

## 特異的分析法に基づく生体内酸化ストレス評価法

Methodology to evaluate oxidative stress in vivo based on specific determinations

(日本農芸化学会推薦)

研究代表者 奈良女子大学 小城 勝相 Nara Women's University Shosuke Kojo  
共同研究者 奈良女子大学 市 育代 Nara Women's University Ikuyo Ichi

As a model of oxidative stress, thioacetamide (400 mg/kg body weight) was administered to rats. After 12 h plasma GOT and GPT were significantly higher than that of the control group. These results indicated that the necrotic process was initiated at about 12 h and developed thereafter. By co-administration of dimethyl sulfoxide (DMSO, 18 and 1 h before, and 8 h after administration of thioacetamide: each time, 2.5 ml/kg body weight, p.o.), plasma GOT and GPT were even comparable to the control group, showing that DMSO totally prevented the necrotic action of thioacetamide. After 12 and 24 h of thioacetamide administration, the hepatic level of vitamin C, the most sensitive chemical indicator of oxidative stress, decreased significantly, indicating that oxidative stress was significantly enhanced 12 h after thioacetamide intoxication and thereafter. DMSO totally restored the liver vitamin C level, demonstrating that DMSO effectively ameliorated the oxidative stress caused by thioacetamide, resulting in the prevention of necrosis of the liver. Phosphorylated c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and significantly increased transiently 12 h after treatment with thioacetamide. Phosphorylated extracellular signal-related kinase (ERK) 2 was significantly increased 6-12 h after thioacetamide injection. DMSO treatment inhibited the change of these MAPKs by thioacetamide.

## 研究目的

活性酸素による酸化ストレスは老化を初め、癌、動脈硬化などの生活習慣病の原因と考えられている。活性酸素の働きを食品成分によって阻害することができれば健康食品として有用である。現在 500 種を越える特定保健用食品が市販されているが、その中に抗酸化作用を標榜するものは1つも無い。その最大の理由は生体内の酸化ストレスを正確に評価する方法が存在しないためである。

我々はこれまで、四塩化炭素、チオアセトアミド、D-ガラクトサミンの3つの化学物質による肝炎をモデルとして、酸化ストレスを化学的に評価する研究を行ってきた。この目的のために、脂質ヒドロペルオキシドとビタミンCの特異的高感度測定法を開発してきた。酸化反応で増加し酸化を推進する脂質ヒドロペルオキシドと酸化反応を阻害するビタミンC、Eの変化から肝細胞壊死との関係を研究してきた結果、肝臓で最初に変化するものがビタミンCであることが明らかになった。即ち、ビタミンCは肝臓における酸化ストレスの最も鋭敏な指標であることが判明した。

一方、酸化ストレスの亢進によってどのように細胞死が引き起こされるのかを調べることによって、酸化ストレスの生理的意味やシグナルネットワークがわかるとともに、食品成分による抗酸化活性を評価する上で多くのパラメーターを提供することになる。本研究では、酸化ストレスによるMAPK (Mitogen-activated protein kinase)活性化を動物実験によって検証し、酸化ストレスとの関係を検討した。

MAPKは細胞増殖、アポトーシスなどの細胞内シグナル伝達を行うことで注目されているタンパク質キナーゼで、それら自身が上流のタンパク質キナーゼによるリン酸化で活性化される。MAPKの代表的なものが、JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase)、ERK (extracellular signal-related kinase)、p38 MAPKと呼ばれる3種類である。MAPKの研究は培養細胞を用いたものがほとんどであり、動物組織での活性化を扱った研究は少ない。MAPKは活性酸素種(ROS)によっても活性化されるといわれているがROSとの関係について、その時間経過を検討した例すら少数の研究以外は見あたらない。

本研究では、我々が見つけた、酸化ストレスによってCaspase-3活性化を伴うアポトーシスと広汎な壊死が引き起こされるチオアセトアミド中毒のラット肝における酸化ストレスとMAPKの関係について時間経過を含めて検討した。肝臓の酸化ストレスの評価には一連の研究で最も鋭敏と考えられるビタミンCを用いた。

さらに経口投与した抗酸化剤が化学物質による肝臓での酸化ストレスを軽減する可能性を検討するため、まずは抗酸化剤であり大量投与が可能で毒性の低いジメチルスルホキシド(DMSO)でその可能性を検証した。

## 研究経過

ラット腹腔にチオアセトアミド(400mg/kg)を投与した。血漿GOT、GPTは6時間後には生理食塩水を投与した対照群と比較して変化はないが12時間後、有意に上昇し24時

間後に最大値に到達した。肝臓のビタミンCは投与6時間後には変化はなく、12時間後に対照群の60%まで有意に低下し、24時間後には対照群の30%まで低下した。この結果は投与12時間以降、肝臓に酸化ストレスが亢進していることを示した。チオアセトアミド投与の18、1時間前と8時間後の3回DMSOを2.5ml/kg経口投与（チオアセトアミドのみを投与したラットには比較のため同じ時間に水を2.5ml/kg経口投与）すると、12、24時間後のGOT、GPTの上昇もビタミンCの減少も完全に抑制された。

Table 1. Change in plasma GOT and GPT and liver concentrations of vitamins C and E

	Control	6 h		12 h	
		Thioacetamide	Thioacetamide +DMSO	Thioacetamide	Thioacetamide +DMSO
GOT (Karmen units)	84.7±29.5 <sup>a</sup>	118.9±31.6 <sup>a</sup>	96.8±40.2 <sup>a</sup>	515.9±150.4 <sup>b</sup>	125.3±38.8 <sup>a</sup>
GPT (Karmen units)	38.7±22.8 <sup>a</sup>	48.0±16.0 <sup>a</sup>	41.5±19.1 <sup>a</sup>	107.7±42.6 <sup>b</sup>	36.4±10.7 <sup>a</sup>
Vitamin C (nmol/g liver)	1971.2±259.2 <sup>a</sup>	1994.6±110.8 <sup>a</sup>	2138.7±136.8 <sup>a</sup>	1177.7±234.7 <sup>b</sup>	2283.4±141.0 <sup>a</sup>
Vitamin E (nmol/g liver)	35.0±3.6 <sup>a</sup>	36.2±5.6 <sup>a</sup>	34.4±5.2 <sup>a</sup>	38.2±3.7 <sup>a</sup>	40.4±6.0 <sup>a</sup>

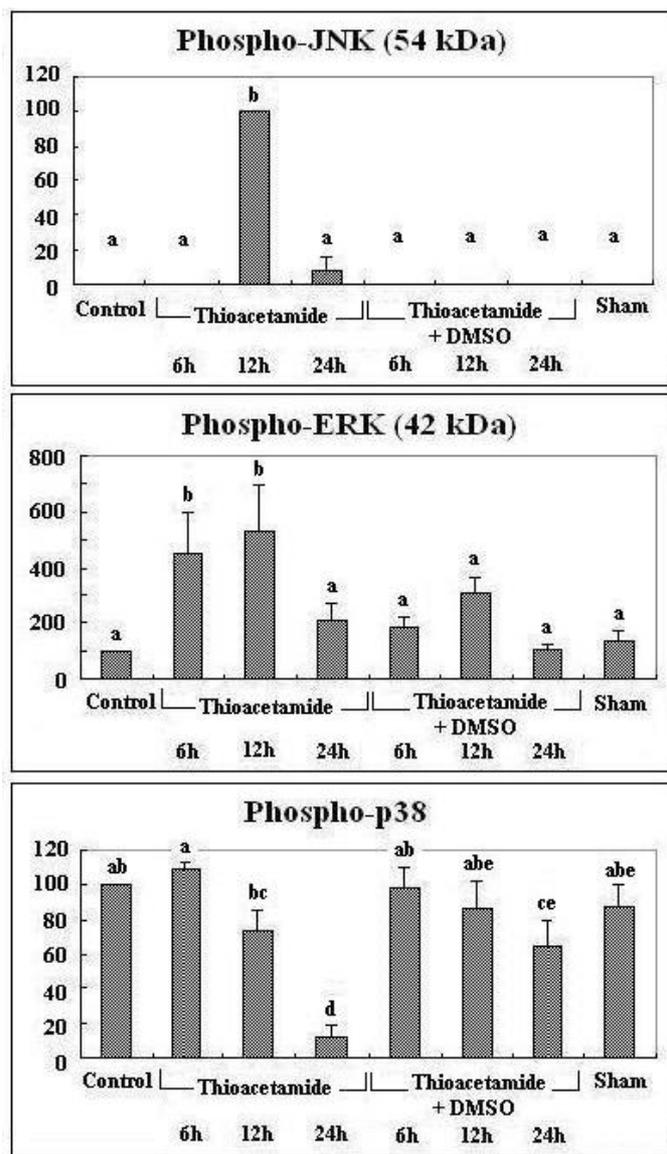
	24 h		Sham
	Thioacetamide	Thioacetamide +DMSO	
GOT (Karmen units)	4878.3±1170.5 <sup>b</sup>	95.9±38.5 <sup>a</sup>	60.8±4.9 <sup>a</sup>
GPT (Karmen units)	1677.8±158.9 <sup>b</sup>	37.1±9.0 <sup>a</sup>	30.9±5.1 <sup>a</sup>
Vitamin C (nmol/g liver)	649.7±304.4 <sup>b</sup>	1888.7±170.7 <sup>a</sup>	1914.6±153.9 <sup>a</sup>
Vitamin E (nmol/g liver)	32.2±3.3 <sup>a</sup>	34.9±2.4 <sup>a</sup>	42.5±5.2 <sup>a</sup>

細胞死を引き起こすとされるJNKのリン酸化はビタミンCが減少するチオアセトアミド投与12時間後に有意に亢進した。この結果は酸化ストレスの亢進とJNK活性化がほぼ同時に起こることを意味している。リン酸化されたp38 MAPKはチオアセトアミ

ド投与後24時間で有意に減少した。

一方、生存シグナルと考えられているERK2はチオアセトアミド投与後6-12時間の早い段階でリン酸化が亢進していた。投与6時間後はビタミンCに変化が現れる以前である。

Fig. 2. Densitometry of phospho-MAPK in the livers of the control, sham, thioacetamide, and thioacetamide+DMSO groups.



DMSOはチオアセトアミドによる上記MAPKの変化を全て有効に阻害した。

### 考察

チオアセトアミド投与と同時にDMSO経口投与すると、12、24時間後のGOT、GPTの上昇もビタミンCの減少も完全に抑制された。DMSOは以前からラジカル捕捉剤として知られており、ビタミンCの減少が抑制されたという結果はこれを支持する。即

ち DMSO が酸化ストレスを軽減した結果、肝細胞壊死が抑制されたと考えられる。

JNKのリン酸化はビタミンCが減少するチオアセトアミド投与12時間後に有意に亢進し、酸化ストレスの亢進とJNK活性化がほぼ同時に起こることを意味している。酸化ストレスがJNKを活性化する原因であるとしても結果をもたらすまでに迅速な反応が起こっており、両者は緊密にリンクしていることをうかがわせる。リン酸化された p38 MAPKはチオアセトアミド投与後24時間で有意に減少した。JNKとp38 MAPKは似た挙動をすることが多くの研究で知られているが、チオアセトアミド中毒の肝臓では調節機構は異なることがわかった。

一方、生存シグナルと考えられているERK2はチオアセトアミド投与後6-12時間のビタミンCに変化が現れる以前の早い段階でリン酸化が亢進していた。MAPKの活性化と酸化ストレスを定量的に扱った研究は少ないが、培養ラット肝細胞を用いた実験でERK2は100 $\mu$ Mの過酸化水素で活性化されることがわかっている。肝臓でのビタミンCの濃度は2,000 $\mu$ Mであり、100 $\mu$ Mの変化を検出することは困難である。化学的指標の中ではビタミンCは鋭敏であるが、100 $\mu$ MのROSで反応するERK2はビタミンCよりも鋭敏な酸化ストレス指標になるかもしれない。

過酸化水素は、タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) を可逆的に阻害する。PTPは活性中心に反応性の高いシステイン残基を持つので、過酸化水素で定量的に酸化される。酸化型に酵素活性はなく、結果としてタンパク質の脱リン酸化が阻害され、特定のリン酸化タンパク質が蓄積する。これと類似の反応性を持つタンパク質がERK2のリン酸化に関与するようであれば、少量のROSにも迅速に対処できるだけでなく大量に存在するビタミンCより結果として鋭敏な指標になることは十分考えられる。

DMSO はチオアセトアミドによる MAPK の変化を全て有効に阻害した。DMSO が抗酸化作用を持つこと、かつ 2.5ml/kg という大量投与が可能であることから酸化ストレスの軽減によって肝臓の壊死も MAPK 活性化も抑制したと考えられる。

以上から DMSO はチオアセトアミド投与によって引き起こされる酸化ストレスによる MAPK の活性化、それに続く細胞死を有効に阻害した。このことは経口投与によって in vivo で肝臓の酸化ストレスが軽減される可能性を示したもので、今後、食品成分の生体内での抗酸化作用を検討する上で良いモデルになることが期待できる。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 市 育代、岸岡輝美、飯田ちなつ、藤井こずえ、長江律子、大西優希、小城勝相；「チオアセトアミド肝障害の DMSO による抑制効果」、第 40 回酸化反応討論会 (奈良、2007)
2. I. Ichi, T. Kishioka, C. Iida, K. Kozue, R. Nagae, Y. Onishi, and S. Kojo, "The protective effect of DMSO on oxidative stress, MAPK, and the hepatic necrosis induced by

thioacetamide.” International Conference on Food Factors (ICOFF2007) (京都、2007)

誌上発表

1. Terumi Kishioka, Chinatsu Iida, Kozue Fujii, Ritsuko Nagae, Yuki Onishi, Ikuyo Ichi, and Shosuke Kojo; “Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver.” *Eur. J. Pharmacol.*, **564**, 190-195 (2007).