

2.学会発表

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.

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

G. 知的所有権の取得状況
なし

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 家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)などの神経性病態あるいはSAMなどの加齢性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病態の原因となること、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

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。

B.研究方法

Wistar雄ラット肝脳分離ミトコンドリアとペルオキシソーム、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。

(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

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。

D.考察

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ソ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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kashiba M, Oka J, Ichikawa R, Kageyama A, 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. Cross-Talk Between No and Oxyradicals, a Supersystem that Regulates Energy Metabolism and Survival of Animals. *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 aminocoumarin 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

井上正康、西川 学、吉良幸美、常宝君、佐藤英介、内海耕慥 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、内海耕慥 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、内海耕慥、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1

3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 フタル酸ジエステ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 フタル酸エステルの精巣萎縮と 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 オタマジッ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

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 助手

研究要旨 高齢者の重要疾患である脳梗塞の新規治療法を開発する目的で、高血圧自然発症ラットの局所脳虚血モデルを用いて、アデノウイルスベクターによる脳への interleukin-10 (IL10) 遺伝子導入による脳梗塞の治療効果を検討した。雄性 SHR の脳室内に標識遺伝子 (β -galactosidase) を導入すると、その発現は投与1日から7日まで脳室壁に認められた。血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルにより大脳皮質に脳虚血を作製し、虚血後90分の時点でヒト IL10 を組み込んだアデノウイルスベクターを脳室内に投与すると、標識遺伝子を導入した群と比較して脳梗塞の容積は著明に縮小した。また、脳梗塞組織での白血球細胞浸潤は、IL10 導入群では β -galactosidase 導入群と比較して減少していた。本研究の結果から、IL10 を用いた遺伝子治療が脳梗塞の急性期治療として有効である可能性が示された。

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の重要性に着目し、高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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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 \pm 2.5 % (mean \pm SEM) に低下し、AdBgal 投与群でも同様の低下 (21.6 \pm 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 \pm 16 mm³ であり、AdIL10 投与群では 47 \pm 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いた。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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.

G. 知的所有権の取得状況

なし

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 抗酸化食品因子の持つ老化関連の疾病予防、特に、糖尿病モデル動物を用いて、食品中の抗酸化成分の持つ機能性の研究を行った。本年は、香辛料やハーブを対象に研究を進めてきたが、なかでも、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」の持つ糖尿病合併症予防作用の検討を行った。その結果、代表的な糖尿病合併症としてよく知られる白内障の抑制効果が明らかにされた。さらに、レドックス制御による糖尿病合併症の予防の可能性に関する検討を目的として酵母由来のグルタチオンを対象に検討を行ったところ、糖尿病由来の腎機能低下や糖尿病性神経障害に対する抑制効果を明かにすることができた。

A. 研究目的

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 OCl⁻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。

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。

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。

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の細胞内蓄積のほか、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。

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。

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 .

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

地榆エキスと活性成分 sanguin H-6 の生体内動態

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

研究概要 フリーラジカル・活性酸素は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・活性酸素を効率よく消去し、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明らかにしてきた。またこのような作用はエラージタンニンの sanguin H-6 によることを明らかにし、本研究では、地榆エキスと sanguin H-6 が rich な TC-4 fraction の生体内動態を検討し、ellagic acid の代謝産物を確認した。

A. 研究目的

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。

B. 実験方法

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留去して乾燥した。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。

カラム：Cosmosil 5C18ARII (4 mm x 250 mm)
溶離液：アセトニトリルの 50mM H₃PO₄ 溶液
流量：0.8 ml/min
検出器：JASCO photodiode-array detector

C. D. 結果と考察

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 castreum pigment と

UV が酷似しており、その sulfate があるいは 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。

E. 結論

地榆エキスと活性成分の sanguiin 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

F. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yokozawa T.	Role of the Active Dan Shen Component, Magnesium Lithospermate B, in the Kidney.	edited by A. Mori and T. Satoh,	"Molecular Aspects of Asian Medicines"	PJD Publications Ltd.,	New York	2001	139-156
Kitani K, Minami C, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO, 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?	Eds H. Rodrigues, R Cutler,	"Oxidative stress and aging : diagnostics, intervention and longevity."	World Scientific Publ Co Pte LTD,		2002	in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC.	Pharmacological Interventions in Aging and Age-associated Disorders.	Ann NY Acad Sci			in press
Kitani K, Minami C, Isobe K, Maehara K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC.	Why(-)deprenyl prolongs survivals of experimental animals : Increase of anti- oxidant 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, Yamamoto T, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO, 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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kashiba M, Oka J, Ichikawa R, Kageyama A, Inayama T, Kageyama H, 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	2001
Tomita M, Sato E, Nishikawa M, Yamano Y, Inoue M.	Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes.	J Arthritis & Rheumatism	44	96-104	2001
Tsuchiya M, Asada A, Maeda K, Ueda Y, Sato E, Shindo M, 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, 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, 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, Utumi K	Cross-Talk Between No and Oxyradicals, a Supersystem that Regulates Energy Metabolism and Survival of Animals.	Free Rad. Res	33	757-770	2001

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nishikimi M, Kira Y, Kasahawa E, Sato E, Kanno T, Utumi K, 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, 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, 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, Inoue M, Imanaka M, Ishiko O, 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, Inoue M.	Metabolic cooperation of Ascorbic Acid and Glutathione in Normal and Vitamin C-deficient ODS Rats.	Physiol.Chem.Phys.&Med ed.NMR	33	29-39	2001
Minamiyama Y, Imaoka S, Takemura S, Okada S, Inoue M, Funae Y.	Escape from tolerance of organic nitrate by induction of cytochrome P450.	Free Radical Biology & Medicine	31	1498-1508	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