

平成 21 年 5 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008年
 課題番号：19592098
 研究課題名（和文） 体内酸化ストレス度からみた脳障害病態のフリーラジカル産生とその基礎的研究
 研究課題名（英文） The Research of Oxidative stress and Free radical production in brain injury
 研究代表者：
 佐藤 和恵（SATO KAZUE）
 昭和大学・医学部・客員教授
 研究者番号：90053941

研究成果の概要：

脳障害患者の全血では、従来使用していたスピントラップ剤 DMPO では、アルコキシラジカルが産生していることを報告している。例数は更に増加している。今回、新規トラップ剤 CYPMPO を使用しての測定ではラジカルの捕捉はできたが、ラジカル種の同定が完全にできていない。しかしながら、FRAS4 を使用しての血漿の酸化ストレス度及び抗酸化能測定においては、両者が逆の相関をすることが観察された。以上の結果については現在論文にまとめているところである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：酸化ストレス、フリーラジカル、ESR、スピントラップ

1. 研究開始当初の背景

現在、様々な疾患に活性酸素及び一酸化窒素(NO)などのフリーラジカルが関与していることが分かってきている。頭部外傷や脳梗塞の病態においても、フリーラジカルが関与しているという報告があるが、実際の病態において捕捉された例は少ない。一般にフリーラジカルは不安定でガス状物質であるので、捕捉が非常に困難で、臨床上のマーカーも少ない。そのため臨床的データや基礎実験においても代謝産物測定がほとんどで、直接的なフリーラジカルの発生や消去能を観察した例は少ない。

我々は最近脳障害患者の血液のフリーラジカルを捕捉する技術を電子スピン共鳴法を使用して世界で始めて確立し、脳障害疾患の種類と重症度を知りうることで、即ちアルコキシラジカルと重症度が相関することを報告している。以上の基礎及び臨床データを土台として、救命救急センターに搬送される神経救急疾患の病態において、フリーラジカルが産生する時は、体内酸化ストレス度も上昇していると考えられる。しかし実際に、脳障害疾患において体内ストレス度とフリーラジカルとの関係の臨床的および基礎的な研究はほとんどない。そこで我々は、フリーラ

ジカルの直接モニタリング、および体内ストレス度を測定することにより、神経救急疾患の治療における基礎的情報の蓄積が実際の臨床の場（救命救急）での迅速で適正な治療への有効な手段になりうると考えている。

2. 研究の目的

救急脳障害患者の生体資料、特に血液については既に *ex vivo* ESR 法を用いて、脳障害疾患の種類と重症度との相関を知りうることを、即ちアルコキシラジカルの強度と重症度が相関することを報告している。今回は今まで使用していたトラップ剤の DMPO に加えて、新規に開発されたスーパーオキシドとヒドロキシラジカルを同時に測定可能なトラップ剤、CYPMPO を使用して測定する。また以前は使用していなかった患者の血液（血清または血漿）の酸化ストレス度及び抗酸化能を FRAS4（ウイスマー社）を使用して測定する。また脳障害のモデル実験ラットを作成し、同様な測定および組織を用いて、形態解析や組織解析を行うことにより、ラジカル産生を組織学的にも捉えることが出来る。

救急脳障害患者では、血液以外の情報が得られたいが、ラットでは各組織内でのフリーラジカル測定も可能であり、各組織内の酸化ストレス度や抗酸化能の測定も行えるので、更なる情報が得られると考えている。

3. 研究の方法

昭和大学救命救急センターに搬送される脳障害患者（脳卒中、頭部外傷、蘇生後脳症等）より採取した血液を直ちに電子スピン共鳴（ESR）法を用いてフリーラジカルの測定を行う。また血清の抗酸化能および酸化ストレス度の測定を FRAS4 の測定装置にて測定を行う。

作成した実験モデルラットの各組織および血液（血清および血漿）の組織学的検討および酸化ストレス度の測定等を患者と同様に ESR 法および FRAS4 法を使用して測定する。

4. 研究成果

救命救急センターに搬送される脳障害患者の血液については、以前と同様に採取、測定を行い、従来使用していたスピントラップ剤 DMPO では、アルコキシラジカルが産生していることを報告してきたが、更に例数が増えると共に、我々が行ってきた測定の確証が構築できてきた。

今回、新規トラップ剤 CYPMPO を使用しての測定ではラジカルの捕捉はできたが、ラ

ジカル種の同定が完全にできていない。しかしながら、FRAS4 を使用しての血漿の酸化ストレス度及び抗酸化能測定においては、両者が逆の相関をすることが観察された。以上の結果については現在論文にまとめているところである。

持続緩徐式血液濾過透析（Continuous hemodiafiltration; CHDF）は重症急性膵炎や多臓器不全（MOF）あるいは敗血症など救命救急センターに搬送される多くの重症例で腎代替療法や炎症性サイトカイン制御の目的に用いられる。その一方で以前より透析療法によりフリーラジカルが産生することが報告されている。CHDF 療法を行っている症例の透析カラム前後における酸化ストレス度と還元力（抗酸化能）について検討した。今回は全血の採取と ESR 法による測定はできなかったが、昭和大学の救命救急センターに搬送された CHDF を施行した例について透析カラム後の d-ROM 値は透析カラム前と比較して有意に上昇。透析カラム後の BAP 値は透析カラム前に比して有意に低下していた。CDEF 透析カラム後の血中酸化ストレス度の増大と抗酸化能の減少が認められた。透析カラム前後の変化の原因として透析カラムを介した物理的・化学的刺激が関与していると考えられ、今後 CHDF 療法施行における抗酸化療法の必要性が示唆された。これについても論文を作成中である。

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 件）

- ① Dohi K, Satoh K, Shioda S, Aruga T, et al(9②): Novel Free Radical Monitoring in Patients with Neurological Emergency: Acta Neurochirurgica, Supplement 106, 2009 (In press)
- ② Sakagami H, Satoh K, Nakamura W, et al(7②): Selective anti-bacterial and apoptosis modulating activities of mastic: in Vivo, 23:215-224.2009. 査読有
- ③ 坂上 宏、周 麗、佐藤和恵: マスチックの機能性の追求: New Food Industry 51, 9-20,2009. 査読有
- ④ Kato T, Satoh K, Sakagami H, et al(8④): Bimodal effect of glycyrrhizin on macrophage nitric oxide and prostaglandin E2 production. In Vivo, 22: 583-586, 2008. 査読有
- ⑤ Sakagami H, Satoh K, Nakashima H, et al (14⑦): Antiviral, Antibacterial

- and Vitamin C-synergized Radical Scavenging Activity of *Sasa senanensis* Rehder extract, in *Vivo*, 22, 471-476,2008. 査読有
- ⑥ Ao Y, Satoh K, Shioda S, et al (5②): Singlet Oxygen Scavenging Activity of Essential Oils from *Rutaceae*: *J Clin. Biochem.Nutr.*, 43, 6-12, 2008. 査読有
- ⑦ Senga F, Yin Li, Satoh K, Shioda S, et al(7⑥): Minus Charge Stimulation Prevents LPS-Induced Liver Injury by Reduction of Nitric Oxide: *J Clin. Biochem.Nutr.*, 42, 222-227, 2008. 査読有
- ⑧ 青暢子、佐藤和恵、清水藍、塩田清二：一重項酸素消去能からみた精油の安全使用について：J Japan Soc Aromatherapy, 7: 36-42.2008. 査読有
- ⑨ Miyahara K, Satoh K, Sakagami H et al (8⑥):Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by benzocycloheptoxazines: *Anticancer Res.*,28:2657-2662.2008. 査読有
- ⑩ Sakagami H, Satoh K,and Osawa K et al(15②): Anti-HIV and vitamin C-synergized radical scavenging activity of cacao husk lignin fractions. *In Vivo*, 22, 327-332, 2008. 査読有
- ⑪ Sakagami H, Hashimoto K, Satoh K, et al (7⑦): Tumor-specificity and Type of Cell Death Induced by Vitamin K2 Derivatives and Prenylalcohols: *Anti-cancer Res.*, 28:151-158.2008. 査読有
- ⑫ Takahashi J, Hashimoto K, Satoh K, Sakagami H , et al (10⑧): Inhibition of NO Production in LPS-stimulated Mouse Macrophage-like Cells by Trihaloacetylazulene Derivatives: *Anti-cancer Res.*, 28:171-178.2008. 査読有
- ⑬ Hatsukari I, Satoh K, Sakagami H, et ai, (9⑥): Induction of Apoptosis by Morphine in Human Tumor Cell Lines in Vitro: in *Vivo*: 27, 857-864,2007. 査読有
- ⑭ Sakagami H, Satoh K, Nakamura W, et al (17③):Anti-stress, Anti-HIV and Vitamin C-synergized Radical Scavenging Activity of Mulberry Juice Fractions: in *Vivo*: 27, 499-506, 2007. 査読有
- ⑮ 青暢子、佐藤和恵、須藤絹子、塩田清二：一重項酸素消去能の検討、J Japan Soc Aromatherapy, 5: 55-61.2007. 査読有
- ⑯ Ohtaki H, Dohi K, Satoh K , Shioda S, et al(10⑥): Increased mitochondrial DNA oxidative damage after transient middle cerebral occlusion in mice: *Neuroscience Res.*, 58, 349-355, 2007. 査読有
- ⑰ Akiyama N, Satoh K, Ozawa T, Natori S, et al (11④): A Long-lived Semiquinone Radical Anion is Formed from N-B-alanyl-5,8-glutathionyl-3,4-dihydroxy-phenylalanine(5-S-GAD), an Inset-derailed Antibacterial Substance. *J Biochem.*, 142, -48. 2007. 査読有
- ⑱ Watanabe S, Satoh K, Sakagami et al (7⑥): Radical Scavenging Activity and Inhibition of Macrophage NO Production by Fukinolic acid: *Food Sci. Technol. Res.*, 13, 366-671, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 周 麗、橋本研、佐藤和恵、坂上 宏 (7⑥)：クマザサ抽出液（ササヘルス）の抗炎症作用：第 82 回日本薬理学会年会、横浜、2009 年 3 月
- ② 儲 慶、橋本 研、佐藤和恵、坂上 宏：漢方の腫瘍選択性、細胞障害活性及び抗炎症作用：第 82 回日本薬理学会年会、横浜、2009 年 3 月
- ③ 坂上 宏、周 麗、佐藤和恵、大澤謙二、内海克明(12⑤)：リグニンによるマクロファージ活性化の機構：第 82 回日本薬理学会年会、横浜、2009 年 3 月
- ④ 土肥謙二、佐藤和恵、塩田清二、有賀徹(7②)：実験的頭部外傷におけるスーパーオキシドラジカル産生における gp91phox の動態と役割：第 67 回日本脳神経外科学会総会、岩手、2008 年 10 月
- ⑤ 土肥謙二、佐藤和恵、塩田清二、有賀徹(5②)：脳低温療法の実状と今後の展望について脳低温療法における酸化ストレスのモニタリングと動態：第 36 回日本救急医学会総会、札幌、2008 年 10 月
- ⑥ 土肥謙二、佐藤和恵、塩田清二、有賀徹(7②)：重症脳損傷における酸化ストレスモニタリングについて：第 15 回脳代謝モニタリング研究会 シンポジウム、東京、2008 年 7 月
- ⑦ 佐藤和恵、清水 藍、土肥謙二、有賀 徹、塩田清二：降圧薬オルメテックとカルブブロックの抗酸化能とビタミンEとの相互作用：日本酸化ストレス学会、京都、2008 年 6 月
- ⑧ Dohi K, Satoh K, Shioda S, Aruga T, et al (7②):Free Radical Monitoring in Patients with Neuroemergency Diseases: using *ex vivo* Electron Spin Resonance and others : 14th Inter-

national brain edema, symposium,
Portland, Apr 2008

- ⑨ 不老美也子、佐藤和恵、坂上 宏(12⑨) :
クマザサ抽出液 (ササヘルス) に検出され
たリグニン様活性: 第 81 回日本薬理学
会年会、横浜、2008 年 3 月
- ⑩ 土肥謙二、佐藤和恵、塩田清二、有賀徹
(9⑦): 脳損傷における NADPHoxygenase
由来活性酸素の動態と機能について: 第
113 回日本解剖学会・全国学術集会、大
分、2008 年 3 月
- ⑪ Satoh K, Shimizu A, Arakawa H,
Sioda S :Radical Scavenging Activity of
Sesamol and Interaction with Vitamin
E: ICPH 2007-3rd Intern.Confer.Food
Facta.
Health Promotion, kyoto, nov. 2007
- ⑫ Watanabe S, Nakamura W, Satoh K,
Sakagami H:Component Analysis and
Antioxidant Activity of Mulberry
Juice:ICPH2007-3rdIntern.Confer.Food
Facta.Heal.Promotion,kyoto,nov.2007

[図書] (計 1 件)

「油脂・脂質の基礎と応用」
—栄養・健康から工業まで—
(社) 日本油化学会編
2009 年 3 月 31 日 280 ページ
5 章 3 節「脂溶性ビタミン」執筆

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 和恵 (SATO KAZUE)
昭和大学・医学部・客員教授
研究者番号: 90053941

(2) 研究分担者

有賀 徹 (ARUGA TOURU)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号: 40266086
塩田 清二 (SIODA SELJI)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号: 80102375
土肥 謙二 (DOHI KENJI)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号: 20349062

(3) 連携研究者