

博士論文

有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 による
生体内抗酸化誘導効果の解明

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

武田 知也

指導教員 麻生 久 教授

目次

目次

第1章 序論

第2章 Ge-132 摂取による糞便色素の変化および抗酸化物質誘導効果の解明

2.1 はじめに

2.2 材料と方法

2.2.1 試薬

2.2.2.1 糞便色素類の分析と活性酸素消去能の評価

2.2.2.1.1 供試動物

2.2.2.1.2 飼育条件

2.2.2.1.3 解剖

2.2.2.1.4 ビリルビン、ステルコビリニン色素抽出・分析

2.2.2.1.5 ステルコビリノーゲン色素抽出・分析

2.2.2.1.6 盲腸内容物中の胆汁酸測定

2.2.2.1.7 糞便・盲腸内容物水抽出物の抗酸化活性測定

2.2.2.1.8 各糞便色素の抗酸化能の比較

2.2.2.1.9 血中ヘマトクリット値

2.2.2.2 マクロファージへの Ge-132 添加による赤血球貪食への影響評価

2.2.2.2.1 供試動物

2.2.2.2.2 飼育条件

2.2.2.2.3 解剖

2.2.2.2.4 マクロファージ赤血球貪食能試験

2.2.2.2.5 マクロファージ貪食能に関与する遺伝子発現変動

2.2.2.3 骨髄細胞の赤血球への分化に対する Ge-132 摂取の影響検討

2.2.2.3.1 供試動物

2.2.2.3.2 飼育条件

2.2.2.3.3 解剖

2.2.2.3.4 骨髄細胞の処理、培養および赤芽球コロニーの観察

2.2.2.4 統計処理

2.3 結果

2.3.1 Ge-132 摂取によるマウス糞便の色調変化および糞便中の赤血球代謝色素量の変化

2.3.2 Ge-132 摂取によるマウス盲腸内容物中の色調変化、赤血球代謝色素量および胆汁酸量

2.3.3 Ge-132 摂取によるマウス糞便および盲腸内容物中の抗酸化活性および各色素の抗酸化活性の比較

2.3.4 THGP 処理によるマクロファージ赤血球貪食能や貪食能に関与する遺伝子発現に与える影響

2.3.5 Ge-132 摂取によるマウス血液中のヘマトクリット値および骨髓細胞の赤芽球コロニー形成数の変化

2.4 考察

2.5 小括

図表

第3章 Ge-132 の皮膚に対する生理作用の研究

3.1 はじめに

3.2 材料と方法

3.2.1 試薬

3.2.2 供試動物

3.2.3 飼育条件

3.2.4 解剖

3.2.5 皮膚組織の樹脂包埋

3.2.6 細胞の樹脂包埋

3.2.7 同位体顕微鏡分析による Ge 吸収分布のイメージング化

3.2.8 LC-MS/MS 分析による細胞の THGP 取り込み量測定

3.2.9 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼによる酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率の測定

3.2.10 過酸化水素による酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率、細胞内 ATP 量測定

3.2.11 過酸化水素による長期間の酸化ストレスに対する細胞生存率測定

3.2.12 抗酸化酵素活性測定

3.2.13 細胞内 ROS 量測定

3.2.14 遺伝子発現網羅解析および RT-PCR 法による遺伝子発現解析

3.2.15 酸化ストレス処理による NHDF 細胞 IL-6 産生量の測定

3.2.16 統計処理

3.3 結果

3.3.1 同位体顕微鏡分析による Ge-132 皮膚塗布による Ge 吸収分布

3.3.2 同位体顕微鏡分析および LC/MS-MS 分析法による NHDF 細胞の Ge-132
の取り込み

3.3.3 THGP 処理による NHDF 細胞のヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ
酵素誘導による酸化ストレスに対する細胞生存率への影響

3.3.4 THGP 処理による NHDF 細胞の過酸化水素による酸化ストレスに対する細
胞生存率および細胞内 ATP 量への影響

3.3.5 THGP 処理による NHDF 細胞の長期過酸化水素曝露による酸化ストレスに
対する細胞死抑制作用の測定

3.3.6 THGP 処理による NHDF 細胞の抗酸化酵素活性誘導および細胞内 ROS 量
への影響

3.3.7 THGP 処理による NHDF 細胞の網羅的遺伝子発現解析および特定遺伝子の
発現変動解析

3.3.8 THGP 処理による NHDF 細胞の培養上清中の IL6 量の変動

3.4 考察

3.5 小括

図表

第4章 総括

謝辞

参考文献

第 1 章 序論

Poly-*trans*-[(2-carboxyethyl)germasquioxane] (Ge-132) は、金属ゲルマニウムに炭素類が共有結合した有機ゲルマニウム化合物で、1967 年に浅井、及川らによって世界で初めて合成に成功した水溶性有機ゲルマニウムである。その結晶構造は筒井らによって明らかにされている (図 1) [Tsutsui et al. 1976]。Ge-132 の結晶は Ge と酸素原子が 6 個ずつ Ge-O 結合で 12 員環の構造を形成し、シート状のポリマー構造をとる。また Ge 原子にカルボン酸を持つプロパニル基が上下に互い違いに結合し、各シートはカルボキシエチル間で水素結合をして積層している。Ge-132 は結晶性が高く、温度・湿度・光などに極めて安定で、水に溶解すると室温では約 1% が可溶で、飽和溶液では pH2~3 の酸性を呈し、アルカリを用いて中和をすると溶解度が増加する。加水分解を受けると Ge-O の結合が切断され、Ge に水酸基が 3 つとカルボン酸が結合した 3-(trihydroxygermyl) propanoic acid [分子式 : $(\text{HO})_3\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$] (THGP) のモノマー構造をとる。生体は水が豊富なため、経口で摂取した後は Ge-132 が水解された THGP の形で存在し、生理作用を及ぼしていると考えられる。Ge-132 は経口摂取した 20-30% が腸管より吸収され、24 時間後には 80-90% が尿から排出される。また、48 時間後にはほぼ全量が排出され、体内に残存することはない[鹿児島 他. 1986; 藤田 浩 1983]。様々な安全性の試験が行われ[永田 他. 1978; 新保 他 1980; 杉谷 幸男 他 1986; Sanai et al. 1991]、毒性の低い非常に安全な物質である。現在、日本では Ge-132 は健康食品および化粧品素材として使用されて、海外でも同様の化合物がサプリメントとして使用されている。

Ge-132 の生理作用としては、インターフェロン γ の誘起を介してマクロファージと NK 細胞の活性化の誘導[Aso et al. 1985; 桑原 正人 他 1983]、がん細胞に対する抗腫瘍効果[Fukazawa et al. 1994; Kumano et al. 1985] など、宿主の免疫を賦活させる作用が報告されている。また、リウマチ症状モデルに対する抗炎症効果 [佐々木 他 1983]、骨粗しょう症モデルに対する骨代謝調節作用[Fujii et al. 1993]、四塩化炭素による肝臓障害モデルでの抗酸化作用[佐々木 他 1984]、鎮痛作用[鈴木 他 1983; Dozono et al. 1996]、火傷の痛みの緩和 [小池 他 2019]などの様々な生理作用が報告されている。

一方、酸化ゲルマニウムや四塩化ゲルマニウムのような炭素類を持たない無機ゲルマニウム化合物が存在する。一般に、無機ゲルマニウムはポリエチレンテレフタレート (PET) 樹脂を合成する際の触媒として用いられたり、光ファイバーの屈折調整剤

などに使用されている。特に酸化ゲルマニウムは少量であれば有機ゲルマニウムと同様に、有用な生理活性効果を持つが[Kada et al. 1984]、慢性的に摂取すると腎臓に蓄積し、腎毒性を引き起こし、最悪な場合、腎不全を引き起こして死亡するケースも報告されている[佐内 他 1989: Sanai et al. 1990]。酸化ゲルマニウムにはヒトおよび動物において、継続的摂取による健康障害に強い因果関係があるため、日本では酸化ゲルマニウムを含有させた食品を継続的に摂取することは避けることとされている[厚生労働省 1988]。

近年、Ge-132 は水溶した状態で THGP としてシスジオール構造を有する物質 ATP、ADP、AMP、アデノシンあるいはグルコース等と錯体形成することが報告されている[Nakamura et al. 2015: Shimada et al. 2015: Shimada et al. 2017]。これらの物質と THGP が錯体形成をすることで、リガンドとレセプターの結合阻害によるシグナル伝達の抑制効果、基質と酵素の結合阻害による酵素反応の阻害効果、錯体形成の強さの違いによって物質の平衡状態を傾けて、酵素反応を促進させるなどの効果が報告されている。THGP の錯体形成を介した効果として ATP 作動性チャネルのカルシウムイオン流入の阻害[Nakamura et al. 2015]、アデノシンデアミナーゼ酵素によるアデノシン基質分解反応の阻害[Shimada et al. 2017]、糖異性化反応の促進[Nagasawa et al. 2017]などが報告されており、構造的な作用に着目した研究も行われているが、Ge-132 の生理作用には未だ不明な点が多く存在する。

近年、多くの疾病（神経障害、アテローム性動脈硬化症、癌など）に対して酸化ストレスが関与することが報告されている[Birben et al. 2012]。酸化ストレスは生体内の活性酸素と抗酸化能力のバランスが崩れることで生じると考えられている。生体内の活性酸素はミトコンドリアの電子伝達系をはじめ、ストレス時に細胞膜や細胞質に存在する NADPH オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼおよび uncoupling を起こした NO 合成酵素などの酵素反応を介して生じる[谷口 他 2009]。さらに、酵素反応以外でも鉄イオンなどの金属イオンが触媒となって過酸化水素から反応性の高いヒドロキシラジカルが生じる[谷口 他 2009]。一般的に活性酸素は細胞内のシグナル伝達分子として、細胞の分化、増殖や代謝機能の調節に関与する[Akaike 2014]。また、血球などの免疫細胞が外来の病原菌やウイルスに対して活性酸素を放出することで、体内の免疫反応を助けて感染防御の役割を果たす[Yang et al. 2012]。よって、生体には活性酸素が必要であるが、紫外線あるいは放射線などの環境要因の他に、薬剤や酸

化された物質の摂取などの影響で生体に必要以上の活性酸素の増加を生じさせることがある。過剰な活性酸素は組織や細胞に傷害を与え、様々な疾病の要因となることが知られている。例えば、脳において過剰な活性酸素は神経変性を引き起こし、アルツハイマー病やパーキンソン病の要因となり[Angelova et al. 2018]、また血管においては炎症を引き起こしてアテローム性動脈硬化の要因ともなる[Madamanchi et al. 2004]。さらには DNA 損傷を引き起こし、癌化にも関与する[Kumari et al. 2018]。それゆえ、体内の抗酸化のバランスを保つことが重要である。Ge-132 は免疫疾患患者の血漿中のスーパーオキシド消去活性を正常化したり[Prónai et al. 1992]、四塩化炭素によって酸化ストレスを誘導した肝臓障害モデルでのマウス血清中 GOT、GPT 活性の減少[佐々木 他 1984]などの抗酸化作用を有することが報告されている。しかしながら、生体内の脂質過酸化作用に関しては germanium sesquisulfide などの Ge-132 の誘導体は強い抗酸化作用を示すが、Ge-132 をはじめとする germanium sesquioxide は全く酸化抑制作用を示さないことが報告されている[大澤 他 1988]。そのため、Ge-132 は生体内の抗酸化機構を介して酸化を抑制していると考えられるが、その詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。

ヒトおよびラットにおいては、Ge-132 摂取によって糞便色が変わることが報告されている[Nakamura et al. 2010]。さらに Ge-132 摂取によって誘導される糞便色素類は抗酸化能を持つことも報告されている[Zibera et al. 2016; Nakamura et al. 2006]。しかしながら、その色素変化のメカニズムやこれに伴う生理作用の全容は明らかになっていない。そのため、Ge-132 の糞便色素の変化について明らかにすることは、Ge-132 の摂取による抗酸化作用をはじめ、多様な生理作用の解明につながると期待される。さらに、Ge-132 は経口摂取による生理作用だけでなく、皮膚への塗布による作用として火傷の疼痛緩和効果 [小池 他 2019] と創傷の修復効果[Matsumoto et al. 2016]が報告されているが、Ge-132 の皮膚吸収あるいは炎症や細胞・組織損傷によって増加する酸化ストレスに対する効果については不明な点が多く存在する。そこで、本研究では Ge-132 の多様な生理作用を解明する上で、特に抗酸化作用に着目し研究を行った。前述の通り、酸化ストレスは多くの疾病や炎症などに関与するため、Ge-132 の抗酸化効果を解明することはそれらの予防・治療に役立つことが期待される。よって本研究では、Ge-132 経口摂取による糞便色素の変化に着目し、それに関係する作用および皮膚における抗酸化作用機構解明の研究を行った。

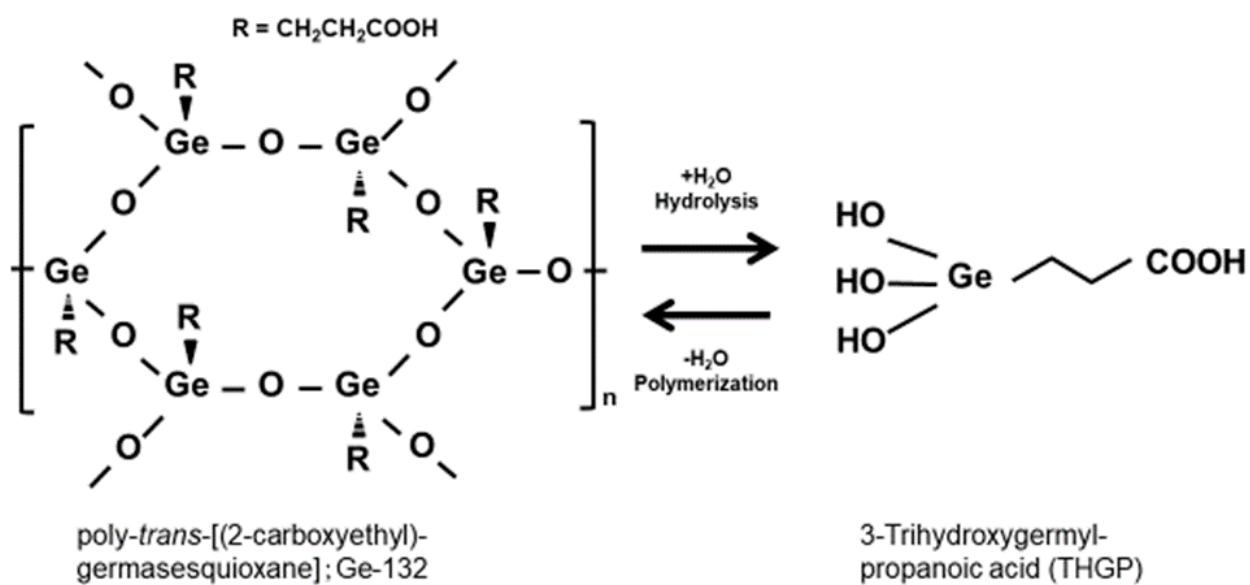


図 1 Ge-132 とその単量体 THGP の構造

第2章 Ge-132 摂取による糞便色素の 変化および抗酸化物質誘導効果の解明

2.1 はじめに

古来、糞便は健康のバロメーターなどと言われ、便の形、色、硬さなどの状態を比較することは、自分の健康状態を把握するため一つの有益な指標となる。特に色味に関しては、黒食便は腸管出血、白色灰色系であると胆汁分泌不良による黄疸の疑いなど、体の病態を示唆するものとなる。一方で、摂取する食べ物によっても便の色が変化する。例えば、イカ墨やポリフェノールを多く含むものを摂取すると便が黒ずんだり、ホウレンソウなどの緑黄色野菜は未消化の繊維がそのまま出ることによって色味が変化するため、健康状態を把握するためには便の色以外にも総合的に判断する必要がある。

Ge-132 の経口摂取は便の色を黄色に変化させることがラットを用いた実験で確認されている[Nakamura et al. 2010]。中村らは便色の変化を促す難消化性オリゴ糖（ラフィノース）と Ge-132 の作用について比較解析した[Nakamura et al. 2012]。ラフィノースは腸内細菌叢を変化させ、腸内環境での発酵を増加させることによる便色の変化であった。一方、Ge-132 は腸内細菌叢には影響は与えず、胆汁排出量および胆汁中のビリルビン量の増加に加え、盲腸内容物中で主に便の色を決められているステルコビリンの量を増加させることが便色の変化させる要因であることを確認し、ラフィノースとは異なる作用機構であることを明らかにした。

赤血球は骨髄で産生されてから分解されるまでヒトでおよそ 120 日と考えられており [Shemin. 1989]、ビリルビンは赤血球色素（ヘム）の分解産物の一つである [Raimo et al. 1969]（図 2）。老化した赤血球は脾臓や肝臓などのマクロファージやクッパー細胞などの貪食細胞によって捉えられて分解される[Alam et al. 2017]。赤血球の成分であるヘモグロ빈はヘムとグロビンに分解され、グロビンはアミノ酸として再度タンパク質合成の原料として利用される。一方、ヘムはヘムオキシゲナーゼによって酵素的に酸化されて開裂し[Sass et al. 2003]、鉄とビリベルジンに代謝され、さらにビリベルジンをビリルビンリダクターゼが還元することによってビリルビンが産生される。ビリルビンは水に溶けにくいいため、肝臓でグルクロン酸に抱合されることで、胆汁中に溶解込み、腸管へと排出される（図 3）。排出されたビリルビンは腸内細菌によって還元的に代謝されてウロビリノーゲンを生成する。嫌気的環境下でウロビリノーゲンは構造異性体であるステルコビリノーゲンに還元され、さらに大部分はステルコビリニンに酸化されて糞便に排出される。一部は腸管より吸収され尿中にウロビ

リンとしても排出される。いずれも便および尿の色素成分となる。特にウロビリノーゲン（ステルコビリノーゲン）は強い抗酸化能力があることが示されている [Nakamura et al. 2006]。

前述したが、赤血球はヒトでおよそ 120 日のサイクルで新しい赤血球に作り替えられる。特に造血機能は低酸素状態（貧血など）になると腎臓からエリスロポエチンが放出され、骨髄で赤血球の生産が促されて血液中の赤血球量が維持されるように働く [Koury 2005]。Ge-132 の摂取は赤血球の分解が亢進されるため、血液中の赤血球量が減少している可能性があるが、ヘマトクリット値が維持されることが報告されており [Nakamura et al. 2010]、造血能にも影響を及ぼしている可能性が考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

また、Ge-132 経口摂取によって糞便色の変化に伴う糞便中の赤血球代謝色素量の詳細な変化や抗酸化能への影響についても明らかになっていない。便中の赤血球代謝色素、特にステルコビリノーゲンが増加していれば、便中の抗酸化能の増加にも期待できるが未解明のままである。そこで本研究では Ge-132 摂取による便中に含まれる赤血球の代謝過程で生じる色素の量に着目し、抗酸化誘導能および赤血球代謝回転（赤血球分解・造血）に与える影響について検討した。抗酸化誘導能の効果を明らかにすることで、Ge-132 の酸化障害による疾病の予防・治療効果を解明することが可能となる。さらに赤血球の代謝回転の促進効果は、血液中に新しい赤血球の割合が増加することで、生体内に十分な酸素供給がなされる。十分な酸素の供給はミトコンドリアでのエネルギー産生の促進につながる可能性があり、細胞の活性化にも影響を及ぼす可能性がある。これらの作用が糞便の色と関係があることを明らかにすることで、便の色を確認することは体内でこれらの効果が生じていると確認できるようになる可能性がある。本章では、Ge-132 摂取による糞便色素の変化機構について研究を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 試薬

断りがない限り、いずれの試薬も特級以上のグレードの試薬を用いた。

[動物飼育]

- ・ α コーンスターチ（オリエンタル酵母株式会社）
- ・ ミルクカゼイン（オリエンタル酵母株式会社）
- ・ AIN76 ビタミン（オリエンタル酵母株式会社）
- ・ AIN76 ミネラル混合（オリエンタル酵母株式会社）
- ・ セルロースパウダー（オリエンタル酵母株式会社）
- ・ DL-メチオニン（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ コリン酒石酸水素塩（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ コーンサラダ油（日本コーンスターチ株式会社）
- ・ Ge-132（株式会社 浅井ゲルマニウム研究所）

[HPLC 分析]

- ・ 酢酸（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 酢酸エチル（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ pH2.2 クエン酸ナトリウム緩衝液（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ メタノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ メタノール（純正化学株式会社）：HPLC グレード
- ・ アセトニトリル（純正化学株式会社）：HPLC グレード
- ・ Stercobilin, Hydrochloride（Frontier Scientific 社）
- ・ ビリルビン（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ アスコルビン酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬工業株式会社）

[ステルコビリノーゲン分析]

- ・ 酢酸（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 酢酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ Urobilinogen（SANTA CRUZ 社）

- ・ 石油エーテル（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 窒素ガス（函館酸素株式会社）
- ・ p-ジメチルアミノベンズアルデヒド（関東化学株式会社）
- ・ 塩酸（関東化学株式会社）

[胆汁酸測定]

- ・ 総胆汁酸テストワコー（富士フィルム和光純薬工業株式会社）

[抗酸化能、ラジカル消去活性]

- ・ 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ トロロックス（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ Tris-HCl（Promega 社）
- ・ エタノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ レドックスアッセイ 総抗酸化能(TAC)測定キット（メタロジェニクス株式会社）

[マクロファージ赤血球貪食能試験]

- ・ ダルベッコ変法イーグル培地（日水製薬株式会社）
- ・ FBS（biosera 社）
- ・ アルゼバー溶液 pH6.1（武藤化学株式会社）
- ・ RAW264.7（RIKEN BRC）
- ・ メイグリュンワルド染色液（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 1/15 M PBS pH6.4（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ ギムザ染色溶液（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ グリセロール（日本薬局方）

[cDNA 化、Real time PCR]

- ・ Isogen（ニッポンジーン社）
- ・ クロロホルム（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ エタノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 2-プロパノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 大塚蒸留水（大塚製薬株式会社）

- ・ Super Script^{III} 逆転写酵素 (Invitrogen 社)
- ・ 5×FS buffer (Invitrogen 社)
- ・ 50μM Oligo dT 20 (SIGMA 社)
- ・ 10μM dNTP Mix (Promega 社)
- ・ Rnase Inhibitor (富士フィルム和光純薬工業株式会社)
- ・ 0.1M DTT (Invitrogen 社)
- ・ TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ社)

[骨髄細胞の赤芽球コロニー形成能測定試験]

- ・ PBS (富士フィルム和光純薬工業株式会社)
- ・ Iscove's Modified Dulbecco's Medium 培地 (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社)
- ・ MethoCult M3334 培地 (株式会社ベリタス)

2.2.2.1 糞便色素類の分析と活性酸素消去能の評価

2.2.2.1.1 供試動物

5 週齢 ICR 雄性マウス 24 匹 (日本チャールズリバー社)

2.2.2.1.2 飼育条件

5 週齢の ICR 雄性マウス 24 匹を購入し、予備飼育を 3 週間行った。予備飼育はコントロール組成 (表 1 動物飼育飼料組成) の粉末飼料に馴化させた。予備飼育終了後、本試験飼育は各群の組成の餌を 5 日間与えた。実験群は飼料に Ge-132 を 0.05% 添加したものを経口摂取させる群 (0.05% Ge-132 群)、飼料に Ge-132 を 0.2% 添加したものを経口摂取させる群 (0.2% Ge-132 群) を設定し、コントロール群として Ge-132 を添加していない飼料を経口摂取させる群 (Chow diet 群) の 3 群を設けた。本飼育開始の 6 日前から糞便を隔日、1 日分を毎朝回収し (計 3 回回収)、糞便中の赤血球代謝色素であるビリルビン、ステルコビリノーゲンおよびステルコビリンの量を測定して、色素の量が群間にバラつきがないように本飼育開始時に群分けを行った。本飼育開始 1 日目からは毎日体重・摂食量を測定し、毎朝糞を回収した。なお回収した糞はビリルビン、ステルコビリノーゲン、ステルコビリン量およびラジカル消去活性と総抗酸化活性の測定まで -80℃ で保存した。

2.2.2.1.3 解剖

解剖はイソフルランによる麻酔下で実施し、盲腸内容物、全血を回収し、以下に示す測定項目の分析に供した。採取したサンプルは、盲腸内容物は-80℃で分析まで保存し、全血は腹部大静脈より採血し、分析まで氷冷した。採材したサンプルで、盲腸内容物中のビリルビン量、ステルコビリノーゲン量、ステルコビリニン量、胆汁酸量およびラジカル消去活性を測定した。さらに血中のヘマトクリット値を測定した。

2.2.2.1.4 ビリルビン、ステルコビリニン色素抽出・分析

回収したマウスの糞便をすり鉢で全量粉碎した。褐色瓶に粉碎した糞便 0.2g、アスコルビン酸 Na を 50mg 測りとり、色素抽出溶媒（酢酸：酢酸エチル：水の容量比 = 360:90:50）を 4ml 入れた後、低温下（4℃）でスターラーを用い、1 日攪拌しながら色素を抽出した。抽出後、全量を 5ml 容のエッペンチューブに移し、その一部を 9600 × g、15 分、4℃で遠心分離した。上清をフィルトレーションろ過し（孔径 0.45 μm、DISMIC 社）、HPLC 分析用のサンプルとした。盲腸内容物は使用サンプル、抽出溶媒すべてを糞便からの抽出の場合の半量で抽出を行い、操作自体は同様にして HPLC 分析用のサンプルとして調製した。ビリルビン、ステルコビリニンは各々 UV 波長 450nm、490nm で測定した。色素のそれぞれの標準液の作製方法を下記に記載する。ビリルビンの標準液の作製はビリルビン 5mg を秤量し、0.1N NaOH 溶液を 1ml、10%アスコルビン酸 Na 溶液を 100μl、超純水を 400μl 加え、遮光環境下で攪拌する。溶解を確認後、メタノール 2.5ml 加えてさらに攪拌した。攪拌後 50ml のメスフラスコに溶液を移し、10%アスコルビン酸 Na 溶液を 5ml 加えた。メタノールで秤量瓶を 3 回洗い、全量メスフラスコに入れ、メタノールでメスアップし、ビリルビン標準液（100μg/ml）とした。ステルコビリニンの標準液の作製はステルコビリニン 1mg を秤量し、超純水を 2ml 加えた。溶解を確認後、メタノール 5ml 加えて攪拌し、10ml のメスフラスコに移した。メタノールで秤量瓶を 3 回洗い、全量をメスフラスコに入れ、メタノールでメスアップし、ステルコビリニン標準液（100μg/ml）とした。HPLC 条件については下記に記載する。色素の抽出および HPLC の分析方法は中村らの方法を参考にして[nakamura et al. 2010, nakamura et al. 2011]、2 種類の色素を一斉に分析ができる条件で行った。

【HPLC 条件】

1. 分析装置：HPLC 装置（島津製作所製）
2. カラム：Mightysil RP18-GP II 750mm4.6Φ 3μ ODS カラム（関東化学株式会社）
3. 溶離液
溶離液 A：クエン酸緩衝液 pH5 (20mM)：メタノール：アセトニトリル 6:3:1 (v/v/v)
溶離液 B：クエン酸緩衝液 pH5 (20mM)：メタノール：アセトニトリル 2:9:3 (v/v/v)
4. 送液量：0.75ml/ min
5. 分析容量：20μl
6. 検出条件
検出器：フォトダイオードアレイ 波長 450, 490nm
7. グラジエント条件
表 2 に記載する。

2.2.2.1.5 ステルコビリノーゲン色素抽出・分析

試験管にすりつぶした糞便を 0.1g または盲腸内容物 0.05- 0.1g、アスコルビン酸 Na を 25mg 測りとり、抽出溶媒（0.5M 酢酸緩衝液 pH5.0）を 3ml 入れ、試験管内を窒素ガスで満たし、3h、4℃で振盪抽出した。抽出後、石油エーテルを 5ml 入れ、よく攪拌後、1000×g、5min 遠心分離し、新しい試験管に上清を回収した。石油エーテルによる抽出操作を 2 回繰り返し、上清を一つにまとめ、5ml まで窒素ガスで濃縮した。濃縮した石油エーテル色素抽出液にエールリッヒ試薬を 1ml 加え、よく攪拌し、ステルコビリノーゲンを反応させた。反応後、飽和酢酸ナトリウムを 3ml 加えて反応を止め、1000×g、5min 遠心分離後、下層の溶液を回収し、560nm の吸光値を測定した。なお標準はステルコビリノーゲンの構造異性体であるウロビリノーゲン試薬を希釈し、0.015-0.1mg 分のウロビリノーゲンを含んだ溶液を準備した。サンプルの抽出方法と同様の操作を行い、560nm の吸光値を測定し、検量線を作成した。色素の抽出および定量方法は Henry らの方法[Henry et al. 1961]を参考にして行った。

2.2.2.1.6 盲腸内容物中の胆汁酸測定

盲腸内容物を 10mg 測りとり、90%エタノール 200 μ l を加え、よく攪拌した。65°C、1 時間インキュベートを行い、13800 \times g、10 分、4°C で遠心分離し、上清を回収した。残渣に 90%エタノール 200 μ l を加え攪拌して、同条件で遠心分離し、上清を回収した。この洗浄作業を 2 回繰り返し（合計 3 回抽出）、回収した溶液を減圧乾燥した。90%エタノール 1ml 加え再溶解して、遠心分離し、上清を総胆汁酸テストワコーで盲腸内容物中の胆汁酸量を分析した。胆汁酸の抽出は岩見らの方法[岩見 他 2002]に従い、行った。

2.2.2.1.7 糞便・盲腸内容物水抽出物の抗酸化活性測定

試験管にすりつぶした糞便 0.1g および盲腸内容物 0.025g を測りとり、超純水 3ml を加え、試験管内を窒素ガスで満たし、3h、4°C で振盪抽出した。抽出後、9600 \times g、5min 遠心分離し、上清中の抗酸化能を 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカル消去活性測定および銅イオンの還元力によって評価するレドックスアッセイ総抗酸化能(TAC)測定キットを用いて測定した。

DPPH をエタノールに溶解し、0.75mM の溶液になるよう調製した。また Standard としてトロロックス（TE）を用い、12.5-200 μ M の溶液になるようエタノールで溶解した。緩衝液として 100mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）を用いた。サンプルは抽出溶液 400 μ l、エタノール 320 μ l、Tris 溶液 80 μ l を入れた。Standard 溶液は 2 連で行い、トロロックス溶液 320 μ l、水 400 μ l、Tris 溶液 80 μ l を入れた。Blank 溶液として水 400 μ l、エタノール 320 μ l、Tris 溶液 80 μ l を入れた。それぞれの反応溶液を調製後、DPPH 溶液 200 μ l ずつ入れて良く攪拌し、暗所で 20 分間静置した。溶液の 520nm の吸光度を測定した。総抗酸化活性はキットのプロトコールに従い、測定した。

2.2.2.1.8 各糞便色素の抗酸化能の比較

糞便色素であるビリルビン、ステルコビリノーゲンおよびステルコビリンの抗酸化能について DPPH ラジカル消去活性で評価した。ビリルビンは 0.1N の水酸化ナトリウム水溶液を加え、0.1mg/ml に調製し、反応溶液終濃度 0.025mg/ml（17.1 μ M）になるよう水で希釈した。ステルコビリノーゲンは構造異性体であるウロビリノーゲンを使用した。ウロビリノーゲンおよびステルコビリンは水で溶解し、反応溶液終濃度

0.025mg/ml（それぞれの終濃度 16.9 μ M、16.8 μ M）になるよう希釈した。さらに Ge-132 は THGP として反応溶液終濃度 5mM となるように調製した。比較対象としてアスコルビン酸水溶液を用い、反応溶液終濃度 20 μ M となるように調製した。DPPH ラジカル消去活性の測定手法は 2.2.2.1.7 に記載した方法に従い、反応溶液の 540nm の吸光度を測定した。

2.2.2.1.9 血中ヘマトクリット値

解剖時に回収した血液をヘパリン処理したヘマトクリット毛細管（EM マイスター）に吸い上げ、13800 \times g、10 分で遠心分離し、沈殿する赤血球部分の高さを、血漿部分を含む全血の高さで割ることで血中のヘマトクリット値を測定した。

2.2.2.2 マクロファージへの Ge-132 添加による赤血球貪食への影響評価

2.2.2.2.1 供試動物

7 週齢 C57BL/6J 雄性マウス 12 匹（日本チャールズリバー社）

2.2.2.2.2 飼育条件

7 週齢の C57BL/6J 雄性マウス 12 匹を購入し、予備飼育を 9 日間行った。予備飼育はコントロール組成（表 1 動物飼育飼料組成）の粉末飼料に馴化させた。実験群は飼料に Ge-132 を 0.05% 添加したものを経口摂取させる群（0.05% Ge-132 群）とコントロール群として Ge-132 を添加していない飼料を経口摂取させる群（Chow diet 群）を設けた。予備飼育終了後、本試験はそれぞれの組成の餌を 4 日間与えた。本試験開始時に群間で体重にバラつきがないように群分けを行った。

2.2.2.2.3 解剖

解剖はイソフルランによる麻酔下で実施し、全血を回収した。採取した各マウスの血液を 850 \times g で 10 分間遠心分離し、上清の血漿部分を捨て、赤血球細胞を PBS に懸濁した。さらに細胞懸濁液を 850 \times g で 10 分間遠心分離してから上清廃棄することで洗浄した。赤血球細胞が壊れないようにするためにアルゼバー溶液に再懸濁し、懸濁液をマクロファージ赤血球貪食試験で使用するまで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

2.2.2.2.4 マクロファージ赤血球貪食能試験

RAW264.7 細胞を、カバーガラスを入れた 6 ウェルプレートに 5×10^5 cells/well 播種し、カバーガラス上に細胞を 10%FBS 含有の DMEM 培地で 37°C 、5% CO_2 下で培養した。細胞を THGP 無処理および $500 \mu\text{M}$ の濃度で 1 日処理した。解剖時に保管した赤血球のアルゼバー溶液懸濁したものを $300 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿物を PBS に懸濁した。さらに懸濁液を $300 \times g$ で 10 分間遠心分離した後、沈殿物を PBS に再懸濁した。懸濁液の赤血球数をカウントし、 5×10^7 cells / ml に調整した。調製した赤血球懸濁溶液を 5×10^6 cells / well になるよう RAW264.7 に播種した。5% CO_2 、 37°C で 1 時間インキュベートし、赤血球を貪食させた。インキュベーション後、細胞表面を PBS で洗浄して貪食されなかった余剰な赤血球を除去した。メイグリュンワルド染色液を加え、室温で 5 分間染色した。染色溶液を廃棄し、 $1/15 \text{ M}$ PBS pH6.4 を加え、室温で 5 分間置いた。PBS 溶液を廃棄し、25 倍に希釈したギムザ染色溶液で室温にて 15 分間染色した。染色溶液を捨て、純水を加え、室温で 5 分間置いた。染色した RAW264.7 細胞を 50%グリセロールで封入し、DS-Fi3 デジタルカメラ（ニコン）を備えた倒立顕微鏡で RAW264.7 細胞および貪食された赤血球を観察した。 $\times 200$ の倍率で 5 つの顕微鏡視野をランダムに撮影し、約 100 個の RAW264.7 細胞を数え、さらに数えたマクロファージが貪食した赤血球の数を数えた。マクロファージの赤血球貪食能は、マクロファージ 100 個あたりの貪食された赤血球の総数と、貪食マクロファージの平均赤血球貪食数によって評価した。

2.2.2.2.5 マクロファージ貪食能に関与する遺伝子発現変動

RAW264.7 を 6 ウェルプレートに 5×10^5 cells / well で播種し、THGP 無処理および $500 \mu\text{M}$ 濃度で 1 日間 37°C 、5% CO_2 下で培養した。THGP 処理の翌日に細胞上清を除去し、細胞に Isogen 1ml を加え、細胞を溶解した。細胞溶解液をニッポンジーソンのプロトコールに従い、細胞の Total RNA を抽出した。なお Total RNA の濃度は 260nm の吸光値から算出し、純度は 260nm/ 280nm の比で確認し、純度 1.8 以上の高純度の RNA のみをサンプルとして用いた。Total RNA 量 $1.0 \mu\text{g}$ 分を逆転写し、cDNA を合成した。逆転写は Super ScriptIII 逆転写酵素を用いて行った。各サンプルに Oligo dT20 $3 \mu\text{l}$ 、「 $37 \mu\text{l}$ -RNA 溶液量 μl 」分の大塚蒸留水を加えて希釈した。その後、 65°C 、5 分間で反応させ、氷上に置いた。表 3 の溶液を必要量混合し、Master

mix を作製した。Master mix を各サンプルに 20 μ l 加え、逆転写反応（50 $^{\circ}$ C 1 時間、95 $^{\circ}$ C 5 分）を行い、4 $^{\circ}$ C で十分サンプルを冷やした後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

合成した cDNA を用い Real Time PCR 法で mRNA 量を定量した。Real Time PCR には TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) を用いた。PCR 反応条件は Forward primer、Reverse primer、TB GreenTM Premix Ex TaqTM II、大塚蒸留水を表 4 に示した量で混合し、サンプル溶液に混合した。反応は 95 $^{\circ}$ C、30s のステップを 1 回、95 $^{\circ}$ C、5s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、30s のステップを 50 回繰り返す 2 ステップ反応にて行った。使用したプライマー配列は表 5 に示した。なお、内部標準を Ribosomal Protein S18 (Rps18) とし、Scavenger receptor A1 (Sr-a1)、Heme oxygenase 1 (Hmox-1)、Heme oxygenase 2 (Hmox-2) 発現量の値を内部標準で補正を行った。

2.2.2.3 骨髓細胞の赤血球への分化に対する Ge-132 摂取の影響検討

2.2.2.3.1 供試動物

7 週齢 ICR 雄性マウス 30 匹（日本チャールズリバー社）

2.2.2.3.2 飼育条件

7 週齢の ICR 雄性マウス 30 匹を購入し、予備飼育を 7 日間行った。予備飼育はコントロール組成（表 1 動物飼育飼料組成）の粉末飼料に馴化させた。実験群は飼料に Ge-132 を 0.05% 添加したものを 4 日間経口摂取させる群（0.05% Ge-132 4day 群）、飼料に Ge-132 を 0.05% 添加したものを 7 日間経口摂取させる群（0.05% Ge-132 7day 群）を設定し、コントロール群として Ge-132 を添加していない飼料を経口摂取させる群（Chow diet 群）の 3 群を設けた。予備飼育終了後、本試験は各群の組成の餌を 4 または 7 日間与えた。本飼育開始時に群間で体重にバラつきがないように群分けを行った。

2.2.2.3.3 解剖

解剖はソムノペンチル麻酔下で実施し、腹部大静脈からの全血採取で失血死させた後、マウスの左大腿骨を採材した。採材した各マウスの左大腿骨についている肉片をハサミを用いて適切に削ぎ落とし、骨髓細胞を生理食塩水を用いて 21G 注射針にて洗い出すことによって、クリーンベンチ内で単離し、赤芽球への分化能について検討した。

2.2.2.3.4 骨髓細胞の処理、培養および赤芽球コロニーの観察

採材した左足大腿骨の肉片を除いた後、21G 針で 5ml の生理食塩水で骨髓細胞を取り出した。採取した骨髓細胞にさらに Iscove's Modified Dulbecco's Medium 培地 5ml を加えて混合し、氷冷した。細胞数を計数し、赤芽球測定メチルセルロース培地に 2.5×10^5 cells となるように細胞浮遊液を加えた。2ml 滅菌ディスポピペットで混合した後、1ml ずつ 2 枚の 35mm シャーレに播種した。さらに 1ml の滅菌水を入れた 35mm シャーレに蓋をせずに、これら 3 枚の 35mm シャーレを 100ml シャーレに入れて 5%CO₂, 37°C にて 14 日間培養した。前期赤芽球系前駆細胞のコロニー形成数 (BFU-E) を顕微鏡下でカウントした。カウントには×10 対物レンズを使用した。

2.2.2.4 統計処理

各実験結果における値は平均値±標準偏差で示し、Excel 統計処理ソフトを用いて、統計処理を行った。多群間の統計的比較は、すべての群で正規分布であるとみなされた場合は、バートレット検定を行い、等分散であると検定された時は一元配置分散分析を行った。ここで有意差が確認された時は Dunnet の多重比較検定を行った。等分散でないと検定された時はクラスカル・ワーリス検定を行い、有意差を検定した。正規分布でないとみなされた場合もクラスカル・ワーリス検定を行った。ここで有意差が確認された時は Steel 検定により多重比較検定を行った。また盲腸内容物の抗酸化能に関して Student t 検定を用いた。いずれの検定においても危険率 5 あるいは 1% で有意差を検定した。

2.3 結果

2.3.1 Ge-132 摂取によるマウス糞便の色調変化および糞便中の赤血球代謝色素量の変化

Ge-132 摂取によってマウス糞便の色調が変化するかを調べるため、本飼育時開始から経時的に糞便を回収した。図 4 は飼育中に回収した糞便の写真である。Chow Diet 群では糞便の色調は変化していないが、Ge-132 を含む餌を与えている 0.05% Ge-132 群および 0.2% Ge-132 群では摂取 3 日目より便色が明るい黄色になっていることが判明した（図 4）。次に、マウス糞便中の赤血球代謝色素であるビリルビン、ステルコビリノーゲンおよびステルコビリニン量について測定し、各々の定量結果を図 5 に示した。なお 0 日目の糞便色素量のデータは、予備飼育中に回収した 3 回分の糞便と本飼育 0 日目の糞便色素量の平均値とした。色素量の経時的な変化については、各々の群の摂取前（0 日目）との比較で検定を行った。ビリルビン量は Ge-132 摂取による有意な増加は認められなかった（図 5A）。ステルコビリノーゲン量は Ge-132 摂取によって 5 日目に 5% 有意に増加し（0.05% Ge-132 群：0 日目 467 ± 156 、5 日目 714 ± 160 、0.2% Ge-132 群：0 日目 486 ± 122 、5 日目 $652 \pm 139 \mu\text{g/g feces}$ ）、また 0.05% Ge-132 摂取群では 4 日目にも 5% 有意に増加した（0.05% Ge-132 群：0 日目 467 ± 156 、4 日目 $686 \pm 116 \mu\text{g/g feces}$ ）（図 5B）。ステルコビリニン量も Ge-132 摂取 5 日目に 5% で有意な上昇を確認した（0.05% Ge-132 群：0 日目 126 ± 37.8 、5 日目 202 ± 48.3 、0.2% Ge-132 群：0 日目 129 ± 33.1 、5 日目 $183 \pm 36.7 \mu\text{g/g feces}$ ）（図 5C）。ビリルビン、ステルコビリノーゲンおよびステルコビリニンの合計色素量は Ge-132 摂取によって有意に増加した（0.05% Ge-132 群：0 日目 602 ± 190 、5 日目 931 ± 185 、0.2% Ge-132 群：0 日目 588 ± 152 、5 日目 $829 \pm 158 \mu\text{g/g feces}$ ）（図 5D）。これらの結果は、Ge-132 が糞便の色を変化させる要因が糞便中に赤血球代謝色素（特にステルコビリニン）が増加することで生じる可能性を示している。

2.3.2 Ge-132 摂取によるマウス盲腸内容物中の色調変化、赤血球代謝色素量および胆汁酸量

続いて、盲腸内容物の色調および色素量について調べた。盲腸を含む内容物の色は Ge-132 摂取によって、明るい黄色みを帯びることが判明した（図 6）。次に、マウス盲腸内容物中の赤血球代謝色素（ビリルビン、ステルコビリノーゲン、ステルコビリ

ン) 量および胆汁酸量について測定し、各々の定量結果を図 7 に示した。盲腸内容物中のビリルビンおよびステルコビリノーゲンは Ge-132 摂取によって有意な増加は認められなかったが (図 7A,B)、ステルコビリンは Ge-132 摂取によって 5%有意に増加した (Chow diet 群 : 50.0 ± 11.8 、0.05%Ge-132 群 : 77.0 ± 20.3 、0.2% Ge-132 群 : $81.8 \pm 4.8 \mu\text{g/g feces}$) (図 7C)。これらの結果は糞便の色と同様に、盲腸内容物中の赤血球代謝色素が増加して色の変化が生じたと考えられる。しかしながら胆汁排せつ量に関わる胆汁酸量は Ge-132 摂取によって有意な増加は認められなかった (図 7D)。

2.3.3 Ge-132 摂取によるマウス糞便および盲腸内容物中の抗酸化活性および各色素の抗酸化活性の比較

Ge-132 摂取によって糞便中に増加することが明らかになった色素類のうち、ステルコビリノーゲンは既知の抗酸化物質である。そこで、色素の増加に伴う糞便中の抗酸化能力について、DPPH ラジカル消去活性および銅イオンの還元力を解析した。マウス糞便のラジカル消去活性および総抗酸化活性と盲腸内容物中のラジカル消去活性について測定し、各々の定量結果を図 8 に示した。ラジカル消去活性は Ge-132 摂取によって 2 日目に 5%有意に増加し (Chow diet 群 : 2.92 ± 0.30 、0.05%Ge-132 群 : 3.15 ± 0.17 、0.2% Ge-132 群 : $3.38 \pm 0.13 \mu\text{mol TE / g feces}$)、0.2%Ge-132 群では 4 日目でも 5%で有意な増加が見られた (Chow diet 群 : 2.74 ± 0.25 、0.2% Ge-132 群 : $3.21 \pm 0.26 \mu\text{mol TE / g feces}$) (図 8A)。糞便中の総抗酸化活性は 4 日目に 0.05% Ge-132 含有摂取群で摂取前と比較して 5%有意に増加した (0.05%Ge-132 群 : 0 日目 8.93 ± 0.51 、4 日目 $10.0 \pm 0.74 \mu\text{mol AA / g feces}$) (図 8B)。また、盲腸内容物中のラジカル消去能は 0.2%Ge-132 群で 5%有意に増加した (Chow diet 群 : 1.65 ± 0.31 、0.2% Ge-132 群 : $2.02 \pm 0.36 \mu\text{mol TE / g feces}$) (図 8C)。さらに、糞便色素の抗酸化活性については、各色素の試薬、Ge-132 および抗酸化物質の対照としてアスコルビン酸 (AA) を用いてラジカル消去活性の比較を行い、その結果を表 6 に示した。Ge-132 (THGP) の物質自体にはラジカル消去活性はなかった ($<0.01 \mu\text{mol TE 当量}$)。各糞便色素のラジカル消去活性では、ビリルビン及びウロビリノーゲンは同等のラジカル消去活性を持ち、抗酸化物質といわれるトロロックス (TE) やアスコルビン酸 (AA) よりも強いラジカル消去活性であることが明らかと

なった（物質 1mol 当たりのビリルビン：1.90 ± 0.03、ウロビリノーゲン：2.00 ± 0.02、アスコルビン酸：0.98 ± 0.02 μmol TE）。さらに、ステルコビリンはステルコビリノーゲンの酸化物であるが、アスコルビン酸と同等のラジカル消去活性を持つことが明らかとなった（物質 1mol 当たりのステルコビリン：0.87 ± 0.04、アスコルビン酸：0.98 ± 0.02 μmol TE）。つまり、Ge-132 摂取によって糞便中の抗酸化性を持つ色素が増加して、糞便中の抗酸化能の増加が生じていることが示唆された。

2.3.4 THGP 処理によるマクロファージ赤血球貪食能や貪食能に与える遺伝子発現に与える影響

次に、THGP 処理がマクロファージ貪食能に与える影響を評価した。RAW264.7 細胞 100 個当たりの赤血球貪食総数と赤血球を貪食している RAW264.7 細胞の平均赤血球貪食個数について計測して、各々の結果を図 9 に示した。THGP 処理によって RAW264.7 細胞 100 個あたりの Chow diet 摂取マウスの赤血球貪食総数が 5%有意に増加した（THGP 無処理：90.6 ± 22.0、THGP 処理：133 ± 19.2 個）（図 9A）。また貪食している RAW264.7 細胞の平均赤血球貪食数も THGP 処理により 5%有意に増加した（THGP 無処理：2.3 ± 0.6、THGP 処理：3.2 ± 0.3 個）（図 9B）。さらに、マクロファージの赤血球貪食能の亢進に関して、異物・死細胞を認識するレセプターである Sr-a1 やヘムを代謝する酵素である Hmox-1 や Hmox-2 の遺伝子発現が RAW264.7 細胞への THGP 処理によって変動するかを解析した。各々の遺伝子発現については、図 10 に示した。THGP の添加処理によってマクロファージが老化赤血球などの認識と処理代謝に関与する遺伝子が 1%有意に増加した（Sr-a1：THGP 無処理；0.45 ± 0.10、THGP 処理；0.82 ± 0.06、Hmox-1：THGP 無処理；0.28 ± 0.09、THGP 処理；0.99 ± 0.31、Hmox-2：THGP 無処理；0.33 ± 0.21、THGP 処理；1.56 ± 0.41）（図 10）。よって THGP 処理はマクロファージの貪食能を亢進して、赤血球分解を促進させることが判明した。また、Ge-132 摂取したマウスの赤血球は、マクロファージに貪食される個数が Chow diet 摂取マウスの赤血球に比較して 5%有意に減少した（Chow diet 摂取マウス赤血球：90.6 ± 22.0、Ge-132 摂取マウス赤血球：45.8 ± 33.7 個）（図 9A）ことから、Ge-132 摂取によってマクロファージに処理されにくい赤血球の割合が増加していると考えられる。

2.3.5 Ge-132 摂取によるマウス血液中のヘマトクリット値および骨髓細胞の赤芽球コロニー形成数の変化

最後に、Ge-132 摂取による血液中のヘマトクリット値および造血に関わる骨髓細胞の赤芽球分化能に与える影響を評価した。血中のヘマトクリット値および骨髓細胞の前期赤芽球系前駆細胞のコロニー形成数 (BFU-E) を測定し、各々の結果を図 11 に示した。糞便色素を測定したマウス由来の血液では、ヘマトクリット値に有意な変動はなかった (図 11A)。BFU-E は、0.05%Ge-132 摂取 4 日目の骨髓細胞で 5%有意に増加した (Chow diet 群 : 20.0 ± 4.71 、4 日間 0.05%Ge-132 摂取群 : 69.5 ± 15.6 個) (図 11B)。Ge-132 を摂取したマウスでは赤血球の分解が亢進するが、血液中の減少した赤血球量を補うため、造血能が亢進したと考えられる。

2.4 考察

これまでに Ge-132 の経口摂取によって便の色調変化は確認されていたが、実際に糞便中の色素の増加は明らかにされていなかった。本研究によって Ge-132 摂取群の糞便が摂取 3 日目より明るい黄色になるのが確認され、便中に赤血球代謝色素であるステルコビリノーゲン、ステルコビリンが増加しているのを初めて明らかにした。また、盲腸内容物も明るい黄色みを帯び、ステルコビリン色素が増加していることも明らかにした。中村らは、Ge-132 摂取によってラット胆汁中のビリルビン色素量および胆汁分泌量が増加し、ビリルビンをグルクロン酸抱合化する酵素 Ugt1a1 遺伝子も増加することを報告している[Nakamura et al. 2010]。これらの結果から、Ge-132 摂取が肝臓から腸管へのビリルビン色素排出を促進し、便中に排出された赤血球代謝色素の増加させたことにより糞便色が変化したと考えられる。しかしながら、本研究では盲腸内容物中の胆汁酸量の Ge-132 摂取による有意な増加は認められなかった。胆汁酸は大半が再吸収され、腸肝循環するため、盲腸内容物中にはほとんど残っておらず、有意な差が出にくかったと考えられる。またマウスには胆汁を貯蔵する胆のうをもち、ラットにはその器官がないことから、胆のうがあるマウスでは餌を摂取した時に胆汁を分泌することができるので餌の摂取時間によって盲腸内容物中に含まれる胆汁酸にバラつきが生じることも影響したと考えられる(図 7D)。本研究では Ge-132 摂取による胆汁酸量の有意な増加を示せなかったが、ビリルビンの代謝物である糞便中の色素の量が増加したことより、胆汁排出量または胆汁中のビリルビン排出量が増加傾向にあったと考えられる。また Ge-132 摂取によって盲腸内容物中にも糞便中にもビリルビン量の増加を認められなかったのは、ビリルビンは糞便に排出される過程でほとんどがステルコビリンやステルコビリノーゲンに代謝された結果と考えられる(図 5D)。

便の色と色素量の変化に関して、実際に便の色を決める物質は赤血球代謝色素だけではない。例えば、鉄や銅などの無機物のイオンは酸化の状態によっては色味が異なってくる[原 匠 2010]。イオン化した Fe^{2+} は淡緑色、 Fe^{3+} は黄褐色を呈する。よってステルコビリノーゲンなどの抗酸化物質の増加は糞便中の無機物を還元させることで、糞便の色味を変化させている可能性もある。その他にも便の色に関与する物質としては、クロロフィルやポリフェノールなどのポルフィリン化合物がある。ワインなどに含まれるポリフェノールを多く摂取すると翌日に便の色が黒くなる。実際、高濃

度の Ge-132 (0.5%含有 Ge-132) 摂取はポルフィリン化合物であるプロトポルフィリンの誘導を促し、便の色を赤くする報告がある[Nakamura et al. 2011]。そのため、Ge-132 による便の色の变化は糞便中のステルコビリ色素の増加以外にも可能性があり、今回の結果は便の色の变化を促す要因の一つである。

本研究によって、初めて Ge-132 摂取によって糞便、盲腸内容物中の抗酸化活性の増加が生じることを明らかにした。ステルコビリノーゲンはウロビリノーゲンの構造異性体であり、ウロビリノーゲンはビタミン E などの抗酸化物質よりも高い抗酸化性が報告されている[Nakamura et al. 2006]。さらに、本研究からステルコビリも一般の抗酸化物質と同等の抗酸化性を有することが明らかとなった。今回の分析においては、トロロックスの抗酸化能力を一定モル数あたりで比較して表したが、興味深いことにいずれの抗酸化物質についてもトロロックスに対して等倍もしくは 2 倍の活性が認められた。ラジカル消去能はプロトンの受け渡しによって還元能を発揮する能力について評価する試験であるため、プロトン供与体としての受け渡し個数が 1 分子あたりに換算して 1 個なのか、あるいは 2 個なのかということを示していると考えられた。本研究においては、標準試薬の活性を調べるとともに、実際に糞便中および盲腸内容物中の抗酸化性は Ge-132 摂取によって有意な増加が生じるという結果を得られたが、色素の増加に伴う増加とは一致しなかった。糞便中のラジカル消去能のデータと糞便の赤血球代謝総色素量（ビリルビン、ステルコビリノーゲン、ステルコビリンの総和）のデータは、解析した糞便の日数が異なるため、色素の増加に伴う抗酸化能の増加を評価することが難しい。盲腸内容物の比較では、ラジカル消去活性に関して 0.2%Ge-132 摂取群では Chow diet 群と比較すると 5%有意に 1.2 倍（Chow diet 群：1.65 ± 0.31、0.2% Ge-132 群：2.02 ± 0.36 μmol TE / g feces）増加し、赤血球代謝総色素量も有意ではなかったが 1.2 倍増加していた（Chow diet 群：268 ± 99.3、0.2% Ge-132 群：317 ± 145 μg / g feces）。しかしながら 0.05%Ge-132 摂取群では赤血球代謝総色素量は Chow diet 群と比較して有意ではなかったが 1.4 倍と 0.2%Ge-132 摂取群よりも増加したのに対し（Chow diet 群：268 ± 99.3、0.05% Ge-132 群：377 ± 92.2 μg / g feces）、ラジカル消去活性は Chow diet 群と比較すると 1.1 倍の増加で有意ではなかった（Chow diet 群：1.65 ± 0.31、0.05% Ge-132 群：1.85 ± 0.40 μmol TE / g feces）。これは色素量を測定する試験と抗酸化性を測定する試験のサンプルは糞便からの抽出法が異なることが影響したと考えられる。抗酸化性を測定

する手法は有機溶媒や酸の影響を受けるため、色素抽出法で抽出したサンプルでは測定が不可能である。また、抗酸化性が高いステルコビリノーゲンは反応性が高いため、抽出後は酸化を受ける前に迅速な測定が必要である。また、ステルコビリノーゲンは水溶性の色素であるため、抗酸化性の測定には糞便から水で抽出したサンプルを用いたことから、色素以外の水溶性の抗酸化物質も抽出され、色素の増加と抗酸化能の増加が一致しなかったと考えられる。以上より Ge-132 の物質自体には抗酸化性がないことから、Ge-132 摂取によって赤血球の代謝産物であるステルコビリノーゲンやステルコビリニンが糞便中に増加することで、抗酸化性を誘導しているのは Ge-132 の新しい生理作用と言える。糞便中の抗酸化能の増加はすなわち腸管での抗酸化能の増加を示すものと考えられる。特に腸管は食物や病原菌などの外部からの攻撃を受けやすい器官であり、腸管内での抗酸化能の増加は外来の酸化ストレスを軽減し、いわゆる体外である消化管内から体内に傷害性の活性酸素を運び込ませない生体の防御機能を亢進させると考えられる。今後、酸化ストレスによる腸疾患に対する軽減効果について検討し、抗酸化物質の増加との関係性を解析することにより、酸化障害の疾病に対する Ge-132 の生体内抗酸化物質の誘導による予防・治療を証明するなどの研究に期待が持たれる。

赤血球の代謝色素は、肝臓や脾臓のマクロファージやクッパー細胞が老化赤血球を貪食し、分解することで生成される[Alam et al. 2017] (図 2)。そのため Ge-132 摂取によって糞便中に赤血球代謝色素が増加するのは、マクロファージの赤血球貪食能が亢進されることで生じている可能性が示唆された。そこで、本研究ではマクロファージの赤血球貪食能を *in vitro* で解析したところ、Ge-132 はマクロファージの赤血球の貪食能を有意に増加させ、スカベンジャーレセプターである Sr-a1 や赤血球のヘム分解酵素である Hmox-1、Hmox-2 の遺伝子発現を増加させた (図 9、10)。ヘムオキシゲナーゼはヘムを分解する酵素であるが、組織や細胞を酸化ストレス傷害・炎症から保護するタンパクであり[Yachie. 2007]、ヘム代謝によって抗酸化物質ビリルビンの増加と、抗炎症物質である CO の誘導を促す。過去の報告で、Ge-132 を摂取したマウス肝臓のヘムオキシゲナーゼ遺伝子発現が増加することから [Nakamura et al. 2014]、肝臓内でヘムの代謝が亢進されている可能性が考えられる。よって Ge-132 には肝臓内のビリルビン量や CO を増加させることにより、抗酸化・抗炎症を誘導する効果が期待される。また、Ge-132 摂取マウスの赤血球は通常マウスの赤血球と比較

してマクロファージに貪食される数が減少していた。この結果から、Ge-132 摂取マウスでは生体内のマクロファージ（もしくはクッパー細胞）が活性化して既に老化赤血球の貪食処理が行われたことで、貪食されやすい老化赤血球が減少していた可能性が考えられた。

これまでの結果から、Ge-132 摂取は赤血球分解を亢進することで血液中の赤血球量が減少し、端的にはヘマトクリット値が低下して貧血などの身体の異常をきたす危険性が考えられる。しかしながら、Ge-132 摂取による血液中の赤血球量を示すヘマトクリット値の減少は認められず、さらに Ge-132 摂取によって骨髓細胞から赤血球の元である赤芽球への分化誘導が亢進されていた。よって Ge-132 摂取は赤血球の分解だけでなく、造血能を亢進させて赤血球量の恒常性を維持していることが判明した。今後、赤血球の代謝サイクルが落ちていると予想される老化モデルを用いて、赤血球代謝や老化赤血球のマーカーを解析することで、Ge-132 の赤血球代謝回転促進作用が明らかになることが期待される。加えて、Ge-132 摂取によって赤血球の産生因子である血中のエリスロポエチン量や、同因子の腎臓での産生能や多機能性幹細胞からの様々な血球分化誘導能促進作用を解析することによって、赤血球産生機序に与える Ge-132 の効果が解析されることを望む。

2.5 小括

本章では Ge-132 摂取によって生じる糞便色素の変化および赤血球代謝回転促進作用について明らかにした。結果は以下の通りである。

- 1) Ge-132 摂取 3 日目より糞便の色が明るい黄色に変化した。
- 2) Ge-132 摂取によって糞便中のステルコビリノーゲン、ステルコビリニン量が増加した。
- 3) Ge-132 摂取によって盲腸内容物の色も糞便同様に明るい黄色に変化し、ステルコビリニン色素量が増加した。
- 4) Ge-132 摂取によって糞便および盲腸内容物中の抗酸化能が亢進した。
- 5) THGP 添加培養処理によってマクロファージの赤血球貪食能が亢進した。
- 6) Ge-132 摂取によって血液中のヘマトクリット値は変動がなく、また骨髓細胞の赤芽球分化能が亢進することから、赤血球の産生能を増加させる。
- 7) Ge-132 摂取することで促進する赤血球代謝回転作用を図 12 に示した。

Ge-132 の生体内の物質による抗酸化活性の誘導効果および赤血球代謝回転促進作用は新しい作用メカニズムであり、Ge-132 の多様な生理作用の解明につながることを期待する。

図表

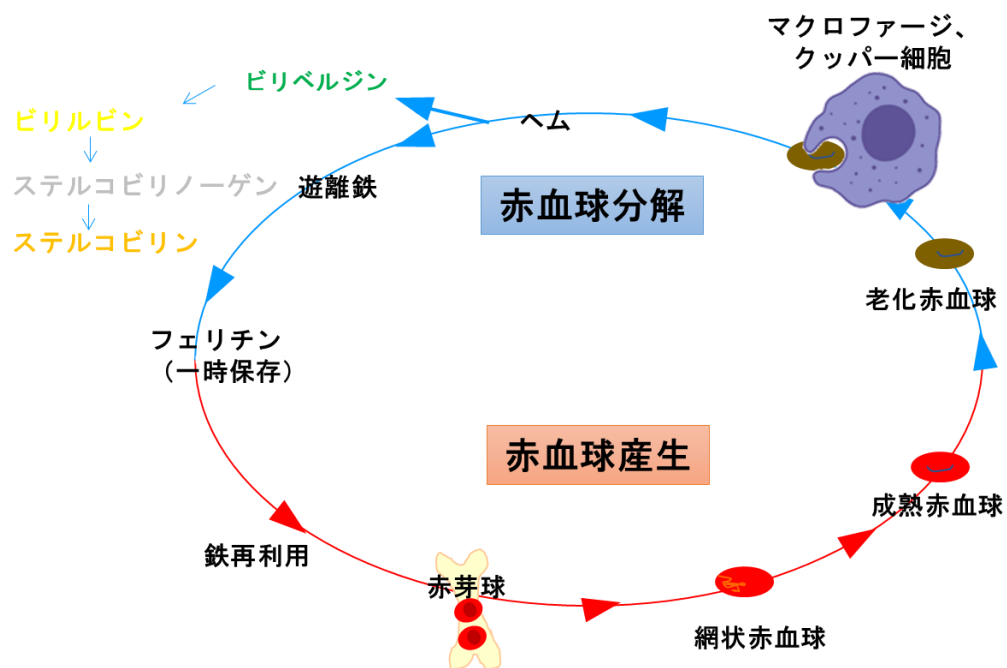


図 2 赤血球代謝回転作用

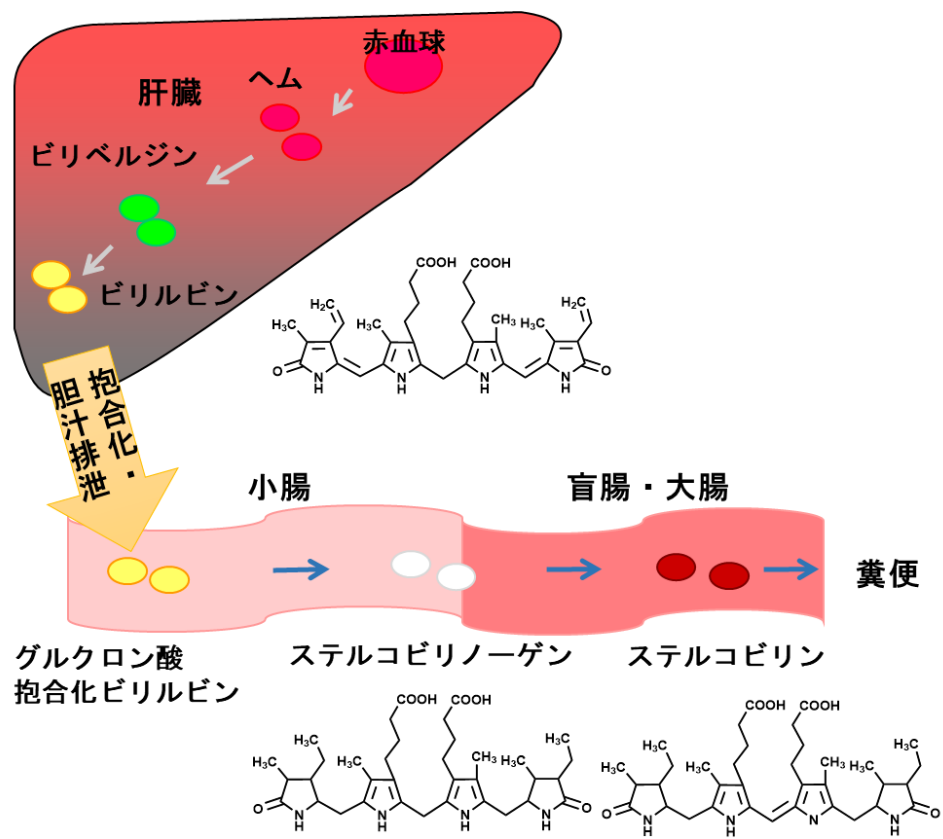


図 3 赤血球分解およびヘム代謝色素排出経路

表 1 動物飼育飼料組成

飼料組成	Chow diet	0.05%Ge-132	0.2% Ge-132
α コーンスターチ	61.5	61.45	61.3
ミルクカゼイン	23	23	23
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3
AIN76 ビタミン	1	1	1
AIN76 ミネラル混合	4	4	4
コリン酒石酸水素塩	0.2	0.2	0.2
セルロースパウダー	5	5	5
コーンサラダ油	5	5	5
Ge-132	0	0.05	0.2
Total(%)	100	100	100

表 2 HPLC グラジエント条件

	TIME (min)	A 液 流量(%)	B 液 流量(%)
Inject	0	100	0
Gradient start	0	100	0
Gradient 1st end	5	100	0
Gradient 2nd end	10	0	100
Anlysis end	27	0	100
End	33	100	0

表 3 Master mix (1 反応分)

	(μl)
5 × FS buffer	12
10μM dNTP mix	3
Rnase Inhibitor	1
0.1M DTT	1
20 倍希釈した Super ScriptIII逆転写酵素	3
Total	20

表 4 Real Time PCR 溶液条件(1 反应分)

	(μ l)
Sample (cDNA 溶液)	1
Forward primer	0.1
Reverse primer	0.1
TB Green™ Premix Ex Taq™ II	5
water	3.8
Total	10

表 5 Primer list (5 \Rightarrow 3)

Sr-a1	F : ttaaaggatgatcggggacaaa
	R : caaccagtcgaactgtcttaag
Hmox-1	F : gtcaagcacagggtgacaga
	R : atcacctgcagctcctcaaa
Hmox-2	F : agcagctcaaaacttcccagc
	R : caaattcagggtccaaggcattc
Rps18	F : ttctggccaacgggtctagacaac
	R : ccagtgggtcttgggtgtgctga

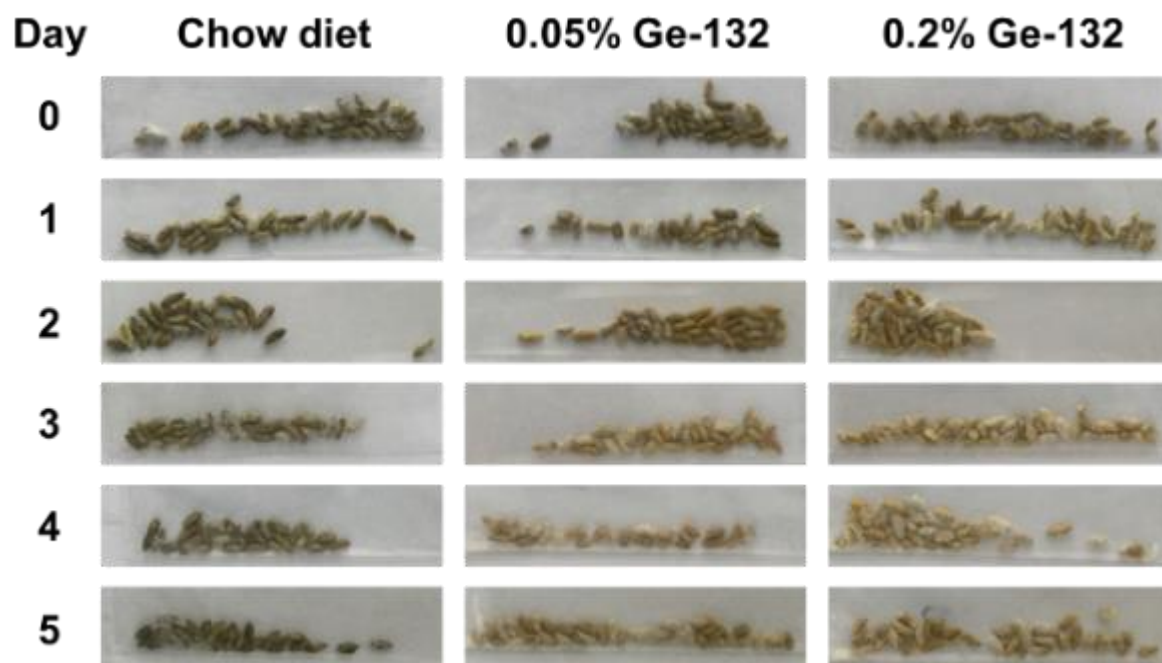


図 4 Ge-132 摂取した時のマウス糞便の色調変化
本飼育開始から毎日糞便を回収し、1 日ごとの糞便の様子を示す。

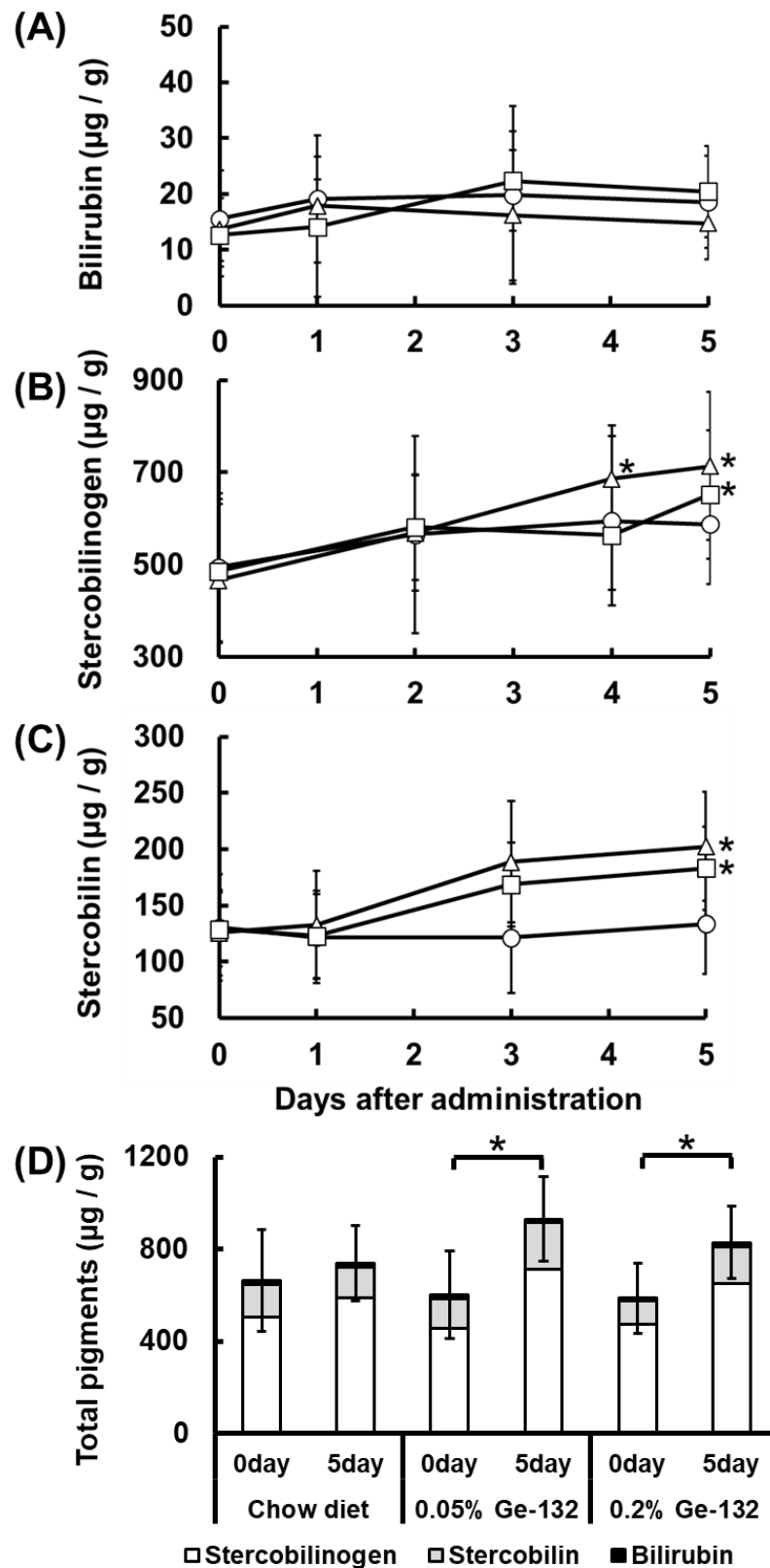
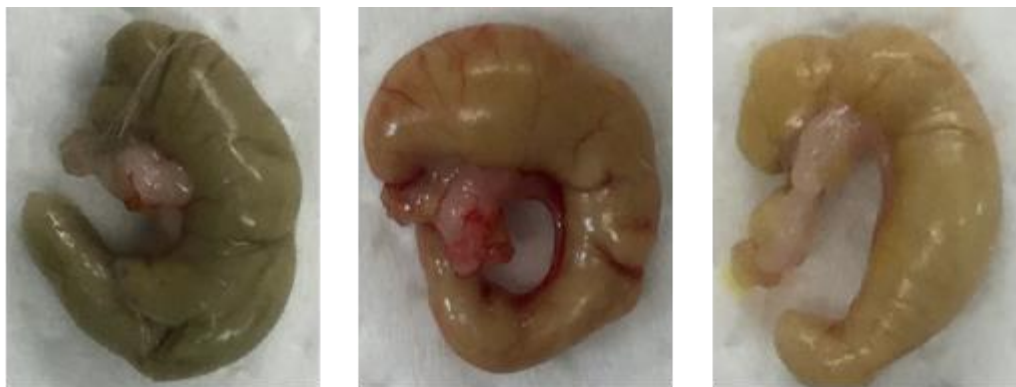


図5 マウス糞便中の赤血球代謝色素量の変化
 マウス糞便中のビリルビン (A)、ステルコビリノーゲン (B)、ステルコビリ
 リン (C)、0、5 日目の赤血球代謝色素の総量 (D) を示す。個体数は N=8。
 ○は Chow diet 群、△は 0.05% Ge-132 群、□は 0.2% Ge-132 群を示す。



Chow diet 0.05% Ge-132 0.2% Ge-132

図 6 Ge-132 摂取した時のマウス盲腸内容物の色調変化
Ge-132 摂取 5 日目のマウス盲腸内容物の様子を示す。

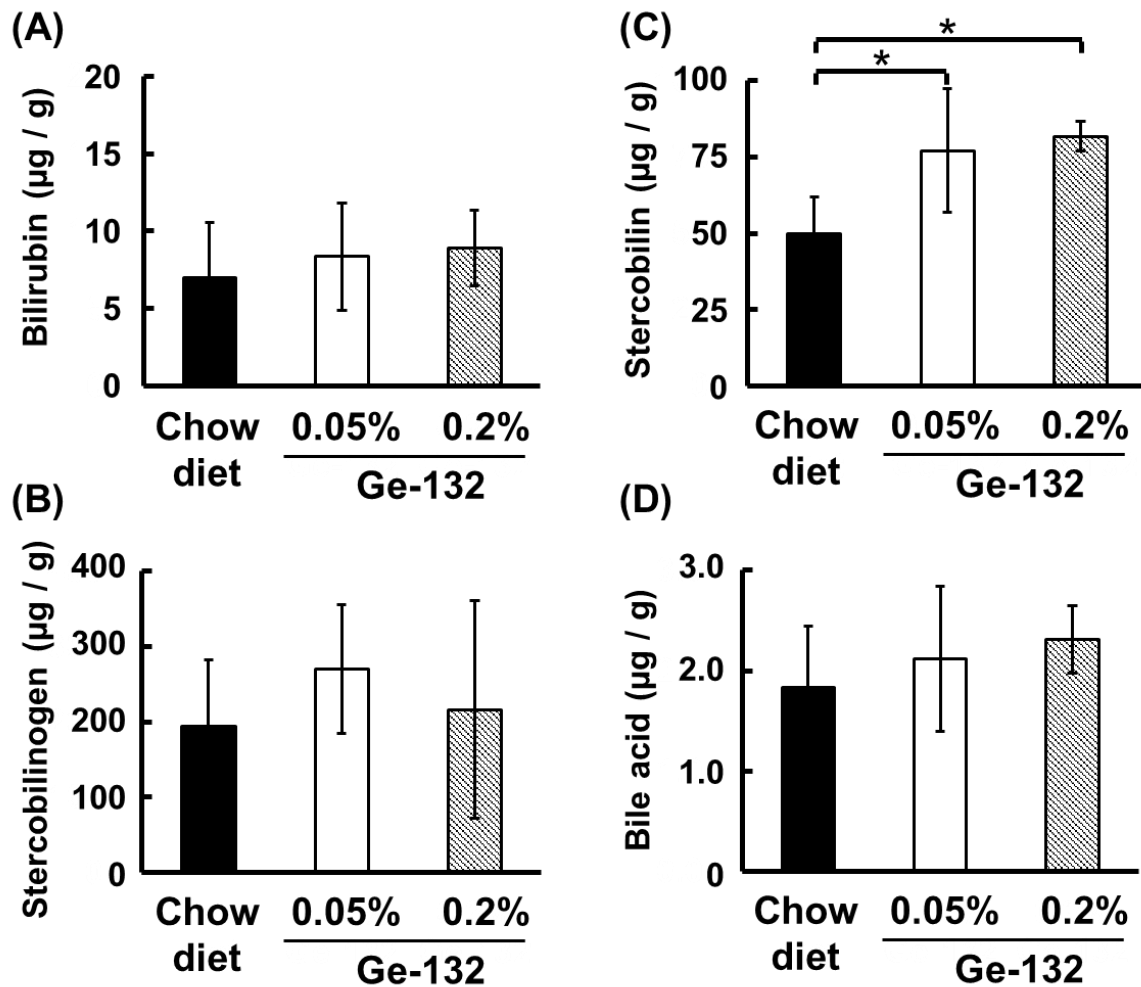


図 7 マウス盲腸内容物中の赤血球代謝色素量、胆汁酸量
マウス盲腸内容物中のビリルビン (A)、ステルコビリノーゲン (B)、
ステルコビリリン (C)、胆汁酸量 (D) を示す。個体数は N=6-8。

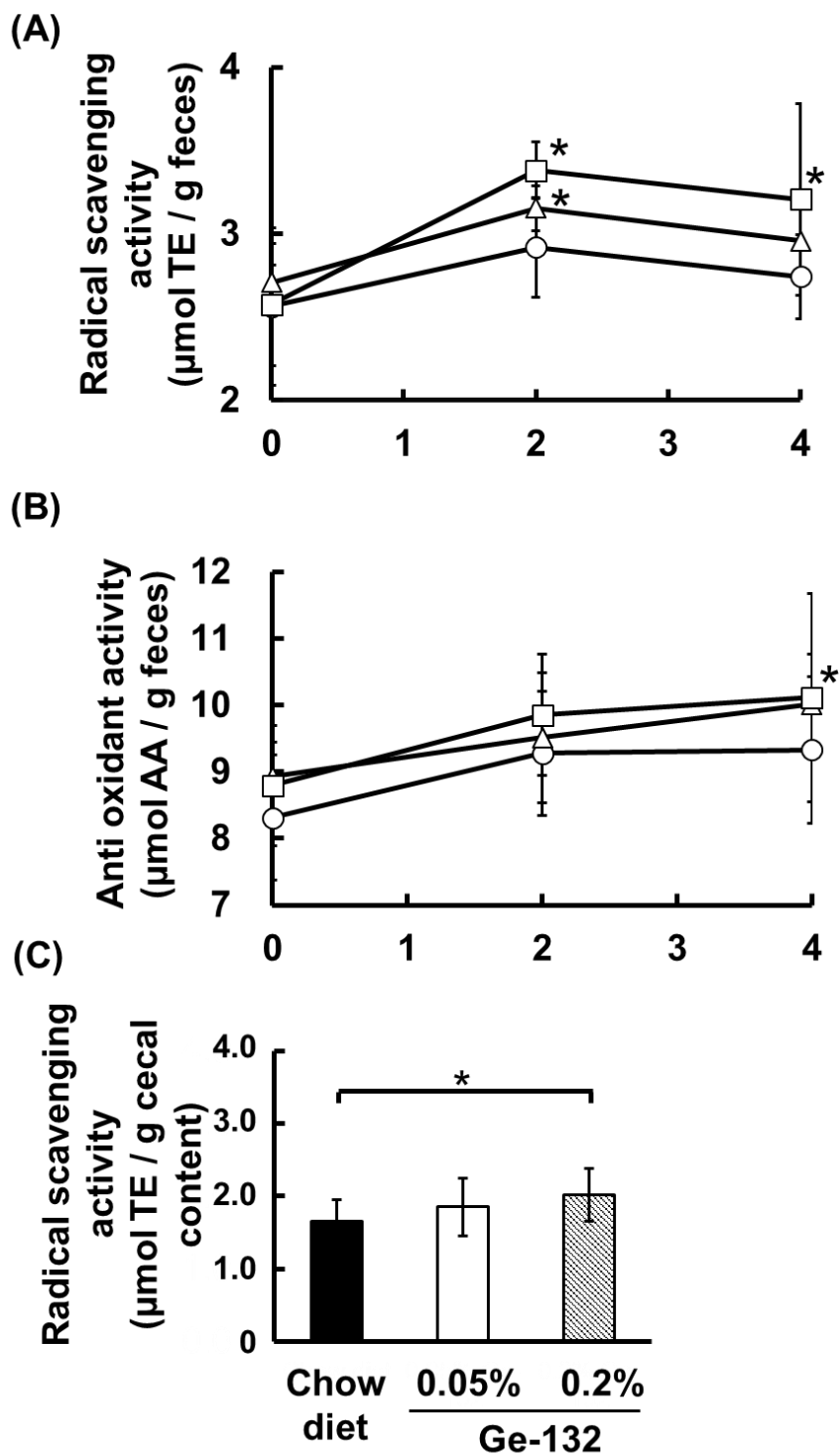


図 8 マウス糞便および盲腸内容物中の抗酸化活性の変化
 マウス糞便中のラジカル消去活性 (A)、総抗酸化活性 (B)、盲腸内容物中のラジカル消去活性 (C) を示す。個体数は N=7、8。○は Chow diet 群、△は 0.05% Ge-132 群、□は 0.2% Ge-132 群を示す。

表 6 各糞便色素の抗酸化能

1μmol 当たりの抗酸化能(TE 当量 μmol)	
Bilirubin	1.90±0.03
Urobilinogen	2.00±0.02
Stercobilin	0.87±0.04
THGP	<0.01
AA	0.98±0.02

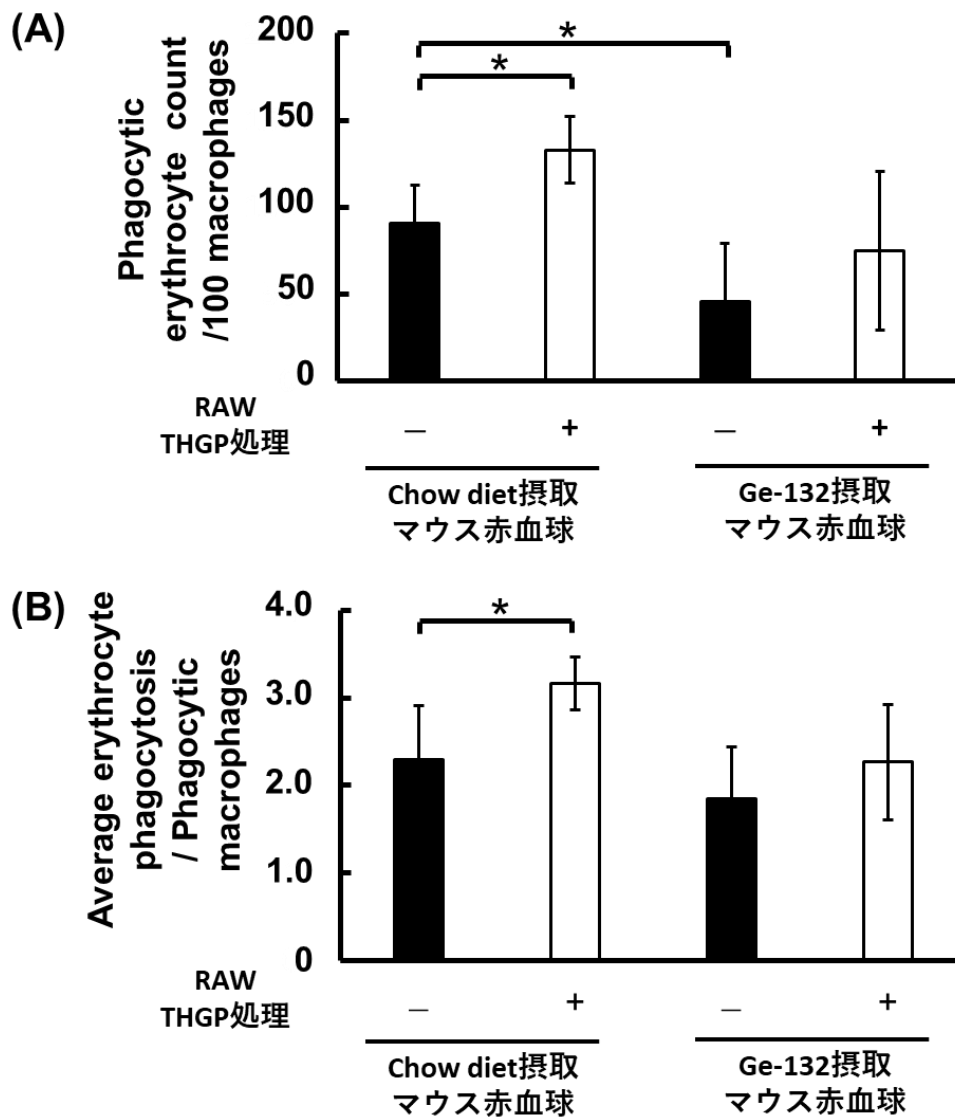


図 9 THGP 処理によるマクロファージ赤血球貪食能の変化
100 個当たりの RAW264.7 細胞の貪食赤血球総数 (A)、赤血球を貪食している RAW264.7 細胞の平均赤血球貪食個数 (B) を示す。
個体数は N=6。

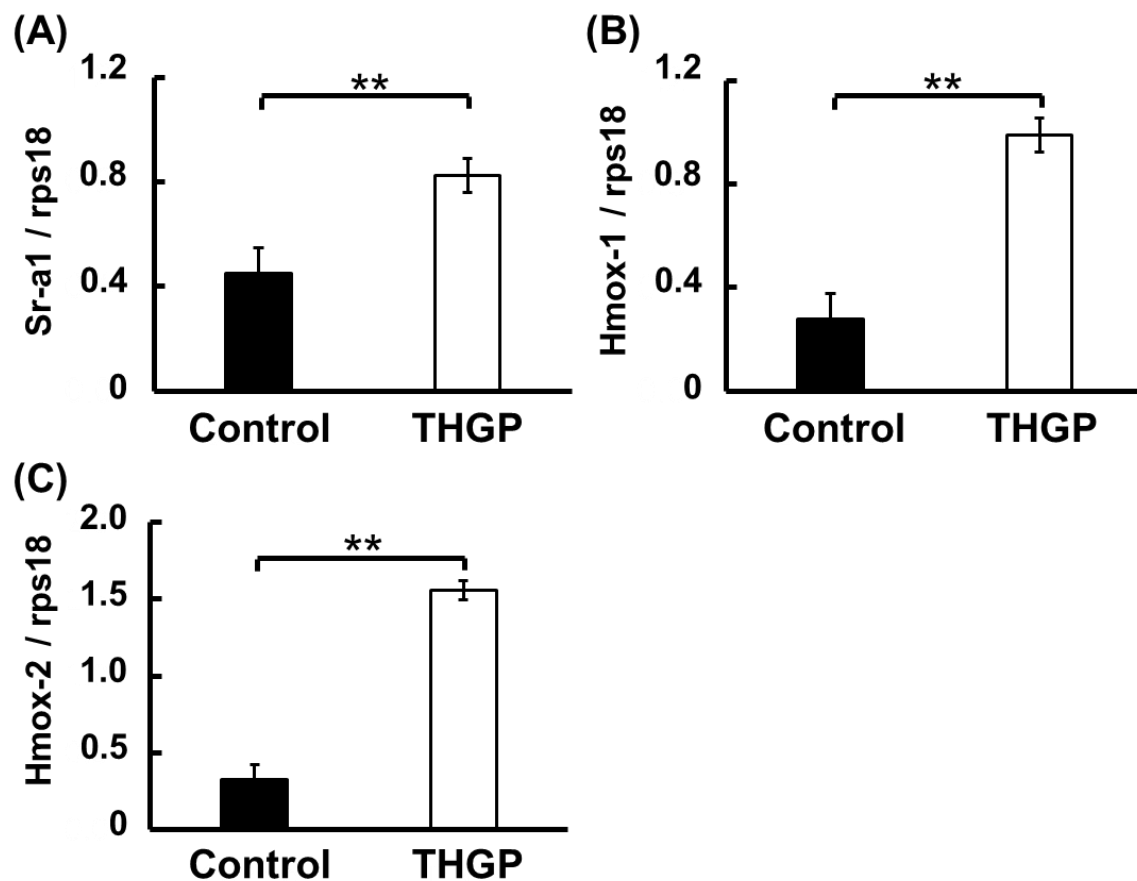


図 10 THGP 処理によるマクロファージ貪食能および赤血球分解に関わる遺伝子発現の変化
Sr-a1 (A)、Hmox-1 (B)、Hmox-2 (C) の遺伝子発現変化を示す。rps18 遺伝子を内部標準として用いて発現量を補正した。個体数 N=4-6。

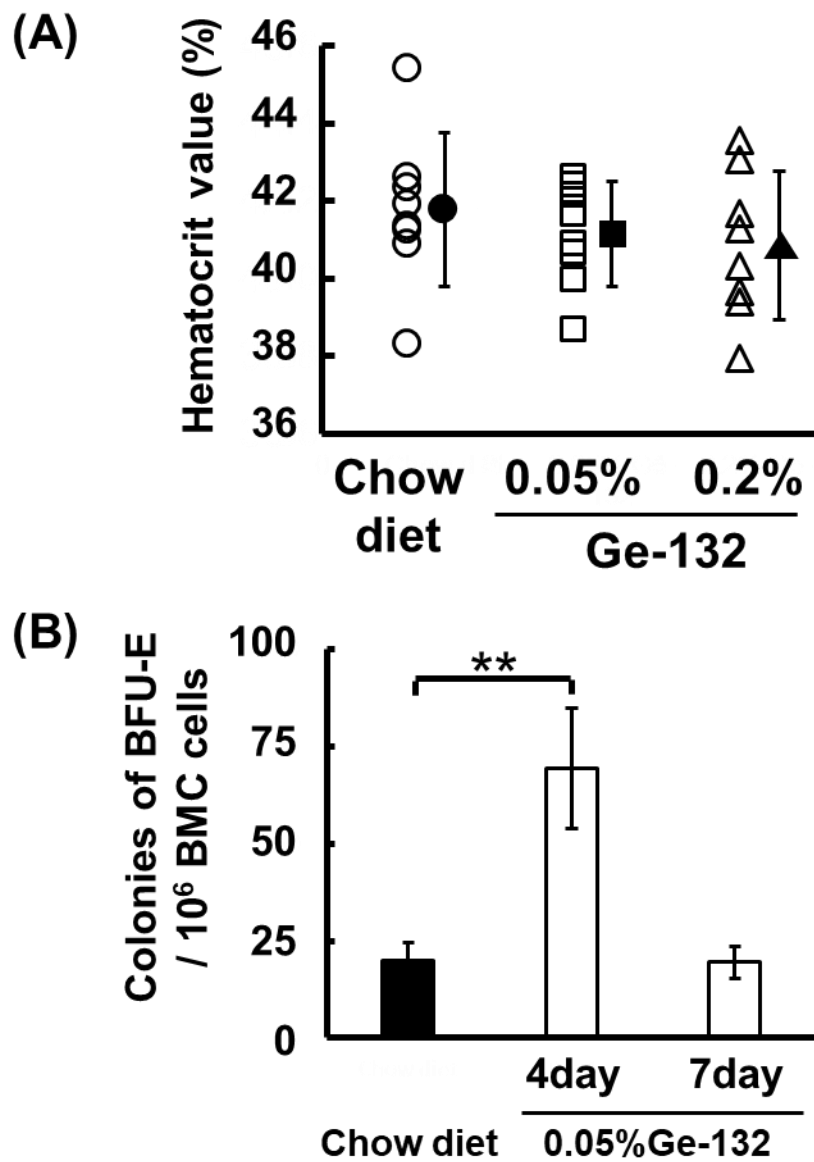


図 11 ヘマトクリット値および骨髓細胞の赤芽球分化能に与える影響
 マウス血液中のヘマトクリット値 (A)、骨髓細胞の成熟 BFU-E
 コロニー形成数 (B) を示す。個体数は N=6-8。

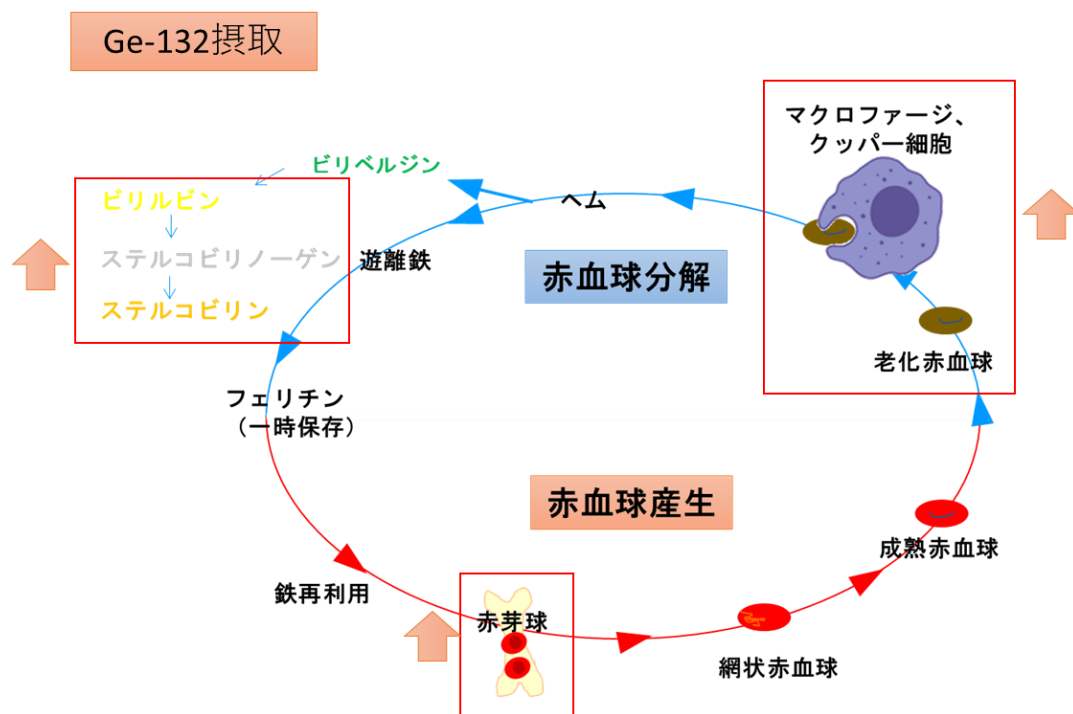


図 12 Ge-132 による赤血球代謝回転促進作用

第3章 Ge-132 の皮膚に対する 生理作用の研究

3.1 はじめに

皮膚は常に外界からの様々な物理学的刺激、化学的刺激、温度変化および紫外線曝露などにさらされている[Ogawa et al. 2006]。特に紫外線は酸化ストレスの直接的要因となる活性酸素を皮膚内で発生させることで、コラーゲン繊維にダメージを与え、皮膚の正常な構造を壊し、細胞の核内の DNA を傷つけることによって、癌化を誘導する[Kammeyer et al. 2015; Godic et al. 2014]。さらに、酸化ストレスは、皺、メラニン斑、および加齢に伴う皮膚の異常な状態の要因になる[Rinnerthaler et al. 2015]。また、皮膚における酸化ストレスは、火傷および損傷した組織でも過剰に生成されるなど[Parihar et al. 2008]、多くの問題が報告されている。そのような有害な作用の結果、皮膚はバリア機能を失って病原体に感染しやすくなったり、アトピーなどのアレルギーを発症しやすくなる。よって、皮膚の酸化ストレスを緩和することは健康な皮膚の状態を保つのに重要である。

Ge-132 の皮膚に対する生理作用としては、火傷の痛み軽減を有する作用が確認されている[小池 他 2019]。また、Ge-132 は熱処理を与えたヒト皮膚由来正常繊維芽細胞の生存数を有意に増加させる作用を有することが報告されている[中村 他. 2011]。さらに、ラットあるいはイヌの皮膚の創傷実験モデルにおいて Ge-132 を創傷部位に湿布することで傷の修復を速める効果が報告されている[Matsumoto et al. 2016; 江藤 他, 1996]。その修復メカニズムとしては、THGP 処理によるヒト皮膚線維芽細胞 Hs68 のコラーゲングル収縮能の増加、TGF β 1、 α -sma 遺伝子発現の増加などが示されている[Matsumoto et al. 2016]。Ge-132 の皮膚に対する生理作用はいくつか報告されているが、作用機構に関して未だ明らかになっていない点が多い。

そこで本章では Ge-132 の皮膚に対する生理作用を明らかにするため、始めに Ge-132 の皮膚への浸透性について解析し、さらに細胞内の Ge-132 の局在について調べた。最後に、Ge-132 の皮膚繊維芽細胞における酸化ストレスに対する防護効果について解析した。

3.2 材料と方法

3.2.1 試薬

断りがない限り、いずれの試薬も特級以上のグレードの試薬を用いた。

[飼料]

- ・ 固形試料 D10001（リサーチダイエット社）

[Ge-132（THGP）取り込み試験（同位体顕微鏡分析、LC-MS/MS 分析）]

- ・ アセトン（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ LR Gold Resin（応研商事株式会社）
- ・ LR White Resin（応研商事株式会社）
- ・ 正常ヒト皮膚線維芽細胞（成人）：Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)
（タカラバイオ株式会社）
- ・ 線維芽細胞増殖培地（タカラバイオ株式会社）
- ・ Detach kit（タカラバイオ株式会社）
- ・ 生理食塩水（日本薬局方 生理食塩液 大塚生食注）
- ・ 窒素ガス（函館酸素株式会社）
- ・ 純度 99.9999%ゲルマニウムインゴット（株式会社 TDY）
- ・ トリパンブルー溶液（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 塩酸（ナカライテスク）
- ・ クロロホルム（ナカライテスク）
- ・ メタノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 酢酸（ナカライテスク）

[NHDF 細胞生存試験]

- ・ XOD（Butter milk）／キサンチンオキシダーゼ、バターミルク由来
（オリエンタル酵母工業株式会社）
- ・ ヒポキサンチン（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ CellTiter96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay（Promega 社）
- ・ 過酸化水素（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ CellTiter-Glo® 2.0 Assay kit (Promega 社)
- ・ Propidium iodide 溶液（同仁堂）

- ・ Hoechst 33342 溶液（同仁堂）

[抗酸化酵素活性試験]

- ・ DetectX Catalase Colorimetric Activity Kit (Arbor Assays 社)
- ・ PBS

[細胞内 ROS 量測定試験]

- ・ Cell Meter™ Fluorimetric Intracellular Total ROS Activity Assay Kit Green Fluorescence（AAT Bioquest 社）
- ・ Hepes buffer

[マイクロアレイ解析]

- ・ Isogen (ニッポンジーン社)
- ・ クロロホルム（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ エタノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 2-プロパノール（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 大塚蒸留水（大塚製薬株式会社）
- ・ Human Genome U133A（Affymetrix 社）
- ・ 3'IVT PLUS Reagent kit（Affymetrix 社）

[Real time PCR]

- ・ Super ScriptⅢ逆転写酵素（Invitrogen 社）
- ・ 5×FS buffer（Invitrogen 社）
- ・ 50μM Oligo dT 20（Sigma Aldrich 社）
- ・ 10μM dNTP Mix（Promega 社）
- ・ Rnase Inhibitor（富士フィルム和光純薬工業株式会社）
- ・ 0.1M DTT（Invitrogen 社）
- ・ TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)（タカラバイオ社）

[培養上清中の IL-6 量測定]

- ・ Human IL-6 ELISA Kit (Diaclone 社)

3.2.2 供試動物

10 週齢 HR-1（ヘアレス）雄性マウス 24 匹（星野試験動物飼育所）

3.2.3 飼育条件

HR-1 雄性マウス 10 週齢を購入し、固形試料を与えて 1 週間環境に馴化させた。予備飼育後、マウスの頸背部に 50mg/ ml Ge-132 の中和水溶液を浸した 1cm 角の濾紙を 1 分間湿布した。この操作を 2 週間隔日で行い、15 日目まで塗布を行った。

3.2.4 解剖

最終塗布終了後に解剖を行った。解剖時にセボフルラン吸入麻酔下で湿布部位の皮膚を採材し、腹部大静脈からの全血採取で失血死させた。なお本飼育期間中は水、餌を自由摂取とした。採取したマウスの皮膚を-80℃の十分な量の冷アセトンに浸漬して、樹脂包埋の作業に移るまで-80℃で保存した。

3.2.5 皮膚組織の樹脂包埋

冷アセトン中で皮膚組織の脱水、固定を行った。新しい-80℃の冷アセトンに組織片を移し、-30℃に 1 時間浸漬した。いずれの操作も十分な量の溶液に組織片を浸漬した。LR Gold Resin（0.1%Benzil 含む）：アセトン（1:1）の溶液に組織を移し、-30℃に 1 時間浸漬した。LR Gold Resin（0.1%Benzil 含む）：アセトン（7:3）の溶液に組織を移し、-30℃に 1 時間浸漬した。LR Gold Resin（0.1%Benzil 含む）：アセトン（9:1）の溶液に組織を移し、-30℃に 1 時間浸漬した。LR Gold Resin（0.1%Benzil 含む）の溶液に組織を移し、-30℃に 1 時間浸漬した。新しい LR Gold Resin（0.1%Benzil 含む）の溶液に組織を移し、30 分間脱気処理を行った。脱気したのち、-30℃で 1 晩浸漬した。組織をカプセルに移し、LR Gold Resin（0.1%Benzil 含む）の溶液で満たし、脱気処理を 30 分間行った後、室温、太陽光照射下で樹脂を硬化させた。

3.2.6 細胞の樹脂包埋

35mm 細胞培養用シャーレに 160℃、3 時間乾熱滅菌した 1cm 角のシリコンウェハを入れ、 2.0×10^5 cells / シャーレ（2ml）になるように播種し、シリコンウェハ上で細胞を培養した。なお NHDF 細胞の培地は推奨の培地（線維芽細胞増殖培地）を

用い、37°C、5% CO₂ 下で細胞を培養した。翌日 Ge-132 中和溶液 1600µg / ml (THGP 10mM) に調製した培地中で 1 日培養した。培養後、シリコンウェハを生理食塩水で洗浄し、冷アセトンでシリコンウェハ上に数滴たらし、脱水、固定し、N₂ ガスで風乾した。LR White Resin (Accelelator 含む) を数滴たらし、N₂ ガスでシリコンウェハ全体に伸ばしつつ風乾した。測定表面にゴミが付着しないようにシャーレにいれ、室温で保存した。

3.2.7 同位体顕微鏡分析による Ge 吸収分布のイメージング化

皮膚組織中の Ge、リン (P) 原子の局在について分析するため、樹脂に包埋した皮膚組織はライカ社製のウルトラミクロトームを用いて 3µm の厚さで切片を作製し、シリコンウェハ上にアセトンで張り付け、分析した。組織切片、細胞分析用のシリコンウェハ表面を金蒸着し、Ge については 5 つの天然同位体のうち ⁷⁴Ge、リン原子 ³¹P を測定した。なお分析は北海道大学創成研究機構の同位体顕微鏡を用い、MS 分析と合わせてイメージング解析を行った。同位体顕微鏡の機器操作は北海道大学創成研究機構坂本直哉助教、北海道大学大学院理学院永田康祐氏に依頼した。データの画像処理は ImageJ 及び Photoshop6 を使用した。分析方法は論文 [Yurimoto et al. 2003; Hamasaki et al. 2013] に従い、行った。

3.2.8 LC-MS/MS 分析による NHDF 細胞の THGP 取り込み量測定

細胞培養 6 穴プレート 2 枚に、2.0×10⁵ cells/ ウェルになるように播種した。Ge-132 無添加、Ge-132 中和溶液 160、1600µg/ ml (THGP 1、10mM) を添加して 37°C、5% CO₂ 下で 1 日培養し、細胞カウント用のウェルには通常の培地を加えた。各濃度 3 検体ずつで培養を行った。翌日、培地を捨て、生理食塩水 1ml で洗浄し、超純水 0.5ml を加えセルスクレーパーで細胞をはがし回収した。さらに超純水 0.5ml を加え、ウェル内を洗いながら回収し、細胞懸濁液を測定まで -80°C で保存した。なお Cell count 用の細胞はトリプシン処理で細胞をはがし、トリパンブルー染色で細胞数をカウントした。

細胞懸濁液 100µl に内部標準 (5µg/ml) の溶液を 10µl 加えた。内部標準は THGP の活性メチレン部位の水素を重水素に置き換えたものを水に溶解し使用した。細胞溶解液の THGP および内部標準のトリクロル化を行うため、濃塩酸 200µl を加えて 5 分間インキュベーションした。インキュベーション後、クロロホルムを

2ml を加え、1h 振盪した。振盪後、2000 × g、10 分間室温で遠心分離した。上清を取り除き、下層の有機層を別のチューブに移し、エバポレーターで濃縮乾固を行った。乾固したものを純水 50μl に溶解し、LC-MS/ MS の分析サンプルとした。サンプル調製、分析方法は論文[Yamaguchi et al. 2015]に従って行った。なお分析は東北大学病院の LC/ MS-MS の装置で行い、東北大学病院薬剤部山口浩明准教授（現山形大学医学部附属病院教授）に分析を依頼した。

○ LC 条件

機器名 : Nexera System (Shimadzu)

カラム名 : Shodex DE413-2D カラム (150mm × 2.0mm)

カラム温度 : 50°C

移動相 : 水/メタノール/酢酸 95:5:0.1 v/v/v

流速 : 0.3mL/min

計測時間 : 5min

○ MS 条件

機器名 : TSQ Vantage EMR (Thermo Fischer Scientific)

spray voltage : 3000 V

vaporizer temperature : 600°C

sheath gas pressure : 80

AUX gas pressure : 20

capillary temperature : 150°C

declustering voltage : 0 V

3.2.9 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼによる酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率の測定

96 穴プレートに NHDF 細胞を 1.5×10^4 cells/ ウェル播種し、1 日培養後、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (HPX- XOD) 添加によって酸化ストレス負荷試験を行った。試薬の調製は以下に示す。XOD は超純水に 10U/ ml の濃度に溶解し、濾過滅菌した。その溶液を培地で 100 倍希釈したものを添加溶液 (100U/ L) とした。ヒポキサンチンは 10mM の濃度で超純水に溶解し、濾過滅菌した。その溶液を

培地で 10 倍希釈したものを添加溶液 (1mM) とした。Ge-132 溶液は中和した 40mg/ ml の溶液を使用し、適宜培地で希釈して用いた。表 7 に示す用量で細胞に試薬を加え、1.5 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートし、酸化ストレス処理を行った。インキュベート後、上清を捨てて新しい培地 100μl に入れ替えたのち、Cell Titer96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS 試薬) 20μl 加え、さらに 1 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートし、ARVO3 (パーキンエルマー社) を用いて、細胞を含む溶液の 490nm の吸光値を測定した。

3.2.10 過酸化水素による酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率、細胞内 ATP 量測定

96 穴プレートに NHDF 細胞を 1.5×10^4 cells/ ウェル播種し、1 日 37°C、5% CO₂ 下で培養後、過酸化水素 (H₂O₂) による酸化ストレス試験を行った。試薬の調製は以下に示す。過酸化水素は適宜培地で希釈した。Ge-132 溶液は中和した 40mg/ ml の溶液を使用し、適宜培地で希釈して用いた。アスコルビン酸溶液 (AA) を抗酸化剤の比較対照として用いた。細胞に試薬を表 8 に示す用量で加え、1.5 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートし、酸化ストレス処理を行った。インキュベート後、上清を捨てて新しい培地に入れ替えたのち、Cell TiTer96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS 試薬) 20μl 加え、さらに 1 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートし、細胞を含む溶液の 490nm の吸光値を測定した。細胞内 ATP 量測定試験は、H₂O₂ による酸化ストレス試験と同様の条件で酸化ストレスをかけ、CellTiter-Glo® 2.0 Assay kit を用いて測定した。酸化ストレス処理後、上清を捨てて培地 100μl と等量の試薬を細胞に加え、発光を安定させるため、10 分間室温に置いた。ARVO3 を用いて各ウェルの溶液の発光量を測定した。

3.2.11 過酸化水素による長期間の酸化ストレスに対する細胞生存率測定

12 穴プレートに NHDF 細胞を 1.5×10^5 cells/ ウェル播種し、1 日、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培養後、培地を廃棄し、細胞に試薬を表 9 に示す用量で加え、24 時間酸化ストレス処理を行い、細胞生存率を PI/ Hoechst 染色によって評価した。THGP 濃度は 3.2.10 項の直接過酸化水素を加えたストレス細胞生存率の試験で有意に防御効果があった 5.9mM とした。酸化ストレス処理後、細胞を PBS で洗浄し、培地に PI および Hoechst 溶液が 100 倍希釈になるように調製した溶液 (培地終

濃度 0.01 mg/ml) を細胞に添加した。30 分、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートし、培地を除き、PBS で洗浄した。4%パラホルムアルデヒドリン酸溶液を加え、20 分間室温で細胞を固定した。固定溶液を捨て、PBS で洗浄した後、再度 PBS を加えて、PBS 下で PI と Hoechst 溶液で染色した細胞を DS-Fi3 デジタルカメラ（ニコン）を備えた培養倒立顕微鏡（Eclipse TS100）で観察した。Hoechst と PI の蛍光観察には、それぞれ 361~389 nm と 540~580 nm の励起波長を用いた。いずれの蛍光観察も、倍率 40 倍で 2 mm² 角の 8 つの視野をランダムに撮影し、蛍光を発した細胞をカウントした。細胞死の割合は PI 陽性細胞の数を Hoechst 陽性細胞の数で割り、算出した。光顕の画像は倍率 100 倍で撮影した。

3.2.12 抗酸化酵素活性測定

6 穴プレートに NHDF 細胞を 2.0×10^5 cells/ ウェル播種し、1 日、37°C、5% CO₂ 下で培養後、3.2.9 項の細胞生存率試験と同濃度のヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ（HPX-XOD）によって酸化ストレス処理を行った。なお THGP 濃度は細胞生存率試験で有意に防御効果があった 0.59、5.9mM について試験を行い、酸化ストレスを与えない条件での THGP の効果についても合わせて検討した。表 10 に添加溶液条件を示す。各々の溶液を添加して 1.5 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートし、培養溶液を除いて、PBS1ml で細胞を洗浄した。カタラーゼ測定は DetectX Catalase Colorimetric Activity Kit の推奨プロトコールに従い、測定した。洗浄した細胞にキットの Cold assay buffer を 500μl 加え、細胞をスクレーパーで剥がした。剥がした細胞は 2ml エッペンドルフチューブに移し、AM-5 homogenizer (トッケン) を用いて、16,000rpm、3 分間細胞をホモジネートした。細胞懸濁液を 10,000g、15 分、4°Cで遠心分離して上清を回収し、測定サンプルとした。サンプル溶液のカタラーゼ活性をキットの推奨プロトコールに従い、測定した。

3.2.13 細胞内 ROS 量測定

96 穴プレートに NHDF 細胞を 1.5×10^4 cells/ ウェル播種し、1 日、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培養上清を捨てて、Cell MeterTM Fluorimetric Intracellular Total ROS Activity Assay Kit の Green Fluorescence AmpliteTM ROS Green Working 溶液を 100μl 添加し、細胞を 1 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートした。インキュベート後、3.2.12 項で記した条件で用いたのと同じ終濃度の酸化ストレス及び

THGP 処理になるように溶液を加え、液総量は 120 μ l で行った。さらに抗酸化能の比較対象として、アスコルビン酸溶液を添加した群を加えた。表 11 に添加溶液条件を示す。各々の溶液を添加して 1.5 時間、37°C、5% CO₂ 下でインキュベートした後、キットの推奨プロトコールに従い、細胞内 ROS 量を測定した。

3.2.14 遺伝子発現網羅解析および RT-PCR 法による遺伝子発現解析

6 穴プレートに NHDF 細胞を 1.0×10^5 cells/ ウェル播種し、2 日、37°C、5% CO₂ 下で培養した後、3.2.12 項で記した条件で用いたのと同じ濃度で細胞に酸化ストレス処理を行った。酸化ストレス処理後、培養上清を捨て、Isogen を 1ml 加え、細胞を溶解した。ニッポンジーン社の推奨プロトコールに従い、細胞から Total RNA を抽出した。なお Total RNA の濃度は 260nm の吸光値から算出し、純度は 260nm/280nm の比で確認し、純度 2.0 以上の RNA サンプルをマイクロアレイ解析で用いた。なおサンプルは各群 6 検体を各検体が一定の RNA 量になるように一つにプールし、6 検体の遺伝子発現を平均化したものをサンプルとして用いた。検体は酸化ストレス無処理群、酸化ストレス処理群、THGP 0.59mM- 酸化ストレス処理群、THGP 5.9mM- 酸化ストレス処理群の 4 群とし、解析を行った。マイクロアレイの実験は帯広畜産大学得字圭彦准教授に依頼し、実験手法は Affymetrix 社のプロトコールに従った。サンプルを 3'IVT PLUS Reagent Kit でラベル化を行い、GeneChip Human Genome U133A にハイブリダイゼーション反応処理を行った。GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix 社) でハイブリダイゼーションを行ったチップの洗浄を行った後、データの解析を Array Star software (version 4.0.2, DNASTAR 社) を用いて行った。なお機能解析やクラスター解析は Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) version 6.8 tools (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて行った。

上記に示したマイクロアレイ解析に用いた Total RNA サンプルを使用し、特定の遺伝子の発現量について Real Time PCR 法にて解析した。なお逆転写反応、Real Time PCR の条件は「2.2.3.5 項マクロファージ貪食能に関与する遺伝子発現変動」で示した方法に従って行った。使用したプライマーは表 12 に示した。なお、内部標準を RPS18 とし、Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 (NR4A2)、Interleukin 6 (IL6)、Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) 発現量の値を内部標準で補正を行った。

3.2.15 酸化ストレス処理による NHDF 細胞 IL-6 産生量の測定

細胞培養および酸化ストレス処理は「3.2.10 項 過酸化水素による酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率、細胞内 ATP 量測定」の方法に従って行った。実験群は通常培養群、酸化ストレス処理群および 5.9mM THGP 添加-酸化ストレス処理群の 3 群で行った。酸化ストレス処理後に培養上清を回収し、Human IL-6 ELISA Kit の推奨プロトコールに従い、培養上清中の IL-6 量を測定した。なお、細胞生存率を MTS assay 法で測定し、培養上清中の IL-6 量を生細胞数で補正し、IL-6 産生量を算出した。

3.2.16 統計処理

各実験結果における値は平均値±標準誤差で示し、Excel 統計処理ソフトを用いて、統計処理を行った。多群間の統計的比較は、すべての群で正規分布であるとみなされた場合は、バートレット検定を行い、等分散であると検定された時は一元配置分散分析を行った。ここで有意差が確認された時は Dunnet の多重比較検定を行った。等分散でないと検定された時はクラスカル・ワーリス検定を行い、有意差を検定した。正規分布でないとみなされた場合もクラスカル・ワーリス検定を行った。ここで有意差が確認された時は Steel 検定により多重比較検定を行った。

3.3 結果

3.3.1 同位体顕微鏡分析による Ge-132 皮膚塗布による Ge 吸収分布

Ge-132 を塗布した皮膚切片の光学顕微鏡像と同位体顕微鏡イメージング分析の結果を図 13 に示した。測定した皮膚切片には、表皮、真皮および皮下組織が含まれるように調製した。リン原子が表皮および真皮の細胞核に対応する領域で検出された（図 13C）。リン原子は遺伝情報を担う DNA および RNA、生体のエネルギー代謝に必要な ATP などに含まれており、細胞の核にはこれらの成分が含まれていることからリン原子が検出される。また、皮膚表面の防御機能を担う表皮では、角化細胞が表皮の最下層である基底層から分裂・成熟をして層状に細胞が配列し形成しているため、細胞が密に存在するのでリン原子が多く検出された。Ge 原子は通常生体にはほとんど存在していないが[Chairman et al. 1974]、Ge-132 水溶液を塗布した表面の角質層から強く検出されただけでなく、真皮および皮下組織からも検出され、真皮および皮下組織まで Ge-132 が浸透することが判明した（図 13D）。真皮まで到達している Ge 原子は均一に存在してのではなくて濃淡があり、リンの分析と一致している箇所が一部存在している。そのため、真皮に存在している線維芽細胞に Ge-132 が取り込まれる可能性が示唆された。また表皮の付属機関である毛根にも Ge 原子が観察された。

3.3.2 同位体顕微鏡分析および LC/ MS-MS 分析法による NHDF 細胞の Ge-132 の取り込み

Ge-132 が真皮に存在する線維芽細胞に取り込まれている可能性が示唆されたため、正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF 細胞）への Ge-132 取り込みについて同位体顕微鏡を用いて解析した。Ge 原子は天然に同位体が 5 種類存在し、 ^{74}Ge ($M/Z=73.9211778$) が最も多く存在している。そのため同位体顕微鏡を用いて金属 Ge の質量 74 付近のマスを測定したところ、 ^{74}Ge マスのピークを確認した（図 14A）。Ge-132 を添加していない細胞では ^{74}Ge のマスは検出されなかったが（図 14B）、Ge-132 を添加して培養した細胞には ^{74}Ge のマスを確認した（図 14C）。それぞれの細胞の ^{74}Ge のマスをイメージ化したものを図 15A-D に示した。図 15A および B の右上、左上、左下に見られる白い部分は、測定上干渉として出てきた質量数 74 近辺の妨害シグナルであり、 ^{74}Ge が検出されたのではない。Ge-132 無添加の細胞では ^{74}Ge が検出されなかったのに対し（図 15A）、Ge-132 を添加して培養した細胞で

は、細胞全体に ^{74}Ge が取り込まれている様子が観察され（図 15B）、細胞の核にも ^{74}Ge が局在していることを確認した（図 15C、D）。さらに細胞への Ge-132 取り込みを異なる LC/MS-MS 分析法で解析した。Ge-132 のモノマーである THGP は、添加濃度依存的に NHDF 細胞に取り込まれることが明らかとなった（図 16）。2 つの異なる分析方法によって、THGP が NHDF 細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

3.3.3 THGP 処理による NHDF 細胞のヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ酵素誘導による酸化ストレスに対する細胞生存率への影響

THGP 処理が NHDF 細胞の酸化ストレスに対する防護効果について、細胞生存率で評価した。酸化ストレス負荷していない細胞の生存率を 100%とした。酸化ストレスによって NHDF 細胞の生存率が 55.4%減少するが、THGP の添加濃度依存的に細胞生存率の減少が抑えられ、0.59mM および 5.9mM THGP 添加濃度で 5%有意に細胞生存率の減少が 36.2%、35.8%まで抑えられた（図 17）。THGP は NHDF 細胞に取り込まれ、酸化ストレスに対する防御効果を誘導することが判明した。

3.3.4 THGP 処理による NHDF 細胞の過酸化水素による酸化ストレスに対する細胞生存率および細胞内 ATP 量への影響

細胞に直接過酸化水素を加える酸化ストレス系を用いて、THGP の酸化ストレスに対する細胞死抑制効果を生存率と細胞内 ATP 量で評価した。酵素による誘導実験では過酸化水素は低濃度から徐々に発生して濃度が上昇するが、一定濃度の過酸化水素を添加する場合は前者よりも酸化ストレスが過激であるため、細胞死が多く誘導されていた。酸化ストレス無処理群の細胞生存率を 100%とし、対照区と比較して、酵素誘導酸化ストレスによって細胞生存率の減少が 55.4 %であったのに比べて、過酸化水素酸化ストレスによる減少は 70.0 %であった。しかしながら、5.9mM THGP を添加した細胞生存率の減少は 57.8%と 5%有意に抑えられ、過酸化水素酸化ストレスに対する防御効果が認められた（図 18A）。また、細胞生存を示す細胞内 ATP 量について、酸化ストレス無処理群を 100%とし、対照区と比較して、酸化ストレスによって細胞内 ATP 量の減少は 77.7%であったのに対し、5.9mM THGP 添加した細胞内の ATP 量の減少は 63.6%と 5%有意に抑えられた（図 18B）。また、抗

酸化物質であるアスコルビン酸（AA）添加でも、THGP と同様に 5%有意に細胞生存率および細胞内 ATP 量の減少がそれぞれ 61.5%、51.0%まで抑えられた。

3.3.5 THGP 処理による NHDF 細胞の長期過酸化水素曝露による酸化ストレスに対する細胞死抑制作用の測定

さらに長期酸化ストレスに対する THGP の細胞死抑制効果について PI/Hoechst 染色で評価した。長期酸化ストレスダメージにより細胞形態が悪くなるのに対し、THGP 添加によってその形態が改善されている様子が観察された（図 19A）。今回使用した PI 色素は一般に生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞が取り込んで核内の DNA に結合し、赤色蛍光を発するため、死細胞を検出する染色色素として用いられる。また Hoechst 色素は細胞膜透過性があり、生細胞と死細胞の両方を染色するので、PI と Hoechst 色素両方で染色された細胞を死細胞とし、その数を Hoechst 色素で染色された全細胞数で割ることで、長期酸化ストレスによる細胞死の割合を算出した。長期酸化ストレス処理による細胞死が 95.4%に増加するのに対し、THGP 添加によって細胞死が 74.6%まで 5%有意に軽減された（図 19B）。長期酸化ストレス条件下においても、THGP は抗酸化効果を誘導することが判明した。

3.3.6 THGP 処理による NHDF 細胞の抗酸化酵素活性誘導および細胞内 ROS 量への影響

THGP の酸化ストレスに対する防御効果を解析する目的で、細胞の抗酸化酵素活性および細胞内 ROS 量の変化について解析した。HPX-XOD によって産生される過酸化水素の除去酵素である細胞内カタラーゼ酵素活性は、THGP 添加による影響は認められなかった（図 20A）。また細胞内 ROS 量は対照区の細胞と比較して、酸化ストレス処理群の細胞でおよそ 12 倍に上昇したが、THGP 添加による影響は見られなかった（図 20B）。しかしながら酸化ストレス処理によって増加した細胞内の ROS 量は 0.1mM および 1.0mM アスコルビン酸の添加によってそれぞれ 1%有意に 20.6%、86.8%減少した。THGP の抗酸化効果は、一般的な抗酸化物質であるアスコルビン酸（AA）とは異なる抗酸化メカニズムであることが示唆された。

3.3.7 THGP 処理による NHDF 細胞の網羅的遺伝子発現解析および特定遺伝子の発現変動解析

酸化ストレスおよび THGP 添加が与える細胞内遺伝子発現への影響について遺伝子の網羅解析を行い、各処理によって 2 倍以上発現が増減した遺伝子を変動のあった遺伝子として抽出し、解析を行った。各群の群間比較をして、変動遺伝子数を図 21 に示した。酸化ストレス処理によって変動した遺伝子は 402 個、0.59mM THGP 添加処理で変動した遺伝子数は 7、5.9mM THGP 添加処理で変動した遺伝子数は 164 個検出された。それらの変動した遺伝子の中で酸化ストレス処理と 0.59mM THGP 添加処理で変動した共通の遺伝子は 6 個、酸化ストレス処理と 5.9mM THGP 添加処理で変動した共通の遺伝子は 17 個存在した。酸化ストレス処理と 0.59mM THGP 添加処理で変動した 6 個の遺伝子に関しては、5.9mM THGP 添加処理群で変動した遺伝子にも含まれていた。酸化ストレス処理と 5.9mM THGP 添加処理で変動した共通の遺伝子 17 個を表 13 に示した。その 17 個の遺伝子についてクラスター解析を行った結果から、Gene Ontology:1901700 は酸化化合物に対する反応性というクラスターであり、酸化ストレスを細胞にかけたことで生じたクラスターと示唆された（表 14）。そのクラスターに含まれる遺伝子の中で、酸化ストレスおよび 0.59mM あるいは 5.9mM の THGP 添加によって変動した NR4A2、IL6、CXCL2 遺伝子の発現解析を Real Time PCR 法で行った結果を図 22 に示した。細胞死を誘導する NR4A2 遺伝子は、酸化ストレス無処理群で 1.72 ± 0.81 に対して酸化ストレス処理群では 7.02 ± 3.75 であり、酸化ストレスをかけると有意に増加した。しかしながら、0.59mM THGP 添加では 0.36 ± 0.05 で、5.9mM THGP 添加によって 0.28 ± 0.03 となって 5%有意に減少することが確認され、それぞれの減少は 1/19 および 1/25 以下と著しい低下であった。また、酸化ストレスをかけていない場合でも、5.9mM THGP 添加によって NR4A2 遺伝子の発現量が 0.20 ± 0.04 と有意に減少したことから、本遺伝子に対する THGP の抑制作用は非常に強いことが明らかとなった（図 22A）。炎症性のサイトカインである IL6 遺伝子の発現量は、酸化ストレス無処理群の 1.01 ± 0.09 に対して酸化ストレス処理群では 3.10 ± 0.49 なり、酸化ストレスをかけると有意に増加する。しかしながら、IL6 遺伝子の発現量の酸化ストレス処理による増加は 0.59mM THGP 添加では 1.13 ± 0.17 、5.9mM THGP 添加では 0.84 ± 0.10 となって 5%有意に減少させ、酸化ストレスをかけていない場合でも 0.59mM THGP 添加で 0.70 ± 0.05 、5.9mM THGP 添加で $0.70 \pm 0.05\%$ となって有意に減少し

た（図 22B）。よって、THGP 添加は、酸化ストレス処理によって増加する IL6 遺伝子の発現を酸化ストレスをかけていない細胞と同等の発現量で変動させない作用が有ることが判明した。また、炎症性のサイトカインである CXCL2 の遺伝子発現は、酸化ストレス無処理群の 0.16 ± 0.03 に対し、酸化ストレス処理群では 4.69 ± 1.27 に上昇したが、酸化ストレス処理に 5.9mMTHGP を添加することによって 0.95 ± 0.05 と上昇が抑制された（図 22C）。これらの遺伝子の発現を調節することにより、THGP は酸化ストレスによる細胞死を抑制していることが判明した。

3.3.8 THGP 処理による NHDF 細胞の培養上清中の IL6 量の変動

THGP 添加が、酸化ストレスに強く関連した炎症性サイトカインである IL6 の産生量に及ぼす影響を解析した。酸化ストレス処理により細胞の IL6 産生量は、無処理群に対して 2.24 倍に増加したが、5.9mMTHGP 添加処理によって IL6 は 1.35 倍の産生量に留まって 5%有意に減少させた（図 23）。THGP 添加処理は、炎症性サイトカイン IL6 の蛋白質産生でも有意に抑えられることが明らかとなった。

3.4 考察

Ge-132 は食品としてだけでなく、化粧品の素材としてレパゲルマニウムという名称で使用されている。Ge-132 の皮膚に対する生理作用は火傷の痛み軽減や皮膚の創傷実験モデルにおいて修復効果が報告されている[小池 他 2019: Matsumoto et al. 2016]。しかしながら、Ge-132 の皮膚への浸透性は明らかになっておらず、Ge-132 の皮膚に対する作用機構に関しても十分に明らかにされていなかった。本研究では、Ge-132 は皮膚組織に浸透して、真皮、皮下組織まで到達することを初めて明らかにした。皮膚の物質吸収経路は、大きく分けて細胞間隙経路、細胞内経路、汗腺および毛穴などの付属器官経路が報告されている[Sugino et al. 2009]。Ge-132 は水溶性の物質であるため、脂溶性の物質の主な透過経路である細胞間隙経路や細胞内経路からでは、真皮まで吸収はされにくいと想像された。しかしながら、表皮は小さな分子の侵入を防ぐことはできず、分子量 500 以下の物であれば皮膚を透過するということが報告されている[Bos et al. 2000]。Ge-132 を加水分解した形である THGP は分子量が 197 と小さいため、Ge-132 は主に角質部分に多く検出され、表皮にまで透過していた理由と考えられる (図 13)。しかしながら、角質以外の表皮の ^{74}Ge シグナルは弱く、表皮から拡散的に取り込まれていると判断できない。また、付属機関である毛根で ^{74}Ge が観察されていることから、Ge-132 が毛穴を通して真皮層まで吸収されていることが示唆された。これらの結果は、Ge-132 が経皮から吸収されて皮膚への生理作用を及ぼす可能性が示唆された。よって、Ge-132 の皮膚の吸収量を上げることは生理作用を増加させることに繋がる可能性があり、今後は Ge-132 の皮膚吸収経路解明の研究が望まれる。

Ge-132 は真皮まで到達しているが均一には存在せずに濃淡があり、一部リンの分析と一致している箇所が存在している。リンは細胞の核とみられる領域で検出されるため、Ge-132 は真皮に存在している線維芽細胞によって取り込まれて、核に移行している可能性が示唆された。同位体顕微鏡によって、NHDF 細胞は細胞全体に Ge を取り込み、さらに Ge が細胞の核にも局在していることを可視化したのは世界で初めてである (図 15C、D)。物質の核内外移行は核膜孔複合体を通して行われるが、DNA の複製・転写・修復などを行うタンパクや RNA、イオン、ある程度の大きさの分子などの生命維持に関わる必要な物質が核内に移行するが、THGP がどのような機構で核内に移行するかは現時点では不明である。核内には THGP が相互作用できる RNA や ATP などのジオール構造をもつ生体内の重要な物質が存在する

[Shimada et al. 2017]。これら分子との THGP の相互作用は弱い、転写調節因子である siRNA と結合することで、mRNA の破壊を抑えたり、mRNA の前駆体と結合することでプロセッシングを阻害することで、遺伝子発現の調節を行うことも想像される。つまり、Ge-132 の細胞核内での作用を明らかにすることで、Ge-132 の多様な生理作用を明らかにする一つの手がかりとなる可能性がある。そのため、今後は相互作用する核内分子の同定や、遺伝子の転写活性調節などさらなる研究が望まれる。

さらに、本研究では同位体顕微鏡による解析だけではなく、細胞への Ge-132 取り込みを LC/ MS-MS 分析法でも解析した。同位体顕微鏡では Ge-132 を Ge 原子として測定するが、LC/ MS-MS では THGP (Ge-132 のモノマー) として測定することで、細胞は Ge-132 を THGP の形として取り込んでいることが確認できた (図 16)。2 つの異なる分析方法によって、THGP が NHDF 細胞内に取り込まれることを明らかにした。よって、Ge-132 は生体の細胞内にモノマーの形として取り込まれて分解・代謝されず、本章で示した生理作用を発現していることが判明した。

次に NHDF 細胞の酸化ストレス負荷に対する THGP の効果について解析した。酸化ストレスによって細胞の生存率が減少するが、THGP はその生存数を高めることが明らかとなった。THGP (Ge-132) は細胞内の ATP 量を増加させ、細胞増殖を促進させる効果を介して酸化ストレスの細胞死を抑えることが報告されている[Wada et al. 2018]。本研究では、THGP 処理は通常状態の NHDF 細胞における細胞生存率および細胞内 ATP 量の増加を誘導できなかったが (図 18A, B)、THGP (Ge-132) の細胞処理時間の違いに加え、THGP に対する応答が細胞の種類によって異なる可能性が示唆された。THGP の酸化ストレスに対する防御効果としては、THGP が酸化ストレスに関連する抗酸化分子または酵素反応の抗酸化活性を調節する可能性が考えられるが、細胞のカタラーゼ酵素活性および細胞内 ROS 量の変化には THGP 添加は影響を与えなかった (図 20A, B)。また、手塚らはサルの肝臓ホモジネートに THGP を添加することでレドックス関連酵素の活性を調節し、カタラーゼ酵素活性が増加することを報告しているが[Tezuka et al. 2017]、本研究では THGP のカタラーゼの活性に与える影響は確認できなかった。これは、単一の皮膚細胞からの抽出したサンプルと複数種の細胞が含まれる肝臓組織からの抽出したサンプルの違いに加え、皮膚あるいは肝臓の細胞種の違いなどが影響して、手塚らの研究と異なる結果が得られた可能性がある。中村らも Ge-132 摂取マウス肝臓で抗酸化酵素遺伝子

の発現が増加していることを報告している[Nakamura et al. 2014]ことから、THGP は肝臓の細胞では抗酸化酵素を誘導する可能性は高いと考えられる。今後、THGP が酵素活性に与える影響の解明にはさらなる詳細な研究が必要である。

THGP と抗酸化物質であるアスコルビン酸 (AA) の作用を比較したところ、両者ともに酸化ストレスに対する細胞死を抑制する作用が確認されたが、THGP と AA には作用機構で大きな違いがあることが判明した。AA は直接皮膚の細胞内 ROS 形成を抑える能力があるが[Venza et al. 2015]、細胞に添加された中和型の THGP は抗酸化活性を発現しないことから、THGP は既存の抗酸化物質とは異なるメカニズムで酸化ストレスによる細胞死を抑制していると推察された。

遺伝子の網羅解析により、酸化ストレスによって発現増加した遺伝子の NR4A2、IL6、CXCL2 遺伝子は、THGP 処理によって減少した遺伝子であった。NR4A2 は細胞分化誘導、炎症タンパク因子の調節などを行う核内受容体因子であり[Crea et al. 2015]、NR4A2 が細胞死を誘導することも報告されている [Watanabe et al. 2015: Shi et al. 2017]。NR4A2 は、酸化ストレスによって活性化されるアポトーシスシグナル調節キナーゼ 1 (ASK1) -p38 経路を介して核から移動し、ネクローシス誘導機能を獲得することが報告されている[Watanabe et al. 2015]。さらに、NR4A2 は ROS によって活性化された NF κ B 経路を介して誘導され、オートファジーを介したアポトーシスを促進することが報告されている[Shi et al. 2017]。本研究は、THGP による酸化ストレス由来の細胞死抑制効果は、THGP が NR4A2 発現を抑制して細胞の生存率を高めたことを証明した。また、THGP 処理は胚の発生段階で生じる内因性の酸化ストレスによるアポトーシス経路を抑制することに加え、細胞死を誘導する因子を制御する可能性が報告されており[Kim et al. 2017]、今回の THGP の酸化ストレスに対する細胞死抑制効果も細胞死を制御することで生じている可能性が示唆された。今後、THGP の細胞死抑制メカニズムを解明するには、NR4A2 発現制御因子[Watanabe et al. 2015 : Shi et al. 2017]や細胞死シグナルに対する詳細な作用研究が必要である。

さらに、ROS は炎症反応の誘発因子として知られており、炎症では組織・細胞傷害を引き起こす[Johar et al. 2004: Mittal et al. 2014]。IL6 は、ROS などのストレスによって誘導される炎症性サイトカインであり[Frossi et al. 2003]、IL6 遺伝子発現レベルは酸化ストレスによって有意に増加するが、THGP 添加によって減少することを本研究によって明らかにした (図 22B)。IL6 は炎症部位で産生され、特に慢性

関節リウマチの病因として知られている[Srirangan et al. 2010]。Ge-132 (THGP) は関節リウマチモデルにおいて足の腫脹率や骨の病変を抑制することが報告されており[佐々木 他. 2013]、本研究で認められたような細胞レベルでの THGP による IL6 発現の抑制や細胞死の軽減が、リウマチの症状を軽減させる一因となっている可能性がある。さらに、炎症因子に関連したケモカイン CXCL2 遺伝子の発現レベルは酸化ストレスによって増加し、THGP 添加によって減少した (図 18C)。CXCL2 は単球、マクロファージ、内皮細胞、線維芽細胞、神経組織、および腫瘍細胞などの様々な細胞で生成され、好中球誘因および炎症応答に関与するケモカインとして知られている[Li et al. 2018; Rouault et al. 2013]。さらに、CXCL2 遺伝子の発現は ROS および IL6 の mRNA 量ならびに細胞死と相関することが報告されていることから[Mukhopadhyay et al. 2010; Park et al. 2008]、本研究で明らかにした THGP の酸化ストレスによる細胞死抑制効果は、直接 ROS 消去によるものではなく、炎症経路における ROS の下流で IL6 および CXCL2 などの炎症性サイトカインを抑制することも一要因であると考ええる。

本研究の結果によって、Ge-132 は皮膚表面に塗布することによって、真皮および皮下組織まで浸透する現象を世界で初めて可視化することに成功した。また、皮膚線維芽細胞においては、THGP が細胞質だけでなく核内にも移行することを明らかにした。酸化ストレスに対する THGP の防御効果は、既知の抗酸化メカニズムとして知られる抗酸化酵素の誘導や抗酸化物質による酸化ストレス自体の軽減ではなく、細胞死誘導因子や炎症性因子の遺伝子発現を抑制して、細胞の生存率を増加させる機構であることを発見した。

3.5 小括

本章では Ge-132 の皮膚組織への吸収分布や細胞の取り込みを明らかにするとともに、細胞に取り込まれた THGP が誘起すると考えられる細胞の抗酸化活性誘導効果について明らかにした。図 24 に THGP の酸化ストレスに対する防護効果メカニズムのスキームを示した。結果の概要は以下の通りである。

- 1) 皮膚の Ge-132 の吸収は表皮だけでなく、真皮・皮下組織まで吸収されることが明らかとなった。
- 2) Ge は表皮の角質層に多く存在し、表皮から拡散的に吸収されるのではなく、付属器官（毛根や汗腺など）から真皮に入り込む可能性が示唆された。
- 3) Ge-132 は皮膚の繊維芽細胞に THGP として取り込まれ、さらに核内まで取り込まれることを明らかにした。
- 4) 酸化ストレスによって NHDF 細胞の生存数が減少するが、THGP の添加濃度依存的に生存数が高まることを明らかにした。
- 5) THGP 処理による抗酸化酵素活性の誘導や細胞内 ROS 量の減少効果は見られなかった。
- 6) THGP 処理は、酸化ストレスによって上昇した細胞死誘導遺伝子や炎症関連遺伝子の発現を減少させ、既存の抗酸化物質とは異なるメカニズムで酸化ストレスに対する細胞死を抑制していた。

一般的な抗酸化物質と違うメカニズムでの THGP の抗酸化作用は、その他の抗酸化物質との併用による酸化ストレス防御効果に相乗作用を有する可能性を示す。最後に、THGP の抗酸化作用のメカニズムを介して、酸化障害による様々な疾病に対する予防・治療を証明するなどの研究につながることを期待する。

图表

表 7 酵素誘導による酸化ストレス試験 試薬添加条件

(μ l)

	培地	HPX(1mM)	XOD(100U/L)	THGP
HPX-XOD(-)	140	60	0	0
HPX-XOD(+)	120	60	20	0
5.9 μ M THGP HPX-XOD(+)	100	60	20	20
59 μ M THGP HPX-XOD(+)	100	60	20	20
590 μ M THGP HPX-XOD(+)	100	60	20	20
5900 μ M THGP HPX-XOD(+)	100	60	20	20

表 8 過酸化水素酸化ストレスによる酸化ストレス試験 試薬添加条件

(μ l)

	培地	H ₂ O ₂ (5mM)	THGP	AA
H ₂ O ₂ (-)	200	0	0	0
590 μ M THGP H ₂ O ₂ (-)	180	0	20	0
5900 μ M THGP H ₂ O ₂ (-)	180	0	20	0
100 μ M AA H ₂ O ₂ (-)	180	0	0	20
H ₂ O ₂ (+)	180	20	0	0
5.9 μ M THGP H ₂ O ₂ (+)	160	20	20	0
59 μ M THGP H ₂ O ₂ (+)	160	20	20	0
590 μ M THGP H ₂ O ₂ (+)	160	20	20	0
5900 μ M THGP H ₂ O ₂ (+)	160	20	20	0
100 μ M AA H ₂ O ₂ (+)	160	20	0	20

表 9 過酸化水素による長期間の酸化ストレスに対する細胞死割合測定 試薬添加条件

(μ l)

	培地	H ₂ O ₂ (5mM)	THGP	AA
H ₂ O ₂ (-)	1000	0	0	0
H ₂ O ₂ (+)	900	100	0	0
5.9mM THGP H ₂ O ₂ (+)	800	100	100	0

表 10 抗酸化酵素活性測定 試薬添加条件

	培地	HPX(1mM)	XOD(100U/L)	THGP
HPX-XOD(-)	1400	600	0	0
0.59mM THGP HPX-XOD(-)	1200	600	0	200
5.9mM THGP HPX-XOD(-)	1200	600	0	0
HPX-XOD(+)	1200	600	200	0
0.59mM THGP HPX-XOD(+)	1000	600	200	200
5.9mM THGP HPX-XOD(+)	1000	600	200	200

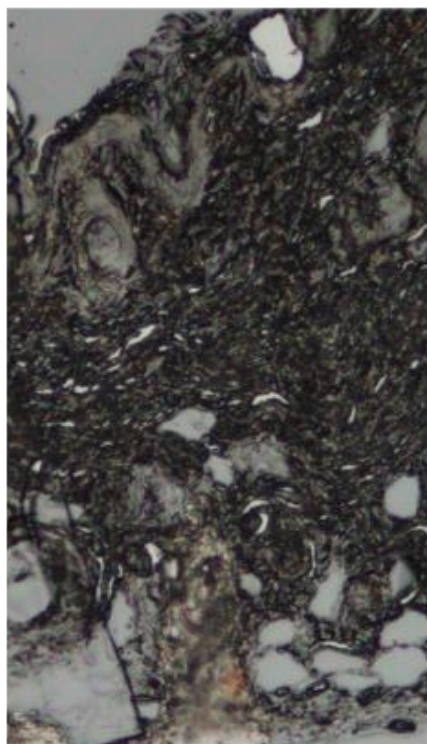
表 11 細胞内 ROS 量測定 試薬添加条件

	Working 溶液	HPX (6mM)	XOD (600U/L)	THGP or AA	Hepes buffer
HPX-XOD(-)	100	6	0	0	14
0.59mM THGP HPX-XOD(-)	100	6	0	2	12
5.9mM THGP HPX-XOD(-)	100	6	0	2	12
HPX-XOD(+)	100	6	2	0	12
0.59mM THGP HPX-XOD(+)	100	6	2	2	10
5.9mM THGP HPX-XOD(+)	100	6	2	2	10
0.01mM AA HPX-XOD(+)	100	6	2	2	10
0.1mM AA HPX-XOD(+)	100	6	2	2	10
1.0mM AA HPX-XOD(+)	100	6	2	2	10

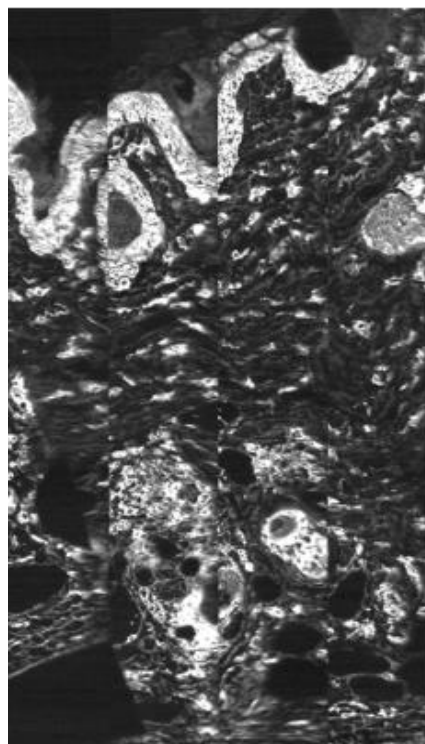
表 12 Primer list (5⇒3)

NR4A2	F : ctaacctgcaggcagaacctgaa
	R : acatttgtctgaactgcaacaacca
IL-6	F : aagccagagctgtgcagatgagta
	R : tgtcctgcagccactgggttc
CXCL2	F : cgcacgcgccatgggttaag
	R : acattaggcgcaatccaggtg
RPS18	F : ttgacgagtactcaacaccaacatc
	R : gagcatatcttcggccacac

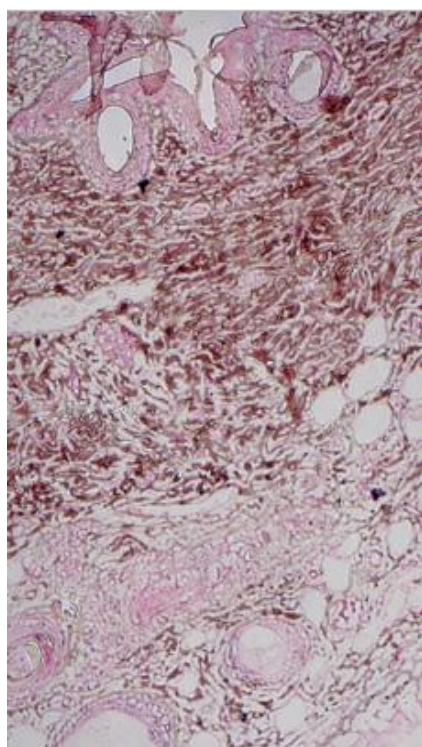
(A) 同位体顕微鏡
分析切片の光顕画像



(C) リン元素の画像



(B) HE染色画像



(D) Ge元素の画像

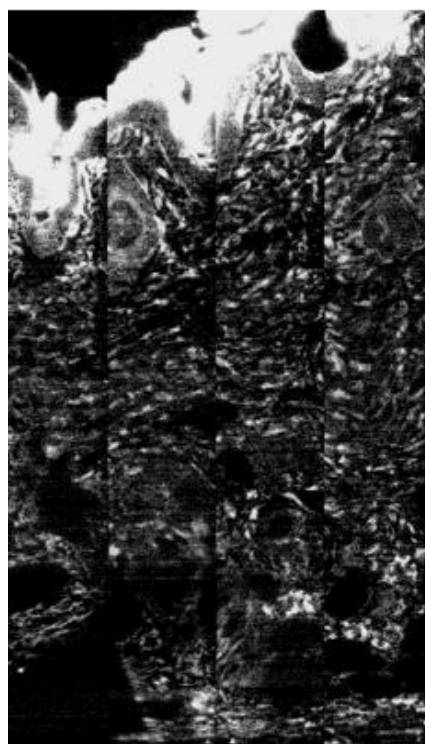


図 13 同位体顕微鏡分析によるマウス皮膚組織の元素分析画像
ヘアレスマウス組織の光顕画像 (A)、ヘマトキシリン・エオシン染色
画像 (B) およびリン、ゲルマニウム元素分析画像 (C、D) を示す。

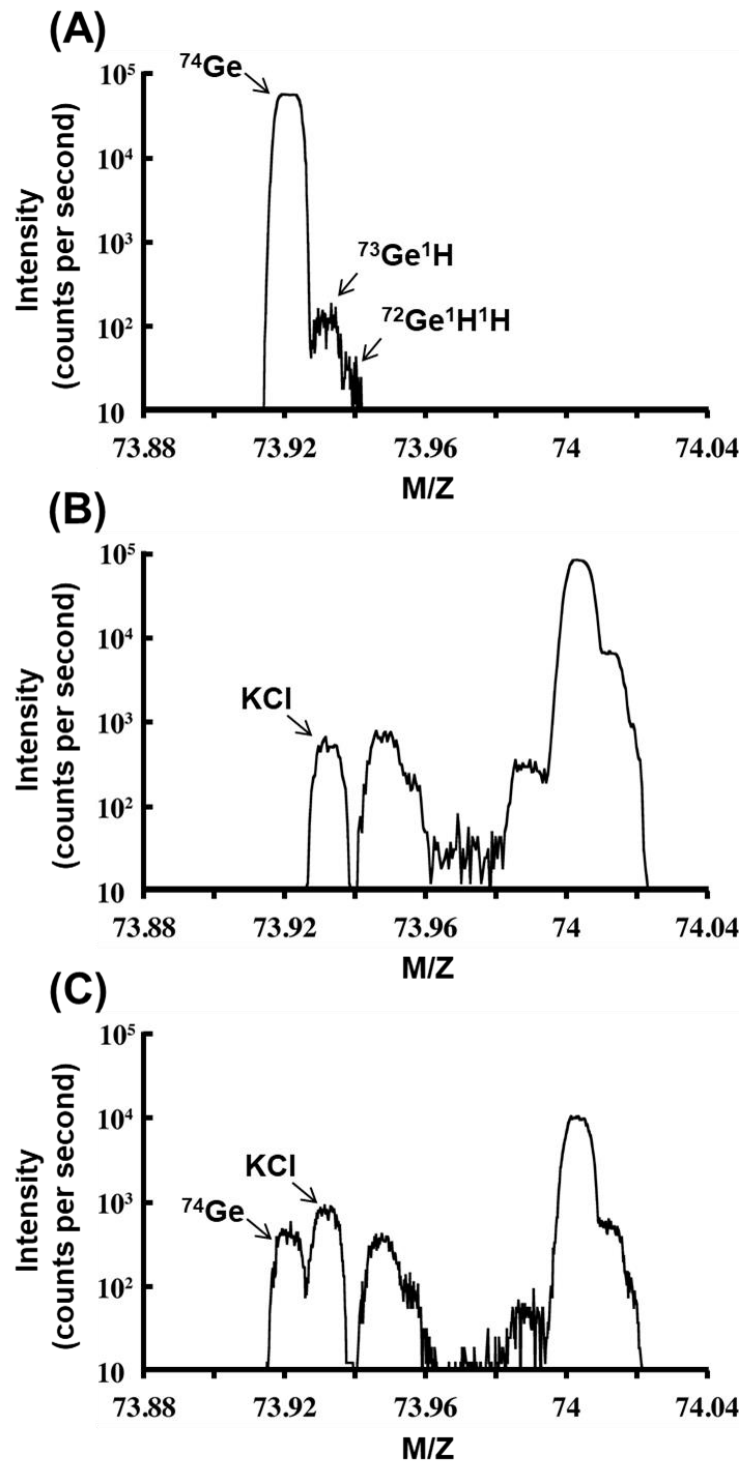
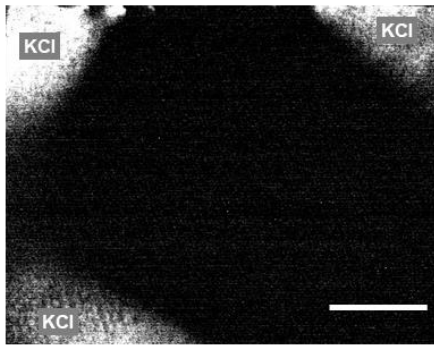


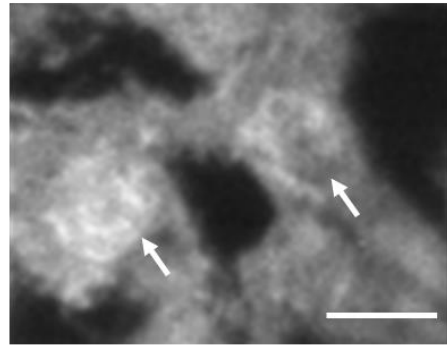
図 14 金属 Ge と正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を同位体顕微鏡で分析したマスデータ

金属 Ge のマス (A)、THGP を添加培養していない細胞のマス (B)、THGP を添加培養した細胞のマス (C) を示す。

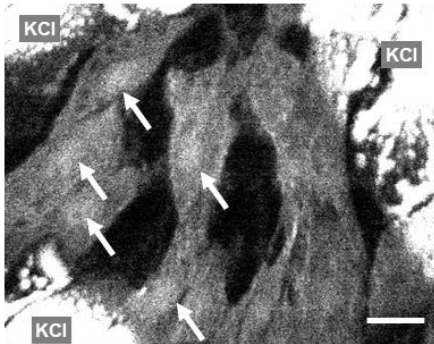
(A)



(C)



(B)



(D)

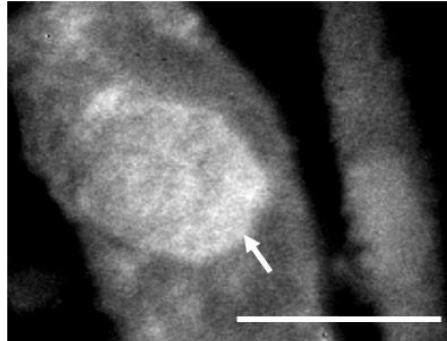


図 15 正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF 細胞）を同位体顕微鏡で Ge をイメージ化した画像
Ge-132 添加培養していない細胞の Ge をイメージ化した画像（A）、
添加培養した細胞の Ge をイメージ化した画像（B、C、D）を示す。
スケールバーは 25 μ m。

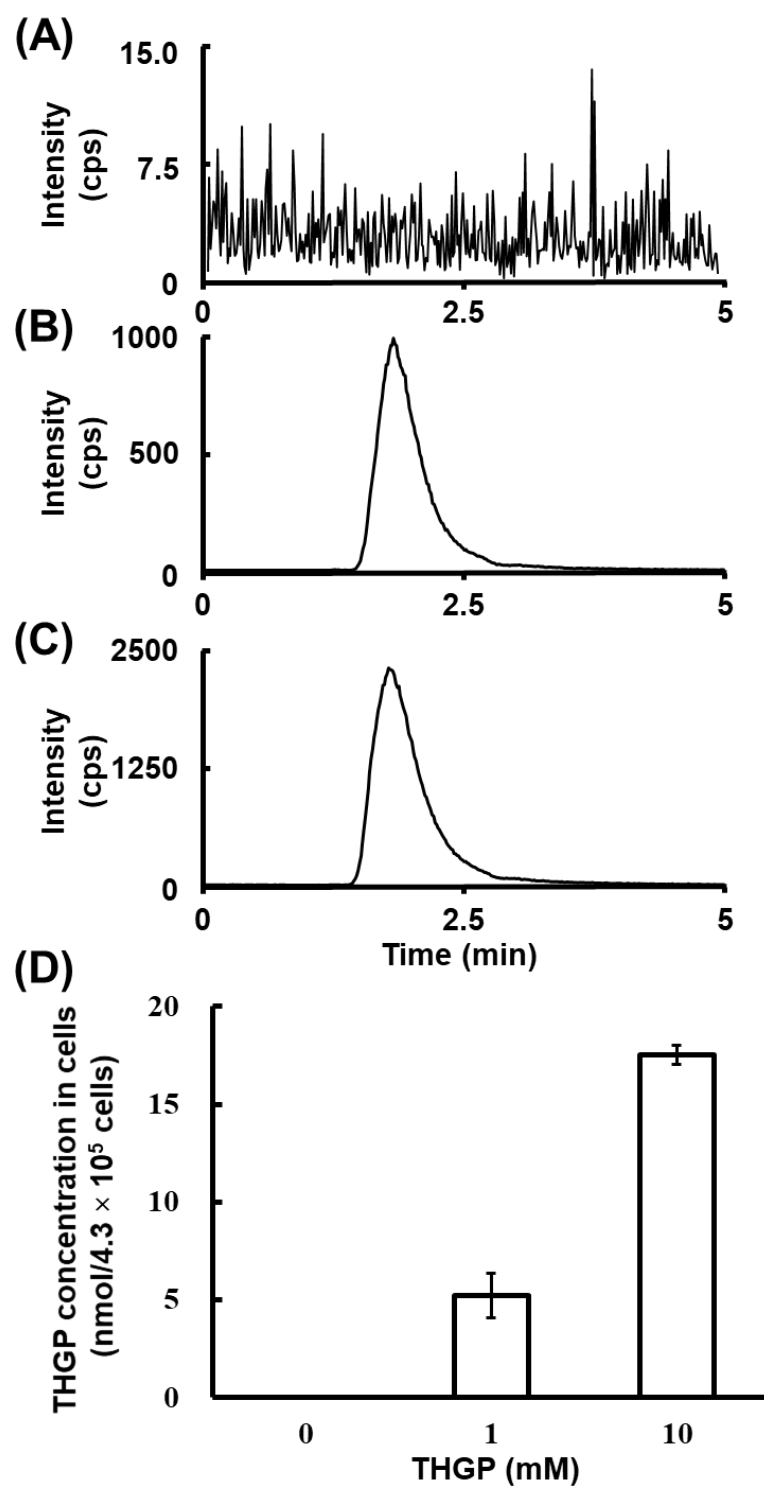


図 16 NHDF 細胞の THGP 取り込み量

THGP を 0,1,10mM 添加培養した細胞の THGP の取り込み量を LC/MS-MS 分析で測定した結果 (A, B, C) を示す。細胞当たりで補正した THGP 取り込み量を (D) に示す。個体数は N=3。

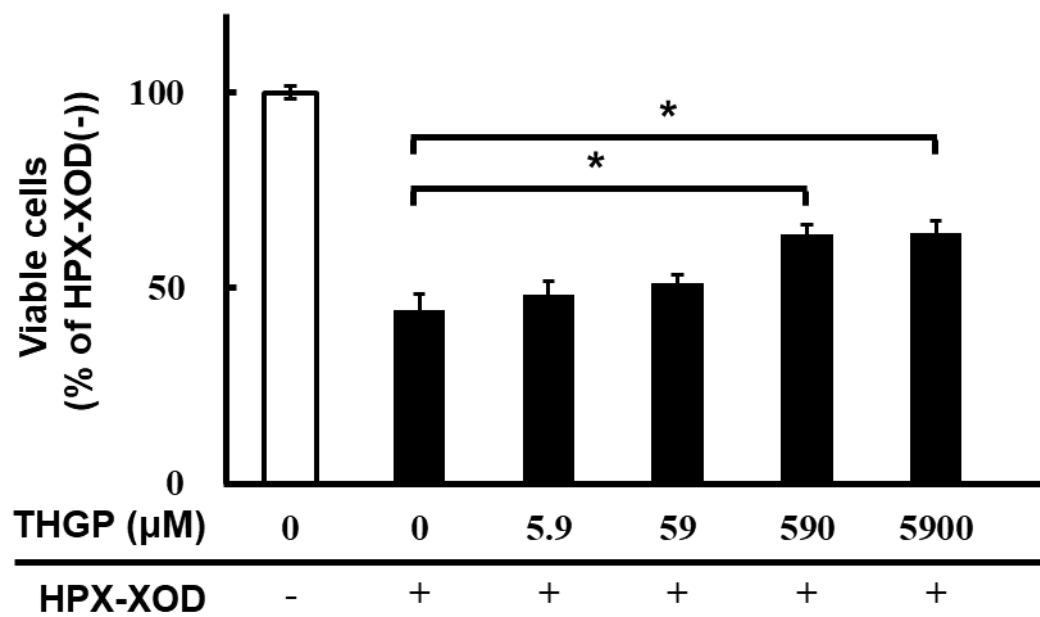


図 17 酵素誘導酸化ストレスに対する NHDF 細胞の生存率
 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ酵素による酸化ストレス
 に対する NHDF 細胞生存率を示す。個体数は N=8。

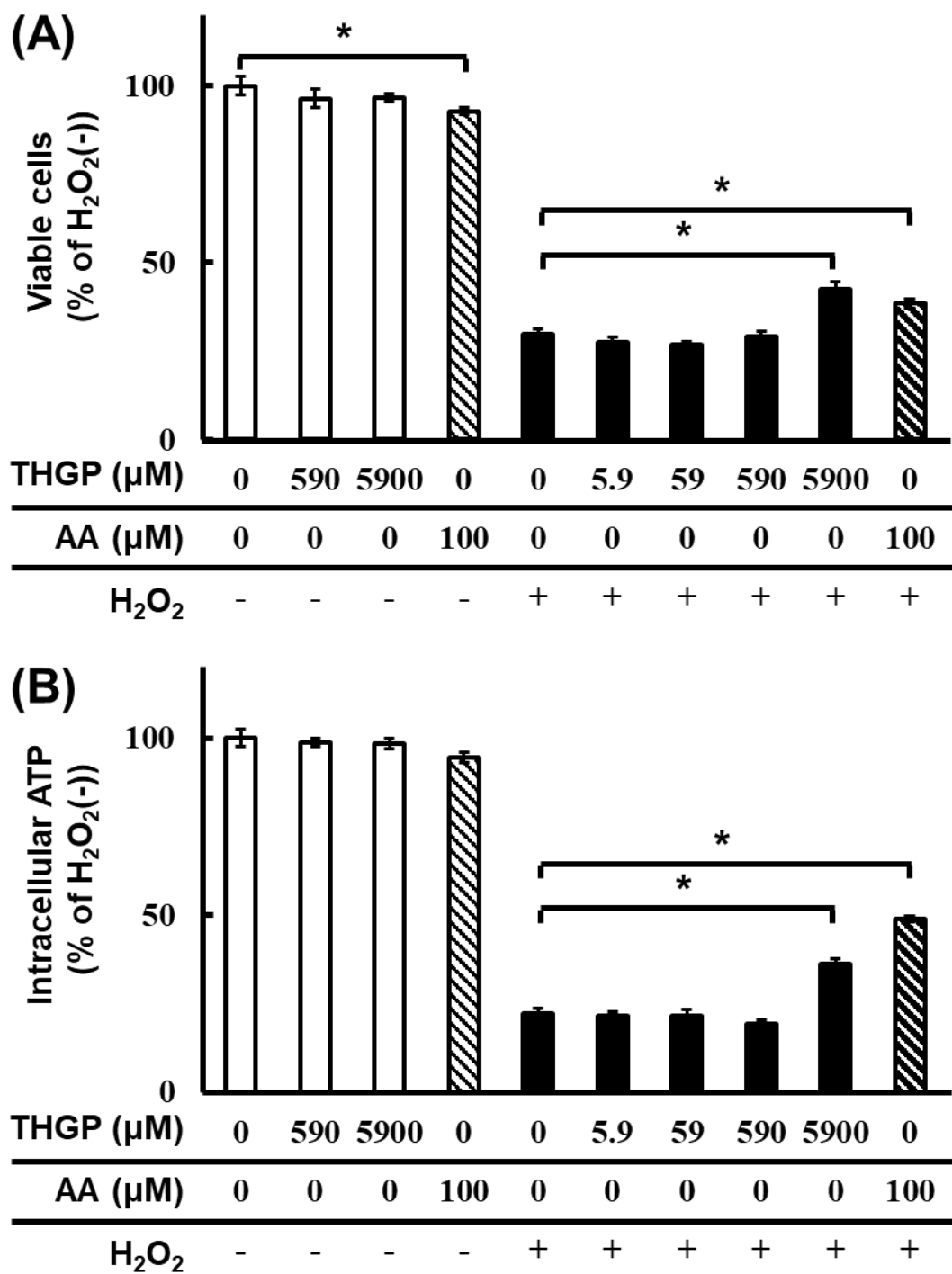


図 18 過酸化水素酸化ストレスに対する NHDF 細胞の生存率と細胞内 ATP 量
直接過酸化水素を培地に加えた時の酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率および細胞内 ATP 量を示す。個体数は N=8。

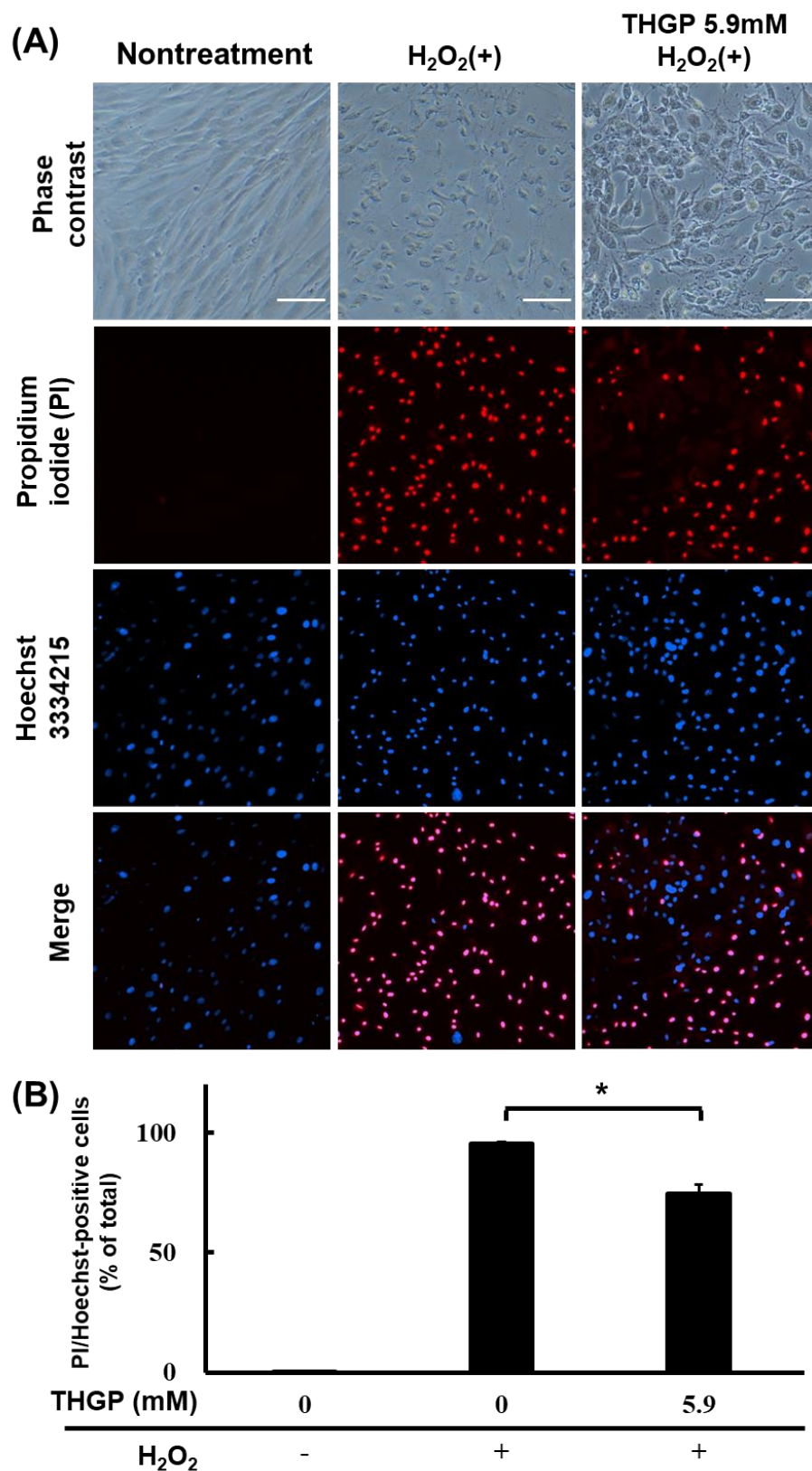


図 19 長期過酸化水素酸化ストレスに対する NHDF 細胞の生存率
長期酸化ストレスに対する NHDF 細胞の形態画像および PI/Hoechst 染色
画像 (A) および PI/Hoechst 正染色した割合 (B) を示す。個体数は N=6-8。

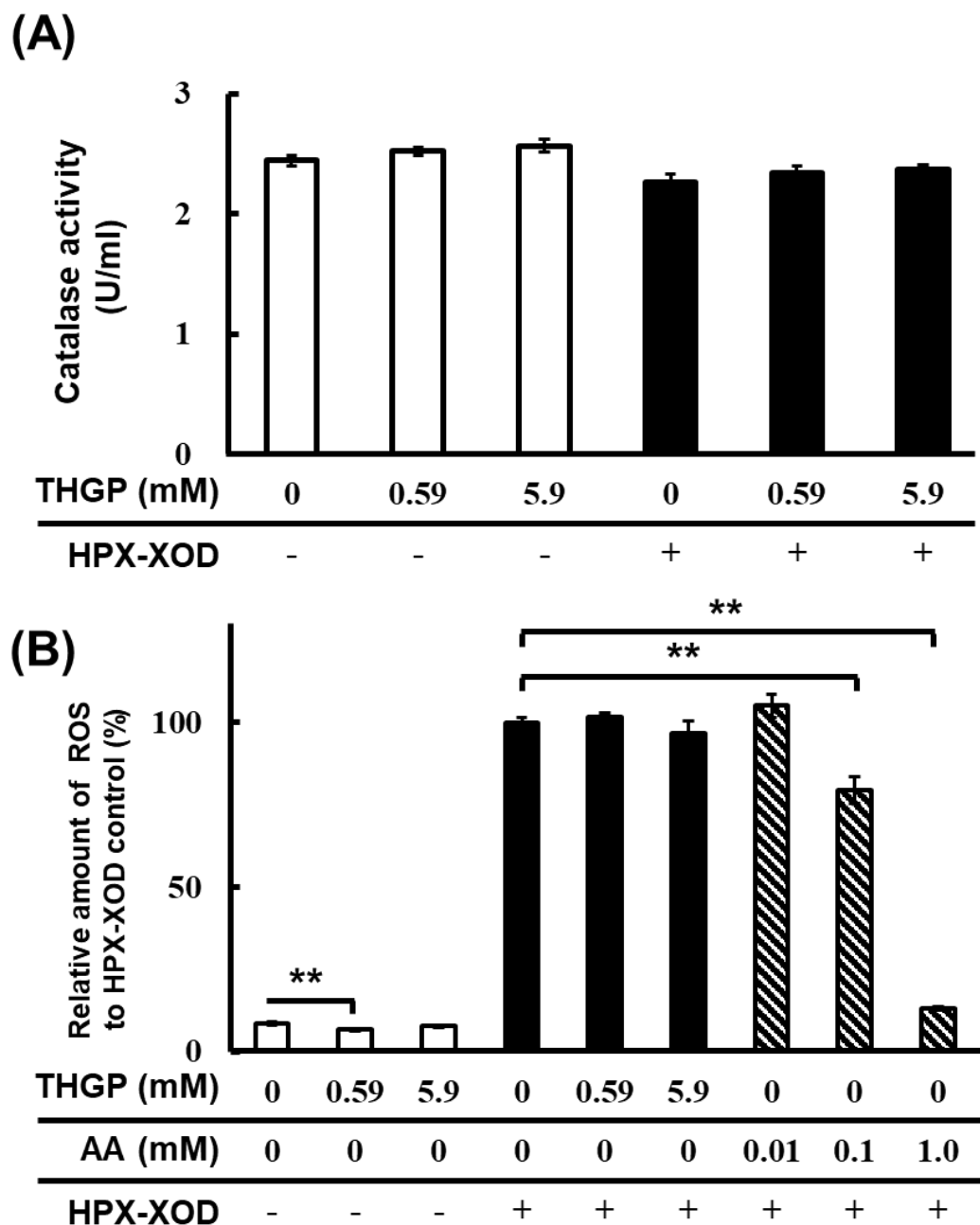


図 20 酸化ストレス及び THGP 処理による NHDF 細胞の抗酸化酵素活性、細胞内 ROS 量の変化
酸化ストレスに対する NHDF 細胞のカタラーゼ活性(A)、細胞内 ROS 量 (B) を示す。個体数 N=6-8

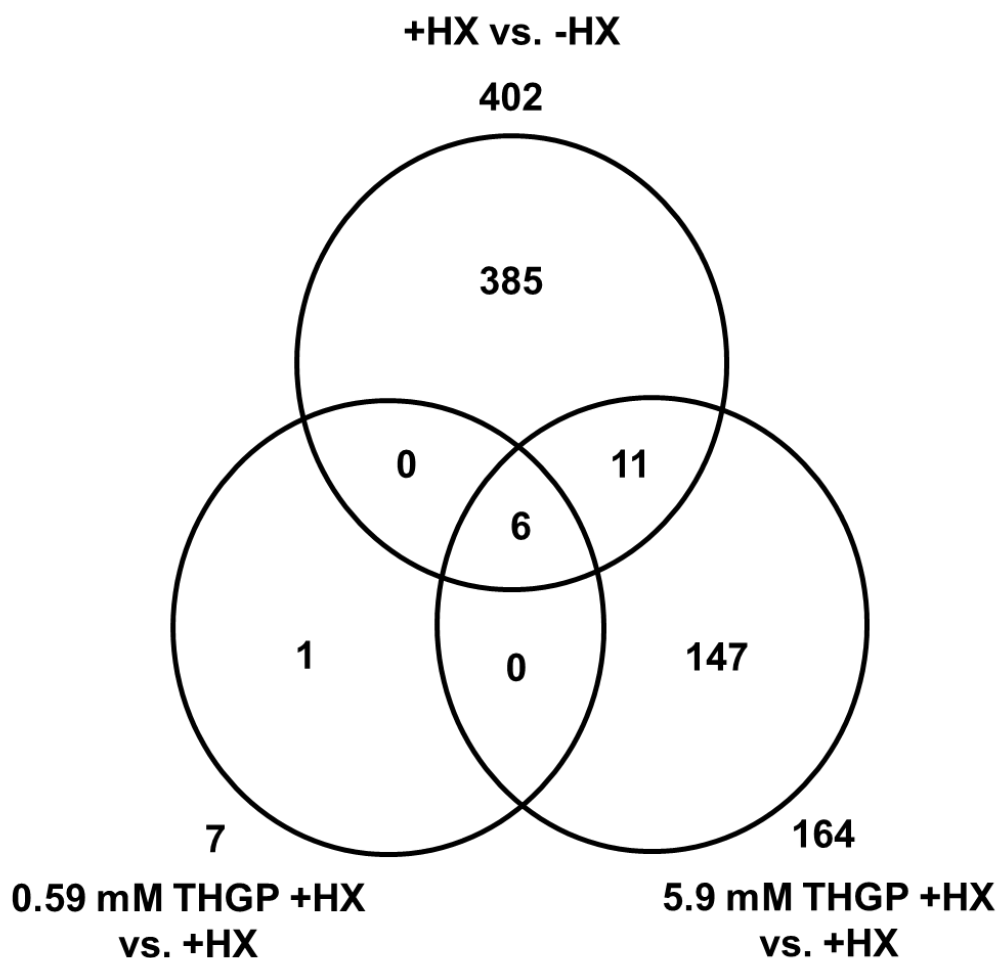


図 21 酸化ストレスおよび THGP 処理による NHDF 細胞の発現変化した遺伝子数

酸化ストレス無処理群 (-HX)、酸化ストレス処理群 (+HX)、0.59 mM THGP-酸化ストレス処理群 (0.59 mM THGP +HX)、5.9 mM THGP-酸化ストレス処理群 (5.9 mM THGP +HX) の群間比較をし、発現が 2 倍以上変動した遺伝子数をベンダイアグラムで示した。

表 13 酸化ストレスおよび 5.9mM THGP で処理し、2 倍以上発現変動した遺伝子（17 個）

Probe ID	Gene Symbol	Public ID	Gene Name	Fold changes in gene expression		
				+HX vs -HX	0.59 mM THGP vs +HX	5.9 mM THGP vs +HX
204622_x_at	NR4A2	NM_006186	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3.84	0.10	0.12
216248_s_at	NR4A2	S77154	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	4.00	0.13	0.13
204621_s_at	NR4A2	AI935096	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3.57	0.13	0.13
205207_at	IL6	NM_000600	interleukin 6	3.01	0.44	0.36
209774_x_at	CXCL2	M57731	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	5.85	0.42	0.39
219228_at	ZNF331	NM_018555	zinc finger protein 331	5.14	0.37	0.41
202340_x_at	NR4A1	NM_002135	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	2.26	0.54	0.48
209324_s_at	RGS16	BF304996	regulator of G-protein signaling 16	8.62	0.70	0.48
220987_s_at	AKIP1 NUAK2	NM_030952	A kinase (PRKA) interacting protein 1 NUAK family, SNF1-like kinase, 2	4.33	0.68	0.50
205925_s_at	RAB3B	NM_002867	RAB3B, member RAS oncogene family	0.33	1.90	2.16
220253_s_at	LRP12	NM_013437	low density lipoprotein receptor-related protein 12	0.47	1.62	2.18
215092_s_at	NFAT5	AJ005683	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	0.23	1.59	2.41
220342_x_at	EDEM3	NM_017992	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	0.33	1.19	2.59
211380_s_at	PRKG1	D45864	protein kinase, cGMP-dependent, type I	0.46	1.62	2.60
220484_at	MCOLN3	NM_018298	mucolipin 3	0.48	1.31	2.77
201856_s_at	ZFR	BC000376	zinc finger RNA-binding protein	0.47	1.99	2.97
211090_s_at	PRPF4B	Z25435	pre-mRNA processing factor 4B	0.38	1.29	5.01

表 14 酸化ストレスおよび 5.9mM THGP で処理し、2 倍以上発現変動した遺伝子（17 個）のクラスター解析結果

Gene Ontology (GO) term	Genes altered by 5.9 mM THGP	P-value	Genes				
GO:0045444 fat cell differentiation	3	0.010	IL6	NR4A1	NR4A2		
GO:0016477 cell migration	5	0.011	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	PRKG1
GO:0071383 cellular response to steroid hormone stimulus	3	0.015	IL6	NR4A1	NR4A2		
GO:0060326 cell chemotaxis	3	0.016	IL6	NR4A1		CXCL2	
GO:0048870 cell motility	5	0.016	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	PRKG1
GO:0051674 localization of cell	5	0.016	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	PRKG1
GO:0071375 cellular response to peptide hormone stimulus	3	0.021	IL6	NR4A1	NR4A2		
GO:1901700 response to oxygen-containing compound	5	0.022	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	EDEM3
GO:1901653 cellular response to peptide	3	0.024	IL6	NR4A1	NR4A2		
GO:0040011 locomotion	5	0.026	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	PRKG1
GO:0033993 response to lipid	4	0.027	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	
GO:0048545 response to steroid hormone	3	0.034	IL6	NR4A1	NR4A2		
GO:0043434 response to peptide hormone	3	0.039	IL6	NR4A1	NR4A2		
GO:0006928 movement of cell or subcellular component	5	0.043	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2	PRKG1
GO:0045944 positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4	0.043	IL6	NR4A1	NR4A2		NFAT5
GO:1901652 response to peptide	3	0.046	IL6	NR4A1	NR4A2		

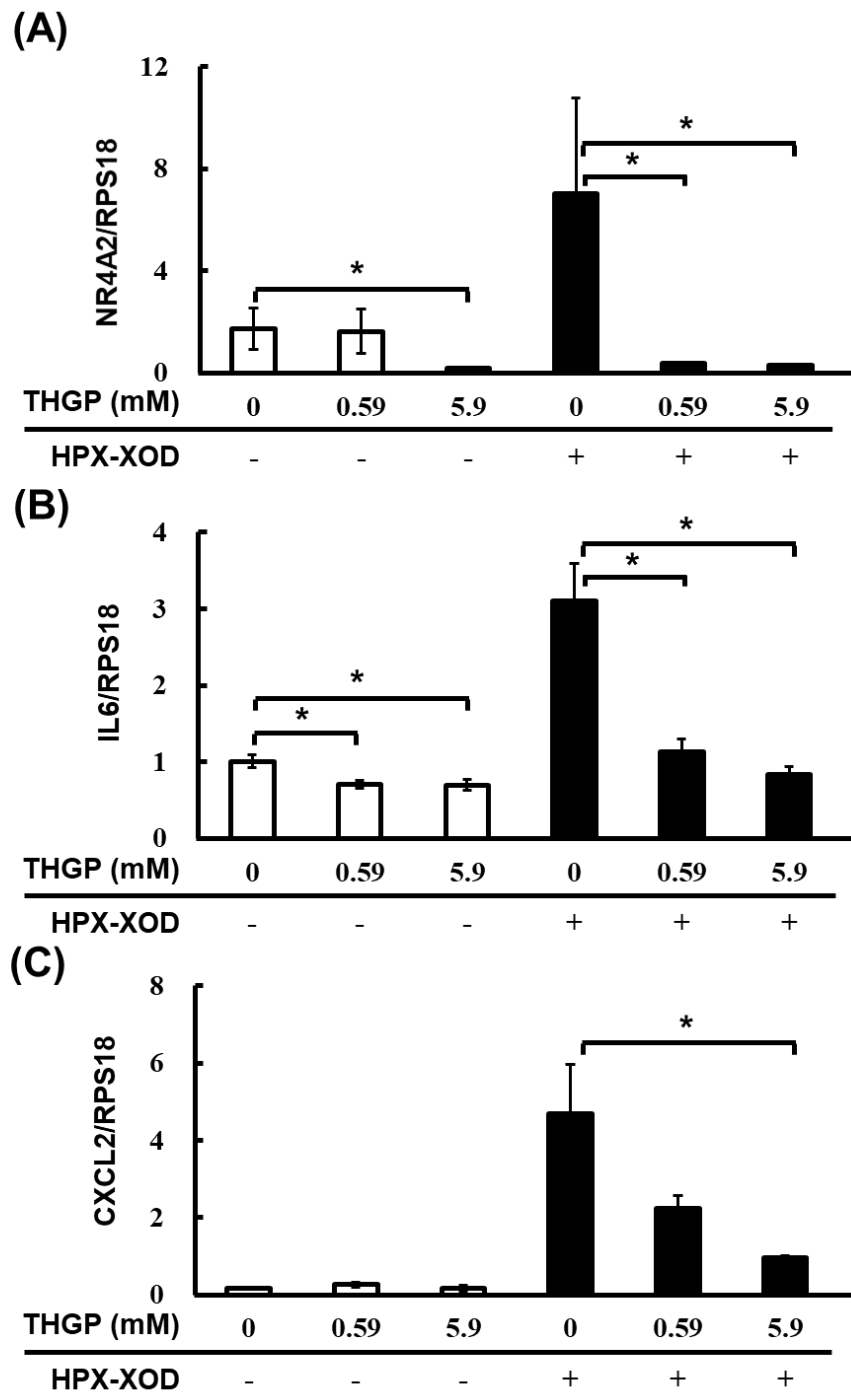


図 22 酸化ストレス及び THGP 処理による NHDF 細胞の NR4A2、IL6、CXCL2 遺伝子発現の変化
 NR4A2 (A)、IL6 (B)、CXCL2 (C) の遺伝子発現変化を示す。RPS18 遺伝子を内部標準として用いて発現量を補正した。個体数 N=5-6。

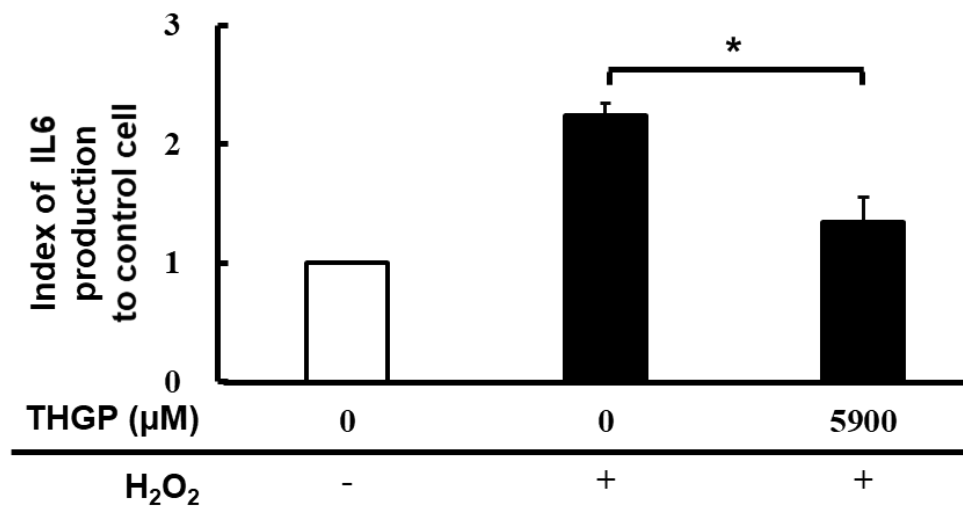


図 23 酸化ストレスおよび THGP 処理による培養上清中に放出された IL6 量
酸化ストレスおよび THGP 処理によって培養上清中に放出された IL6 量を示す。値は生細胞率で補正した。個体数 N=6-8。

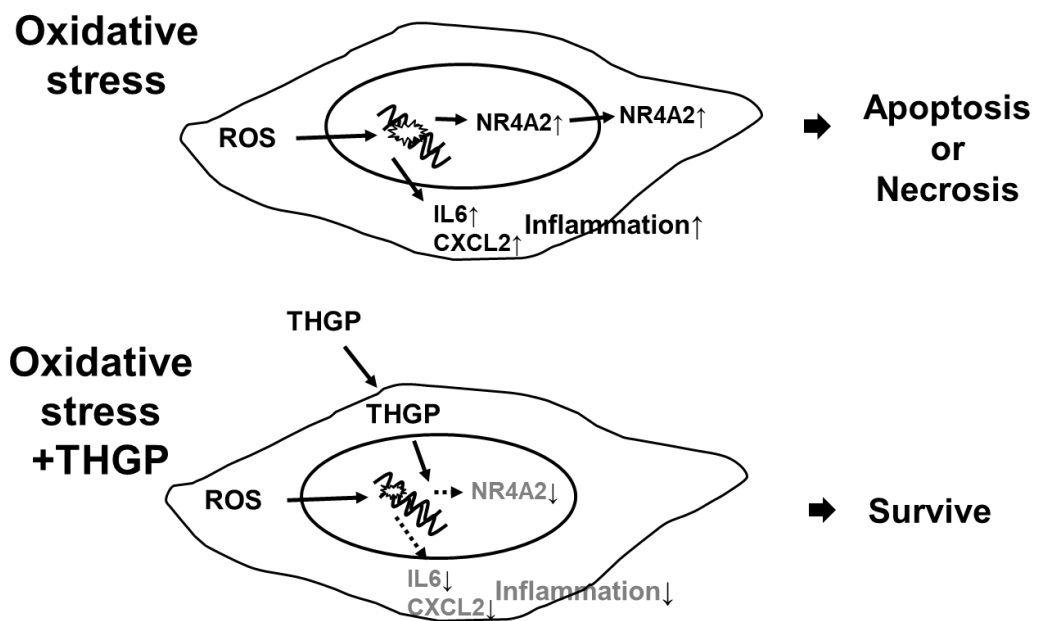


図 24 THGP の酸化ストレスに対する防護効果メカニズム

第 4 章 総括

本研究では Ge-132 の多様な生理作用の中で抗酸化効果を解明するため、経口摂取および皮膚塗布による生理作用について解析を行った。第 2 章では Ge-132 の経口摂取によって生じる糞便の色の変化に着目して、その変化機構について検討し、第 3 章では Ge-132 の皮膚の吸収動態と抗酸化作用機構の研究を行った。

第 2 章において、Ge-132 摂取で生じる糞便の色の変化は赤血球代謝色素（ステルコビリニン）が増加するためであることを明らかにした。またステルコビリノーゲンは一般的な抗酸化物質よりも強い抗酸化能をもち、今回 Ge-132 摂取によって糞便中の色素増加に伴う糞便中の抗酸化能の増加を初めて示した。Ge-132 摂取による糞便中の抗酸化能の増加は腸管の酸化物や病原菌感染による炎症ストレスを軽減し、健康な腸管を維持することに役立つ可能性が示唆された。また Ge-132 摂取はマクロファージの赤血球貪食能を亢進させることで老化赤血球を減少させ、さらに骨髓細胞の赤芽球分化能を亢進させる。結果として血液中の赤血球量が維持され、その組成は膜が柔軟で酸素運搬能が高い若い赤血球の割合が増加していると考えられる。細胞活動の源はミトコンドリアの酸化還元により産生される ATP であり、酸化還元に必要な酸素は生体に必須なものである。実際に Ge-132 摂取によって赤血球の流動性が増加することがヒトで示されており[石田 他 2001]、全身に酸素が十分に行き届けられることで細胞を活性化させ、健康を維持することができると期待している。

第 3 章において、Ge-132 の体内への吸収は経口摂取からだけでなく、皮膚表面からも吸収され、真皮・皮下組織まで吸収されることを明らかにした。また皮膚の繊維芽細胞において核内まで取りこまれることを初めて可視化した。ヒト正常皮膚線維芽細胞（NHDF 細胞）において、THGP は酸化ストレスによる細胞死の抑制効果を示したが、その効果は抗酸化酵素の誘導効果や細胞内の ROS 量の減少ではなく、一般的な抗酸化物質とは異なることを発見した。THGP は酸化ストレスによる細胞死誘導遺伝子（NR4A2）および炎症性関連遺伝子（IL6、CXCL2）の発現を抑制することで、細胞生存を高めた可能性が示唆され、細胞自身の防御メカニズムの活性化によることが示唆された。酸化ストレスも一因とされる火傷やアレルギーなどの皮膚の病態において、THGP の酸化防御効果が緩和することができると考えられ、さらにメカニズムが異なる一般的な抗酸化物質との併用では相乗的な抗酸化効果を期待する。

以上のことから、Ge-132 は生体分子の誘導または宿主の防御メカニズムを活性化させることによって抗酸化作用を発現することが判明した。赤血球代謝色素の誘導による抗酸化作用の増加に加え、酸化ストレス誘導の細胞死・炎症の抑制効果が Ge-132 の新たな生理作用として見出すことができた。最後にこれらの生理作用を促す要因として、THGP が作用する可能性がある因子について考察した。THGP はシスジオール構造をもつ物質だけでなく、SH 基を持つ物質であるシステインとも錯体を形成する（未発表）。生体の酸化ストレス応答因子として Nrf2 があり、酸化ストレスに応答して Hmox-1 や抗酸化酵素などの生体防御因子の転写の促進および炎症性サイトカインの転写の抑制が報告されている[田口 他 2007: Kobayashi et al. 2016]。Nrf2 はストレスに速やかに応答するために常に作られているが、通常は Keap1 タンパクと結合してユビキチン化されて分解される[伊東 2009]。Keap1 は SH 基を持つ物質であることから、THGP は Keap1 との結合を介して Nrf2 のタンパク分解を阻害し、核内移行を誘導させ、Hmox-1 や抗酸化酵素の転写促進、IL6 などの炎症性サイトカインの転写抑制を誘導している可能性が考えられた。その結果、IL6 の発現量が低下してストレス軽減作用が誘導され、また Hmox-1 発現の上昇によるマクロファージの活性化が赤血球代謝回転を亢進していることが考えられた（図 25）。今後、これらの発現制御を検討することで Ge-132 の生理作用を明らかにしていきたい。

体の酸化障害は様々な疾病の要因となる。例えば、DNA 酸化障害によるガン化、酸化によるタンパク質の変性、過酸化脂質の増加による動脈硬化と脳卒中、心疾患、慢性炎症の誘導など過度な酸化ストレスは健康を害する要因となることが多数報告されている。Ge-132 が種々の疾病に対して生理作用を示すのは、Ge-132 が宿主の酸化ストレス防御機構を活性化させることで、酸化障害による疾病を緩和させていることが一要因になっていることを本研究によって明らかにした。

本研究で示した結果は、Ge-132 の体内の抗酸化誘導効果メカニズム解明につながるものと考えている。。

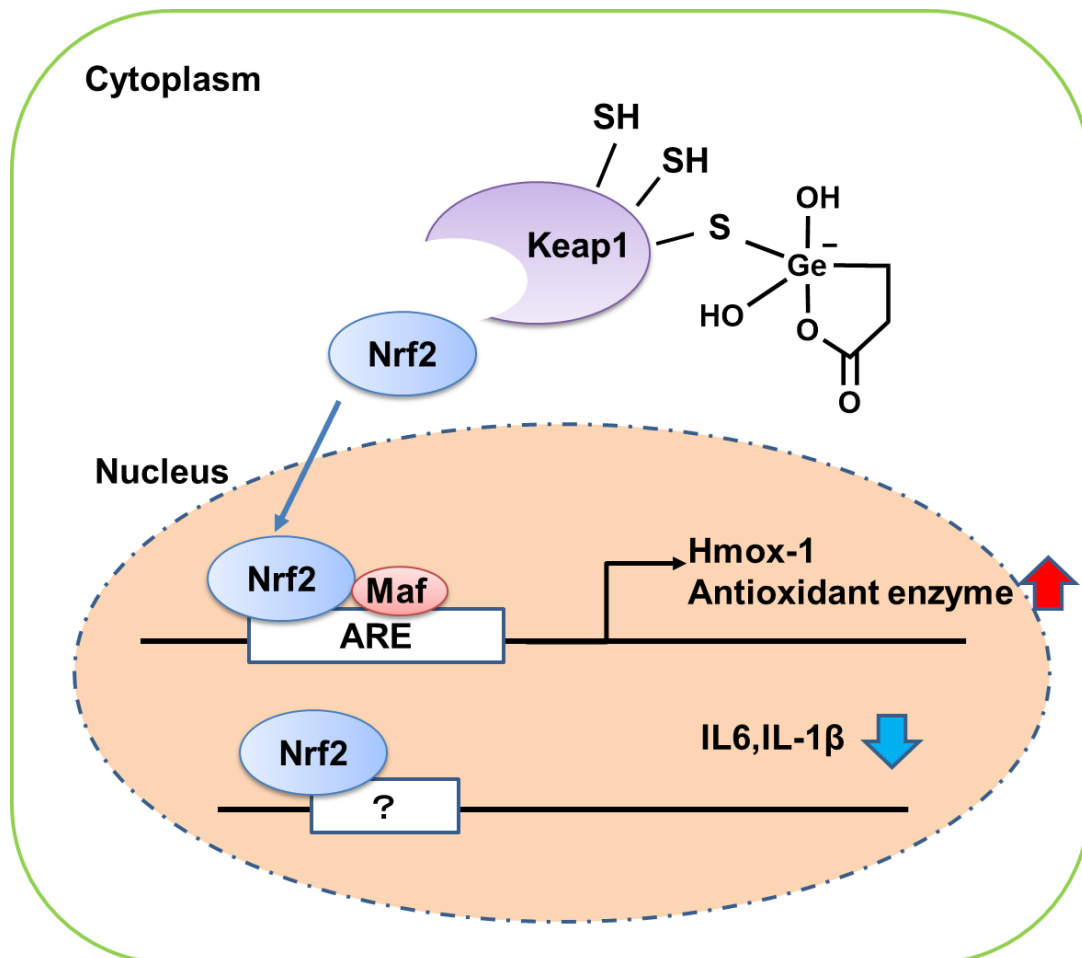


図 25 THGP で誘導が予想される生体防護メカニズム

謝辞

本研究の遂行および論文作成において、ご指導ご鞭撻頂きました麻生久教授に心より感謝申し上げます。本論文の作成において、副査および本審査をお引き受け下さった動物生殖科学分野の種村健太郎教授、栄養学分野の白川仁教授に深く感謝申し上げます。さらに本審査をお引き受け下さった動物栄養性化学分野の喜久里基准教授、動物資源科学分野の北澤春樹教授、機能形態学分野の野地智法准教授、渡邊康一助教に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行において、有益なご指導、ご助言およびサンプル測定していただきました北海道大学創成研究機構坂本直哉助教、永田康祐氏、帯広畜産大学人間科学研究部門得字圭彦准教授、山形大学医学部附属病院山口浩明教授に深く感謝申し上げます。

さらに機能形態学分野での研究および学生生活において、支援を頂いた機能形態学分野の学生の皆様に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、本研究の遂行機会および論文作成にあたり、あらゆる面で支えてくださった中村宜司博士ならびにご支援いただいた株式会社浅井ゲルマニウム研究所の皆様に感謝し、また絶えず励まし支えてくださった家族に心より感謝申し上げます。

参考文献

M Tsutsui, N Kakimoto, D D Axtell, H Oikawa and K Asai. (1976) Crystal Structure Of

‘Carboxyethylgermanium Sesquioxide’. J. Am. Chem. Soc., 98: 8287-8289.

鹿児島 正豊, 大西 勉, 勝呂 信雄, 富澤 攝夫. (1986) 2-Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) の体内動態 (第 1 報) 経口投与. 応用薬理, 32 (1): 71-79

藤田 浩. (1983) 免疫療法剤の体内動態. Pharma Medica., 1: 407-419.

永田 次雄, 永田 貴久, 荒蒔 義知, 榎本 真, 井坂 英彦, 大塚 潤一. (1978) Carboxyethylgermanium Sesquioxide の静脈内投与によるビーグル犬の 6 ヶ月間の慢性毒性試験. 応用薬理, 16 (4): 613-636.

新保 幸太郎, 森 規子. (1980) Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge 132) のウサギにおける器官形成期投与試験. 応用薬理, 20: 675-679.

杉谷 幸男, 坂巻 政次, 杉田 利志子, 阿保 義種, 佐藤 博. (1986) Carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge 132) のラット経口投与による亜急性毒性試験. 応用薬理, 31: 1181-1190.

T Sanai, S Okuda, K Onoyama, N Oochi, S Takaichi, V Mizuhira and M Fujishima. (1991) Chronic tubulointerstitial changes induced by germanium dioxide in comparison with carboxyethylgermanium sesquioxide. Kidney Int., 40: 882-890.

H Aso, F Suzuki, T Yamaguchi, Y Hayashi, T Ebina and N Ishida. (1985) Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. Microbiol Immunol., 29: 65-74.

桑原 正人, 田中 茂男, 小出 英興, 辻本 元. (1983) ビーグル犬における Ge 132 による NK 活性の増強について. 医学と薬学 10: 1659-1661.

H Fukazawa, Y Ohashi, S Sekiyama, H Hoshi, M Abe, M Takahashi and T Sato. (1994) Multidisciplinary treatment of head and neck cancer using BCG, OK-432, and Ge-132 as biologic response modifiers. *Head Neck.*, 16: 30-38.

N Kumano, Y Nakai, T Ishikawa, S Koinumaru, S Suzuki, T Kikumoto and K Konno. (1985) Antitumor effect of the Organogermanium compound Ge-132 on the lewis lung Carcinoma (3LL) in C57BL/6 (B6) mice. *Tohoku J Exp Med.*, 146: 97-104.

佐々木 健一, 石川 正明, 門馬 恵子, 高柳 義一. (1983) 免疫調節物質有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 のラットアジュバント関節炎に及ぼす影響. 東北薬科大学研究年報, 30: 143-147.

A Fujii, N Kuboyama, J Yamane, S Nakao and Y Furukawa. (1993) Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats. *Gen Pharmacol.*, 24: 1527-1532.

佐々木 健一, 石川 正明, 門馬 恵子, 高柳 義一. (1984) 有機ゲルマニウム化合物 (Ge -132) のマウスにおける実験的急性炎症および四塩化炭素肝障害に及ぼす影響. 応用薬理, 27: 1119-1131.

鈴木 幸子, 田口 恭治. (1983) Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) の薬理学的研究 (1) 鎮痛効果. 応用薬理, 26: 803-810.

H Dozono, K Ikeda and T Onishi. (1996) Effectiveness of Ge-132 to relieve pain and smooth home care administration for the terminal cancer patient. *Gan to kagaku ryoho*, 23 Suppl 3: 291-295.

小池 寧々, 杉本 果歩, 増田 寛志, 島田 康弘, 佐藤 克行, 中村 宜司, 山口 浩明, 田邊元三, 丸本 真輔, 笠波 嘉人, 関口 富美子, 川畑 篤史. (2019) E 有機ゲルマニウム化合物 repagermanium は H₂S により誘起される Cav3.2 T 型カルシウムチャネル活性上昇とマウスにおけるアロディニアを直接的に阻害する. 第 136 回 日本薬理学会近畿部会 プログラム・要旨集: 28

T Kada, H Mochizuki and K Miyao. (1984) Antimutagenic effects of germanium oxide on Trp P 2 induced frameshift mutations in Salmonella typhimurium TA98 and TA1538. Mutat Res., 125: 145-151.

佐内 透, 奥田 誠也, 大地 信彰, 王 幸則, 小林 和夫, 島松 和正, 小野山 薫, 藤見 惺, 藤島 正敏. (1989) ゲルマニウム腎症に関する実験的研究 ; 二酸化ゲルマニウムおよびカルボキシエチルゲルマニウム三二酸化物の亜急性腎毒性の検討. 腎と透析, 26: 228- 232.

T Sanai, S Okuda, K Onoyama, N Oochi, Y Oh, K Kobayashi, K Shimamatsu, S Fujimi and M Fujishima. (1990) Germanium dioxide induced nephropathy: A new type of renal disease. Nephron, 54: 53-60.

厚生労働省. (1988) ゲルマニウムを含有させた食品の取扱について. 衛新第 12 号.

T Nakamura, Y Shimada, T Takeda, K Sato, M Akiba and H Fukaya. (2015) Organogermanium compound, Ge-132, forms complexes with adrenaline, ATP and other physiological cis-diol compounds. Future Med Chem., 7: 1233-1246.

Y Shimada, K Sato, Y Tokuji and T Nakamura. (2015) Nuclear magnetic resonance studies of the interactions between the organic germanium compound Ge-132 and saccharides. Carbohydr Res., 407: 10-15.

Y Shimada, K Sato, T Takeda and Y Tokuji. (2017) The Organogermanium Compound Ge-132 Interacts with Nucleic Acid Components and Inhibits the Catalysis of Adenosine Substrate by Adenosine Deaminase. Biol Trace Elem Res., 1: 164-172.

T Nagasawa, K Sato and T Kasumi. (2017) Efficient Alkaline Isomerization of Lactose to Lactulose in the Presence of an Organogermanium Compound. J.Appl.Glycosci., 64: 27- 32.

E Birben, UM Sahiner, C Sackesen, S Erzurum and O Kalayci. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J., 5: 9-19.

谷口 直之, 赤池 孝章, 鈴木 敬一郎, 内田 浩二. (2009) 活性酸素シグナルと酸化ストレス. 実験医学 増刊 vol.27: 30-37

T Akaike. (2014) Reactive Oxygen Species Signaling and Redox Homeostasis Regulated by 8-Nitro-cGMP. *Yakugaku zasshi.* 134: 515-519.

Y Yang, AV Bazhin, J Werner and S Karakhanova. (2012) Reactive Oxygen Species in the Immune System. *Int Rev Immunol.*, 32: 249-270.

PR Angelova and AY Abramov. (2018) Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 26: 692-702.

NR Madamanchi, ZS Hakim and MS Runge. (2004) Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost.*, 3: 254-267.

S Kumari, AK Badana, MM G, S G, R Malla. (2018) Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights*, 13: 1-9.

L Prónai and S Arimori. (1992) Decreased plasma superoxide scavenging activity in immunological disorders - carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) as a promoter of prednisolone. *Biotherapy*, 4:1-8.

大澤 俊彦, 柿本 紀博. (1988) 有機ゲルマニウム化合物の抗酸化性. *ESR とフリーラジカル*, 149-154.

T Nakamura, T Nagura, M Akiba, K Sato, Y Tokuji, M Ohnishi and K Osada. (2010) Promotive Effects of the Dietary Organic Germanium Poly trans-[(2 carboxyethyl)germasesquioxane]](Ge-132) on the Secretion and Antioxidative Activity of Bile in Rodents. *J. Health Science.*, 56: 72-80.

L Ziberna, M Martelanc, M Franko and S Passamonti. (2016) Bilirubin is an Endogenous Antioxidant in Human Vascular Endothelial Cells. *Sci Rep.*, 6: 29240.

T Nakamura, K Sato, M Akiba and M Ohnishi. (2006) Urobilinogen, as a Bile Pigment Metabolite, Has an Antioxidant Function. *Journal of Oleo Science*, 55: 191-197

H Matsumoto, H Iwafuji, J Yamane, R Takeuchi, T Ustunomiya, A Fujii. (2016) Restorative effect of organicgermanium compound (Ge-132) on dermal injury. *Wound Medicine*, 15: 6-10.

T Nakamura, T Nagura, K Sato and M Ohnishi. (2012) Evaluation of the Effects of Dietary Organic Germanium, Ge-132, and Raffinose Supplementation on Caecal Flora in Rats. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 31: 37-45.

T Raimo, S Harvey, Marver and S Rudi. (1969) Microsomal Heme Oxygenase Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.*, 244: 6388-6394.

D Shemin. (1989) An Illustration of the Use of Isotopes: The Biosynthesis of Porphyrins. *Bioessays*, 10:30-35.

MZ Alam, S Devalaraja and M Haldar. (2017) The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology. *Front Immunol.*, 24: 8:33

G Sass, MC Soares, K Yamashita, S Seyfried, WH Zimmermann, T Eschenhagen, E Kaczmarek, T Ritter, HD Volk and G Tiegs. (2003) Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology*, 38: 909-918.

MJ Koury. (2005) Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp Hematol.*, 33:1263-1270.

RJ Henry, SL Jacobs and S Berkman. (1961) Studies on the Determination of Bile Pigments. *Clinical Chemistry*, 7: 231-239

岩見 公和, 藤井 尚人, 鈴鹿 智彦, 金本 龍平. (2002) 糞中ステロイド排泄増加にお

ける大豆レジスタントプロテインの中心的役割と捕捉胆汁酸の構造特異性. 大豆たん白質研究, 5: 58-62

原 匠. (2010) 鉄(Ⅱ)イオンと鉄(Ⅲ)イオンの反応. 化学と教育, 58: 416-417.

T Nakamura, M Saito, Y Shimada, H Fukaya, Y Shida and Y Tokuji. (2011) Induction of aminolevulinic acid synthase gene expression and enhancement of metabolite, protoporphyrin IX, excretion by organic germanium. Eur J Pharmacol., 653: 75-81.

A Yachie. (2007) Heme Oxygenase and its role in defense system; Paradigm shift of anti-inflammatory therapy. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 30: 11-21.

T Nakamura, T Takeda, Y Tokuji. (2014) The Oral Intake of Organic Germanium, Ge-132, Elevates α -Tocopherol Levels in the Plasma and Modulates Hepatic Gene Expression Profiles to Promote Immune Activation in Mice. Int J Vitam Nutr Res., 84: 183-195.

F Ogawa, S Sato. (2006) Roles of oxidative stress in photoaging and the pathogenesis of systemic sclerosis. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 29(6): 349-358.

A Kammeyer and RM Luiten. (2015) Oxidation events and skin aging. Ageing Res Rev., 21: 16-29.

A Godic, B Poljsak, M Adamic and R Dahmane. (2014) The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. Oxid Med Cell Longev., 860479.

M Rinnerthaler, J Bischof, MK Streubel, A Trost and K Richter. (2015) Oxidative stress in aging human skin. Biomolecules, 5: 545-589.

A Parihar, MS Parihar, S Milner and S Bhat. (2008) Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. Burns, 34: 6-17.

江島 博康. (1996) 実験的皮膚欠損に対する有機ゲルマニウム化合物・レパゲルマニウム(Ge-132)外用剤の皮膚修復効果について. MVM., 5 (3): 17-20.

中村 宜司 佐藤 功 秋葉 光雄. (2011) 熱傷治療剤, JP2002-193802.

H Yurimoto, K Nagashima and T Kunihiro. (2003) High precision isotope micro-imaging of materials. *Appl. Surf. Sci.*, 203-204: 793-797.

T Hamasaki, T Matsumoto, N Sakamoto, A Shimahara, S Kato, A Yoshitake, A Utsunomiya, H Yurimoto, EC Gabazza, and T Ohgi. (2013) Synthesis of ¹⁸O-labeled RNA for application to kinetic studies and imaging. *Nucleic Acids Res.*, 41: 126 -135.

H Yamaguchi, Y Shimada, T Takeda, T Nakamura and N Mano. (2015) A Novel Extraction Method Based on a Reversible Chemical Conversion for the LC/MS/MS Analysis of the Stable Organic Germanium Compound Ge-132. *Anal Chem.*, 87: 2042-2047.

WS Snyder Chairman, MJ Cook, ES Nasset, LR Karhausen, G Parry Howells and IH Tipton. (1974) Report of the task group on reference man. International Commission on Radiological Protection publication, 23: 327

M Sugino, H Todo and K Sugibayashi. (2009) Skin Permeation and Transdermal Delivery Systems of Drugs: History to Overcome Barrier Function in the Stratum Corneum. *Yakugaku Zasshi.*129:1453-1458.

JD Bos and MM Meinardi. (2000) The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.*,9:165-169.

T Wada, T Hanyu, K Nozaki, K Kataoka, T Kawatani, T Asahi and N Sawamura. (2018) Antioxidant Activity of Ge-132, a Synthetic Organic Germanium, on Cultured Mammalian Cells. *Biol Pharm Bull.*, 41: 749-753.

T Tezuka, A Higashino, M Akiba. and T Nakamura. Organogermanium (Ge-132) Suppresses Activities of Stress Enzymes Responsible for Active Oxygen Species in Monkey Liver Preparation. *AER.*, 5: 13-23.

M Venza, M Visalli, C Beninati, GV De Gaetano, D Teti and I Venza. (2015) Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. *Oxid Med Cell Longev.*, 481782.

D Crean, EP Cummins, B Bahar, H Mohan, JP McMorro and EP Murphy. (2015) Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. *J Immunol.*, 195: 1436-1448

T Watanabe, S Sekine, I Naguro, Y Sekine and H Ichijo. (2015) Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)-p38 Pathway-dependent Cytoplasmic Translocation of the Orphan Nuclear Receptor NR4A2 Is Required for Oxidative Stress-induced Necrosis. *J Biol Chem.*, 290: 10791-10803.

X Shi, W Li, H Liu, D Yin and J Zhao. The ROS/NF- κ B/NR4A2 pathway is involved in H₂O₂ induced apoptosis of resident cardiac stem cells via autophagy. (2017) *Oncotarget*, 8: 77634-77648.

E Kim, SU Hwang, JD Yoon, EB Jeung, E Lee, DY Kim and SH Hyun. (2017) Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) treatment during in vitro culture protects fertilized porcine embryos against oxidative stress induced apoptosis. *J Reprod.*, 63: 581-590.

D Johar, JC Roth, GH Bay, JN Walker, TK Krocak and M Los. (2004) Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic-like and apoptotic) cell death and cancer. *Rocz Akad Med Bialymst.*, 49: 31-39.

M Mittal, MR Siddiqui, K Tran, SP Reddy and AB Malik. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.*, 20: 1126-1167.

B Frossi, De M Carli, KC Daniel, J Rivera and C Pucillo. (2003) Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway. *Eur J Immunol.*, 33: 2168-2177.

S Srirangan and EH Choy. (2010) The role of interleukin 6 in the pathophysiology of

rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.*, 2:247-256.

DJ Li, H Fu, J Tong, YH Li, LF Qu, P Wang and FM Shen. (2018) Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibits neointimal hyperplasia by suppressing inflammation and oxidative stress. *Redox Biol.*, 15:22-33.

C Rouault, V Pellegrinelli, R Schilch, A Cotillard, C Poitou, J Tordjman, H Sell, K Clément and D Lacasa. (2013) Roles of Chemokine Ligand-2 (CXCL2) and Neutrophils in Influencing Endothelial Cell Function and Inflammation of Human Adipose Tissue. *Endocrinology*, 154: 1069-1079.

P Mukhopadhyay, M Rajesh, H Pan, V Patel, B Mukhopadhyay, S Bátka, B Gao, G Haskó and P Pacher. (2010) Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radic Biol Med.*, 48: 457-467.

EJ Park, J Yi, KH Chung, DY Ryu, J Choi and K Park. (2008) Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.*, 180: 222-229.

石田 名香雄, 木村郁郎. (2001) 有機ゲルマニウムの化学. 東洋医学舎: 141-143.

田口 恵子, 山本 雅之. (2007) 酸化ストレス防御のための生体内センサー Keap1-Nrf2 制御システム. *化学と生物*, 45: 857-862

EH Kobayashi, T Suzuki, R Funayama, T Nagashima, M Hayashi, H Sekine, N Tanaka, T Moriguchi, H Motohashi, K Nakayama and M Yamamoto. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.*, 23: 11624.

伊東 健. (2009) Nrf 2 酸化ストレス応答系による病態制御. *生化学*, 81: 447-455