

分担研究報告書

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

分担研究者 井上 正康 大阪市立大学 教授

研究概要 部位特異的SODおよびNO代謝制御法の開発と解析により、脳、血管系、および腎における加齢性病態にフリーラジカルが関与することが判明した。また、これらの病態ではミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝病態が誘起され、これが内因性抗酸化分子群のバランスを崩して細胞死の原因となること、および β 酸化により長鎖脂肪酸をエネルギーに転換するカルニチンがこれらの加齢性病態を著明に抑制することが明らかになった。

A. 研究の目的

加齢性脳心血管障害にスーパーオキシドやNOなどの活性酸素が関与することが示唆されているが、その実体と有効な制御法は確立されていない。本分担研究者は、活性酸素病態の解析により、加齢の素過程における活性酸素の役割を解明すると同時に、新たな抗酸化代謝制御法を開発し、動脈硬化、心脳血管病変、パーキンソン病等の加齢関連疾患を阻止軽減する予防治療法を開発することを目指している。高齢化社会において、加齢関連病態を阻止軽減し、健康な老人集団を確保することを目指すことの医学的および社会的意義は極めて大きい。

B. 研究方法

加齢性病態には細胞内カルシウム輸送病態に起因するミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝病態と内因性抗酸化代謝病態に起因する細胞死が起こる可能性が示唆されたので、その詳細な研究を行った。さらに、この細胞毒性が長鎖脂肪酸を結合して β 酸化を促進するカルニチンにより阻止軽減できる可能性

が考えられたので、その有効性を細胞レベルおよび個体レベルで確認した。病態モデルの *in vitro* 実験系としてはPC12神経細胞を用い、動物モデルとしては老化促進マウス(SAMP8)、線虫(*C. elegance*)、および酸化ストレスによる筋肉細胞死を特色とするオタマジャクシの変態現象を解析に利用した。解析には、肝と腎の機能、神経細胞機能、筋肉細胞死、および個体レベルでの寿命延長効果を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては本学の実験動物倫理委員会の承認の基に研究を進めた。

C. 研究結果

本年度の研究により、各種の循環病態および加齢性病態における活性酸素の発生動態や発生部位、およびそれによる細胞死のメカニズムの概要が明らかになった。特に、細胞レベルおよびミトコンドリアレベルでの解析により、加齢性病態ではミトコンドリア周辺における酸化ストレスが重要であり、その長期的制御が病的老化を予防軽減する可能性が明らかになった。また、

PC12 神経細胞を用いた解析により、ミトコンドリア依存性の細胞死にはカルシウム代謝病態に引き続く長鎖脂肪酸過形成とその内膜毒性が鍵となることが判明した。この重要性は、加齢性病態に深く関与する筋肉細胞および神経細胞などでも確認された。さらに、動物モデルとして老化促進マウス (SAMP8) を用い、カルニチン摂取が老化促進マウスの寿命を延長することを明らかにした。現在、この方法を食事性あるいは医薬品として利用し、加齢性病態を抑制し、個体レベルで有効な老化予防治療戦略を確立しつつある。

D. 考察

個体レベルで部位特異的活性酸素代謝制御を可能とし、これにより加齢性疾患を予防治療する試みは極めて少ない。生体レベルで部位特異的に活性酸素毒性を軽減することを目指す本研究では、毎日の食事成分として利用できる低分子保護分子を用い、神経細胞、血管および腎を保護することが特色である。

G. 結論

本研究では神経細胞のミトコンドリア依存性細胞死がカルニチンにより著明に抑制されること、および老化促進マウス SAMP8 の臨床病態が著明に軽減し、寿命が延長することも判明した。この所見は、カルニチンのミトコンドリア依存性細胞死抑制効果が老化抑制戦略として利用可能だ留事を示唆し、極めて重要な結果と考えられる。

今回、活性酸素代謝が生体の好氣的エネルギー代謝を制御する必須な因子であると同時に、その過程で誘起される酸化ストレスが血管や神経系組織細胞のミトコンドリア、ライソゾーム、DNA、酵素系の加齢性変化の重要な原

動力として作用していることが判明した。酸化ストレスを軽減する抗酸化剤などは血管や神経細胞の加齢性病態を抑制しうる可能性が示唆されているが、食事性や内因性のカルニチンも有効な保護作用を示す可能性が示唆された。加齢性変化は長期に渡りゆっくりと進行する不可逆的過程であり、その阻止軽減には日々のライフスタイルが重要と考えられる。したがって、日々の食物成分に含まれる新規抗酸化成分、およびカルニチンのごとく既知の成分で有効な保護作用を有する因子が加齢性病変の抑制に有効であることが示唆された。今後、この点に注目し、ヒトにおける老化抑制法の具体的方法を開発したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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)

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

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 -

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

研究要旨 高血圧自然発症ラットを用いた血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルにより大脳皮質に局所脳虚血を作製し、アデノウイルスベクターによる脳への遺伝子導入に対する局所脳虚血の影響について検討した。また、老齢高血圧自然発症ラットを用い、虚血脳への遺伝子導入に対する老化の影響を検討した。

成熟動物の脳虚血後 90 分の時点で、*E.coli* β -galactosidase の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを脳室内に注入し、脳室壁に導入された β -galactosidase の発現を偽手術群と比較した。偽手術群での導入遺伝子発現は、導入後 6 時間より認められ、12 時間をピークとして、以後減弱した。一方、脳虚血後に導入すると、1 日後までの発現は同程度であったが、虚血 4 日および 7 日後での発現が、偽手術群に比し有意に増強しており、脳虚血による発現増強効果が認められた。

また、老齢動物の大脳皮質への遺伝子導入では、非虚血部における発現の程度には成熟動物との有意な差はみられなかったが、虚血辺縁部および虚血中心部では、虚血 4 日後および 7 日後の時点で導入遺伝子の発現が増強しており、老化による発現増強効果が認められた。以上の結果から、老齢者の脳梗塞に対する遺伝子治療が有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでに高血圧自然発症ラットを用いて再現性の良い脳虚血モデルを開発し、脳虚血の病態生理についての基礎的検討を行うことで、虚血性細胞障害の抑制を目指した研究を進めてきた。また、高齢者では脳梗塞の発症が多いという事実から、老化自体が脳虚血に及ぼす影響は重要な問題と考えられ、老齢動物における脳虚血の病態について、形態学的あるいは生化学的手法を用いて、成熟動物との比較検討を行ってきた。この結果、老化に

伴って虚血性脳神経細胞障害が増悪すること、すなわち、加齢による虚血脆弱性が存在することを認めた。この老化による虚血脆弱性の機序について、脳内血行動態や脳虚血の際の神経伝達物質の大量放出、虚血に対するストレス応答蛋白の誘導などが関与していることなどを報告してきた。

昨年度の研究では、近年注目されている最新の分子生物学的手法である遺伝子導入の技術を用い、虚血脳への遺伝子導入の有効性に関する基礎検討を行い、導入遺伝子の発現が脳血流によ

って規定されること、導入遺伝子発現の脳血流閾値が存在することを報告している。今年度の研究では、さらに脳梗塞の遺伝子治療に関する基礎的な研究を進める目的で、脳虚血とそれに続く二次的反応が脳への遺伝子導入に及ぼす影響に関する検討を行った。また、高齢者への遺伝子治療の可能性を探る目的で、高齢動物の虚血脳への遺伝子導入の有効性に関する検討を行った。これらの研究により、老年者の脳梗塞の病態解明、さらには治療へと結びつけていく重要な基礎データが得られることが期待される。

B. 研究方法

成熟動物への遺伝子導入：

雌性高血圧自然発症ラット (SHR、5-8ヶ月齢) を用い、アデノウイルスベクターによる脳室壁への遺伝子導入に及ぼす局所脳虚血の影響を検討した。脳虚血の作製には、我々の教室で開発したクリプトンレーザー照射とローズベンガルの静注による血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルを用い、右大脳皮質に局所脳虚血を作製した群 (虚血群、n=14) と偽手術群 (n=16) を対象とした。脳虚血作製後90分の時点で、標識遺伝子 (*E. coli* β -galactosidase) を組み込んだ非増殖性ヒト5型アデノウイルスベクター 20 μ l (1.3×10^{12} particles/ml) を、非虚血側の脳室内に注入した。同様に、偽手術群の脳室内にも同量のウイルスベクターの注入を行った。アデノウイルスベクター注入後3、6、12時間、1、4および7日の時点で、灌流固定後に脳を摘出した。脳の冠状切片 (厚さ2mm) を作製後、脳室壁に導入された β -galactosidase の発現を組織化学的 (X-Gal 染色) に同定した。導入遺伝子発現の程度は、半定量法により expression score (0-3) として評価し、

虚血群と偽手術群での発現を比較検討した。また、虚血群においては、頭頂葉皮質 (bregma 後方 2 mm、側方 4 mm) の脳血流を、虚血前及び虚血開始後 10、30、60 分の時点でレーザードップラー血流計により測定した。

高齢動物への遺伝子導入：

高齢雌性 SHR (19-21ヶ月齢) を用い、アデノウイルスベクターによる脳虚血部位への遺伝子導入の有効性を成熟 SHR (5-7ヶ月齢) と比較検討した。脳虚血の作製には、既述の血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルを用い、右大脳皮質に局所脳虚血を作製した。虚血側頭頂葉皮質の2ヶ所 [bregma の後方 1.5 mm、右側方 2.7 mm (I-p) および 4.0 mm (I-c)] と非虚血側頭頂葉皮質 [bregma 後方 1.5 mm、左側方 2.7 mm (C)] の脳血流量を、脳虚血前および虚血開始後10、30、60分の時点でレーザードップラー血流計により測定した。脳虚血後90分の時点で標識遺伝子 (*E. coli* β -galactosidase) を組み込んだ非増殖性ヒト5型アデノウイルスベクターを、各脳血流測定部の皮質表層より深部 2 mm に 5 μ l (1.3×10^{12} particles/ml) ずつ注入した。脳虚血作製後1、4および7日の時点で脳を摘出し、脳内に導入された標識遺伝子の発現を同定した。非虚血部および虚血部位における導入遺伝子の発現には、組織化学染色 (X-Gal) で同定し、expression score として半定量的に評価を行った。また、化学発光法を用い、脳虚血部での β -galactosidase の発現を定量的に測定し、成熟群と高齢群で比較検討した。

C. 研究結果

成熟動物への遺伝子導入：

脳虚血導入後 10 分での頭頂葉皮質の血流は、前値の $31 \pm 2\%$ に低下し、

以後も低値を持続した。偽手術群では、脳室壁での導入遺伝子の発現が、導入6時間後より認められ (expression score 0.9 ± 0.1 、平均 \pm 標準誤差)、12時間後に 2.3 ± 0.3 とピークとなり、1日後 1.5 ± 0.1 、4日後 1.2 ± 0.1 、7日後 0.3 ± 0.1 と漸減した。一方、虚血群の脳室壁では、偽手術群と同様に導入6時間後より導入遺伝子の発現が認められ、12時間後をピークとし、導入1日後まで発現の程度に差は認められなかった。しかしながら、虚血群では導入4日後および7日後の expression score が、それぞれ 1.7 ± 0.2 ($p < 0.05$)、 0.6 ± 0.2 ($p = 0.05$) と、偽手術群と比較して発現の程度がより増強していた。

老齢動物への遺伝子導入：

老齢群の生理学的諸変量については、成熟群と比較して平均動脈圧とヘマトクリットが軽度低値を示していたが、その他のパラメーターには差を認めなかった。中大脳動脈閉塞後60分での頭頂葉皮質の脳血流は、老齢群では虚血側の I-p で前値の $45 \pm 5\%$ (mean \pm SEM) に、I-c で $22 \pm 3\%$ に低下した。この血流低下の程度は、成熟群と差を認めなかった。

導入遺伝子発現の組織化学的な検討では、C および I-p では脳虚血後1、4、7日のいずれにおいても、老齢と成熟の両群で有意な差は認められなかった。虚血中心部である I-c においては、脳虚血後1、4日の時点では有意な差は認められなかったが、虚血7日後の expression score (平均値) は成熟群 0 (n=5) に対して老齢群は 1.0 (n=4) と有意に発現が増強していた ($p < 0.05$)。化学発光法による定量的検討でも、脳虚血後7日の I-c での標識遺伝子の発現量は、成熟群 1.3 ± 0.4 mU/mg protein (n=4) に対して老齢群では 8.0 ± 1.7 mU/mg protein (n=5) と有意に高

値であった ($p < 0.01$)。

D. 考察

これまでの研究から、脳室壁へのアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入の有効性が高く、中枢神経系疾患、特に脳血管障害の急性期治療への応用が期待されている。今回の検討から、アデノウイルスベクターを用いた脳室壁への遺伝子導入の発現は、脳室内投与後少なくとも6時間後に認められ、12時間後にはピークに達することが示され、脳疾患の急性期治療に応用できる可能性が示唆された。また、脳室壁への導入遺伝子の発現は、大脳皮質の局所脳虚血によって増強することが示され、虚血性脳血管障害への応用が有効である可能性が示唆された。今回用いた血栓性中大脳動脈閉塞モデルでは、虚血巣は脳皮質に局限されるため、脳室壁は直接脳虚血に陥らない。したがって、脳室壁での発現の増強には、二次的な因子が介在していると考えられる。今後、炎症性シグナルなどの関与をさらに検討していく予定である。

老齢動物を用いた虚血脳への遺伝子導入の検討では、虚血中心部での遺伝子発現が増強している結果を得た。また、本実験モデルでは、老齢群の方が成熟群よりも梗塞範囲が大きくなり、成熟群では梗塞巣の脳表での辺縁が、bregma より外側 3.1 ± 0.8 mm (mean \pm SD) であるのに対し、老齢群で 2.4 ± 0.3 mm ($p < 0.05$) であることを認めている。したがって、虚血辺縁部 (I-p) においては虚血侵襲がより強いと考えられる老齢群でも成熟群と同程度に発現がみられたことは、やはり老齢群での発現が増強していることを示唆している。

導入遺伝子の発現に寄与する宿主の因子として、蛋白合成能や免疫能など

が挙げられるが、蛋白合成能は加齢とともに低下することが示されており、この点では老齢群の方が発現量は減少するものと考えられる。しかしながら、免疫能は加齢によって低下するため、老齢群で易感染性となり、遺伝子導入効率率は成熟群よりも良いと考えられ、また免疫反応の低下から、感染細胞の排除の遅延が生じ、成熟群よりも発現期間が持続する可能性が考えられる。また、アデノウイルスベクターに対する受容体数の増加あるいは親和性の増大が老齢動物で生じている可能性も考えられる。今後これらの機序に関しての検討を加える予定である。

E. 結論

アデノウイルスベクターを用いた脳室壁への遺伝子導入は、局所脳虚血により導増強する可能性が示された。また、脳虚血部に対するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入において、虚血辺縁部（ペナンプラ領域）および虚血中心部での発現が増強することが示され、老齢動物での虚血脳への遺伝子導入の有効性が示唆された。

F. 研究発表

1.論文発表

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.

2. 学会発表

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, Ooboshi 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.

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御

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

研究要旨 香辛料やハーブ、特に、「ゴマ種子」中の「抗酸化リグナン類」や、香辛料「ターメリック」として有名な「ウコン」中の「クルクミン類」とその抗酸化性代謝物「テトラヒドロクルクミン」の持つ老化制御機能について検討を進め、「抗酸化リグナン類」としては「セサミノール配糖体」と共に「セサモリン」の持つ遺伝的な動脈硬化発症の抑制、また、「クルクミン類」については抗酸化酵素や薬物代謝酵素誘導による生体防御能に対する予防効果の検討を行い、これらの食品因子の酸化ストレス制御機構について分子レベルからの解析を行った。

A. 研究目的

加齢病態の大きな原因の一つと考えられている「酸化ストレス」制御の可能性のある食品因子（フードファクター）の検索を進め、われわれが特に注目したのが「ゴマ」や「ターメリック」をはじめとするハーブやスパイスである。ゴマについては、「セサミノール」と命名した強力な抗酸化物質が、ゴマ油の精製工程で「セサモリン」を前駆物質として2次的に大量に生成するとともに、特に昨年度においては、ゴマ種子の50%を占める脱脂粕中に存在する「セサミノール配糖体」を摂取したときに腸内細菌のもつβ-グルコシダーゼにより加水分解を受け、生体内で二次的に生産されることを明らかにしている。また、インド料理に不可欠な香辛料「ターメリック」は「ウコン」とも呼ばれ、沖縄では「うっちゃん茶」とか「ウコン茶」として広く愛飲されている。われわれは、この「ターメリック」の主成分である黄色色素が、摂取後、腸管吸収の際に還元されて強力な抗酸化物質「テトラヒドロクルクミ

ン」に変換され、大腸がん予防効果を示すことを明らかにしてきた。

そこで、本年度は、新たにゴマ種子中の主要なリグナンとして知られている「セサモリン」に注目し、アポE欠損マウスを用いた動脈硬化発症予防の可能性の検討を行った。さらに、「テトラヒドロクルクミン」にの疾病予防の可能性として、第II相の酵素誘導も含めた抗酸化酵素誘導の可能性の検討を行うと共に、「テトラヒドロクルクミン」を用いてコレステロール負荷ウサギを対象に動脈硬化予防の可能性についての検討を行った。

B. 実験方法

「セサモリン」は、ゴマ種子を粉碎後、n-ヘキサンで脱脂し、エタノール抽出により粗抽出物を得た後、分取用HPLCで大量精製を行い、30gの「セサモリン」を得ることができた。また、動物は、7週齢の雄アポE欠損マウスとその対照系統C57BL/6Jマウスに0.2%セサモリンを18週間投与した後、動脈、血清、肝臓を得た。

また、Watanabe Heritable Hperlipidemia (WHHL) Rabbits に対して 0.2%の SG を 1 2 週間投与した後に、種々の検討を行った。

「テトラヒドロクルクミン」(THC) 投与実験は、体重 2.2-2.7kg の New Zealand White Rabbits (NZW)を 2 群に分け、コントロール群には正常食、実験群には 0.5%THC を含む餌を与え、一週間飼育した後から 1%コレステロールを 1 3 週与えた後に大動脈、肝臓、腎臓、血清を得た。

また、酸化ストレスバイオマーカーとして、リノール酸ヒドロペルオキシドに修飾されたリジンより生成するヘキサノニルリジン(HEL)をエピトープとする特異的なモノクローナル抗体と好中球やマクロファージによる酸化傷害バイオマーカーとして最近注目を集めているチロシン 2 量体、ジチロシン(dityrosine)に特異的なモノクローナル抗体を用いた。

C. 研究結果

現在、動脈硬化症における酸化ストレスの関与は特に初期反応が注目されている。本研究では、アポ E 欠損マウスとその対照系統 C57BL/6J マウスにおいて脂質過酸化初期反応物の一つである 13-HPODE のタンパク質修飾物の HEL およびフリーラジカル由来の修飾蛋白 dityrosine と動脈硬化症の関わりに着目し検討を行った。結果は、アポ E 欠損マウスにおいて血清中のコレステロールは高い値を示した。脂質過酸化反応生成物 TBARS が増加し、また抗 HEL および抗 dityrosine 抗体を用いた免疫化学的手法(ELISA)よりアポ E 欠損マウスの肝臓および腎臓における HEL および dityrosine の生成量は高い値を得た。この結果からアポ E 欠損マウスの生体内に酸化ストレスが亢進していることが推測される。

さらに、抗 HEL および抗 dityrosine の抗体を用いた免疫組織染色より 25 週齢のアポ E 欠損マウスの動脈硬化巣では HEL および dityrosine が存在していることより、それらは動脈硬化の発症、進展に関与していることが示唆された。アポ E 欠損マウスにおいて高コレステロール血症より生体内酸化ストレスが亢進した結果、脂質過酸化反応生成物を生じ、脂質過酸化産物 HEL および蛋白質の酸化的傷害マーカーである dityrosine が増加した結果よりリポ蛋白質においてこのような酸化反応が起きて、動脈硬化の発症および進展を促進することが推測される。脂質過酸化反応二次生成物である MDA 及び HNE がアポ E 欠損マウスの動脈硬化巣に存在していることがすでに報告されていたが、今回注目した脂質過酸化反応初期産物脂質ヒドロペルオキシドによる蛋白修飾物である HEL も動脈硬化の進展に関与していることが証明された。生体内酸化ストレスが亢進した結果脂質過酸化反応を引き起こし、脂質過酸化反応より生じた初期産物および安定的な最終産物アルデヒド類による酸化修飾蛋白質やフリーラジカル由来の酸化修飾蛋白質は動脈硬化症の発症および進展に大きな役割を果たしていることが示唆される。また、HEL および dityrosine は動脈硬化の初期段階においてバイオマーカーとして期待ができると考えられる。

このように、酸化ストレスと動脈硬化症との関わりが明らかになるにつれ、抗酸化食品因子を摂取することにより動脈硬化症の予防に大きな注目が集められている。食品中には抗酸化性を有する様々な成分が存在しており、これらの摂取が生体内に発生する活性酸素、フリーラジカル、脂質過酸化産物を抑制する効果があると期待されている。本研究で検討したのは日本をはじめ世

界中で食べられているゴマであり、ゴマは古くから体によいと言われ、ゴマ種子に抗酸化性をもつ脂溶性リグナン類と水溶性リグナン配糖体が多く含まれている。「セサミノール」とその配糖体は動脈硬化症を予防する効果が報告されている。「セサモリン」についてはその物質自身は抗酸化性を示さないが、経口摂取により抗酸化性を持つ「セサモール」や「セサミノール」に代謝されたことにより生体内の抗酸化性が明らかにされている。本研究では0.2% セサモリンをアポE欠損マウスに経口投与することにより、マウスの血清中のコレステロールには影響を与えなかったが、肝臓においてHEL及びdityrosineは有意に減少した。また、動脈硬化巣のコレステロールの沈着は低下傾向が見られた。抗酸化剤の動脈硬化症における抑制効果のメカニズムはいまだに不明な点が多い。脂質過酸化が動脈硬化の発症に関連していることが明らかにされている。「セサモリン」は経口摂取により生体内の脂質過酸化産物の生成を抑制すると同時にフリーラジカルにより修飾タンパクの生成を抑えることにより動脈硬化の進展を抑制すると考えられる。

多くの調査において心血管疾患(CVD)に対する抗酸化剤の効果が報告されている。今回は注目したのは強い抗酸化性を持つターメリックの黄色色素の成分の一つであるクルクミノイドの生体内の代謝物である「テトラヒドロクルクミン」(THC)である。1%コレステロール負荷したウサギに0.5% THCすることにより血清中のコレステロールは低下しなかったが、肝臓においてTBARSは抑制され、肝臓中では抑制傾向が見られた。動脈硬化の発症にLDLが発症の引き金になっているといわれているが、ウサギの血清から分離したLDLをex vivoで酸化

誘導剤Cu²⁺を添加および非添加してインキュベート2時間により脂質過酸化度を示す指標であるTBARSを測定した結果は酸化誘導剤Cu²⁺を非添加した(native LDL)においてTBARSが抑制される傾向が見られた。生体内にフリーの金属イオンが極微量であることが知られているが、native LDLは生体内の条件に近いので、native LDLにおける過酸化脂質の生成量は実際の生体内の条件に近いので、その抑制される結果から、THCの投与によりウサギの生体内にもLDLの酸化が抑えられているのではないかと推測ができる。また、酸化ストレスマーカーであるHELにおいて肝臓中では有意に抑制された。ウサギの大動脈のコレステロール沈着の割合を検討した結果はTHCを投与した群では減少傾向が見られたが、有意差は見られなかった。というのは、1%コレステロール負荷したウサギに対して血清中高コレステロールにより酸化ストレスが亢進して生じた脂質過酸化産物が動脈硬化に関与することと同時に、高コレステロール血症により動脈壁にコレステロールの沈着することが及ぼす他の促進因子の発現することによって動脈硬化の発症と進展に促進していることが考えられる。今回、抗酸化剤として用いたTHCは0.5%濃度にしたが、高コレステロール負荷に対してその濃度について再検討する必要があると考えられる。また、最近、コレステロール負荷したウサギにおいて血清中およびLDL中のコレステロールが低下し、脂質過酸化産物の指標であるTBARSを抑制したことにより動脈硬化の進展が抑えられたという結果が得られた。これらの結果からターメリックの成分であるcurcuminoid類は新しい抗酸化食品因子として脂質の代謝に関与する生活習慣病などの疾病の予防に期待ができる。

今回の研究において、食品の機能性成分の摂取による生活習慣病の一つである動脈硬化症の予防効果について検討したが、食品に存在する多くの抗酸化成分はそれぞれ異なった代謝、吸収や抗酸化特性を持つこと、また同じ成分としても動物種によってそれぞれ違うと思われる。疾病の予防効果は、 β -カロテンの発ガン予防に関する介入試験のように単一成分の過剰摂取はかえって生体に悪影響を及ぼすことが考えられる。多種多様の抗酸化成分を食品として適量摂取することは生体に有効であると考えられる。今後の課題として、「セサモリン」や THC などの抗酸化成分や機能成分を混在し生体での有効性について検討していくべきであると考えている。日常の食事から、健康を望む人々の食生活に貢献出来ることを切望している。

D. 考察

われわれは、「フードファクター」（食品因子）としてのゴマリグナン類やクルクミン類に着目して研究を進め、本年度は、「セサモリン」が、アポ E 欠損マウスを用いた動脈硬化発症のモデルに対して「酸化ストレス」予防により抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、「テトラヒドロクルクミン」を用いて、コレステロール負荷による動脈硬化発症ウサギモデルを用いた実験で動脈硬化予防効果が明らかとなったことは、極めて興味深い結果である。

今回の研究において、食品の機能性成分の摂取による生活習慣病の一つである動脈硬化症の予防効果について検討したが、食品に存在する多くの抗酸化成分はそれぞれ異なった代謝、吸収や抗酸化特性を持つこと、また同じ成分としても動物種によってそれぞれ違

うと思われる。疾病の予防効果は、 β -カロテンの発ガン予防に関する介入試験のように単一成分の過剰摂取はかえって生体に悪影響を及ぼすことが考えられる。多種多様の抗酸化成分を食品として適量摂取することは生体に有効であると考えられる。今後の課題として、sesamololn や THC などの抗酸化成分や機能成分を混在し生体での有効性について検討していくべきであると考えている。日常の食事から、健康を望む人々の食生活に貢献出来ることを切望している。

E. 結論

食品による加齢病態の制御の可能性は、ようやく、スタートしたばかりである。しかし、がんをはじめ動脈硬化や糖尿病合併症など生活習慣病とよばれる疾病の予防における食品への役割については、大きな期待が持たれてきている。実際の老化制御の可能性については、長期間の投与実験が必要となるが、われわれのグループは、本プロジェクトの主任研究者である長寿医療研究センター、木谷健一センター長のグループを中心に共同研究が既に進行中である。最終的な結論が出るまでにまだ時間を要するが、この分野の研究の進展に大きな期待がなされているものと確信する。

動脈硬化症は、特に血管内膜下にコレステロールが蓄積する粥状動脈硬化症は虚血性心疾患や脳血管障害の原因となる。近年日本でも欧米並みに増加してきている。動脈硬化の発症原因は高コレステロール血症をはじめ脂質代謝異常および動脈壁変化炎症、血小板凝集や血栓変化など多方面から取り上げられる。現在最も注目されているのは酸化ストレスが関与するという発症仮説である。すなわち、体の各組織に

コレステロールを運搬する LDL が酸化を受けて変性するのが動脈硬化発症の第一歩である。血管壁における粥状動脈硬化の形成には二つの現象が関与している。一つは細胞成分の反応であり、もう一つはコレステロールエステルの蓄積である。高血圧、耐糖能異常、高脂血症、遺伝因子などの危険因子に細胞は反応し、細胞増殖因子やサイトカインの分泌調節を起こしうる。一方、高脂血症は血管壁に沈着するコレステロールを提供する。高脂血症は、とりわけ高コレステロール血症が動脈硬化症の最大の危険因子であることが種々の研究により示されている。

アポ E 欠損マウスは家族性型高脂血症に類似して、血清中コレステロールを多く含む VLDL とその中間レムナント IDL が増加している。普通食飼育においても動脈硬化が認められ、その組織像は人の粥状動脈硬化と似ている。このため、このマウスと他の因子をノックアウトしたマウスの交配により、対照アポ E 欠損マウスに比べ fatty streak の面積の程度を評価することは広く研究に用いられている。それにより高脂血症の動脈硬化へ作用機構を明らかにされつつある。また、アポ E 欠損マウスにおいて LDL の凝集および酸化されやすいということと、アポ E 欠損マウスにおいて酸化 LDL に関連するスカベンジャーレセプターが発現誘導されることなどが報告されている。これらのことから、脂質関連蛋白質の酸化の動脈硬化への作用を明らかにすることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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大事-歴史、現状、未来展望) 2000年11月 東京

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

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

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

研究要旨 一酸化窒素 (NO) 酸化物のパーオキシナイトライト (ONOO⁻) 惹起モデルをリポポリサッカライド (LPS) と虚血-再灌流を施して作製し, 地榆エキスの影響を検討した結果, ONOO⁻ 惹起モデルで検出された 3-ニトロチロシン(ONOO⁻ によって蛋白質中のチロシン残基がニトロ化したもの) レベルが著明に低下し, また腎組織中の DNA の断片化も軽減し, 腎機能低下も改善していた。以上, 昨年度並びに本年度の結果より, 地榆エキスはフリーラジカルが関与した腎障害に対し, 改善作用を有することが明らかとなった。一方, LPS で活性化したマクロファージを用い, NO 産生, 誘導型 NOS (iNOS), NADPH-diaphorase 活性を指標に活性成分の精製を試みた結果, sanguin H-6 に強い活性を認めた。

A. 研究目的

NO は NO 合成酵素(NOS)によって L-アルギニンから合成される多彩な生理作用を持つ分子である。腎臓では 3 種類の NOS が発現しているが, それぞれに由来する NO は腎血流量, 糸球体濾過などの生理作用への関与とともに, その産生の促進あるいは低下によって種々の腎病態に重要な役割を担っている。このうち iNOS は通常 LPS, IL-1 β や TNF- α などのサイトカインによって遺伝子転写レベル調節を受けて発現しており, iNOS によって生成される NO は eNOS と nNOS によって生成される NO よりはるかに多量であり, 過剰産生された NO はフリーラジカルとしての反応性を有し, DNA 合成阻害, ミトコンドリアにおけるエネルギー産生阻害, ヘム, Fe²⁺, SH 基を持つ蛋白質と反応して, 不活性化などを引き起こす。特に NO とスーパーオキシド (O₂⁻) が反

応して産生される ONOO⁻ は極めて毒性が強く, 慢性腎不全, 急性腎不全, 腎炎などの腎病態に深く関与していると考えられている。

一方, 生体にはフリーラジカルを消去する多くの防御システムが存在し, 悪玉フリーラジカルの障害を防御している。しかし, フリーラジカルの過剰産生あるいは防御システムの破綻が生じた場合, フリーラジカルを効果的に消去することが不可能となり, その結果, フリーラジカルが蓄積して酸化ストレス状態を引き起こす。この場合, フリーラジカルスカベンジャー, 抗酸化剤は重要な役割を果たすと考えられており, 多くの研究者がこの点に注目し, 新しく安全で, 有効な天然抗酸化剤, フリーラジカルスカベンジャーの開発をめざしている。

伝統的な生薬は何千年もの間, 人類の健康と病気の治療に使われてきた。

現代医学が非常に発達した今日においても、その広範な生物活性、さらには低い毒性と副作用によって、臨床治療、特に健康保健の面で依然として愛用されている。しかし、伝統生薬は古来の経験に従って用いられており、薬効、薬理作用についての非科学的な面が多い。近年、伝統生薬の薬理学的研究、有効成分の同定、作用機序の解明が活発に行われ、伝統薬物の有用性が再確認され、また西洋薬、合成薬の有効性の限界や毒性、副作用などの問題によって伝統薬物が再認識されてきており、新しい生物活性物質、治療薬開発の潜在的な源と考えられている。フリーラジカルに対する作用研究においても、多くの伝統生薬とその成分が抗酸化、フリーラジカル消去作用を有することが報告されているが、NO についての研究報告はほとんど見られない。

本研究課題において、著者は伝統生薬の NO 消去活性を指標としたスクリーニング試験に着手し、最も強い活性を示した地榆 (*Sanguisorba officinalis* L., *Sanguisorbae Radix*) の影響を検討しているが、昨年度、NO、O₂ が関与する腎障害モデルを用い検討した結果、これらラジカル消去作用を介して腎機能に好影響をもたらしている所見を明らかにした。このことは、酸素代謝制御を有する新たな治療薬開発の可能性を示唆するものであり、本年度は ONOO⁻ 惹起モデルを用い検討するとともに、活性成分について究明した。また酸化亢進状態にある老化促進マウス (SAM-P/1) における地榆エキスの影響も評価し、他の伝統生薬と比較検討した。

B. 実験方法

Wistar 系雄性ラット (6 週齢、体重 150 g 前後) に地榆エキスを 100 あるいは 200 mg/kg 体重/日を 30 日間連日経口

投与し、次いで LPS と虚血-再灌流を施し、血液、腎臓を採取した。これら試料の 3-ニトロチロシン、DNA 断片化の程度を中心に検討した。

SAM を用いた実験では、主としてグルタチオンレドックスサイクルに及ぼす影響を検討した。地榆エキスからの活性成分の検索は LPS 刺激マクロファージを用い検討した。

C. 研究結果

3-ニトロチロシンを HPLC で測定した結果、LPS と虚血-再灌流を施したラット血漿では検出され、偽処理した場合には検出されなかった。一方、LPS と虚血-再灌流を施す前に 30 日間地榆エキスを経口投与したラットでは、非投与群より低い 3-ニトロチロシン値を示し、腎機能の指標の血漿尿素窒素、クレアチニンレベルも著しく低下していた。また腎組織中の DNA 断片化も抑制され、地榆エキスが ONOO⁻ による酸化的損傷を軽減していることが推測された。一方、SAM で認められる抗酸化防御系の低下も、地榆エキスによって是正されている知見が得られた。

地榆エキスからの活性成分の検索を LPS で活性化したマクロファージを用い、まずタンニン画分と非タンニン画分に分け検討した結果、タンニン画分に活性を認めた。タンニン画分をさらに低、高分子量の水溶性タンニンと高分子量の procyanidine に分画し、活性の認められた画分から sanguin H-6, sanguin H-11, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose, eugenin, polymeric proanthocyanidin を単離した。これら化合物の中で sanguin H-6 が最も強い活性を示し、次いで 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose, sanguin H-11 の順であった。sanguin H-6 による活性は iNOS

の特異的阻害剤の aminoguanidine 100 μ M と同程度の効果を示していた。

D. 考察

フリーラジカル・活性酸素は生体内に侵入したウイルスや癌細胞を攻撃したり、血管弛緩作用を持つものなど、我々の生体にとって必要である反面、さまざまな要因によって過剰産生されたフリーラジカル・活性酸素は細胞膜の脂質、蛋白質、酵素に傷害を与え、老化や生活習慣病をはじめとする種々の疾病の原因・増悪因子となることが示され、現在、悪玉のフリーラジカル・活性酸素を効率良く消去し、かつ安全性の高い抗酸化物質が探索されている。腎においてもフリーラジカルや活性酸素が腎疾患の増悪因子として酸化ストレス状態と関与していることが報告されており、このような酸化ストレス状態を地榆エキスが緩和する作用を有していることを、本研究課題で明らかにすることが出来た。またこのような作用はエラージタンニンの sanguin H-6 によるものと考えられ、その詳細な作用機序については、目下検討中である。タンニンは生体内に吸収されても多くの場合、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体、メチル抱合体として存在することが報告されているが、生薬成分の中にはそのままの形で吸収されるものもあり、多成分系の生薬の効果を考察する場合、体内動態を検討する必要がある、この点についても現在、検討中である。

E. 結論

NO 並びに NO 酸化物の ONOO⁻ による腎障害に対し、地榆が改善作用を有していることを明らかにした。また SAM においても好影響を及ぼし、このような作用は我々が検討しているイボ

ツツラフジ、薬用人参、羅布麻、緑茶、丹参などの抗酸化物とは異なっており、新しい治療薬開発の素材の可能性が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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.

G. 知的所有権の取得状況
なし