

平成21年6月2日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791328

研究課題名（和文）

経時的生体内活性酸素種測定法の確立および活性酸素種傷害の解明と治療薬の選択

研究課題名（英文）

Establishment of in vivo monitoring of superoxide and investigation of oxidative stress

研究代表者

藤田 基 (FUJITA MOTOKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50380001

研究成果の概要：

本研究では、全合成型の電気化学活性酸素種センサーを用いた経時的生体内活性酸素種測定法を確立した。ラット前脳虚血再灌流モデルおよびエンドトキシン血症において活性酸素種傷害の病態を解明し、治療薬の検討を行った。

ラット前脳虚血再灌流モデルでは、虚血中からスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) の産生を認め、再灌流後から著明な上昇を認めた。また、軽度低体温・高濃度酸素投与は $O_2^{\cdot-}$ の産生を抑制し、活性酸素種傷害を抑制した。高血糖は $O_2^{\cdot-}$ の産生を増悪させ、活性酸素種傷害を悪化させた。治療薬としてアロプリノール、ウリナスタチン、フィゾスチグミンを検討し、各々の薬剤で $O_2^{\cdot-}$ 抑制効果を得た。

ラットエンドトキシン血症では、エンドトキシン投与1時間後よりは $O_2^{\cdot-}$ の産生を認め、活性酸素種傷害・組織障害を認めた。ウリナスタチンにより、 $O_2^{\cdot-}$ の産生は抑制された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：活性酸素種、スーパーオキシドアニオンラジカル、経時的測定法、前脳虚血再灌流、エンドトキシン血症

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) は生体防御機能などにおいて生体にとって重要な機能を司っているが、虚血再灌流障害や重症感染症などの病態では、過剰に産生された ROS が生体に牙を剥き組織障害をきたすことが知られている。生体内の ROS は、そのほとんどがスーパーオキシドアニオ

ンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) から派生したものであり、 $O_2^{\cdot-}$ の動態を把握することが活性酸素種による生体傷害の病態の解明につながると考えられる。しかしながら、 $O_2^{\cdot-}$ は不安定ラジカルであるため生体内での経時的な測定は困難であり、生体内での動態は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、全合成型の電気化学活性酸素種センサーを用いた経時的生体内活性酸素種測定法を確立し、虚血再灌流障害や重症感染症など活性酸素種が影響している病態において $O_2^{\cdot-}$ の動態を把握することにより、活性酸素種による生体傷害の病態を解明する。

3. 研究の方法

(1) ラット前脳虚血再灌流モデルにおける $O_2^{\cdot-}$ の測定

① SOD 投与による $O_2^{\cdot-}$ の検証

ラットの前脳虚血再灌流モデルは全身麻酔、人工呼吸 (吸入酸素濃度 $F_iO_2 : 0.4$) 下に血圧、血液ガス等をモニターし、脱血性低血圧と両側総頸動脈結紮で作成した。

対照群は虚血時に両側総頸動脈結紮は行わず、脱血性低血圧のみとした。前脳虚血再灌流を行う虚血再灌流群、前脳虚血再灌流を行い再灌流 20 分後に SOD を投与する虚血再灌流+SOD 群、および対照群の 3 群で検討を行った。前脳虚血を 20 分間行った後に再灌流を行い、再灌流 60 分後まで観察した。頸静脈内に $O_2^{\cdot-}$ 電極を挿入し、経時的に脳灌流血中の $O_2^{\cdot-}$ 値を測定した。虚血再灌流+SOD 群では、再灌流 20 分後に SOD 5 U/g b.w. を静脈内投与した。再灌流 60 分後に血漿を採取後、冷生食で灌流し脳組織を採取した。

$O_2^{\cdot-}$ は電流値として測定し、虚血前のベース値からの上昇分 ΔI (nA) で検討した。また、 ΔI を単位時間で積分して得られた電荷量 Q (μC 、単位時間に発生した $O_2^{\cdot-}$ 量を反映) の検討も行った (図 1)。

再灌流 60 分後の血漿および脳組織中で脂質過酸化物質であるマロン酸アルデヒド (malondialdehyde: MDA) を測定した。

② 軽度低体温の効果について

前脳虚血 (20 分) 再灌流 (60 分) を行い再灌流直後に体温を $37^\circ C$ に維持する常温群と $32^\circ C$ で維持する低体温群、および対照群の 3 群で検討を行った。

③ 高濃度酸素投与の影響について

前脳虚血 (10 分) 再灌流 (120 分) を行い再灌流後も F_iO_2 を 0.4 に保つ正常酸素群、再灌流後から F_iO_2 を 1.0 に上昇させる高濃度酸素群の 2 群で検討を行った。

④ 高血糖状態の影響について

虚血作成前に 20%ブドウ糖液を投与し血糖値 300 mg/dL 以上を達成した高血糖群、および生食を投与した正常血糖群の 2 群で前脳虚血 (10 分) 再灌流 (120 分) を行い、検討を行った。

⑤ アロプリノール投与の効果について

虚血作成の 24 時間および 1 時間前にアロプリノール 100 $\mu g/g$ を投与するアロプリノール低濃度群、アロプリノール 200 $\mu g/g$ を投与するアロプリノール高濃度群、生食を投与する対照群の 3 群で前脳虚血 (10 分) 再灌流 (120 分) を行い、検討を行った。

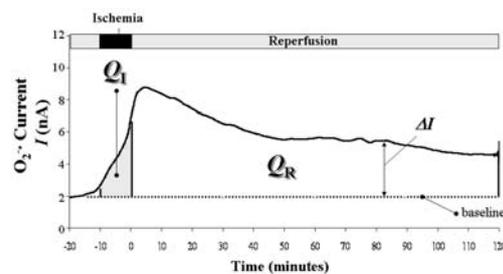
⑥ ウリナスタチン投与の効果について

再灌流直後にウリナスタチン 5 U/g b.w. を静注する UTI 群と同量の生食を投与する対照群の 2 群で前脳虚血 (20 分) 再灌流 (60 分) を行い、検討を行った。

⑦ フィゾスチグミン投与の効果について

虚血作成の 24 時間および 1 時間前にフィゾスチグミン 80 $\mu g/g$ を投与するフィゾスチグミン群、生食を投与する対照群の 2 群で前脳虚血 (10 分) 再灌流 (120 分) を行い、検討を行った。

図1 Evaluation of $O_2^{\cdot-}$ Current



(2) ラットエンドトキシン血症モデルにおける $O_2^{\cdot-}$ の測定

① SOD 投与による $O_2^{\cdot-}$ の検証

ラットのエンドトキシン血症モデルは全身麻酔、人工呼吸 (吸入酸素濃度 $F_iO_2 : 0.4$) 下に血圧、血液ガス等をモニターし、リポポリ多糖類 (LPS) 3 mg/kg b.w. の静脈内投与で作成した。

対照群、LPS 投与を行う LPS 群、LPS 投与後 SOD を 5 U/g b.w./h 持続投与する LPS+SOD 群の 3 群で検討を行った。

対照群は同量の生食投与を行った。右心房内に $O_2^{\cdot-}$ 電極を挿入し、LPS 投与 6 時間後まで経時的に混合静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 値を測定した。また、LPS 投与 6 時間後に血漿を採取し、MDA、可溶性 intracellular adhesion molecule-1 (sICAM1) の測定を行い、脂質過酸化と血管内皮傷害の定量を行った。

② ウリナスタチン投与の効果について

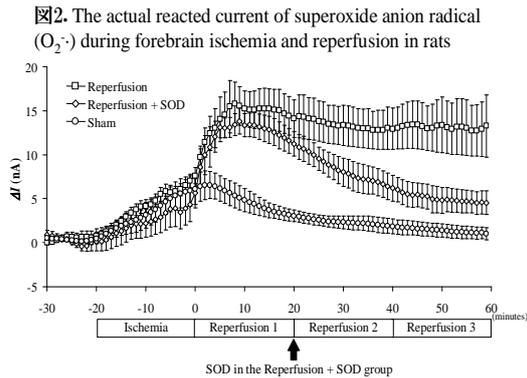
LPS 投与直後にウリナスタチン 5 U/g b.w. を静注する UTI 群と同量の生食を投与する対照群の 2 群で検討を行った。

4. 研究成果

(1) ラット前脳虚血再灌流モデルにおける $O_2^{\cdot-}$ の測定

① SOD 投与による $O_2^{\cdot-}$ の検証

図2に頸静脈内で測定した $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。虚血後から3群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から虚血再灌流群、虚血再灌流+SOD群では電流値の更なる上昇を認めた。虚血再灌流+SOD群では、再灌流20分後のSOD投与後から電流値の低下を認めた。



再灌流後の電荷量を20分毎に算出した (Q_1 , Q_2 , Q_3)。再灌流20分後までは、再灌流群と再灌流+SOD群には差がなかったが、再灌流20分から40分後、40分から60分後では、再灌流+SOD群では、虚血再灌流群に比べ有意に低値であった (Q_2 : $p < 0.05$, Q_3 : $p < 0.01$)。対照群に対し、虚血再灌流を行った2群は、経過中の Q 値は有意に高値であった ($p < 0.01$)

再灌流1時間後の脳組織中および血漿MDAを測定した。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD群の脳組織中のMDAは対照群に対して有意に高値であった ($p < 0.01$)。虚血再灌流群および虚血再灌流+SOD群の間には有意差を認めなかった。虚血再灌流群の血漿MDAは、対照群に対して有意に高値であった ($p < 0.01$)。虚血再灌流+SOD群の血漿MDAは、虚血再灌流群に対して有意に抑制された ($p < 0.05$)。

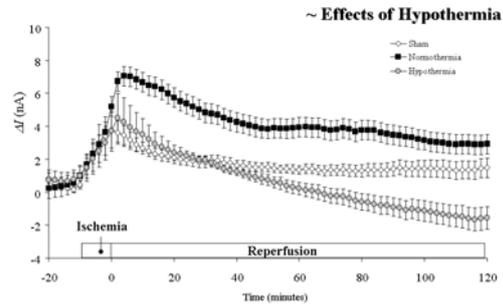
再灌流後1時間の $O_2^{\cdot-}$ 量を反映する Total Q ($Q_1+Q_2+Q_3$)と脳組織中および血漿MDA濃度との相関を検討したところ、脳組織中および血漿MDAは各々Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

② 軽度低体温の効果について

図3に頸静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。虚血後から3群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から正常体温群では電流値の更なる上昇を認めた。対照群および

軽度低体温群は再灌流後から電流値上昇の抑制を認めた。

図3. Mean $O_2^{\cdot-}$ Current (I) during Forebrain Ischemia - Reperfusion in Rats



虚血中の電荷量 Q は3群間で差がなかったが、再灌流後、低体温群で正常体温群に比べ有意に Q 値の抑制を認めた。

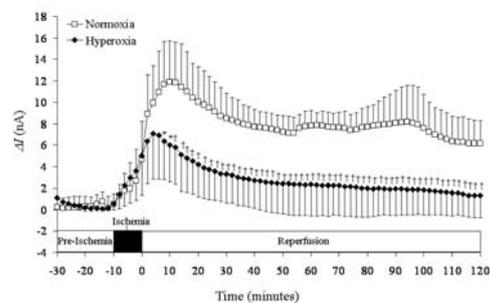
再灌流2時間後の脳組織中および血漿MDAを測定した。正常体温群の脳組織中および血漿中のMDAは対照群に対して有意に高値であった ($p < 0.01$)。低体温群の脳組織中および血漿中のMDAは正常体温群に比べ有意に抑制されていた (脳組織中: $p < 0.05$, 血漿中: $p < 0.01$)。

再灌流後2時間の $O_2^{\cdot-}$ 量を反映する Total Q と脳組織中および血漿MDA濃度との相関を検討したところ、脳組織中および血漿MDAは各々Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

③ 高濃度酸素投与の影響について

図4に頸静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。虚血後から2群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から正常酸素濃度群では電流値の更なる上昇を認めた。高濃度酸素投与群では再灌流後電流値上昇の抑制を認めた。

図4. The actual measured current of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



虚血中の電荷量 Q は両群間で差がなかったが、再灌流後、高濃度酸素投与群の Q 値は正常酸素濃度群に比べ有意に抑制された。

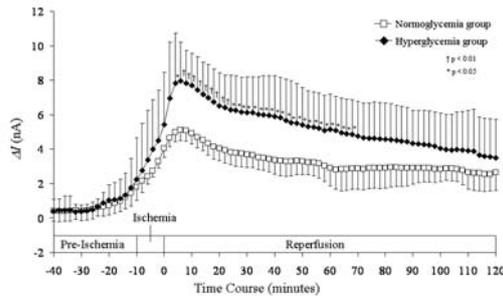
高濃度酸素投与群の脳組織中および血漿中のMDAは正常酸素濃度群に対して有意に

低値であった ($p < 0.01$)。脳組織中および血漿 MDA はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

④ 高血糖状態の影響について

図 5 に頸静脈中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。再灌流直後から高血糖群では正常血糖群に比べ電流値の更なる上昇を認めた。

図5. The actual measured current of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



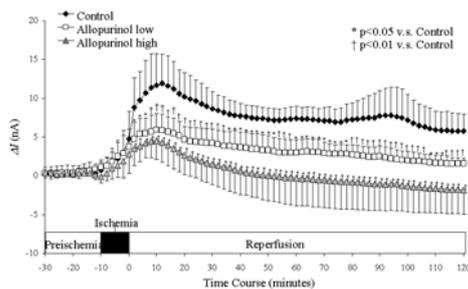
虚血中の電荷量 Q は両群間で差がなかったが、再灌流後、高血糖群の Q 値は正常血糖群に比べ有意に高値であった。

高血糖群の脳組織中および血漿中 MDA は正常血糖群に対して有意に高値であった ($p < 0.05$)。脳組織中および血漿 MDA はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

⑤ アロプリノールの効果について

図 6 に頸静脈中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。再灌流直後からアロプリノール投与群では対照群に比べ濃度依存性に電流値の抑制を認めた。

図6. The actual measured current of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



虚血中の電荷量 Q は両群間で差がなかったが、再灌流後、アロプリノール投与群では対照群に比べ濃度依存性に Q 値の抑制を認めた。

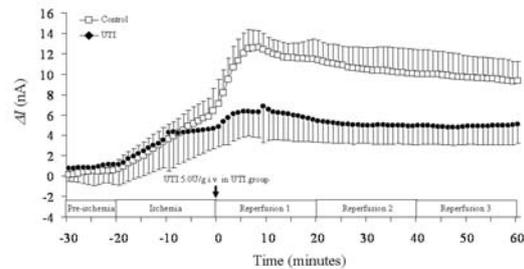
アロプリノール群の脳組織中および血漿中 MDA は対照群に比べ濃度依存性に有意に抑制された ($p < 0.01$)。脳組織中および血漿 MDA はともに Total Q と有意な正の相関を

認めた ($p < 0.01$)。

⑥ ウリナスタチン投与の効果について

図 7 に頸静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。虚血後から 2 群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から対照群では電流値の更なる上昇を認めた。UTI 群では再灌流後電流値上昇の抑制を認めた。

図7. The actual measured current of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



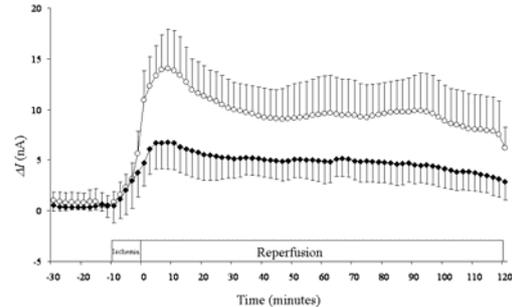
虚血中の電荷量 Q は両群間で差がなかったが、再灌流後、UTI 群では対照群に比べ有意に Q 値の抑制を認めた。

UTI 群の脳組織中および血漿中 MDA は対照群に比べ有意に抑制された ($p < 0.05$)。脳組織中および血漿 MDA はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

⑦ フィゾスチグミン投与の効果について

図 8 に頸静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。虚血後から 2 群ともに電流値の上昇を認め、再灌流直後から対照群では電流値の更なる上昇を認めた。フィゾスチグミン群では再灌流後電流値上昇の抑制を認めた。

図8. The actual measured current of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) in the rat forebrain ischemia-reperfusion model.



虚血中の電荷量 Q は両群間で差がなかったが、再灌流後、フィゾスチグミン群では対照群に比べ有意に Q 値の抑制を認めた。

UTI 群の脳組織中および血漿中 MDA は対照群に比べ有意に抑制された ($p < 0.01$)。脳組織中および血漿 MDA はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

以上の結果から、ラットの前脳虚血再灌流モデルにおいて、虚血中から頸静脈中で $O_2^{\cdot-}$ の産生を認め、再灌流後から著明な上昇を認めた。 $O_2^{\cdot-}$ 値は脳組織中および血漿中の脂質過酸化物質である MDA と有意に相関しており、 $O_2^{\cdot-}$ 値が酸化ストレス障害の指標となることが示唆された。

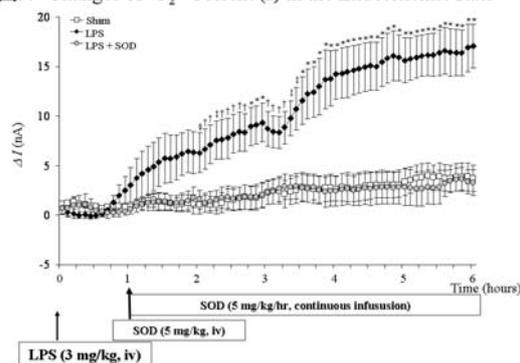
また、軽度低体温・高濃度酸素投与は $O_2^{\cdot-}$ の産生を抑制し、活性酸素種傷害を抑制した。高血糖は $O_2^{\cdot-}$ の産生を増悪させ、活性酸素種傷害を悪化させた。アロプリノール、ウリナスタチン、フィズスチグミンには $O_2^{\cdot-}$ 抑制効果を認め、ラジカル傷害治療薬としての効果が期待された。

(2) ラットエンドトキシン血症における $O_2^{\cdot-}$ の測定

① SOD 投与による $O_2^{\cdot-}$ の検証

図 9 に混合静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。LPS 群において LPS 投与 1 時間後より $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇を認め、5 時間後にはプラトーとなった。SOD の持続投与により電流値の抑制を認めた。

図9. Changes of $O_2^{\cdot-}$ Current (I) in the Endotoxemic Rats



LPS 投与から 6 時間の電荷量 Q は LPS 群で対照群に比べ有意に高値であった ($p < 0.01$)。LPS+SOD 群では LPS 群に比べ有意に抑制された ($p < 0.01$)。

LPS 投与 6 時間後の血漿 MDA は LPS 群で対照群に比べ有意に増加していた ($p < 0.01$)。また、LPS+SOD 群の血漿 MDA も対照群に比べ有意に増加していた ($p < 0.05$)。

LPS 群および LPS+SOD 群の sICAM1 は対照群に比べ有意に増加していた ($p < 0.01$)。

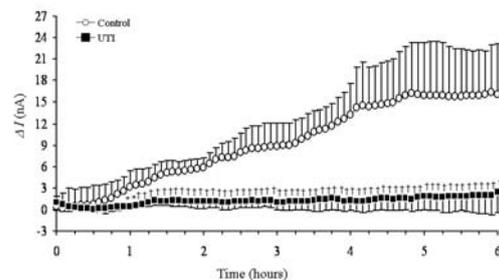
LPS 投与後 6 時間の Q と MDA および sICAM1 との相関を検討したところ、MDA および sICAM1 はともに Total Q と有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

② ウリナスタチン投与の効果について

図 10 に混合静脈血中の $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇値 ΔI を示す。LPS 群において LPS 投与 1 時間後より $O_2^{\cdot-}$ 電流値の上昇を認め、5 時間

後にはプラトーとなった。UTI 群では電流値の抑制を認めた。

図10. Changes of $O_2^{\cdot-}$ Current (I) in the Endotoxemic Rats



LPS 投与から 6 時間の電荷量 Q は UTI 群で対照群に比べ有意に抑制された ($p < 0.01$)。

UTI 群の血漿中 MDA は対照群に比べ有意に抑制されていた ($p < 0.01$)。また、 Q と血漿 MDA の間には有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

UTI 群の血漿中 sICAM1 は対照群に比べ有意に抑制されていた ($p < 0.01$)。また、Total Q と血漿 sICAM1 の間には有意な正の相関を認めた ($p < 0.01$)。

以上の結果から、ラットエンドトキシン血症モデルにおいて、混合静脈血中で $O_2^{\cdot-}$ の産生を認めた。また、 $O_2^{\cdot-}$ 値は血漿中の脂質過酸化物質である MDA および血管内皮傷害の指標である sICAM1 と有意に相関しており、 $O_2^{\cdot-}$ 値が酸化ストレス障害および血管内皮障害の指標となることが示唆された。

また、ウリナスタチンには $O_2^{\cdot-}$ 抑制効果を認め、ラジカル傷害治療薬としての効果が期待された。

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 前川剛志、藤田基、生体内スーパーオキシドラジカルモニタリング：新技術による各種病態把握と治療手段としての可能性、第 36 回日本集中治療医学会学術集会、2009 年 2 月 27 日、大阪
- ② 藤田基、Moderate Hypothermia Suppresses Superoxide Radical Generation in the Jugular Vein in the Forebrain Ischemia-Reperfusion Rat、The XIV Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (14th SFRR)、2008 年 10 月 20 日、北京

- ③ 笠岡俊志、藤田基、Xanthine Oxidase is the Major Source of Superoxide Radical in the Forebrain Ischemia-Reperfusion Rat、The XIV Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (14th SFRR)、2008年10月18日、北京
- ④ 鶴田良介、藤田基、Cholinergic Agonist, Physostigmine inhibits Superoxide Radical Generation in the Jugular Vein in the Forebrain Ischemia-Reperfusion Rat、The XIV Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (14th SFRR)、2008年10月18日、北京
- ⑤ 藤田基、ラット前脳虚血再灌流モデルにおける血流中スーパーオキシドラジカル測定法の確立とスーパーオキシド-HMGB1の相関について、第36回日本救急医学会総会、2008年10月15日、札幌
- ⑥ 藤田基、脳虚血再灌流時のスーパーオキシドモニタリング、第14回脳代謝モニタリング研究会、2008年7月5日、東京
- ⑦ 藤田基、臨床応用を意図したスーパーオキシド電極による生体内持続ラジカル測定、第5回“フリーラジカルと脳疾患”西日本研究会学術集会、2007年11月10日、大阪
- ⑧ 藤田基、In vivo detection of superoxide anion radicals by a newly developed electrochemical sensor in brain ischemia-reperfusion rats、Brain '07 & Brain PET '07、2007年5月22日、大阪

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 基 (FUJITA MOTOKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50380001

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし