

かき肉エキスによるラット海馬中総グルタチオン増強効果

福田 卓, 春松 槇, 松井 博之, 松田 芳和

(日本クリニック(株)・中央研究所*)

Effect of oyster extract on the enhancement of glutathione in rat hippocampus

Suguru FUKUDA, Shin HARUMATSU, Hiroyuki MATSUI, Yoshikazu MATSUDA

Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd

Summary

In our previous study, we reported the enhancement of glutathione in rat hippocampus with combined administration of oyster extract and warfarin. However, the effect of sole administration of oyster extract on glutathione in rat hippocampus was not investigated. Therefore, the principal aim of the present study was to determine if oyster extract increases glutathione in rat hippocampus and various organs. Moreover, the effect of oyster extract on glutathione S-transferase (GST) activity was investigated.

In the first experiment, after 7-week-old male Sprague-Dawley rats were administered oyster extract (200 or 500 mg/kg body weight P.O.) (high-volume group or low-volume group) or vehicle (control group) for 1 week, these various organs were isolated. The concentration of glutathione in these organs was determined. The concentrations of glutathione in hippocampus of the high-volume group and the low-volume group were twofold higher than that of the control group, with significant differences.

In the second experiment, after 7-week-old male Sprague-Dawley rats were administered oyster extract (500 mg/kg body weight P.O.) (oyster extract group) or vehicle (control group) for 1 week, these various organs were isolated. The concentration of glutathione and GST activity in these organs were determined. The concentration of glutathione in kidney in the treated group was significantly higher than that in the control group. GST activity in the hippocampus in the oyster extract group was significantly higher than that in the control group.

The present results suggest that oyster extract produces anti-oxidant effects in hippocampus and kidney.

グルタチオンはグルタミン酸, システイン, グリシンからなるトリペプチドであり, 内在性の抗酸化物質として重要な役割を担っている。グルタチオンは, 細胞中のチオール基酸化還元調整, 酸化障害に対する防御, 活性型金属イオンおよび求電子性物質の解毒作用およびシステインの貯蔵と輸送に必要とされる¹⁾。また, タンパク質およびDNAの合成, 細胞増殖サイクルの調整, 細胞分化などにも関わっている¹⁾。

かき肉エキスには, 多様な抗酸化作用があることが報告されている。その中でも, in vitro および in vivo の実験系において, かき肉エキスによるグルタチオン増強効果が報告されている。しかし, これまでに脳内中のグルタチオンに対するかき肉エキスの影響は検討されていなかった²⁻⁴⁾。

昨年, われわれは, ラットにかき肉エキスおよびワルファリンを投与した場合, 海馬中総グルタチオン量が増強

することを示した⁵⁾。しかし, この実験ではかき肉エキス単独投与による海馬中総グルタチオン量の増強効果については未検討であった。そこで, 本実験ではかき肉エキス単独による海馬中総グルタチオン量の変動を検討した。また, 様々な臓器における総グルタチオン量に対するかき肉エキスの効果を検討した。そして, グルタチオンと共役的に解毒作用を担っているグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性 (以下 GST 活性) に対する影響を調べた。

実験方法

(実験 1)

体重 130~150 g の 5 週齢 Sprague-Dawley 系雄ラット 18 匹を 1 週間, 馴化飼育した後に 3 群 (各群 6 匹) に分けた。次にラットに 1 日 1 回 7 日間, 溶媒 (蒸留水), かき

*所在地: 京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

肉エキスパウダーを経口投与した。かき肉エキスの投与量は 200 mg/kg body weight (低用量群) および 500 mg/kg body weight (高用量群) とした。

飼育期間終了後、ラットをエーテル麻酔下で開腹し、肝臓、肺、腹部大動脈、海馬、大脳皮質、大腿骨、心臓、脾臓、膵臓、小腸および大腸を採取した。その後、臓器は、総グルタチオン測定を行うまで -30°C で保管した。総グルタチオン測定は Glutathione Quantification Kit (株同人化学) を用いて測定した。

(実験 2)

体重 130 ~ 150 g の 5 週齢 Sprague-Dawley 系雄ラット 24 匹を 1 週間、馴化飼育した後に 2 群 (各群 12 匹) に分けた。次にラットに 1 日 1 回 7 日間、溶媒 (滅菌水)、かき肉エキスパウダーを経口投与した。かき肉エキスの投与量は 500 mg/kg body weight とした。

飼育期間終了後、ラットをエーテル麻酔下で開腹し、肝臓、腎臓、肺、海馬、心臓、大腿四頭筋 (大腿直筋)、精巢上体および血ペイを採取した。その後、腎臓は直ちに 10% スルホサリチル酸溶液で処理した後、総グルタチオン測定用の検体とした。また、その他の臓器は、総グルタチオン測定もしくは GST 活性測定を行うまで -30°C で保管した。総グルタチオン測定および GST 活性測定は Glutathione Quantification Kit (株同人化学) および Glutathione-S-Transferase Assay Kit (Sigma-aldrich 社) を用いて測定した。

(統計学的分析)

実験 1 の各測定値は、一元配置分散分析により検定し、有意 (危険率 < 0.05) であった場合には、Fisher PLSD によって群間の比較を行った。また、実験 2 の測定値は、T Test によって群間の比較を行った (危険率 < 0.05)。以上の計算には統計解析ソフトである StatView-J 5.0 を用いた。

結果

(実験 1)

海馬において、対照群に比べ低用量群および高用量群で総グルタチオン量が約 2 倍、有意に上昇した (Fig. 1)。このことから、かき肉エキスは単独で海馬中総グルタチオン量を増強することが分かった。また、肺において対照群に比べ、高用量群で総グルタチオン量が若干減少していた。しかし、実験 2 において、再測定を行ったところ有意な差は認められなかった。また、その他の臓器においても対照群とかき肉エキス投与群の総グルタチオン量に有意な差は見られなかった (Table 1)。

(実験 2)

海馬において、対照群に比べかき肉エキス投与群で GST 活性が有意に上昇した (Fig. 2)。また、腎臓において、対照群に比べかき肉エキス投与群で総グルタチオン量が有意に上昇した。しかしながら、対照群に比べ、かき肉エキス投与群において、腎臓における GST 活性に有意な

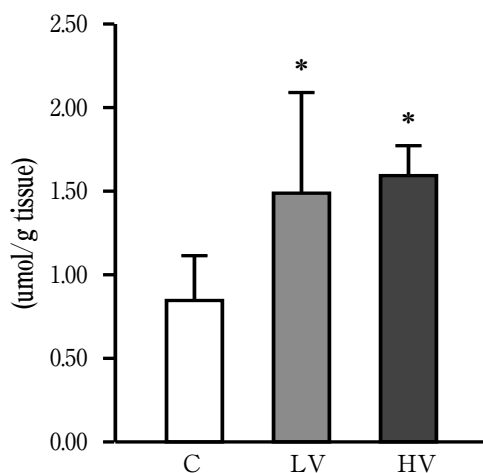


Fig. 1 Effect of oyster extract on glutathione in rat hippocampus.

Abbreviations for the experimental groups are as follows: C, rats orally administered distilled water; LV, rats orally administered 200mg/kg body weight oyster extract; HV, rats orally administered 500 mg/kg body weight oyster extract. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Values are considered significantly different at $*P < 0.05$ vs. C. Unit is $\mu\text{mol/g}$ tissue.

Table 1 Effect of oyster extract on glutathione in various rat organs.

Organ	Group		
	C	LV	HV
Liver ¹	3.08 \pm 0.52 ^a	2.96 \pm 0.81 ^a	3.42 \pm 0.51 ^a
Hippocampus ¹	0.85 \pm 0.27 ^a	1.49 \pm 0.60 ^{ab}	1.59 \pm 0.18 ^a
Bone ²	11.75 \pm 0.69 ^a	12.01 \pm 0.67 ^a	11.94 \pm 0.47 ^a
Brain cortex ¹	1.32 \pm 0.54 ^a	0.96 \pm 0.65 ^a	1.13 \pm 0.78 ^a
Artery ¹	0.15 \pm 0.16 ^a	0.24 \pm 0.05 ^a	0.20 \pm 0.13 ^a
Heart ¹	2.12 \pm 0.24 ^a	2.16 \pm 0.18 ^a	2.05 \pm 0.39 ^a
Spleen ¹	3.09 \pm 0.34 ^a	3.07 \pm 0.18 ^a	2.88 \pm 0.28 ^a
Lung ¹	1.61 \pm 0.23 ^a	1.50 \pm 0.25 ^a	1.31 \pm 0.13 ^b
Pancreas ¹	0.35 \pm 0.35 ^a	0.33 \pm 0.31 ^a	0.27 \pm 0.16 ^a
Large intestine ¹	1.65 \pm 0.24 ^a	1.80 \pm 0.57 ^a	1.39 \pm 0.62 ^a
Small intestine ¹	2.61 \pm 0.64 ^a	2.83 \pm 0.22 ^a	2.67 \pm 0.25 ^a

Abbreviations for the experimental groups are as follows: C, rats orally administered distilled water; LV, rats orally administered 200mg/kg body weight oyster extract; HV, rats orally administered 500mg/kg body weight oyster extract. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Values not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Unit is $\mu\text{mol/g}$ tissue.

² Unit is mM.

Table 2 Effect of oyster extract on glutathione in various rat organs.

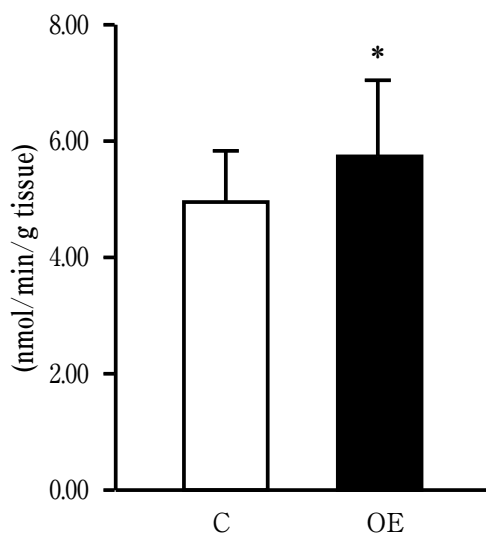


Fig. 2 Effect of oyster extract on GST specific activity in rat hippocampus.

Abbreviations for the experimental groups are as follows: C, rats orally administered distilled water; OE, rats orally administered 500 mg/kg body weight oyster extract. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Values are considered significantly different at *P < 0.05 vs. C. Unit is nmol/min/g tissue.

差は見られなかった。また、その他の臓器においても GST 活性に有意な差は見られなかった (Table 2)。

考 察

海馬において、対照群に比べかき肉エキス投与群で総グルタチオン量および GST 活性が有意に上昇した。これらのことから、海馬において、かき肉エキスの抗酸化作用が示唆された。

パーキンソン病 (以下 PD) では、黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落することが発症原因である。ドーパミン代謝において、フリーラジカルや活性酸素が発生し、これらが神経変性を引き起している^{6,7)}。そして、PD 患者において、黒質中のグルタチオン量が減少しているという報告もある^{8,9)}。

アルツハイマー病 (以下 AD) には、前脳基底核のコリン動作性神経、大脳皮質および海馬において、錐体ニューロンが減少する特徴がある¹⁰⁾。そして、 β アミロイド沈着、 τ タンパク質凝集、細胞中の酸化ストレスなどの顕著な特徴も見られる^{11,12)}。 β アミロイドによりフリーラジカルが産生され、それに付随して酸化ストレスが神経変性をもたらすことも分ってきている¹³⁾。さらに、AD 病態時にグルタチオン代謝が変化することが分っている¹⁴⁾。例えば、AD 患者の大脳皮質において、還元型グルタチオンレベルが低下しているという報告がある。グルタチオンは、安定性および生物学的利用率が低く、中枢神経系に輸送される

Organ	Group	
	C	OE
Kidney	3.12 \pm 0.32 ^a	3.53 \pm 0.43 ^b
Muscle	1.23 \pm 0.43 ^a	1.01 \pm 0.37 ^a
Blood-Clot	1.74 \pm 1.37 ^a	1.50 \pm 0.93 ^a

Abbreviations for the experimental groups are as follows: C, rats orally administered distilled water; OE, rats orally administered 500 mg/kg body weight oyster extract. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Values not sharing a common superscript are significantly different (P < 0.05). Unit is μ mol/g tissue.

量には限りがある¹⁰⁾。そのため、内在性のグルタチオン量を増やすことで神経変性を抑制する様々なアプローチがなされている。

上記を踏まえると、かき肉エキスが単独でラット海馬の総グルタチオン量を劇的に増強させたことは、かき肉エキスが AD などの治療に有用であることを示唆している。また、海馬だけでなく、黒質中のグルタチオンを増強している可能性もあるので、PD 治療への可能性もあるのかもしれない。かき肉エキス中には、グルタチオンの材料となるアミノ酸 (グルタミン酸、システイン、グリシン) も含まれているが、その他の食品に比べ、特段に多い訳ではない。このことから、かき肉エキスは細胞内のアミノ酸から合成されるグルタチオン量を増加させていると考えられる。かき肉エキス中の成分が海馬シグナル伝達物質として働き、グルタチオン生合成酵素などの発現を誘導している可能性がある。

かき肉エキス中には、グリコーゲン、タウリンなどのアミノ酸およびミネラルやビタミンなどの微量栄養素が含まれている。タウリンは中枢神経系に最も多く含まれるアミノ酸であり、細胞膜の安定性、浸透圧調節および神経細胞保護に重要な役割を果たしている¹⁵⁻¹⁷⁾。また、ラットにタウリンを経口投与することで、extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2), protein kinase B (Akt), glycogen synthase kinase3 beta (GSK3b) および cAMP response element-binding protein (CREB) などの海馬におけるリン酸化の増加が報告されている¹⁸⁾。このことから、かき肉エキス中のタウリンが海馬シグナル伝達物質として働き、グルタチオン生合成を増強している可能性は大きい。しかしながら、かき肉エキス中の他の成分がそのシグナル伝達に相加的もしくは相乗的に働いている可能性もある。これらのことから、グルタチオン増強に関わっているかき肉エキス成分を特定するために、さらなる研究が必要である。

参考文献

- 1) CL Hammond, Lee TK, Ballatori N (2001) Novel roles for glutathione I gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 34: 946-954.
- 2) H Tapiero, KD Tew (1996) Increased glutathion expression in cells induced by *Crassostera gigas* extract (JCOE). *Biomed & Pharmacother* 50: 149.
- 3) L Gate, M Schltz, E Walsh, S Dhalluin, G Nguyenba, H Tapiero, KD Tew (1998) Impact of dietary supplement of *Crassostera gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and S-transferase activity in rat tissues. *In vivo* 12: 299.
- 4) H Tapiero, KD Tew, S Dhalluin, G Nguyenba, V Soupramanien, J Kouyate (1998) The antioxidant effects of *Crassostera gigas* extract (JCOE) in human volunteers. *In vivo* 12: 305.
- 5) 西堀頼史, 鈴木陽子, 岸浪昌礼, 藤澤紘, 永岡茂樹, 山崎則之, 松井博之, 松田芳和 (2012) カキ抽出エキスパウダーの安全性および機能性に関する報告. *微量栄養素研究* 28 : 40-44.
- 6) ELK Sofic, K Jellinger, P Riederer (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*; 142: 128-30.
- 7) JD Jr Adams, ML Chang, L Klaidman (2001) Parkinson's disease-redox mechanisms. *Curr Med Chem*. Jun; 8(7): 809-14.
- 8) J Sian, DT Dexter, AJ Lees, S Daniel, Y Agid, F Javoy-Agid, P Jenner, CD Marsden (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of Neurology*, vol. 36, no. 3, 348-355.
- 9) P Damier, E. C Hirsch, P Zhang, Y Agid F Javoy-Agid (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience*, vol. 52, no. 1, 1-6
- 10) I Cacciatore, L Baldassarre, E Fornasari, A Mollica, F Pinnen (2012) Recent advances in the treatment of neurodegenerative diseases based on GSH delivery systems. *Oxid Med Cell Longev*. volume 2012, 12.
- 11) L. F. Lau, M. A Brodney (2008) Therapeutic approaches for the treatment of Alzheimer's disease: an overview. *Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 2, pp.1-24.
- 12) S Varadarajan, S Yatin, M Aksenova, D. A Butterfield (2000) Review: Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *Journal of Structural Biology*, vol.130, no.2-3, pp.184-208.
- 13) Maltsev A. V, Bystryak S, and Galzitskaya O. V (2011) The role of β -amyloid peptide in neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, vol.10, pp.440-452.
- 14) M Lee, T Cho, N Jantaratnotai, Y.T Wang, E McGeer, P.L McGeer. (2010) Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *The FASEB Journal*, vol.24, no.7, pp.2533-2545.
- 15) M Gu, AD Owen, SE Toffa, JM Cooper, DT Dexter, P Jenner, CD Marsden, AH Schapira (1998) Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewybody diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 158, no. 1, pp.24-29.
- 16) N Hussey, C Deleuze, MG Desarmenien, FC Moos (2000) Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol* 62: 113-134.
- 17) I Tamai, M Senmaru, T Terasaki, A Tsuji (1995) Na(+)- and Cl(-)- dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol* 50: 1783-1793.
- 18) M Tanabe, A Nitta, H Ono (2010) Neuroprotection via strychninesensitive glycine receptors during post-ischemic recovery of excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *J Pharmacol Sci* 113: 378-386.