

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790211

研究課題名(和文)生活習慣病に対する治療薬剤及び補完代替物の多面的抗酸化能評価

研究課題名(英文) Multifaceted antioxidant evaluation of medicine and functional food for the lifestyle-related disease

研究代表者

安楽 誠 (ANRAKU, MAKOTO)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：60398245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroの検討において、天然高分子多糖類であるキトサンは、脂質吸収抑制作用に加え抗酸化作用を示すことが明らかとなった。また、病態モデル動物を用いた検討においても、脂質吸収抑制効果及び腎障害亢進抑制効果に加えた抗酸化作用が見出された。そこで血液透析患者において、既に販売されている機能性食品であるキトサンを服用して頂いた結果、尿毒症物質の顕著な削減と酸化ストレスの軽減が観察された。以上の知見より、機能性食品であるキトサンのメタボリックシンドロームあるいは腎不全などの病態への多面的抗酸化療法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of chitosan on oxidative stress and related biochemical properties in lifestyle diseases. In metabolic syndrome patients or model rats, chitosan has a high antioxidant activity as well as the ability to exert antilipidemic effects. Furthermore, in chronic renal failure (CRF) patients or model rats, chitosan has a high antioxidant activity as well as the ability to exert reno-protective effects. From these results, we hypothesize that chitosan reduces the levels of lipids and/or uremic toxins that induce the production of reactive oxygen species in the intestinal tract, thereby inhibiting the subsequent development of oxidative stress in the systemic circulation in the metabolic syndrome or CRF. Thus, the pleiotropic effects of chitosan might lead to the development of effective new methods for the treatment of such diseases and for reducing oxidative stress associated with lifestyle diseases such as metabolic syndrome or CRF.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：生活習慣病 抗酸化作用 キトサン アルブミン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の国民健康栄養調査によると、生活習慣病(メタリックシンドローム、高血圧症、糖尿病、脂質異常症、慢性腎臓病)有病者は、その予備軍まで含めると1020万人にも上るため、対応が急務な国民病として位置付けられている。この国民病の死因の第一位は心血管障害(Cardiovascular diseases: CVD)であり、その進展に酸化ストレスの関与が報告されているため、これら病態の進展抑制に加え、抗酸化作用を加味した治療戦略が提起されている。これまでに、抗酸化剤であるビタミンC、Eの摂取量と冠動脈疾患発症との間に負の相関が観察されているものの、大規模臨床試験では必ずしも抗酸化療法の有効性が証明されていない。このため、活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)や一酸化窒素に着目した新規抗酸化剤の開発が進められているが、治療薬として新たに1剤追加することは医療経済的に大きな負担であるため、既存の薬剤の中から抗酸化作用を有する薬物を活用する、いわゆる「育薬」が期待されている。

2. 研究の目的

近年、生活習慣病の発症・進展に、酸化ストレスの密接な関与が明らかになってきたが、抗酸化剤の適応を有する薬剤は殆どない上、新規薬剤の開発及び上乘せ処方では医療経済的な負担が大きい。本研究では、既存の生活習慣病治療薬の中から酸化ストレス軽減効果を兼ね備えた薬剤の活用(育薬)、並びに優れたラジカル消去効果を有する機能性食品の未病医療への適用(育食)、による多面的抗酸化療法を確立し、これに多彩なバイオマーカーを駆使した酸化ストレスの網羅的評価方法を組み合わせることにより、生活習慣病の新たな治療および予防戦略を提案する。

3. 研究の方法

In vivo(病態モデル動物;肥満、高血圧、腎不全)および*in vitro*における生活習慣病治療薬及び予防としての機能性食品の抗酸化作用を評価し、抗酸化作用が示唆される薬物及び機能性食品については患者(生活習慣病、慢性腎不全)を対象とした臨床試験を行う。

(1) 生活習慣病治療・予防における薬物及び機能性食品の*in vitro*における抗酸化作用のスクリーニング

生活習慣病に対する治療薬として使用されている各種降圧薬(ARB、ACE阻害薬、カルシウム受容体拮抗薬など)、経口血糖降下薬(SU剤、ピグアナイド)、脂質代謝改善薬(スタチン系、フィブラート系)及び予防が期待され、科学的根拠を持つ各種機能性食品(降圧作用;カゼイン、カテキンなど、経口

血糖降下作用;小麦アルブミン、難消化性デキストリンなど、脂質代謝改善作用;キチン・キトサン、レシチンなど)の抗酸化作用について、各種酸化ストレスマーカー(酸化アルブミン解析、F2イソプロスタン、8-デオキシグアノシン、カルボキシメチルリジン、チオレドキシニン、ESR)により評価を行う。加えて、酸化ストレス亢進により血管内皮が最初に傷害を受ける部位であるため、血管内皮細胞を用いた培養細胞系を使用し、各種ラジカルに対する酸化ストレス抑制効果や細胞保護効果についても検討を行う。

(2) 病態モデル動物を用いた薬物及び機能性食品の抗酸化作用の有効性評価

*In vitro*スクリーニングより抗酸化作用を有する可能性が認められた薬物及び機能性食品に対して、病態モデル動物を用いた*in vivo*での検討を行う。病態モデルとして、肥満(高脂血症)、高血圧、慢性腎不全を設定し、各種酸化ストレスマーカー及び生化学値の変動について検討を行う。

(3) 生活習慣病有病者及び慢性腎不全患者を対象とした臨床試験(薬物及び機能性食品の抗酸化作用の検討)の実施

*In vitro*および病態モデル動物スクリーニングにより有効性が示唆された薬物及び機能性食品について、生活習慣病及び慢性腎不全を呈する患者を対象に臨床試験を行う。具体的には、インフォームドコンセントにより同意が得られた患者に対し、薬物及び機能性食品を常用量で服用してもらう。服用前後に採血をおこない血液採取し、各種酸化ストレスマーカー及び生化学値の変動について検討を行う。

4. 研究成果

(1) 生活習慣病治療・予防における薬物及び機能性食品の*in vitro*における抗酸化作用のスクリーニング

各種酸化ストレスマーカーにより既存の効果に加えた抗酸化作用について検討した結果、脂質吸収抑制作用を有するキトサンにおいて、顕著な抗酸化作用が観察された。加えて、酸化ストレス亢進により血管内皮が最初に傷害を受ける部位であるため、血管内皮細胞を用いた培養細胞系を使用し、各種ラジカルに対する酸化ストレス抑制効果や細胞保護効果についても検討した結果、酸化ストレス抑制に伴う細胞保護効果が観察された。

(2) 病態モデル動物を用いた薬物及び機能性食品の抗酸化作用の有効性評価

メタリックシンドロームモデルとして

肥満・高血圧自然発症ラット (SHR/NDmcr-cp rat) を利用し、高分子 (Mw: 1,000 kDa)、低分子キトサン (Mw: 30 kDa) 摂取によるアルブミン酸化度を利用した抗酸化効果について生化学値の変動と併せて検討した。その結果、高分子キトサン摂取時のみ有意な脂質吸収抑制作用が観察された。一方、低分子キトサンの摂取は高分子キトサンの摂取に比べ高い抗酸化作用を示した。In vitro モデルにおけるラジカル除去能を検討した結果、用量、時間依存的に低分子キトサンは高分子キトサンに比べて高いラジカル除去能を示したことから、SHR/NDmcr-cp rat において、低分子キトサンの高い抗酸化作用が血中の酸化ストレス抑制につながったものと考えられた。一方、高分子キトサンは in vitro においてほとんど抗酸化作用を示さないものの、血中での抗酸化作用が観察されたことから、高分子キトサンが LDL のような酸化促進成分を消化管内において顕著に吸着して糞中に排泄することにより、血中酸化促進成分の減少による二次的な抗酸化作用を血中において発揮したものと考えられた。以上の知見より、キトサンは、メタボリックシンドロームに対しての治療のみならず予防へも適応可能な機能性食品として有用である可能性が示唆された。

次に慢性腎不全モデルラット (CRF-rat) を用いてキトサンの抗酸化及び腎保護効果について検討した。その結果、キトサン投与により腎機能パラメータである尿中アルブミン、血中インドキシル硫酸 (IS) 及び血清クレアチニン濃度の有意な減少が観察され、腎不全の進行抑制が確認された。これは、投与されたキトサンが消化管内で尿毒症物質あるいはその前駆体を吸着したまま糞中に排泄し、体内蓄積ひいては血中蓄積を抑制した結果、腎不全の進行が抑制されたものと考えられた。次に、CRF-rat を用いて生体内酸化ストレスに及ぼすキトサンの影響についてアルブミン酸化度及び BAP テストにより評価した結果、キトサン非投与群と比較して有意な抗酸化作用が観察された。また、IS 濃度変化と酸化ストレスの指標であるアルブミン酸化度の変化に良好な相関が認められたことから、キトサンによる消化管内尿毒症物質の吸着作用が血中の抗酸化作用の増加に

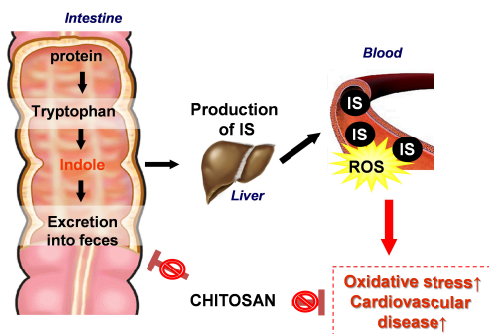


図1 キトサンによる酸化ストレス抑制機構

つながったものと考えられた (図1)。以上の知見より、CRF モデルラットへのキトサン投与は、腎不全の進行を抑制するだけでなく、血中の抗酸化作用も示すことが明らかとなった。

(3) 生活習慣病有病者及び慢性腎不全患者を対象とした臨床試験 (薬物及び機能性食品の抗酸化作用の検討) の実施

メタボリックシンドロームモデルラットにおける結果より、高分子キトサンは消化管内における脂質排泄やコレステロール低下作用などに加えた多面的効果としての抗酸化作用が期待できる。そこで次に、実際にメタボリックシンドローム予備軍に対する高分子キトサン服用による抗酸化効果について生化学値の変動と併せて検討した。今回、既に機能性食品として販売されているキトサミン®をボランティア 10 名に服用して頂いた。なお、研究計画は福山大学倫理委員会の承認を得て行った。その結果、先のモデルラット同様、キトサミン®服用開始後 4 週間に血漿酸化ストレスの軽減と脂質吸収抑制作用の多面的効果が観察された。また血中の酸化ストレス変動とメタボリックシンドロームの指標である動脈硬化指数との関連性について検討した結果、良好な相関関係が確認されたことより (図2) キトサミン®は、LDL などの脂質成分の吸着作用による間接的な抗酸化作用により血中酸化ストレスを軽減するものと考えられた。今回得られた知見は、今後、特定保健用食品として利用されているキトサミン®に対し、メタボリックシンドロームの予防期から治療期までの幅広い期間での応用を期待させるものと考えられる。

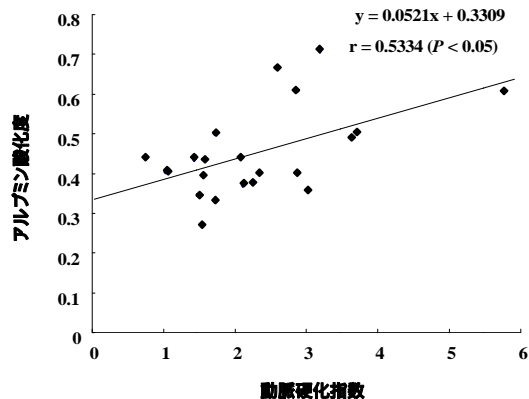


図2 動脈硬化指数とアルブミン酸化度の関連性

次に CRF-rat における結果よりキトサンは、消化管内における尿毒症物質排泄作用に加えた多面的効果としての抗酸化作用が期待できる。そこで次に、松下会あけぼのクリニックで透析中の患者 11 例を対象として、キトサン摂取に伴う腎障害の進行度及び酸化ストレスの変動について調査を行った。キトサンは日本化薬フードより提供された特定保健用食品であるヘルケット® (キトサンビスケット; 1 袋 0.5g キトサン含有) を使用した。採血はキトサン摂取前の最終透析前を

0 週としキトサン摂取後 4 週, 8 週, 12 週後まで行った。なお全対象例は研究の目的及び計画の説明を口頭及び文書にて受けた後, 同意を得られた患者のみ採血を行った。また研究計画は松下会あけぼのクリニック倫理委員会の承認を得て行った。腎不全の状態は, 血清リン及び尿毒症物質の一つである IS の変動により評価した。また, 血清アルブミンを用いたアルブミン酸化度及び血漿抗酸化能測定, ラジカル消去能などによる抗酸化効果も併せて評価した。その結果, 透析患者におけるキトサンの摂取は, キトサン摂取前と比較して有意な血清 P 及び血中 IS の低下を惹起した。また, 各種抗酸化測定により, キトサン摂取前と比較して酸化ストレスの減少が観察された。さらに, 酸化ストレス亢進因子であり CVD 発症のリスクファクターでもある血中 Advanced oxidation protein products (AOPP) の有意な減少が観察されたことから, 透析患者におけるキトサンの服用は CVD 発症の予防にもつながるものと考えられる(図 3)。

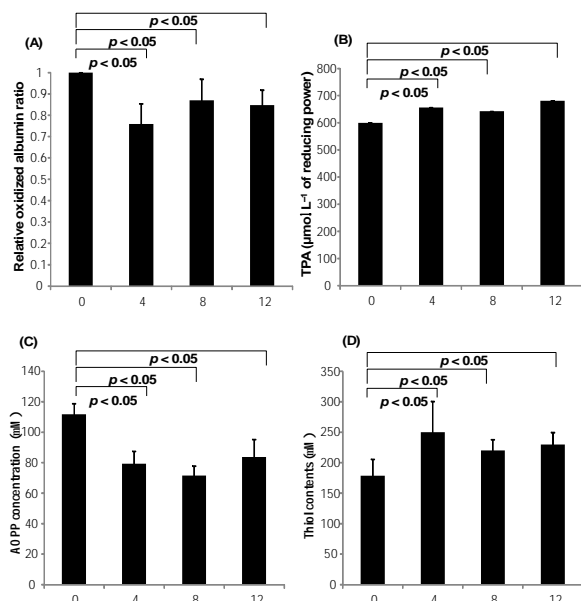


図3 キトサン摂取による各種酸化ストレスマーカーの変動

現在, 多くの生活習慣病の危険因子として酸化ストレスの負荷が目目され, 酸化ストレスの抑制が病態進行の抑制や予防につながるものと期待されている。本研究では, 機能性食品であるキトサンが血中脂質濃度や尿毒症物質である IS 濃度を減少させ, 全身循環系において酸化ストレスを軽減することを初めて見出した。キトサンのユニークな抗酸化作用は他の抗酸化剤であるレニン・アンジオテンシン系阻害剤や抗酸化ビタミンと異なることから, キトサン単独あるいはこれらの薬剤との併用投与は, メタボリックシンドロームや腎不全をはじめとした生活習慣病時における新規抗酸化治療戦略となる可能性が示唆される。また, キトサンは機能性食品であることから, 酸化ストレス関連疾患に対する予防あるいは早期治療に有用であるとえられる。これらの知見は, キトサン

の脂質吸収抑制効果や腎保護効果に加えた多面的作用としての抗酸化効果を明らかにするのみならず, 今後, 機能性食品におけるキトサンの抗酸化剤としての位置づけを明確化するとともに, 機能性食品の適正使用を支援していく上で有用な基礎データになるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 12 件)

1. Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Hirayama F, Otagiri M. N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against photo-oxidation and reactive oxygen species compared to N-acetyl-L-tryptophan. *Biochim Biophys Acta*, in press (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.bbagen.2014.04.014.
2. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirono S, Otagiri M, Maruyama T. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. *PLoS One*. **9**, e87919 (2014) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0087919.
3. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. **8**, e85216 (2014) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0085216.
4. Altaf A, Aldawsari H, Banjar ZM, Anraku M, Iohara D, Otagiri M, Uekama K, Hirayama F. Preparation of soluble stable C₆₀/human serum albumin nanoparticles via cyclodextrin complexation and their reactive oxygen production characteristics. *Life Sci*. **93**, 277-282 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.lfs.2013.06.021.
5. Aldawsari H, Altaf A, Banjar ZM, Iohara D, Nakabayashi M, Anraku M, Uekama K, Hirayama F. Crystallization of A New Polymorph of Acetohexamide from 2-Hydroxybutyl-

- β -cyclodextrin Solution: Form VI with A High Aqueous Solubility. *Int. J. Pharm.* **453**, 315-321 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.026.
6. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* **1830**, 5465-5472 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.036. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.014.
 7. Hiraga A, Anraku M, Otagiri M, Hirayama F. Antioxidant and renoprotective activity of chitosan in nephrectomized rats *Kichin, Kitosan Kenkyu* **19**, 24-27 (2013) 査読有
 8. Anraku M, Tomida H, Michihara A, Tsuchiya D, Iohara D, Maezaki Y, Uekama K, Maruyama T, Otagiri M, Hirayama F. Antioxidant and renoprotective activity of chitosan in nephrectomized rats. *Carbohydr Polym.* **89**, 302-304 (2012) 査読有
 9. Iohara D, Yoshida K, Yamaguchi K, Anraku M, Motoyama K, Arima H, Uekama K, Hirayama F. Cyclodextrin-Induced Change in Crystal Habit of Acetylsalicylic Acid in Aqueous Solution. *Cryst. Growth Des.* **12**, 1985-1991 (2012) 査読有 DOI: 10.1021/cg201691c
 10. Anraku M, Takeuchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Kitamura K, Tomita K, Kuniyasu A, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Quantitative analysis of cysteine-34 on the antioxidant properties of human serum albumin in hemodialysis patients. *J Pharm Sci.* **100**, 3968-3976 (2011) 査読有 doi: 10.1002/jps.22571.
 11. Zhang JS, Anraku M, Kadowaki D, Imai T, Suenaga A, Odani A, Otagiri M. Spectroscopic studies of interactions of chondroitin sulfates with cisplatin. *Carbohydr Res.* **346**, 631-637 (2011) 査読有 doi: 10.1002/jps.22571.
 12. Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Kojima E, Hata T, Tabuchi N, Tsuchiya D, Goromaru T, Tsutsumi H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Tomida H. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. *Carbohydr Polym.* **83**, 501-505 (2011) 査読有 DOI:10.1016/j.carbpol.2010.08.009
- 介, 上釜 兼人, 平山 文俊 キチンナノファイバー及びキトサンナノファイバーの徐放性素材への応用 日本薬学会第134年会 (2014/3/27-30), 熊本大学他, 熊本
2. 安楽 誠 血清アルブミンの酸化機構の解明と酸化ストレス関連疾患への展開 第30回日本薬学会九州支部大会 (2013/12/7-8) 長崎国際大学, 佐世保
 3. 平賀 歩, 安楽 誠, 田中 元子, 南雲 恒平, 渡邊 博志, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 平山 文俊, 丸山 徹, 小田切 優樹 透析患者の酸化ストレス及び高リン血症に対するキトサンの有用性評価 第30回日本薬学会九州支部大会 (2013/12/7-8) 長崎国際大学, 長崎
 4. 石田 裕太郎, 梅崎 至高, 和田 幸樹, 庵原 大輔, 安楽 誠, 小田切 優樹, 上釜 兼人, 平山 文俊 慢性腎不全モデルラットにおける2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンの抗酸化及び腎保護効果の検討 第30シクロデキストリンシンポジウム (2013/9/11-12) 熊本パレア, 熊本
 5. 安楽 誠, 田中 元子, 南雲 恒平, 渡邊 博志, 庵原 大輔, 平山 文俊, 丸山 徹, 小田切 優樹 透析患者の高リン血症及び酸化ストレスに対するキトサンの影響 第30回日本TDM学会・学術大会 (2013/5/25-26) 市民会館崇城大学ホール, 熊本
 6. 平賀 歩, 安楽 誠, 田中 元子, 南雲 恒平, 渡邊 博志, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 平山 文俊, 丸山 徹, 小田切 優樹 透析患者におけるキトサンの抗酸化及び腎保護効果の検討 日本薬学会第28年会 (2013/5/23-25), ウィンク愛知, 愛知
 7. Makoto Anraku, Motoko Tanaka, Kohei Nagumo, Yuji Maezaki, Daisuke Iohara, Kaneto Uekama, Fumitoshi Hirayama, Toru Maruyama, Masaki Otagiri Effects of chitosan on oxidative stress and hyperphosphatemia in hemodialysis patients, International Conference of the European Chitin Society (2013/5/5-8) Porto, Portugal
 8. 安楽 誠, 東 久美子, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 小田切 優樹, 平山 文俊 分子量が異なるPEG化キトサンの調製とその抗酸化作用 日本薬学会第133年会 (2013/3/27-30) パシフィコ横浜, 神奈川
 9. 平賀 歩, 安楽 誠, 富田 久夫, 丸山 徹, 小田切 優樹, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 前崎 祐二, 平山 文俊 慢性腎不全モデルラットにおけるキトサンの腎保護及び抗酸化効果 第26回キチン・キトサンシンポジウム (2012/7/12-13) 北海道大学, 北海道
 10. 安楽 誠, 東 久美子, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 小林 誠幸, 平山 文俊 各分子量

〔学会発表〕(計15件)

1. 平賀 歩, 安楽 誠, 庵原 大輔, 伊福 伸

- PEG 化キトサンの抗酸化作用評価 第 26 回キチン・キトサンシンポジウム (2012/7/12-13) 北海道大学, 北海道
11. 安楽 誠, 庵原 大輔, 梅崎 至高, 上釜 兼人, 小田切 優樹, 平山 文俊 アルブミン - フラーレン複合体の構造・機能特性 日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26) 神戸国際会議場, 兵庫
 12. 安楽 誠, 富田 久夫, 小田切 優樹, 前崎 祐二, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 平山 文俊 慢性腎不全モデルラットにおけるキトサンの抗酸化及び腎保護効果の検討 日本薬学会第 132 年会(2012/3/28-31)北海道大学, 北海道.
 13. 安楽 誠, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 小田切 優樹, 平山 文俊 健康食品の予防医療への応用: 各種病態時におけるキトサンの抗酸化作用の定量的解析 第 4 回シクロデキストリンワークショップ (2011/10/30), 湯布院, 大分.
 14. Makoto Anraku, Koji Takeuchi, Fumitoshi Hirayama, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Ayaka Suenaga, Toru Maruyama, Masaki Otagiri. Quantitative Analysis of Cysteine-34 on the Antioxidative Properties of Human Serum Albumin and its Physiological Significance in Hemodialysis Patients, Helsinki Drug Research 2011 Congress, (2011/9/18-20) Helsinki, Finland
 15. 梅崎 至高, 安楽 誠, 丸山 徹, 小田切 優樹, 庵原 大輔, 上釜 兼人, 平山 文俊, 前崎 祐二, 富田 久夫 メタボリックシンドロームモデルラットにおけるキトサンの抗酸化作用評価 第 25 回キチン・キトサンシンポジウム (2011/8/30-31) 奈良県新公会堂, 奈良

〔図書〕(計 1 件)

M. Otagiri, VT. Chuang, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, Human serum albumin: The oxidation of human serum albumin and role of Cys34 180-196, Sojo University Publishing Center, 510 (180-196).

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: 慢性腎不全予防剤又は慢性腎不全治療剤

発明者: 安楽 誠, 富田 久夫, 丸山 徹, 小田切 優樹, 前崎 祐二

権利者: 日本化薬フードテクノ株式会社

番号: 2014-024817

取得年月日: 2014 年 2 月 6 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

<http://www.ph.sojo-u.ac.jp/~dio/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安楽 誠 (ANRAKU MAKOTO)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60398245