

平成10年度厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

研 究 報 告 書

加齢及び加齢関連疾患に対する薬物による干渉に関する実験的研究

主任研究者 木 谷 健 一

国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長

# 目 次

## 統括研究報告書

木谷 健一 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長)

加齢及び加齢関連疾患に対する薬物による干渉に関する実験的研究・・・・・・・・・・ 1

## 分担研究報告書

木谷 健一 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長)

デプレニル及びラサジリンその他の薬物の加齢齧歯類の寿命に対する薬理効果と  
その作用機序, 特に脳内抗酸化酵素活性上昇の意義・・・・・・・・・・ 13

丸山 和佳子 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老化機構研究部 室長)

パーキンソニズム惹起性神経毒によるアポトーシスモデルを用いた抗アポトーシ  
ス薬の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

道川 誠 (国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長)

コレステロール合成抑制により誘導される神経細胞死 -アルツハイマー病発症  
に果たすアポリポプロテインEの分子機構の検討-・・・・・・・・・・ 25

井上 正康 (大阪市立大学 医学部 教授)

組織特異活性酸素制御法の開発と血管源性加齢病態の解明・・・・・・・・・・ 29

杉山 雄一 (東京大学大学院 薬学系研究科 教授)

血液脳関門を介した脳へのドラッグデリバリーの開発・・・・・・・・・・ 35

大澤 俊彦 (名古屋大学大学院 生命農学研究科 教授)

食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

加齢及び加齢関連疾患に対する薬物による干渉に関する実験的研究

主任研究者 木谷 健一 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長

研究要旨 インド料理香辛料ターメリックの黄色色素クルクミン (C) 及びそのテトラヒドロ体 (TC) の経口投与はマウスにおいて実験大腸癌・肺癌の発生を抑制し、CよりTCがその効果が強かった。セサミノール配糖体投与は家兎における動脈硬化形成防止効果を認めた（大澤）。デプレニルの適量の長期投与は、ラット、マウスの生存曲線延長効果傾向をもたらしたが、過少量・過剰量はその効果を失った。又ラサジリンにもデプレニルに似た抗酸化酵素活性上昇の効果を確認した（木谷）。活性酸素代謝は *in vivo* でエネルギー代謝を制御する因子であること、これに付随する酸化ストレスが各レベルでの加齢性変化の原動力であることを示した。（井上）。脳内在性神経毒素 N-methyl (R) salsolinol (NMS) はパーキンソン病の原因物質である可能性、及びドーパミン作動性細胞のアポトーシスのモデル薬となること、デプレニルを含むプロバジラミン類に抗アポトーシス効果を見出した（丸山）。ApoE4により誘導される神経細胞死にはコレステロール代謝とコレステロール濃度の低下が必須条件であることを示した（道川）。薬物の脳、血液、脳関門に存在する新しい有機陰イオントランスポーターのクローニグを試みその機能解析を行った（杉山）。

分担研究者 丸山 和佳子  
国立中部病院  
長寿医療研究センター  
老化機構研究部 室長

分担研究者 井上 正康  
大阪市立大学 医学部 教授

分担研究者 杉山 雄一  
東京大学大学院薬学部 教授

分担研究者 道川 誠  
国立中部病院  
長寿医療研究センター  
痴呆疾患研究部 室長

分担研究者 大澤 俊彦  
名古屋大学大学院  
生命農学研究科 教授

## A. 研究目的

加齢（老化）及び加齢関連疾患（いわゆる老年病）の発症機序に対する酸化ストレスの役割が次第に強調されてきているがその直接証明は容易でない。本研究では、酸化ストレスの作用機序の解明に努めると共に逆に抗酸化剤の効果を検討することにより酸化ストレスの役割を明らかにすることを目的としている。これらの抗酸化ストラテジーの部分的な成功すら、加齢のフリーラジカル説の間接的証明となると共に現実的に加齢関連疾患の予防及び治療に結びつきうるものであり実際的なアプローチとして極めて必要性が高い。

## B. 研究方法

マウス（BDF1）、ラット（F-344）を用い、異なった投与量のデプレニルを18月齢より週3回皮下注射し、その生存曲線を生食投与の対象群と比較し、一部ではと殺後脳内スーパーオキシドディスムターズ（SOD）、カタレーズ（CAT）活性を測定した。他にラジサリンの抗酸化酵素活性への効果及びBN/Biラット脳の酵素活性の加齢変化を検討した。更にウルソデオキシコール酸（UDCA）の肝内CAT、GST活性に対する効果を若（27月齢）若（7月齢）C57BLマウスで検討した（木谷）。

マウスを用いて1,2-ジメチルヒドラジン、アゾキシメタンによる長期発癌実験に対するクルクミンの介入実験を行った。同様に1%コレステロール投与家兔に発症する動脈硬化症に対する用いて、セサミノールの効果を検討した（大澤）。

生体エネルギー代謝を活性酵素クロストークが制御する様相を分子、ミトコンドリア（Mt）、細胞及び組織各レベルでオキシメーター及びESRによる酵素関連代謝を中心に解析した（井上）。ヒトドーパミン

神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞をNMSで処理、コメットアッセイにてDNA損傷と細胞死を定量した。デプレニルによりあらかじめ培養系を処理した後にNMSを与え、そのアポトーシス効防止効果を検討した（丸山）。ラット胎児脳より調整した神経細胞培養系を作り、ApoE3, ApoE4, compactin,  $\beta$ -VLDL及びその組合せを培養系に作用させ、その細胞死への影響を調べた（道川）。血管・脳関門を生理的に通過せうるdrug delivery system（DDS）を開発のため血液脳内関門に存在する有機アニオントランスポーター（OAT）の同定を行った（杉山）。

## C. 研究結果

BDF1雄ラットに18月齢より0.5mg/kg（週3回）を皮下投与した群は22月齢を過ぎ、デプレニル群の生存曲線延長傾向が明らかとなった。しかし、0.25mg/kgのマウスでは対照群との間に全く差が見られない。さらにF-344雄ラットに有効と我々が報告した（Kitani *et al.* Life Sci, 1993）用量の2倍量（1.0mg/kg, 週3回）を18月齢より投与したラットでは31月齢にもその生存率が対照群7/12 vs デプレニル3/12と逆転した。この時点で生存ラットをと殺した脳抗酸化酵素活性を調べると対照群と投与群で全く差がなかった。これに対し、27月齢雄に1ヶ月投与した場合、0.25から2.0mg/kgの用量範囲で活性は上昇していた。若齢雄F-344ラット（8.5月齢）を用いた実験ではラジサリンの3.5週間皮下持続注入がデプレニル同様脳ドーパミン作動性組織（黒質、線状体など）のCAT、SOD活性を2~5倍上昇させることを確認した。ウルソ4週投与は若齢（7月齢）高齢（27月齢）マウス肝に有意かつ同程度（40%、30%）のGST活性を上昇させたが、若齢群では肝

CAT活性はむしろ低下した（木谷）。

ジメチルヒドラジン及びアゾキシメタンによるマウスにおける大腸癌、肺癌の発生率はクルクミン、テトラヒドロクルクミン0.5%含有食投与により有意に低下した。セサミノール配糖体（1%）含有食を投与した家兎ではコレステロール1%含有食による動脈硬化巣形成を有意に抑制した（大澤）。

生体内ではNOとスーパーオキシドを主体とした酸素ラジカル間のクロストークは血流を介して本代謝をポジティブに、またMt内代謝をネガティブに制御し、両者が精密なバイオリアクターとして働いていることがわかった。また、この代謝の歪みが高血圧症・動脈硬化症の病因に深く関与することが判明した（井上）。

内因性毒素（NMS）は培養神経細胞に致死効果をもち、かつその細胞死はアポトーシスと判断された。デプレニル前投与はNMSによる神経細胞死に対し極めて強力な防御効果を示した（丸山）。

ApoE3, ApoE4, compactin その他の各要素のうち神経細胞死をもたらす組合せはApoE4+ $\beta$  VLDL+compactinの場合のみであり、ApoE4のもつ潜在的な神経細胞毒性がコレステロール合成低下によるコレステロール濃度低下という要素と相まって神経細胞死を引き起こすことが判明した（道川）。

ラット脈絡叢、脳に新しい有機陰イオントランスポーターの存在を明らかにした。このトランスポーターは有機陰イオン特異的でNa<sup>+</sup>非依存、かつ、その取り込みが飽和性であることを証明した（杉山）。

#### D. 考察

加齢・加齢関連疾患の病因にフリーラジカルが関与すると唱えられてから約半世紀が過ぎ、その可能性は次第に現実的なもの

となってきたが、なお、生体内での作用機序の詳細は不明である。本班研究では井上が*in vivo*におけるスーパーオキシドを主とする活性酸素とNOのクロストークが血液循環動態やエネルギー代謝を部位特異的に制御するスーパーシステムを形成していること又そのバランスの歪みが種々の病態を引き起こすことを示した。この結果から加齢関連疾患が極めて長期の歪みの連続により起こると考えると、その対策は抗酸化物質を長期間食品に添加するか、食品内抗酸化物の摂取が有効であろうと予想している。事実、大澤により食品内抗酸化物による発癌、動脈硬化予防に極めて明確な有効性が実験的に示され、この方向にある更に多くの可能性を追求する重要性が示された。内因性酸化酵素を修飾するデプレニルやラサジリンの動物寿命に対する効果、特にその機序は尚不明な点が多く、更に検討の余地が残されているが、脳組織の酸化ストレス戦略としては抗酸化物質投与による第1の方法が血液・脳関門の存在のため限界のある現在、それを補う酸化ストレス戦略として更に追求すべきテーマと考えられる。特にデプレニルをはじめとする多くのアリファティックプロピラミン類はそれ自体極性が低く、血管・脳関門を通過しえ、既にパーキンソン病の治療にも用いられ、人への使用が可能な薬物である。その抗アポトーシス効果と共に生存曲線延長効果の機序は更に検討に値しよう。

道川の研究はApoE4のリスクファクターとしての作用はコレステロール濃度低下により引き起こされるというアルツハイマー病の病因論としても極めて興味あるモデルであるが、このプロジェクト内ではむしろ特異な神経細胞死の*in vitro*モデルとして、将来種々の薬物の薬効スクリーニングに応用され得よう。最後の杉山によるDDSの

完成は容易でないが、脳・神経系の抗酸化戦略としては何としても解決すべき重要問題であり、杉山らが初めて明らかにした脈絡叢における有機イオントランスポーターは本研究がその方向に数歩踏み出すものと考えられる。

#### E. 結論

井上の *in vivo* 実験の結果にも示されるように酸化組織障害が多くの人病の原因となっている可能性は益々たかまってきたが、一方 NO との微妙なクロストークが明らかとなり、抗酸化戦略にもより高度のものが求められる。しかし、大澤の試みの成功は多くの食物中の抗酸化物質からの *nutriceuticals* の開発の重要であることを強調すると共にこれらを含む食物の摂取の意義についても、より科学的な根拠をもたらした。デプレニルより代表される一連のアリファティックプロパジラミンの多様な薬理作用は将来加齢・加齢関連疾患に対し、より高度の薬理学的戦略をもたらそう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

W. Maruyama, T. Abe, H. Tohgi, M. Naoi: Endogenous MPTP-like dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in the cerebrospinal fluid decreases with progression of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* in press.

W. Maruyama, T. Takahashi, M. Naoi: (-)Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxynitrite and nitric oxide. *Mechanism of Aging and Development* in press.

M. Naoi, W. Maruyama: Cell death of dopamine neurons in aging and

Parkinson's disease. *Mechanism of Aging and Development* in press.

W. Maruyama, M. Strolin-Benedetti, M. Naoi: N-Methyl(R)salsolinol and a neutral N-methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease. *Neurobiology* in press.

M. Naoi, W. Maruyama, K. Yagi, M. B. H. Youdi: Anti-apoptotic function of L-(-)deprenyl (selegiline) and related compounds. *Neurobiology*, in press.

Michikawa M. and Yanagisawa K: Deficiency of cholesterol and not of nonsterol isoprenoid products causes neuronal cell death induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Neurochem.* (in press).

Owada K., Sanjo N., Kobayashi T., Kamata T., Mizusawa H., Muramatsu H., Muramatsu T., and Michikawa M. Midkine inhibits apoptosis via ERK activation in PC12 cells. *Bull Tokyo Med Dent Univ* (in press).

Michikawa M. and Yanagisawa K. Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. *Mechanisms of Aging and Development* (in press).

道川 誠 アルツハイマー病研究の動向  
神経細胞に対するアポリポ蛋白 E の作用  
医学の歩み (印刷中)

Zs.-Nagy I, Tanaka S and Kitani K. Age-dependence of the lateral diffusion coefficient of the Con-A-receptors in the plasma membrane of *ex vivo* prepared brain cortical cells of BN/Bi RjHsd rats. *Exp Brain Res*, 1999, 124:233-240.

Kitani K, Lateral mobility of proteins and lipids of cell surface membranes during aging: do the data support 'The Membrane Hypothesis of Aging'? *Mech Ageing Dev* (in press), 1999.

- H. Kusuvara, T. Sekine, N. Utsunomiya-Tate, M. Tsuda, R. Kojima, S.H. Cha, Y. Sugiyama, Y. Kanai and H. Endou: Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* in press
- Kitani K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Assessing the effects of deprenyl on longevity and antioxidant defenses in different animal models. *Ann New York Acad Sci.* 1998, 854 : 291-306.
- Kitani K Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part I: Supplementations with chemicals, pharmaceuticals and nutrients (nutriceuticals), Proceedings of the Annual Meeting of the Korean Gerontological Societies for 1998, pp. 9-15.
- Kitani K Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part II: Pharmacological modification of endogenous antioxidative machineries. Proceedings of the Annual Meeting of the Korean Gerontological Societies for 1998, pp. 85-97.
- Kitani K and Zs.-Nagy I. Effect of spironolactone on lateral mobility of lipids in hepatocyte plasma membranes in the rat. *Hepatol Res.* 1998, 12:131-139.
- Kitani K, Tanaka S and Zs.-Nagy I. Age dependence of the lateral diffusion coefficient of lipids and proteins in the hepatocyte plasma membrane of BN/BiRijHsd rats as revealed by the smear-FRAP technique. *Arch Geront Geriatr* 1998, 26:257-273.
- Zs.-Nagy I, Tanaka S and Kitani K. Age-dependence of the lateral diffusion coefficient of Con-A-receptor protein in the skeletal muscle membrane of C57BL/6J mice. *Mech Ageing Dev.* 1998, 101: 257-268.
- 老人は薬になぜ弱く, どう弱いのか 臨床精神薬理 1:987-995, 1998.  
胆汁酸 肝臓病学 Basic Science, 戸田剛太郎, 他編, 医学書院, 東京 pp. 455-461, 1998.
- 高齢者介護総論: 高齢者の身体的・精神的な特徴と高齢期に多い疾病及び障害 介護支援専門員 標準テキスト 1:197-232, 1998.
- 老化とは—その機序に関する最近の知見 イラスト医学&サイエンスシリーズ: 老化のしくみと疾患 12-20, 1998.
- 長寿科学研究における実験動物の役割 -- その限界 (limitation) と可能性 (potentiality) 実験動物 47:3-10, 1998.
- 基礎老化研究の総合戦略 Geriatr Med 36:27-33, 1998.
- M. Umeda, S. Aoyama, T. Kaiya, K. Kohda, W. Maruyama, M. Naoi: Oxidation of 1-amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a 1-amino analog of MPTP by type A and type B monoamine oxidase. *J. Neural Transm.* 105: 1253-1264, 1998
- Y. Kato, W. Maruyama, M. Naoi, Y. Hashizume, T. Osawa: Immunohistochemical detection of dityrosine in lipofuscin pigments in the aged human brain. *FEBS Lett.* 439: 231 - 234, 1998.
- K. Kohda, Y. Noda, S. Aoyama, M. Umeda, T. Sumino, W. Maruyama, M. Naoi: Cytotoxicity of 1-amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenylpyridinium ion, 1-amino analogues of MPTP and MPP+, to clonal pheochromocytoma PC12 cells. *Chemical Research in Toxicology* 11: 1249-1253, 1998
- N. Morikawa, M. Naoi, W. Maruyama, S. Ohta, Y. Kotake, H. Kawai, T. Niwa, P. Dostert, Y. Mizuno: Effects of various

tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and the electron transfer complexes.  
J. Neural Transm. 105:677-688 1998

C. Minami, Y. Deng, W. Maruyama, T. Takahashi, M. Kawai, D. Nakahara, M. Naoi: Generation of reactive oxygen species accounts for cytotoxicity of an endogenous dopaminergic neurotoxin, (R)-N-methylsalsolinol, to differentiated dopaminergic SH-SY5Y cells. J Neural Transm. 105: 397-405 1998

W. Maruyama, T. Takahashi, M. Naoi: (-)-Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxynitrite and nitric oxide. J. Neurochem. 70:2510-2515, 1998

M. Naoi, W. Maruyama, T. Kasamatsu, P. Dostert: Oxidation of N-methyl(R)salsolinol : Involvement to neurotoxicity and neuroprotection by endogenous catechol isoquinolines. J. Neural Transm. [Suppl] 52:125-138, 1998

M. Naoi, W. Maruyama, N. Nakao, T. Ibi, K. Sahashi, M. Strolin Benedetti: (R)Salsolinol N-methyltransferase activity increases in parkinsonian lymphocytes. Ann. Neurol. 43:212-216, 1998

丸山和佳子、直井 信 : ヒト脳内在性物質、N-methyl(R)salsolinol はドーパミン細胞にアポトーシスを惹起する Progress in Medicine 18: 1425-1432, 1998

M. Naoi and W. Maruyama: N-Methyl(R)salsolinol, and endogenous MPTP-like dopamine neurotoxin and its relevance to Parkinson's disease. Advances in Neurology in press G. Stern (Eds) Lippincott-Raven, Philadelphia

M. Naoi, W. Maruyama, K. Matsubara,

K. Tipton, M. Strolin Benedetti, H. Parvez: Analysis of endogenous neurotoxins, salsolinol derivatives, in human materials for the study on pathogenesis of neurodegenerative disorders. Progress in HPLC-HPCE Vol 7: pp 413-460, Neurochemical markers of Degenerative Nervous Diseases and Drug Addiction A. G. Qureshi, H. Parvez, P. Caudy and S. Parvez (eds), VSP press, Utrecht-Tokyo, 1998

W. Maruyama and M. Naoi: Studies on neuronal apoptosis using a comet assay and cultured cells. Progress in HPLC-HPCE Vol 7: pp781-816, Neurochemical markers of Degenerative Nervous Diseases and Drug Addiction A. G. Qureshi, H. Parvez, P. Caudy and S. Parvez (eds), VSP press, Utrecht-Tokyo, 1998

M. Naoi and W. Maruyama: N-Methyl(R)salsolinol and (R)salsolinol N-methyltransferase as possible pathogenic factors in Parkinson's disease. Progress in Alzheimers and Parkinson's disease: pp 413-420 A. Fisher, M. Yoshida and I. Hanin (Eds), Plenum Publisher, New York, 1998

W. Maruyama and M. Naoi: N-Methyl(R)salsolinol, a neurotoxin candidate to induce Parkinson's disease, caused apoptosis in dopamine cells. Progress in Alzheimers and Parkinson's disease: pp 105-112 A. Fisher, M. Yoshida and I. Hanin (Eds), Plenum Publisher, New York, 1998

W. Maruyama and M. Naoi: Quantitative analysis of apoptotic neuronal cell death by single cell gel electrophoresis assay. Advances in Molecular Toxicology : pp 35-51 C. Reiss, S. Parvez, G. Labbe and H. Parvez (Eds), VSP press, Utrecht, 1998

M. Naoi and W. Maruyama: Cytotoxicity of an endogenous



- dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol; Relevance to Parkinson's disease. *Advances in Molecular Toxicology* : pp 339-355  
C. Reiss, S. Parvez, G. Labbe and H. Parvez (Eds), VSP press, Utrecht-Tokyo, 1998
- M. Naoi, W. Maruyama, P. Dostert: An animal model of Parkinson's disease prepared by endogenous N-methyl-(R)salsolinol. *Handbook of Endogenous Neurotoxins*: pp 41-61 A. Moser (Eds), Birkhaeuser, Berlin, 1998
- 直井 信、丸山和佳子 : 黒質に選択的な神経毒の代謝酵素は Parkinson 病の内因か医学のあゆみ 別冊 95-101, 1998
- 直井 信、丸山和佳子 : 黒質ドーパミン細胞に選択的な神経毒は存在するのか? *Pharma Medica* vol 16, No10, 47-53, 1998
- Michikawa M. and Yanagisawa K  
holesterol biosynthesis is critical for apolipoprotein E4-induced neuronal cell death. *J Neurosci Res*.4: 58-67, 1998.
- Mizuno. T., Haars C., Michikawa M. and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid  $\beta$ -protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells. *Biochem Biophys Acta* 1373: 119-130, 1998.
- Sanjo N., Owada K., Kobayashi T., Awaya A., Mizusawa H. and Michikawa M A novel neurotrophic pyrimidine compound MS-818 enhances neurotrophic effects of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 54: 604-612, 1998.
- Nishikawa, M., Sato, E. F., Kashiba, M., Kuroki, T., Utsumi, K., and Inoue, M. (1998). Role of glutathione in nitric oxide-dependent regulation of energy metabolism in rat hepatoma cells. *Hepatology* 27, 422-6.
- Nishikawa, M., Takeda, K., Sato, E. F., Kuroki, T., and Inoue, M. (1998). Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am-J-Physiol* 274, G797-801.
- Nakanishi, T., Nishi, Y., Sato, E. F., Ishii, M., Hamada, T., and Inoue, M. (1998). Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J-Trauma* 44, 143-8.
- Nagata, K., Yu, H., Nishikawa, M., Kashiba, M., Nakamura, A., Sato, E. F., Tamura, T., and Inoue, M. (1998). *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J-Biol-Chem* 273, 14071-3.
- Morishita, S., Sato, E. F., Takahashi, K., Manabe, M., and Inoue, M. (1998). Insulin-induced hypoglycemia elicits apoptosis in the rat. *Diabetic Res. Clin. Pract.* 40, 1-7.
- Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Inoue, M., Kashiba, M., and Tomita, K. (1998). Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens agents. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 1-18.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Toyokuni, S., Tanimoto, Y., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). A processed grain food inhibits hepatic injury in endotoxemic rats. *J. Nutr Sci Vitaminol* 44, 547-59.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Kawada, N., and Inoue, M. (1998). Role of nitric oxide in extracellular nucleotide-induced contractile status of assorted vessels including parts of the portal vasculature. *J-Hepatol* 28, 314-9.
- Konaka, R., Kasahara, E., Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Chein, K., and Inoue, M. (1998). Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide radicals. *International*

Journal of Cosmetic Science 20, 1-18.

Yamada, T., Yukioka, H., Hayashi, M., Asada, A., and Inoue, M. (1998). Effects of inhaled nitric oxide on platelet-activating factor-induced pulmonary hypertension in dogs. *Acta Anaesthesiol-Scand* 42,358 - 68.

Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., and Kuroki, T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265-74.

Takemura, S., Minamiyama, Y., Kawada, N., Inoue, M., Kudo, S., Hirohashi, K., and Kinoshita, H. (1998). Extracellular nucleotides modulate the portal circulation with generation of nitric oxide. *Hepatology Research* 13, 29-36.

Kaneko, H., Koshi, S., Hirota, T., Miyauchi, Y., Kitamura, N., and Inoue, M. (1998). Inhibition of post-ischemic reperfusion injury of the kidney by diamine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1407, 193-99.

Sasaki, J., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsuura, J., Seno, M., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). Multiple-labeling of oligonucleotide probes for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.* 31, 275-79.

Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, M., and Utsumi, K. (1998). Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Letters* 435, 233-36.

Kang, M-H., Naito, M., Tsujihara, N. and Osawa, T. (1998) Sesamol Inhibits Lipid Peroxidation in Rat Liver and Kidney, *J. Nutrit.* 128 1018-1022

Kim, J-M., Araki, S., Kim, D-J., Park, C-B., Takasuka, N., Baba-Toriyama,

H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H. (1998) Chemopreventive Effects of Carotenoids and Curcumins on Mouse Colon Carcinogenesis after 1,2-Dimethylhydrazine Initiation, *Carcinogenesis* 19 81-85

## 2. 学会発表

Kitani K. Pharmacokinetics and dynamics of drugs affecting the central nervous system (CNS) in the elderly. The Second German-Japanese Workshop on "Medical Problems posed by an Aging Population" Apr. 27-29, 1998. Heidelberg, Germany.

木谷健一, 田中 慎. 肝細胞以外の細胞表面膜蛋白拡散の加齢変化  
第21回日本基礎老化学会 1998年6月17日 東京

木谷健一, 田中 慎. マウス骨格筋細胞表面膜の蛋白拡散定数の加齢変化  
第40回日本老年医学会学術集会 1998年6月19日 福岡

木谷健一. 高齢者の薬動・薬学:精神科領域の薬を中心として 箱根精神薬理シンポジウム招待講演 1998年9月5日 箱根

Kitani K. Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part I: Supplementations with chemicals, pharmaceuticals and nutrients (nutriceuticals) Annual Meeting of Korean Federation of Gerontological Societies. Invited Lecture in Symposium: Future Perspectives of Medical and Social Support for the Elderly. Oct. 17, 1998, Seoul, Korea.

Kitani K. Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part II: Pharmacological modification of endogenous antioxidative machineries Annual Meeting of Korean Federation of Gerontological Societies. Invited

Lecture. 98 meeting of the Korean Society for Gerontology, Oct. 17, 1998, Seoul, Korea.

Kitani K. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: A possible antioxidant strategy. 長寿科学に関する第3回ニルス国際ワークショップ“加齢及び加齢関連疾患に対する干渉の試み”  
1998年11月26-27日 大府

Kitani K. Keynote lecture "Science of Ageing: Why, how and what should we study? A personal view. The First Workshop for grantholders for SAGE (Science of Ageing) Initiative Programme by BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council of the U. K.). Jan. 13-15, Manchester, UK

W. Maruyama: Neuroprotection by (-)deprenyl and related compounds. The Third International NILS Workshop on Longevity Sciences "Interventions in Aging and Age-associated Disorders" November 26-27, Obu, Aichi, Japan (oral)

J. Sholz, W. Maruyama, M. Naoi, A. Moser: Endogenous neurotoxins in animal model of Parkinson's disease. 71th Meeting of German Society of Neurology September 2-6, 1998, Munich, Germany

W. Maruyama, M. Naoi, M. B. H. Youdim: Rasagiline protects dopamine cells from apoptosis induced by peroxynitrite. 28th Meeting of Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, USA (poster)

M. Naoi, W. Maruyama, C. Minami, K. Sango, M. Kawai, K. Matsubara: Dopamine-derived tetrahydroisoquinoline; its enantio-specific occurrence in human brain and induction of apoptosis. 28th Meeting of

Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, USA (poster)

M. Naoi, W. Maruyama, K. Yagi and M. Youdim: Anti-Apoptotic Function of (-)Deprenyl and Related Compounds 8th Amine Oxidase Workshop September 6-10, 1998, Lake Balaton, Hungary (symposium)

W. Maruyama, M. Strolin-Benedetti and M. Naoi: N-Methyl(R)salsolinol and a Neutral N-Methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease 8th Amine Oxidase Workshop September 6-10, 1998, Lake Balaton, Hungary (poster)

Wakako Maruyama, Makoto Naoi: Etiology and biological marker of Parkinson's disease. German-Japanese Workshop April 26-29, 1998, Heidelberg German

Wakako Maruyama, Makoto Naoi, Moussa Youdim: Anti-apoptotic potency of deprenyl and demethyldeprenyl. Understanding of Parkinson's disease. May 10-13, 1998, Zichron Yaakov, Israel

Makoto Naoi, Wakako Maruyama: An N-methyltransferase as an endogenous for in sporadic Parkinson's disease" Understanding of Parkinson's disease. May 10-13, 1998, Zichron Yaakov, Israel

直井 信、丸山和佳子、赤尾幸博、中川義仁：内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinolにより惹起されるドーパミン細胞のアポトーシス；パーキンソン病との関連  
第3回東海アポトーシス研究会 1999, 2, 名古屋

丸山和佳子、高橋 勤、直井 信：selegiline 誘導体の抗アポトーシス作用に関する研究 第71回日本生化学会大会 1998, 10, 名古屋

三後久美子、南知予子、丸山和佳子、川井

正雄、直井信：ヒト脳に選択的に存在する (S)-tetrahydropapaveroline 第71回日本生化学会大会 1998, 10, 名古屋

南知予子、三後久美子、丸山和佳子、川井正雄、高橋 勤、直井 信：  
Tetrahydropapaveroline によるDNA 傷害の検討 第71回日本生化学会大会 1998, 10, 名古屋

丸山和佳子、高橋 勤、直井 信：  
selegiline 誘導体の抗アポトーシス作用 第41回日本神経化学会 1998, 9, 東京

南知予子、三後久美子、丸山和佳子、川井正雄、高橋 勤、直井 信：  
Tetrahydropapaveroline によるDNA 傷害の検討 第41回日本神経化学会 1998, 9, 東京

直井 信、三後久美子、南知予子、丸山和佳子、川井正雄、松原和夫  
ヒト脳には(S)型 tetrahydropapaveroline のみが存在する。  
第41回日本神経化学会 1998, 9, 東京

丸山和佳子、直井 信、橋詰良夫：ヒト脳に内在するMPP+様神経毒1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ionの黒質濃度は線条体における中性N-メチル転移酵素の活性が決定する  
第39回日本神経学会総会 5月 20-22日 1998 京都

直井 信、丸山和佳子(老化機構研究部)、阿部隆志、東儀英夫：パーキンソン病発症に中性N-メチル転移酵素は関与するか  
第39回日本神経学会総会 5月 20-22日 1998 京都

道川 誠 ミニシンポジウム「アルツハイマー病研究最前線の紹介、問題点」  
「コレステロール代謝からアルツハイマー病をみる：アポリポ蛋白Eの役割」  
(1998年2月9日、東京)

道川 誠、柳澤勝彦 シンポジウム「アルツハイマー病の分子遺伝学と治療の展

望」Alzheimer病におけるアポリポ蛋白Eの役割-コレステロール代謝の観点から  
第17回日本薬理学会年会 シンポジウム  
(1998年3月24-26日、京都)

Michikawa M. Pathogenesis of Alzheimer's disease Japanese and Germany Workshop on Age-Related Diseases. (Heidelberg, Germany, April 27, 1998.)

道川 誠、柳澤勝彦 培養神経細胞におけるコレステロール合成抑制と細胞死  
日本神経化学会(1998年9月22日、東京)

道川 誠 コレステロール合成と神経細胞死 日本痴呆学会 (1998年10月1日、東京)

M. Inoue (1998) Role of cross-talk of reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants, and vitamins in health and diseases. Ist Japan-China Conference on Vitamins (Peigin)

M. Inoue (1998) Role of cross-talk of nitric oxide, reactive oxygen species, GSH and related antioxidants in the regulation of energy metabolism. IIInd. Int. Conf. Pathophysiology (Finland, Alton Meister Symposium)

M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and circulatory status. VIIIth Ann. I. M. Arias Symposium "Bridging Basic Science and Liver Disease" American Liver Foundation (Boston)

M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and enteric bacteria. IIInd Japan-UK Conference (Tsukuba)

M. Inoue (1998) Nitric oxide and related oxyradicals, majesties of aerobic life. IIInd Cong. SFRR Asia "Emerging potential of Antioxidant Therapy" (Goa)

井上正康 (1998) 「活性酸素病態」日本呼吸器学会・シンポジウム講演 (熊本)

井上正康 (1998) 活性酸素・NO 病態：生体防御機構の源流を探る 日本炎症会・教育講演 (東京)

楠原洋之、関根孝司、楯直子、杉山雄一、金井好克、遠藤仁 有機アニオントランスporter (OAT3) のクローニングと解析、第13回日本薬物動態学会年会 1998, 11 仙台

津田実、楠原洋之、関根孝司、遠藤仁 多選択性有機アニオントランスporter ファミリー (OAT1, OAT2 及び OAT3) による各種抱合体の輸送、第13回日本薬物動態学会年会 1998, 11 仙台

大澤俊彦、チャンティマー ワンプントラグーン、内田浩二、岡田邦彦：酸化ストレスに対するクルクミノイドの防御機構。日本栄養食糧学会 1998 年度大会 (沖縄) 1998.4.

大澤俊彦、河合慶親、内藤通孝、野村秀樹、井口昭久、内田浩二、姜明花：高コレステロールウサギモデルにおけるゴマ粕中に含まれるリグナン配糖体の抗酸化効果について。日本農芸化学会 1998 年度大会 (名古屋) 1998.4

姜明花、内藤通孝、辻原命子、内田浩二、勝崎裕隆、大澤俊彦：ゴマに含まれるリ

グナンの抗酸化作用について。ゴマ研究会 (静岡) 1997.11

姜明花、内藤通孝、河合慶親、野村秀樹、井口昭久、内田浩二、大澤俊彦、：高コレステロールウサギの動脈硬化に対するゴマ粕中に含まれるリグナン配糖体の抑制効果について。日本栄養食糧学会 1998 年度大会 (沖縄) 1998.4.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

デプレニル及びラサジリンその他の薬物の加齢齧歯類の寿命に対する薬理効果と  
その作用機序，特に脳内抗酸化酵素活性上昇の意義

主任研究者 木谷 健一 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター センター長

研究要旨 デプレニルの投与量の効果は投与期間により、生存率、脳内抗酸化酵素上昇作用の双方に対し異なり、過剰量に生存延長に逆に作用したが適量は生存延長効果をラット、マウスで示した。又F-344ラット雄では正常加齢で脳内各部位の抗酸化酵素活性が数倍に増加するが、新たに調べたBN/Biラットではそのような傾向はなかった。抗アポトーシス効果をもつMAOB阻害薬ラサジリンがデプレニルと同様脳内ドーパミン作動性組織の抗酸化酵素活性を上昇させることを見出した。又、ウルソデオキシコール酸4週（0.5%含有食餌）投与した時の肝グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）活性上昇作用は若齢マウスのみならず、28月齢の老齢マウスでも同程度みられ、cancer chemopreventionの一つの可能性を示した。

A. 研究目的

従来の研究により木谷はデプレニルのもつ2つの異なった薬理的効果1) 脳内ドーパミン作動性組織に対する抗酸化酵素〔スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ（CAT）〕活性上昇作用2) 齧歯類、犬におけるみかけの生存曲線延長効果の間に因果関係がある可能性を追求しているが、今回は特にデプレニル用量と両効果の間の関係を更に明らかにすることを第一の目的とした。又、ラサジリンについても新しく検討した。又、上記の薬効の更なる解明のため従来迄検討されたことのない異なったラットストレイン（BN/Biラット）の使用を目的としその加齢による脳各部位の抗酸化酵素活性の変化した。更に加齢マウスにおけるウルソデオキシコール酸

の肝GST活性上昇作用を検討することにより、本薬物cancer chemopreventionの可能性を追求することを目的とした。

B. 研究方法

18月齢以後のBDF1マウス0.25mg及び0.50mg/kg/injection週3回、同様に18月齢以後F-344ラットに1.0mg/kg/inj.いずれも週3回皮下注射を行い、生食液投与の対照群との生存曲線の比較を開始した。先にスタートした1.0mg/kgラットの実験では31月齢で生存ラットをと殺し、抗酸化酵素活性を測定した。別に27月齢F-344ラットに0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0mg/kg週3回投与を4週間行い、対照群と抗酸化酵素活性を比較した。また、8月齢、28月齢のBN/Biラット（両性）につき、脳内各組織の抗酸化酵素活性を

測定した。別に7月齢、26月齢のC57BL雄マウスに0.5%ウルソデオキシコール酸（ウルソ）含有食餌を4週給餌し、対照食投与の対照群と肝GST及びCAT活性を測定比較した。

### C. 研究結果

BDF1マウスでは0.25mg/kg群は4ヶ月経過後全く対照と変わらぬ生存曲線を描いているが0.50mg/kgでは22月齢時点で差を見せ始めデプレニルによる生存延長傾向が認められた。研究の先行した1.0mg/kg/inj（週3回投与）ラット群は31月齢に至り、予想と異なりデプレニル群の方が生存が少なかった（対照群7/12 vs デプレニル群3/12）。生き残りのラットをと殺し脳内抗酸化酵素活性を測定した所いづれの組織（黒質、線状体、海馬、大脳皮質）においても両群の間には全く酵素活性の差がなかった。これに対し27月齢のラットについて異なった用量のデプレニルを1ヶ月投与した場合、0.25mgから2.0mg/kg迄の広い範囲にわたり、CAT、Mn-SOD、Cu、Zn-SOD活性は対照群に比し、明らかに上昇していた。ラサジリンを0.5mg/kg/day 3.5週投与したF-344ラットではデプレニルと同様、脳ドーパミン作動性組織では対照に比し、CAT、SOD活性が2~5倍上昇することを確認した。BN/Bi両性のラット、8, 28月齢の若・老齡群計4群を検討した結果は脳内各部位のSOD, CAT活性とも加齢による変化は著明でなく、F-344雄で認められたSOD、CAT活性の加齢による著明な上昇は認められなかった。4週間のウルソ投与は若・高齡マウス群にはほぼ同等（30~40%）の有意なGST上昇を示したが、若齡マウスではウルソ投与は肝CAT活性が期待に反し有意に低下した。

### D. 考察

デプレニルの動物生存曲線延長効果は最初に報告したKnoll (Mech Ageing Dev. 1989) の24月齢以後の平均余命100%延長程ではないが、ラットでは我々の報告(34%, Life Sci, 1993)を含め3報、ハムスター、マウス更にビーグル犬(Life Sci, 1997)で報告されており更に免疫不全マウスでは著明な生存曲線延長効果が報告されている。しかし、その作用機序は全く不明である。デプレニルにはMAOB阻害効果の他に抗アポトーシス効果が報告されているが、動物の生存曲線がアポトーシスで規定されている可能性は少なく、他の機序を追求する必要がある。我々は今迄デプレニルの抗酸化酵素上昇作用には用量依存性があると共に過剰の用量は逆に効果を失い、より過剰な用量は逆に活性を低下させることを見出している(Life Sci, 1992)。今回の検討ではマウスにおいて生存曲線に対する用量依存性が益々明らかにされつつあり、又、ラットにおいて1.0mg/kgは長期投与では抗酸化酵素活性に対する作用を失うのみか生存曲線作用延長作用も失うことを示した。最近英国からデプレニルのラット生存曲線短縮効果の報告があったが、上記の我々の経験で十分説明がなし得、かつデプレニルのもつ二種の薬理効果の因果関係をより強く示唆しよう。我々のプレミナリーな研究でラサジリンがデプレニル同様SOD, CAT活性を上昇させる効果が認められたが、これは現在の所世界で初の知見であり、この種の薬物の動物生存曲線への効果の検討に期待がもたれる。BN/BiラットでF-344雄ラットで見られたSOD, CAT活性の加齢による著明な上昇はBN/Biラットでは認められず、動物種差のみか、ストレイン差が加齢研究に及ぼす影響の強さを改めて強調した。ウルソのもつマウス肝GST活性上昇は加齢マウスにも著明に認められた。ウルソは慢性肝炎、特に原発性胆汁性肝硬変に効

果があることが認められており、人に長期投与しても全く副作用の認められない薬物であり、今後発癌の chemoprevention の一つの戦略としての可能性が期待される。

#### E. 結論

我々の確認したデプレニルによるラット、マウスの生存曲線延長効果に対する効果とその機序を追求することにより、新たな加齢に対する薬物による介入の可能性が示唆された。特にデプレニル、ラサジリンのもつ抗酸化酵素活性上昇効果は、加齢、加齢関連疾患に対する抗酸化戦略の一つとして抗酸化物の直接投与のみならず、体内（内因性）の抗酸化酵素の修飾という新たな可能性を示唆しよう。又、ウルソは極めて安全なしかも人における投与可能な薬物であり、長期投与による chemoprevention の可能性を示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Zs.-Nagy I, Tanaka S and Kitani K. Age-dependence of the lateral diffusion coefficient of the Con-A-receptors in the plasma membrane of *ex vivo* prepared brain cortical cells of BN/Bi RijHsd rats. *Exp Brain Res*, 1999, 124:233-240.

Kitani K, Lateral mobility of proteins and lipids of cell surface membranes during aging: do the data support 'The Membrane Hypothesis of Aging'? *Mech Ageing Dev* (in press), 1999.

Kitani K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Assessing the effects of deprenyl on longevity and antioxidant defenses in different animal models. *Ann New York Acad Sci*. 1998, 854 : 291-306.

Kitani K Antioxidant strategies against

aging and age-associated disorders. Part I: Supplementations with chemicals, pharmaceuticals and nutrients (nutriceuticals), *Proceedings of the Annual Meeting of the Korean Gerontological Societies for 1998*, pp. 9-15.

Kitani K Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part II: Pharmacological modification of endogenous antioxidative machineries. *Proceedings of the Annual Meeting of the Korean Gerontological Societies for 1998*, pp. 85-97.

Kitani K and Zs.-Nagy I. Effect of spironolactone on lateral mobility of lipids in hepatocyte plasma membranes in the rat. *Hepatol Res*. 1998, 12:131-139.

Kitani K, Tanaka S and Zs.-Nagy I. Age dependence of the lateral diffusion coefficient of lipids and proteins in the hepatocyte plasma membrane of BN/BiRijHsd rats as revealed by the smear-FRAP technique. *Arch Geront Geriatr* 1998, 26:257-273.

Zs.-Nagy I, Tanaka S and Kitani K. Age-dependence of the lateral diffusion coefficient of Con-A-receptor protein in the skeletal muscle membrane of C57BL/6J mice. *Mech Ageing Dev*. 1998, 101: 257-268.

老人は薬になぜ弱く、どう弱いのか 臨床精神薬理 1:987-995, 1998.

胆汁酸 肝臓病学 Basic Science, 戸田剛太郎, 他編, 医学書院, 東京



pp. 455-461, 1998.

高齢者介護総論：高齢者の身体的・精神的な特徴と高齢期に多い疾病及び障害  
介護支援専門員 標準テキスト 1:197-232, 1998.

老化とは－その機序に関する最近の知見  
イラスト医学&サイエンスシリーズ：老化のしくみと疾患 12-20, 1998.

長寿科学研究における実験動物の役割  
-- その限界 (limitation) と可能性 (potentiality) 実験動物 47:3-10, 1998.

基礎老化研究の総合戦略 Geriat Med 36:27-33, 1998.

## 2. 学会発表

Kitani K. Pharmacokinetics and dynamics of drugs affecting the central nervous system (CNS) in the elderly. The Second German-Japanese Workshop on "Medical Problems posed by an Aging Population" Apr. 27-29, 1998. Heidelberg, Germany.

本谷健一, 田中 慎. 肝細胞以外の細胞表面膜蛋白拡散の加齢変化  
第21回日本基礎老化学会 1998年6月17日 東京

本谷健一, 田中 慎. マウス骨格筋細胞表面膜の蛋白拡散定数の加齢変化  
第40回日本老年医学会学術集会 6月19日 福岡

本谷健一. 高齢者の薬動・力学：精神科領域の薬を中心として 箱根精神薬理シン

ポジウム招待講演 1998年9月5日箱根

Kitani K. Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part I: Supplementations with chemicals, pharmaceuticals and nutrients (nutriceuticals) Annual Meeting of Korean Federation of Gerontological Societies. Invited Lecture in Symposium: Future Perspectives of Medical and Social Support for the Elderly. Oct. 17, 1998, Seoul, Korea.

Kitani K. Antioxidant strategies against aging and age-associated disorders. Part II: Pharmacological modification of endogenous antioxidative machineries Annual Meeting of Korean Federation of Gerontological Societies. Invited Lecture. 98 meeting of the Korean Society for Gerontology, Oct. 17, 1998, Seoul, Korea.

Kitani K. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: A possible antioxidant strategy. 長寿科学に関する第3回ニルス国際ワークショップ“加齢及び加齢関連疾患に対する干渉の試み”  
1998年11月26-27日 大府

Kitani K. Keynote lecture "Science of Ageing: Why, how and what should we study? A personal view. The First Workshop for grantholders for SAGE (Science of Ageing) Initiative Programme by BBSRC (Biotechnology

and Biological Sciences Research  
Council of the U. K.). Jan. 13-15,  
Manchester, UK

G. 知的所有権の取得状況  
なし

パーキンソニズム惹起性神経毒によるアポトーシスモデルを用いた抗アポトーシス薬の検討

分担研究者 丸山和佳子 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老化機構研究部室長

研究要旨 パーキンソン病の原因物質である可能性があるヒト脳内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinol によるドパミン神経細胞のアポトーシス細胞死のモデルを確立した。propargylamine 類の一部に抗アポトーシス作用を持ち、細胞保護に働く薬剤があることを見い出した。

#### A. 研究目的

加齢に従いヒト脳黒質ドパミン神経細胞の数と機能が低下することが報告されている。さらにパーキンソン病は黒質線条体ドパミン神経細胞が選択的に変性をきたす疾患であり、加齢とともにその頻度が増加するいわゆる老年病の典型的なものである。ドパミン神経細胞の脱落により引き起こされる運動障害は高齢者の社会生活を損なう大きな問題となっている。最近分担研究者らはパーキンソン病における神経細胞死がヒト脳に内在するドパミン由来の神経毒 N-methyl(R)salsolinol の蓄積によることを示唆する結果を見い出した。

本研究の目的はパーキンソン病におけるドパミン神経細胞の細胞死について、その機序を明らかとするとともに、防御する薬剤の開発をおこなうことである。

#### B. 研究方法

ヒトドパミン神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を用いてドパミン神経の脳内在性神経毒による細胞死のモデルを作成する。神経毒としてはドパミン由来のイソキノリンである N-methyl(R)salsolinol を用いる。一定時間細胞を N-methyl(R)salsolinol で処

理した後、comet assay により DNA 傷害と細胞死を定量的に測定した。deprenyl は B 型 monoamine oxidase の阻害薬として開発されたが、神経保護作用を持つことが最近報告されている。細胞を予め deprenyl およびその誘導体で処理することにより、DNA 傷害が防御されるか否かについて検討し、神経保護あるいは抗アポトーシス活性に必要な化学構造を明らかとした。

#### C. 研究結果

N-methyl(R)salsolinol はアポトーシスによる DNA 傷害を濃度依存的に誘導した。deprenyl 誘導体の中でも propargylamine 構造をもつ化合物のみが抗アポトーシス活性を持つことが明らかとされた。この作用は各々の薬剤による monoamine oxidase 阻害活性とは相関しなかった。さらに propargylamine 類の中でも A 型 monoamine oxidase である clorgyline は抗アポトーシス活性をもたなかった。

#### D. E. 考察および結論

propargylamine 類は老化およびパーキンソン病におけるドパミン神経細胞死を防御できる可能性がある。今後 in vivo のモデル

を用いた検討とともに、作用のメカニズムを明らかとする為の研究が必要と思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

W. Maruyama, T. Abe, H. Tohgi, M. Naoi: Endogenous MPTP-like dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in the cerebrospinal fluid decreases with progression of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* in press.

W. Maruyama, T. Takahashi, M. Naoi: (-)Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxy nitrite and nitric oxide. *Mechanism of Aging and Development* in press.

M. Naoi, W. Maruyama: Cell death of dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Mechanism of Aging and Development* in press.

W. Maruyama, M. Strolin-Benedetti, M. Naoi: N-Methyl(R)salsolinol and a neutral N-methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease. *Neurobiology* in press.

M. Naoi, W. Maruyama, K. Yagi, M. B. H. Youdim: Anti-apoptotic function of L-(-)deprenyl (selegiline) and related compounds. *Neurobiology*, in press.

M. Umeda, S. Aoyama, T. Kaiya, K. Kohda, W. Maruyama, M. Naoi: Oxidation of 1-amino-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine, a 1-amino analog of MPTP by type A and type B monoamine oxidase. *J. Neural Transm.* 105: 1253-1264, 1998

Y. Kato, W. Maruyama, M. Naoi, Y. Hashizume, T. Osawa: Immunohistochemical detection of dityrosine in lipofuscin pigments in the aged human brain. *FEBS Lett.* 439: 231 - 234, 1998

K. Kohda, Y. Noda, S. Aoyama, M. Umeda, T. Sumino, W. Maruyama, M. Naoi: Cytotoxicity of 1-amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenylpyridinium ion, 1-amino analogues of MPTP and MPP+, to clonal pheochromocytoma PC12 cells. *Chemical Research in Toxicology* 11: 1249-1253, 1998

N. Morikawa, M. Naoi, W. Maruyama, S. Ohta, Y. Kotake, H. Kawai, T. Niwa, P. Dostert, Y. Mizuno: Effects of various tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and the electron transfer complexes. *J. Neural Transm.* 105: 677-688 1998

C. Minami, Y. Deng, W. Maruyama, T. Takahashi, M. Kawai, D. Nakahara, M. Naoi: Generation of reactive oxygen species accounts for cytotoxicity of an endogenous dopaminergic neurotoxin, (R)-N-methylsalsolinol, to differentiated dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm.* 105: 397-405 1998