

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化・老年病に対する
栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法による
干渉に関する実験的研究

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 木谷 健一

平成 13 (2001) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	1
老化・老年病に対する栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法による干渉に関する実験的研究	3
II. 分担研究報告書	15
1. 薬理的及び栄養学的作用手法を用いた齧歯類寿命への介入の研究	17
木谷健一	
2. 組織特異的活性酸素制御法の開発と血管源性加齢病態の解明	22
井上正康	
3. 老化による脳の虚血脆弱性に関する研究	
- アデノウイルスベクターを用いた in vivo 遺伝子導入による検討 -	26
大星博明	
4. 食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御	31
大澤俊彦	
5. NO 酸化物による腎障害に対する地榆エキスの役割と活性成分の検索	37
横澤隆子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	51

I . 総括研究報告書

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

老化・老年病に対する栄養学的・薬理的・分子遺伝学的手法による
干渉に関する総合的研究

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 デプレニル (DP) 0.25mg/kg 週 3 回皮下注を 18 月齢からの F344/Du 両性ラットに開始したところ、投与群は生食投与の対照群に比し、有意な寿命延長を示した。プロパジラミン類のもつスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) 活性上昇能は、DP > ラサジリン (RG) > 2-ヘキシルメチルプロパジラミン (2HMP) > 同デメチル体 (2HP) であった。DP は脳内ドーパミン作動部位のみならず、脳外カテコラミン作動性臓器 (心、腎、副腎、脾) の SOD、CAT 活性をも上昇させ、又、SOD の mRNA レベルを上昇させていた。又、IL-1 β 、TNF α 濃度も上昇していた。テトラヒドロクルクミン (TC) 0.2% 含有飼料を 13 月齢より与えた雄 C57BL マウスは対照群に比し 30 月齢で 2 倍以上の生存率を示した (木谷)。ゴマ種子に含有されるセサモリン 0.2% 含有食を与えたアポ E 欠損マウスで肝ヘキサノニルリジン (HEL) 及び dityrosin 濃度を有意に減少させた。又、1% コレステロール負荷により起きる家兎の高コレステロール血症家兎は 0.5% TC 食により腎 thiobarbiturate reactive substance (TBARS) を低下させ、また肝 HEL 濃度を低下させ、更に動脈硬化の進展を抑制した (大澤)。地榆エキス投与は腎ラットにおいてリポポリサッカライド投与と腎の虚血・再灌流の併用による oxygen crisis において 3-ニトロチロシン濃度を著明に低下させ、腎組織中の DNA 断片化を軽減させ、腎機能低下を防止した。又、地榆の最有効成分 sanguin H-6 を同定した (横澤)。老化促進マウス (SAMP8) にカルニチンを経口投与することによりその寿命を有意に延長せしめた。又、クリプトンレーザーによる脳虚血後、E.coli β -galactosidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを導入し、脳室壁に薬入された β -galactosidase の発現は虚血ラット脳でも対照 (偽手術) ラットと同じく 6 時間で認められ、12 時間でピーク値となったが、4~7 日後の発現は、対照ラット脳に比しむしろ高かった。又老齢ラット大脳皮質への遺伝子導入では虚血辺縁部及び中心部で若齢ラットに比しむしろ発現が増強しており、高齢者の脳梗塞に対する遺伝子治療の可能性の高いことを示唆した (大星)。

分担研究者 井上 正康
大阪市立大学医学部
第一生化学教室
教授

分担研究者 大星 博明
九州大学大学院
医学研究院病態機能内科
助手

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

分担研究者 横澤 隆子
富山医科薬科大学
和漢薬研究所
助教授

A. 研究目的

加齢及び加齢関連の各種疾患（いわゆる老年病）の原因にフリーラジカルの関与が提唱されてをいるが、尚その直接証明はない。各種の抗酸化ストラテジーは疾病の予防にはその効果を認める報告も少なくないが、動物の寿命への介入の成功は未だ市民権を得ていない。本研究班は、専門、バックグラウンドの異なる研究者が加齢・加齢疾患への干渉という共通の目的で薬理的、分子遺伝学的、栄養学的な様々なアプローチを試み、共通の場で議論することにより、更なる高次のストラテジーを指向すると共に、加齢・加齢疾患の生物学的機序の解明及び人間に適用可能な介入のストラテジーを探索することを目的とする。

B. 研究方法

加齢への介入：加齢齧歯類の生存曲

線を指標として DP 投与効果の確認とその作用機序としての抗酸化酵素活性上昇、各種サイトカインの動態を検討した（木谷）。TC0.2%含有食を加齢マウスに投与し、生存曲線への効果を検討した（木谷、大澤）。別に老化促進マウス（SAM）にカルニチンを経口投与し、その生存曲線を対照と比較した（井上）。

加齢関連疾患への介入：コレステロール負荷家兎の動脈硬化に対する TC の効果、アポ E 欠損ラットに対するセサモリンの効果を検討した（大澤）。井上はシスプラチンによる腎毒性に対する腎尿細管指向性 SOD の効果、同消化管毒性に対するカルニチンの効果を検討した。大星は高齢者脳虚血疾患の遺伝子治療を目的とし、アデノウイルスベクターを用い、E.coli β -galactosidase の脳内発現のラット月齢差を検討した。

C. 研究結果

齧歯類寿命への介入：DP0.25mg/kg 週3回皮下注した F344/Duラットは両性とも生存曲線を延長させ、その平均寿命を有意に延長させた。DP 類似のプロバジラミン類であるラサジリン（RG）、2-ヘプチルメチルプロバジラミン（2-HMP）、同デメチル体（2-HP）の SOD、CAT 活性上昇効果は、DP>RG>2-HMP>2-HP の順で差があった。DP は脳以外でも心、腎、副腎、脾等のカテコラミン作動性臓器で CAT、SOD 活性を有意に上昇させかつ2倍の SOD の mRNA レベルも上昇していた。又、IL-1 β 、TNA α 濃度の上昇も認めた（木谷）。TC0.2%含有食を C57BL 雄マウスに 18 月齢より投与した群では平均寿命に有意差はなかったが、10%最長寿命は対照に比し有意に延長していた。13 月齢より投与の場合

生存曲線への効果はより大で、30 月齢現在の生存率は対照 22% (11/50) に比し TC 群 48% (24/50) と 2 倍以上高かった (木谷、大澤)。SAM にカルニチンを投与することによりその寿命を有意に延長させ得た (井上)。

疾患・病態モデルに対する介入：アポ E 欠損マウスに対し、ごま種子より得たセサモリン 2% 含有食を投与すると高コレステロール血症は改善しないが、酸化組織損傷の証拠と考えられる肝内 HEL、dinitrotyrosine 濃度は減少した。1% コレステロール含有食を家兔に与えた後、TC0.5% 含有食を投与したところ、血清内 TBAR 濃度が低下し、LDL 酸化の防止を示唆する結果を得た。肝 HEL も有意に低下した (大澤)。LPS 及び腎虚血・再灌流を併用するラット腎酸化損傷モデルに対し、地榆エキスは著明な防止効果を示した。そのまた最も有効な成分は sanguinin H-6 であることを同定した (横澤)。シスプラチンの消化器毒性はカルニチンにより著減した (井上)。高血圧自然発症ラットを用い E.coli β -galactosidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター脳室内注入した時の脳室壁 β -galactosidase の発現は虚血群・偽手術群ともに 12 時間でピーク値を示したが、4~7 日後では虚血群の方が発現が高かった。又、若齢ラットと比較すると虚血辺像部、及び中心部では虚血 4~7 日後高齢ラットの方が遺伝子発現が高かった。

D. 考察

寿命に対する介入：「研究目的」において述べた如く、現在の実験老年学の常識は実験動物寿命延長の唯一の再現性のある方法は食餌制限 (dietary restriction, DR) である。DP による寿命延長には有効とする報告を無効とす

る報告に分かれているため、その信憑性に疑義がもたれている。しかし、我々の研究の結果、この効果は極めて用量依存性が大であるばかりでなく、過剰量では効果が低くなるばかりかむしろ逆効果 (寿命短縮) が現れることを我々も報告しており (Life Sci, 2000)、又、他にも同様の報告がある (J. Neural Transm, 1998, Biogenic Amines, 1999)。今回の実験のように至適量を用いるならこの効果の再現性は極めて高い。その作用機序の一つとして、我々は脳ドーパミン作動性の部位の SOD、CAT 活性の上昇を挙げてきたが、今回の研究結果により、この現象は脳外のカテコラミン作動性臓器でも出現し、同時に広範なサイトカインの動員を起こしていることが判った。今後はこれらの液性因子の動向をも視野に入れ、その機序を探求する必要がある。抗酸化物 (或いはその precursor) を経口投与することにより実験動物の生存曲線を延長させる試みは 40 年の歴史があるが、これ又再現性の保証された報告はない。TC はカレー色素、ターメリックの主成分クルクミンの腸管壁代謝物であり、強力な抗酸化剤である。大澤らは実験的大腸癌の発生予防に著効のあることを報告し、体内諸臓器の組織酸化損傷を防止していることが確認されているが、寿命に対する試みは過去全くない。今回最初 18 月齢より投与した群では他の抗酸化物質についての報告と同じく殆ど効果をみななかったが最長寿命の有為な延長という興味ある結果を得た。13 月齢から投与を開始したコホートではこの効果は更に著しい。平均寿命の算出にはあと数カ月を要するが、TC がマウスのみかけの寿命に介入する可能性を示唆する結果で今後の研究の結果が期待される。カルノシン投与が SAM の寿命を延長させたが、

SAM は飼育条件により寿命が大きく変わり、又本来の寿命を simulate している保証はなく、関連疾患に介入している可能性もある。今後の検討が必要である。

疾患・病態モデルへの介入：今回の地榆エキス、TC、セサモリンらの研究はいずれも実験的酸化ストレスにこれらの物質が介入している可能性を強く示唆する。いずれも人体投与可能な物質である点、このような研究の成果は臨床応用への道を目指し得よう。カルニチンの消化管毒性防止作用は、新しい（特に高齢者）の癌化学療法への道を切り開くものと期待される。大星の遺伝子療法は、全く別のアプローチであるが、脳血管病学変という高齢者に圧倒的に多い疾患に対する従来と全く異なった interventional therapy としてその将来への期待が増す。

E. 結論

いくつかの全く異なったアプローチが疾患・病態への介入のみか加齢への介入の可能性をも示唆していることは本研究班の活動を意義あるものとしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO and Carrillo MC. Do antioxidant strategies work against aging and age-associated disorders? Propargylamines : A possible antioxidant strategy. *Ann New York Acad Sci*, in press, 2001.

Kitani K, Minami C, Maruyama W, Kanai S Ivy GO and Carrillo MC. Common properties for propargylamines of enhancing superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat: Implications for the life prolonging effect of (-)deprenyl. *J Neural Transm (Suppl)* 60:115-132, 2000.

Maruyama W, Yamamoto T, Kitani K, Carrillo MC, Youdim MBH and Naoi M. Mechanism underlying anti-apoptotic activity of a (-)deprenyl-related propargylamine, rasagiline. *Mech Ageing Dev* 116:181-191, 2000.

Carrillo MC, Kanai S, Kitani K and Ivy GO. A high dose of long term treatment with deprenyl loses its effect on antioxidant enzyme activities as well as on survivals of Fischer-344 rats. *Life Sci* 67:2539-2548, 2000.

Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y and Kitani K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 48:5068-5073, 2000.

Yokozawa T, Chen CP and Kitani K. Chiyu extract stimulates antioxidant defense ability in senescence-accelerated mice. *J. Trad. Med.* 17, 73-79, 2000.

Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T and Kitani K. A study on the nitric oxide production-suppressing activity of *sanguisorbae radix* comonents. *Biol. Pharm. Bull.* 23(6)717-722, 2000.

- Kitani K, Yamada Y and Ikeda K(eds.) Interventions, Part II :Proceedings of the Fourth International NILS Workshop on Longevity Sciences. Mech Ageing Dev.116(2,3)65-227, 2000.
- Tsuchiya M, Tokai H, Takehara Y, Sato E, Inoue M. : Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activities. Am J Respir Crit Care Med., 162, 1257-1261, 2000.
- Sakata C, Tanaka H, Takemura S, Nakamura A, Inoue M, Kinoshita H: Post-ischemic intraportal adenosine administration protects against reperfusion injury of canine liver. J. Hepatobiliary Pancreat Surg, 7(1), 78-85, 2000.
- Kashiba M, Inoue M, Inoue S. : Impaired reductive regeneration of ascorbic acid in the Goto-Kakizaki diabetic rat. Biochem Pharmacol, 59, 557-561, 2000.
- Takada Y, Sato E, Nakajima T, Tsumura M, Inoue M, Yamada R.: Granulocyte-colony stimulating factor enhances anti-tumour effect of hyperthermia. Int. J. Hyperthermia, 16, 275-286, 2000.
- Suzumura K, Kasahara E, Ohnishi Y, Chien K.C., Inoue M. : Fluvastatin normalizes the decreased turnovers of glutathione and ascorbic acid in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 27, 709-714, 2000.
- Suzumura K, Kasahara E, Wang Y, Chien K.C., Inoue M. : Decreased turnovers of glutathione and ascorbic acid in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 46, 205-209, 2000.
- Nakamura A, Park A.M., Nagata K, Sato E, Kashiba M, Tamura T, Inoue M. : Oxidative cellular damage associated with transformation of helicobacter pylori from a bacillary to a coccoid form. Free Radic Biol Med, 28, 1611-1618, 2000.
- Kashiba M, Oka J., Ichikawa R, Ishikawa T, Nishikimi M, Inoue M, Inoue S. : Impaired reductive regeneration of ascorbic acid in the Goto-Kakizaki diabetic rat. Biochem. J., 351, 313-318, 2000.
- Tsuchiya M, Maeda K, Sato EF, Shindo M, Inoue M. : Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activities. Am. J. Res. Criti. Car. Med., 163, 1-6, 2001.
- Tomita M, Sato E, Nishikawa M, Yamano Y, Inoue M. : Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. Arthritis & Rheumatism, 44, 96-104, 2001.
- Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M. : Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral circulation. Mech Ageing Dev 116: 95-101, 2000.
- Ooboshi H, Ibayashi S, Takano K, Sadoshima S, Kondo A, Uchimura H, Fujishima M. : Hypothermia inhibits ischemia-induced efflux of amino acids and neuronal damage in the hippocampus of aged rats. Brain Res, 884: 23-30, 2000.
- Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M. : Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral blood vessels and ischemic brain: Perivascular approach and ischemic threshold. Ischemic Blood Flow in the Brain, Fukuuchi Y, Tomita M, Koto A (eds.), Springer-Verlag, pp136-141, 2000.

- Ibayashi S, Takano K, Ooboshi H, Kitazono T, Sadoshima S, Fujishima M. : Effect of selective brain hypothermia on regional cerebral blood flow and tissue metabolism using brain thermo-regulator in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res*, 25: 369-375, 2000.
- Ibayashi S, Nagao T, Kitazono T, Ooboshi H, Kitayama J, Sadoshima S, Fujishima M. : Calcium antagonist isradipine reduces metabolic alterations in acute cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res*, 25: 349-355, 2000.
- Ooboshi H, Ibayashi S, Takada J, Yao H, Kitazono T, Fujishima M. : Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain: Ischemic flow threshold for transgene expression. *Stroke*, in press.
- Ooboshi H, Ibayashi S, Yao H, Takada J, Heistad DD. : Age-related neuronal vulnerability to brain ischemia: A potential target of gene therapy. *AGE*, in press.
- Takada J, Ibayashi S, Nagao T, Ooboshi H, Kitazono T, Fujishima M. : Bradykinin mediates the acute effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. *Stroke*, in press.
- 大星博明、藤島正敏: 脳血管障害に対する遺伝子治療. *医学のあゆみ* 195: 899-900, 2000.
- 大星博明、藤島正敏: Evidence に基づく内科的治療のすすめかた、循環器疾患: 脳卒中. *最新医学* 55: 548-558, 2000.
- 大星博明、藤島正敏: 高齢者の特性に基づく診断・治療と問題点、脳血管障害 - 特徴、病型診断・治療の実際と問題点. *内科* 87: 270-275, 2001.
- Osawa T. Protective role of dietary antioxidants in oxidative stress. Yoshikawa, T., Toyokuni, S., Yamamoto, Y., and Naito, Y. *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*, OICA, London, 2000, 476-482.
- Kato Y, Miyake Y, Yamamoto K, Shimomura Y, Ochi H, Mori Y and Osawa T. Preparation of a Monoclonal Antibody to N^{ϵ} -(Hexanonyl)lysine: Application to the Evaluation of Protective Effects of Flavonoid Supplementation against Exercise-Induced Oxidation Stress in Rat Skeletal Muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274: 389-393, 2000.
- Kato Y., Wu X, Naito M, Nomura H, Kitamoto N and Osawa T. Immunochemical Detection of protein Dityrosine in Atherosclerotic Lesion of Apo-E-Deficient Mice Using a Novel Monoclonal Antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275: 11-15, 2000.
- Yokozawa T, Chen C.P. and Kitani K. Chiyu extract stimulates antioxidant defense ability in senescence-accelerated mice, *J. Trad. Med.*, 17, 73-79, 2000.
- Yokozawa T, Wang T.S., Chen C.P. and Hattori M. Inhibition of nitric oxide release by an aqueous extract of *Tinospora tuberculata*, *Phytother. Res.*, 14, 51-53, 2000.

- Yokozawa T, Chen C.P., Tanaka T and Kitani K. A study on the nitric oxide production-suppressing activity of *Sanguisorbae Radix* components, *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 717-722, 2000.
- Yokozawa T and Liu Z.W. The role of ginsenoside-Rd in cisplatin-induced acute renal failure, *Renal Failure*, 22, 115-127, 2000.
- Kim D.W., Yokozawa, T, Hattori M, Kadota S and Namba T. Inhibitory effects of an aqueous extract of *Apocynum venetum* leaves and its constituents on Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein, *Phytother. Res.*, 14, 501-504, 2000.
- Yokozawa T, Cho E.J., Nakagawa T, Terasawa K and Takeuchi S. Inhibitory effect of green tea tannin on free radical-induced injury to the renal epithelial cell line, LLC-PK₁, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 6, 521-526, 2000.
- Yokozawa T, Cho E.J., Hara Y and Kitani K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5068-5073, 2000.
- Choi J.S., Chung H.Y., Jung H.A., Park H.J. and Yokozawa T. Comparative evaluation of antioxidant potential of alaternin (=2-hydroxyemodin) and emodin, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6347-6351, 2000.
- Chen C.P., Yokozawa T, Sekiya M, Hattori M and Tanaka T. Protective effect of *Sanguisorbae Radix* against peroxynitrite-mediated renal injury, *J. Trad. Med.*, in press.
- 横澤隆子, 中川孝子, 趙 恩珠. 培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ を用いたラジカル消去能の検討 -緑茶の場合-, "腎とフリーラジカル -第5集-", 伊藤克巳, 玄番宗一監修, 青柳一正編, 東京医学社, 東京, 2000, 72-77.
- Yokozawa T. Preventive effect of Luobuma leaf against oxidation of low-density lipoproteins, "Recent Research Developments in Agricultural & Biological Chemistry, 4", edited by S.G. Pandalai, Research Signpost, India, 2000, 45-58.
- 横澤隆子. 障害腎に対する薬用人参の作用, "薬用人参 2000", 熊谷 朗監修, 共立出版, 東京, 2000, 145-150.
- 横澤隆子. 腎における丹参成分 lithospermic acid B Mg 塩の役割, *MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW*, 45, 323-331, 2000.

2. 学会発表

Minami C, Kitani K, Maruyama W, Yamamoto T, Carrillo MC and Ivy GO. Three different propargylamines share properties of increasing antioxidant enzyme activities in dopaminergic brain regions as well as extra-brain tissues in rats. American Aging Association 29th Annual Scientific Meeting, June 2-5, 2000, Boston.

木谷健一 ラサジリンのラット、ドーパミン作動性組織における抗酸化酵素活性上昇作用 第42回日本老年医学学会 平成12年6月15~17日 仙台

南知予子、前原佳代子、山本貴子、丸山和佳子、磯部健一、木谷健一 デブレニルによるラット全身諸組織の抗酸化酵素活性上昇効果 第23回日本基礎老化学会 平成12年6月29、30日 大府

木谷健一 加齢・加齢関連疾患に対する酸化的組織損傷の意義：抗酸化ストラテジーの可能性と限界 第12回腎とフリーラジカル研究会 特別講演 9月23日 富山

木谷健一 「加齢のフリーラジカル説と抗酸化ストラテジー」 第10回メイラード反応研究会 特別講演 10月5、6日 岐阜

井上正康 活性酸素と長寿：高齢者消化器病学会・特別講演 2000年1月（東京）

井上正康 活性酸素と生物の生存戦略：ネオプテリン研究会・特別講演 2000年7月（東京）

井上正康 生物の設計図と生存原理：天然物化学アカデミー・特別講演 2000年7月（東京）

井上正康 活性酸素スーパーシステム：感染症学会シンポジウム講演・2000年9月（長崎）

Inoue M.: Role of cross-talk of reactive oxygens in the pathogenesis of FALS. Int. Symposium on FALS: 2000年9月 (Kurashiki)

佐藤英介、井上正康 口腔内細菌の活性酸素代謝と生存戦略：第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

笠原恵美子、三好真美、小中隆盛、井上正康 フタル酸エステル投与による生体：内酸化還元動態第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

吉良幸美、佐藤英介、錦見昭彦、井上正康 Cu/Zn-SODの細胞内超微局在特性の解析。第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

常宝君、西川 学、佐藤英介、井上正康 カルニチンによる抗癌剤シスプラチン腎症の選択的抑制。第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）日本生化学会

三好真美、笠原恵美子、南山幸子、佐藤英介、井上正康 硝酸塩のストレス潰瘍に対する保護作用。第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

南山幸子、竹村茂一、船江良彦、井上正康 有機ニトロ化合物のNO遊離機構におけるチトクロームP450分子種の関与とヒト心血管系における局在特性。第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

西川 学、常宝君、永富英彦、佐藤英介、井上正康 抗癌剤腎毒性の分子機構と腎指向性SODによるその制御。第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

朴雅美、長田久美子、井上正康 Helicobacter pyloriの胃内生存戦略と一酸化窒素代謝特性。第73回日本生化学会・2000年10月（横浜）

今田伊助、佐藤英介、笠原恵美子、吉良幸美、井上正康：ミトコンドリア呼吸下産生される活性酸素の LO12 化学発光による測定。第 73 回日本生化学会・2000 年 10 月（横浜）

Inoue M, Nishikawa M, Park A, Sato E. : Cross-talk of nitric oxide, superoxide and molecular oxygen, a majesty of aerobic life: 8th Int. Conference on Free Radical Society・2000 年 10 月（Kyoto）

Sato E, Yamamoto Y, Higuchi M, Inoue M. : S.mutans that generates the superoxide radical is resistant to nitric oxide. 8th Int. Conference on Free Radical Society・2000 年 10 月（Kyoto）

Minamiyama Y, Takemura S, Imaoka S, Inoue M. : Cytochrome P450s play a role in biotransformation of organic nitrates to nitric oxide in human heart vessels. 8th Int. Conference on Free Radical Society・2000 年 10 月（Kyoto）

Park A, Nagata K, Sato E, Inoue M. : H. pylori elicit oxidative stress thereby causing gastric injury and facilitating their transformation and mutation. 8th Int. Conference on Free Radical Society・2000 年 10 月（Kyoto）

Kira Y, Sato E, Inoue M. : Sub cellular localization of Cu/Zn-SOD and its role in the pathogenesis of fals. 8th Int. Conference on Free Radical Society・2000 年 10 月（Kyoto）

Kasahara E, Miyoshi M, Nishikimi A, Sakaki J, Inoue M. : Phthalic esters elicit oxidative stress and mitochondrial injury therebinding atrophy of the testis. 8th Int. Conference on Free Radical Society・2000 年 10 月（Kyoto）

Inoue M. : Role of free radicals in health and diseases: Int. Conf. Medical Biochemistry: Prenary Lecture 2000 年 10 月（Seoul）

Inoue M. : Role of Supersystem of reactive oxygens in health and diseases: Int. Conf. Free Radical, Prenary Lecture: 2001 年 1 月（Taipei）

Ooboshi H, Nagao T, Ibayashi S, Fujishima M: Ischemic blood flow in the brain elevated plasma homocysteine in hypertensive with deep white matter lesions: A multicenter prospective study . 4th World Stroke Congress Melbourne, 2000, 11.

Ibayashi S, Takada J, Kitazono T, Ooboshi H, Fujishima M, Fukuoka Stroke Study Group (FSSG): Clinical Characteristics in Acute Lacunar Hemorrhage. 4th World Stroke Congress Melbourne, 2000, 11.

Takada J, Nagao T, Ibayashi S, Ooboshi H, Kitazono T, Fujishima M: Bradykinin mediates the acute effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. 4th World Stroke Congress Melbourne, 2000, 11.

Kumai Y, Qoboshi H, Ibayashi S, Takada J, Fujishima M. : Brain ischemia prolongs transgene expression of adenovirus-mediated gene transfer to ependyma in rats. 4th World Stroke Congress Melbourne, 2000, 11.

大星博明、豊田一則、中根博、高田潤一、熊井康隆、井林雪郎: 脳血管への遺伝子治療。<シンポジウム> 第12回日本脳循環代謝学会総会。仙台, 2000, 12.

豊田一則、大星博明、井林雪郎、Donald D Heistad: 生体内での脳血管への遺伝子導入効率の増強 -アデノウイルスへの正電荷粒子の結合-。仙台, 2000, 12

高田潤一、大星博明、八尾博史、北園孝成、井林雪郎: 虚血脳への遺伝子導入に及ぼす加齢の影響。第12回日本脳循環代謝学会総会。仙台, 2000, 12

熊井康敬、大星博明、高田潤一、北園孝成、井林雪郎: Adenoviral vectorを用いた脳室内遺伝子導入に対する局所脳虚血による増強効果。第12回日本脳循環代謝学会総会。仙台, 2000, 12.

北園孝成、脇坂正則、鴨打正浩、大星博明、長尾哲彦、藤島正敏、井林雪郎: 脳血管ペリサイトの収縮機構。第12回日本脳循環代謝学会総会。仙台, 2000, 12.

八尾博史、井林雪郎、定永史子、高田潤一、大星博明、北園孝成、藤島正敏: Photothrombosisによる中大脳動脈閉塞モデルにおけるYAGレーザーによる再灌流。第12回日本脳循環代謝学会総会。仙台, 2000, 12.

Osawa T. Antioxidative plant foods for disease prevention, The 13th Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology, November, 2000, Fukuoka, Japan.

Osawa T. Protective Role of Sesame Lignans in Oxidative Stress. 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 14, 2000, Hawaii, USA.

大澤俊彦 酸化ストレス予防と食品機能 第22回時期共鳴医学会, 第4回SFRR合同学会特別講演 2000年6月 東京

大澤俊彦 老化制御機能をもつ食物因子の解析 IUFoST-JAPAN 公開シンポジウム (日本の機能性食品科学の概要-歴史、現状、未来展望) 2000年11月 東京

Yokozawa T and Dong E. Radical-scavenging activity of green tea polyphenols, "Free Radicals in Food: Chemistry, Nutrition, and Health" Symposium at the 219th American Chemical Society, 2000, 3, San Francisco, USA.

佐野光代、横澤隆子、竹内茂彌、中川孝子、服部征雄、寺澤捷年. 腎における緑茶タンニンの役割, 日本薬学会第120年会, 2000, 3, 岐阜

Yokozawa T. Effectiveness of green tea tannins in renal failure, International Conference of Traditional Chinese Medicine (2000 Beijing), 2000, 4, Nanjing, China.

中川孝子, 横澤隆子. 緑茶タンニンの NO に及ぼす影響, 第 43 回日本腎臓学会学術総会, 2000, 5, 名古屋

G. 知的所有権の取得状況
なし

Yokozawa T. Antioxidant activity of traditional crude drugs, Vascular Aging Research Society, 2000, 8, Pusan, Korea.

中川孝子, 横澤隆子, 関谷倫子, 服部征雄, ジュネジャ・レカ・ラジュ, 寺澤捷年. 動脈硬化の進展抑制における緑茶タンニンの役割, 第 17 回和漢医薬学会大会, 2000, 9, 名古屋

横澤隆子, 陳 翠萍, 関谷倫子, 服部征雄. パーオキシナイトライト由来腎障害モデルを用いた地榆の検討, 第 17 回和漢医薬学会大会, 2000, 9, 名古屋

横澤隆子, 陳 翠萍, 田中 隆, 木谷健一. 地榆からの NO 産生抑制成分の検索とフリーラジカル由来腎障害モデルを用いた評価, 第 17 回和漢医薬学会大会, 2000, 9, 名古屋

中川孝子, 横澤隆子, 寺澤捷年. シスプラチン誘発急性腎不全における緑茶タンニンの関与, 腎とフリーラジカル研究会, 2000, 9, 富山

大久保 勉, 阪中専二, 朱 政治, ジュネジャ・レカ・ラジュ, 横澤隆子, 柴田 透, 長谷川眞常, 仲川清隆, 宮澤陽夫. 緑茶ポリフェノールの生体内抗酸化と透析患者への試み, 腎とフリーラジカル研究会, 2000, 9, 富山

横澤隆子. 緑茶タンニンの腎における役割, 第 12 回飛鳥プロジェクトフォーラム, 2000, 12, 富山.

Ⅱ.分担研究報告書

分担研究報告書

薬理的及び栄養学的作用手法を用いた齧歯類寿命への介入の研究

分担研究者 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(DP)を 0.25mg/kg 皮下注週 3 回を F344/Du ラット両性に 18 月齢より投与したところ、雄雌共に生食投与対照群に比し、DP 投与群で平均余命の有意な延長を認めた。ラサジリン (RG)、2-ヘキシルメチルプロパジラミン (2-HMP)、同デメチル体 (2-HP) などの一連のプロパジラミン類の脳ドーパミン作動性部位における抗酸化酵素活性の上昇効果を比較検討したところ、いずれもその効果を認めたが、最大の効果は DP>RG>2HMP>2HP と明らかに順位が認められた。DP については脳外臓器 (心、腎、副腎、脾など) においてスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) 活性の上昇作用があることを世界で初めて見出し、又、2 種の SOD の mRNA レベルの上昇作用があることを認めた。又、更にこれら臓器で TNF α 、IL-1 β 濃度の上昇を確かめた。テトラヒドロクルクミン (TC) 0.2% 含有 diet で 18 月齢より飼育した C57BL 雄マウスは対照群に比し、平均寿命の有意な延長はみられなかったが、最長寿命 (4 匹づつの平均) では TC 投与群が有意に延長していた。TC を 13 月齢より投与した群ではこの傾向は更に強く、30 月齢現在対照群生存率 11/50 (22%) に対し、投与群では 24/50 (48%) と 2 倍以上の差を示した。従来不可能とされてきた齧歯類の寿命延長は、DP、TC などによる薬理的、栄養学的介入が可能となりつつある。

A. 研究目的

実験的に動物の寿命を延長をする確実な手段としては食餌制限 (カロリー摂取制限, DR) が唯一の方法であることが実験老年学の常識である。老化のフリーラジカル説が益々確実視されつつある現在、なお抗酸化物質投与によるストラテジーの寿命延長の試みは、その成功が認知されていない。本研究はプロパジラミン類、特に DP を用いてこのタブーに挑戦することにより、寿命決定の生物学機序を明らかにすると共に、この他の抗酸化物質 [本年度

は、カレー色素ターメリックの主成分クルクミンの腸管内代謝物であるテトラヒドロクルクミン(TC)]をマウスに長期投与することにより、いわゆる抗酸化食品成分の寿命延長への可能性を追求することにより従来の常識を再検討することを目的とした。

B. 実験方法

F344/Du ラット (両性) を用い、18 月齢より DP0.25mg/kg/inj 皮下注 (週 3 回) を開始し、その生存曲線を生食液注射の対照群として比較した。別に

F344/N 雄性 8~10 月齢を用い、前年に引き続き、DP、RG 以外のプロパジラミンである 2HMP、2MP を皮下へ 3 週持続注入することにより脳内外の各部位における SOD、CAT 活性上昇効果を検討し、4 種のプロパジラミンの効果を比較した。別に若齢雄 F344 ラットにおける DP の至適用量として知られる 2.0mg/kg/day, 3 週持続皮下注入を行ったラットについて前年度 RG について見出された脳外組織における SOD、CAT 活性上昇の有無及び 2 種の SOD の mRNA レベルへの効果を検討した。別に大澤班員により実験的大腸癌予防に著明な効果をもつことが証明され、かつ強力な抗酸化作用をもつことの知られるクルクミンの腸管代謝物 TC0.2%含有食を 13 月齢、18 月齢より投与開始した C57BL 雄マウスの生存曲線を対照群と比較した。

(倫理面での配慮) これら動物実験は当研究センター内の実験動物委員会のプロトコールを提出し、科学的、倫理的至当性を承認されている。

C. 研究結果

DP の他、RG、2-HMP、2-HP による、脳ドーパミン作動性部位の抗酸化酵素活性の効果はこれら全てのプロパジラミンにその効果は認められたが、効果の程度は DP>RG>2HMP>2HP の順となり、プロパジラミン以外の化学構造がこの効果に大きな影響をもつことがわかった。RG で脳以外の組織(心、腎)にもこの効果が認められた(Life Sci,67:377,2000) ため、DP について精査したところ、さきに検討した肝では変化しない SOD,CAT 活性は、心、腎のみならず、副腎、脾でも著増し、かつ Cu, Zn-, Mn-SOD の mRNA レベルの上昇を認めた(submitted)。また、TNF α 、IL-1 β 濃度上昇も認められた。18

月齢より DP を 0.25mg/kg/inj 週 3 回投与の両性 F-344 ラット生存曲線の検討では、両性共 DP 投与ラットの有意な生存延長を確認した。しかし、1.0mg/kg/inj の雄ラットの場合、投与 13 ヶ月目には DP 投与ラットの生存率が低く(対照群 7/12 vs. DP 群 3/12) かつ生存ラットの脳線状体 SOD,CAT 活性は両群で差が無く、同様の処理 1 ヶ月の時最大効果をみせる同用量の効果が失われていることが明らかになった(Life Sci,67,2539,2000)。

TC を C57BL 雄マウスに 18 月齢より投与した群は対照群と生存曲線は殆ど変わらず、平均寿命は対照群との間で有意差がなかった。しかし、最長生存 4 匹の平均値は TC 投与群で有意に延長していた。一方、13 月齢より投与したものでは 30 月齢現在対照群 11/50 (22%) vs. TC 投与群 24/50 (48%) と生存率に 2 倍以上の差が認められた。

D. 考察

動物種間には幅広い寿命の差があり、最長寿命はヒトではほぼ 120 年と推定されているが、齧歯類では高々 3~4 年である。この寿命の差を決定している生物学的機序は不明であり多くの仮説があるが、単位体重量当たり曝射される反応性酸素種の量とそれに伴う組織損傷の差として説明するいわゆる“加齢のフリーラジカル説”が最も有力である。この仮説に基づき、多くの研究者が実験動物(主としてマウス)にいわゆる抗酸化物質を投与することにより寿命延長する事ことを試みたが、現在まで unanimous にその効果が認知された物質はなく、実験老年学の現在でのコンセンサスは唯一の寿命延長効果をもつ方法は食餌制限(カロリー摂取制限、DR)とされている。DP は現在まで少なくとも 4 種の動物種(マ

ウス、ラット、ハムスター、犬)でその投与により寿命の有意な延長が報告されているが、否定的な結果の報告もあり、又逆に寿命短縮の報告すらあり、実験老年学者の間でも尚その効果を納得しない者も少なくない。木谷らはF344雄ラットを用い、0.5mg/kg、週3回皮下注が平均寿命を有意に延長すると報告した(Life Sci, 1993)。今回0.25mg/kg/injを用い、同様の検討を両性ラットで繰り返し、再び、その効果を確認した。特に雌ラットにおける報告は諸外国からも全く報告されていない新しい知見である。このような結果にも関わらず、DPの実験動物寿命に対する延長効果が一般的に容易に認知されない理由はその用量依存性にあり、特に過剰量を用いると効果が少なくなるばかりか逆に逆効果(寿命短縮)を招くことがあることによると考えられる。事実木谷らは1.0mg/kg投与では寿命短縮が起こることを報告(Life Sci, 2000)しており、このような場合には後述するSODへの効果も失われている。諸外国の文献中DPの効果を認めないものの殆どは、この用量依存性に対する無知からきていると考えられ、その実用性はともかく薬理学的手法としてDPの寿命延長効果はより確実なものとなったと考えられる。またDPの生存曲線延長効果の作用機序の解明は、加齢・寿命の生物学的機序を探求する有力な手がかりとなろう。木谷らはDPのもつもう一つのユニークな薬理作用である脳ドーパミン作動性組織におけるSOD、CAT活性の上昇作用との因果関係を長年追求してきた。加齢のフリーラジカル説を単純に解釈すれば、抗酸化ストラテジーとしてのSOD、CAT活性のupregulationは合理的な説明が可能である。Cu、Zn-SOD、CAT遺伝子をupregulateされた

transgenic fly (*Drosophila melanogaster*)の寿命延長(Science, 1994)や、最近、寿命延長のmutant *C.elegans*におけるMn-SOD遺伝子の発現上昇(FASEB, 1999)などはSOD活性をmodulationすることが寿命を変化させる可能性を示唆するが哺乳類での証拠は限られている。DP以外のプロバジラミンのこの効果の可能性を調べて3種のプロバジラミンを検討したが、SOD、CAT活性upregulationに関してはDPは勝るものは見当たらず、この薬理作用にはプロバジラミン以外の化学構造により大きな差が生ずることがわかった。更にDPにおいて精査した結果、RGにみられたと同様脳以外の心、腎においてもSOD、CAT活性の上昇をみる以外、副腎、脾など広くカテコラミン作動性臓器に起こる現象であることが判った。木谷らは肝においては抗酸化酵素活性のDPによる上昇がないことを繰り返し報告しており、今回のDPの脳以外臓器での効果は臓器選択性をもつことを示し、現在まで全く報告のない新知見である。同時にIL-1 β 、TNA α 等サイトカインのmobilizationが明らかとなり、従来DPに報告されているIL-2、IL-6、NK細胞機能、interferon γ などのupregulationと合わせ考えると脳SOD、CAT活性上昇とのinteractionによるneurohumonalな機序による寿命の制御、また、そのレベルでの介入の可能性を示唆する新しい発見が得られたと考えられる。TCの結果(特に13月齢よりの投与群)は尚結論が得られていないが栄養学的介入による寿命の延長の試みとして初の成功例となることが期待され、来年度の結果が待たれる。尚、現在同様の試みを緑茶ポリフェノール、八味地黄丸などで試みており、来年度にはその結果を報告でき

ると考えられる。

E. 結論

適当な用量を用いることにより DP はラットの寿命に介入し、それを延長することができ、動物種の寿命規定の生物学的機序の解明に大きな示唆を与える。その機序には脳ドーパミン作動性部位の SOD、CAT 活性上昇が示唆されるが、脳外のカテコラミン作動性臓器（心、腎、副腎、脾）にも同様な現象が新たに確認され、必ずしも脳レベルで全てを説明する必要はなく、又、TNA α 、IL-1 β の mobilization などの新知見を加えるとより全身的な neurohumoral control の意義が強調される。TC によるマウス寿命の延長が来年度確認されれば、life span への栄養学的介入の可能性への新しいステップを上ることになる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO and Carrillo MC. Do antioxidant strategies work against aging and age-associated disorders? Propargylamines : A possible antioxidant strategy. *Ann New York Acad Sci*, in press, 2001.

Kitani K, Minami C, Maruyama W, Kanai S Ivy GO and Carrillo MC. Common properties for propargylamines of enhancing superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat: Implications for the life prolonging effect of (-)-deprenyl. *J Neural Transm (Suppl)* 60:115-132, 2000.

Maruyama W, Yamamoto T, Kitani K, Carrillo MC, Youdim MBH and Naoi M.

Mechanism underlying anti-apoptotic activity of a (-)-deprenyl-related propargylamine, rasagiline. *Mech Ageing Dev* 116:181-191, 2000.

Carrillo MC, Kanai S, Kitani K and Ivy GO. A high dose of long term treatment with deprenyl loses its effect on antioxidant enzyme activities as well as on survivals of Fischer-344 rats. *Life Sci* 67:2539-2548, 2000.

Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y and Kitani K. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2' -azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 48:5068-5073, 2000.

Yokozawa T, Chen CP and Kitani K. Chiyu extract stimulates antioxidant defense ability in senescence-accelerated mice. *J. Trad. Med.* 17, 73-79, 2000.

Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T and Kitani K. A study on the nitric oxide production-suppressing activity of sanguisorbae radix components. *Biol. Pharm. Bull.* 23(6)717-722, 2000.

Kitani K, Yamada Y and Ikeda K (eds.) *Interventions, Part II :Proceedings of the Fourth International NILS Workshop on Longevity Sciences.* *Mech Ageing Dev.* 116(2,3)65-227, 2000.

2. 学会発表

Minami C, Kitani K, Maruyama W, Yamamoto T, Carrillo MC and Ivy GO. Three different propargylamines share properties of increasing antioxidant enzyme activities in dopaminergic brain regions as well as extra-brain tissues in rats. American Aging Association 29th Annual Scientific Meeting, June 2-5, 2000, Boston.

木谷健一 ラサジリンのラット、ドーパミン作動性組織における抗酸化酵素活性上昇作用 第42回日本老年医学会 平成12年6月15~17日 仙台

南知予子、前原佳代子、山本貴子、丸山和佳子、磯部健一、木谷健一 デプレニルによるラット全身諸組織の抗酸化酵素活性上昇効果 第23回日本基礎老化学会 平成12年6月29、30日 大府

木谷健一 加齢・加齢関連疾患に対する酸化的組織損傷の意義：抗酸化ストラテジーの可能性と限界 第12回腎とフリーラジカル研究会 特別講演 9月23日 富山

木谷健一 「加齢のフリーラジカル説と抗酸化ストラテジー」 第10回メイロード反応研究会 特別講演 10月5、6日 岐阜

G. 知的所有権の取得状況

なし