

# 酸化ストレス誘発網膜神経節細胞死に対するビルベリーエキスの保護作用

(岐阜薬科大学、株式会社わかさ生活)

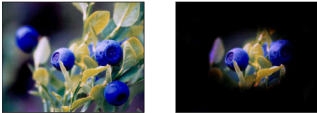
日本薬学会第128年会

## 目的

網膜神経節細胞死は緑内障等の後眼部疾患の原因のひとつであり、その発症機序の一部に酸化ストレスの関与が指摘されている<sup>1)</sup>。我々は、網膜神経節細胞株を用いて酸化ストレスを誘導する活性酸素種(ONOO<sup>-</sup>)に対するビルベリーエキス及び含有成分であるアントシアニン(シアニン、デルフィニン、マルビジン)の作用について検討した。

## 緑内障

緑内障とは視神経乳頭、視野の特徴的変化の少なくともひとつを有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害の改善あるいは進行を阻止し得る機能的構造的異常を特徴とする疾患である。



正常視野 正常視野と緑内障視野

## ビルベリー (Vaccinium myrtillus)

ブルーベリーの一つで主に北ヨーロッパ、北アメリカなどで自生している。樹高が15~40 cmと低く、耐寒性がある。4月から6月に開花する。約150種類あると言われているブルーベリーの中でも最もアントシアニン含量が多く、その抽出エキスはVMA (Vaccinium myrtillus anthocyanoside) と呼ばれ36%、15種類のアントシアニンを含む。

近年、血管新生抑制作用<sup>2)</sup>、血管保護作用<sup>3)</sup>などの薬理作用が報告されている。

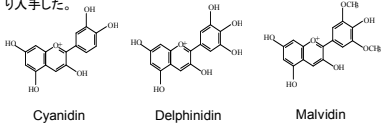


ビルベリー (Vaccinium myrtillus)

## 材料と方法

### 1. 化合物

VMAは株式会社わかさ生活(京都)から、シアニン、デルフィニン及びマルビジンはExtrasynthese社 (Geny Cedex, France) より入手した。



シアニン、デルフィニン及びマルビジンの構造式

### 2. HPLC分析

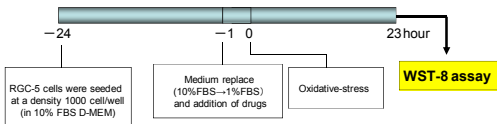
VMAは1 mg/mlとなるよう希酸で溶解した。溶出はreverse-phase C18 カラムを用い、1 ml/minで行った。UV-visible detectorにより520 nmにて測定を行った。

#### Solution

- (A)液 10%希酸
  - (B)液 希酸、アセトニトリル、メタノール、水 (10/22.5/22.5/40 (vol/vol))
- The gradient  
0分時...90%(A)液、10%(B)液  
40分時...65%(A)液、35%(B)液

### 3. RGC-5増殖試験

RGC-5を1000 cell/wellの密度で96well plateへ播種し、24時間培養を行った。その後、培地を1%FBS-D-MEMへ置換し、各濃度のVMAまたはアグリコン(シアニン、デルフィニン及びマルビジン)を添加し、37°Cにてインキュベートした。その1時間後、ONOO<sup>-</sup>を産生するSIN-1をそれぞれ終濃度0.5 mMとなるよう添加した。その23時間後、生細胞をWST-8法(同仁)により定量した。

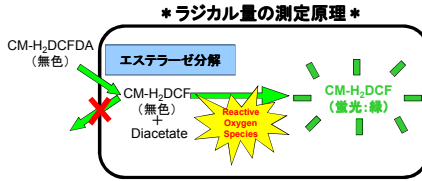
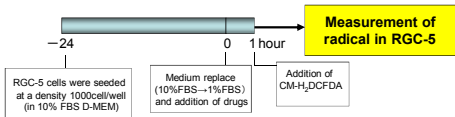


### 4. マウス脳脂質過酸化

マウス抽出脳ホモジネートに被検薬を加え、37°C 30分間脂質過酸化反応させた。その後、直ちに35% HClO<sub>4</sub>を添加し、反応を停止させた。2800 rpm、10分間遠心し、その上清にチオナルビツール酸(TBA)溶液を添加し、100°C、15分間反応させることにより発色させ、TBA反応産物(TBARS)を吸光度計(532 nm)により計測した。結果は、各被検薬に対するTBARSの50%抑制率(IC<sub>50</sub>)として算出した。

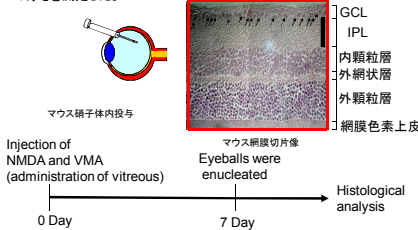
### 5. 細胞内ラジカル測定

RGC-5を1000 cell/wellの密度で96well plateへ播種し、24時間培養を行った。その後、培地を1%FBS-D-MEMへ置換し、各濃度のVMAまたはアグリコン(シアニン、デルフィニン及びマルビジン)を添加し、1時間、37°Cにてインキュベートした。その1時間後、終濃度10 µMとなるようCM-H<sub>2</sub>DCFDAを添加した。15分間、37°Cにてインキュベートした後、同じ培地に交換をした。その後、SIN-1を終濃度0.5 mMに加え、10分間の経時的なラジカル変化を励起波長488 nm、蛍光波長525 nmにて測定し、10分間の総ラジカル量を算出した。



### 6. NMDA誘発網膜障害モデル (in vivo)

NMDA (5 nmol/eye)及びVMAをマウス硝子体へ投与し、その7日後に眼球を摘出した。その後、固定・薄切した切片をHematoxylin及びEosin染色により染色した。視神経乳頭より、約350 µm離れた箇所を撮影し、GCL(神経節細胞層)中の細胞数及びIPL(内網層)の厚さを測定した。



### 7. TUNEL染色

NMDA (5 nmol/eye)、VMA及びnNOSの阻害剤であるL-NAMEをマウス硝子体へ投与し、その24時間後に眼球を摘出した。その後、固定・薄切した切片をTUNEL染色により、アポトーシス細胞を染色した。

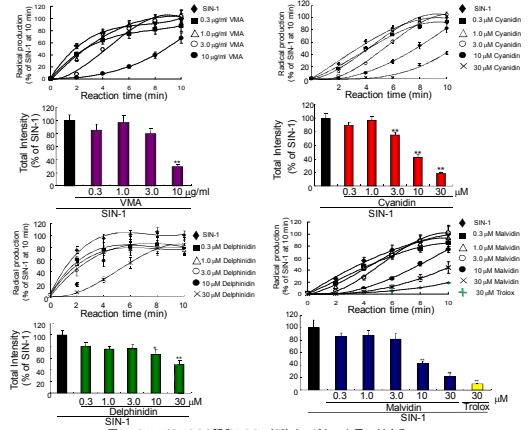


図3. SIN-1(ONOO<sup>-</sup>)誘発RGC-5細胞内ラジカル上昇に対するVMA、シアニン、デルフィニン及びマルビジンの作用

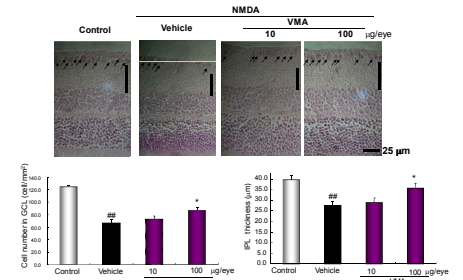


図4. NMDA誘発網膜障害モデルに対するVMAの作用

## 結果

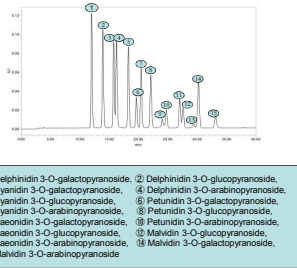


図1. VMAのHPLC分析

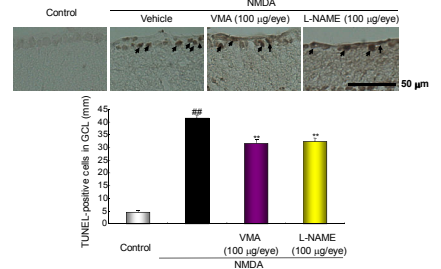


図5. NMDA誘発TUNEL陽性細胞の増加に対するVMAの作用

## 結果のまとめ

- ・VMA (10 µg/ml)、シアニン(10 µM)、デルフィニン(30 µM)、及びマルビジン(10 µM)はSIN-1誘発RGC-5細胞死を有意に抑制した(図2)。
- ・マウス脳ホモジネートの脂質過酸化をVMA、シアニン、デルフィニン及びマルビジンは濃度依存的に抑制した(表1)。
- ・VMA(10 µg/ml)、シアニン(3.0-30 µM)、デルフィニン(10-30 µM)及びマルビジン(10-30 µM)はSIN-1誘発細胞内ラジカル上昇を有意に抑制した(図3)。
- ・VMA(100 µg/eye)はNMDA誘発網膜障害モデルマウスに対して内網状層の菲薄化及び網膜神経節細胞数の減少を有意に抑制した(図4)。
- ・VMA(100 µg/eye)及びL-NAME(100 µg/eye)はNMDA誘発網膜障害モデルマウスに対してTUNEL陽性の細胞数の増加を有意に抑制した(図5)。

## VMAの作用点

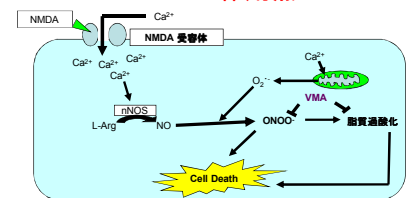


図7. NMDA誘発網膜障害モデルに対するVMAの作用点

## まとめ

VMA及びその含有成分であるアントシアニンは、酸化ストレス(ONOO<sup>-</sup>)誘発RGC-5細胞死を有意に抑制した。また、VMAはin vivo NMDA誘発網膜障害を有意に抑制した。これらの保護作用には、アントシアニンの抗酸化作用が関与していることが示唆された。

## 参考文献

- 1) Bonne, C., Muller, A., Villain, M., Free radicals in retinal ischemia. Gen Pharmacol 30:275-280, 1998.
- 2) N. Matsunaga, Y. Chikaraishi, M. Shimazawa, S. Yokota and H. Hara. Vaccinium myrtillus (Bilberry) extracts reduce angiogenesis in vivo and in vitro. eCAM (published online on October 27, 2004; 10:1093/ecam/1051)
- 3) Morazzoni, P. & Magistretti, M. J. Activity of Myrtilan, an anthocyanoside complex from Vaccinium myrtillus (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. Fitoterapia 61:13-21, 1990.

表1. 脂質過酸化に対するVMA、シアニン、デルフィニン及びマルビジンの作用

Treatment	IC <sub>50</sub> (95% confidence limits)
VMA	1.0 µg/ml (0.8-1.4)
Cyanidin	0.7 µM (0.4-1.0)
Delphinidin	1.9 µM (1.4-2.4)
Malvidin	8.3 µM (5.7-20.2)

n=3-4