

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23792074
研究課題名（和文）	血管内経時的測定法を用いたスーパーオキシドアニオンラジカルの発生源と産生量の検討
研究課題名（英文）	The assessment of oxidative stress by measuring superoxide anion radical directly in venous
研究代表者	
	戸谷 昌樹 (TODANI MASAKI)
	山口大学・医学部附属病院・助教
	研究者番号： 00585721

研究成果の概要（和文）：

血管内経時的測定法を用いて生体内でスーパーオキシドアニオンラジカルを測定し、酸化ストレス傷害、血管内皮細胞傷害、早期組織炎症反応との関係を明らかにした。電気化学的センサーで測定した電流値とスーパーオキシドアニオンラジカル濃度の関係を生体外で校正して評価した。全脳虚血再灌流モデルラットを用いて、アポシニンとアロプリノールを投与することでスーパーオキシドアニオンラジカルを抑制し酸化ストレス傷害との関係を検討した。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed the relationship among oxidative stress, endothelial injury and early inflammation to measure superoxide anion radical directly in venous. To assess the measured current values of the electrochemical sensors, we calibrated against superoxide anion radical concentration *in vitro*. We examined that apocynin and allopurinol suppressed superoxide anion radical generation resulting in inhibition of oxidative stress in rat with forebrain ischemia/reperfusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：救急・生体侵襲制御医学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学、救急医学

キーワード：フリーラジカル、酸化ストレス傷害、スーパーオキシドアニオンラジカル、生体内持続ラジカル測定法、アポシニン、マロン酸アルデヒド、HMGB1、ICAM-1

1. 研究開始当初の背景

(1) スーパーオキシドアニオンラジカル($O_2^{\cdot-}$)は酸化ストレス傷害のイニシエーターとして重要である。人間をはじめとするほとんどの生物が酸素を利用してエネルギーを高効率に得ており、その過程で発生するより活性の強い酸化物質を活性酸素種(ROS)と呼ぶ。生体内で過剰に産生したROSは、その酸化毒性によって組織傷害を引き起こす。 $O_2^{\cdot-}$ は、酸素から最初に派生するROSであり酸化ストレスのイニシエーターとして重要である。しかしながら、 $O_2^{\cdot-}$ は不安定なラジカルであるため直接測定することは困難であり、生体内での

動態はいまだに解明されていない。

(2) 近年、生体内で安定している鉄ポルフィリン重合膜を用いた全合成型の電気化学活性酸素種センサーが開発され、*in vitro*における $O_2^{\cdot-}$ の測定が可能になった。我々は脳虚血再灌流傷害、エンドトキシン血症、熱中症において $O_2^{\cdot-}$ が上昇し酸化ストレス傷害が起こっていることを報告した。

(3) $O_2^{\cdot-}$ の発生にはさまざまな発生経路が考えられている。我々は測定された $O_2^{\cdot-}$ と酸化ストレス傷害に関連があることを報告した。しかし、 $O_2^{\cdot-}$ の発生源や産生経路は未だに不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は生体侵襲の原因物質となり得るスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の動態を把握し、酸化ストレス傷害の病態を解明することである。具体的には以下の通りである。

(1) 電気化学的センサーと $O_2^{\cdot-}$ 濃度の関係を明らかにする。

(2) 血管内経時的測定法を用いて Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) オキシダーゼを抑制するアポシニンと、キサンチンオキシダーゼ (XO) を抑制するアロプリノールが、血管内 $O_2^{\cdot-}$ の産生を抑制するか検討する。

(3) $O_2^{\cdot-}$ の産生と酸化ストレス傷害、血管内細胞傷害、早期組織炎症反応との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

ラット前脳虚血再灌流モデルにおいてスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) 産生とアポシニン、アロプリノール投与による影響を調べた。対象は Wistar ラット雄 (250-350g) を用いた。ラットを対照群 (Control 群, n=7)、脳虚血 60 分前にアロプリノール 100mg/kg 投与する群 (Allopurinol 群, n=7)、アポシニン 30mg/kg を投与する群 (Apocynin 群, n=7)、アロプリノール 100mg/kg およびアポシニン 30mg/kg を投与する群 (Apocynin + Allopurinol 群, n=7) に無作為に分けた。イソフルラン全身麻酔下に気管切開後人工呼吸管理 (吸入酸素濃度 40%) とした。 $O_2^{\cdot-}$ センサーは使用前後に生体外でキャリブレーションし、 $O_2^{\cdot-}$ 濃度との関係を調べた。 $O_2^{\cdot-}$ センサーを頸静脈の枝から挿入、先端を頸静脈内に留置し $O_2^{\cdot-}$ 電流値を測定した。 $O_2^{\cdot-}$ センサー挿入後に未分画ヘパリンを 1000 単位投与、以降 30 分ごとに 1000 単位ずつ投与した。Smith 法の変法により前脳虚血を 10 分施行、その後再灌流した。虚血再灌流後 120 分後まで $O_2^{\cdot-}$ を測定した。その後採血および大後頭孔から脳脊髄液の採取をして血清と脳脊髄液を保存、安楽死させた後、冷却した生理食塩水灌流後に脳組織を取り出し -80°C で冷凍保存した。脳の酸化ストレスの指標として、脳組織内の Malondialdehyde (MDA) を測定、全身の酸化ストレス指標として血清 MDA、内皮細胞傷害の指標として脳および血清の Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1)、炎症の指標として脳および血清の High mobility group box 1 (HMGB1) を測定した。

4. 研究成果

(1) 電気化学センサーとスーパーオキシドアニオンラジカル濃度の関係について

スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$)

の測定はシトクローム C を模倣して合成された電気化学活性酸素種センサーの先端で測定される。センサーの先端に接触した $O_2^{\cdot-}$ が O_2 に還元する際に発生する微小電位を測定し、測定結果は電流値 (nA) として表示される。電流値の示す意義が不明確なため *in vitro* で測定電流値 (nA) と $O_2^{\cdot-}$ 濃度の関係を調べたところ、センサーはそれぞれ $O_2^{\cdot-}$ に対する感度が異なっていた。そのため、*in vivo* 測定をする前にセンサーの感度 (nA/nM) を測定することとした。

$O_2^{\cdot-}$ 生体内測定中にセンサーの感度が不安定になることがあるため、生体内測定後にもセンサー感度を測定した。その結果、*in vivo* で測定した後にはほとんどのセンサーで感度が低下していた (図 1)。原因としてセンサー先端に血栓などの不純物が付着していることが考えられたため、生体内での実験においてはヘパリンを定期的に投与した。

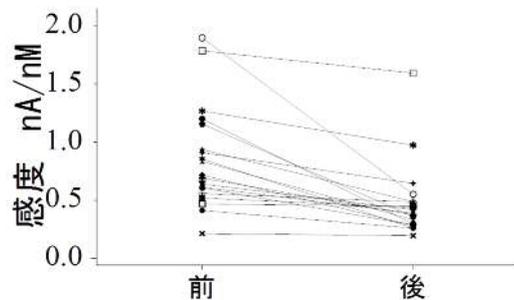


図1 生体内測定前後のセンサー感度

生体内 $O_2^{\cdot-}$ 測定センサーの測定単位は *in vitro* で測定した $O_2^{\cdot-}$ 濃度の nM とした。実際にはセンサー先端で還元された $O_2^{\cdot-}$ が電流値となる。体内では血流速度の測定が出来ないため実際には単位として濃度を用いることが正しいかどうかは不明である。血管内の $O_2^{\cdot-}$ は短時間で消失してしまうために血液を採取して *in vitro* で測定することは難しい。今後、実際の血中濃度と生体内測定センサーで推定した血中濃度については検討が必要である。センサーによってそれぞれ感度が異なっていた。測定前に感度測定をすることで動物実験ではキャリブレーションをすることが出来るが、今後センサーの質を均一に保つことが商品化を考える上では必要となる。生体内での測定では、血栓など不純物の付着から感度が不安定になると考えられた。生体内で安定して測定をするためには、センサー測定部分の抗凝固コーティングや血栓予防の方法を考える必要がある。

(2) 血管内経時的センサーによるスーパーオキシドアニオンラジカルの経時的変化

頸静脈にセンサーを留置して、測定値が安定したところを基準として虚血操作を開始した。虚血操作が完了した後に測定値はほぼ

0nMまで低下した。10分間の虚血の後、再灌流をするとControl群において測定値は30nMとなり、最初の基準値より上昇した。Control群において徐々に低下し測定終了まで25nMで定常値となった。Apocynin群およびAllopurinol群において測定値は再灌流後に30nMまで上昇した後徐々に低下し5nMまで低下、実験終了時には5~10nMで推移した。Control群の定常値と比べてApocynin群とAllopurinol群は測定値が低かった。Apocynin + Allopurinol群において測定値は再灌流後に30nMまで上昇した後に5~10nMまで徐々に低下した。Control群の定常値と比べて低い値を示していたがAllopurinol群およびApocynin群の定常値とほぼ同値を示した。それぞれの群において血管内で測定した O_2^- 測定結果の典型例を図2に示した。

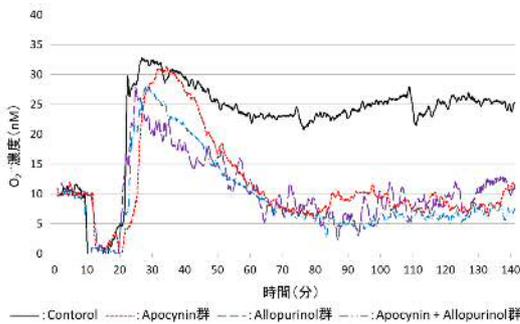


図2 血管内 O_2^- 濃度

以上の結果から、NADPH オキシダーゼ阻害およびXO阻害をすることにより血管内 O_2^- 産生量は低下するが、相乗効果は認めないことが示唆された。

(3) 前脳虚血再灌流モデルラットにおけるMDA、HMGB1、ICAM-1の測定結果について

血清のMDAにおいてApocynin群、Allopurinol群およびApocynin + Allopurinol群はControl群と比較して有意に低値を示した。Apocynin群、Allopurinol群とApocynin + Allopurinol群には有意差を認めなかった。脳組織のMDAにおいて、Allopurinol群とApocynin + Allopurinol群はControl群と比較して有意に低値を示した。Apocynin群はControl群と比べ低い傾向にあったが有意差は認めなかった。血清および脳組織のMDA濃度を図3-1、図3-2に示す。

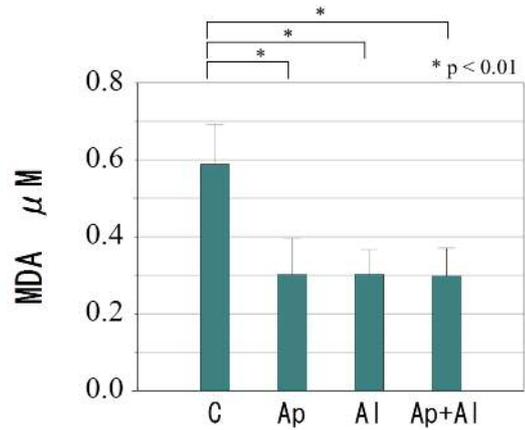


図3-1 血清MDA濃度

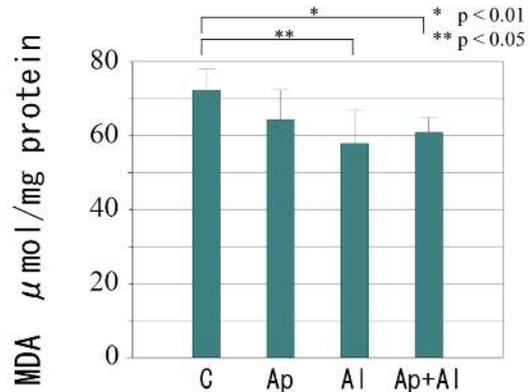


図3-2 脳組織MDA濃度

血清のHMGB1においては全ての群間で有意差を認めなかったが、Apocynin群、Allopurinol群、Apocynin + Allopurinol群はControl群と比較して低い傾向にあった。脳組織のHMGB1において、Apocynin群、Allopurinol群およびApocynin + Allopurinol群はControl群と比較して有意に低値を示した。Apocynin群、Allopurinol群とApocynin + Allopurinol群には有意差を認めなかった。脳脊髄液中HMGB1において、Allopurinol群はControl群と比較して有意に低値を示した。Apocynin群、Apocynin + Allopurinol群はControl群と比較して有意差は認めなかったが低い傾向を認めた。血清、脳組織および脳脊髄液のHMGB1濃度を図4-1、図4-2、図4-3に示した。

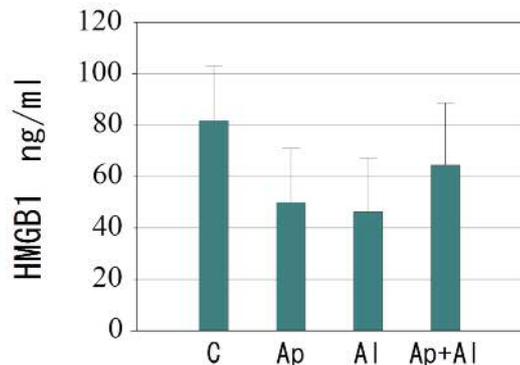


図4-1 血清HMGB1濃度

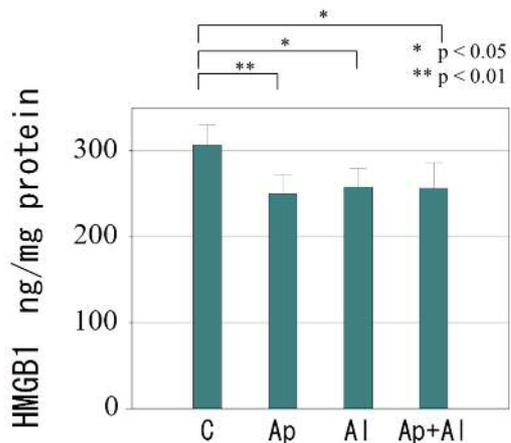


図4-2 脳組織HMGB1濃度

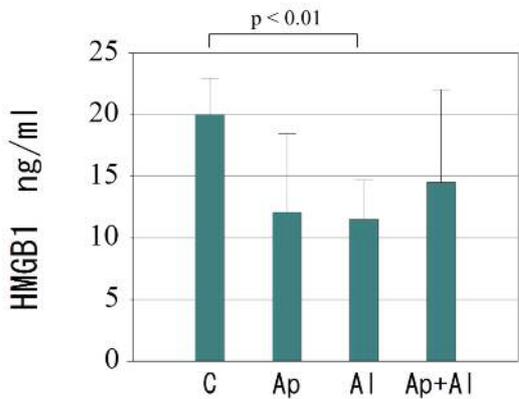


図4-3 脳脊髄液HMGB1濃度

血清の ICAM-1 において Apocynin 群、Apocynin + Allopurinol 群は Control 群と比較して有意に低い傾向にあった。Allopurinol 群は Control 群と比較して有意差は認めなかったが低い傾向にあった。脳組織の ICMA-1 において Apocynin 群、Apocynin + Allopurinol 群は Control 群と比較して有意に低い傾向にあった。Allopurinol 群は Control 群と比較して有意差は認めなかったが低い傾向にあった。血清および脳組織の ICAM-1 濃度を図 5-1、図 5-2 に示す。

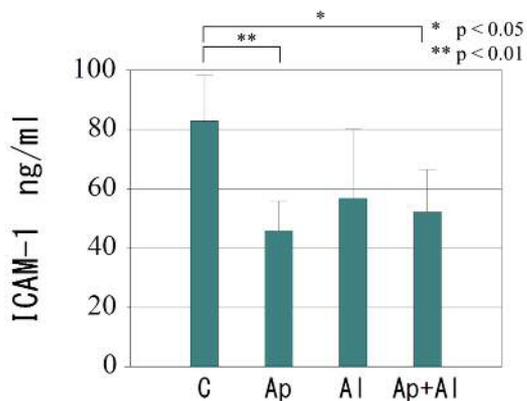


図5-1 血清ICAM-1濃度

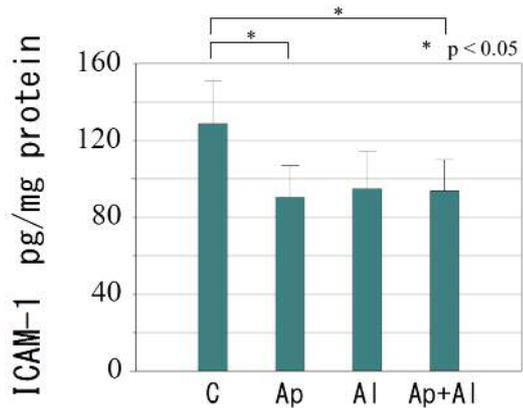


図5-2 脳組織ICAM-1濃度

$O_2^{\cdot-}$ は酸化ストレス傷害の最初の発生物質として重要である。 $O_2^{\cdot-}$ の発生源は主に NADPH オキシダーゼ系、XO 系、アラキドン酸カスケード系、ミトコンドリア呼吸鎖系が考えられている。今回の実験ではそのうち NADPH オキシダーゼ阻害薬であるアポシニンと XO 阻害薬であるアロプリノールを用いて血管内の $O_2^{\cdot-}$ 発生量と血清、脳脊髄液と脳組織の酸化ストレス傷害、血管内皮細胞傷害、早期炎症マーカーを検討した。

血管内で発生する $O_2^{\cdot-}$ はアポシニンおよびアロプリノールによって抑制されるがそれぞれの相乗効果は認めないことが示唆された。また、血管内および脳組織においてアポシニンおよびアロプリノールは酸化ストレス傷害を軽減するが、相乗効果は認めない可能性が示唆された。 $O_2^{\cdot-}$ は酸化ストレス傷害のイニシエーターであり、その発生を抑制することで酸化ストレス傷害を抑制できたが、アポシニンおよびアロプリノールの相乗効果は乏しいと考えられた。

血管内に発生した $O_2^{\cdot-}$ から始まる酸化ストレス傷害によって血管内皮細胞傷害が起こると考えられた。血管内細胞傷害は虚血や浮腫に関与し局所脳組織で虚血再灌流傷害を引き起こすと考えられる。HMGB1 は通常核内に存在しているが炎症によって直ちに細胞質を経由して細胞外に放出される。今回の結果からは脳組織での HMGB1 濃度はアポシニンおよびアロプリノールで抑制され、血清では有意差を認めなかった。これは HMGB1 が細胞質内から細胞外に放出される前であった可能性がある。また、アポシニンとアロプリノールの相乗効果は血管内皮細胞傷害および組織炎症でも認めなかった。酸化ストレス傷害は炎症の発生源であるとともに本流であり、そのイニシエーターである $O_2^{\cdot-}$ を測定することは今後生体侵襲の病態を解明し、治療をする上でも重要な標的となる。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

戸谷 昌樹 (TODANI MASAKI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00585721