

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 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木谷 健一
平成 14 (2002) 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
木谷健一	
II. 分担研究報告書	17
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	19
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	23
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-	27
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. 地榆エキスと活性成分 sanguin H-6 の生体内動態	34
横澤隆子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	45

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 特別客員研究員

研究要旨 ウコン中の抗酸化物質クルクミン(C)とその代謝物テトラヒドロクルクミン(TC)が糖尿病、白内障の予防に効果があることを確かめ、又酵母由来のグルタチオンが糖尿病性腎症、同神経障害に抑制効果のあることを明らかにした（大澤）。本邦では使用されていない地榆の抗酸化能が主としてエラージタンニンの sanquinin H-6 によることを明らかにし、地榆エキスと sanquinin H-6 の生体内動態を明らかにし、ellagic acid の代謝物を確認した（横澤）。C57BL を雄マウスを用い、TC、緑茶ポリフェノール (PP)、八味地黄丸 (八地) の生存曲線に及ぼす効果を検討し、TC、PP に有意の寿命延長効果を認めた（木谷、大澤、横澤）。(-)デプレニル(DP)投与のサイトカインへの影響を検討し、IL-2, IL-6 では腎における低下、副腎においては上昇の傾向を認めた（木谷）。自然高血圧ラット(SHR)の脳内に IL-10 を組み込んだアデノウイルスベクターを投与すると、標織遺伝子(β -galactosidase)導入ラットに比し、実験的脳梗塞の容積の有意な減少、白血球細胞浸潤の有意の減少を認め、IL-10 を用いた脳梗塞の遺伝子治療の可能性を示した（大星）。家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の神経病態、SAM などの加齢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病態の原因となること、及び β 酸化により長鎖脂肪酸をエネルギーに変換するカルニチンがこれら病態を著明に抑制することを明らかにした（井上）。

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.研究の目的

酸化ストレスは、活性酸素をはじめとするフリーラジカルとよばれる反応性の高い分子により誘導される。このフリーラジカルは、ヒトの体が正常に機能しているときには、ウイルスや病原菌の殺菌などの生体防御に必須な物質で重要な生理的役割を果たしているが、過剰に生じたフリーラジカルは多種多様な生体傷害を引き起こすものと考えられている。一重項酸素やスーパーオキシドなどとともに最近注目されてきている NO 由来の ONOO-やミエロペルオキシダーゼにより生成される OCI などの反応性の高いフリーラジカルがタンパク質や酵素、核酸などの生体構成成分へ攻撃が続き、最終的

にさまざまな糖尿病の合併症、なかでも動脈硬化や白内障、腎不全などの原因となっていることが明らかにされてきている。糖尿病で酸化ストレスが亢進するのは、高血糖状態が続くことにより生体構成タンパク質の糖化反応やポリオール代謝とレドックス、プロスタグランジン代謝などの経路とともに、グルコースの自動酸化などの経路により活性酸素が生成し、動脈硬化をはじめ腎障害、糖尿病性白内障などの原因となると考えられる。そこで、我々は、糖尿病性合併症の予防に抗酸化成分が大きな役割を果たしているのではないかと考え、将来的には「糖尿病合併症の予防食品」の開発を本研究の目的とする。(大澤)

本研究課題において、著者らは伝統生薬の 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., Rosaceae; *Sanguisorbae Radix*) の影響を検討しているが、これまで NO, O₂⁻, ONOO⁻ が関与する腎障害モデルにおいて、ラジカル消去作用を介して腎機能に好影響をもたらす所見を明らかにした。このような地榆エキスによる酸化的ストレス状態の緩和作用は、エラージタンニンの *sanguin H-6* によることも明らかにした。一方、経口投与した生薬ならびに生薬成分の中にはそのままの形で吸収されて薬効を示すものもあるが、多成分系の生薬の作用を考察する場合、体内動態を検討する必要があり、本年度はこの点について検討した。(横澤)

加齢のフリーラジカル説は、最近とみにその重みを増している。しかし、いわゆる加齢関連疾患 (age-associated disorders) における場合と違い、実験動物の生存曲線を指標とした加齢そのものに対しては、抗酸化療法の確実な成功の報告はなく、20 世紀の実験老年学の常識は、唯一の生存曲線延長法は“カロリー摂取制限”であるとされてきた。この常識へのチャレンジとしてカレー色素ターメリック中のクルクミン、PP、八地など強力な抗酸化能が知られている物質の持続経

口投与によるマウス生存曲線の延長を目標だ。これは毎日摂取しうる飲食物を通して、健康寿命の延長を目指したものである。さらに臨床的に投与可能な薬物であるデプレニルに知られる動物生存曲線の延長効果の機序を探るため、昨年引き続きインターロイキン (IL) の臓器内濃度の変化を検討した。(木谷)

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の重要性に着目し、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な手法を用いて、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明らかにし、その機序とし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。

昨年度までの本研究では、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において導入遺伝子の発現が脳血流によって規定され、導入遺伝子の発現には血流閾値が存在すること、大脳皮質の局所脳虚血によって遠隔部位である脳室壁での導入遺伝子発現が増強すること、加齢によって脳虚血部位の遺伝子発現が増強することなどを報告してきた。

今年度の研究では、脳梗塞の急性期治療としての遺伝子治療の有効性に関する研究をさらに進め、炎症性サイトカインの産生を抑制する抗炎症サイトカインである interleukin-10 (IL10) の遺伝子導入を脳梗塞急性期に行い、炎症細胞浸潤と脳梗塞縮小効果の検討を行った。これらの研究を進めていくことにより、老年者の重要な疾患である脳梗塞の病態解明、さらには有効な治療法の開発へと結びつ

く重要な知見が得られると考えられる。

(大星)

短寿命の活性酸素は、その産生局所で拡散律速的に代謝される必要がある。Mn型 superoxide dismutase(SOD2)はミトコンドリア内に、Cu/Zn 型(SOD1)は細胞質に分散していると信じられてきたが、反応論的考察から SOD1 もミトコンドリア膜外側に濃縮局在化している必要性が考えられる。

進行性の運動ニューロン変性疾患である家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)には SOD1 点突然変異が関与するが、その分子関連は不明である。本研究では、SOD1 の細胞内超微局在特性と FALS の病因、及びその新治療法を述べる。(井上)

B.研究方法

4週齢雄 SD ラットの水晶体を 15mM Xylose を含有培地にて培養し、テトラヒドロクルクミン (THU1) 添加による水晶体混濁度の抑制効果の検討を行った。さらに、galactose, xylose, glucose のいずれかを 30mM 含有する培地で、4週齢雄 SD ラットの水晶体を2日間培養後、水晶体中のポリオール蓄積量の比較を行った。さらに、グルタチオン (GSH) の糖尿病合併症予防効果の検討を目的に、Wistar 系7週齢雄ラットをストレプトゾトシン (STZ) 投与後各群に分け、60日間飼育を行った (コントロール群、糖尿病群、糖尿病+1% GSH 投与群)。糖尿病合併症の発症と酸化ストレスの関与を検討するため、DNA の酸化傷害として尿中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を定量した。また糖尿病由来の腎障害の指標として、尿中アルブミン量、尿中クレアチニン量を測定した。さらに、糖尿病性神経障害を Tail Flick 法により検討した。(大澤)

地榆エキスは 3000 mg/kg 体重、sanguin H-6 rich の TC-4 fraction は 1500 mg/kg 体重を胃ゾンデでそれぞれ経口投与し、投与前値、投与 30 分、60 分、90 分、120 分、180 分、300 分、480 分、24 時間後に採血し、血清を分離した。続いて 24

時間尿を採取し、得られた試料を 80%アセトンに攪拌懸濁後、不溶物を遠心分離し、上清を窒素ガスを吹き付けて溶媒除去して乾燥した。残渣を 30%メタノールに溶解し、メンブランフィルターで濾過し、HPLC で分析した。分析条件は以下のとおりである。(横澤)

カラム: Cosmosil 5C18ARII (4 mm x 250 mm)

溶離液: 7:1:1 の 50 mM H₃PO₄ 溶液

流量: 0.8 ml/min

検出器: JASCO photodiode-array detector

C25BL 雄マウスを用い、13 或いは 18 月齢より各々 TC [クルクミンの体内 (腸壁内) 代謝物]0.2% 含有食、PP (8mg/kg) 含有水、八地 (1%) 含有食を投与し、正常食、正常水投与の対照群をそれぞれペアさせ、その生存曲線を比較した。自然死をもって各動物の寿命とし、平均寿命を t 検定、各月齢における生存率はカイ 2 乗検定で対照値と比較した。又、昨年を引き続き、F344/N 雄ラット 8 月齢にデプレニル 2.0mg/kg/day 3 週半持続皮下注入を行ったラットと生食水注入の対照ラットについて各種臓器内の IL-2, IL-6 を ELISA 法で測定した。(木谷)

脳室壁への遺伝子導入:

ヒト 5 型アデノウイルスに遺伝子組換えを行って作製した非増殖性ベクターを用い、雄性高血圧自然発症ラット (SHR、5-8ヶ月齢) の脳室壁への遺伝子導入の効果を検討した。標識遺伝子 (Escherichia coli β -galactosidase) を組み込んだアデノウイルスベクター AdRSVBgal 20 μ l (1.3 \times 10¹² particles/ml) を一側の脳室内に注入し、その遺伝子発現を経時的に評価した。ベクター投与後 1 日から 7 日の時点で脳を灌流固定して冠状切片を作製し、標識遺伝子の発現を組織化学染色 (X-Gal) により検討した。

虚血脳への interleukin-10 遺伝子導入:

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、雄性 SHR (5-8ヶ月齢) の右大脳皮質に局所脳虚血を作製した。脳虚血前後の頭頂葉皮質 (bregma 後方 2 mm、

側方 4 mm) の脳血流をレーザードップラー血流計を用いて測定した。脳虚血作製後 90 分の時点で、虚血側の脳室内にヒト IL10 を組み込んだアデノウイルスベクター AdRSVIL10 あるいは AdRSVBgal 20 μ l を注入した。アデノウイルスベクター注入後 5 日の時点で、脳脊髄液を大槽より採取し、ヒト IL10 の濃度を ELISA 法により測定した。髄液採取後に脳を取り出し、冠状切片を作製して TTC 染色を行い、脳梗塞容積の定量を行った。また、組織染色により脳梗塞組織への炎症細胞浸潤を組織学的に評価した。(大星)

Wistar 雄ラット肝臓の分離ミトコンドリアとペルオキシゾーム、及び培養ヒト繊維芽細胞を用い、SOD1 の細胞内超微局在性を解析した。また、正常および 5 種類の FALS 患者変異 SOD1 とラット肝ミトコンドリアとの結合性を解析した。さらに、ミトコンドリアの劣化反応と神経細胞 PC12 の細胞死を抑制するカルニチンを変異 SOD1 トランスジェニックマウス(Tg)に経口投与し、その病態発症、進行速度、及び寿命に対する作用を解析した。(井上)

C. 研究結果

テトラヒドロクルクミンの抗白内障作用天然抗酸化物質のひとつであるクルクミン (U1) が経口吸収される際に変換されて生じるテトラヒドロクルクミン (THU1) の抗白内障作用について検討を行うため、4 週齢雄 SD ラットの水晶体を 15mM Xylose を含有培地にて培養し、検討を行ったところ、THU1 添加により、水晶体混濁度が有意に減少した。さらに、galactose, xylose, glucose のいずれかを 30mM 含有する培地で、4 週齢雄 SD ラットの水晶体を 2 日間培養後、水晶体中のポリオール含量を測定し、さらに培養と同時に THU1 を添加した場合のポリオール蓄積量の比較を行ったところ、THU1 は、培養水晶体中の sorbitol, galactitol, xylitol の蓄積を抑制しなかった。グルタチオン経口摂取による糖尿病性合

併症予防効果

生体は活性酸素の消去系として抗酸化酵素や抗酸化物質を有し、生成系と消去系のバランスを保っている。I 型糖尿病モデル動物 streptozotocin 誘導糖尿病ラット (STZ rat) は、膵 β 細胞内に過剰の活性酸素生成による膵 β 細胞破壊から糖尿病を発症する。膵 β 細胞はグルコースを代謝し、インスリンを分泌するため、活性酸素生成も多いと考えられる。また、膵 β 細胞では、抗酸化酵素の発現量や活性が低いことから膵 β 細胞は酸化ストレスによる傷害を受けやすいと考えられ、抗酸化剤による糖尿病改善効果についても研究されつつある。本実験では glutathione (GSH) 経口摂取による糖尿病性合併症の改善効果を検討した。Wistar 系 7 週齢雄ラットを STZ 投与後各群に分け、60 日間飼育を行った (コントロール群、糖尿病群、糖尿病+1% GSH 投与群)。糖尿病合併症の発症と酸化ストレスの関与を検討するため、DNA の酸化傷害として尿中の 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) を定量した。また糖尿病由来の腎障害の指標として、尿中アルブミン量、尿中クレアチニン量を測定した。さらに、糖尿病性神経障害を Tail Flick 法により検討した。糖尿病群は、コントロール群と比較して血糖、尿量が増大しており、尿中の 8-OHdG 量が上昇した。ところが、糖尿病群と比較して、GSH 投与群は血糖、尿量の抑制はみられなかった。しかしながら、尿中 8-OHdG 量は有意に抑制していたことから、GSH の経口摂取による生体内酸化ストレス抑制作用が認められた。また、糖尿病群と比較して GSH 投与群では、糖尿病性腎障害の指標である尿中アルブミン量、尿中クレアチニン量は有意に減少していた。さらに、糖尿病性神経障害に対する GSH の効果を Tail Flick 法により検討したところ、GSH 投与群において有意な抑制効果がみられた。(大澤)

血液：地榆エキス投与前に認められなかったピークが、480 分をピークに 24 時間後でも同程度に観察された。この化合

(倫理面での配慮)

各々の動物実験は、各研究者所属施設の実験動物倫理委員会に於いて、その正当性・倫理性を評価し、動物実験が飼育・処理・と殺条件などで、その倫理性を満たすと判断された後に行った。

物の UV スペクトルが ellagic acid と酷似していたが、保持時間は ellagic acid よりかなり遅く、ellagic acid より極性が低くなっていると考えられ、メチル化体が推測された。他に 24 時間後だけに観察されるピークが 2 種類あり、1 つは ellagic acid と UV スペクトルが酷似していたが、保持時間は ellagic acid より速く、sulfate か glucuronide ではないかと思われた。もう 1 つは尿から単離した castream pigment と UV が酷似しており、その sulfate かあるいは glucuronide の可能性が示唆されたが、これらについては試料を酵素処理した場合、ellagic acid が生成するか否かについて、現在検討中である。

TC-4 fraction を投与した場合、明瞭なピークを検出することが出来なかった。

尿：地榆エキスを投与した場合、HPLC 分析ではピークが多く、また個体差もあり、特定することは困難であったが、非投与群に認められない 2 つのピークの分離に成功した。1 つは gallic acid にメチル基が 3 つ結合した methyl 3,4-dimethylgallic acid で、このものはエキスにも存在していることを確認しており、そのまま排泄されたものと考えられた。もう 1 つは castream pigment で、gallic acid をラットに投与した代謝産物として、すでに報告されている化合物であった。

TC-4 fraction 投与群では、castream pigment が確認された。なお、TC-4 fraction には ellagic acid が含まれていないことから、腸内などで分解されたものと推測している。(横澤)

TC を 18 月齢より投与した群では生存曲線は終始対照群を上回ったが、その差はわずかであり、平均寿命では有意差はなかった ($P>0.05$)。しかし、10% 最長生存日数は投与群で有意に延長していた ($P<0.05$)。一方 TC を 13 月齢を投与した群では、28 月齢より生存率は対照値の約 2 倍と有意に高く、その差は有意であり ($P<0.05$, カイ二乗法) 平均寿命でも有意な延長を示した(対照 vs. TC 群 796.64 ± 21.38 日対 882.22 ± 21.86 日, n 各群 50, $P<0.001$)。10% 最長日数も有意に延長し

ていた。PP を 13 月齢より投与した群では 26 月齢では (86%, 43/50) と対照値の 60% (30/50) より有意 ($P<0.01$) 高値を示し始めたが、八地群は対照値とほぼ同値を示した。

デプレニル投与群の IL-2, IL-6 は同様一部の臓器で対照値につき、上昇の傾向を示した。(木谷)

脳室壁への遺伝子導入：

ラット側脳室へのアデノウイルスベクター AdRSVBgal の投与により、導入された β -galactosidase の発現は投与後 1 日から側脳室および第 3 脳室に認められた。導入遺伝子の発現は以後 7 日までの期間で側脳室あるいは第 3 脳室壁に認められた。

虚血脳へのインターロイキン 10 遺伝子導入：

脳虚血後 60 分での脳血流は、AdIL10 投与群では前値の 18.6 ± 2.5 % (mean \pm SEM) に低下し、AdBgal 投与群でも同様の低下 (21.6 ± 4.9 %) を示し、2 群間に脳虚血侵襲の差は認めなかった。脳虚血後 5 日の時点での脳脊髄液中のヒト IL10 濃度は、AdIL10 投与群では $7,623 \pm 2,965$ pg/mL と著明な増加が認められ、導入したヒト IL10 遺伝子が発現後に髄液内に放出されたことを確認した。AdBgal 投与群では髄液中のヒト IL10 は検出できなかった (<0.5 pg/mL)。脳虚血導入 5 日後の脳梗塞容積は、AdBgal 投与群では 111 ± 16 mm³ であり、AdIL10 投与群では 47 ± 11 mm³ と脳梗塞容積の著明な ($p<0.01$) 縮小を認めた。また、組織学的な検討では、AdIL10 投与群での脳梗塞巣への白血球浸潤は、AdBgal 投与群に比較して減少してていた。(大星)

1) 正常 SOD1 はミトコンドリアやペルオキシソーム膜の細胞質表面に濃縮局在していることが判明した。ミトコンドリアへの濃縮結合は膜電位依存性であることも明らかになった。

2) FALS 患者の 5 種類の変異 SOD1 の両オルガネラに対する親和性は著明に低下していた。

3) カルニチンがミトコンドリアの内膜電位を安定化させてチトクロムcの放出を阻害し、神経細胞死を抑制すること、及びカルニチン投与 FALS Tg では病態進行速度が著明に減少して延命効果が見られた。(井上)

D. 考察

糖尿病性白内障の発症には、アルドース還元酵素を介したポリオール細胞内蓄積のほか、酸化ストレスの関与が考えられている。そこで、クルクミンの抗酸化性代謝物 (THU1) の糖尿病性白内障抑制機構の解析を行ったところ、培養ラット水晶体中のポリオール蓄積を抑制しなかったことにより、THU1 にはアルドース還元酵素に対する阻害作用はなく、おそらく THU1 の抗酸化作用により白内障の発症が予防されたものと考えられる。

さらに、I型糖尿病 STZ rat に対し、生体内の主要な抗酸化物質である GSH は経口摂取により尿中への酸化修飾 DNA 量の抑制効果が認められたことから、膵β細胞障害由来の活性酸素種による組織の酸化障害を抑制している可能性が示唆された。また、GSH 摂取により、糖尿病性腎症の指標である尿中アルブミン、尿中クレアチニンの排泄量が抑制され、また糖尿病性神経障害の抑制効果も見られた。これらの結果から GSH 摂取により、生体内のレドックス制御を正常化することにより糖尿病由来の腎機能低下や、糖尿病性神経障害の抑制効果が示唆された。(大澤)

加齢のフリーラジカル説は、約半世紀前、米国の Harman によって提唱されて以来長らくほぼ完全に無視されてきた。しかし、20 世紀最後の 20 年になり特に加齢関連疾患の病因につき急速にその意義が認識されてきた。事実、本研究班の大澤、横澤の研究業績にもある通り、各種の実験的な加齢関連疾患、酸素組織損傷には、各種の抗酸化物質の投与は劇的な防御効果を示し、又、血中抗酸化物質濃度と心筋梗塞頻度間、或いは、抗酸化

物質の豊富に含有する食物の摂取と癌発生率などに負の相関を示すなど、多くの疫学的研究もそれを裏付けている。一方、実験動物の生存曲線、寿命を指標とした加齢そのものへの抗酸化物質投与の効果は、Harman をはじめ、一部その効果を主張するものもいるが、再現性に乏しく、80 年代以前データは動物の飼育条件に諸種の問題があり、再現性のある生存延長の報はない。最近でも、米国農務省とタフツ大学が共同運営する人間栄養加齢研究所 (ボストン) における研究で 5 種の抗酸化物質 (還元グルタチオン、メラトニン、VE、いちご及び 2 者の組み合わせ) を C57BL 雄マウスに 13 月齢より投与したところ、どの実験群も対照群に比し、有意な生存曲線延長をみなかったとの報告があり (Lipman et al., Mech Ageing Dev, 1998)、この種の試みの成功は市民権を得ていない状況である。

今回の我々の TC、PP の成績は各種抗酸化物質の中には、その potency と特に体内動態によっては、この種のアプローチが成功する可能性を強く示唆する。C57BL は、人と違いその加齢中の死因は、リンフォーマ、白血病を主とし、このような加齢関連疾患発生への防御も否定できないが、加齢の機序そのものにも効果があった可能性もある。TC の 2 つの実験結果は、より若齢期からの投与の方がより効果がある可能性を示唆しよう。いずれにしても TC、PP という身近で日常摂取可能な飲食物を介した抗酸化ストラテジーが、実験的に効奏したことは、人においてもその効果が期待される科学的根拠を得たといえる。八地が効果がなかったことは同薬物の無効を意味するものでなく、投与量、投与時期等を変えることにより、結果が変わる可能性も残っていると考えている。この種の介入実験は、十分にコントロールされた動物舎でクリーンコンベンショナルな状態で行う必要があり、又、年月もかかるため、容易に繰り返し行うことが困難であり、その点でも今回の結果は貴重な示唆に富んだものと考えられる。

デプレニルの動物生存曲線延長作用は、同薬が臨床に用いられている薬物であるだけ、その機序の解明が重要である。我々は、脳内ドーパミン動性部位のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) 活性の上昇作用との因果関係を主張しており、本研究の結果、この効果はカテコラミン作動性脳外臓器 (心、腎、副腎、脾など) にもあることが判ってきた。最近ショウジョウバエの運動神経細胞 (motoneuron) の Cu, Zn-SOD の遺伝子発現を選択的に増強させたトランスジェニックフライでその平均寿命が野生種のそれの 40~50%延長したという報告 (Parks *et al.* Nat.Genet.19:171-74, 1998, Sun & Tower. Mol Cell Biol 19:216-28, 1999.) があり、我々の主張を支持する報告と考えている。DP にはこの他抗腫瘍作用、免疫活性賦活作用が報告されており、我々の報告にある各種サイトカインの濃度上昇は、カロリー制限動物の場合と同様、変異を起こした細胞のアポトーシスを促進することにより、腫瘍の発生を防ぐ可能性を示唆すると考えられる。一方脳内 (線状体、海馬など) では、サイトカイン濃度上昇はない。DP には神経細胞の抗アポトーシス作用がよく知られている。加齢過程におけるアポトーシスの意義は、一義的な結論を得ておらず、変異化細胞の除去というプラスの面と病的過程 (パーキンソン病などの神経細胞死) 促進のマイナス面から多角的に議論されている。

DP の非脳臓器のアポトーシス促進作用が証明されれば、加齢の関するアポトーシスの二面性の、より積極的な理解を助けよう。又、同薬の免疫系への賦活作用は、我々の得た各種サイトカインの濃度上昇作用と関連しよう。同薬の臨床応用のみならず、同薬を実験的なプローブ薬として、個体加齢の機序の更なる解明が期待される。(木谷)

昨年度までの研究で、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が虚血脳へ虚血脳においても可能であり、特に脳室壁が遺伝子導入部位として有用な標的と

なりうることを報告してきた。これまでの脳血管障害に関する遺伝子治療の基礎研究においては、遺伝子導入によって脳虚血に対する保護効果が認められるという報告は少なくないが、あらかじめ遺伝子導入を行った状態で虚血を負荷するという条件で得られたものがほとんどであり、脳虚血後の遺伝子導入により脳梗塞の縮小効果を示し成績は認められていなかった。このため遺伝子治療の臨床的な有用性を示すには脳虚血負荷後に行った遺伝子導入で保護効果を示す必要があった。今回の我々の検討では、抗炎症性サイトカインである IL10 を組み込んだ遺伝子導入ベクターを脳虚血負荷 90 分後に投与しても脳梗塞の容積を著明に縮小することが可能であったことから、脳梗塞の急性期治療として IL10 遺伝子を用いた遺伝子治療は臨床的な有効性を発揮する可能性があると考えられる。

従来の研究から、脳梗塞の進展過程において IL1 や TNF α などの炎症性サイトカインが組織障害に重要な役割を果たしていることが示唆されている。IL10 はこれらの炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかにされており、今回の検討では同作用が脳梗塞縮小に寄与したと考えられる。また、今回の結果では梗塞巣への白血球浸潤が IL10 の導入により抑制されており、炎症性サイトカインによるシグナル伝達で生じる内皮 ICAM1 などの活性化を IL10 の過常発現によって阻害することで白血球細胞の浸潤が抑制され、脳梗塞の縮小に寄与した可能性が考えられた。

今回の検討では、脳虚血直後に脳内に遺伝子導入を行うことで脳梗塞の縮小効果が得られたが、今後他の部位への遺伝子導入による効果や therapeutic time window に関する詳細な検討も行い、さらに脳血管障害への臨床応用の可能性を追究していく必要がある。(大星)

細胞質局在と考えられてきた SOD1 がミトコンドリアとペルオキシゾーム膜上に濃縮局在していること、FALS 患者の変異 SOD1 ではその超微局在性が低下す

ること、及びこれに起因する運動神経細胞内でのミトコンドリア不全病態がカルニチンにより抑制されることが判明した。これらの所見から、活性酸素代謝の超微局在化の必然性と分子機構、及び FALS 病態を論じ、新たな治療法の開発が期待される。(井上)

E. 結論

著者らの研究室では、これまで植物性食品素材をはじめとする天然物由来の抗酸化成分の検索を進めている。この研究の目的は、糖尿病性合併症をはじめとする生活習慣病とよばれる疾病の予防に抗酸化成分が大きな役割を果たしているのではないかという期待感からである。このような背景から、最近の糖尿病合併症における酸化ストレスの役割に対する大きな注目は、著者らにとっても極めて魅力ある研究アプローチであると考えられている。今後、糖尿病患者の腎不全や白内障、粥状動脈硬化症など多くの合併症の発症メカニズムにおける酸化ストレスの関与が分子レベルで解析されるとともに、近い将来に科学的基盤に立った「糖尿病合併症の予防食品」が開発されるものと期待される。(大澤)

地榆エキスと活性成分の sanguin H-6 を rich に含む TC-4 fraction をラットに経口投与し、血液と尿中の成分を分析し、ellagic acid の代謝産物を確認した。(横澤)

従来、ほとんど不可能と考えられてきた抗酸化物質経口投与による、動物生存曲線延長が、TC、そして PP で可能であることが示された。更に追試により、この結果を確実のものとするにより、日常の飲食習慣を改善し、諸種の抗酸化物質を積極的に摂取することが、諸種の疾病の予防になるばかりか、加齢そのものにもプラスに介入する可能性を示したものと考える。さらに臨床上パーキンソン病の治療に用いられている DP に知られる動物生存曲線の延長作用の延長機序には、SOD, CAT 活性の上昇のほか、インターロイキン、TNF- α など多くのサイ

トカインを介する機序が潜在する可能性が明らかとなり、同薬を単なる向神経細胞性薬物にとらえず、全身における諸薬理作用から同薬物の作用機序の解明を行う必要のあることを強調した。

アデノウイルスベクターを用いた脳虚血後の IL10 遺伝子導入により脳梗塞巣への炎症細胞浸潤が抑制され、脳梗塞容積を縮小する可能性が示された。また、脳虚血に対するアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が脳梗塞の治療として有効である可能性が示された。(大星)

本研究では、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および FALS 病態の治療薬として利用可能なことを示唆し、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、酵素系の神経性病態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。加齢性変化および FALS での神経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、日々の食物成分中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本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。(井上)

F. 研究発表

1. 論文発表

Ueno Y, Horio F, Uchida K, Naito M, Nomura H, Kato Y, Tsuda T, Toyokuni, S and Osawa T. "Increase in oxidative stress in kidney of diabetic mice", *Bosci., Biochem. Biotech.*, in press

Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H and Osawa T. "Protective effect of dietary glutathione on diabetic nephropathy and neuropathy", *J. Nutrition*, in press .

Yokozawa T.: Role of the Active Dan Shen Component, Magnesium Lithospermate B, in the Kidney. "Molecular Aspects of Asian Medicines", edited by A. Mori and T. Satoh, PJD Publications Ltd., New York, 2001, pp.139-156.

Yokozawa T., Fujii H., Kosuna K., and Nonaka G.: Effects of buckwheat in a renal ischemia-reperfusion model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 396-400, 2001.

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.*, 18: 1-7, 2001.

Yokozawa T., Chen C.P., and Hattori M.: Confirmation that *Luobuma* ameliorates the deterioration of antioxidant defense in senescence-accelerated mice. *J. Trad. Med.*, 18: 27-32, 2001.

Yokozawa T., Nakagawa T., and Terasawa K.: Effects of Oriental medicines on the production of advanced glycation endproducts. *J. Trad. Med.*, 18: 107-112, 2001.

Huh J.I., Kim H.J., Kim J.W., Shim K.H., Kim Y.J., Lee K.H., Yokozawa T., Yu B.P., and Chung H.Y.: Influence of aging and

dietary restriction on renal nitric oxide synthase. *Kor. J. Gerontol.*, 11: 28-33, 2001.

Yokozawa T., Rhyu D.Y., and Owada S.: Increase of radical in rats with adenine-induced renal failure is suppressed by *Wen-Pi-Tang*. *J. Trad. Med.*, 18: 147-153, 2001.

Nakagawa T., Yokozawa T., and Terasawa K.: A study of *Kampo* medicines in a diabetic nephropathy model. *J. Trad. Med.*, 18: 161-168, 2001.

Yokozawa T., Tanaka T., and Kimura T.: Examination of the nitric oxide production-suppressing component in *Tinospora tuberculata*. *Biol. Pharm. Bull.*, 24: 1153-1156, 2001.

Yokozawa T., Nakagawa T., Wakaki K., and Koizumi F.: Animal model of diabetic nephropathy. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53: 359-364, 2001.

Yokozawa T., and Dong E.: Role of ginsenoside-Rd in cisplatin-induced renal injury: special reference to DNA fragmentation. *Nephron*, 89: 433-438, 2001.

Yokozawa T., and Chen C.P.: Evidence suggesting a nitric oxide-scavenging activity for traditional crude drugs, and action mechanisms of *Sanguisorbae Radix* against oxidative stress and aging. *J. Amer. Aging Assoc.* 24: 19-30, 2001.

Kitani K, Minami C, Isobe K, Maehara K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC.

Why(-)deprenyl prolongs survivals of experimental animals : Increase of antioxidant enzymes in brain and other body tissues as well as mobilization of various humoral factors may lead to systemic anti aging effects. *Mech Ageing Dev* (in press) 2002.

Kitani K, Minami C, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO and Carrillo MC. Modification of

endogenous antioxidant enzymes in the brain as well as extra-brain tissues by propargylamines. Is it related to the life prolonging effect of (-)-deprenyl? In "Oxidative stress and aging : diagnostics, intervention and longevity." Eds H. Rodrigues, R Cutler, World Scientific Publ Co Pte LTD, (in press) 2002.

Kitani K. (ed.) Interventions, Part III, Mech Ageing Dev., (in press) Elsevier, 2001.

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. D Harman et al.(ed). Ann New York Acad Sci, 928:248-260, 2001.

木谷健一 討論 The Science of Ageing : Why, how and what should we study? 基礎老化研究 25 巻 第 2 号 2001.

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 32:1043-7, 2001.

Ooboshi H, Ibayashi S, Yao H, Takada J, Heistad DD: Age-related neuronal vulnerability to brain ischemia: A potential target of gene therapy. J Amer Aging Assoc 24: 31-35, 2001.

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 32:1216-9, 2001.

Kitazono T, Kamouchi M, Ago T, Ooboshi H, Nakamura H, Fujishima M, Ibayashi S: Role of Na(+)/H(+) exchanger in dilator responses of rat basilar artery in vivo. Brain Res 906:101-6, 2001.

Kitayama J, Kitazono T, Yao H, Ooboshi H, Takaba H, Ago T, Fujishima M, Ibayashi S: Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger reduces infarct volume in thrombotic middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Res 922:223-8, 2001.

八尾博史、井林雪郎、定永史子、福田賢治、高田潤一、大星博明、北園孝成、内村英幸、藤島正敏: Photothrombosis によるラット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システム. 脳神経 53: 253-257, 2001.

大星博明、豊田一則、中根博、高田潤一、井林雪郎: 脳血管への遺伝子治療. 脳と循環 7: 41-45, 2002.

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

大星博明: 脳血管障害における遺伝子治療. 内科, in press

大星博明: 脳卒中. ガイドライン外来診療 2002, 日経メディカル, in press

大星博明、井林雪郎: TIA とは? -その病態と発生機序-. 脳と循環, in press

大星博明: 遺伝子治療. 脳卒中ナビゲーター, メディカルレビュー社, in press

Inayama T, Kageyama H, Ishikawa T, Nishikimi M, Inoue M and Inoue S. Impaired reductive regeneration of ascorbic acid in the Goto-Kakizaki diabetic rat. Biochem. J. 351: 313-318, 2001.

Tomita M, Sato E, Nishikawa M, Yamano Y and Inoue M. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. Arthritis & Rheumatism, 44: 96-104, 2001.

- Tsuchiya M, Asada A, Maeda K, Ueda Y, Sato E, Shindo M and Inoue M. Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activities. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1-6, 2001.
- Nishikawa M, Nagatomi H, Bao-Jun Cang, Sato E and Inoue M. Targeting Superoxide Dismutase to Renal Proximal Tubule Cells Inhibits Mitochondrial Injury and Renal Dysfunction Induced by Cisplatin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387(1): 78-84, 2001.
- Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Koh N, Takeda T, Kubo S, Hirohashi K, Sato E and Inoue M. Somatic Mutation of Mitochondrial DNA in Cancerous and Noncancerous Liver Tissue in Individuals with Hepatocellular Carcinoma. *CANCER RESEARCH* 61: 1843-1845, 2001.
- Inoue M, Sato E, Park A, Nishikawa N, Kasahara E, Miyoshi M, Ochi A and Utumi K. *Free Rad. Res* 33: 757-770, 2001
- Nishikimi M, Kira Y, Kasahara E, Sato E, Kanno T, Utumi K and Inoue M. Tributyltin interacts With mitochondria and induces cytochrome c release. *Biochem J* 356: 621-626, 2001.
- Katsuragi K, Takemura S, Minamiyama Y, Tanaka H, Inoue M and Kinoshita H. Combined use of adenosine and amrinone inhibits reperfusion injury of rat liver. *Pathophysiology* 8: 29-34, 2001.
- Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, Utsumi T, Doi Y., Inoue M and Utsumi K. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 62: 1037-1046, 2001.
- Ohnaka H, Ukita K, Yamamasu S, Inue M, Imanaka M, Ishiko O and Ogita S. Effects of Cocaine and Ethanol on Mouse Fetuses. *Osaka City Med.J.* 47: 83-93, 2001.
- Wang Y, Kashiba M, Kasahara E, Tsuchiya M, Sato E.F., Utumi K and Inoue M. Metabolic cooperation of Ascorbic Acid and Glutathione in Normal and Vitamin C-deficient ODS Rats. *Physiol.Chem.Phys.&Med.NMR* 33: 29-39, 2001.
- Minamiyama Y, Imaoka S, Takemura S, Okada S, Inoue M and Funae Y. Escape from tolerance of organic nitrate by induction of cytochrome P450. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 1498-1508, 2001
2. 学会発表
横澤隆子：腎障害に対する地榆の役割と機序. 第7回天然薬物研究方法論アカデミー, 2001, 8, 大府.
- 中川孝子、横澤隆子、寺澤捷年、服部征雄：糖尿病性腎症における漢方方剤の作用. 第18回和漢医薬学会大会ミニシンポジウム, 2001, 8, 富山.
- Yokozawa T., Rhyu D.Y., and Kim D.W.: A study of buckwheat in a renal ischemia-reperfusion model. *Proceedings of the VIII International Symposium on Buckwheat*, 2001, 8, Chunchon, Korea.
- Yokozawa T.: The role of the active Dan Shen component, magnesium lithospermate B, in the kidney. *3rd International Congress of Nephrology on Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*. 2001, 9, Shanghai, China.
- Yokozawa T., Nakagawa T., Shu S., and Juneja L.R.: Protective effects of green tea polyphenols against renal disease. *2001 International Conference on O-CHA (tea)*

Culture and Science. 2001, 10, Shizuoka.

Kitani K, Minami C, Carrillo MC and Ivy GO. Neurohumoral events and propargylamines. 2nd international conference on oxidative stress and Aging: Technologies for Assessment and intervention strategies. April 2-5, 2001. Maui, Hawaii, USA.

Minami C, Maeda H, Yamamoto T, Satake S and Kitani K. A clinically applied dose of (-)deprenyl can increase antioxidant enzyme activities in brain as well as extra-brain tissues in monkeys. 30th Annual Meeting of the American Aging Association. May 30-June 4, 2001. Madison, Wisconsin, USA.

南知予子、山本貴子、丸山和佳子、磯部健一、前原佳代子、木谷健一。プロパジラミン類の抗酸化酵素活性上昇作用の共通性とサイトカイン動員作用 第24回日本基礎老化学会 平成13年6月13~15日 大阪

木谷健一。市民公開シンポジウム 21世紀の高齢者介護・看護・医療の課題と展望 老化研究-生理的老化への介入 第22回日本老年学会総会 平成13年6月13~15日 大阪

Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO and Carrillo MC. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: Potentialities of propargylamines. 9th congress International Association of Biomedical gerontology. June 27-30, 2001. Vancouver, Canada.

Kiatni K, Minami C, Isobe K, Maehara K, Kania S, Ivy GO and Carrillo MC. How dose (-)deprenyl affect animals, their survivals in particular? The 17th congress of the international association of gerontology. July 1-6, 2001. Vancouver, Canada.

Ooboshi H, Ibayashi S, Arakawa S, Kitazono T, Yao H, Fujishima M, Iida M: Postischemic gene transfer of IL10 protects against focal brain ischemia. 27th

International Stroke Conference, San Antonio USA, 2002, 2.

高田潤一、井林雪郎、大星博明、北園孝成、藤島正敏、飯田三雄: 高血圧自然発症ラットの脳血流自動調節下限域に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬バルサルタンの効果. 第13回日本脳循環代謝学会. 横浜, 2001, 10.

井上正康、西川 学、吉良幸美、常宝君、佐藤英介、内海耕髓 活性酸素代謝のスーパーシステムと生死の決定 第74回日本生化学会 平成13年10月25~28日

井上正康、西川 学、三好真美、朴雅美、佐藤英介、内海耕髓 活性酸素 NO 系のスーパーシステムと生体制御 第74回日本生化学会 平成13年10月25~28日

王屹、加柴美里、笠原恵美子、土屋正彦、内海耕髓、末松 誠、井上正康 アスコルビン酸欠乏病態におけるチオール代謝動態 第74回日本生化学会 平成13年10月25~28日

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 の役割と耐性機構 南山幸子、竹村茂一、今岡 進、亀川美佳、吉田和世、岡田 茂、船江良彦、井上正康 第74回日本生化学会 平成13年10月25~28日

笠原恵美子、助永親彦、平本恵一、三好真美、小中隆盛、佐藤英介、佐々木順造、徳田雅明、井上正康 フタル酸ジエスエルによる精巣萎縮の機序と活性酸素種の関与 第74回日本生化学会 平成13年10月25~28日

助永親彦、笠原恵美子、平本恵一、小中隆盛、佐藤英介、井上正康 フタル酸エスエルの精巣萎縮と NO 代謝病態の解析 第74回日本生化学会 平成13年10

月25～28日

朴 雅美、橋本佳子、長田久美子、井上正康 局所酸素環境変化と *Helicobacter pylori* の活性酸素代謝特性 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

三好真美、南山幸子、竹村茂一、笠原恵美子、平本恵一、佐藤英介、井上正康 硝酸塩のストレス潰瘍抑制作用 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

柏木昭彦、花田秀樹、菅野智子、内海俊彦、佐藤英介、井上正康、内海耕慥 オタマジャクシ変態過程のカルニチンによる抑制 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

西川 学、西口修平、常宝君、佐藤英介、井上正康 ウィルス性肝炎の肝発癌過程におけるミトコンドリア遺伝子変異 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

常宝君、西川 学、鈴木尚子、吉井真美、佐藤英介、内海耕慥、井上正康 カルニチンによる癌化学療法副作用の抑制とQOLの改善 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

佐藤英介、内海耕慥、井上正康 好中球のプライミングに及ぼす免疫抑制剤の効果 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

今田伊助、笠原恵美子、吉良幸美、佐藤英介、宮本政臣、本多 進、内海耕慥、井上正康 好中球と肝ミトコンドリアの加齢性活性酸素代謝変化 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

加柴美里、笠原恵美子、岡 純、梅垣敬

三、井上正康、末松 誠 血流空間の酸化還元動態調節と白血球__内皮細胞相互作用；新規アスコルビン酸欠乏動物を用いた解析 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

柳原順代、平本恵一、井上正康 目は紫外線を視るか？：紫外線眼照射ストレスによる遺伝子制御と情報伝達 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

平本恵一、柳原順代、井上正康 目は紫外線を視るか？Photo-optico-neuro-dermal network による皮膚遺伝子の保護 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

吉良幸美、越智明海、王屹、芳田裕作、佐藤英介、内海耕慥、井上正康 筋萎縮性硬化症におけるミトコンドリア機能障害の解析及びカルニチンによる治療効果の検討 第74回日本生化学会 平成13年10月25～28日

F.知的所有権の取得状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究報告書

動物の生存曲線への抗酸化ストラテジーによるアプローチ

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 特別客員研究員

研究概要 C57BL 雄マウスの生存曲線に及ぼす抗酸化物質の投与の効果を見るため、0.2%テトラヒドロクルクミン (TC) 含有食 (0.2%) 投与を 18 月齢より投与した群では平均寿命は対照群のそれと有意の差はなかったが、13 月齢より投与を開始した群では、29 月齢よりその生存率は有意 ($P<0.05$, カイ 2 乗検定) の差を示し、対照群に比し、2 倍以上の生存率を維持し、また平均寿命も有意 ($P<0.001$, t 検定) に延長した。両実験群とも 10% 最長生存日齢は各々対照値より有意に延長していた。緑茶ポリフェノール (PP) を飲料水に溶解 (80mg/l) したものを 13 月齢より投与開始した群は、対照値に比し、26 月齢以後生存率に有意に高くなった。これに反し、八味地黄丸 (八地) 1% 含有食を投与した群では対照値と差をみせなかった。デプレニルを若齢 (8 月齢) F344/N ラットに 3 週間持続皮下注入 (2.0mg/kg/day) した場合、昨年報告した IL-1 β , TNF- α の他、IL-2, IL-6 にも腹部内臓器の一部に濃度上昇傾向をみた。TC, PP の結果は、従来確実な成功の報告例のない抗酸化物質の経口投与という方法での実験動物生存曲線延長という世界で最初の結果を得る可能性を強く示唆する。また、DP の生存曲線延長作用は、カテコラミン作動性臓器、組織の SOD, CAT 活性上昇作用と共に全身のサイトカインの動員作用も関与している可能性を示唆する。

A. 研究の目的

加齢のフリーラジカル説は、最近とみにその重みを増している。しかし、いわゆる加齢関連疾患 (age-associated disorders) における場合と違い、実験動物の生存曲線を指標とした加齢そのものに対しては、抗酸化療法の確実な成功の報告はなく、20 世紀の実験老年学の常識は、唯一の生存曲線延長法は“カロリー摂取制限”であるとされてきた。この常識へのチャレンジとしてカレー色素ターメリック中のクルクミン、PP、八地など強力な抗酸化能が知られている物質の持続経口投与によるマウス生存曲線の延長を目標とする。これは毎日摂取しうる飲食物を通して、健康寿命の延長を目指したものである。さらに臨床的に投与可能な薬物であるデプレニルに知られる動物生存曲線の延長効果の機序を探るため、昨年に引

き続きインターロイキン (IL) の臓器内濃度の変化を検討した。

B. 研究方法

C57BL 雄マウスを用い、13 或いは 18 月齢より各々 TC [クルクミンの体内 (腸壁内) 代謝物] 0.2% 含有食、PP (8mg/kg) 含有水、八地 (1%) 含有食を投与し、正常食、正常水投与の対照群をそれぞれペアさせ、その生存曲線を比較した。自然死をもって各動物の寿命とし、平均寿命を t 検定、各月齢における生存率はカイ 2 乗検定で対照値と比較した。又、昨年に引き続き、F344/N 雄ラット 8 月齢にデプレニル 2.0mg/kg/day 3 週半持続皮下注入を行ったラットと生食水注入の対照ラットについて各種臓器内の IL-2, IL-6 を ELISA 法で測定した。

C.研究結果

TC を 18 月齢より投与した群では生存曲線は終始対照群を上回ったが、その差はわずかであり、平均寿命では有意差はなかった ($P>0.05$)。しかし、10%最長生存日数は投与群で有意に延長していた ($P<0.05$)。一方 TC を 13 月齢を投与した群では、28 月齢より生存率は対照値の約 2 倍と有意に高く、その差は有意であり ($P<0.05$, カイ二乗法) 平均寿命でも有意な延長を示した (対照 vs.TC 群 796.64 ± 21.38 日対 882.22 ± 21.86 日, $\text{mean} \pm \text{SEM}$, n =各群 50, $P<0.001$)。10%最長日数も有意に延長していた。PP を 13 月齢より投与した群では 26 月齢では (86%, 43/50) と対照値の 60% (30/50) より有意 ($P<0.01$) 高値を示し始めたが、八地群は対照値とほぼ同値を示した。

デプレニル投与群の IL-2, IL-6 は同様一部の臓器で対照値につき、上昇の傾向を示した。

D.考察

加齢のフリーラジカル説は、約半世紀前、米国の Harman によって提唱されて以来長らくほぼ完全に無視されてきた。しかし、20 世紀最後の 20 年になり特に加齢関連疾患の病因につき急速にその意義が認識されてきた。事実、本研究班の大澤、横澤の研究業績にもある通り、各種の実験的な加齢関連疾患、酸素組織損傷には、各種の抗酸化物質の投与は劇的な防御効果を示し、又、血中抗酸化物質濃度と心筋梗塞頻度間、或いは、抗酸化物質の豊富に含有する食物の摂取と癌発生率などに負の相関を示すなど、多くの疫学的研究もそれを裏付けている。一方、実験動物の生存曲線、寿命を指標とした加齢そのものへの抗酸化物質投与の効果は、Harman をはじめ、一部その効果を主張するものもいるが、再現性に乏しく、80 年代以前データは動物の飼育条件に諸種の問題があり、再現性のある生存延長の報はない。最近でも、米国農務省とタフツ大学が共同運営する人間栄養加齢研究所 (ボストン) における研究で 5 種の抗

酸化物質 (還元グルタチオン、メラトニン、VE、いちご及び 2 者の組み合わせ) を C57BL 雄マウスに 13 月齢より投与したところ、どの実験群も対照群に比し、有意な生存曲線延長をみなかったとの報告があり (Lipman et al., Mech Ageing Dev, 1998)、この種の試みの成功は市民権を得ていない状況である。

今回の我々の TC、PP の成績は各種抗酸化物質の中には、その potency と特に体内動態によっては、この種のアプローチが成功する可能性を強く示唆する。C57BL は、人と違いその加齢中の死因は、リンフォーマ、白血病を主とし、このような加齢関連疾患発生への防御も否定できないが、加齢の機序そのものにも効果があった可能性もある。TC の 2 つの実験結果は、より若齢期からの投与の方がより効果がある可能性を示唆しよう。いずれにしても TC、PP という身近で日常摂取可能な飲食物を介した抗酸化ストラテジーが、実験的に効奏したことは、人においてもその効果が期待される科学的根拠を得たといえる。八地が効果がなかったことは同薬物の無効を意味するものでなく、投与量、投与時期等を変えることにより、結果が変わる可能性も残っていると考えている。この種の介入実験は、十分にコントロールされた動物舎でクリーンコンベンショナルな状態で行う必要があり、又、年月もかかるため、容易に繰り返すことが困難であり、その点でも今回の結果は貴重な示唆に富んだものと考えられる。

デプレニルの動物生存曲線延長作用は、同薬が臨床に用いられている薬物であるだけ、その機序の解明が重要である。我々は、脳内ドーパミン動性部位のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD), カタラーゼ (CAT) 活性の上昇作用との因果関係を主張しており、本研究の結果、この効果はカテコラミン作動性脳外臓器 (心、腎、副腎、脾など) にもあることが判ってきた。最近ショウジョウバエの運動神経細胞 (motoneuron) の Cu, Zn-SOD の遺伝子発現を選択的に増強させたトラ

ンスジェニックフライでその平均寿命が野生種のその 40~50%延長したという報告 (Parks *et al.* Nat.Genet.19:171-74, 1998, Sun & Tower. Mol Cell Biol 19:216-28, 1999.) があり、我々の主張を支持する報告と考えている。DP にはこの他抗腫瘍作用、免疫活性賦活作用が報告されており、我々の報告にある各種サイトカインの濃度上昇は、カロリー制限動物の場合と同様、変異を起こした細胞のアポトーシスを促進することにより、腫瘍の発生を防ぐ可能性を示唆すると考えられる。一方脳内 (線状体、海馬など) では、サイトカイン濃度上昇はない。DP には神経細胞の抗アポトーシス作用がよく知られている。加齢過程におけるアポトーシスの意義は、一義的な結論を得ておらず、変異化細胞の除去というプラスの面と病的過程 (パーキンソン病などの神経細胞死) 促進のマイナス面から多角的に議論されている。

DP の非脳臓器のアポトーシス促進作用が証明されれば、加齢の関するアポトーシスの二面性の、より積極的な理解を助けよう。又、同薬の免疫系への賦活作用は、我々の得た各種サイトカインの濃度上昇作用と関連しよう。同薬の臨床応用のみならず、同薬を実験的なプローブ薬として、個体加齢の機序の更なる解明が期待される。...

E. 結論

従来、ほとんど不可能と考えられてきた抗酸化物質経口投与による、動物生存曲線延長が、TC、そして PP で可能であることが示された。更に追試により、この結果を確実のものとするにより、日常の飲食習慣を改善し、諸種の抗酸化物質を積極的に摂取することが、諸種の疾病の予防になるばかりか、加齢そのものにもプラスに介入する可能性を示したものと考える。さらに臨床上パーキンソン病の治療に用いられている DP に知られる動物生存曲線の延長作用の延長機序には、SOD, CAT 活性の上昇のほか、インターロイキン、TNF- α など多くのサイ

トカインを介する機序が潜在する可能性が明らかとなり、同薬を単なる向神経細胞性薬物にとらえず、全身における諸薬理作用から同薬物の作用機序の解明を行う必要のあることを強調した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO and Carrillo MC. Pharmacological Interventions in Aging and Age-associated Disorders. Ann NY Acad Sci(in press)

Kitani K, Minami C, Isobe K, Machara K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Why(-)deprenyl prolongs survivals of experimental animals : Increase of antioxidant enzymes in brain and other body tissues as well as mobilization of various humoral factors may lead to systemic anti aging effects. Mech Ageing Dev (in press) 2002.

Kitani K, Minami C, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO and Carrillo MC. Modification of endogenous antioxidant enzymes in the brain as well as extra-brain tissues by propargylamines. Is it related to the life prolonging effect of (-)deprenyl? In "Oxidative stress and aging : diagnostics, intervention and longevity." Eds H. Rodrigues, R Cutler, World Scientific Publ Co Pte LTD, (in press) 2002.

Kitani K. (ed.) Interventions, Part III, Mech Ageing Dev., (in press) Elsevier, 2001.

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. D Harman et al.(ed). Ann New York Acad Sci, 928:248-260, 2001.

木谷健一 討論 The Science of Ageing : Why, how and what should we study? 基礎老化研究 25 卷 第 2 号 2001.