

3. コンプライアンスの重要性

栄養介入においては、以下に食事指導を行っても、患者が遵守しなければ意味がない。すなわちいかにコンプライアンスを長期にわたって高めるかということが重要になってくる。遵守の重要性は Scarmeas らによる地中海ダイエット (MeDi) による AD の予防の調査でも報告されている(Ann Neural; 59:912, 2006)。この4年間にわたる前向き調査では MeDi の遵守をあらわす MeDi スコアが最も高い群は最も低い群よりも AD に罹患する相対的危険度は 0.6 と低く、栄養学的には高い群は野菜、果物、豆類、シリアル、魚、酒の摂取が有意に多く、乳製品と肉の摂取が有意に少なかった。

4. 野菜ジュースによる介入の規格化

先に引用した Morris らの CHAP Study では野菜が認知機能の悪化を抑制した。野菜の中では緑色野菜が最も作用が強く、次いで黄色野菜の作用が強かった。しかし、果物にはこの抑制作用はなかった。この理由について Morris らは野菜の方が果物よりもビタミン E の濃度が高いこと、および野菜を食べるときにはドレッシングなど脂質を用いるため、ビタミン E、カロテノイド、フラボノイドなどの脂溶性ビタミンの吸収をよくしている可能性をあげている。

AD の基本に老化があり、酸化ストレスの関与が指摘されている。この意味では抗酸化ビタミンやファイトケミカルに富む野菜を介入の中心に置くことは理にかなっている。現在日本では一日最低 350 グラムの野菜を摂ることが推奨されている。しかし、高齢者にとって毎日 350 グラム摂ることは容易ではない。これを克服するため、我々は 1 日あたり 400 ml の野菜ジュースを推奨している。野菜ジュースの場合には規格化しやすい利点があり介入研究に用いられやすい。

5. 糖尿病、高インスリン血症に対する介入

第2の介入目標として糖尿病と高インスリン血

症がある。2型糖尿病 (NIDDM) ではADの罹患率対照の約1.6~2.3倍高い (Ott A et al: Neurology; 62:920, 2004; Leibson CL, et al: Am J Epidemiol; 145:301-308, 1997)。さらには最近、高インスリン血症とADとの関連が注目されている。高インスリン血症があるとADの相対危険度が2~5倍高くなり(Kuusisto J, et al: BMJ; 315:1045, 1997; Luchsinger JA, et al: Neurology; 63:1187, 2004)、しかも高インスリン血症は全ADの41%をも占めるとの報告されている (Luchsinger JA, et al: Neurology; 63:1187, 2004)。われわれのデータでも高インスリン血症の比率は32%であった。

脳は重量が全体重のわずか 1-2%に過ぎないが、消費エネルギーは全体の 20%に達する。しかも、使えるエネルギーはブドウ糖のみである。従って、AD の本質を能に限局したインスリン抵抗性にとらえる考えもある。最近、インスリン抵抗性改善薬 thiazolidinediones (ロシグリタゾン) による AD 患者の認知機能改善効果が報告された(Risner ME, et al: Pharmacogenomics J; 6: 246, 2006)。AD 患者はきわめて甘いものに対する嗜好が強い。インスリン分泌を強く促す精製糖の過剰摂取を抑える指導が必要である。

6. 栄養指導の実際

AD の病的過程を促進する因子として酸化ストレス、慢性炎症、血管因子、インスリン抵抗性などの関与が明らかにされてきた。健康な生活習慣はいずれも AD の病的過程を促進する因子を抑制する方向に働いていると考えられる。従って、医師、栄養士は個別の病態と意味づけを理解しながら指導を行ってゆく必要がある。

先に述べたごとく栄養介入においてはコンプライアンスが高くなければ意味がない。しかし実際の指導はできる限り緩やか、簡単で、楽しく、持続可能なものにすることが重要である。病態の把握やコンプライアンスの正確な評価を行う

上では血液検査特に総タンパク、アルブミン、コレステロール、中性脂肪、血糖、HbA1c、インスリン (75g GTT)などのデータが参考になる。

また在宅、福祉施設、病院外来では患者の置かれている状況は明らかに異なる。おのおの場合の介入方法の違いを明らかにすることも今後の重要なテーマとなる。

E. 結論

AD の予防や進行速度の低下を目指すには現段階では薬物療法だけでは不十分で、非薬物療法と組み合わせた総合的な取り組みが必要になっている。生活習慣からのアプローチは予想外の効果をあらわし、しかも誰にでも適応でき、副作用がないというメリットがある。今後はいかに患者個別に介入計画を立て、実行してゆくかが問われることになる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1)論文発表

1. Shibata N, Ohnuma T, Higashi S, Higashi M, Usui C, Ohkubo T, Watanabe T, Kawashima R, Kitajima A, Ueki A, Nagao M, Arai H: J Gerontology 2006; 61: 660

2. 仙波宏章、菅原 斉、大塚美恵子、植木 彰:睡眠時無呼吸症候群に誘発された

高齢発症の夜間てんかん発作の1例. 日内会誌(印刷中)

(2)著書・総説

1. 植木 彰:アルツハイマー病と生活習慣. 平井俊策監修 老年期認知症ナビゲーター pp86-87, 2006

2. 植木 彰:認知症予防のために 生活習慣の意義 食習慣 長寿科学研究業績集 (Advances in Aging and Health Research) 認知症の予防と治療 2006 pp- 財団法人長寿科学

振興財団 2006(印刷中)

3. 植木 彰:「アルツハイマー病と栄養」 第47回日本老年医学会学術集会記録(ミニレビュー) 日老医誌 43: 158-160, 2006

4. 植木 彰:アルツハイマー病と糖尿病(基調講演) 糖尿病合併症 20:65-68, 2006

5. 植木 彰:シンポジウム 3:アルツハイマー病と糖尿病 司会のことば 糖尿病合併症 20: 85, 2006

6. 植木 彰:アルツハイマー病と栄養 ファルマシア 42:889-893,2006

7. 植木 彰:若年性認知症 臨床検査、医学書院 50: 1039-1041,2006

8. 植木 彰:アルツハイマー病は予防できるか ②生活習慣病の観点から 須貝佑一編集認知症のすべて からだの科学 251: 123-127, 2006

9. 植木 彰:アルツハイマー病は予防できるか 日本予防医学会雑誌 1:13-16, 2006

10. 植木 彰、大塚美恵子、佐藤敏子:栄養と認知症 性差と医療 3: 1163-1167,2006

11. 植木 彰:アルツハイマー病予防としての生活習慣 運動・栄養 神経治療学 2007年3月号(印刷中)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

認知症の総合的な予防・治療・介護の確立に関する研究

（ H18-長寿-プロ-001 ）

分担研究者 小長谷 陽子 認知症介護研究・研修大府センター

研究要旨：現在約190万人とされ今後の急増が予測される認知症の総合的かつ実効的な対策を確立することを目的に、治療と介護の分野における現時点での問題点をあげ、そのなかで分担研究者が関与しうる分野およびすでに研究を開始している分野について報告した。課題のうち2. 予防と3. 軽度認知機能障害（MCI）と早期診断に関しては簡便な認知機能スクリーニング法の開発について報告し、12. 認知症スタッフの教育については介護要員教育における認知症介護研究・研修センターの役割について報告した。

A. 研究目的

現在約190万人とされ今後の急増が予測される認知症の総合的かつ実効的な対策を確立することを目的とする。

B. 研究方法

治療と介護の分野における現時点での問題点をあげ、そのなかで分担研究者が関与しうる分野およびすでに研究を開始している分野について報告した。

C. 研究結果

1. 軽度認知機能障害（MCI）と早期診断および予防

電話でおこなう認知機能検査 Telephone Interview for Cognitive Status (TICS)の日本語版 (TICS-J)を開発した。対象は、通院中のアルツハイマー病患者 (AD)49名 (男性 19 名、女性 30 名) (平均年齢:75.2±6.8 歳、mean±SD)、および健康な高齢者 (CTL)86名 (男性 15 名、女性 71 名) (平均年齢:74.3±7.2 歳)の計135 名である。平均教育年数は AD11.0±3.0 (mean±SD)年、CTL11.4±2.2 年であった。Mini-Mental State Examination (MMSE)を施行して2週間後に

TICS-Jを行なった。TICS-Jは11項目からなり、41点満点である。TICS-JとMMSEの相関は良好であった (Pearsonの相関係数: $r=0.858$, $p<0.001$)。MMSEはカットオフ値を26点とすると感度は91.8%、特異度は95.3%であり、TICS-Jはカットオフ値を33点とすると、感度は98.0%、特異度は90.7%であった。MMSEのROC (receiver operating characteristic) 曲線における area under the curve は97.2%、TICS-Jでは98.7%であった。TICS-Jの検査所用時間は健常者で10分以内、患者でも12分以内であり、感受性、特異性も良好で有用であると考えられた。

2. 認知症スタッフの教育

介護保険が施行されてから、サービスを行う事業所の数が増えてきた。居宅サービスでは、訪問介護をおこなう事業所は、平成12年の9,833ヶ所から、平成17年には20,618ヶ所と2倍以上の伸びとなっており、訪問看護ステーションの数は、同じく4,730ヶ所から5,309ヶ所と増加している。その他に分類されているが実際には居住施設である、認知症対応型

共同生活介護（いわゆるグループホーム）は介護保険発足時には 675 ヶ所しかなかったが、平成 17 年には 7,084 ヶ所と実に 10 倍以上になっている。また、平成 16 年からは特定施設入所者生活介護（いわゆる介護付き有料老人ホーム）も介護保険に参入し、数を伸ばしている。一方、介護保険施設としては、介護老人福祉施設（特別養護老人ホーム）、介護老人保健施設、介護療養型医療施設があり、平成 17 年にはそれぞれ、5,291 ヶ所、3,131 ヶ所、3,717 ヶ所となっている。

平成 13 年度から、都道府県や政令指定都市では、認知症の介護に従事する者に対し、「認知症(痴呆)介護実務者研修（実務者研修）」を行うことが義務づけられている。これらの実務者研修を企画し、指導する立場の指導者を養成するのが、「認知症介護指導者養成研修（指導者研修）」である。指導者研修は、都道府県が認知症介護研究・研修センター（センター）に委託しておこなっている。

認知症介護研究・研修センターは介護保険が始まった平成 12 年度に全国で 3 ヶ所、東京、仙台、大府に設置された。認知症介護の専門技術に関する実践的な研究を行なうとともに、介護実務者およびその指導的立場にある者に対し、認知症高齢者の介護に関する実践的な研修を実施することにより、介護技術を向上させ、専門職員を養成し、介護サービスの充実を図ることを目的としている。

センター設立から 6 年が経過して、三センターでこれまでに 899 人の修了生を養成した。これらの人材は各都道府県、政令指定都市で、指導者として活躍している。都道府県でおこなわれている実務者研修の受講者は、平成 16 年度までに全国で 4 万人となった。

D. 考察

社会の高齢化に伴い、認知症の患者数が今後さらに増加すると予測されており、疾患の早期発見や予防には、簡便で有効な認知機能スクリーニングが必要である。地域の住民を

対象とするスクリーニングは面接によるものが多いが、時間やコストがかかるだけでなく、被験者の心理的ためらいもあり、受診率が必ずしも高くない。

電話による検査法は、簡便で被験者の負担も軽く、視覚障害者、識字障害者にも適応があり、面接による方法と比べてコストもかからないことが明らかとなっている。従って疫学調査など大規模な調査に適しているのみならず、臨床の場でも応用でき、高齢者の認知機能検査の可能性を広げることができる。

介護保険導入によって介護現場は急速に拡大し、また変化している。介護従事者の多くは日常業務に追われながらも、理念に燃え、新しい知識や技術を学ぶ意欲を持っている。若い人が多く、処遇の問題もあり、離職や転職が多いといわれている。理想が高い人や責任心の強い人は、「燃え尽き症候群」になりやすい。しかし、高齢社会がこれからも続くと思われ、介護従事者は社会の要請である。

新しい知識や技術を伝える研修だけでなく、待遇改善や、精神面のフォローも必要であり、介護要員の質を高める努力が重要である。今後は介護職員の数だけでなく、その質が問われるようになるが、介護職の職種は多様になってきており、全体のレベルを上げるとともに、医療などとの連携をさらに強化する必要がある。

E. 結論

早期診断に関する全国研究と、全国的な介護に関する研究が急務である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1) 渡邊智之、藤掛和広、宮尾克、小長谷 陽子、柴山漠人：高齢者の運転状況と認知症ドライバーに関する研究。日本医事新報 ;第 4295 号（2006 年 8 月 19 日）81-84.

2) 小長谷陽子、渡邊智之、鷺見幸彦、服部英幸、武田章敬、相原喜子、鈴木亮子、太田寿城：大規模調査に有用な新しい認知機能検査、TICS-J の開発。Brain and Nerve 59(1):67-71, 2007

2) 学会発表

1) 川合圭成、武田章敬、末永正機、相原善子、桑島愛、小長谷陽子、川村陽一、祖父江元。簡易コミュニケーション(軽症認知症用)作成の試み。2006.5.11.第47回日本神経学会。東京。

2) 山下真理子、小林敏子、松本一生、小長谷陽子。介護家族の視点からみた認知症高齢者の終末期医療に関する研究。2006.6.30-7.1.第21回日本老年精神医学会。東京。

3) 鈴木貴子、今井幸充、佐藤美和子、渡邊浩文、本間 昭、浅野弘毅、五十嵐禎人、長田久雄、小長谷陽子、荻原正子、六角遼子。アルツハイマー型認知症の病名告知に関する意識調査。2006.6.30-7.1.第21回日本老年精神医学会。東京。

4) 鈴木亮子、小長谷陽子、高田育子。認知症高齢者への心理的援助としての個人回想法の効果に関する検討。一事例の部b b席から。2006.10.1.第7回認知症ケア学会。札幌。

5) 武田章敬、小長谷陽子、加藤隆司、鷺見幸彦、伊藤健吾、祖父江元。アルツハイマー病患者のグループホーム入所による脳代謝の変化—FDG-PETによる縦断的検討—。2006.10.1.第7回認知症ケア学会。札幌。

6) 渡邊智之、藤掛和広、宮尾克、小長谷陽子、柴山漠人。高齢者の運転状況と認知症ド

ライバーに関する意識調査。2006.10.1.第7回認知症ケア学会。札幌。

7) 佐藤美和子、渡邊浩文、鈴木貴子、今井幸充、本間 昭、浅野弘毅、五十嵐禎人、長田久雄、小長谷陽子、荻原正子、六角遼子。認知症の方に対する介護保険サービス利用時の説明と同意。—サービス依頼者と説明対象の実態—。2006.10.1.第7回認知症ケア学会。札幌。

8) 鈴木貴子、渡邊浩文、佐藤美和子、今井幸充、本間 昭、浅野弘毅、五十嵐禎人、長田久雄、小長谷陽子、荻原正子、六角遼子。認知症の方に対する介護保険サービス利用時の説明と同意。—サービス利用者本人への契約書の説明の実態—。2006.10.1.第7回認知症ケア学会。札幌。

9) 渡邊浩文、佐藤美和子、鈴木貴子、今井幸充、本間 昭、浅野弘毅、五十嵐禎人、長田久雄、小長谷陽子、荻原正子、六角遼子。認知症の方に対する介護保険サービス利用時の説明と同意。—利用者の理解の確認方法の実態—。2006.10.1.第7回認知症ケア学会。札幌。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書
（主任研究者：柳澤 信夫）

アミロイド B の毒性に対する漢方薬の神経保護効果

— 認知症治療の新戦略 —

分担研究者 荒井 啓行
東北大学大学院医学系研究科 先進漢方治療医学講座

アミロイド B ペプチド (amyloid B, AB) は、認知症の代表疾患であるアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) の主要な病理学的特徴である老人斑 (senile plaque, SP) の主要構成成分である。この AB が AD の発症に主要な役割を果たしていることが知られている。一方、漢方生薬は多様な成分を含んでおり、さまざまな疾患に有効であると考えられている。本研究に先立ち、漢方薬釣藤鈎は *in vitro* で AB1-40 および AB1-42 の凝集を抑制するとともに、凝集した AB 重合体を脱重合させることが報告されている。本研究では釣藤鈎について二つの内容を検討した。ひとつは MTT 法を用いて、培養細胞における AB の細胞毒性に対する釣藤鈎の影響について検討した。はじめに釣藤鈎の水・エタノール・メタノール抽出溶液が細胞の生存率を増加するかについて調べた結果、エタノール抽出溶液を処理することにより、細胞の生存率が有意に増加した。また、 $10\mu\text{M}$ の AB1-42 は細胞の生存率を減らす。が、 $10\mu\text{g/ml}$ のエタノール抽出溶液を 24 時間前処理後に $10\mu\text{M}$ の AB1-42 を加えると、AB1-42 の細胞毒性が著しく抑制されることが確認された。もうひとつは、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて、転写因子 c-Fos・CREB・c-Rel・p65・ATF2 と DNA の結合活性について検討した。釣藤鈎の抽出溶液は、培養細胞の c-Fos・CREB・c-Rel・p65 と DNA の結合活性に影響を与えなかった。これに対して、AB1-42 は培養細胞に ATF2 と DNA の結合活性を著しく上げた。釣藤鈎の抽出溶液は細胞の生存率を上げるとともに、AB1-42 の細胞毒性に対して保護作用を有し、その神経保護作用に ATF2 の抑制が関与していることが示唆された。

Key Words アルツハイマー病、漢方薬、アミロイドベータタンパク、MTT、転写因子

研究目的：

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は認知症の半分以上を占めており、初老期以降に潜行性発症し、緩徐に進行する神経変性疾患である。日本をはじめ、世界中で、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬 (acetylcholinesterase inhibitor, AChEI) である塩酸ドネペジル (donepezil) がアルツハイマー病の治療薬として唯一認可されている。しかし、これまで塩酸ドネペジルを含めても、アルツハイマー病の神経病理学的な変化を改善できる根本的な治療薬はまだ見つかっていない^[1,2]。アルツハイマー病

を特徴づける病理学的な変化として、アミロイド B ペプチド (amyloid B; AB) からなる老人斑の沈着、リン酸化タウを主な構成成分とする神経原繊維性変化、ならびに選択的神経細胞の脱落が挙げられる。その中で AB の沈着、特に老人斑の集合核の主な構成成分である AB1-42 の沈着が、AD 病態の最も早期に生じる変化であることから、この AB、特に AB1-42 の沈着を抑制する「抗アミロイド療法」は近未来の AD の本質的な治療として期待されている。また、凝集した AB が培養細胞のアポトーシス (apoptosis) を誘発するのは周知のことであり、AB は *in vitro* で培養細胞に毒性を有することが

知られている^[3,4]。神経細胞に対する AB の毒性を抑制できる薬物があれば、脳内の AB 沈着に続く神経細胞の脱落などの変化が軽減できるかも知れない。漢方薬は世界中、特に東アジアで幅広く使われており、各種の病気に用いられている。近年いくつかの漢方薬は認知症に効果があると臨床の場で報告されている。われわれはこれまで漢方薬釣藤鈎を水、エタノールおよびメタノールで抽出した成分が *in vitro* で AB1-40 と AB1-42 の凝集を抑制するとともに、凝集した AB 集合体を脱重合させることができることが確認された^[5]。本研究では培養したヒト神経芽細胞腫細胞 SH-SY5Y を用いて、AB1-42 の細胞毒性に対する漢方薬釣藤鈎の神経保護効果を確認するとともに、各種転写因子との関連についても検討を行った。

方法：

1. 漢方薬の抽出溶液を作成

釣藤鈎 10g に水・エタノール及びメタノールを 100 ml ずつ入れて、還流することにより、水溶液 (water extract:W)・エタノール抽出溶液 (ethanol extract:E) とメタノール抽出溶液 (methanol extract:M) を得た。溶液を乾燥させ、100mg/ml の濃度になるように dimethylsulfoxide (DMSO) で溶解した後に、-20℃で保存する。

2. 細胞を培養

10%FBS (fetal bovine serum) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を使って、5%二酸化炭素 (5%CO₂) の 37℃インキュベーターでヒトの神経腫瘍細胞 SH-SY5Y 細胞を培養し、週に一回継代する。

3. SH-SY5Y 細胞の生存率を測定

生きている細胞のミトコンドリアと反応する 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を用いて、細胞の生存率を測定した。

96 穴平底マイクロプレートに 1000 個の細胞を含む 200μl の細胞懸濁液を播き、37℃・5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養し、ネガティブコントロール (DMSO を使った、C と表記)・E10 (最終濃度を 10μg/ml となるように調整)・E100 (100μg/ml)・M10 (10μg/ml)・M100

(100μg/ml)・W10 (10μg/ml)・W100 (100μg/ml) を加える。48 時間インキュベートして、各ウェルに MTT ストック溶液を 20μl ずつ (最終濃度 0.5mg/ml) 加え、さらに 4 時間培養し、各ウェルに酸性イソプロパノールを 100μl ずつ加え、マイクロプレートリーダーで 570nm で測定する。

AB1-42 の細胞毒性に対する神経細胞保護作用を調べる実験においては、E10・E100・M10・M100・W10・W100 を入れた 24 時間後に、最終濃度 10μM の AB1-42 を加え、更に 24 時間インキュベートして、以上の述べた方法で細胞の生存率を測定した。

生存率を算出する方法：

$$\text{生存率 (\%)} = ((a-b) / (c-b)) \times 100$$

a: 検体の測定値, b: ブランクの測定値, c: ネガティブコントロールの測定値

4. NF-κB と関連因子に対する研究

トランスファクターキット (TransFactor Profiling Kit Inflammation I, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) を利用して ELISA で転写因子と DNA の結合活性を測定した。

60mm のディッシュの中に 1×10⁶ 個/ml の細胞懸濁液を 3ml ずつ播き、インキュベーターで 24 時間培養して E10・M10・W10 を加える。その後 24 時間インキュベートして、最終濃度 10μM の AB1-42 を加え、ネガティブコントロール・E10・M10・W10・AB1-42・AB1-42+E10・AB1-42+M10・AB1-42+W10 のように組み分けて、更に 24 時間培養した。

トランスファクターキットのプロトコールに従って、核たんぱく質を抽出した。4℃で 1,200×g, 5 分遠心後に、上清を回収し、氷冷の PBS を加え、4℃で 300×g, 5 分遠心し、細胞を集め、集めた細胞の 5 倍程度の細胞膜破碎バッファーを加え、氷上で 15 分インキュベートする。4℃で 300×g, 5 分遠心した後に、沈殿の 2 倍程度の細胞膜破碎バッファーを加え、27 号針の注射器で 5 回ピペティングして、細胞を完全に破碎した。4℃で 8,000×g, 20 分遠心した後に、沈査を集め、氷冷核溶解バッファーを加え、4℃で 60 分間インキュベートする。4℃, 16,000×g, 5 分遠心した後に、上清を回収し、Lowry 法で

タンパク量を定量して、 -80°C で保存した。

NF- κB p50・p65・c-Rel・ATF2・c-Fos・CREBとDNAの結合活性を調べた。30 μg のタンパク質を含むサンプルを50 μl /ウェルずつ加え、室温で60分間インキュベートした後に、各因子に適応する一次抗体を加え、室温で60分間インキュベートした。さらに二次抗体を加え、室温で30分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを使って655nmで測定した。

5. 統計分析

SPSSで統計して、 $p=0.05$ を有意差ありと確認した。

結果：

1. 釣藤鈎の細胞保護作用

釣藤鈎抽出溶液を加えたところ、エタノール

の抽出液において細胞の生存率が著しく増加した(図1)。また、どの溶液においても、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が至適濃度であると推測される。

また、図2で示したようにAB1-42は、SH-SY5Y細胞の生存率を減少させるのに対して、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエタノール抽出溶液はAB1-42の細胞毒性を著しく抑制することが確認された。

2. NF- κB と関連因子の変遷

図3-6の示したように、漢方薬とAB1-42とはどれも培養細胞のc-Fos・CREB・c-Rel・p65とDNAの結合活性に明確に影響を与えない。これに対して、図7の示したように、AB1-42は培養細胞のATF2とDNAの結合活性を著しく上げた。

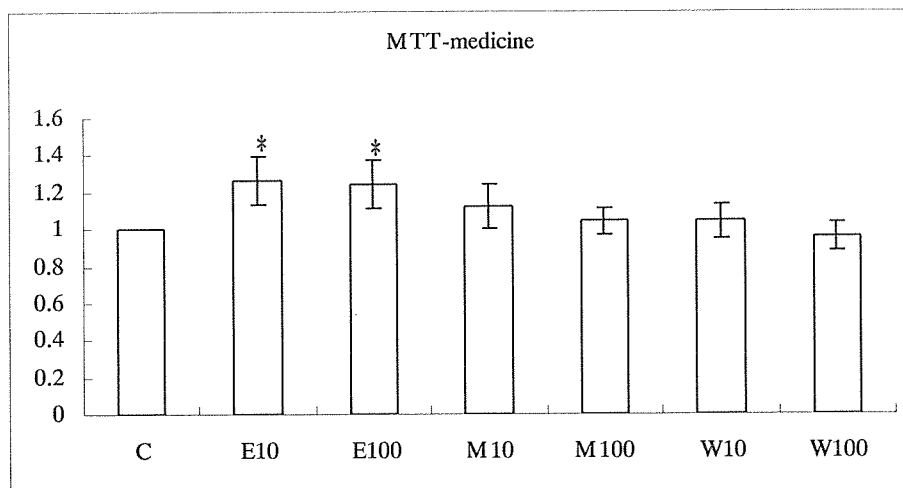


図1 漢方抽出溶液によるSH-SY5Y細胞の生存率の変動

C：ネガティブコントロール

E10：10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエタノール抽出溶液 E100：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエタノール抽出溶液

M10：10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のメタノール抽出溶液 M100：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のメタノール抽出溶液

W10：10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の水溶液 W100：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の水溶液

* $p=0.05$

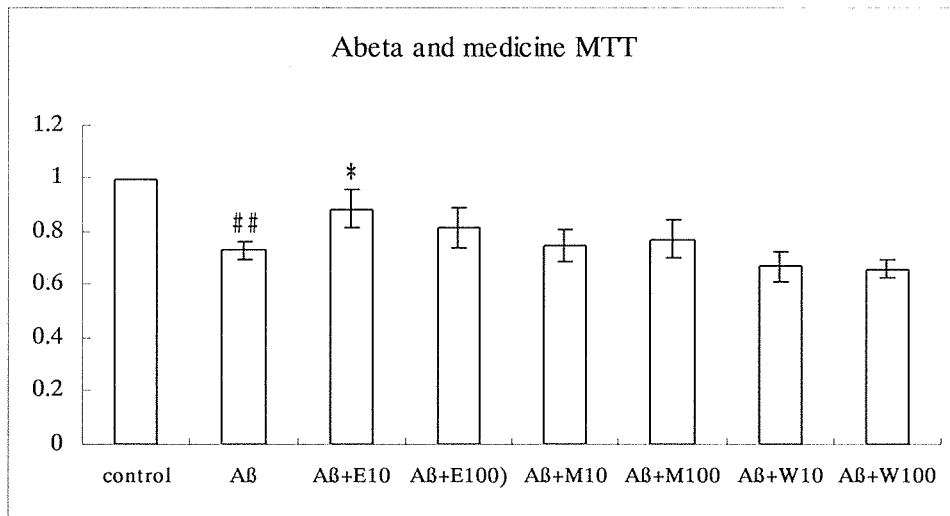


図2 Aβ₁₋₄₂細胞毒性に対する漢方薬抽出溶液の影響

control : ネガティブコントロール Aβ : 10μM の Aβ₁₋₄₂
 Aβ+E10 : 10μg/ml のエタノール抽出溶液前処理 Aβ+E100 : 100μg/ml のエタノール抽出溶液前処理
 Aβ+M10 : 10μg/ml のメタノール抽出溶液前処理 Aβ+M100 : 100μg/ml のメタノール抽出溶液前処理
 Aβ+W10 : 10μg/ml の水溶液前処理 Aβ+W100 : 100μg/ml の水溶液前処理
 ## ネガティブコントロールと比べて $p < 0.01$
 * Aβ₁₋₄₂ 単独と比べて $p < 0.05$

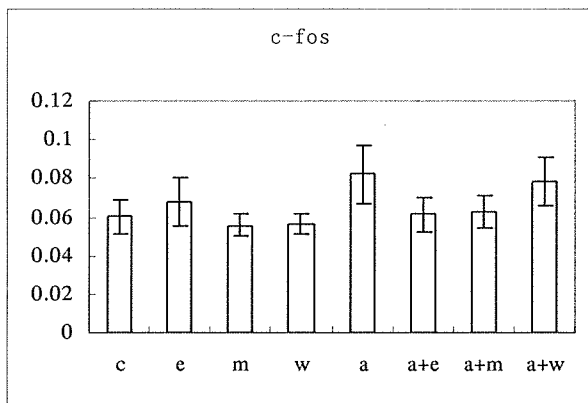


図3 c-Fos と DNA の結合活性

c : ネガティブコントロール e : 10μg/ml のエタノール抽出溶液 m : 10μg/ml のメタノール溶液
 w : 10μg/ml の水溶液 a : 10μM の Aβ₁₋₄₂ a+e : 10μg/ml のエタノール抽出溶液前処理
 a+m : 10μg/ml のメタノール抽出溶液前処理 a+w : 10μg/ml の水溶液前処理

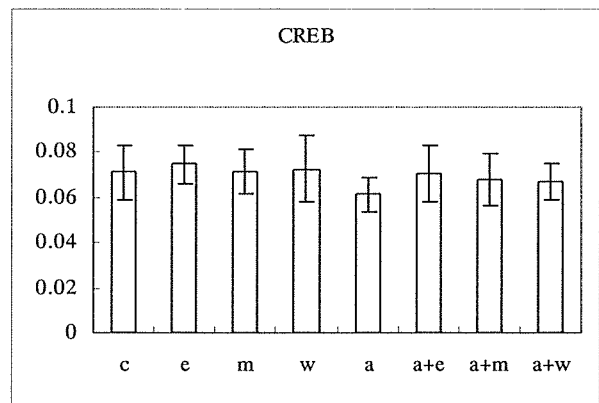


図4 CREB の結合活性

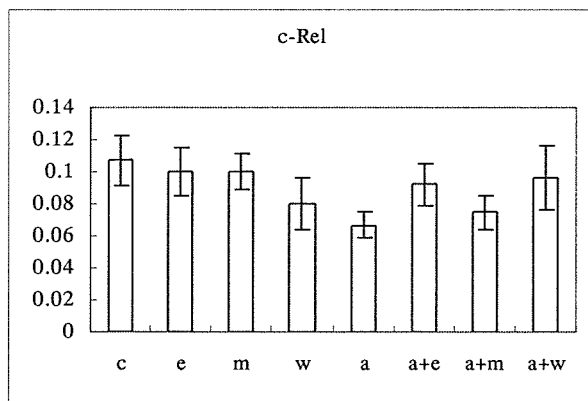


図5 c-Rel と DNA の結合活性

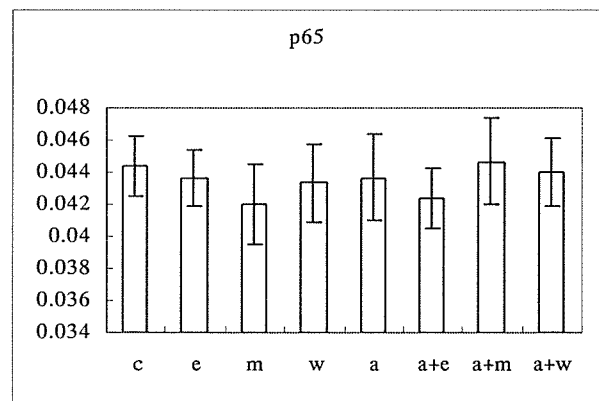


図6 p65 の結合活性

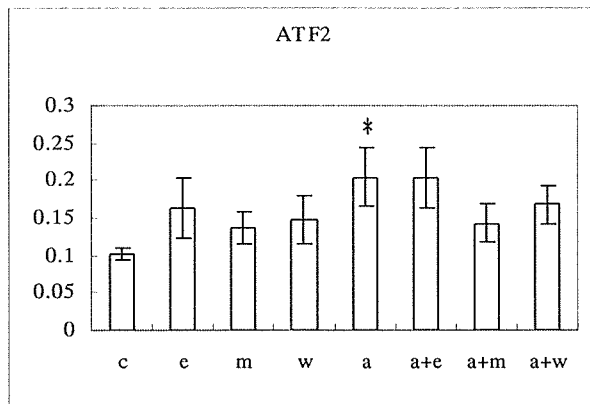


図7 ATF2 と DNA の結合活性

* AB₁₋₄₂ はネガティブコントロールと比べて、 $p < 0.05$

考察:

釣藤鈎は頭痛・めまいなどの治療薬として使われている。今までの研究によって、釣藤鈎の主な成分が、神経細胞に対する酸化ストレスを抑制することが報告されている^[6,7,8]。本研究は、MTT法で培養細胞の生存率を測定することによって、釣藤鈎のエタノール・メタノール・水での抽出溶液が細胞の生存率を増加させる傾向があること明らかになったが、とくにエタノール抽出溶液はSH-SY5Y細胞の生存率を最も顕著に増加させた(図1)。この結果から、エタノール・メタノール・水での抽出液体には、異なる有効成分が含まれているか、あるいはその比率が異なっていることが推測される。エタノール・メタノール・水での抽出溶液を詳しく分析することにより、細胞の生存を促進できる成分を見つけることができるかもしれない。

他の研究者の結果と一致して、細胞にAB₁₋₄₂を加えると、培養細胞の生存率を明確に減少させることから、AB₁₋₄₂には神経細胞に毒性があることが示された(図2)^[9,10]。また、図2に示したように、釣藤鈎のエタノール・メタノール・水抽出溶液は、AB₁₋₄₂がSH-SY5Y細胞の生存率を減少させることを抑制する傾向があるが、特に、10 μ g/mlのエタノール抽出溶液は、AB₁₋₄₂の細胞生存率減少作用を著しく抑制した。しかし、エタノール抽出溶液においても、10 μ g/mlの溶液では明確な抑制作用があるのに対して、100 μ g/mlではAB₁₋₄₂の細胞毒性を抑制することができるが、有意差がなかった($p > 0.05$)。漢方薬で疾患を治療する際には、抽出方法ばかりでなく、薬量も詳しく検討する必要があること

が示唆された。

NF- κ Bは哺乳動物の細胞で広く存在している転写因子で、p50・p65・c-Rel・p52・Rel-Bなどがその構成分子である。NF- κ Bファミリーは異なる遺伝子の転写を調節して、細胞の様々な機能に関わっている^[11]。今までの研究によって、NF- κ Bファミリーは細胞の免疫反応過程・炎症反応過程に関係があるとともに、細胞のアポトーシス(apoptosis)にも関与している。それにNF- κ Bファミリーは免疫細胞の分裂や繁殖などを促すとも報告されている^[12,13]。最近の研究では、ABがNF- κ Bの転写を活性化することが確認されており、ADの初期の老人斑でも活性化のNF- κ Bが存在しているということが示された^[14]。われわれの研究では、トランスファクターキットを用いて、NF- κ Bファミリーのp65・c-Rel、そしてATF2(Activated Transcription Factor-2)・c-Fos・CREB(cAMP-responsive element-binding protein)も検討した。

Valerioらの研究によって、AB₄₀はp65とc-Fosを活性化させるが、c-RelとATF2の転写には影響を与えないと報告された^[15,16]。本研究では、SH-SY5Y細胞にAB₁₋₄₂を加えるとc-FosとDNAの結合活性が上がる傾向はあるものの、有意な差は認められなかった。また、釣藤鈎の抽出溶液はAB₁₋₄₂のc-Fosの活性化を抑える傾向があるものの、有意差はなかった(図3)。更にAB₁₋₄₂はp65を活性化しなかった(図6)。本研究の結果によりAB₁₋₄₂とp65との関連はあまり高くないようである。

c-Relが活性化すれば細胞の生存を促進できる^[17]、c-RelはSH-SY5Y細胞に対するAB₁₋₄₂

の毒性には関連がないことが示唆された。また AB1-42 は CREB の活性化を抑える傾向があるが、ネガティブコントロールと比べて、有意差が出なかった。その上 釣藤鈎の抽出溶液は、CREB を活性化させる傾向があるが、ネガティブコントロールまたは AB1-42 に比べて、どちらも有意差が出なかった。以前の研究で、A β は CREB の活性化を抑えると示されている^[18]。本研究によると、CREB は 釣藤鈎と AB1-42 の細胞に対する作用と何らかの関係があるかもしれないが、深くはかかわっていないようである。

SH-SY5Y 細胞に AB1-42 を処理すると、ATF2 が著しく活性化することが確認された (図 7, $p < 0.05$)。しかし、釣藤鈎の抽出溶液は、ATF2 に明確な影響を与えなかった。ATF2 は bZIP (basic region leucine zipper) ファミリーであり、神経系統の発達の過程で大切な転写因子として働いているとともに、脳の傷害にも何らかの保護作用を発揮している。しかし、ATF2 は細胞の生存と関連があるものの、A β_{1-42} の細胞毒性と関係がないと報告されている^[19]。われわれの結果から、AB1-42 が SH-SY5Y 細胞に対する生存抑制過程において、転写因子 ATF2 は関与していると推測できる。AB1-42 と ATF2 と関連しているメカニズムは詳しく分からないため、今後の研究課題である。

これらの結果から、漢方薬 釣藤鈎の抽出溶液は SH-SY5Y 細胞の生存を促進する作用があり、特にエタノール抽出溶液が最も有効である。さらに、釣藤鈎のエタノール抽出溶液は、AB1-42 の細胞毒性から細胞を保護することが明らかになった。釣藤鈎抽出溶液の SH-SY5Y 細胞に対する作用は、NF- κ B ファミリーの p65・c-Rel ならびに CREB・c-Fos とは関与していないようであるが、ATF2 の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究がさらに発展して、神経細胞生存に対する 釣藤鈎の有効性が証明されれば、近い将来、アルツハイマー病の治療戦略としての漢方の地位が確立されるかもしれない。

参考文献

1. Rosengarten B, Paulsen S, Molnar S, et al. Acetylcholine esterase inhibitor donepezil

improves dynamic cerebrovascular regulation in Alzheimer patients. *J Neurol*, 2006, 253(1):58-64

2. Babiloni c, Casseta E, DalForno G, et al. Donepezil effects on sources of cortical rhythms in mild Alzheimer's disease: Responders vs. Non-Responders. *Neuroimage*, 2006, 31(4): 1650-1665
3. Loo DT, Copani A, Pike CJ, et al. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:7951-7955
4. Meyer LM, Stalder M, Herzig MC, et al. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci*, 2003, 6:370-377
5. Fujiwara H, Iwasaki K, Furukawa K, et al. Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's β -amyloid proteins. *J Neurosci Res*, 2006, 84:427-433
6. Dohi K, Satoh K, Ikeda Y, et al. Neuroprotective effect from ischemia and direct free radical scavenging activity of Choto-san (kampo medicine). *Acta Neurochir*, 2003, Suppl 86: 123 - 127
7. Mahakunakorn P, Tohda M, Murakami Y, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27:38 - 46
8. Mahakunakorn P, Tohda M, Murakami Y, et al. Effects of Choto-san and its related constituents on endogenous antioxidant systems. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28:53 - 57
9. Abe k, Saito H. Cholesterol does not affect the toxicity of amyloid beta fragment but mimics its effect on MTT formazan exocytosis in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res*, 1999, 35(3):165-174
10. Monji A, Tashiro K, Yoshida I, et al. Laminin inhibits both Abeta40 and Abeta43 fibril formation but does not affect Abeta40 or Abeta42-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Neurosci Lett*, 1999, 266(2):85-88

11. Chen, L.F. & Greene, W.C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell*, 2004, 5:392 - 401
12. Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, et al. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J. Neurosci*, 2003, 23:9403 - 9408
13. Kaltschmidt B, Uherek M, Wellmann H, et al. Inhibition of NF-jB potentiates amyloid b-mediated neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:9409 - 9414
14. Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, et al. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:2642 - 2647
15. Valerio A, Boroni F, Benarese M, et al. NF-κB pathway: a target for preventing Aβ-induced neuronal damage and Aβ42 production. *Euro J Neurosci*, 2006, 23:1711-1720
16. Gillardon F, Skutella T, Uhlmann E, et al. Activation of c-Fos contributes to amyloid beta-peptide-induced neurotoxicity. *Brain Res*, 1996, 706:169 - 172
17. Feng ZW, Porter AG. NF-κB/Rel proteins are required for neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Bio Chem*, 1999, 274(43):30341-30344
18. Puzzo D, Vitolo O, Trinchese F, et al. Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci*, 2005, 25(29): 6887-6897
19. Tindberg N, Palmertz MP, Simi A. Contribution of MAP pathways to the activation of ATF-2 in human neuroblastoma cells. *Neurochem Res*, 2000, 25(4):527-531

分担研究報告書

認知症の予防・治療・介護における戦略的・総合的対策の確立生活機能評価による
早期診断

分担研究者 杏林大学高齢医学 鳥羽研二

研究要旨： 軽度認知機能障害や認知症や早期発見のためには、地域、外来、入院など様々な「居場所」において取りうる発見方法が異なる。これは、簡便性、時間、コスト、信頼性などの要素とともに、対象の絶対数と認知機能低下の予測される数によって、早期診断の手法も選択されなければならない。軽度認知機能障害(MCI)と軽症認知症との検討によって、手段的ADLの早期発見における有用性とさらに簡易な問診表における予備的検討を行った。

分担研究課題： 認知症の早期診断に役立つ生活機能の評価

背景と目的： 軽度認知機能障害や認知症や早期発見のためには、地域、外来、入院など様々な「居場所」において取りうる発見方法が異なる。これは、簡便性、時間、コスト、信頼性などの要素とともに、対象の絶対数と認知機能低下の予測される数によって、早期診断の手法も選択されなければならない。

多くの疫学研究において、認知症患者は65歳以上の高齢者の6-8%程度に認められ、2-3%に、軽度認知機能障害を認めるとされている。杏林大学の「物忘れセンター」では、毎週10-20人の新患が訪れるが、統計的には、35000人の高齢者を抱える三鷹市だけでも2500人以上の認知機能低下(認知症)患者がいると推計され、診断されていない認知症患者は膨大な数に上る。

100人の高齢者患者さんを見ている一般外来で、10人に問題があるはずであるが、一般医家のかたの認識はどうであろうか？ 認知症サポート医師研修の資料によれば、医師の3割は認知症を疾患と捉えていないという。

各地で「物忘れ外来」など、認知症外来が増加しているが、潜在的認知症患者の数からして、早期発見には一般医家の協力が欠かせない。しかしながら現状では、長谷川式簡易知能スケール(HDSR)でも時間がかかり、人手が無いという理由で一般医家の外来試行率は低い。

物忘れセンターへの院内紹介の症例のMMSEが平均15点という現状も問題である。一般医家ばかりでなく臓器別専門医の啓蒙も必要であろう。早期発見の観点では、実際一般病院における非認知症794名(65-85歳)で、36.1%がMCIであったという成績が出されており(1)、入院患者は、早期発見の宝庫であ

るといえる。このような対象には、後述する特異度の高い、脳脊髄液検査や核医学検査を行って正確な診断をすべきであろう。

対象と方法：

1) 地域支援事業における認知症スクリーニング

班員が、三鷹市物忘れ・介護予防ネットワーク委員（副委員長）に参加している関係から、三鷹市で、介護予防事業における特定高齢者健診にける、認知機能低下者候補の抽出率、介護予防事業への参加率を調べた。

2) 質問紙法などの生活機能評価の意味

杏林大学物忘れセンター受診者697名で手段的ADL(Lawton&Brody)を測定し、早期に低下する項目を抽出した。さらにCDR 0.5を満たし、MCIと診断された113名と、MMSEが20点以上の軽症認知症を対象に、MCIであることを従属変数として、総合的機能評価各項目（ADL; Barthel Index, IADL, 抑鬱(Geriatric Depression Scale)、意欲(Vitality Index)、認知機能(MMSE)をMCIと認知症で評価し、各スケールが2群間で有意に異なるかを対応のないT検定を行うとともに、有意な項目については、年齢、性を強制注入したモデルにおいて多変量解析を行い、独立した危険因子を決定した。

結果： 1) 地域支援事業における認知症スクリーニング

昨年度から、特定高齢者支援事業のため、26項目のチェックリストが高齢者健診でおこなわれている。三鷹市においては、4月～11月まで10110名が受診し、認知機能以外の栄養、運動などのプログラム対象者は306名(3%)であった。認知機能に関し、同じ話を繰り返す、時間見当識の低下、電話を利用しないの3項目中1項目に該当する対象は特定高齢者の選定基準により特定高齢者と決定された298名の78%が該当したが、全受診者の中では、2.3%にすぎなかった。我々の八王子市民500名の調査では、20%以上が時々同じ話をすることを指摘されていた。特定高齢者の選定基準が厳しすぎるため、認知症の早期発見には不十分であることが示されている。

介護予防事業で膨大なスクリーニングを掛けている以上、認知症予備軍の把握と対策をとるような体制を構築すべきであろう。

2) 質問紙法などの生活機能評価の意味

2-1) MCIとの鑑別

スクリーニング検査方法の探索的調査として、697名の外来認知症またはMCI患者に行った手段的ADL検査では、買物、料理、服薬管理が早期に低下しており、認知症の鑑別に役立つことを報告した(日本老年医学会シンポジウム、認知症の早期発見、2006)。

更にMCI113名との対比の検討から、男性では買い物、女性では料理が出来ないことが、初期認知症とMCIとの鑑別に役立つことが判明した(小林義雄他、

日本老年医学会関東甲信越地方会、シンポジウム)。これらのオッズ比は5倍をこえており、80%以上の確率で、認知症をMCIと区別できることを意味する。

考察：多くの検査表（バッテリー）が開発されているが、既存のバッテリーで、健常高齢者とMCIの鑑別能力を比較した成績では(2)、4個の名前の遅延再生によるMemory Impairment Screen (MIS)（自発解答2点、ヒントにより解答1点、8点満点）と流暢機能（長谷川式の野菜の名前を言える数）が、MCIと健常者を鑑別するのに役立ち、MIS 5点未満、語流暢 20語未満の組み合わせで、MCIを健常者と鑑別する感度75%、特異度85%だったという(2)。この論文では、見当識、5文字の並べ替え（Letter Screening Test）、Boston Naming Test、時計描画テストは鑑別には役立たなかった。時計描画テストに関しては、本邦からMCIと正常の鑑別に役立つという成績(3)や、8時40分を正確に描画、指摘する能力が、最も鑑別に役立つという興味深い成績も報告されている(4)。復唱と遅延再生の組み合わせのMCI、認知症の診断有効性に関しては、我々は、長寿科学研究の「総合的機能評価ガイドライン」で、すでに指摘しているが(5)、MCIとの鑑別の感度96%、特異度91%との結果が報告された(6)。今後の、外来、住民健診において、認知症やMCIのスクリーニングにCGA7の活用が望まれる。

大集団に対する、簡易なスクリーニングの探索的検討

より簡便な方法として、我々は、5000名以上の多数の集団において30歳～80歳で調査した結果では、「同じ話をしたことを指摘される」という認知症初期症状よりやや頻度が少ないが、ほぼ平行して加齢変化が認められるエピソードとして、「昨日の夕食の内容が思い出せない」があり、MCIのスクリーニングとして有用かどうか来年度以降の縦断研究を行いたいと考えている。

結論：手段的ADLは認知症の早期発見の有用な手段となると考えられる。

参考文献

- 1) Bickel H, Mosch E, Seigerschmidt E, Siemen M, Forstl H. Prevalence and persistence of mild cognitive impairment among elderly patients in general hospitals. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;21(4):242-50.
- 2) Beinhoff U, Hilbert V, Bittner D, Gron G, Riepe MW. Screening for cognitive impairment: a triage for outpatient care. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005;20(5):278-85.
- 3) Yamamoto S, Mogi N, Umegaki H, Suzuki Y, Ando F, Shimokata H, Iguchi A. The clock drawing test as a valid screening method for mild cognitive

- impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;18 (2) :172-9.
- 4) Mangone CA, Grillo R, Saavedra I, Pallo V, Salgado P.
[New assessment variables in the Clock Drawing Test (CDT) allow an early and easy diagnosis of degrees of cognitive impairment]
Vertex. 2005 Jan-Feb;16 (59) :13-9.
- 5) 鳥羽研二、CGA7, 総合的機能評価ガイドライン、鳥羽研二編、厚生科学出版、pp15, 2003.
- 6) Shankle WR, Romney AK, Hara J, Fortier D, Dick MB, Chen JM, Chan T, Sun X. Methods to improve the detection of mild cognitive impairment.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 29;102 (13) :4919-24. Epub 2005 Mar 21

業績

1. 論文発表

- 1) 鳥羽研二：認知症高齢者の早期発見 臨床的観点から 日本老年医学会誌 (印刷中)。
- 2) Hang Xi, Masahiro Akishita, Kumiko Nagai, Wei Yu, Hiroshi Hasagawa, Masato Eto, Kenji Toba: Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis* 191; 281~289, 2007.
- 3) Hidenori Arai¹, Masahiro Akishita², Shinji Teramoto², Hiroyuki Arai³, Katsuyoshi Mizukami⁴, Shigeto Morimoto⁵, and Kenji Toba⁶ (¹Department of Geriatric Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, ²Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, ³Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, ⁴Department of Psychiatry, Graduate School of Medicine, Tsukuba University, Tsukuba, ⁵Department of Geriatric Medicine, Kanazawa Medical University, Uchinada, and ⁶Department Medicine, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, Japan) : Incidence of adverse drug reactions in geriatric units of university hospitals. *Geriatr Gerontol Int* 5 ; 293~297, 2005.
- 4) Masato Eto, Kenji Toba, Masahiro Akishita, Koichi Kozaki, Tokumitsu Watababe, Seungbum Kim, Masayoshi Hashimoto, Junya Ako, Katsuya Iijima, Noriko Sudoh, Masao yoshizumi, and Yasuyoshi Ouchi : Impact of Blood Pressure Variability on Cardiovascular Events in Elderly Patients with Hypertension. *Hypertens Res* 2005 ; 28:1~7, 2005
- 5) Akishita M, Nagai K, Xi H, Yu W, Sudoh N, Watanabe T, Ohara-Imaizumi

M, Nagamatsu S, Kozaki K, Horiuchi M, Toba K. Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. Hypertension. 45: 1188-93, 2005.

6) Wei Yu, Masahiro Akishita¹, Hamg Xi, Kumiko Nagai, Noriko Sudoh, Hiroshi Hasegawa, Koichi Kozaki, Kenji Toba (¹Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo) : Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. Clinica Chimica Acta 364; 328~334, 2006.

2. 学会発表

- 1) 鳥羽研二：シンポジウム：認知症高齢者の早期発見 臨床的観点から 日本老年医学会総会、金沢、2006
- 2) 小林義雄、鳥羽研二：シンポジウム：認知症に対する取り組み、日本老年医学会関東甲信越地方会

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hang Xi, Masahiro Akishita, Kumiko Nagai, Wei Yu, Hiroshi Hasagawa, Masato Eto, <u>Kenji Toba</u>	Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis.	Atherosclerosis	191	281-289	2007
Jiro Okochi, <u>Kenji Toba</u> , Tai Takahashi, Kozo Matsubayashi, Masanori Nishinaga, Ryutaro Takahashi, and Takashi Ohru	Simple screening test for risk of falls in the elderly.	Geriatrics & Gerontology International	6	223-227	2006
Reiko Kikuchi, Satoru Mochizuki, Masahiko Shimizu, Noriko Sudoh, Koichi Kozaki, Masahiro Akishita ² , <u>Kenji Toba</u>	Elderly patient presenting with severe thyrotoxic hypercalcemia.	Geriatrics & Gerontology International	6	270-273	2006
平山俊一、菊地令子、井上慎一郎、塚原大輔、末光有美、小林義雄、杉山陽一、長谷川浩、神崎恒一、井上剛輔、 <u>鳥羽研二</u>	超高齢者におけるクレアチニンクリアランス推定式の比較検討	日本老年医学会雑誌	44(1)	90-94	2007
園原和樹・ <u>鳥羽研二</u>	早期診断の進歩とその活用法 頭部MRI画像における大脳白質病変の意義	Medical Practice	23(7)	1171-1174	2006

Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis

Hang Xi^a, Masahiro Akishita^{b,*}, Kumiko Nagai^a, Wei Yu^a,
Hiroshi Hasegawa^a, Masato Eto^b, Koichi Kozaki^a, Kenji Toba^a

^a Department of Geriatric Medicine, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan

^b Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Received 28 November 2005; received in revised form 9 May 2006; accepted 19 May 2006

Available online 27 June 2006

Abstract

Objective: Effects of potent free radical scavenger, edaravone, on oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis were investigated using animal models and cultured cells.

Methods and results: Endothelial apoptosis was induced by 5-min intra-arterial exposure of a rat carotid artery with 0.01 mmol/L H₂O₂. Edaravone treatment (10 mg/kg i.p.) for 3 days suppressed endothelial apoptosis, as evaluated by chromatin staining of *en face* specimens at 24 h, by approximately 40%. Similarly, edaravone dose-dependently inhibited H₂O₂-induced apoptosis of cultured endothelial cells in parallel with the inhibition of 8-isoprostane formation, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) accumulation and VCAM-1 expression. Next, apolipoprotein-E knockout mice were fed a high-cholesterol diet for 4 weeks with edaravone (10 mg/kg i.p.) or vehicle treatment. Edaravone treatment decreased atherosclerotic lesions in the aortic sinus (0.18 ± 0.01 to 0.09 ± 0.01 mm², *P* < 0.001) and descending aorta (5.09 ± 0.86 to 1.75 ± 0.41 mm², *P* < 0.05), as evaluated by oil red O staining without influence on plasma lipid concentrations or blood pressure. Dihydroethidium labeling and cytochrome *c* reduction assay showed that superoxide anions in the aorta were suppressed by edaravone. Also, plasma 8-isoprostane concentrations and aortic nitrotyrosine, 4-HNE and VCAM-1 contents were decreased by edaravone treatment.

Conclusions: These results suggest that edaravone may be a useful therapeutic tool for early atherosclerosis, pending the clinical efficacy.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Atherosclerosis; Reactive oxygen species; Free radical scavenger; Edaravone; 4-HNE; Apolipoprotein E knockout mouse

1. Introduction

Accumulating evidence has shown that stress-induced injury of vascular endothelial cells (ECs) is an initial event in the development of atherosclerosis [1]. In particular, oxidative stress has been implicated in endothelial injury caused by oxidized LDL and smoking as well as hypertension, diabetes and ischemia-reperfusion [1–3]. This notion is supported by the findings that the production of reactive oxygen species (ROS) is upregulated in vascular lesions [4,5], and that lesion formations such as endothelial dysfunction [6]

and atherosclerosis [7] are accelerated by superoxide anion (O₂^{•-}).

Experimental studies have shown the protective effects of antioxidants on atherosclerosis and endothelial injury. Dietary antioxidants were reported to preserve endothelial function [8,9] and inhibit atherosclerosis [10] in cholesterol-fed rabbits. In a well employed animal model of atherosclerosis, apolipoprotein E knockout (ApoE-KO) mouse fed a high fat diet, it has been shown that there was a significant increase in basal superoxide products [11,12], and that both O₂^{•-} levels and aortic lesion areas were attenuated by treatment with Vitamin E [11] or superoxide dismutase [13]. By contrast, it has been reported that elimination of NAD(P)H oxidase [14] or disruption of its subunit p47phox [15] had no effect on lesion size in ApoE-KO mice. Clinical experiments have

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5800 8832; fax: +81 3 5800 8831.
E-mail address: akishita-ky@umin.ac.jp (M. Akishita).

also shown that antioxidants such as Vitamins C and E can ameliorate endothelial dysfunction in patients with hypercholesterolemia or atherosclerosis [16,17], although recent clinical trials have failed to prove the protective effects of Vitamin E on cardiovascular events in patients with risk factors [18] and in healthy subjects [19].

Edaravone is a potent free radical scavenger that has been clinically used to reduce the neuronal damage following ischemic stroke [20]. Edaravone has promising property to quench hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and show inhibitory effects on peroxynitrite (ONOO^-) and both water-soluble and lipid-soluble peroxy radical ($\text{LOO}\cdot$) [21,22]. Accordingly, this compound exerts a wide range of antioxidant activity on ROS beyond the effects of water-soluble or lipid-soluble antioxidant vitamins. Based on this idea, we hypothesized that edaravone would inhibit the process of atherosclerosis.

To test this hypothesis, we investigated the effects of edaravone in two experimental models. First, we examined whether edaravone could inhibit hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced EC apoptosis in a rat model [23] and cultured ECs. Second, we examined whether edaravone could suppress the atherosclerotic lesion formation in ApoE-KO mice.

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats aged 10–12 weeks (Japan Clea), and male C57BL/6 mice and ApoE-KO mice on C57BL/6 background aged 4–6 weeks (Jackson Laboratory) were used in this study. All of the experimental protocols were approved by the Animal Research Committee of the Kyorin University School of Medicine.

2.2. H_2O_2 -induced EC apoptosis in rats and in culture

EC apoptosis was induced by 5-min intra-arterial treatment of a rat carotid artery with 0.01 mmol/L H_2O_2 as previously described [23]. Briefly, edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one; 3 or 10 mg/kg; donated by Mitsubishi Pharma Corporation, Japan) or its vehicle was intra-peritoneally injected daily for 3 days before H_2O_2 treatment. A catheter was placed in the common carotid artery via the external carotid artery. The lumen was flushed with saline, replaced with 0.01 mmol/L H_2O_2 diluted with saline for 5 min and recovered. At 24 h after H_2O_2 treatment, EC apoptosis was evaluated by chromatin staining of *en face* specimens of the carotid artery using Hoechst 33342 dye. Apoptotic cells were identified by their typical morphological appearance; chromatin condensation, nuclear fragmentation, or apoptotic bodies. The numbers of apoptotic cells and intact cells were counted in 10 high-power fields for each specimen by an observer blinded to the treatment group.

Apoptosis of ECs isolated from a bovine carotid artery was induced as previously described [24]. Briefly, subconfluent ECs were pretreated for 24 h with culture medium containing edaravone or vehicle. After washing twice with Hank's balanced salt solution, the cells were exposed to H_2O_2 (0.2 mmol/L) diluted in Hank's balanced salt solution for 1.5 h at 37 °C to induce apoptosis. Then ECs were cultured in culture medium containing edaravone or vehicle until assay. Apoptosis was evaluated at 24 h after H_2O_2 treatment as histone-associated DNA fragments using a photometric enzyme immunoassay (Cell Death Detection ELISA, Roche), according to the manufacturer's instructions.

2.3. Atherosclerosis in ApoE-KO mice

ApoE-KO mice received a high-cholesterol diet (1% cholesterol, 10% fat in CE-2 standard diet; Japan Clea) for 4 weeks. Simultaneously, edaravone (10 mg/kg) or its vehicle was intra-peritoneally injected daily throughout the experiments. Body weight and systolic blood pressure were recorded every week in a conscious state by the tail cuff method (BP-98A; Softron, Tokyo).

At 4 weeks of treatment, mice were sacrificed with an overdose of diethyl ether and perfusion-fixed. Atherosclerotic lesions in the aortic sinus were quantified according to the method described previously [25]. We also measured the surface area of atherosclerotic lesions in the whole descending aorta including the abdominal aorta just proximal to the iliac bifurcation. *En face* specimens of the descending aorta were stained with oil red O, photographed and analyzed using the NIH image software. Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in mice plasma were determined by a commercial laboratory (SRL, Japan).

2.4. Measurement of ROS

Aortic samples for ROS measurements were prepared separately from those for atherosclerosis evaluation. At 4 weeks of treatment, ApoE-KO mice were sacrificed with CO_2 inhalation. Descending aortas were rapidly removed and placed into chilled modified Krebs/HEPES buffer. C57BL/6 mice fed a standard diet were also used as the control. To determine superoxide production *in situ*, frozen cross-sections of the aorta were stained with 10 $\mu\text{mol/L}$ dihydroethidium (DHE; Molecular Probes), followed by fluorescent microscopy [26]. Also, superoxide production in aortic rings was quantified using the superoxide dismutase-inhibitable cytochrome *c* reduction assay as previously described [27]. Immunohistochemical detection of 3-nitrotyrosine in the aorta was visualized by diaminobenzidine as reported previously [28].

Intracellular production of superoxide anions was measured using DHE as described previously [29], and the intensity values were calculated using the Metamorph software [24]. Concentrations of 8-isoprostane (8-iso prostaglandin