

第 19 回国際栄養学会議 (2009. 10. 4-10. 9)  
マンドゥ・ゴーナム博士の発表論文

鉄分を基礎とする飲料 HYDRO-FERRATE 溶液 (MRN-100)

は

高齢ラットにおける酸化ストレスに対し防護

Nariman K. Badr El-Din [a], Eman Noaman [b], Mamdooh Ghoneum [c], and  
Salma M. EL-Banna [d]

[a] マンスーラ大学理学部動物学科 (エジプト、マンスーラ)

[b] エジプト国立放射線・技術センター放射線生物学科(エジプト、カイロ)

[c] チャールズ・ドリュウ医科大学耳鼻咽喉科 (米国カリフォルニア州ロサンジェルス)

[d] エジプト国立放射線・技術センター薬物・放射線研究学科(エジプト、カイロ)

## 背 景

加齢のプロセスは活性酸素種（ROS）の形成と密接に関連していると考えられている[1]。それら ROS は高反応性で核酸、蛋白質、および脂質など多くの生物高分子に損傷を与える場合がある[2-5]。ROS が媒介する攻撃に特有な結果は酸化損傷高分子の蓄積で、遺伝子突然変異および細胞老化に帰結する可能性がある[6]。

本研究は鉄分を基礎とする飲料で、2 価および 3 価の鉄酸塩から導かれた hydro-ferrate 溶液（MRN-100）の、高齢ラットにおける酸化ストレスに対する抗酸化作用を調べる目的で実施した。MRN-100 が *in vitro* にて、マウス脾臓細胞における酸化ストレス誘導アポトーシスに対し防護効果を示すことを、われわれは最近報告している[7]。従ってマロンジアルデヒド（MDA）によって表される脂質過酸化、総フリーラジカル、カルボニル化蛋白質成分（PCO）によって示される酸化的蛋白質損傷、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ（CAT）、およびグルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）を含む抗酸化スカベンジャー酵素の活性、グルタチオン（GSH）および総チオール（TSH）の減少量を測定し、*in vivo* における酸化ストレスに対する効果を調べることはわれわれの関心事であった。加齢における窒素ラジカルの役割を調べるため、酸化最終産物の一酸化窒素を調べた。結果は 40 日間にわたる、高齢ラットへの MRN-100 の毎日投与が以下をもたらすことを示した。1) 酸化ストレスのバイオマーカーである MDA、NO、PCO、および総フリーラジカル量の有意な抑制、および 2) GSH および TSH 成分、および抗酸化酵素の SOD、CAT、および GPx の顕著な増加。

## 材料および方法

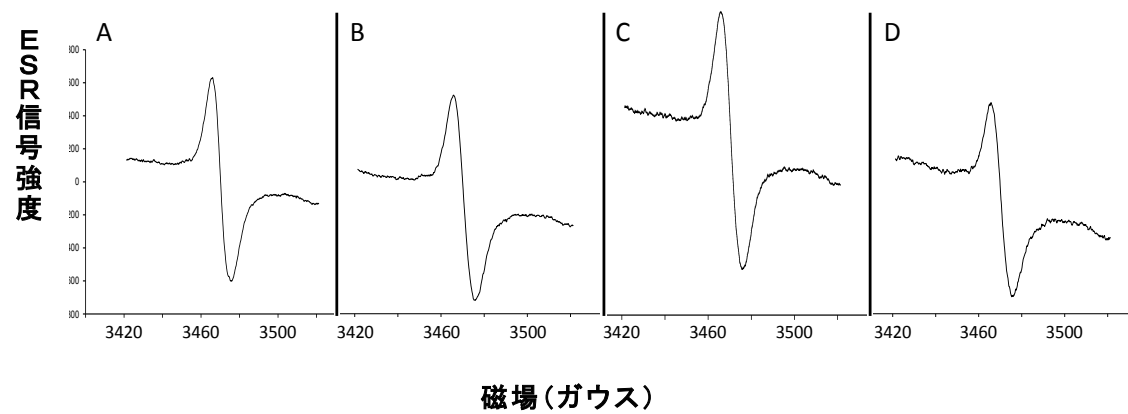
**MRN-100。**MRN-100 は 2 価および 3 価の鉄酸塩から導かれた鉄系化合物で、蒸留水(DW)を使用して  $\text{Fe}^{2+}$  および  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの濃度が  $\sim 2 \times 10^{-12} \text{ mol/l}$  となるように準備した。MRN-100 はファイトシンに由来するが、ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含む植物抽出液で米、麦、ダイコン種子に含まれる。MRN-100 は株式会社エイ・シー・エム（日本）が提供した。

**実験動物および実験デザイン。**24 匹の若年（4 月齢）および高齢（22）の雄の Wister ラットを、照明コントロールおよび温度コントロール（ $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ）付の部屋で 1 匹ずつ檻に入れ、標準的な実験動物用角ペレットを与えた。ラットを 2 つの大きなグループに分けた。グループ I は正常な若年ラット、グループ II は正常な高齢ラットである。各グループをさらに 2 つの群に均等に分けた。非処置の対照群と MRN-100 処置群である。対照群と処置群は 40 日間、それぞれ水道水と hydro-ferrate 溶液（MRN-100）を自由に摂取した。MRN-100 処置群の若年および高齢のラットの水分摂取量と体重は、実験期間を通じて対応する対照群と同等であった。

**試料採取。**41 日目にラットを、16 時間の断食後に安楽死させ、血液をヘパリン処理済チューブにて採取した。肝臓および脳を切除し、氷温の生理食塩水にて洗浄し、氷温のリン酸緩衝液（ $0.1 \text{ mol/L}$ 、 $\text{pH} 7.4$ ）中で均質化した。浅麻酔の後、ヘパリン処理済シリンジを使用して心穿刺により全血を採取し、一部を電子スピン共鳴法（ESR）による総フリーラジカル測定に使用した。溶血血液を作製し、GSH、SOD、CAT、および GPx の減少量推定に使用した。ヘパリン処理血液から分離した血漿は MDA および NO 濃度の測定に使用した。さらに総チオール、総蛋白、カルボニル化蛋白を評価した。

## 結 果

図1： 凍結乾燥血液標本のESRスペクトル



若年および高齢のラットに 40 日間、MRN-100 を投与（MRN-100 群）、または水道水のみを与えた（対照群）。浅麻酔の後、ヘパリン処理済シリンジを使用して心穿刺により全血を採取し、ESR により総フリーラジカルを解析した。A) 若年対照（非処置）群、B) 若年 MRN-100 処置群、C) 高齢対照（非処置）群、D) 高齢 MRN-100 処置群。

図2A： TSH濃度プロファイル、若年対照に対する%

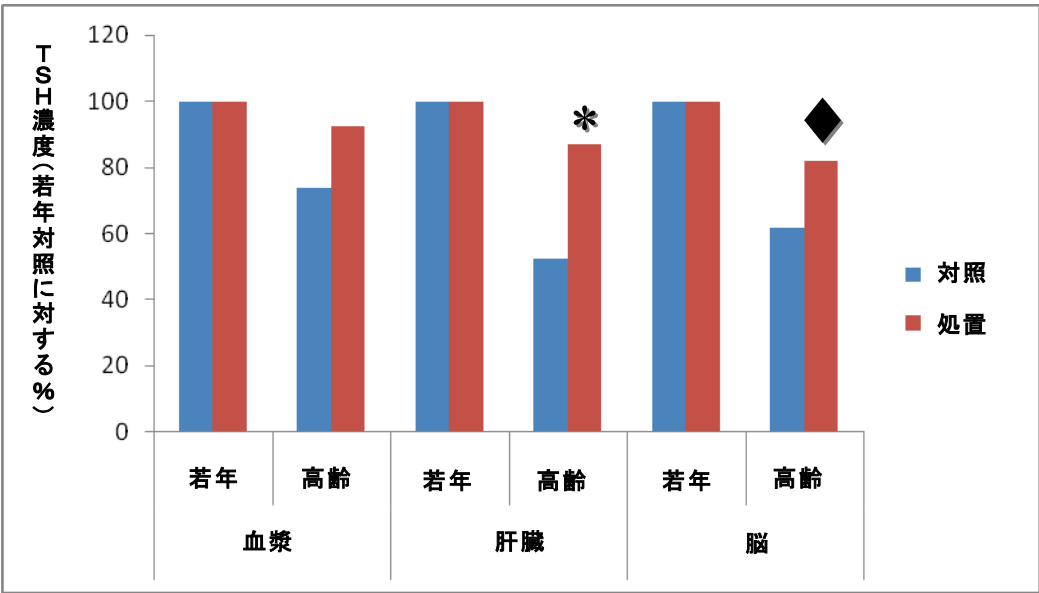


図2A：TSH (total thiols) 総チオール。対象の若年ラット群と比較して高齢の非処置ラット群においてTSH量の有意な減少が観察された。高齢ラットにおけるTSH量に関しては、3種類の生体試料の間で反応に差があった。MRN-100の投与は高齢ラットにおけるTSH量の有意な増加をもたらし、若年ラットと同程度まで増加させた。というグラフです。

チオールは、生体内の主要な抗酸化成分である。

図2B： GSH濃度プロファイル、若年対照に対する%

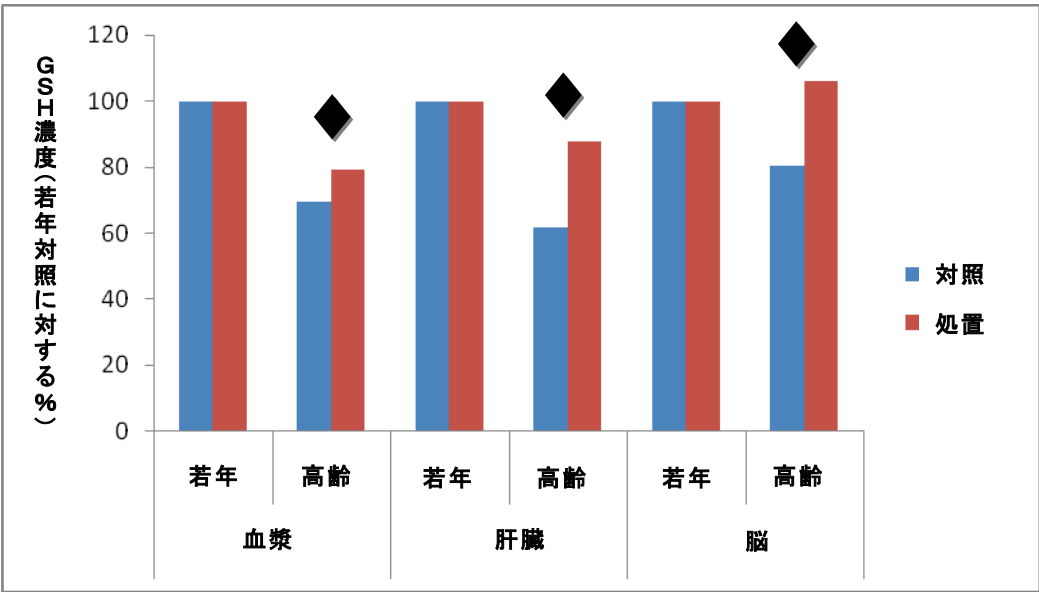


図 2 B : G S H (Glutathione) グルタチオン。若年ラットと比較して高齡ラットの GSH 平均濃度は、高度に有意な減少を示した。 MRN-100 の投与は高齡ラットにおける GSH 量を若年対象と同程度まで上昇させた。というグラフです。

グルタチオン (G S H) 生体内に存在する主要な抗酸化物質のひとつ。グルタミン酸、システイン、グリシンの 3 つのアミノ酸からなるトリペプチドで、さまざまな活性酸素の除去に働き、神経系では活性酸素による神経障害に対して、保護的に働いていると考えられる。

図3A： MDA濃度プロファイル、若年対照に対する%

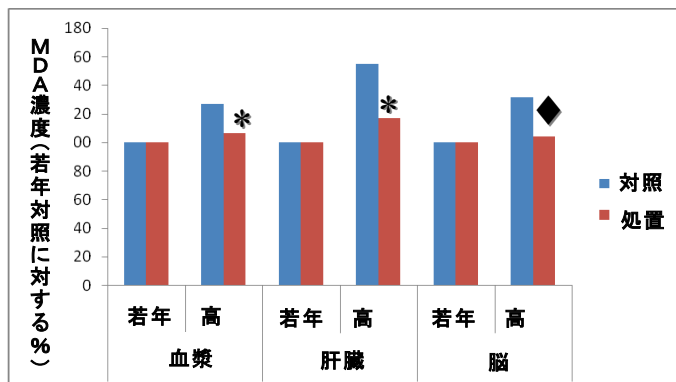


図 3 A は、MDA (マロンジアルデヒド：脂質過酸化分解生成物の一種で脂質過酸化の主要なマーカー) の量。MRN-100 による処置を施した若年および高齡のラットの血漿、肝臓、および脳における MDA の量を測定し脂質過酸化を示した。平均 MDA 量は対照の若年ラットと比較して高齡ラットで顕著な上昇を示した。MRN-100 による処置は高齡ラットにおける MDA 量の有意な低下をもたらし、対照の若年ラットと同程度まで低下させた。MRN-100 の効果はすべての組織で観察された。というグラフです。

マロンジアルデヒド (MDA : malondialdehyde) とは脂質過酸化分解生成物のひとつであり、脂質過酸化の主要なマーカーとして良く用いられます。多価不飽和脂肪酸は、活性酸素種/フリーラジカルによる酸化を受けやすく、たとえばヒドロキシラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) と容易に反応して脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOOH}$ ) と脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ ) を形成します。又、脂質ペルオキシラジカル ( $\text{LOO}\cdot$ ) は、分子内二重結合に反応して環状エンドペルオキシドを形成し、これが更に分解されて、マロンジアルデヒド (MDA : malondialdehyde) が形成されます。

図 3B： NO 濃度プロファイル、若年対照に対する%

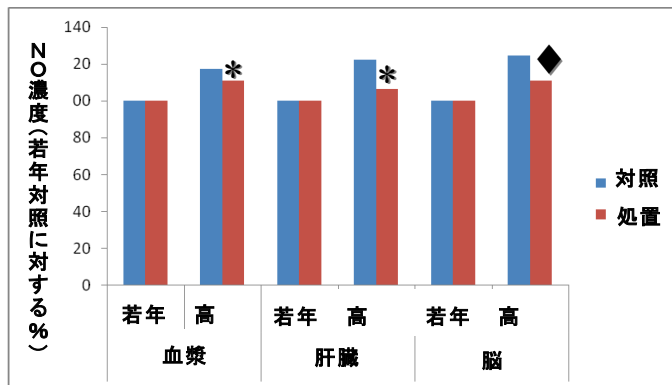


図 3 Bは、加齢における窒素ラジカルの役割を調べるため、酸化最終産物の一酸化窒素（NO）を調べた。一酸化窒素量は高齢の比処置ラットにおいて顕著な上昇を示し、平均値は対照の若年ラットと比較してそれぞれ有意に高かった。MRN-100 の摂取は高齢ラット群において血漿、肝臓、および脳の一酸化窒素量を有意に低下させ、若年の比処置ラットの値の範囲内まで低下させた。（\*低下したほうが良い。）

図 3C： PCO 濃度プロファイル、若年対照に対する%

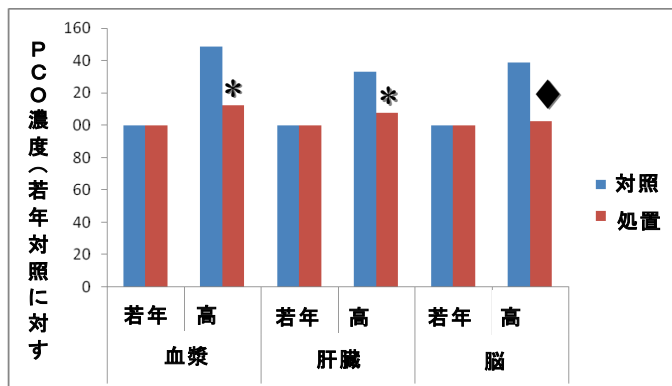


図 3 Cは、PCO（protein carbonyl content）カルボニル化蛋白質。対照の若年ラットと比較して、高齢の比処置ラットはPCO成分の有意な増加を示した。MRN-100 の投与が高齢ラットにおけるカルボニル基の量を有意に抑制し、対照の若年ラットの値まで低下させたことを示している。というグラフです。  
蛋白質の酸化損傷は、カルボニル化蛋白質（PCO）値の上昇、及び蛋白チオール（TSH）の減少に反映される。

図4A： SOD濃度プロファイル、若年対照に対する%

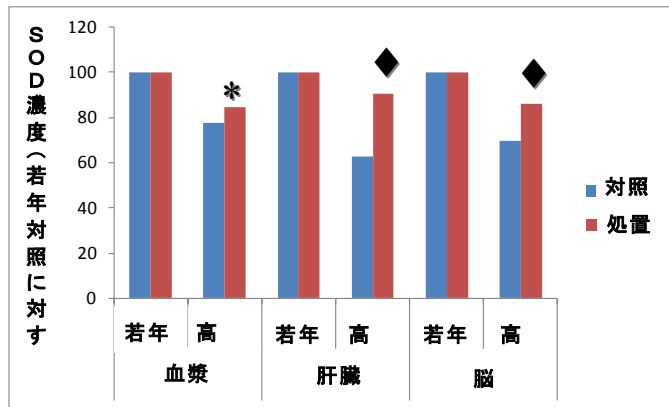


図 4 A：SOD（Superoxide dismutase）スーパーオキシドディスムターゼは、酵素のひとつであり、酸化ストレスを減少させる役割を持つ。若年および高齢ラットによる MRN-100 の摂取は概して、活性を増大する傾向を示した。というグラフです。

図4B： CAT濃度プロファイル、若年対照に対する%

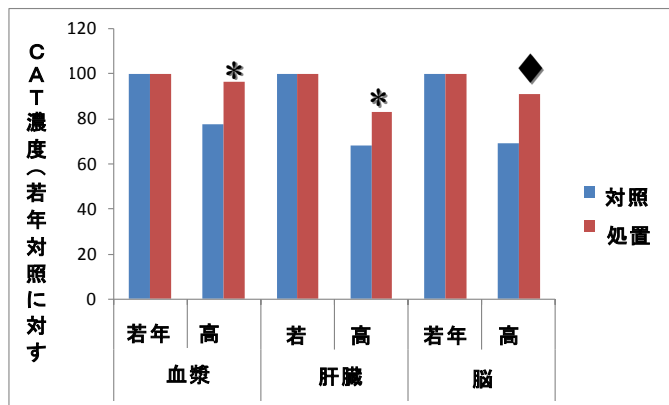


図 4 B：CAT（Catalase）カタラーゼ。過酸化水素を不均化して酸素と水に変える反応を触媒する酵素。若年および高齢ラットによる MRN-100 の摂取は概して、抗酸化酵素の活性を増大する傾向を示した。というグラフです。



図4C： GPx濃度プロファイル、若年対照に対する%

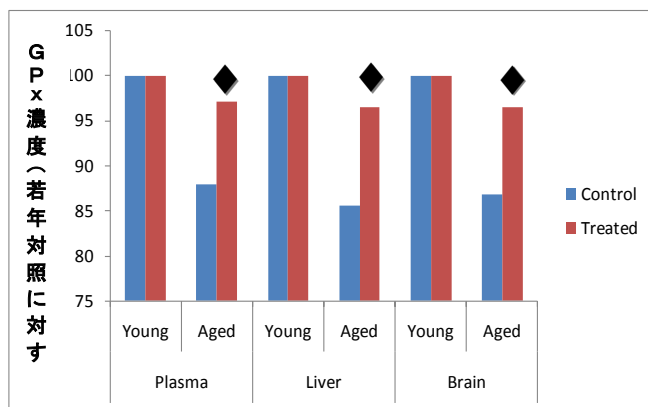


図4C：GPx（glutathione peroxidase）グルタチオンペルオキシダーゼ。若年および高齢ラットによるMRN-100の摂取は概して、抗酸化酵素の活性を増大する傾向を示した。というグラフです。

グルタチオンペルオキシダーゼは活性中心にセレンを有する酵素で、グルタチオン（GSH）の存在下で過酸化水素（ $H_2O_2$ ）を水に還元する他、過酸化脂質（LOOH）を還元する機能を有す。また近年、高齢者（女性）において、加齢に伴い全血中のGPx活性が低下することが、報告されています。SOD、CATと共に生体内において重要な抗酸化作用を担っていると考えられています。

## 結 論

結論として本研究は、MRN-100が内因性抗酸化酵素を増加させて、酸化ストレスのバイオマーカーを抑制することを示している。従って鉄分を基礎とする飲料MRN-100の毎日投与は加齢関連酸化ストレスに対する防護効果をもたらすと考えられる。

## 謝 辞

本研究は株式会社エイ・シー・エム（日本）の支援を受けて実施された。