

スナネズミが経口的に摂取した植物由来リコピンは 脳虚血・再灌流後に海馬組織で発生する 神経細胞変性に影響を与える

Plant Lycopene which Mongolian Gerbil Ingested Affects Neurocyte
Alteration that Occurs in the Hippocampal Tissue
after Ischemia/Recirculation.

芳本 信子, 藤田 公和¹⁾, 松本 岳²⁾, 大橋 美佳,
今田 英己¹⁾ 稲熊 隆博²⁾

Nobuko YOSHIMOTO, Kimikazu FUJITA, Gaku MATSUMOTO, Mika OHASHI,
Hideki IMADA, Takahiro INAKUMA

抗酸化能を有するリコピンが、脳虚血後の神経細胞死や再灌流後に発生する活性酸素によって誘導される遅発性神経細胞変性を抑制することを、私たちはすでに報告してきた。本研究では、前報告に続いてリコピンが生体内の抗酸化能に与える影響についてSOD活性値を測定することによって検討した。

その結果、虚血負荷後に減少したSOD活性値は、リコピン摂取群では通常飼料摂取群と比較して3時間、1、3日目で有意に高値を示した。虚血・再灌流後の血清中リコピン濃度は虚血負荷前と比較して低値を示した。肝臓中リコピン濃度に変化はみられなかった。従って、生体内に取り込まれたリコピンは虚血・再灌流時に発生する活性酸素の障害に対して抑制的に働き、脳への障害を軽減するものと推察される。

We have already reported that lycopene with antioxidant ability controls neurocyte alteration led by the reactive oxygen species that occurs after reperfusion and neuronal death after cerebral ischemia. In this study, we investigated whether lycopene intake could influence SOD activity. As a result, about a SOD activity value which decreased after ischemia-tolerance, the lycopene-ingested-group showed intentionally the higher value than the non-lycopene ingested-group after at decided time.

キーワード：リコピン, 活性酸素, 脳虚血・再灌流, SOD

Lycopene, Reactive oxygen species, Cerebral ischemia/recirculation, Superoxide dismutase

¹⁾藤田保健衛生大学医学部 ²⁾カゴメ株式会社総合研究所

序論

現在、脳の高次機能研究の進歩は、精神・神経疾患の原因を究明し、その治療手段を開発するなど分子レベルで明らかになりつつある。これらの成果には、有効な治療方法や治療薬の開発が進んで劇的な成功を取っていることが考えられる。一方、ある種の機能性食品に含まれる生理活性物質を摂取することの有効性も数多く報告されている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

私達はすでに、抗酸化能を有するリコピンが、脳虚血後の神経細胞死や再灌流後に発生する活性酸素によって誘導される神経細胞変性を抑制することを報告してきた⁵⁾。植物由来のリコピンは強い抗酸化能を有し、活性酸素消去作用があることはすでによく知られており、他の生理活性成分と比較しても lycopene > astaxanthin > β -carotene ~ capsanthin ~ zeaxanthin ~ α -carotene > lutein > β -cryptoxanthin > α -tocopherol のように非常に強いことが報告されている⁶⁾。さらに、リコピンないしトマトの摂取が心臓疾患、生体の免疫系、癌の予防・治療、および筋委縮性側索硬化症、アルツハイマー病などの神経変性疾患を発症するリスクを減らすことも報告されている⁷⁾⁸⁾。

そこで、本研究では、離乳後リコピン含有飼料を経口摂取して成長したスナネズミに一過性の脳虚血を負荷し再灌流後、海馬組織における SOD 活性に及ぼすリコピンの影響を検討した。なお、本研究は日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従って実験を行っている。

1. 方法

実験動物のリコピン摂取方法および脳虚血負荷操作と再灌流操作

通常の MF 飼料で飼育したスナネズミを交配させ、出生後 3 週目（離乳直後）に、リコピン（図 1）含有 MF 飼料（5mg/100g）を自由摂食させ飼育した（約 2.0 ~ 2.5 か月間：体重 60 ~ 65g）。MF 飼料のリコピン含有量は Das ら⁹⁾、Bansal ら¹⁰⁾ の方法を採用した。スナネズミ 1 匹の 1 日当たりリコピン摂取量は、飼料の摂食量を毎日秤量して算出・確認した。スナネズミは藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センター内で飼育・繁殖させ、倫理委員会承認をうけたものである。

スナネズミをフローセン・ガスによる全身麻酔下に、両側総頸動脈を血管クリップで同時に 10 分間閉塞して脳血流を遮断した後、圧迫を除去して血流を再開させた。手術中及び回復時の直腸温を 36.5 ~ 37.5°C で維持

するため、術中及び術後 3 時間まではヒートマット上でネズミを回復させた。そして、再灌流後 1 日目、3 日目および 7 日目に、再び麻酔したネズミを断頭して脳組織を摘出した。摘出した新鮮脳は Glowinski の方法¹¹⁾ に従って 7 部位に分割して海馬を取り出し、生化学分析まで -80°C で凍結保存した。

bcl-2 と Bax 遺伝子タンパク質発現量の測定

スナネズミの海馬組織 CA1 領域を 50mM Tris-HCl buffer, pH7.4 (5mM EDTA, 0.1mM leupeptin, 1mM pepstatin A, 1mM PMSF, 1% SDS を含む) 中で氷冷下にホモジネートした。この試料を 13,000 × g で 20 分間遠心して、その上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。ゲル濃度は 15%、ゲル 1 枚当たり 50mM の直流電流を約 1 時間流した。さらに一次元でタンパク質を電気泳動したゲル標本を PVDF 膜に密着させ、タンパク質分画を PVDF 膜に転写した。その膜を一時抗体として抗 bcl-2 抗体 (1,000 倍希釈, MBL)、抗 Bax 抗体 (500 倍希釈, MBL) 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (1,000 倍希釈, MBL) で処理して免疫染色を行った。bcl-2 陽性バンドの検出法として ECL 法を用いて、PVDF 膜と X 線フィルムを密着させ感光させた後に免疫陽性タンパク質バンドを検出した。得られたタンパク質バンドの濃度の解析は Epson ES-8000 で取り込んだタンパク質像を NIH image 1.55 を用いて、Excel2000 で処理した。数値は全て平均値 ± 標準偏差で表した。

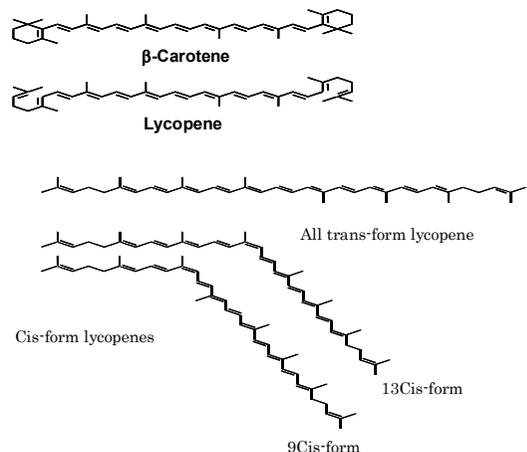


図 1 カロテノイドの化学構造

β -Carotene はイオン環を有しビタミン A 活性を示すが、Lycopene は環構造を持たず、ビタミン A 活性を有しない。

Superoxide dismutase (SOD) 活性の測定

脳組織湿重量40mgに対して超純水0.50mlを加えて、ガラス・ガラス微小ホモゲナイザー中で磨砕し、組織 homogenate を作成した。この組織の0.25mlを密閉式超音波細胞破碎装置 (Bioruptor, コスモバイオ社製) にかけて、冷却しながら組織片を破碎・均一化した。これに冷却したエタノール/クロロホルム混合液 (62.5ml/37.5ml) 0.4ml加えて、よく攪拌した。その試料を0°Cで、3,000rpm, 10分間遠心分離して得られた上清を酵素飼料として使用し、そのSOD活性値を測定した。SOD活性値は、McCordとFridovichの方法¹²⁾に基づいて調整されたSOD測定キット (SOD-525: BIOXYTECH, France) を用いて、比色定量した。

タンパク質の定量

抽出した脳組織中のタンパク質含量は、組織を磨砕して作製したホモジネート中のタンパク質含量を測定した。牛血清のアルブミンを標準試料として、Bradfordの方法¹³⁾に従って比色定量した。

組織中リコピン含有濃度の測定

血清中、肝臓中に含まれるリコピン含有濃度の定量は、HPLC (high-performance liquid chromatography) を用いて行った。採取した血清に内部標準物質としてβ-carotene溶液を加えた後、0.01%butyrate hydroxytolueneを含むethanol溶液および混合溶液 (hexane:dichloromethane =4:1, v/v) を加えた。攪拌後、遠心分離を行い、上清を回収し、さらに混合溶液 (hexane:dichloromethane =4:1, v/v) を加え同様に上清を回収した。得られた上清を蒸発乾固させた後、混合溶液 ((hexane:acetone:ethanol:toluene =10:7:6:7, v/v/v/v)/ethanol=4:6, v/v) に再溶解し、フィルターろ過したものをHPLC分析に供した。抽出した肝組織は0.01%butyrate hydroxytolueneを含むethanol溶液および0.5% diethylenetriamine pentaacetic acidを含む0.9% NaCl溶液の混合液中でホモジナイズした。ホモジネート液に60% KOH溶液を添加し、50°C, 30分ケン化処理を行った。これに内部標準物質としてβ-carotene溶液を加え、その試料を混合溶液 (hexane:dichloromethane =4:1, v/v) 中で2回抽出を行った。遠心分離によって得られた上清を蒸発乾固させた後、hexane/acetone/ethanol/toluene (10:7:6:7, v/v/v/v) 溶液に再溶解し、フィルターろ過したものをHPLC分析に供した。

HPLC分析にはC30 carotenoid column (250×4.6 mm, 5 μm : YMC, Wilmington, NC) を用いた。溶離液は、A)methanol/tert-butyl-methyl-ether/water =75:25:10, B)methanol/tert-butyl-methyl-ether/water =8:90:2を用い、溶離液A100% (0分) →溶離液B100% (25分) →溶離液B100% (28分) →溶離液A100% (30分) の条件でグラジエント分析を行い、PDA検出器 (検出波長460nm) により測定した。

統計処理

脳虚血負荷後・再灌流時の組織での分析にはANOVA (Post hoc test) 検定を用いて、危険率5%未満を有意差ありとした。各図に示すデータは、スナネズミの脳10~12匹の平均値である。

2. 結果

図2は生後3週目で離乳した後のスナネズミのリコピン摂取量の変化を示している。1匹当たり、1日のリコピン摂取量は生後30日目では111.3±12.0 μg, 生後60日目では226.3±17.1 μgであり、成長に伴って徐々に増加した。また、脳虚血負荷・再灌流後のリコピン摂取量 (右側の図) は、1日目は0.42±0.13 μgと少なく、3日目は2.42±0.57 μg, 7日目は4.93±0.65 μgと回復に伴って徐々に増加した。

図3は脳虚血負荷・再灌流後の海馬組織内 bcl-2タンパク量の変動を示している。これは細胞障害を抑制する作用を持つ遺伝子タンパク質である。リコピン非摂取群では著明に減少したが、リコピン摂取群は術後1日目で107.1±12.9%, 7日目では117.6±13.6%と漸増傾向を示し、両群間に統計的な有意差を認めた。

図4は細胞障害を進行させるBaxタンパク質の変動を示している。リコピン非摂取群では増加傾向がみられ、リコピン摂取群では逆に減少傾向が観察された。

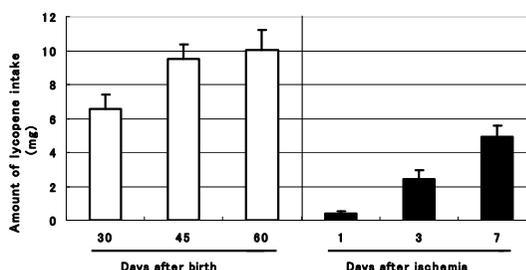
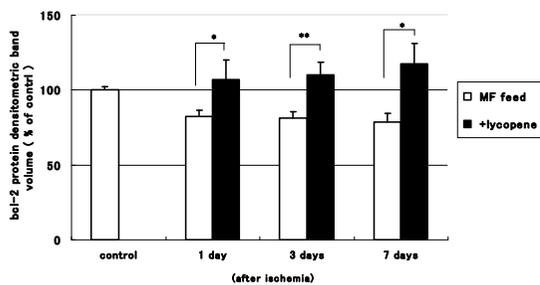


図2 スナネズミのリコピン摂取量の変化



*:p<0.05 **:p<0.01

図3 脳虚血負荷・再灌流後の海馬組織内 bcl-2タンパク量の変動

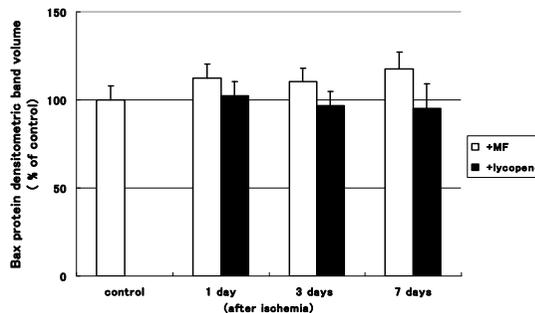


図4 脳虚血負荷・再灌流後の海馬組織内 baxタンパク量の変動

が、統計的に有意な差ではなかった。

図5は細胞障害性をもつ活性酸素の消去反応を触媒するSOD活性値である。リコピン非摂取群は3時間後にSOD活性が低下したが、リコピン摂取群ではSOD活性の低下が有意に抑制された。また、再灌流後1日、3日後においてもリコピン摂取群の方が有意に高い値を示した。図6、図7は経口摂取されたリコピンの生体内蓄積量（濃度）を示している。

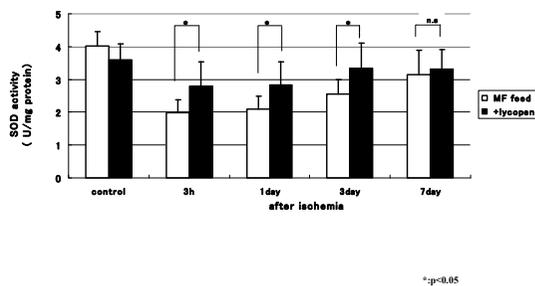
3. 考察

虚血・再灌流後の生体内各臓器での活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の発生を抑制することは、術後における予後のQOLに大きな影響を与えることから、さまざまな酸化ストレス抑制効果が報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。私達の生体では、呼吸によって取り入れられた酸素(O₂)の90%以上はミトコンドリア電子伝達系:チトクロームオキシダーゼにより、1つのO₂分子にそれぞれ4分子の電子(e⁻)が順次加わって最終的には2分子の水(H₂O)になる。この反応はチトクロームオキシダーゼ系の酵素に常に結合したまま反応が進むので、O₂が1電子還元されたスーパーオキシドアニオンの電子伝達系からの漏出はきわめて少量で、健康な状態では、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を中心とする防御機構によって直ちに消去される。そして、残りの数%はROSを生成する。ROSにはスーパーオキシド(O₂⁻)、過酸化水素(H₂O₂)、ヒドロキシルラジカル(・OH)などがあげられるが、これらは生体に存在する消去システムによって通常は水にまで還元される。

しかし、炎症や虚血時には神経細胞内のカルシウム

レベル([Ca²⁺])が上昇するため、ミトコンドリアはカルシウムを過剰に蓄積し、その結果電子伝達系の機能低下によるATPの合成障害が起こり、ROSが過剰に発生する。同時にミトコンドリア内膜と外膜の間に局在する電子伝達系の1つであるシトクロムcが細胞質へ放出され神経細胞死を誘導するシグナルとなる。また、脳のミクログリア細胞はこれらシグナルや感染微生物に対する防御のため、O₂⁻を分泌することが知られている。さらに、脳は細胞膜成分の不飽和脂肪酸や神経伝達物質であるカテコールアミンなどの容易に酸化されやすい物質を豊富に含んでいることもあって、脳虚血・再灌流後の大量の活性酸素が異常発生するような場合には、非常に障害を受けやすい。

今回の実験では、スナネズミの脳虚血・再灌流後の神経細胞内bcl-2タンパク質量は、リコピン非摂取群では顕著に減少し、リコピン摂取群では増加傾向が観察されている。bcl-2タンパク質と異なり、細胞障害を進行させる作用を持つBaxタンパク質の変動をみると、リコピン非摂取群では増加傾向がみられ、リコピ



*:p<0.05

図5 脳虚血負荷・再灌流後の海馬組織内 SOD 活性値

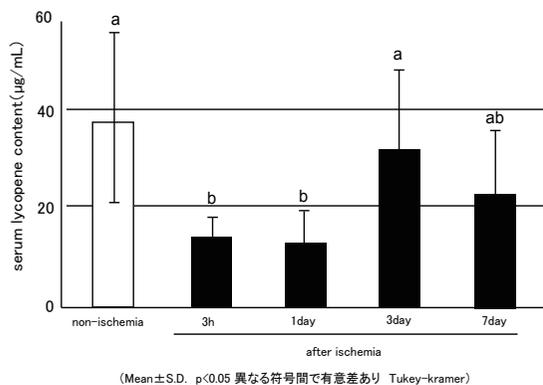


図6 脳虚血負荷前と虚血・再灌流後の血清中リコピン濃度

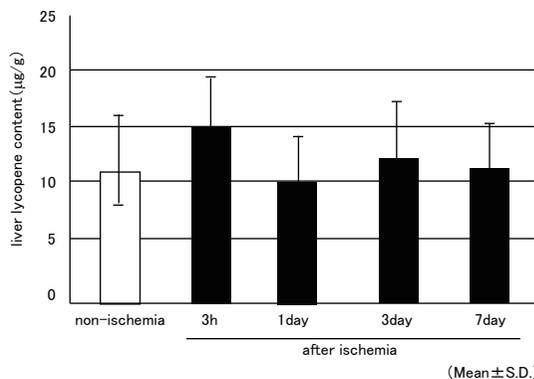


図7 脳虚血負荷前と虚血・再灌流後の肝臓中リコピン濃度

ン摂取群では逆に減少傾向が観察されている。これはリコピンを摂取することによって神経細胞死を抑制している可能性が考えられる。Hsiaoら¹⁶⁾は、体重250g~300gのラットに一時間の中大脳動脈の血流阻止を負荷する15分前と再灌流15分前に、20%Tween80に溶解した2ないし4mg/100gのリコピンを投与する研究を報告している。その結果、再灌流後24時間で摘出した脳では、4mg/100g量のリコピン投与によって障害部位の面積が有意に減少している事を認めている。彼らの実験では、脳虚血・再灌流負荷前2回のリコピン投与であったため、私達の長期間の投与実験とはリコピンの摂取量が大きく異なっているが、経口摂取されたリコピンが体内の血流に入り脳虚血・再灌流後の神経細胞死を抑制するという結論と一致する。

Yokotaら¹⁷⁾によると、リコピンが活性酸素を消去し、無毒化するメカニズムとしてリコピン分子が分解されるのではなく、異性化される反応が進んで、それによってROSが消去される機序が存在していることを報告している。この機序は、リコピン分子構造がトランス型からシス型へ、またシス型からトランス型への双方向反応過程で有効であり、この場合リコピン分子の分解を伴わないことから、きわめて効率のよい相互転換反応であると考えられている。これらのことから、生体内に取り込まれたリコピンは、リンパ管経由で体内循環系に入り、生体内のSODなどの抗酸化酵素活性を高めることで、過剰に発生する活性酸素を消去し、神経細胞死を抑制している可能性が大いに期待される。また、一方で、生体内に取り込まれたリコピンによって直接的に活性酸素が消去されている可能性

も考えられる。

4. 結語

リコピンを経口摂取させたスナネズミに脳虚血負荷による遅発性神経細胞死を起こさせ、虚血・再灌流後に発生する活性酸素が、生体内に取り込まれたリコピンによって進行する神経細胞死を抑制する過程を検討した。

- 1) 細胞障害を抑制する働きを持つ遺伝子タンパク質である bcl-2タンパク質は、リコピン摂取群では有意な増加がみられた。逆の働きをする Bax タンパク質は、有意差は認められなかった。
- 2) 細胞障害を誘発する活性酸素の消去反応を触媒する SOD 活性値は、リコピン摂取群では非摂取群と比較して3時間、1日、3日目で有意に高値を示し、血清中のリコピン濃度は虚血・再灌流後に低値を示した。肝臓中リコピン濃度には変化はみられなかった。

以上の結果から、スナネズミが離乳直後から経口摂取したりコピンによって生体内の抗酸化能が高められ、海馬組織で虚血・再灌流後に発生する神経障害を抑制・軽減できることが明らかになった。

リコピンを含まない通常飼料を摂取しているネズミの肝臓内からリコピンは検出されず、リコピンは食事由来のものが吸収・蓄積されたものと考えられる。これはリコピンを含む食品を摂取することの重要性を示唆するものである。

文献

- 1) Kiho T, Usui S, Hirano K, Aizawa K, Inakuma, Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(1), 200-205 (2004).
- 2) Aizawa K, Matsumoto T, Inakuma T, Ishijima T, Nakai Y, Abe K, Amano F, Administration of tomato and paprika beverages modifies hepatic glucose and lipid metabolism in mice: A DNA microarray analysis. *J Agric Food Chem*, 57, 10964-10971 (2009).
- 3) Wei Y, Shen X, Shen H, Mai J, Wu M, Yao G, Effects of lycopene on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Hygiene Res*, 39(2), 201-204 (2010).
- 4) 芳本信子, 食べ物じてん, 2版, 学建書院, 20-24 (2011).
- 5) 藤田公和, 芳本信子, 加藤寿章, 今田秀己, 柴山健三, 松本 岳, 稲熊隆博, 宮地栄一, スナネズミが経口的に摂取した植物由来リコピンは脳虚血・再灌流負荷後に海馬組織で発生するアポトーシスを抑制する, 藤田学園医学会誌, 31(2), 203-207 (2007).
- 6) Aizawa K, Iwasaki Y, Ouchi A, Inakuma T, Nagaoka S, Terao J, Mukai K, Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts. *J Agric Food Chem*, 59(8). 3717-3729 (2011).
- 7) 平松 緑, フリーラジカルスキャベンジャーによる脳神経疾患の予防と治療. *J Act Oxyg Free Rad*, 4, 641-647 (1993).
- 8) 山西倫太郎, カロテノイドが免疫系に及ぼす影響. *化学と生物*, 47(11), 764-771 (2009).
- 9) Das S, Otani H, Maulik N, Das DK, Lycopene, tomatoes, and coronary heart disease. *Free Radic Res*, 39, 449-455 (2005)
- 10) Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, Arya DS, Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 289, 1-9 (2006).
- 11) Glowinski J, Iversen LL, Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H] norepinehrine, [3H] dopamine and [3H] dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*, 13. 655-669 (1966).
- 12) McCord JM, Fridovich I, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte superoxide reductase (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244. 6049-6055 (1969).
- 13) Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72. 248-254 (1976).
- 14) 浅野孝雄, 脳虚血とフリーラジカル. *脳神経*, 55(3). 201-213 (2003).
- 15) 庄司 剛, 肺移植における虚血再灌流障害とフリーラジカル, <http://kaken.nii.ac.jp/ja/searchk.cgi> より2010年9月26日検索.
- 16) Hsiao G, Fong T.H, Tzu NH, Lin K H, Chou D S, Sheu J R, A potent antioxidant, Lycopene, affords neuroprotection against microglia activation and focal cerebral ischemia in rats. *In Vivo*, 18, 351-356 (2004).
- 17) Yokota T, Ohtake T, Ishikawa H, Inakuma T, Ishiguro Y, Terao J, Quenching of peroxynitrite by lycopene in Vitro. *Chemistry Letters*, 33(1), 80-81 (2004).