

論 文 要 旨

Therapeutic effects of food-derived antioxidant products on
N-methyl-*N*-nitrosourea-induced rat model for human retinitis pigmentosa
(食品由来抗酸化物質の MNU 誘発ラット網膜変性症モデルにおける病態抑制効果)

関西医科大学病理学第二講座
(指導：螺 良 愛 郎 教授)

榎 本 祐 子

【はじめに】

酸化ストレスが関与する眼科領域の代表的な疾患に網膜色素変性症(RP)がある。最終的には失明を来す遺伝性疾患であるが、根本的な薬物治療はなく、病態の理解と治療法の開発が急務といえる。クルクミン(CUR)はカレーの黄色色素の主成分で、ウコンの根茎に多く含まれている。その抗炎症効果、動脈硬化予防効果とともに抗酸化作用の存在が注目されている。また緑茶抽出物(GTE)においても、その主成分であるカテキン類には抗酸化作用をみることが報告されている。ウコンや緑茶は保健薬として古くから愛用され、現在では食材や嗜好飲料として定着している。今回クルクミンと緑茶抽出物のMNU誘発ラット網膜変性症モデルにおける網膜変性抑制効果の有無を検証した。

【研究方法】

1. CUR 実験

7週齢雌 Sprague-Dawley (SD)系ラットに 40 mg/kg *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)を単回腹腔内投与し、MNU 投与 3 日前から屠殺前日まで 200 mg/kg CUR を連日計 10 日間腹腔内投与した。屠殺後に採取した網膜にて各種解析を行った。HE 染色の結果より視細胞率 [総網膜厚に対する視細胞厚(外顆粒層+桿体錐体層)の比率]、網膜傷害率 [外顆粒層が 4 層未満の場合を傷害領域として全網膜長に対する傷害領域の比率] を算出した。また網膜から DNA を抽出し、ELISA 法にて DNA の酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 測定、さらに terminal deoxynucleotidyl transferase -mediated dUTP digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 染色陽性細胞数より、アポトーシス陽性細胞率を求めた。

2. GTE 実験

7週齢雌 SD 系ラットに 40 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、MNU 投与 3 日前から屠殺前日まで 250 mg/kg GTE を連日計 10 日間経口投与した。屠殺後に採取した網膜にて各種解析を行った。HE 染色の結果より視細胞率や網膜傷害率を算出した。また phosphodiesterase (PDE) 6 β とロドプシンの免疫染色結果から、網膜保持率 [網膜全長に対する各抗体での外節陽性長の比率] も求めた。TUNEL 染色よりアポトーシス陽性細胞数の算出、また血清・網膜中の EGCG 濃度の測定、網膜外顆粒層の HO-1 の mRNA 定量も行った。

【結果】

1. CUR 実験

網膜中心部における視細胞率は MNU+CUR 併用群では MNU 単独群に比べて、有意に視細胞の消失を抑制した(23.2 vs 5.3 %)。網膜傷害率も同様に MNU+CUR 併用群では傷害の軽減が見られた。8-OHdG レベルは MNU 投与後 12 時間でピークとなり、その時点で MNU+CUR 併用群では MNU 単独群に比して有意に抑制された(0.50 vs 0.78 ng/ml)。酸化ストレスがピークとなった MNU 投与後 12 時間の TUNEL 染色陽性細胞率は CUR によって有意に減

少していた(10.8 vs 17.5 %)。

2. GTE 実験

視細胞率は網膜中心部、辺縁部共に MNU+GTE 併用群では、MNU 単独群に比して有意に視細胞の消失を抑制した(各々17.2 vs 10.0, 42.9 vs 32.0 %)。網膜傷害率も MNU 投与後 7 日で MNU+GTE 併用群では MNU 単独群と比べ有意に傷害を抑制した(61.0 vs 88.1 %)。また PDE6 β の免疫染色から求めた網膜保持率は、MNU 投与後 7 日で有意に網膜機能の保持が見られた(25.1 vs 4.2 %)、ロドプシン染色でも同様の傾向をみた。TUNEL 陽性細胞数は中心部、辺縁部共に MNU 投与 24 時間後でピークとなり、中心部では MNU+GTE 併用群で MNU 単独群に比して有意な陽性細胞数の減少が見られた(981.2 vs 2056.2 cells/mm²)。マイクロダイセクションで外顆粒層を中心に採取し mRNA 定量を行った結果、MNU 投与後 24 時間で GTE による HO-1 発現の抑制が見られた。MNU 投与日の GTE 投与後 1 時間、2 時間の血清、網膜中の EGCG 濃度は、血清、網膜共に 1 時間後をピークに高濃度の EGCG が検出された。

【結論】

- CUR や GTE は MNU 誘発網膜傷害を酸化ストレスの抑制を介して視細胞アポトーシスを減少させることにより軽減した。
- 今回使用した用量の CUR や GTE では目立った毒性は認められず、ヒト RP の発症の予防や進行の阻害に役立つ可能性が示唆された。