

氏名	中村 正
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙第513号
学位授与の日付	平成27年10月6日
学位論文題名	Protective Effect of Brazilian Propolis against Liver Damage with Cholestasis in Rats Treated with $\alpha$ -Naphthylisothiocyanate 「 $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート投与ラットの肝・胆道障害に対するブラジル産プロポリスの予防効果」 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Vol.2013 ; ArticleID 302720, 14 pages, 2013. 4
指導教授	原田 信広
論文審査委員	主査 教授 吉岡 健太郎 副査 教授 片野 義明 教授 長崎 弘

## 論文内容の要旨

### 【目的】

ミツバチが作るプロポリス(PP)は抗酸化作用、抗炎症作用などを示し、実験的肝障害モデルにおいて肝細胞障害を予防することが知られている。しかし、PPが実験的肝・胆道障害に対して予防効果を示すか否かは知られていない。 $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート(ANIT)単回投与ラットでは肝臓が肥大し、肝内胆汁うっ滞を伴う肝障害が惹起される。また、この障害の発症・進展には酸化ストレス、好中球浸潤、脂質代謝異常などが関与している。そこで、本研究では実験的肝・胆道障害に対するPPの予防効果を明らかにすることを目的とし、ANIT単回投与ラットの肝・胆道障害に対するブラジル産PPエタノール抽出液(BPEE)の予防効果を調べた。また、ビタミンE(VE)はANIT肝・胆道障害ラットにおいて肝細胞障害を抗酸化作用と好中球浸潤抑制作用を介して予防することが知られているので、BPEEのANIT肝・胆道障害予防効果をVEと比較して調べた。

### 【方法】

15時間絶食させた7週齢雄性Wistar系ラットにオリーブ油で溶解したANIT(75 mg/kg体重)を腹腔内投与し、肝・胆道障害発症前の投与12時間後に5% Tween80で希釈したBPEE(25 mg、50 mg及び100 mg/kg体重)と5% Tween80-6%エタノールで希釈したVE(250 mg/kg体重)を経口投与した。ANIT投与24時間後にラットを麻酔し、下大静脈より採血した後に屠殺した。直ちに肝臓を生理食塩水で灌流、摘出し、その重量を測定した。血清は、肝細胞障害指標のトランスアミナーゼ(ASTとALT)、胆道障害指標の $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GT)、総胆汁酸(T-BA)及び総ビリルビン(T-Bil)、脂質成分の総コレステロール(T-Chol)、トリグリセリド(TG)及びリン脂質(PL)並びに過酸化脂質(LPO)の測定に用いた。肝臓は、LPO、抗酸化物質の還元型グルタチオン(GSH)、アスコルビン酸(AA)及びVE、抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラー

ゼ(CAT)及びグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-px)並びに好中球浸潤指標のミエロペルオキシダーゼ(MPO)の測定に用いた。血清と肝臓中のこれらの成分及び酵素活性は、既報の方法で測定した。また、肝臓をホルマリン固定後にパラフィン包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を行い、肝組織像を観察した。

### 【結果】

ANIT投与では、血清AST、ALT及び $\gamma$ -GT活性と共に、T-BAとT-Bil濃度が増加した。BPEE(50 mg/kg)投与は血清中のこれらの酵素活性と成分濃度の増加を抑制したのに対し、VE投与は血清ALTとAST活性の増加のみを抑制し、 $\gamma$ -GT活性やT-BAとT-Bil濃度には効果がなかった。ANIT投与で血清T-Chol、TG及びPL濃度が増加したが、これらの増加はBPEE(50 mg/kg)投与で抑制されたのに対し、VE投与では抑制されなかった。ANIT投与による相対的肝重量(g/100g体重)の増加はBPEE(50 mg/kg)投与で抑制されたが、VE投与では抑制されなかった。ANIT投与で血清と肝臓のLPO濃度と共に、肝臓中のGSHとAA濃度及びMPO活性は増加したが、SOD活性が低下した。ANIT投与による血清と肝臓のLPO濃度の増加はBPEE(50と100 mg/kg)とVE投与で抑制され、BPEE(50 mg/kg)の抑制効果はVEと同程度であった。BPEE(25、50及び100 mg/kg)投与はANIT投与による肝GSH濃度の増加を抑制し、その効果はBPEE(50及び100 mg/kg)が強かったが、VE投与はその増加を抑制しなかった。ANIT投与による肝SOD活性の減少は、各投与量のBPEE及びVE投与で抑制されたが、その効果はBPEE(50 mg/kg)が一番強かった。ANIT投与による肝MPO活性の増加はBPEE(50 mg/kg)とVE投与で抑制され、その効果はBPEEの方が若干弱かった。H-E染色した肝組織像の観察では、好中球浸潤を伴う細胞壊死がANIT投与で認められたが、その好中球浸潤をBPEE(50 mg/kg)とVE投与は同程度に軽減していた。

### 【結論】

これらの結果より、BPEEはANIT投与ラットの肝・胆道障害をVEよりも効果的に予防することが明らかとなった。また、BPEEのANIT肝・胆道障害予防効果は酸化ストレス、好中球浸潤、脂質代謝異常、肝肥大などに対する抑制作用によることが示唆された。しかし、BPEEは高投与量では逆にANIT肝・胆道障害予防効果を減弱することが明らかとなった。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、ブラジル産プロポリスエタノール抽出液(BPEE)が $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート(ANIT)単回投与ラットの肝細胞障害をビタミンE(VE)と同様に予防することを示した。また、ANITによる胆道障害を、VEは予防しないが、BPEEは予防することを示した。肝臓中の過酸化脂質(LPO)、抗酸化物質の還元型グルタチオン(GSH)、アスコルビン酸(AA)、VE、抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)及びグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-px)及び好中球浸潤指標のミエロペルオキシダーゼ(MPO)を測定することにより、BPEEはVEと同様にANITによるLPO、MPOの上昇、SOD低下を抑制し、さらにVEでは見られないGSHの上昇抑制などの作用が示された。これらの結果よりBPEEによるANIT肝・胆道障害予防効果は酸化ストレス、好中球浸潤、脂質代謝異常などに対する抑制作用によることが示唆された。しかし、BPEEは高投与量では逆にANIT肝・胆道障害予防効果を減弱することも明らかとなった。

以上より、本論文はBPEEのVEとは異なるANIT肝・胆道障害予防効果を明らかにし、肝臓中の各種の抗酸化物質などを測定することによるメカニズムの解明にも貢献しており、学位論文に値するものと判断した。