

機関番号 : 26201

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20500714

研究課題名 (和文) パーキンソンモデル動物における, 香辛料成分の発症後病態進行抑制効果に関する研究

研究課題名 (英文) Effects of zingerone and eugenol on the pathological progress in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease model mouse.

研究代表者

加太 英明 (KABUTO HIDEAKI)

香川県立保健医療大学・教養部・教授

研究者番号 : 00321266

研究成果の概要 (和文) : 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を脳室内に投与したパーキンソン病 (PD) モデルマウスを用いて実験を行った。我々はすでに丁子の成分オイゲノールもしくは生姜の成分ジンゲロンには, 6-OHDA による脳線条体内ドーパミン (DA) 低下に対して予防効果があることを報告している。しかしながら, 6-OHDA を投与した後にこれら香辛料成分を投与すると, DA の低下が増強され, 内因性活性酸素種消去物質であるグルタチオンおよびL-アスコルビン酸の酸化型の増加が認められた。また, ジンゲロン投与により, 活性酸素種消去酵素であるカタラーゼ活性の低下が認められた。これ等の結果より, PD 発症後にオイゲノールやジンゲロンを摂取すると, 活性酸素種の生成の増加, 抗酸化酵素活性の低下が起り, 酸化的障害が亢進されることが示唆された。すなわちオイゲノールやジンゲロンは PD に対して予防効果はあるものの, 発症後に摂取すると病態を悪化させる可能性のあることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : We examined the effects of zingerone and eugenol, essential oils extracted from ginger and cloves, on the dopamine (DA) concentration and antioxidant activities in the mouse striatum after 6-hydroxydopamine (6-OHDA) administration and L-DOPA treatment. Daily oral administration of eugenol/zingerone and injection of L-DOPA intraperitoneally for 4 weeks following a single 6-OHDA injection did not improve abnormal behaviors induced by L-DOPA treatment. 6-OHDA reduced the DA level in the striatum, zingerone and eugenol enhanced the reduction of striatal DA and its metabolites. Zingerone decreased catalase activity and increased the oxidized L-ascorbate level in the striatum. We previously reported that pre-treatment with zingerone or eugenol prevents 6-OHDA-induced DA depression by preventing lipid peroxidation. However, the present study shows that post-treatment with these substances enhanced the DA decrease. These substances had adverse effects dependent on the time of administration relative to model PD onset. These results suggest that we should be wary of ingesting these spice elements after the onset of PD symptoms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：神経化学，総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：パーキンソン病，香辛料，病態進行，L-DOPA，健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

近年，機能性食品の研究開発，中でも酸化ストレスに対する予防食の開発が注目されている。すなわち，活性酸素種によるDNAや脂質の過酸化が，動脈硬化症，ガン，肝疾患，神経変性疾患，老化の主な原因と考えられているが，抗酸化物質を含む食品の摂取によりこれら疾患の発症や進行が防止できるのではないかと期待されている。ウコンの成分であるクルクミン，丁子の成分であるオイゲノール，唐辛子の成分であるカプサイシンなどいくつかの香辛料の成分は，活性酸素の消去活性があり，培養細胞や組織ホモジネイトを使用した実験では酸化的障害に対する保護効果が報告されている(井上正康編「活性酸素と医食同源」共立出版)。パーキンソン病(PD)は，黒質・線条体中のドーパミン(DA)神経細胞の脱落を伴う神経変性疾患であり，その細胞死に活性酸素種が関与していると考えられている(Kondo, Ann NY Acad Sci, 1996, 786:206-216)。PDモデル動物を用いた実験では，抗酸化物質の投与や活性酸素種処理酵素の増強が予防的にはたらく事が示されている(Cadet et al, Brain Res, 1989, 476:10-15)。また，6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を脳内に投与すると，DA神経細胞の脱落が認められ，運動失調をきたすこ

と，PD患者の尿中より6-OHDAが検出されたことより，6-OHDAを投与したラットやマウスは，よいPDモデル動物と考えられている(Tolwani et al, Lab Anim Sci, 1999, 49:363-371)。

我々は，すでに遺伝的てんかんモデルであるE1マウスに胡椒の成分パイペリンを投与するとけいれん発作が抑制されること(Mori et al, Neurochem Res, 1985, 10:1269-1275)，鉄塩投与により作成した外傷性てんかんモデルラットに活性酸素消去作用を持つ，茶葉タンニン，パパイヤ抽出物などの食品成分を投与すると脳組織の脂質過酸化が抑制され，脳波におけるけいれん発作波の出現を阻止すること(Yokoi et al, Jpn J Psychiatr Neurol, 1989, 43:552-553)を報告している，さらに6-OHDA投与によるPDモデルマウスに生姜の成分であるジンゲロンやオイゲノールを投与することにより，活性酸素種処理酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性や，内在性抗酸化物質でありまた活性酸素種処理酵素の基質であるグルタチオン(GSH)濃度が増加し，脳線条体内DAの低下が抑制されることを明らかにしている(Kabuto et al, Neurochem Res, 2005, 30:325-332, Kabuto et al, Biol Pharm Bull, 2007, 30:423-427)。

以上の結果は，神経変性疾患モデル動物にお

いて、活性酸素種除去活性を持つ物質が、神経細胞保護作用をもつこと、活性酸素種処理酵素や内在性抗酸化物質の誘導に影響をおよぼすことを示している。しかしながらこれらの結果はすべてその予防効果を検証したものである。

PDの治療薬としては一般にL-DOPAが使われるが、L-DOPA投与により病状は改善するものの病態の進行は早まることが知られている。小川らはPDモデル動物に対してL-DOPAを投与すると脳の酸化的障害が増加することを報告している (Ogawa et al, Neurosci Lett, 1994, 171:55-58)。すなわち、L-DOPA投与によりDA代謝が亢進し病状は改善されるものの、その際発生する活性酸素種がDA神経に対して酸化的障害を与えていると考えられている。

2. 研究の目的

内因性のPD原因物質であると考えられている6-OHDAを脳室内に投与した後、病状改善薬であるL-DOPAとともにオイゲノールもしくはジングロンをマウスに経口投与し、その病態改善効果および神経系への酸化的障害の進行に対する抑制効果をマウスの行動と黒質・線条体中のDA濃度を指標として検討する。また、活性酸素種処理酵素の誘導、抗酸化物質の脳内濃度についても検討する。食品の一つである香辛料の持つ機能性を科学的に検証し、酸化的障害により引き起こされる疾病に対して香辛料摂取による予防、および進行防止効果を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

ICR 雄性マウス (30g, (株)チャールズリバー) を使用した。購入後、飼育環境(飼料:オリエンタル酵母社製MF, 室温 25°C, 明暗サイクル 12-12 (明期 7 AM~7 PM))にならすため、

1週間飼育後に実験を行った。

動物実験は「香川県立保健医療大学動物実験に関する指針」に従っておこなった。

(2) 動物への処置

マウスを5群に分けた。第1群(対照群), 第2群(L-DOPA投与群)に対しては、生理食塩水 2 μ L を脳室内投与した。第3群(6-OHDA+L-DOPA投与群), 第4群(6-OHDA+L-DOPA+ジングロン投与群), 第5群(6-OHDA+L-DOPA+オイゲノール投与群)に対しては 6-OHDA 60 μ g を 2 μ L の生理食塩水に溶解し脳室内投与した。投与 24 時間後より、第2-5群に対してL-DOPA を 200 mg/kg となるように 1日1回生理食塩水に溶解し、腹腔内投与した。第1群には同量の生理食塩水を投与した。第1-3群に対しては1%エタノール水溶液を自由に摂取させ、第4群にはジングロン 4 nmol/ml を含む1%エタノール水溶液、第5群にはオイゲノール 60nmol/mL を含む1%エタノール水溶液を自由に摂取させた。実験期間中マウスは1日約5mLの水を摂取した。従って、マウス1匹あたりジングロンは0.7 μ mol/kg, オイゲノールは10 μ mol/kg 摂取したこととなる。L-DOPA投与後2分間行動を観察した。4週間投与後、L-DOPA最終投与24時間後にペントバルビタール麻酔下にマウスを屠殺し脳を取り出し、線条体を分離、-80°Cにて分析まで保存した。

(3) DA およびその代謝産物ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC), ホモバニリン酸(HVA)の測定

マウス線条体に、氷冷した10mM EDTAを含む200 mM 過塩素酸溶液を加えホモジナイズ、4°C 10,000 x gにて遠心分離を行い、得られた上清を孔径0.45 μ mのフィルターに通した後、電気化学検出器(株エイコム)付き高速液体クロマトグラフィー(株島津)に注入す

ることにより測定した。

(4) SOD 活性

SOD 活性は、SOD テストワコー(和光純薬工業株)を用いて測定した。

(5)カタラーゼ活性

カタラーゼ活性は、Aebi により報告された方法に従って行った(Aebi, 1984, Method in Enzymology, 105:121-126)。

(6) グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性

GPx 活性はバイオテック GPx-340 キット(株OXIS インターナショナル) を用いて行った。

(7) GSH および L-アスコルビン酸濃度

組織を 10 倍量の氷冷した 20 mM デフロキサミンメシレートを含む 5%メタリン酸溶液でホモジナイズ、遠心分離後、得られた上清を電気化学検出器(株エイコム)付き高速液体クロマトグラフィー(株島津)に注入して測定した。

(8) タンパク質量

タンパク質量は、牛血清アルブミンを標準物質として、Lowry らの方法(Lowry et al, 1951, J. Biol. Chem., 193:265-275) に従って測定した。

(9) 統計計算

すべてのデータは、平均 ± SEM で表した。有意差検定は、一元配置分散分析により F 値が有意であったものに対して、Scheffe の F テストを用いておこない、 $p < 0.05$ であったものを有意と判定した。

4. 研究成果

(1) 行動への影響

L-DOPA 投与開始より 3 週目以降より、6-OHDA および L-DOPA を投与したマウス数例において、L-DOPA 投与直後より後肢を突っ張るような異常行動が見られた。この行動異常は、ジングロンやオイゲノール投与によって抑制されなかった。

(2) 線条体内 DA, DOPAC, HVA 濃度 (図 1)

6-OHDA 投与により、対照群と比較して、DA, DOPAC, HVA 濃度に有意な低下が認められた。ジングロンおよびオイゲノール投与は、その低下をさらに増強した。特にジングロン投与による DA 低下は、6-OHDA+L-DOPA 投与群と比較しても有意となった。L-DOPA のみ投与では、DA およびその代謝産物濃度に変化は認められなかった。

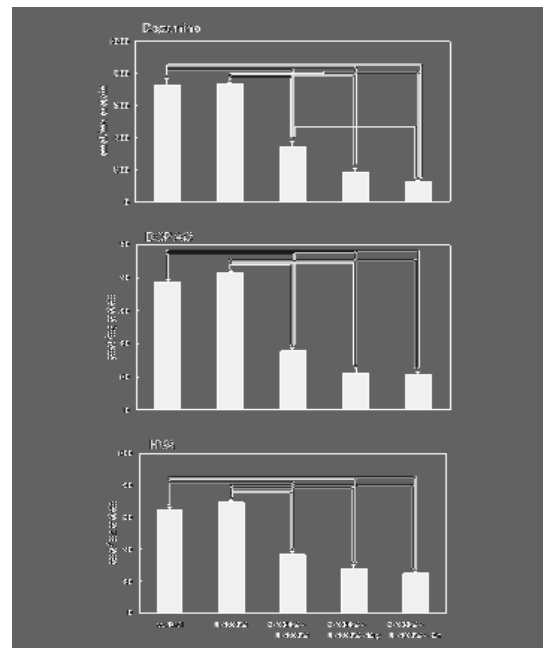


図 1. 6-OHDA 投与後、L-DOPA, およびジングロンもしくはオイゲノールを 4 週間投与後の脳線条体中の DA とその代謝産物濃度。

データは、mean ± SEM (n=4-14) で表し、有意差検定は一元配置分散分析により F 値が有意であったものに対して、Scheffe の F テストを用いて $p < 0.05$ であったものを有意と判定した。

(3) SOD, カタラーゼ, GPx 活性 (図 2)

6-OHDA, L-DOPA, オイゲノール投与によりマウス脳線条体内 SOD, カタラーゼ, GPx 活性に変化は見られなかった。しかしながら、6-OHDA+L-DOPA+ジングロン投与により、対照群と比較して、カタラーゼ活性の有意な低

下が認められた。

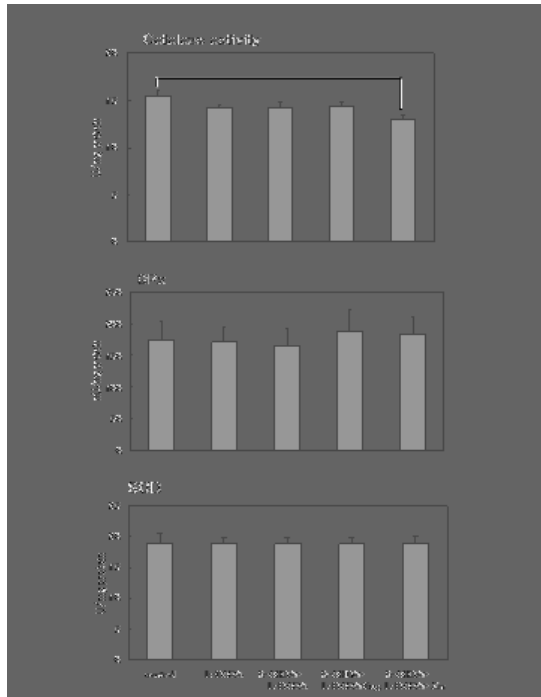


図2 マウス線条体中のカタラーゼ, GPx, SOD 活性

各シンボルは 図1 と同じ (n=6 to 8).

(4) 酸化型 (GSSG) および還元型 (GSH) グルタチオン濃度 (図3)

いずれの処置群においても、線条体中の酸化型、還元型グルタチオン濃度に有意な変化は認められなかった。

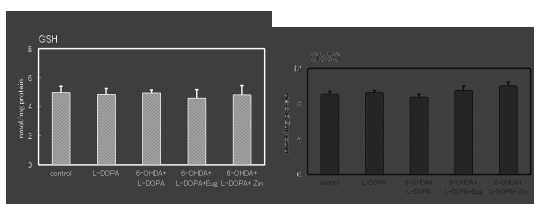


図3 マウス線条体内 GSH および GSSG 濃度各シンボルは 図1 と同じ (n=6 to 8).

(5) 酸化型および還元型 L-アスコルビン酸 (V.C) 濃度 (図4)

6-OHDA, L-DOPA, ジンゲロン, オイゲノールいずれの投与も、マウス線条体内還元型 L-アスコルビン酸濃度に対しては、有意な変化

はもたらさなかった。しかしながら、6-OHDA+L-DOPA+ジンゲロン投与により、対照群に比べ酸化型 L-アスコルビン酸の増加が認められた。

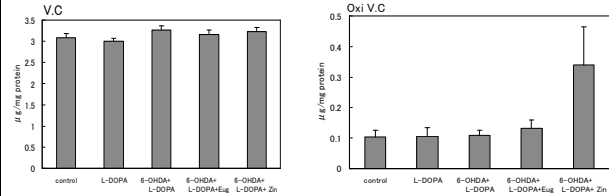


図4 マウス線条体内 全および酸化型 L-アスコルビン酸濃度

各シンボルは図1 と同じ (n=6 to 8).

(6) 考察

L-DOPA は、PD 患者に対する治療薬として一般的に使われ、その症状を改善するが、長期投与によりその効果が減退すること、ジスキネジア等の異常行動を起こすなどの副作用が知られている。我々は、ジンゲロンやオイゲノールがこれら副作用に対して、有効かどうかを検証した。その結果、6-OHDA 投与後 L-DOPA を投与し続けると3週間ほど後から後肢を突っ張るような異常行動を示し、ジンゲロンやオイゲノールを投与してもその異常行動は抑制されなかった。6-OHDA 投与後 L-DOPA を投与したマウス線条体中の DA 濃度は、対照群の半分ほどになっていた。6-OHDA 投与後無処置だと4週間には、線条体 DA 濃度は、対照群と変わらないまでに回復することが知られている (Ogawa et al, Neurosci Lett, 1994, 171:55-58)。6-OHDA 投与後 L-DOPA と共にジンゲロンもしくはオイゲノールを投与すると、DA 濃度の回復は抑制されたが、これは、これら香辛料成分が、L-DOPA による酸化ストレスを増加させたためかもしれない。

ジンゲロン投与により、カタラーゼ活性の

有意な低下がみられた。今回マウスに対して投与したジングロン濃度は、直接ジングロンがカタラーゼ活性を抑制するには低すぎるため、ジングロンはその受容体もしくは他の何らかの機構を介して、カタラーゼ遺伝子の発現を促したのではないかと考えられる。またジングロン投与により、酸化型のL-アスコルビン酸濃度が増加した。これらの結果は、ジングロン投与によりマウス脳線条体中のカタラーゼ活性が低下し、過酸化水素消去活性が弱まり、活性酸素種の増加が起これ、酸化型L-アスコルビン酸が増加したと考えられる。増加した酸化ストレスは、DA神経の障害をもたらし、DA濃度の回復を阻害したと考えられる。

ジングロンやオイゲノールには、有用な効果が報告されている (Aggarwal et al, *Planta Med*, 2008, 74:1560-1569. Hasana-Ranjbar et al, *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8:2-10. Kundu et al, *Forum Nutr*, 2009, 61:182-192)。しかしながら、今回の我々の結果は、脳に障害を受けた後もしくはPDが発症した後にこれら香辛料成分を摂取すると、酸化的障害が増加し、病態進行が促進する可能性があることを示唆する。

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1件)

- ① Kabuto H, Amakawa M, Mankura M, Yamanushi TT, and Mori A. Docosahexaenoic acid ethyl ester enhances 6-hydroxydopamine-induced neuronal damage by induction of lipid peroxidation in mouse striatum. *Neurochem Res*. 査読有 34 (2009) 1299-1303.

[学会発表] (計5件)

- ① 加太英明, 山主智子, 万倉三正, 高山房子. パーキンソン病モデルマウスの脳内ドーパミン低下に及ぼすスクアレンおよびスクアランの影響. 第65回日本栄養・食糧学会大会 2011年5月14日(東京)
- ② 加太英明, 山主智子, 高山房子, 万倉三正. 症状改善薬投与に伴うパーキンソン病モデルマウスの行動異常・病態進行に及ぼす香辛料成分の影響. 第64回日本栄養・食糧学会大会 2010年5月22日(徳島市)
- ③ 加太英明, 山主智子. パーキンソン病モデルマウスを用いた, 症状改善薬投与に伴う, 行動異常・病態進行に及ぼす香辛料成分の影響に関する研究. 日本生薬学会第56回年会 2009年10月4日(京都市)
- ④ 山主智子, 加太英明, 万倉三正. パーキンソン病モデルマウスの脳内ドーパミン低下におよぼすニンニク抽出物の影響. 日本生薬学会第56回年会 2009年10月4日(京都市)
- ⑤ 加太英明, 天川雅夫, 万倉三正, 森昭胤. パーキンソン病モデルマウスの脳内ドーパミン低下に及ぼすドコサヘキサエン酸の影響, 日本生薬学会 第55回年会 2008年9月20日(長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加太英明 (KABUTO HIDEAKI)
香川県立保健医療大学・教養部・教授
研究者番号: 00321266

(2) 研究分担者

山主智子 (YAMANUSHI TOMOKO)
香川県立保健医療大学・教養部・准教授
研究者番号: 40382395