

## 赤血球酸化ストレスに対するアルドース 還元酵素阻害剤の効果

徳永賢治, 田中恵子, 穴吹知子, 立石謹也, 太田安彦

香川県立医療短期大学臨床検査学科

### Effect of Aldose Reductase Inhibitor on Oxidative Stress in Human Erythrocyte

Kenji Tokunaga, Keiko Tanaka, Tomoko Anabuki  
Kinya Tateishi, Yasuhiko Ohta

*Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences*

#### Abstract

Aldose reductase (AR), an enzyme in the polyol pathway of glucose metabolism, catalyzes the reduction of glucose to sorbitol. In diabetes mellitus, the increased availability of glucose in insulin insensitive tissues such as lens, nerve and retina leads to increased formation of sorbitol through the polyol pathway. The sorbitol accumulation may be contribute to oxidative stress by depleting its cofactor NADPH, which is also required for the regenerating of GSH.

In this study we investigated the role of polyol pathway for oxidative stress in human erythrocytes and the effect of aldose reductase inhibitor (ARI). The erythrocytes incubated in the presence of 30mM glucose, the time course of sorbitol accumulation appeared almost linear over the 3 hr incubation period. Whereas, the sorbitol accumulation was effectively inhibited during incubation with high concentration of glucose by the ARI. Moreover, the treatment with ARI was prevented decrease of GSH in exposure to  $H_2O_2$ .

These results suggested that the abnormal glutathione redox cycle observed in human erythrocytes is induced by high glucose concentration, resulting in an impairment of reduced GSH-dependent  $H_2O_2$  degradation.

**Key words :** アルドース還元酵素 (aldose reductase)  
ポリオール代謝 (polyol pathway)  
酸化ストレス (oxidative stress)  
ソルビトール (sorbitol)

\*連絡先: 〒761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原281-1 香川県立医療短期大学臨床検査学科

\*Corresponding address: Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences,  
281-1 Hara, Mure-cho, Kita-gun, Kagawa, 761-0123, Japan

## I はじめに

生体はたえずいくつかの経路で低濃度の活性酸素を生成している。生成した活性酸素は消去系として抗酸化酵素やグルタチオン (GSH) などで処理し、両者のバランスを保っている。しかし、何らかの原因で活性酸素の生成が消去系よりも優位に立った場合、酸化ストレスを受ける。増加した活性酸素は、種々の病態の発症や進展のメカニズムに関与していることが提唱され、糖尿病合併症についても、その因子の一つとしてポリオール代謝の関連性が指摘されている。高血糖によるポリオール代謝の亢進はソルビトールやフルクトースを産生し、生成したフルクトースから派生するメチルグリオキサルは強力な活性酸素産生能を有している<sup>1)</sup>。また、後期糖化生成物 (advanced glycation end products; AGE) の生成過程やAGEがレセプターに結合する際にも活性酸素が産生される。一方、消去系の酵素であるスーパーオキシドデスムターゼ (Superoxide dismutase; SOD) は糖化反応により活性中心のリジンに糖化が起こり、失活することが報告されている<sup>2), 3)</sup>。これらのことから、我々はポリオール代謝に注目し、糖尿病患者の赤血球に好中球由来の活性酸素を負荷し、赤血球内の活性酸素代謝を調べた結果、健常人に比し過酸化脂質値 (MDA) の増加、膜蛋白の変性を確認した<sup>4)</sup>。

そこで、今回、高血糖状態での酸化ストレスの亢進と消去能に対するアルドース還元酵素 (AR) 阻害剤の効果を調べる目的で健常人の赤血球にグルコースと $\text{H}_2\text{O}_2$ を負荷し、ポリオール代謝と酸化ストレスの関連性について研究した。

## II 方 法

### 1. ポリオール代謝に対するグルコース負荷量の影響

健常成人よりヘパリン採血した全血を生理食塩水で3回洗浄 (3,500rpm, 5分) し、血球に0.9%NaCl-0.1mol/lリン酸緩衝液 (pH7.4) を1ml加え、試料とした。この試料に、グルコース無添加、または30mmol/lを反応直前に添加し、37℃で0, 30, 60, 120および180分間反応させた後、ポリオール代謝産物であるソルビトール値を測定した。フルクトース値については、試料にグルコースを5mmol/lまたは30mmol/l添加し、インキュベーション後、測定した。また、反応系に

AR阻害剤 (エパルレスタット; 小野薬品) を添加後、180分間反応させ、ソルビトール値を測定して、その効果を調べた。

### 2. ポリオール代謝と酸化ストレスの関連性

グルコース負荷後、赤血球中カタラーゼの阻害剤として1mmol/lアジ化ナトリウムを10 $\mu$ l添加し、37℃で10分間インキュベートした後、30mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$ を20 $\mu$ l添加して37℃でインキュベートし、その消去能の指標としてGSH値と過酸化脂質値 (MDA) を測定した。さらにAR阻害剤を反応系に加えて消去能を比較した。

### 3. 赤血球内成分 (代謝産物) の測定

#### 1) ソルビトール値の測定方法

篠原ら<sup>5)</sup>の方法を用いた。すなわち、グルコース負荷後の試料1.0mlに精製水を5.0ml加えて溶血させ、0.293mol/l  $\text{ZnSO}_4$ 溶液1.0mlを添加し、混和した。次いで0.475mol/l NaOHを1.0ml添加後、よく混和して3,500rpm, 5分間遠心した。その上清2.0mlに0.33mol/l トリス-HCl 緩衝液 (pH8.6) 0.5ml, 3.8mmol/l NAD 1.0ml, 0.1mol/l EDTA 0.1mlおよび40U/ml SDH 0.05mlを順次加え、37℃, 30分反応させた後、蛍光 (励起光365nm, 蛍光450nm) を測定した。

#### 2) フルクトース値の測定方法

##### ① グルコース処理

グルコース負荷後の試料1.0mlに、0.6mol/l過塩素酸2.0mlを加え、3,500rpm, 15分間遠心した。上清1mlに0.75mol/l炭酸カリウム溶液0.5mlを添加した試料を作製し、その1.0mlにグルコース処理剤 (GOD 180U/ml, Mutarotase 6U/ml, 100mmol/lリン酸緩衝液, pH7.4溶液) 1.0mlを加え、37℃, 20分間反応させた。

##### ② フルクトース値の測定

グルコース処理後の試料1.0mlに0.75mol/l TEA 緩衝液 (pH7.6) 1.0ml, 反応液 (11.5mmol/l NADP, 81mmol/l ATP, HK/G6P-DH; HK 280U/ml, G6P-DH 140U/ml) 0.02mlを添加、混合して、15分間室温で反応させ、340nmで吸光度 (A1) を測定した。さらに700U/ml PGIを0.02ml添加し、混和後、15分室温で反応させ、340nmで吸光度 (A2) を測定した。A2-A1の吸光度差を求め、検量線よりフルクトース値を求めた。

- 3) 還元型グルタチオン (GSH) 値の測定方法  
比色法に基づくキットGSH-400 (OXIS Health products, Inc.) を用いて測定した。
- 4) 過酸化脂質値 (MDA) の測定方法  
チオバルビツール酸法に基づくキット過酸化脂質—テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

### Ⅲ 結 果

#### 1. ポリオール代謝に対するグルコース負荷の影響

赤血球溶液にグルコースを負荷し、経時的にソルビトール値を測定すると、図1に示すように30 mmol/lの添加では反応時間に比例して直線的にソルビトール値が増加した。一方、無添加の試料ではほとんどソルビトール値の増加は認めなかった。次にポリオール代謝の第2代謝産物であるフルクトース値を測定した。測定にあたり、グルコー

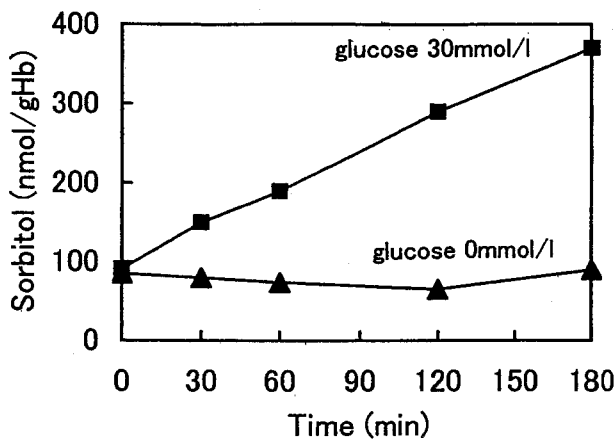


Fig. 1 Time course of sorbitol accumulation

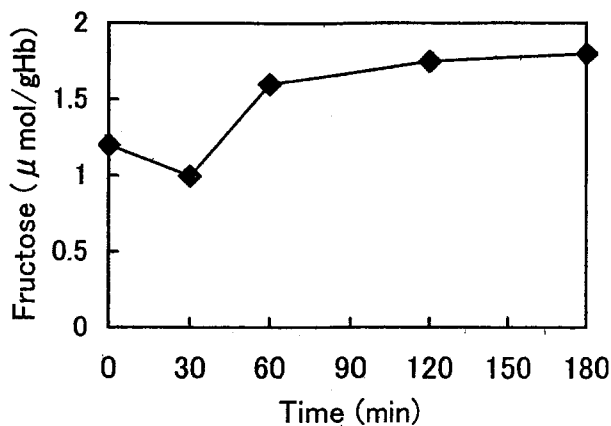


Fig. 2 Time course of fructose accumulation

スの影響を除くためにグルコースオキシダーゼで処理する方法で前処理をして測定した。結果は図2に示すように30分では低下したが、その後は増加を認めた。これらの結果から、赤血球内でもグルコース負荷によりポリオール代謝の亢進が確かめられた。

そこで、反応系にAR阻害剤を添加してその効果を検討すると、図3に示すとおりAR阻害剤10 μmol/lの添加でソルビトール値の上昇が抑制された。

#### 2. ポリオール代謝と酸化ストレスの関連性

亢進したポリオール代謝と酸化ストレスの関係を調べるために、グルコースを負荷して、経時的にGSH値と過酸化脂質値 (MDA) を測定した。しかし、180分間の反応では両者に変化を認めなかった。そこでグルコース負荷後、さらにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加し、その消去能を検討した (図4)。グルコース30mmol/lの負荷の系では120分の反応で

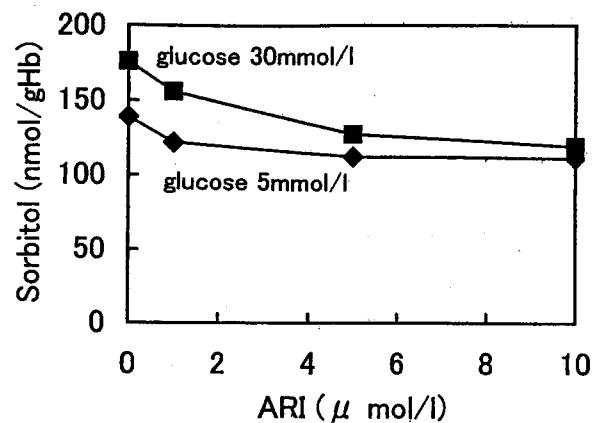


Fig. 3 Effect of ARI on sorbitol accumulation

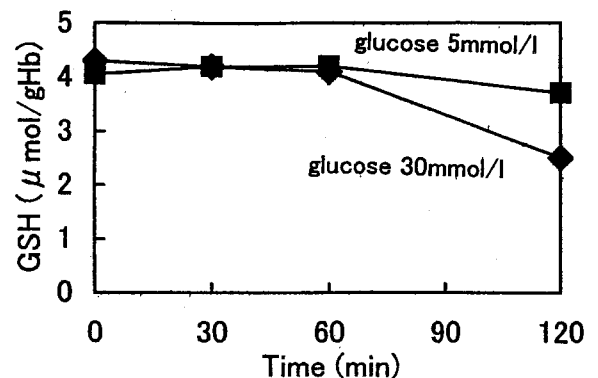


Fig. 4 Time course of GSH content during incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

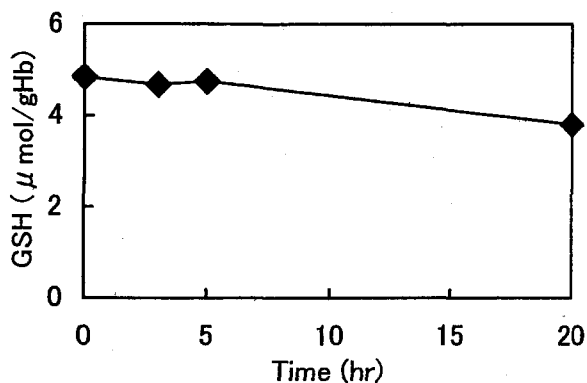


Fig. 5 Effect of ARI on time course of GSH content during incubation with  $H_2O_2$

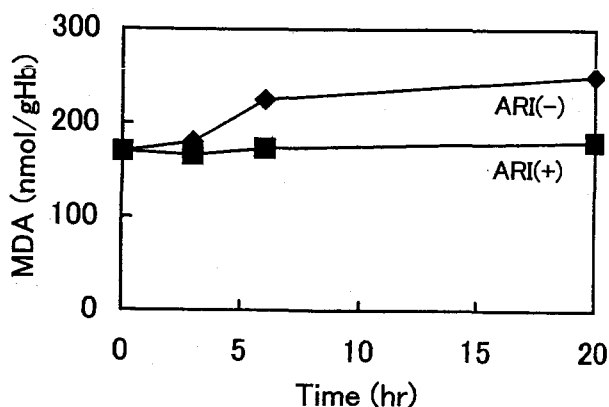


Fig. 6 Effect of ARI on time course of MDA content during incubation with  $H_2O_2$

GSH値は明かに低下した。次にグルコース負荷時にAR阻害剤を加えて、ポリオール代謝を抑制した場合の $H_2O_2$ 処理能を調べた(図5)。AR阻害剤添加によりGSH値は5時間まで変化せず、20時間でわずかに低下した。過酸化脂質値(MDA)は図6に示すとおり、非添加系と比較して、その上昇が抑制された。

#### IV 考 察

糖尿病における持続的な高血糖はポリオール代謝を亢進させ、糖尿病性合併症の発症に関与していることが示唆されているが、ポリオール代謝と酸化ストレスとの関連性は十分に研究されていない。

最近、Nishikawaら<sup>6)</sup>は、高グルコース環境下での大動脈内皮細胞はミトコンドリア電子伝達系の異常により、活性酸素の産生が増加し、この系に電子伝達系複合体II阻害剤や酸化的リン酸化の脱共役剤によって活性酸素の増加を防止することを報告して

いる。また、糖尿病動物における神経障害の発症、進展防止にポリオール代謝系の酵素であるARの阻害剤が有効であることが報告されている<sup>7)</sup>。

今回、ミトコンドリアを有さず、エネルギー代謝を解糖系に依存している赤血球を用いて、グルコース負荷に対するポリオール代謝と酸化ストレスの関連性を検討した。さらに、この反応系にAR阻害剤を加えて活性酸素消去系に対する効果について調べた。

まず、グルコース負荷によるポリオール代謝への影響は、経時的にソルビトール、フルクトース値が増加し、高血糖によるポリオール代謝の亢進が確かめられた。この結果は、Hamadaら<sup>8)</sup>の糖尿病患者赤血球中のソルビトール、フルクトース値は健常人よりも有意に高値を示したという報告と一致している。

この系にAR阻害剤を添加するとソルビトール値の上昇は抑制された。Kikkawaら<sup>9)</sup>はAR阻害剤を投与した糖尿病ラットの赤血球のソルビトール含量が、坐骨神経のソルビトール量と相関していることを報告している。これらの結果から、赤血球以外の組織でも高血糖によるポリオール代謝の亢進は、AR阻害剤で抑制されると推測される。

次にポリオール代謝と酸化ストレスの関係を調べるために、グルコースを負荷し、ポリオール代謝亢進状態でのGSH値と酸化ストレスの程度を示す過酸化脂質値(MDA)を測定した。両者の値は経時的に変化しなかった。これは、赤血球内では一定の速度でメトHbとスーパーオキシド( $O_2^-$ )が産生され常に酸化ストレスに曝されているが、 $O_2^-$ はSODにより $H_2O_2$ に分解され、さらにGSH系で処理されている。したがってポリオール代謝の亢進にもかかわらず、GSH値および過酸化脂質値(MDA)が変化しなかったのは、この処理機構が十分に働いていると考えられた。

そこで、グルコース負荷後、さらに $H_2O_2$ を反応系に加えて検討した。その結果、GSH値は低下した。これは活性酸素処理系のGSHサイクルにおいて、GSHの産生はNADPHからNADPへの変換を伴うが、ポリオール代謝の亢進によりNADPHの低下となり、GSH値が減少したと考えられた。次に、AR阻害剤の効果を調べた。すなわちポリオール代謝を抑制した場合の $H_2O_2$ 処理について検討した。その結果、GSH値の減少は阻止され、過酸化脂質値(MDA)は増加が抑制された。

これらの結果から、ポリオール代謝の亢進は活性

酸素の産生増加および消去能低下の両面から酸化ストレスの亢進と密接な関連性を有すると考えられた。

## V 結 語

ポリオール代謝と酸化ストレスの関連性を調べる目的で、ヒト赤血球溶液にグルコースを負荷した高血糖状態ではソルビトール値およびフルクトースの値が上昇し、ポリオール代謝の亢進を確認した。この系にAR阻害剤を加えると、ソルビトールの値の上昇を抑制した。

さらに、 $H_2O_2$ の添加による酸化ストレスについても、AR阻害剤の添加はGSH値の低下と過酸化脂質値(MDA)の上昇を阻止した。これらの結果から、ポリオール代謝が酸化ストレスに関連していることが示唆された。

## 謝 辞

AR阻害剤(エパルレスタット)を供与頂いた小野薬品に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Phillips S A, Thornalley P J (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 212: 101-105.
- 2) Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N (1987) Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase in diabetes and close association with

- the enzyme activity. *Biochem Biophys Acta* 924: 292-296.
- 3) Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N (1987) Glycation and inactivation of Cu-Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem* 262: 16969-16972.
- 4) 徳永賢治, 菅野和久, 村瀬光春, 佐伯修一, 武内望 (1996) 好中球由来活性酸素による糖尿病患者の赤血球膜過酸化反応について. *臨床化学* 25: 8-13.
- 5) Shinohara R, Ohta Y, Yamauchi M, Ishiguro I (1998) Improved fluorometric enzymatic sorbitol assay in human blood. *Clin Chim Acta* 273: 171-184.
- 6) Nishikawa T, Edelstein D, Yamagishi S, Matumura T, Kaneda Y, Yorek M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 404: 787-790.
- 7) Nagaraji R H, Prabhakara M (1994) Suppression of pentosidine formation in galactosemic rat lens by an inhibitor of aldose reductase. *Diabetes* 43: 580-586.
- 8) Hamada Y, Nakamura J, Naruse K, Komori T, Kato K, Kasuya Y, Nagai R, Horiuchi S, Hotta N (2000) Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of N-(carboxymethyl) lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care* 23: 1539-1544.
- 9) Kikkawa R, Hatanaka J, Yasuda H, Kobayashi N, Shigeta Y, Terashima H, Morimura T, Tuboshima M (1983) Effect of ONO-2235, a new aldose reductase inhibitor, on peripheral nerve disorders in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 24: 290-292.

受付日 2002年12月2日