

田七杜仲精の研究内容：

<実例報告> <専門誌掲載>

「早老マウスの肝臓及び腎臓におけるレドックス状態の 障害植物療法剤DTSの有効性」

老年医学国際協会 第6回ヨーロッパ学会

2007年7月5～8日 ロシア

Marotta F^{a,d}, Harada M^b, Ono-Nita SK^c, Minelli E^a, Marandola P^d

^a バイオテクノロジー・伝統医学WHOセンター、ミラノ大学（ミラノ、イタリア）、^b MCH
病院（東京、日本）、^c 肝消化器病学部、サンパウロ大学（サンパウロ、ブラジル）、

^d スカルパ - G. A. I. A. エイジ・マネージメント基金（パヴィア、イタリア）

〔要旨〕

T迷路テストで選別した早老マウス（PSM）を、（A）30日間にわたりDTS(150mg/kg)を経口投与した群と（B）年齢にマッチしてT迷路テストを迅速に完了した、治療を行わない対照群とに分けた。マウス屠殺後、肝臓及び腎臓のカタラーゼ（CAT）活性、グルタチオン・ペルオキシダーゼ（GP_x）、スーパーオキシド・ディスムターゼ（SOD）、マロンジアルデヒド（MDA）、血漿チオールについて分析を行った。治療を行わないPSM群では、血漿チオールの減少や組織中のCAT、SOD、GP_xの各値の低下、及びMDAの上昇（迷路テスト迅速完了群に対して $P < 0.01$ ）が認められたが、DTS（田七 - 杜仲 - 精）の投与によってグルタチオン、システイン（ $P < 0.05$ ）、組織中の上記のパラメーターの濃度（ $P < 0.05$ ）は有意に改善した。こうした予備的データは、DTSの投与によってPSMの酸化障害が軽減することを示唆するものであり、DTSは細胞質やミトコンドリア内腔のマトリックスに作用することが考えられる。

キーワード：早老マウス；酸化ストレス；DTS

〔はじめに〕

田七杜仲精の研究内容：

老化のプロセスは、蛋白結合チオール値と関連する抗酸化能の低下や、活性酸素種（ROS）によるDNA、蛋白質、脂質、小細胞分子の酸化修飾と関連性がある。特に、チオール化合物（システイン80%、グルタチオン17%、ホモシステイン2~3%）は、細胞内や細胞外のレドックス（酸化還元）バッファー能を調節する主たる要因として相応の役割を担っている。組織中のGSH値の低下もまた、免疫の低下や老化の進行と関係し、ガン発生のリスクを増大させるとみられている。De la Fuenteら¹は最近、T迷路テストを明快なパラメーターとして用いた実験で、免疫障害及び迅速にテストを完了した同一齢マウスと比べ寿命が短いなどの明らかな早老の特徴が一部マウスに見られることを確かめている。本研究では、Balb-cマウス（近交系マウスの一種）に同様の方法を用い、インハウスの実験の予備的データから有意の抗酸化/抗炎症効果のあることが確かめられている新しい機能性食品（ニュートラシューティカル）を、論文²⁻⁶に従ってテストすることを目的とした。

[研究材料及び方法]

Balb-cマウス（25~30g）は常態下で繁殖させ、気温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、無菌環境で12時間ごとの明暗サイクル下で飼育し、食餌と水は随意に与えた。70週齢のときから、T迷路テストを週1回、4週にわたり実施し、最大配分時間（60秒）内に常にテストを完了させることができなかったマウスを早老マウス（PSM）とした。100%と0%をそれぞれ含め、「早」組と「遅」組を手に入れるために、中間成績のマウスは除外した。これにより、早老マウス（PSM）計28匹と非早老マウス（NPSM）計26匹を選別した。PSMは、標準食を4週にわたり投与したA群と、標準食に加え1日に体重kgあたり150mgのDTS（田七人參、杜仲、朝鮮人參の根。漢方養生研究所（東京、日本）の好意により寄贈された）を追加投与したB群に分けた。4週にわたる投与研究の後、ただちに肝臓と腎臓を摘出し、組織は分析を行うまで -80°C で保存した。組織の一部は、SOD測定のために用いられる標準方法によって細胞質ゾルとミトコンドリアの分画を分離するために使用した。

[植物療法剤の準備]

品質管理手続きや国際標準化機構ISO9001及び14001の規制下で製造されているDTSは、漢方養生研究所（東京、日本）の好意で寄贈を受けた。この物質は、中程度の硬さの細かい顆粒状で、味もよく、容易に食物と混ぜることができる。

[血漿分析]

総チオール値は、遊離（型）分画や蛋白結合（型）分画とともに、2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborateでプリカラム誘導体化した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC法）で測定

田七杜仲精の研究内容：

し、サンプルは水素化ホウ素ナトリウムで還元した。

[肝臓及び腎臓の組織分析]

カタラーゼ活性は、 H_2O_2 の利用速度を測ることにより、波長240nmで測定を行った。 H_2O_2 のモル吸光係数は43.6M/cm。1分間に1 μ molの H_2O_2 を利用する酵素の数を1活性ユニットとした。

グルタチオン・ペルオキシダーゼ (GP x) 活性は、分光光度法によって波長340nmで測定し、1分間にGSH 1 μ molをカバーする酵素の数を1活性ユニットとした。

グルタチオン・レダクターゼ活性は、分光光度法によって波長340nmで測定し、1分間にGSSG 1 μ molを還元する酵素の数を1活性ユニットとした。

スーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) 活性は、ニトロテトラゾリウム・ブルーの還元速度として、波長560nmで測定を行い、標準の条件下でニトロテトラゾリウム・ブルーの還元を50%阻害するのに要した蛋白質の量を1活性ユニットとした。

[マロンジアルデヒドの測定]

肝臓と腎臓の組織中のマロンジアルデヒド (MDA) は、分光光度法によって定量化し、チオバルビツール酸 (TBA) 濃度はMDA - TBA複合体の吸収係数によって算出し、nmol/mLとして表わした。

[統計的評価]

統計分析のため、まず始めに正規性を調べたところ、パラメーターの一部の値が正規分布に当てはまらないことがわかった。そのため、クラスカル=ウォリス検定やマン=ホイットニーのU検定といったノンパラメトリックな検定法を用いて各グループを比較した。

[結果]

血漿チオール分析

同一齢マウスと比較して、NPSM群のマウスでは、統計的に有意の総血漿チオール値の低下 (30~33%の低下、 $P < 0.01$) が認められ、チオールの個々の構成要素はすべて影響を受けていた (データなし)。このパラメーターは、DTSの投与により、完全とはいえないまでも (17~23%の上昇) 有意に改善し (NPSM群に対して $P < 0.05$)、さらなる分析の結果、チオール構成要素としてのグルタチオン及びシステインが有意に改善したことが確認された (データなし)。チオー

田七杜仲精の研究内容：

ルの遊離・結合比を見ると、PSM群のマウスではこの比率が統計的に高いことが判明（NPSM群に対して $P < 0.05$ ）しており、このパラメーターにDTS治療による影響はなかった。

肝臓及び腎臓の組織分析

両組織中の細胞質ゾル分画を検査したところ、抗酸化酵素の活性に変化は認められなかった。NPSM群と比較して、PSM群では有意の修飾が数多く認められた（ $P < 0.01$ ）。すなわち、GSHの減少（組織1gあたり、単位 μmol ：肝臓で 4.7 ± 0.02 対 5.4 ± 0.02 ；腎臓で 2.9 ± 0.09 対 4.1 ± 0.04 ）、GSH-Pxの減少（タンパク質1mgあたり、単位U：肝臓で 148 ± 7.3 対 163 ± 8.3 ；腎臓で 135 ± 3.6 対 168 ± 5.7 ）、GSH/GSSG比の低下（両組織とも25～40%）である。これらのパラメーターは、DTS投与によって完全ではないが有意（ $P < 0.05$ ）に改善し、GSHレドックス $GSSG/(GSH + GSSG) \times 100$ として表わされるGSHレドックスは正常に戻った（ $P < 0.05$ ）。表1に示した通り、検査を行った酸化/抗酸化パラメーターは、腎臓のSODを除き、DTSの投与によって改善した（ $P < 0.05$ ）。垂細胞の分析の結果、PSM群においては細胞質ゾルのSODに有意の変化はなかったものの、ミトコンドリア区画は、検査した両組織中とも有意に枯渇していることが判明した（タンパク質1mgあたり、単位ユニット：肝臓では 7.4 ± 2.7 対 12.6 ± 1.4 ；腎臓では 6.5 ± 1.0 対 10.6 ± 0.9 ）。両パラメーターとも、DTSの投与により不完全ながら改善した（蛋白質1mgあたり、単位ユニット：それぞれ 11.2 ± 1.1 と 9.8 ± 0.7 、 $P < 0.05$ ）。

[結論]

表1. DTS投与によるカタラーゼ、SOD、MDAへの影響（対照群とPSM群の比較）

群	カタラーゼ	SOD	MDA
単位	蛋白質1mg中U	蛋白質1mg中U	蛋白質1mg中 nmol
肝臓			
NPSM/balb-c	276 ± 6.4	25.6 ± 3.32	55 ± 55
PSM			
未治療	$255 \pm 5.8^*$	24.7 ± 2.82	$0.83 \pm 0.06^*$
+DTS	$271 \pm 5.8^{**}$	24.9 ± 2.01	$0.62 \pm 0.02^{**}$
腎臓			
NPSM/Balb-c	187 ± 6.9	18.9 ± 2.66	0.21 ± 0.01

田七杜仲精の研究内容：

PSM

未治療	164 ± 4.1*	16.4 ± 3.21*	0.32 ± 0.03*
+DTS	171 ± 5.1*	18.0 ± 3.42**	0.26 ± 0.02**

*NPSM群に対してP<0.01。 **未治療PSM群に対してP<0.05。

老化は、抗酸化物質として最も適当なグルタチオンの値の低下、システイン値の低下とも関連している。グルタチオン値やシステイン値の低下は、必要量が増加する一方でGSHの生合成が阻害されるという両方の結果と考えられる。ことに、グルタチオンは生体細胞の重要な防御機構の役割を担っており、GSHは抗酸化酵素グルタチオン・ペルオキシダーゼの基質として、代謝や他のROSの反応を通じて形成されるペルオキシダーゼの有害な影響から細胞成分を守る働きをしている。したがって、チオール・ジスルフィド比の変化（すなわちチオール・レドックス状態の変化）は、細胞内や細胞外の蛋白質の構造や機能に有意の影響を与えることになる。前段に記したような選別規準を採用して1して早老の特徴を有するマウスを調べたところ、酵素の抗酸化機構がアンバランスを来し、そのためにレドックス状態に欠損が生じていることが分かった。こうしたマウスでは特異的な免疫障害が認められている¹が、持続的な酸化ストレスによる細胞高分子や細胞機能への影響が、行動的反応の鈍さや短命を引き起こす、さらなるメカニズムである可能性が高い。一方、抗酸化物質のチオプロリンまたはN-アセチルシステインへの介入が免疫機能を有意に改善させることが、同グループによって示された⁷。とはいえ、PSM群へのDTS投与により、H₂O₂産生の程度を示すGSHレドックス比が低下するとともに内因性GSH値の上昇が観察されたことは、この機能性食品がGSH/GSSGレドックス状態の調節に直接作用する一方で、グルタチオン・レダクターゼ活性も高進させる可能性があることを示唆している。ことに、ミトコンドリア分画のSOD活性は有意に改善した。

興味深いことに、本研究の目的からは逸れるが、DTSに含まれるサポニンの一部に免疫学的なプラス効果や有効な抗炎症性特性があるらしいことが分かっている^{8,9}。老化促進モデル・マウスは老化研究における調査の貴重な源泉だが、正常固体マウスの現在のモデルは、臨床指向の治療介入に敏感に反応する可能性のある「生理学的」老化プロセスに有益なヒントを与えてくれるかもしれない。DTSの作用機序に関しては、より詳細な研究が進められているが、その中心的構成成分の多様性¹⁰から考えても、DTSは高齢者の機能性食品として有望といえるようだ。