臓器に血液が再灌流する際に、好中球やマクロファージが組織に浸潤し産生される活性酸素 (Reactive oxygen species; ROS)<sup>2)</sup> や炎症性サイトカイン (IL-6 や TNF $\alpha$  など) による障害が IRI の病態の一因とされる<sup>3)</sup>。生理的な状態では抗酸化物質と ROS のバランスは保たれているが、過剰な ROS 産生はこのバランスを崩し、臓器不全へと進展する<sup>4)</sup>。これまでに、酸化ストレスを主体とするさまざまな病態において、特定の栄養素の効果が検証されている<sup>5)6)</sup>。今日では、経腸栄養剤は経口摂取困難時の栄養補給に加えて、免疫賦活作用など特殊な作用を目的とした新しい栄養剤の開発が進んでおり<sup>7)</sup>、本研究では、抗酸化栄養素の経口摂取による炎症抑制作用を期待し、マウス肝 IRI への保護効果について検証することになった。

#### 【方法】

通常飼料 (Control diet) と抗酸化栄養素 (アスコルビン酸 [ビタミン C] , トコフェロール [ビタミン E] , ポリフェノール類 [カテキン, プロアントシアニジン]) を強化した抗酸化栄養素強化飼料 (Ao diet) を作成した。野生型 C57BL/6 マウスを用いて肝 IRI モデルを作成し、IR 前に各々の飼料を 7 日間与え、抗酸化物質の変化について測定した。肝 70% 部分虚血 60 分を行い、再灌流 6 時間後にサンプルを採取した。評価項目として、血清肝逸脱酵素 (AST・ALT) の測定、病学的評価・免疫染色、定量 PCR による炎症性サイトカイン・細胞接着因子・抗酸化酵素の測定、酸化ストレスとして脂質酸化を反映するマロンドアルデヒド (MDA) の測定を行ない、Ao diet を摂取した Ao diet 群と通常飼料を摂取した Control diet 群において比較検討した。統計学的有意差検定には t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありと評価した。

## 【結果】

7日間の経口摂取により、Ao diet 群で血清ビタミン C・ビタミン E の上昇を確認したが ( $p < 0.001$ )、肝組織中のポリフェノールに差を認めなかった。再灌流後 6 時間において、Ao diet 群で血清 AST・ALT 値の低下を認め ( $p < 0.05$ )、Hematoxylin & Eosin 染色にてネクロシスの抑制を認めた ( $p < 0.05$ )。また、TUNEL 染色において陽性細胞数の減少 ( $p < 0.05$ )、Western blot 法にて肝組織中 Cleaved caspase-3 の発現低下を Ao diet 群で認め、アポトーシスの抑制を確認した。Ao diet 群において、肝組織内の炎症性サイトカイン IL-6、ケモカイン CXCL1 遺伝子発現の低下を認め ( $p < 0.05$ )、抗酸化酵素である Superoxide dismutase (SOD) 1・SOD2 の上昇を認めた ( $p < 0.05$ )。Control diet 群では、IRI に伴う酸化ストレスによる肝組織 MDA の有意な上昇を認めたが、Ao diet 群では抑制された ( $p < 0.05$ )。Ao diet 群では細胞接着因子 ICAM-1 の遺伝子発現が低下しており、免疫染色にて好中球 (Ly-6G) とマクロファージ (CD68) の肝組織への浸潤の抑制を確認した ( $p < 0.05$ )。

肝 IRI では、白血球が肝組織へと浸潤し ROS や炎症性サイトカイン・ケモカインを誘導し、肝細胞死を誘導する。ビタミン C・ビタミン E の上昇によって、SOD 遺伝子発現が増加し、ICAM-1 遺伝子発現の低下を認めた。ICAM-1 の減少は白血球の肝組織への浸潤を抑制することで、IR による ROS の産生を抑制し、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制した。また、抗酸化物質と抗酸化酵素の増加は ROS を中和し、肝障害の減少へと寄与した。

## 【考察】

本研究では、IR 刺激前 7 日間の Ao diet の摂取によってビタミン C・ビタミン E の増加を認め、マウス肝 IRI に対する保護効果を認めた。ビタミン C は水溶性抗酸化物質であり、ROS 産生に対する強い抑制効果をもつ<sup>8)</sup>。マウスは L-gulonolactone oxidase の作用により、生体内でビタミン C を合成することができるが、IR においてはビタミン C・ビタミン E とともに体内で急速に消費される<sup>9)</sup>。ビタミン E は脂溶性抗酸化物質であり、細胞膜のリン脂質中に存在し、ROS によってビタミン E が還元型から酸化型へと変化し ROS を中和することで抗酸化能を発揮する<sup>10)</sup>。さらに、ビタミン C には酸化型ビタミン E を還元型へ還元する作用も有し、ビタミン C とビタミン E の抗酸化効果は相乗的なものである<sup>10)</sup>。カテキンとプロアントシアニジンも ROS に対する強い抗酸化能をもつ<sup>11) 12)</sup>。今回、経口摂取による肝組織中ポリフェノールの増加を認めなかったことは、カテキン・プロアントシアニジンとともに経口摂取での吸収率が非常に低いこと、生体内での半減期が短いことが一因であると考えられた<sup>13) 14)</sup>。

IRにおいては、ICAM-1 やセレクチンなどの細胞接着因子の発現が血管内皮細胞や白血球で増加し、肝組織への白血球の浸潤を促進する<sup>15)</sup>。ビタミン C・ビタミン E の投与によって ICAM-1 の発現が抑制されることが報告されており<sup>16)</sup>、Ao diet の摂取によって、IR による ICAM-1 発現が抑制されることが確認できた。ICAM-1 の発現低下により、好中球とマクロファージへの肝への浸潤が抑制されたと考えられ、それらが IL-6 と CXCL1 の低下につながったと推察された。IR 刺激によって、好中球とマクロファージは ROS を産生するが、SOD は superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> へと変換する。本研究では Ao diet の摂取によって、細胞質に存在する SOD1 とミトコンドリアに存在する SOD2 の増加を認め、肝組織の酸化ストレスに対する耐性の増加につながったと考えられた。MDA は脂質酸化によって合成され、細胞膜のリン脂質の酸化を反映するといわれている<sup>17)</sup>。IR 刺激前の Ao diet の摂取によって、抗酸化物質であるビタミン C・ビタミン E の増加、抗酸化酵素である SOD1・SOD2 の増加を認め、結果として、肝組織中の MDA が減少したと考えられた。

#### 【結語】

本研究において、Ao diet の摂取はビタミン C・ビタミン E の増加により、IR 刺激による酸化ストレスから肝臓を保護した。抗酸化栄養素を付加した食事により、抗酸化物質（ビタミン C・ビタミン E）が増加し、肝 IRI に対する改善効果を示した。臨床的には、術前の抗酸化栄養素の十分な摂取により、肝臓外科特有の IRI が抑制され、術後成績向上につながる可能性が期待される。

#### 引用文献

1. Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski J, Busuttil RW. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplantation Reviews* 2000;14:106-26.
2. Klune JR, Tsung A. Molecular Biology of Liver Ischemia/Reperfusion Injury: Established Mechanisms and Recent Advancements. *Surgical Clinics of North America* 2010;90:665-77.
3. Ogawa M. Mechanisms of the development of organ failure following surgical insult: the 'second attack' theory. *Clinical Intensive Care* 1996;7:34-8.
4. Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 956792
5. Abe S, Tanaka Y, Fujise N, et al. An Antioxidative Nutrient-Rich Enteral Diet Attenuates Lethal Activity and Oxidative Stress Induced by Lipopolysaccharide in

Mice. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2007;31:181-7.

6. Matsumoto S, Koga S, Kusaka J, et al. Effects of Antioxidant-Enriched Concentrated Liquid Diet ANOM on Oxidative Stress and Multiple Organ Injury in Patients with Septic Shock: A Pilot Study. *Journal of Anesthesia & Clinical Research* 2011;2:8.

7. Klek S, Sierzega M, Szybinski P, et al. The immunomodulating enteral nutrition in malnourished surgical patients - a prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 2011;30:282-8.

8. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal* 2007;274:1-22.

9. Kitamura Y, Washino Y, Koga E, et al. Oxidative Stress in the Ischemic and Non-Ischemic Parts of the Rat Liver after Two-Thirds Ischemia/Reperfusion. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2010;5:90838-1.

10. Kammerer C, Getoff N. Synergistic effect of dehydroascorbic acid and mixtures with vitamin E and beta-carotene on mitomycin C efficiency under irradiation in vitro. *In vivo (Athens, Greece)* 2004;18:795-8.

11. Rathore K, Choudhary S, Odoi A, Wang HC. Green tea catechin intervention of reactive oxygen species-mediated ERK pathway activation and chronically induced breast cell carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2012;33:174-83

12. Pinent M, Castell-Auvi A, Genovese MI, et al. Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa. *Journal of The Science of Food and Agriculture* 2016;96:178-82.

13. Zhu M, Chen Y, Li RC. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Medica* 2000;66:444-7

14. Ou K, Gu L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *Journal of Functional Foods* 2014;7:43-53.

15. Ala A, Dhillon AP, Hodgson HJ. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. *International Journal of Experimental Pathology* 2003;84:1-16.

16. Tahir M, Foley B, Pate G, et al. Impact of vitamin E and C supplementation on serum adhesion molecules in chronic degenerative aortic stenosis: a randomized controlled trial. *American Heart Journal* 2005;150:302-6.

17. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991;288:481-7.