

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590681

研究課題名(和文) 脳内でアセトアルデヒドは産生するのか？

研究課題名(英文) Is there some acetaldehyde formation in the brain?

研究代表者

飴野 清 (AMENO KIYOSHI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：50019626

研究成果の概要(和文)：

高アセトアルデヒド(AcH)産生ラットおよびALDH2 ノックアウトマウスを用い、エタノール投与するとAcHが血中には高濃度、脳内はその1/5-1/8 検出され、カタラーゼ活性阻害剤前処理は、脳内AcH濃度を低くする。脳内ではカタラーゼ介してAcH産生があることを強く支持している。ALDH2 ノックアウトマウスでは、AcHは脳のコリン作動性神経系に関連する酵素活性のmRNA発現を阻害する。

研究成果の概要(英文)：

After ethanol dosing to high acetaldehyde (ethanol metabolite) formation model (HAF) rats and aldehyde dehydrogenase 2 knockout (ALDH2-KO) mice, following results were obtained. 1. High acetaldehyde (AcH) levels were detected in the both HAF rats and ALDH2-KO mice, 2. the brain AcH levels were 1/5th-1/8th of the blood, 3. brain AcH levels of the HAF rats and ALDH2-KO mice pretreated with catalase inhibitors (sodium azide or 3-amino-1, 2, 4-triazole) were lower than those without pretreatment and 4. AcH reduced the mRNA expression of brain cholinergic markers in ALDH2-KO mice. These results suggested that AcH formation are performed in vivo brain through catalase activity and brain AcH has effects on brain cholinergic nerve neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：脳、エタノール、アセトアルデヒド、酢酸、カタラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ-2 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

日本人の約半数がアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH)2 不活性型で飲酒後高濃度のアセトアルデヒド (AcH) を血中に検出すること、AcH が顔面紅潮や種々の不快な症状や病態生理学的な影響を及ぼすことはよく知られている。脳内での AcH アダクトの生成などの中枢神経系への影響も報告され、*in vitro* の動物実験からは脳内で AcH は検出されること、アルコールが脳内 catalase により代謝され、AcH の産生されることが示唆されていたが、生体での *in vivo* 実験での証明はない。

2. 研究の目的

アルコール投与後の脳内の AcH の動態、catalase によるアルコール代謝の有無、脳内での AcH 産生の有無をフリーミングでの *in vivo* 実験で確認し、この AcH がコリン作動性神経伝系への影響、程度を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物は Wister 系ラットに Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 阻害剤の cyanamide を前投与して作成した高アセトアルデヒド産生モデル (HAF) および無処置のラット、ALDH2 ノックアウト (ALDH2-KO) マウスや野生型 (ALDH2-WT) マウスを使用した。

(2) 血液試料はラットの大腿動脈にカニューレーションをしたものから経時的に、マウスは断頭後の血液を採取した。脳透析液はラット、マウスともに、脳線条体に脳透析膜を留置し、微小循環法で採取した。

(3) エタノールは 20% エタノール (2g/kg) を腹腔内投与した。Catalase 活性阻害剤の Sodium azide (AZ), 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT) 10mg/kg あるいは Alcohol dehydrogenase 活性阻害剤の 4-methylpyrazole (4-MP) をエタノール投与前 30 分に投与し、実験に供した。

(4) ALDH2-KO および ALDH2-WT にエタノール 2g/kg あるいは 4g/kg 投与後 40 分ないし 120 分に断頭し、前頭皮質におけるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) およびアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を採取し、その mRNA 発現を RT-PCR 法で測定した。

(5) エタノールおよび AcH は Head-space GC 法で測定した。

4. 研究成果

(1) HAF ラット、ALDH2-KO マウスにエタノールを投与するとは Wister 系ラットおよび ALDH2-WT マウスに比較して、エタノールおよび代謝産物 (AcH および酢酸) 濃度について次のような結果を得た。

① HAF ラット、ALDH2-KO マウスでは、Wister 系ラットおよび ALDH2-WT マウスに比較して、エタノールの血中ピーク濃度に差はないものの、濃度低下は遅延した。

② HAF ラット、ALDH2-KO マウスでは、Wister 系ラットおよび ALDH2-WT マウスに比較して、血中には高濃度の AcH 濃度が検出された。

③ ALDH2-KO マウスの血中酢酸濃度は ALDH2-WT マウスに比較して低濃度であった。

図 1 には ALDH2-KO および ALDH2-WT マウスの結果を示す。

上記の結果は、エタノールの代謝系の諸酵素のうち ALDH 活性の低下、あるいは ALDH2 活性の欠損により AcH 代謝が抑制されてエタノールそのものの代謝遅延が起き、高 AcH 産生がみられとする従来の報告を支持した。さらに、AcH 代謝が抑制された結果として AcH 代謝産物の酢酸濃度の低下のあることも確認した。ALDH 活性の低下あるいは ALDH2 の欠損することにより、エタノール代謝の全過程におけるエタノールそのもの、代謝産物の AcH、酢酸の動態を明らかにした。

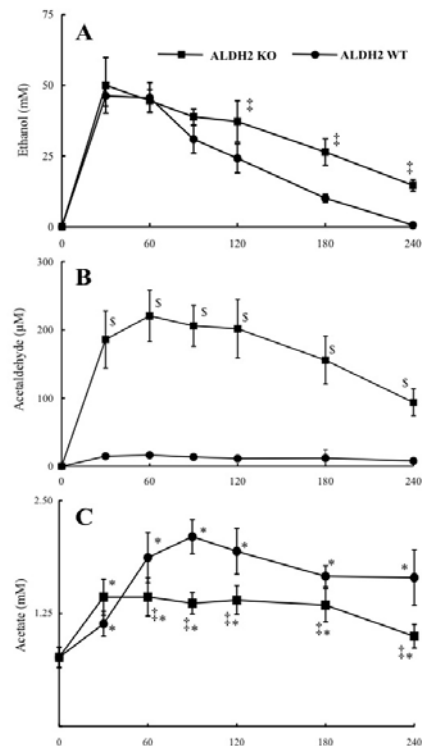


図 1. ALDH2-KO および ALDH2-WT マウスにエタノール 2g/kg 投与後の血中エタノール、アセトアルデヒドおよび酢酸濃度。

④ WisterラットおよびALDH2-WTおよび、HAFラットおよび、ALDH2-KOマウスでは、エタノール投与後の脳透析液中エタノール濃度は血中濃度とほぼ同濃度であり、濃度低下もほぼ同様の結果を示した。

WisterラットおよびALDH2-WTマウスでは、エタノール投与後の脳透析液中のAcH濃度も血液同様にほとんど検出されなかった。一方、HAFラットではエタノール投与後の脳透析液中にはAcHを検出したが、その濃度は血中濃度の約1/5であった。また、ALDH2-KOマウスではエタノール投与後の脳透析液中にはAcHを検出したが、その濃度は血中濃度の約1/8であった。

HAFラットではALDH活性全てが阻害されず一部残存しており、脳脊髄関門にもALDH活性が一部存在し、また、ALDH2-KOマウスではALDH2活性のみが欠損しており、脳脊髄関門にはその他のALDH活性が存在する。したがって、これらのALDHにより、血中のAcHが脳内に分布する際に代謝され、脳内AcH濃度が低くなったものと考えられる。

表1にはALDH2-KOおよびALDH2-WTにエタノール投与時の脳透析液エタノールおよびAcH濃度を示す。ALDH2-KOマウスにのみ脳透析液中にAcHが検出され、その濃度は血中濃度の約1/8であった。

表1. ALDH2KOおよびALDH2-WTにエタノール投与時の脳透析液エタノールおよびAcH濃度.

After EtOH dosing	Strains	EtOH (mM)	AcH (μM)
40 min	ALDH2 -KO	38.9 ± 3.5	28.4 ± 3.1
	ALDH2 -WT	34.6 ± 3.2	ND
120 min	ALDH2 -KO	30.4# ± 2.3	24.6 ± 3.4
	ALDH2 -WT	23.2 ± 1.9	ND

(2)HAFラットに catalase 活性の阻害剤である AZあるいはATを前投与すると脳内エ

タノール濃度に有意差を認めなかったものの、脳透析液中のピーク AcH 濃度は、AZ あるいは AT 非投与の HAF ラットは 192 ± 19.4 μM、AZ あるいは AT 前投与の HAF ラットは約 129.3 ± 12.41 μM、4-MP を前投与したラットが約 76.9 ± 7.3 μM であった。Catalase 活性阻害剤投与により、明らかに脳透析液中の AcH 濃度が低下した。このことは、AT あるいは AZ 前投与により脳内の catalase 活性が低下し、エタノール代謝が抑制され、その結果として AcH 産生が低くなったものと考えられる。また、AZ を前投与した ALDH2-KO マウスにエタノールを投与すると、脳内の AcH 濃度は 28.4 ± 3.1 μM、AZ 投与群では 20.4 ± 3.5 μM と低い濃度を呈した。この結果は HAF ラットでの結果と一致する。

これら in vivo の結果は、脳内では catalase 活性によりエタノール代謝があり、AcH 産生とする in vitro 実験の報告を支持する。

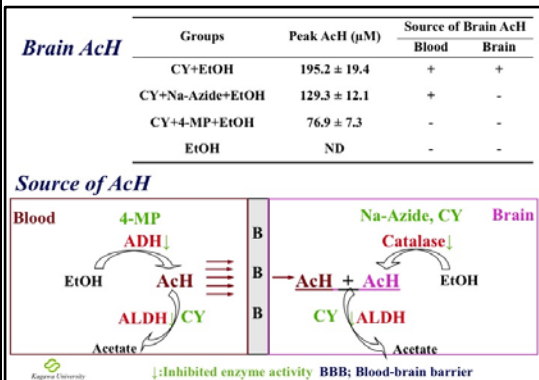


図 2. HAF および Wister ラットにおけるエタノール投与後の脳透析液中のピーク AcH 濃度 (上) および脳 AcH の由来、およびそれらに関連するアルコール代謝関連酵素についての模式図 (下) .

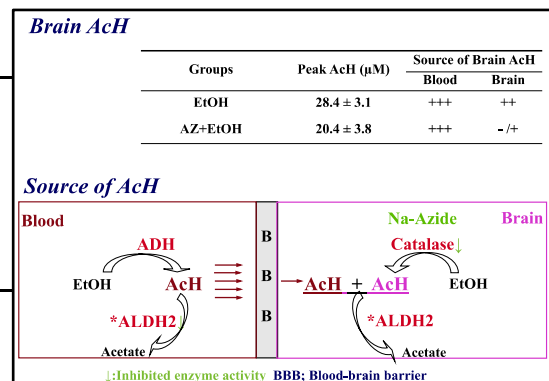


図 3. ALDH2-KO マウスにおけるエタノール投与後の脳透析液中のピーク AcH 濃度 (上)、脳 AcH およびそれらに関連するアルコール代謝関連酵素についての相関図諸酵素の AcH の由来についての模式図 (下) .

HAF ラットあるいは ALDH2-KO マウスでは、エタノール投与後に肝臓で産生した AcH が血流を介して全身に分布する。一方、HAF ラットの ALDH 活性が全て阻害されずに一部残存しており BBB にも残存しているといえ、また、ALDH2-KO マウスでも、ALDH2 のみが欠損しており、その他の ALDH の isozyme があり、それらの活性は残存し、脳脊髄液関門にも ALDH 活性は存在するといえる。BBB に分布した AcH はこれらの ALDH により代謝され、脳内には極めて低濃度の AcH が分布することになったといえる。

さらに、脳内ではエタノールが catalase により代謝され AcH を産生するが、catalase 活性が阻害剤により低下するとエタノール代謝の抑制、その結果としての AcH 産生の低下があったものと考えられる。

これらを総合的に考えると、脳内の AcH は脳内の catalase によるエタノール代謝の結果 AcH が産生し、さらに血中 AcH 由来のものも加わったものと考えられる。

(3)ALDH2-WT ではエタノール 4g/kg 投与後においてのみ ChAT mRNA および AChE mRNA の発現は有意に低下したが、ALDH2-KO マウスではエタノール 2g/kg、4g/kg においても 40 分後および 120 分後の ChAT mRNA および AChE mRNA の発現は有意に低下し、その程度は ALDH2-WT に比較して著明であった。これらの結果は高濃度のエタノール、あるいはエタノールが低濃度でも AcH が加わると中枢神経系のコリン作動性神経系の受容体レベルでの影響があることを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Jamal M, Ameno K, Miki T, Tanaka N, Ohkubo E, Kinoshita H. Effects of systemic nicotine, alcohol or their combination on cholinergic markers in the frontal cortex and hippocampus of rat. *Neurochem Res*, 2010; 35:1064-1070. 査読有
- ② Jamal M, Ameno K, Miki T, Wang W, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I, Kinoshita H. Cholinergic alterations following alcohol exposure in the frontal cortex of Aldh2-deficient mice models. *Brain Res*, 2009; 1259: 37-46. 査読有
- ③ Ameno K, Wang W, Jamal M, Kumihashi M, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I, Kinoshita H. Ethanol metabolism in ALDH2 knockout mice. *Leg Med*. 2009; 11: S413-415. 査

読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① Jamal M, Ameno K, Ono J, Sultana R, Shirakami G, Ijiri I, Kinoshita H. Acute alcohol effects and role of acetaldehyde in memory in mice models. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA). 2010, Sep, 13-16, Paris.
- ② Sultana R, Ameno K, Jamal M, Ohkubo E, Tanaka N, Kinoshita H. Effects of acute ethanol and nicotine on radial-arm maze performance in mice models. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA). 2010; Sep, 13-16, Paris.
- ③ Jamal M, Ameno K, Ohkubo E, Tanaka N, Kinoshita H. Acute alcohol exposure in mice models: impact on memory. 第 94 次日本法医学会総会. 2010, 6 月、23-25 日、東京.
- ④ Ameno K, Jamal M, Kumihashi M, Ijiri I, Kinoshita H. Origin of Acetaldehyde after Ethanol Dosing. The International Association of Forensic Toxicologist (TIAFT) 47th, 2009, August、23-27, Geneva. (Switzerland)
- ⑤ ジャマール モストファ, 飴野 清, 組橋 充, スルタナ ルビー, 井尻 巖, 木下博之: 記憶, 学習機能へのアルコール投与の影響 -ALDH2 と ApoE ノックアウトマウスを用いた実験的研究. 第 93 次日本法医学会学術全国集会. 2009 年 5 月 13 日-15 日、大阪.
- ⑥ Jamal M, Ameno K, Uekita I, Wang W, Kumihashi M, Badiuzzaman S, Ijiri I. Acetaldehyde-induced changes in cholinergic function in the frontal cortex of ALDH2 transgenic mice (3rd). The 7th International symposium advances in Legal Medicine. 2008, Sep, 1-5, Osaka.
- ⑦ Ameno K, Wang W, Uekita I, Jamal M, Kumihashi M, Isse T, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama K, Ijiri I. Ethanol metabolism in ALDH2 knockout mice. The 7th international symposium advances in Legal Medicine, 2008, Sep, 1-5, Osaka.
- ⑧ Jamal M, Ameno K, Uekita I, Wang W, Kumihashi M, Ijiri I. Acetaldehyde-induced changes in cholinergic function in the frontal cortex of ALDH2 transgenic mice. 第 92 次日本法医学会総会. 2008 年, 4 月、23 日-25 日、長崎.
- ⑨ Jamal M, Ameno K, Uekita I, Kumihashi M, Wang W, Ijiri I. Role of catalase in mediating acetaldehyde production in

the striatum of free-moving rats. 第92次日本法医学会総会. 2008年4月23日-25日、長崎.

⑩ Jamal M, Uekita I, Kumihashi M, Ijiri I, Ameno K. Cholinergic changes following exposure to nicotine, ethanol, or both combined in the frontal cortex and hippocampus of rat. 第11回ニコチン・薬物依存研究フォーラム. 2008年9月18日-19日, 横浜.

⑪ Jamal M, Uekita I, Kumihashi M, Ijiri I, Ameno K. Effects of systemic nicotine or alcohol on cholinergic function in the rat brain are prevented by co-administration. 第25回日本法医学会中四国地方会. 2008年10月18日、米子.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飴野 清 (AMENO KIYOSHI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：50019626

(2) 研究分担者

木下博之 (KINOSHITA HIROSHI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：00284357

ジャマール モストファ (JAMAL MOSTOFA)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：50418802

上北育男 (UEKITA IKUO)
兵庫県立姫路循環器病センター・医長
(H20-H21)
研究者番号：60380151

(3) 連携研究者

井尻 巖 (IJIRI IWAO)
香川大学・医学部・名誉教授、大林第二病院・副院長
(H20-H21)
研究者番号：90113183