

大豆ポリフェノールの抗酸化作用に基づく虚血・再灌流障害予防法の構築

板垣史郎*

弘前大学医学部付属病院薬剤部

Protective Effect of Soy Isoflavone Genistein on Ischemia-Reperfusion Injury

Shiro ITAGAKI

Division of Pharmacy, Hirosaki University school of Medicine and Hospital, Hirosaki 036-8563

ABSTRACT

Reperfusion injury refers to damage to tissue caused when blood supply returns to the tissue after a period of ischemia. Ischemia-reperfusion (I/R) injury has been well described in the literature as causing organ damage in the brain, heart, lungs, liver, kidneys and skeletal muscle. Intestinal I/R is a common clinical problem in the settings of severe burns, circulatory shock and strangulation ileus. Indeed intestinal I/R injury is an important factor associated with high morbidity and mortality. Intestinal I/R damages remote organs and promote multi-organ failure. It has been reported that enteral feeding before ischemic insults is beneficial for reducing organ injury and improving survival after intestinal I/R. In that study, the authors used a standard complex enteral diet and they suggested that it is important to find new nutrient formulas. Since reactive oxygen species are responsible for intestinal I/R injury, we focused on the soy isoflavone genistein, which has a wide spectrum of biochemical and pharmacological activities. In this study, we have found that genistein, which has combined antioxidant activity from radical scavenging, xanthine oxidase inhibition and chain-breaking effects, exhibits a protective effect on intestinal I/R injury. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 187-191, 2010.

Key words : ischemia-reperfusion; intestine; genistein; antioxidant;

*〒036-8563 弘前市本町53番地

北海道はわが国の大豆生産の2割を占める大産地であり、昨今の食の安全に対する意識の高まりを受け、その存在感はより一層大きくなってゆくと思われ、大豆にはポリフェノールが豊富に含まれており、抗酸化作用をはじめ、様々な生理作用を示す。申請者は研究成果の普及啓発、産業への貢献を念頭に、北海道の地域性を活かした本研究を立案した。

代表的酸化障害として虚血・再灌流 (I/R) 障害が挙げられる。I/R障害とは心筋梗塞・腸捻転・患部切除等による一過性の虚血の後、血流が再開する状態を指し、急速な酸素の流入によって生じた大量の活性酸素が臓器を暴露し、障害を引き起こす¹⁾。I/R障害を受けやすい臓器として、肝臓、脳、小腸などが挙げられる。中でも小腸は食物の消化や栄養成分の吸収を司る重要な臓器であるが、その機能上、外界と接しているために障害の影響を特に受けやすい。小腸I/R障害は熱傷・ショック・絞扼性イレウスなどの疾患および患部切除手術に伴って惹起される臨床極めて重要な病態である。小腸I/Rに伴う障害は小腸のみならず、脳・肝臓などの遠隔臓器へと波及し、多臓器不全を引き起こすことも稀ではない。このように、小腸I/R障害は、その悪性度・致死率の高さから、予防法の確立が切望されている。

これまでに、小腸虚血障害発症前の経腸栄養が、組織障害の抑制および障害発症後の生存率向上に有用であることが報告されている^{2,3)}。その報告では、標準的経腸栄養剤を使用しており、同時に新たな栄養剤成分を見出すことの重要性についても述べられている。申請者は食品成分の動態特性の解明、およびその特性に基づく障害予防効果の実証について豊富な実績を有する。一例として、小腸酸化障害に対するクマイ笹抽出エキスおよびルテインの保護効果を明らかにした^{4,5)}。申請者はこれまでの研究実績を基に、我々は広範な生理作用を有する大豆ポリフェノール、ゲニステインに着目し、小腸I/R障害に対する保護作用を検証した。

方 法

使用動物

実験動物は、Wister系雄性ラット（日本医科学動物資材研究所）を6週齢で株式会社ホクドーより購入し、7-9週齢、250-350 gのものをを用いた。飼育は23±2℃、湿度50±10%内で行った。水は新鮮水道水、餌はローデントラボダイエット5L37を自由摂食させた。

ラット小腸I/Rモデルの作成

ラット小腸I/Rモデルの作成は、Megisonらの方法⁶⁾

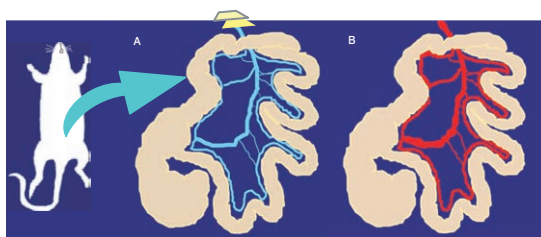


Fig. 1. Rat intestinal ischemia-reperfusion model

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg body weight, i.p. injection). Through a midline laparotomy, each rat was subjected to 30 min of ischemia by ligating small anastomosing vessels and occluding the superior mesenteric artery (A). Reperfusion was induced by removing the clamp (B). The abdomen was then covered with a sterile plastic wrap. Rats were killed under surgical anesthesia at 1 hr after reperfusion. Tissues were harvested just before killing.

に若干の改良を加えて行った。虚血は側副血行路を上流より結紮するとともに、動物実験用ディスポーザブルクリップ（NATUME）を用いて上腸間膜動脈をクリッピングすることにより行った（Fig. 1A）。再灌流は上腸間膜動脈のクリップを取り外すことにより行った（Fig. 1B）。虚血時間は30 min、再灌流時間は60分とした。再灌流終了後、ラットを速やかに実験に供した。

評価物質の投与

ゲニステインおよびエピガロカテキンガレート（EGCG）は和光純薬工業（株）より購入した試薬特級を使用した。ゲニステインおよびEGCGは蒸留水にて1 mMに調整し、虚血1時間前にループ内に0.5 mL投与した。

エバンスブルー組織漏出量の測定

エバンスブルーは蒸留水で20 mg/mLに調製し、再灌流5分前に頸静脈より1 mL/kg weight（20 mg/kg weight）投与した。再灌流終了後、速やかに上腸間膜動脈を切断し小腸組織から血液の除去を行なった。血液の除去後ループ部を切り出し37℃で24時間組織を乾燥させた。乾燥後、ホルムアミドを4 mL添加し、37℃で24時間振盪することによりエバンスブルーを組織から抽出し、抽出液の620 nmにおける吸光度を測定した。検量線にはエバンスブルーのホルムアミド溶液を用いた。

小腸組織染色

灌流後、ループ部を摘出、10%中性ホルマリン緩衝液につけて固定した。固定した臓器をパラフィンで包埋した後、4 μ Mに薄切りすることで組織切片を作成した。組織切片をhematoxylin-eosinで染色し、顕微鏡観察を行った。組織切片の作成および染色は（株）札幌総合病理研究所に委託した。

過酸化脂質量の測定

再灌流後、ループ部を摘出、粘膜層をスライドグラスで擦過し、1 mLの水を加えホモジネートを作成した。作成したホモジネート0.1 mLに、8.1%SDS溶液0.1 mL、20%酢酸緩衝液（pH3.5）0.75 mL、TBA試薬0.75 mLを加え、95℃で60分間加熱した。検量線には小腸ホモジネートの代わりに30 μ M TEPE ethanol溶液を使用した。反応後、速やかに氷冷し1 mLの水を注入した。1-Butanol 5 mLを加えて1分間ボルテックスした後、2,000 rpm、5分間遠心し、上層の535 nmにおける吸光度を測定した。たん白定量はLowry法により行った。

結果と考察

本研究では強力な抗酸化作用を有することが知られているエピガロカテキンガレート（EGCG）を対照化合物として、ゲニステインの小腸I/R障害抑制効果を評価した。我々はこれまでに、ゲニステインがスーパーオキシドアニオン消去作用、ヒドロキシルラジカル消去作用およびラジカル連鎖反応停止作用を有することを確認している（Fig. 2）。

ラット小腸を30分虚血後、60分血液を再灌流させることで、小腸上皮細胞の損傷が生じる。本研究では、まず*in vivo*における組織障害に対するゲニステインの効果を測定した。小腸I/Rによる組織障害の指標には酸化障害により組織への漏出量が増加するとの報告のあるエバンスブルーを用いた。小腸I/Rにより、エバンスブルーの小腸漏出量は有意に増加した。ごく最近、我々はラジカル連鎖反応停止作用を有する化合物であるEGCG、アスコルビン酸、フェルラ酸の前処置により、小腸I/Rによる組織障害が抑制されることを報告した⁷⁾。これらの化合物と同様、ゲニステインもまたラジカル連鎖反応停止作用を有する。エバンスブルー組織漏出量の増加はゲニステインの投与により、有意に減少した（Fig. 3）。さらに、小腸I/Rにより惹起された絨毛の脱落は、ゲニステインの前投与により抑制された（Fig. 4）。

生体膜に酸化ストレスがかかることで生じた過酸化脂質は酸化障害の原因になる。小腸I/Rにより生成さ

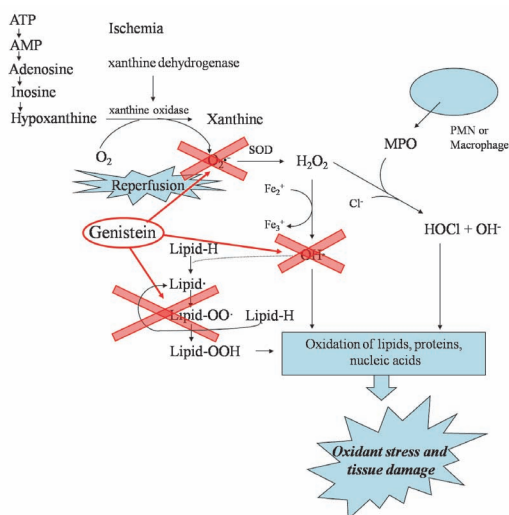


Fig. 2. Antioxidant properties of genistein.

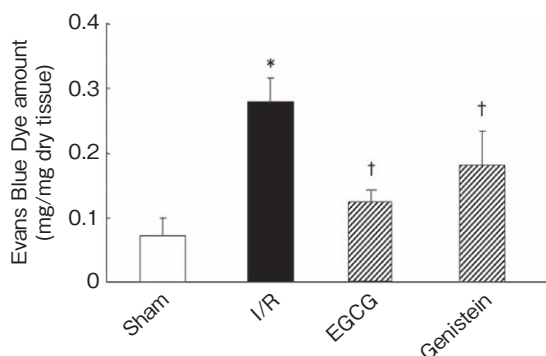


Fig. 3. Effects of EGCG and genistein (1 mM) on changes in vascular permeability in the small intestine. Each column represents the mean with S.D. of 4 to 6 rats. * $p < 0.05$, significantly different from nonischemia control animals. † $p < 0.05$, significantly different from animals not treated with compounds (I/R animals).

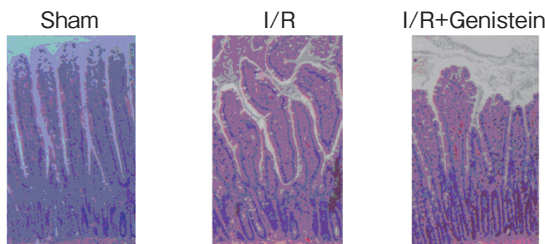


Fig. 4. Microscopic appearance after hematoxylin and eosin staining of intestinal tissue after I/R.

れた過酸化脂質の量をマロンジアルデヒドの量としてTBA法により測定した。小腸の過酸化脂質量は、I/R処置により有意に増加した。EGCGは小腸虚血再灌流による過酸化脂質の形成を有意に抑制したが、ゲニステインは過酸化脂質形成抑制効果を示さなかった (Fig. 4)。

小腸I/Rラットを用いた検討において、ラジカル連鎖反応停止作用を有するゲニステインが組織保護作用を示したにもかかわらず、小腸脂質ヒドロペルオキシド量に影響を与えなかった理由は不明である。ゲニステインはラジカル連鎖反応停止作用に加え、ヒドロキシルラジカル消去作用も有する。ゲニステインの小腸I/R障害抑制作用に対しては、ラジカル連鎖反応停止作用よりもヒドロキシルラジカル消去作用が大きく寄与している可能性が考えられる。好中球と単球に存在する活性酸素の代謝酵素であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) は多量の菌が感染した際の初期生体防御機構として働く。一方、MPOに特異的な反応である塩素化反応は次亜塩素酸などの塩素酸化物を生成する反応であり、それらは組織傷害の原因となりうる。ゲ

ニステインのMPO阻害作用、およびそれを介した小腸I/R障害抑制効果については、更なる検討が必要である。

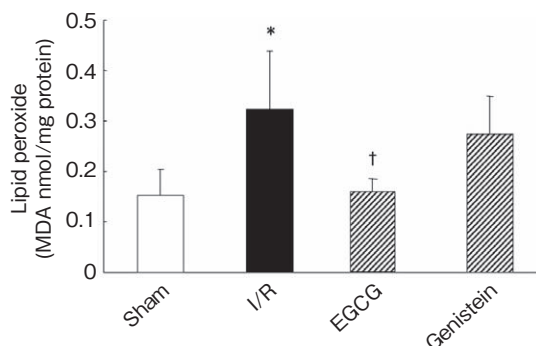


Fig. 5. Effects of EGCG and genistein (1 mM) on the amount of lipid peroxide in the jejunum after I/R. Each column represents the mean with SD of 4 to 6 rats. * $p < 0.05$, significantly different from nonischemia control animals. † $p < 0.05$, significantly different from animals not treated with compounds (I/R animals).

要 約

ラジカル補足作用、ラジカル連鎖反応停止作用などの抗酸化活性を有するゲニステインは、小腸I/R障害に対する保護効果を示した。今後は、ゲニステインを配合した経腸栄養剤を用いて、より保護効果の高い小腸I/R障害予防法の構築に取り組んでいきたいと考えている。

謝 辞

研究の遂行に当たっては、実際に実験を担当した北海道大学・大学院生 佐藤夕紀氏のご努力に負うところが大きく、この場を借りてそのご尽力に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Koike K, Moore FA, Moore EE, Read RA, Carl VS and Banerjee A (1993): Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism. *J Surg Res*, **54**, 469-473.
- 2) Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Lundberg AH, Wilcox HG and Kudsk KA (2001): Enteral nutrition prevents remote organ injury and death after a gut ischemic insult. *Ann Surg*, **233**, 660-668.
- 3) Fukatsu K, Kudsk KA, Zarzaur BL, Sabek O, Wilcox HG and Johnson CD (2002): Increased ICAM-1 and beta2 Integrin expression in par-enterally fed mice after a gut ischemic insult. *Shock*, **18**, 119-124.
- 4) Ogura W, Itagaki S, Kurokawa T, Noda T, Hirano T, Mizuno S and Iseki K (2006): Protective effect of lutein on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Biol Pharm Bull*, **29**, 1764-1766.
- 5) Kurokawa T, Itagaki S, Yamaji T, Nakata C, Noda T, Hirano T and Iseki K (2006): Antioxidant activity of a novel extract from Bamboo grass (AHSS) against Ischemia-Reperfusion injury in

- rat small intestine. *Biol Pharm Bull*, **29**, 2301-2303.
- 6) Megison SM, Horton JW, Chao H and Walker PB (1990): A new model for intestinal ischemia in the rat. *J Surg Res* **49**, 168-173.
- 7) Itagaki S, Kurokawa T, Nakata C, Saito Y, Kobayashi M, Hirano T and Iseki K (2009): In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem* **114**, 466-471.