

天然物由来物質における抗炎症作用機序の解明  
とラットモデルを用いたその活用に関する研究

2018 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(帯広畜産大学)

米澤 豊

天然物由来物質における抗炎症作用機  
序の解明とラットモデルを用いたその  
活用に関する研究

米澤 豊

## 目次

序論	1
第1章 マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた lipopolysaccharide 刺激試験における hydroxytyrosol の作用の解析	3
緒言	4
材料及び方法	6
結果	10
考察	12
小括	15
図表	16
第2章 細胞内シグナル因子の inhibitor を用いた hydroxytyrosol の作用機序の解析	23
緒言	24
材料及び方法	26
結果	28
考察	30
小括	33
図表	34
第3章 ラットカラゲニン肢浮腫モデルを用いた hydroxytyrosol の抗炎症作用の評価	39
緒言	40

材料及び方法	41
結果	47
考察	49
小括	51
図表	52
第4章 Hydroxytyrosol の経口投与によるアスピリン誘発胃潰瘍への影響	59
緒言	60
材料及び方法	62
結果	65
考察	66
小括	68
図表	69
総括	74
謝辞	77
引用文献	78

略号一覧 (アルファベット順)

AP-1	activator protein 1, アクチベータータンパク質 1
COX-2	cyclooxygenase-2, シクロオキシゲナーゼ-2
ERK1/2	p44/42 mitogen-activated protein kinase, 細胞外シグナル調節キナーゼ
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
HT	hydroxytyrosol, ヒドロキシチロゾール
IL	interleukin, インターロイキン
iNOS	inducible NO synthase, 誘導型 NO 合成酵素
JNK	c-jun N-terminal kinase, c-Jun N 末端キナーゼ
LDA	low-dose aspirin, 低用量アスピリン
LDH	lactate dehydrogenase, 乳酸脱水素酵素
LPS	lipopolysaccharide, リポ多糖
MAPK	mitogen-activated protein kinase, 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ
MC	methylcellulose, メチルセルロース
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B, 核内因子 $\kappa$ B
NO	nitric oxide, 一酸化窒素
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 非ステロイド性抗炎症薬
PG	prostaglandin, プロスタグランジン
PVDF	polyvinylidene difluoride, ポリフッ化ビニリデン
RRT-PCR	real-time RT-PCR, リアルタイム RT-PCR
TBS	tris-buffered saline, トリス緩衝生理食塩水
TBS-T	TBS with Tween 20
TLR	toll-like receptor, Toll 様受容体
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$ , 潰瘍壊死因子- $\alpha$

## 序論

炎症は感染や外傷などで組織が損傷したときに体内で生じる生体防御反応である。具体的には、物理的的刺激（機械的外傷，熱，放射線，光線，異物）や化学的的刺激（強酸，強アルカリ），病原微生物の感染，自己抗体などの免疫抗原が原因となり，局所的な発赤，腫脹，疼痛，発熱といった4主徴が引き起こされる。炎症反応による痛みは生体にとっての危険信号を知らせる必要不可欠なものの1つではあるが，過剰に発現した場合，炎症は慢性化あるいは遷延し，生体組織の損傷や機能低下など人体にとって悪影響を呈することとなる。本状態を慢性炎症と呼ぶ (1)。

近年，がんや生活習慣病などの慢性疾患の病態形成に，慢性炎症が深く関わっていることが注目されている (2)。慢性炎症では，酸化ストレスなどの刺激を受けた臓器の細胞から放出される自己由来の成分が，マクロファージに発現する Toll 様受容体 (TLR) (3) により認識され，サイトカイン，プロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub>，一酸化窒素 (NO) をはじめとした様々な炎症性メディエーターが産生された結果，恒常的な炎症反応が誘導される (2)。このように，マクロファージと慢性炎症との関連が注目されており，マクロファージによる様々なメディエーターの産生の予防に役立つ新規化合物の探索が進められている。

天然物由来物質である hydroxytyrosol (HT) はオリーブの葉や実に豊富に含まれる低分子フェノール化合物 (Fig. 1) であり，*in vitro* 実験において抗炎症 (4-7)，抗酸化 (8, 9)，抗ウイルス (10) 及び抗菌 (11) 作用を示すことが明らかとなっている。著者が所属する研究室が以前に行った研究において，lipopolysaccharide

(LPS) で刺激したマウスの腹腔マクロファージに HT を作用させたところ、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 遺伝子発現の低下, インターロイキン-10 (IL-10) 遺伝子発現の上昇, NO 放出の低下等, 抗炎症性作用に関する変化が確認された。一方で, 炎症性反応に関与すると考えられる nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), 腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) については HT による発現抑制作用は認められなかった。これらの結果から, HT が示した抗炎症作用は NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2 を介したシグナル伝達経路では無く, 別のシグナル経路を介して生じた可能性が考えられ, HT の作用メカニズムを特定するために更なる検討が必要と考えられた (12)。

そこで, 本研究では HT の抗炎症作用に関して, その作用機序を明らかにするとともに, 動物モデルにおける抗炎症作用を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では, マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて, LPS 誘発性炎症における HT の抗炎症作用を評価した。第 2 章では, 細胞内シグナル因子の inhibitor を用いて, HT の作用メカニズムを解析した。第 3 章では, カラゲニン誘発肢浮腫モデルを用いて, HT の抗炎症作用を検討した。加えて第 4 章では, HT の経口投与によるアスピリン誘発胃潰瘍への作用について検討した。

## 第 1 章

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた lipopolysaccharide 刺激試験に  
おける hydroxytyrosol の作用の解析



## 諸言

炎症は、病原体侵入，化学物質刺激，新陳代謝異常による組織細胞の異常変化等により，生体が内外から有害な刺激を受けたときに生じる防御反応である。炎症の機能は，細胞傷害の初期原因を排除し，炎症プロセスによって損傷した壊死細胞及び組織を除去し，組織修復を開始することである。しかし，過剰な炎症は，関節炎，喘息，多発性硬化症及びアテローム性動脈硬化症を含む慢性炎症を引き起こす (1)。

発熱や発赤などの炎症応答の開始に重要な役割を果たすのは，「自然免疫」と呼ばれる生体による異物の特異的認識機構である。マクロファージは自然免疫に関わる多機能性の白血球で，生体に侵入してきた異物を認識・排除するセンサーとして働く。マクロファージの活性化は，炎症反応において重要な役割を果たす。

グラム陰性細菌の細胞壁の成分であるリポ多糖 (LPS) は，マクロファージにより認識され，炎症反応を引き起こす。マクロファージによる LPS の認識は，細胞表面又は内部の TLR (3) への LPS の結合によって引き起こされる (13)。LPS が結合した TLR は，細胞内シグナル伝達経路を介して転写因子を活性化し，NO，PGE<sub>2</sub> などの生理活性物質や，炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ ，IL-1 $\beta$  等の炎症性メディエーターの発現誘導を促す (14, 15)。

NO は，NOS によって L-アルギニンから合成される。iNOS は，炎症誘発刺激を受けた際に発現する。一度発現すると，iNOS は大量の NO を生成し，過剰に生成した NO は，単独あるいはスーパーオキシドと反応して DNA 障害性を有するペルオキシ亜硝酸を産生し，細胞や組織に障害を与え，炎症症状を増悪する。

(16, 17)。

オリーブ油中に含まれる小さなフェノール分子である HT は他の天然物由来物質と比較して強力な抗酸化活性を発揮し、抗炎症、抗血栓、抗腫瘍及び抗菌作用を持つことが知られる (4-12, 18)。

武田ら (12) は以前の研究において、HT は、LPS で処理したマウス腹腔マクロファージにおける iNOS 遺伝子発現及び NO 産生を抑制することを明らかにした。さらに、HT は NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路阻害とは独立したメカニズムを介して NO 産生を抑制する可能性があることを報告した。一方、Zhang ら (19) は、HT はヒト単球 THP-1 細胞において LPS の存在下で NF- $\kappa$ B の核への移行を抑制したことを報告している。これらの 2 つの研究では、用いた細胞系は異なっていたが、用いた HT の濃度は同様であった (80  $\mu$ M 及び 100  $\mu$ M)。同様の HT 濃度で異なる結果が認められた原因として、100  $\mu$ M 程度の HT は NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を介して起こる炎症反応を常に抑制するわけではないこと、または、マクロファージ系の様々な細胞系は、LPS 刺激に対して異なる応答を示すことが考えられた。

LPS は NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路とは異なる経路も誘導することが報告されている。特に、p44/42 mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) は、単球及びマクロファージにおいて LPS によって強く誘導されることから (20, 21)、HT はこのシグナル伝達経路を抑制することによって抗炎症効果を発揮する可能性が考えられる。

本研究では、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて、LPS 誘発性炎症における HT の抗炎症作用及びそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 材料及び方法

### 被験物質等

HT は東京化成工業株式会社 (東京, 日本) の純度 >98.0%の製品を用いた。HT を蒸留水 (株式会社大塚製薬工場, 東京, 日本) を用いて 100 mg/mL の濃度になるよう溶解し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

LPS は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) の製品を用いた。LPS を生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場) を用いて 1 mg/mL の濃度になるよう溶解し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

HT 及び LPS は, 10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (和光純薬工業株式会社) (以下, 培養液) で段階希釈し実験に用いた。

### 実験方法

#### 1. HT の RAW 264.7 に対する細胞傷害性の検証

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 (DS Pharma Biomedical, Co., Ltd., 大阪, 日本) は培養液を用いて細胞培養用 10 cm シャーレで培養した。培養条件は  $37^{\circ}\text{C}$ , 5.0%  $\text{CO}_2$  濃度とし,  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養した。継代の細胞濃度は  $0.5\text{--}1.0^5/\text{well}$  とした。培養液の交換は細胞の継代と同時点で行い, 頻度は 3~4 日に 1 回とした。実験には最大で継代 12 代目までの細胞を使用した。

継代細胞が十分な数になった時点で細胞を回収し, 細胞培養用平底 24-well プレートに  $2\times 10^6/\text{well}$  の細胞を播種して 2 時間培養した後, 接着しなかった細胞を除いた。その後, HT をそれぞれ 0–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で含有させた培養液に交換し,

CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、培養上清を回収し、生化学自動分析装置 (LABOSPECT006, 日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本) を用いて、上清中に含まれる lactate dehydrogenase (LDH) を測定した。

## 2. Real-time RT-PCR (RRT-PCR) による遺伝子発現の解析

細胞培養用平底 12-well プレートに  $2 \times 10^6$ /well の RAW264.7 細胞を加えて 2 時間培養した後、接着しなかった細胞を除いた。その後、1) 培養液のみ、2) LPS 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3) LPS 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + HT (1.56–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をそれぞれ添加した well を設け CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

培養 3 及び 24 時間後に細胞を回収し、RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を使用し、キットの取扱説明書に従って細胞の total RNA を抽出した。cDNA 合成には、QuantiTect<sup>™</sup> Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を使用し、1 サンプルあたり 1  $\mu\text{g}$  の total RNA を用いて、以下の条件で逆転写した (42 °C 15 分間, 95 °C 3 分間)。Real-time RT-PCR (RRT-PCR) は、cDNA 及び QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR (QIAGEN) 及び AriaMx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。用いたプライマー (QuantiTect<sup>™</sup> Primer Assays, QIAGEN) を Table 1 に示した。PCR 反応は 95 °C で 5 分間反応させた後、95 °C で 10 秒間、60 °C で 30 秒間の 40 サイクルで行った。閾値サイクル (Ct) は、蛍光強度が閾値を超えて上昇するのに必要なサイクル数として定義した。得られた Ct 値を基に内在性コントロールである glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する各群間の相対的な遺伝子発現量を算出した。結果は、MIQE ガイドライン (22) に従って、遺伝子発現の相対値として表した。

### 3. 培養上清中の NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ の濃度及び細胞中の COX-2 濃度測定

2 と同様の実験を行い、培養 24 時間後に細胞上清を回収した。細胞上清中の NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の濃度を、それぞれ Nitric Oxide (total), detection kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), Prostaglandin E2 ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK), Mouse TNF alpha SimpleStep ELISA<sup>®</sup> Kit (Abcam) 及び IL-1 beta Mouse SimpleStep ELISA<sup>®</sup> Kit (Abcam) を用いて測定した。さらに、細胞中の COX-2 濃度を Mouse COX2 SimpleStep ELISA<sup>®</sup> Kit (Abcam) で測定した。PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び COX-2 に関しては ELISA 法で測定し、NO に関しては Griess 法 (23) で測定した。

### 4. Western blotting による細胞内シグナル因子の発現解析

2 と同様の実験を行い、細胞を 15 分後に回収してリン酸化 NF- $\kappa$ B (pNF- $\kappa$ B) 及びリン酸化 ERK1/2 (pERK1/2) の発現を、また 6 時間後に回収して iNOS の発現を、それぞれ Western Blotting 法により解析した。

Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後に、Trans-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。転写後のメンブレンは、0.3%スキムミルク含有 Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) (和光純薬工業株式会社) により 4 °C で 24 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、ウサギ由来一次抗体：抗 NF- $\kappa$ B, 抗 pNF- $\kappa$ B, 抗 ERK1/2, 抗 pERK1/2 及び抗 iNOS (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を 0.3%スキムミルク含有 TBS-T で 1,000 倍希釈し添加した。室温で 1 時間反応後、TBS-T で

3 回洗浄した。二次抗体には Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology) を 0.3%スキムミルク含有 TBS-T で 1,000 倍希釈して用い、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄後、SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてメンブレンに結合した抗原抗体複合体を検出し、LAS-3000 (富士フイルム株式会社, 東京, 日本) で分析した。内部コントロールとして、anti- $\beta$ -Actin HRP-DirecT (Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd., 愛知, 日本) を用いて  $\beta$ -アクチンを検出した。さらに、得られたバンドの濃度を Quantity One version 4.5 (Bio-Rad) を用いて測定し、目的タンパク質の濃度を  $\beta$ -アクチンの濃度で割ることにより相対的なタンパク質発現量を算出した。

#### 統計処理

結果は、平均  $\pm$  標準誤差 (S.E.) として示した。有意差検定には、ウィリアムズ多重比較試験を用いた。有意水準は両側 5%とした。統計解析には統計ソフトウェアである SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 及び EXSUS (株式会社 CAC クロア, 大阪, 日本) を使用した。

## 結果

### 1. RAW264.7 細胞における HT の細胞傷害性

RAW264.7 細胞における HT (0–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の細胞傷害性を評価した。いずれの濃度においても、細胞傷害性の指標である LDH の増加は認められなかった。しかし、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において LDH はわずかに減少した (Fig. 2)。原因は不明であったが、何らかの影響があると考え、その後の実験は 0–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で実施した。

### 2. RAW264.7 細胞における炎症関連遺伝子の発現

次に、LPS (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で刺激した RAW264.7 細胞における HT の効果を評価した。以前の研究 (12) の実験条件に加え、より早期での遺伝子発現変動を調べるために、RAW264.7 細胞を LPS (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及び HT (0–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で 3 時間及び 24 時間処理した。

3 時間処理において、LPS (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 単独では、コントロールと比較して、iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び IL-6 の遺伝子発現が有意に増加した。NF- $\kappa$ B 及び IL-10 遺伝子発現も増加したが、統計学的に有意ではなかった。HT は、LPS が誘発した TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の遺伝子発現増加を、1.56–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で有意に減少させた (Fig. 3)。

24 時間処理において、LPS (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 単独では、コントロールと比較して、iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$  及び IL-6 の遺伝子発現が有意に増加した。対照的に、TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 及び IL-10 遺伝子発現は LPS によって変動しなかった。HT は、LPS が誘

発した iNOS, COX-2, 及び IL-1 $\beta$  の遺伝子発現増加を, それぞれ 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.56–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 及び 1.56–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で有意に減少させた (Fig. 4)。

### 3. RAW264.7 細胞の培養上清中の NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ の濃度及び細胞中の COX-2 濃度

LPS (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 存在下で培養した RAW264.7 細胞より回収した細胞上清では, NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の産生が有意に増加していた。LPS による NO, PGE<sub>2</sub> 及び IL-1 $\beta$  の産生は, それぞれ 3.13–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1.56–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 3.13–12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の HT で濃度依存的に抑制された。対照的に, LPS による TNF- $\alpha$  の産生は, HT によって抑制されなかった。細胞中の COX-2 濃度は, LPS により有意に増加した。LPS による COX-2 産生は HT により抑制されたが, 統計学的に有意ではなかった (Fig. 5)。

### 4. RAW264.7 細胞における NF- $\kappa$ B 関連タンパク質の発現

Western blotting 法を用いて, LPS 刺激下の RAW264.7 細胞を HT 存在または非存在下で 15 分間培養した後の pNF- $\kappa$ B 及び pERK1/2 の発現, ならびに 6 時間培養した細胞における iNOS の発現を評価した。LPS (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の添加により, pNF- $\kappa$ B, pERK1/2 及び iNOS の発現はいずれも増加した。LPS が誘発した pNF- $\kappa$ B 及び iNOS 発現の上昇は, 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の HT の添加により抑制された。対照的に, pERK1/2 の上昇は, HT の存在によって抑制されなかった (Fig. 6)。



## 考察

本研究では、*in vitro* 炎症モデルとして多用されているマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用い、HT の LPS による炎症性サイトカイン及びメディエーターの誘導に対する作用について検証した。

HT は RAW264.7 細胞における LPS 誘発性の NF- $\kappa$ B 活性化, TNF- $\alpha$  遺伝子発現, IL-1 $\beta$  産生, COX-2-PGE<sub>2</sub> 及び iNOS-NO 系を抑制した。TLR4 は、LPS によって活性化され、NF- $\kappa$ B シグナル伝達及び炎症性サイトカイン産生を誘発し、自然免疫系を活性化する (24, 25)。IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$  は、感染、傷害及び免疫刺激に対する急性期応答として迅速に翻訳され、放出される (26–28)。iNOS 及び COX-2 は、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  及び他のサイトカインによって誘導されるため (29–31)、炎症応答プロセスの後半に放出される。本研究では、HT は初期段階で TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の発現を抑制した (Fig. 3)。したがって、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の抑制が、COX-2-PGE<sub>2</sub> 及び iNOS-NO 系を二次的に抑制した可能性が考えられた。

Western blotting 解析では、HT が 12.5  $\mu$ g/mL の濃度で LPS 刺激による pNF- $\kappa$ B の発現を抑制したが、6.25  $\mu$ g/mL 未満の濃度では抑制しなかった。Zhang ら (19) は THP-1 細胞における NF- $\kappa$ B の核への移行は、100  $\mu$ M の HT によって抑制されたが、50  $\mu$ M の HT では抑制されなかったと報告している。一方、今回の実験において、低濃度の HT は NF- $\kappa$ B シグナル伝達を抑制しなかったが、TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  の遺伝子発現及び iNOS-NO 系を抑制した。これらの結果は、HT は低濃度では NF- $\kappa$ B シグナルに依存しない経路で LPS 誘発性の炎症応答を抑制することを示している。

pERK1/2 は LPS によって強く誘導されることが報告されている (20, 21)。今回の実験において HT は、pNF- $\kappa$ B 及び iNOS に対する抑制効果とは対照的に、いずれの濃度でも pERK1/2 の発現を抑制しなかった。Chan ら (32) は、RAW264.7 細胞における LPS 誘発 iNOS 産生が、ERK1/2 経路に加えて、c-Jun N 末端キナーゼ (c-jun N-terminal kinase : JNK) 及び p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (p38) 経路によって調節されると報告しており、HT の作用機序を担うシグナル伝達経路を明らかにするためには更なる研究が必要と考えられた。

HT が iNOS 遺伝子発現を減少させ、NO 産生を抑制するという結果は、マウス腹腔マクロファージを用いた武田らの結果 (12) と一致するものであった。しかし、武田らの研究では、COX-2 遺伝子の発現は 3.13–12.5  $\mu$ g/mL の HT によって抑制されなかった。マウス腹腔マクロファージを用いた過去の別の研究においても、武田らの実験結果と同様に、HT は LPS 誘発性の COX-2 タンパク質発現増加を抑制しなかった (33)。興味深いことに、Maiuri ら (5) 及び Zhang ら (19) は、HT は LPS 誘発性の COX-2 遺伝子発現と PGE<sub>2</sub> 産生の両方の誘導を抑制することを報告している。これら 2 つの研究では、マウスマクロファージ様株化細胞 J774 及びヒト単球 THP-1 細胞が用いられている。マウス腹腔マクロファージでは、培養細胞株とは異なり、LPS などの免疫賦活剤による活性化過程において未知の生物学的因子の影響を受ける可能性が考えられている (33)。*in vivo* では多くの異なるタイプのマクロファージが存在するので、単一細胞型から得られた実験結果は *in vivo* における現象を完全に反映しないことに注意することが重要であると考えられた。

本研究では、HT は LPS 誘発性の炎症応答を抑制することを示し、抗炎症薬と

しての開発の可能性が見出された。既存の抗炎症薬である非ステロイド性抗炎症薬 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) の副作用には、胃や小腸に対する粘膜損傷 (34) や腎障害 (35) が知られている。HT はげっ歯類を用いた安全性試験で毒性を示さず (36), すでに食品や栄養補助食品で広く市販されている (37)。HT の抗炎症効果を完全に理解するためにはさらなる研究が必要であるが、HT が動物モデルにおいて有害な炎症応答を効果的に抑制するかどうかを試験する価値があると考えられる。

## 小括

有害な刺激を受けたときに生じる防御反応である炎症の制御は、病態の転帰と患者の QOL の両面で重要である。しかしながら、NSAIDs に代表されるように多くの抗炎症性の治療法には副作用があり、新しい安全な治療が求められている。

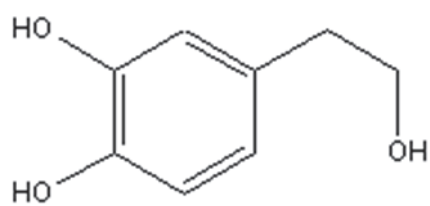
過去の研究では、LPS で刺激したマウス腹腔マクロファージにおいて、HT は 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で iNOS 遺伝子発現及び NO 産生を抑制した。一方で、NF- $\kappa$ B 遺伝子発現は変化しなかった。本研究では、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて、種々の濃度の HT の抗炎症効果を評価した。HT は 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度では NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を抑制することで、TNF- $\alpha$  遺伝子発現、IL-1 $\beta$  産生、COX-2-PGE<sub>2</sub> 及び iNOS-NO 系を抑制し、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  より低い濃度では別のシグナル伝達経路に関与することで炎症反応を調節する可能性が考えられた。一方、HT は LPS 誘発性の pERK1/2 発現を抑制しなかった。HT の抗炎症効果を完全に理解するためにはさらなる研究が必要であるが、本研究では、HT が LPS 刺激 RAW264.7 細胞に対して抗炎症効果を有することが明らかとなった。

HT は既に栄養補助食品として利用可能であり、毒性の影響は報告されていない。従って、HT は新規抗炎症薬になりうると考えられた。新規抗炎症薬としての開発を見据え、HT の作用メカニズムを明らかにすべく、細胞内シグナル因子の inhibitor を用いた検討を進めることにした。

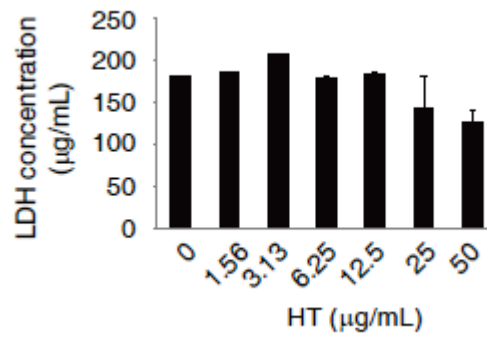
図表

**Table 1. Primers sets (QuantiTect™ Primer Assays, QIAGEN) used in real-time RT-PCR**

Gene name	Assay name
iNOS (nitric oxide synthase 2, inducible)	Mm_LOC673161_1_SG
COX-2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	Mm_Ptgs2_1_SG
TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha)	Mm_Tnf_1_SG
NF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells)	Mm_Nfkb1_1_SG
IL-1 $\beta$ (interleukin 1 beta)	Mm_Il1b_2_SG
IL-6 (interleukin 6)	Mm_Il6_1_SG
IL-10 (interleukin 10)	Mm_Il10_1_SG
Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	Mm_Gapdh_3_SG



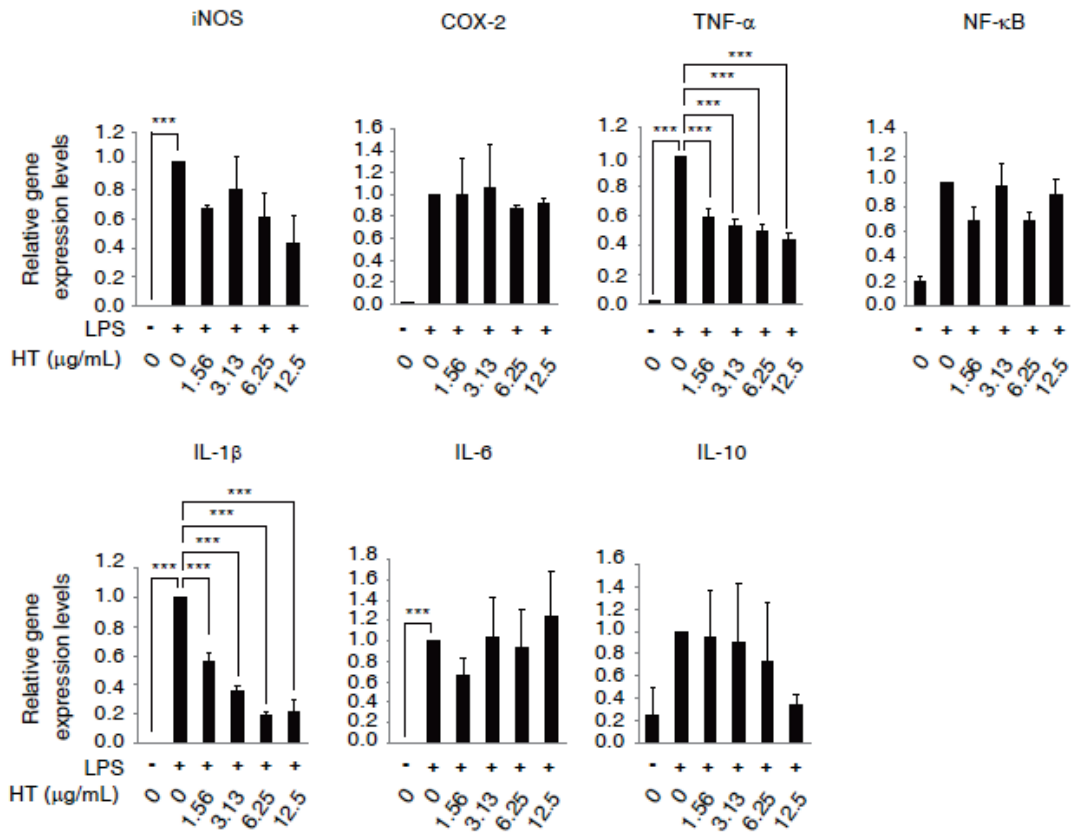
**Fig. 1.** Chemical structure of hydroxytyrosol



**Fig. 2.** Analysis of the cytotoxicity of HT against RAW264.7 cells cultured with HT (0–50 µg/mL) for 24 h.

Cytotoxicity was evaluated as the LDH concentration in the culture supernatant.

Mean ± S.E. (n = 3).

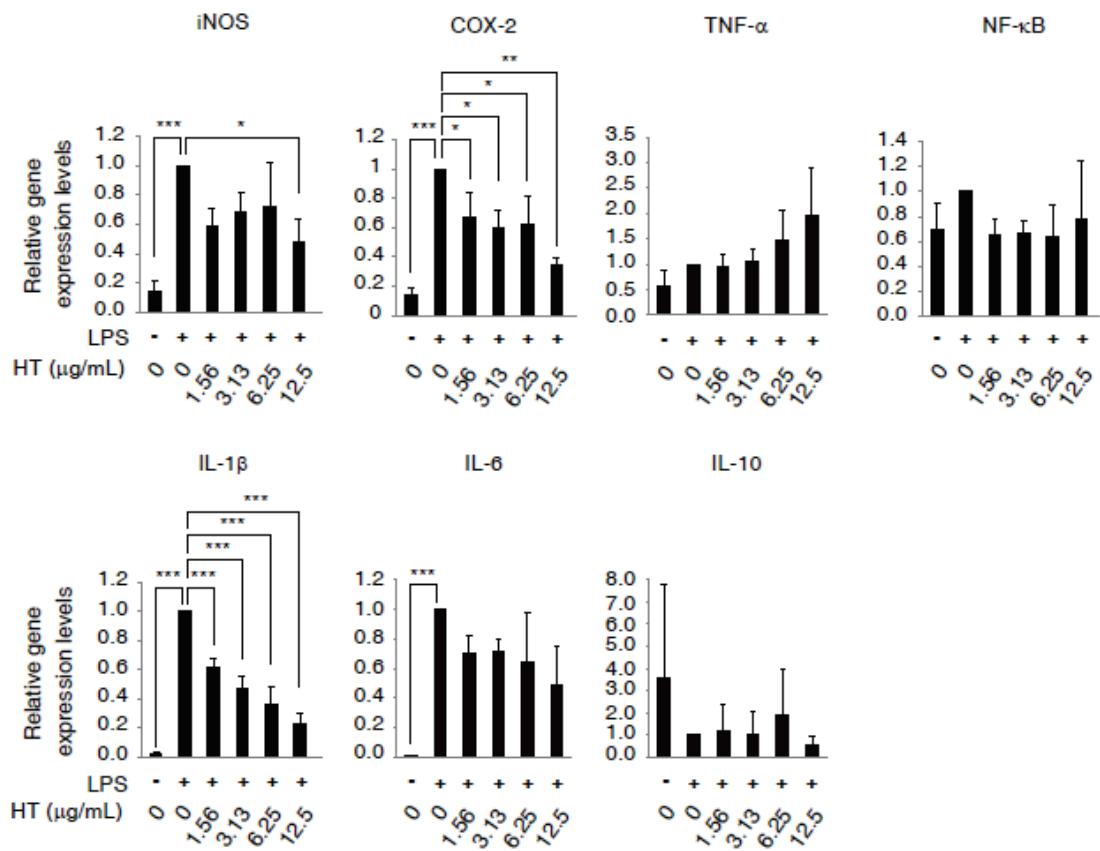


**Fig. 3.** Expression of the iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 genes in cultures of RAW264.7 cells treated with LPS (0.25  $\mu$ g/mL) and HT (0–12.5  $\mu$ g/mL) for 3 h.

Relative mRNA expression levels of iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were evaluated by real-time RT-PCR.

Mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $P < 0.001$  (Williams' multiple comparison test) ( $n = 4$ ).



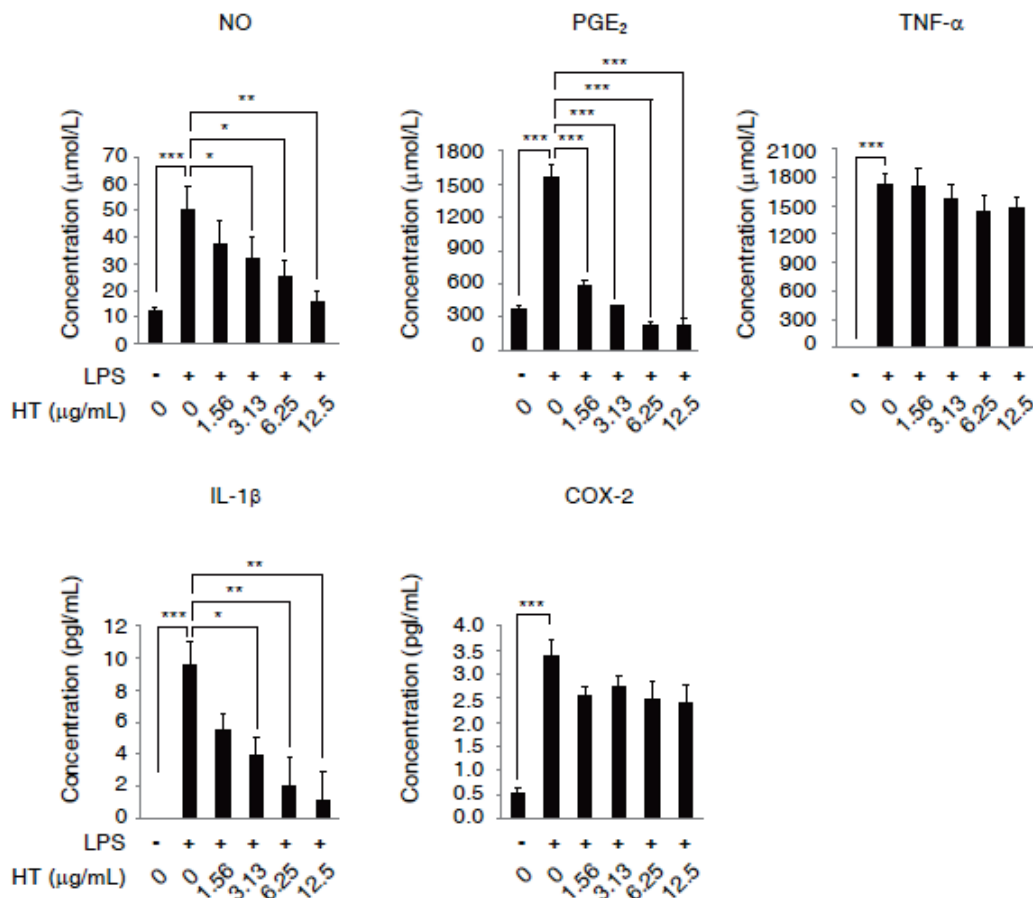


**Fig. 4.** Expression of the iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 genes in cultures of RAW264.7 cells treated with LPS (0.25  $\mu$ g/mL) and HT (0–12.5  $\mu$ g/mL) for 24 h.

Relative mRNA expression levels of iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were evaluated by real-time RT-PCR.

Mean  $\pm$  S.E. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Williams' multiple comparison test)

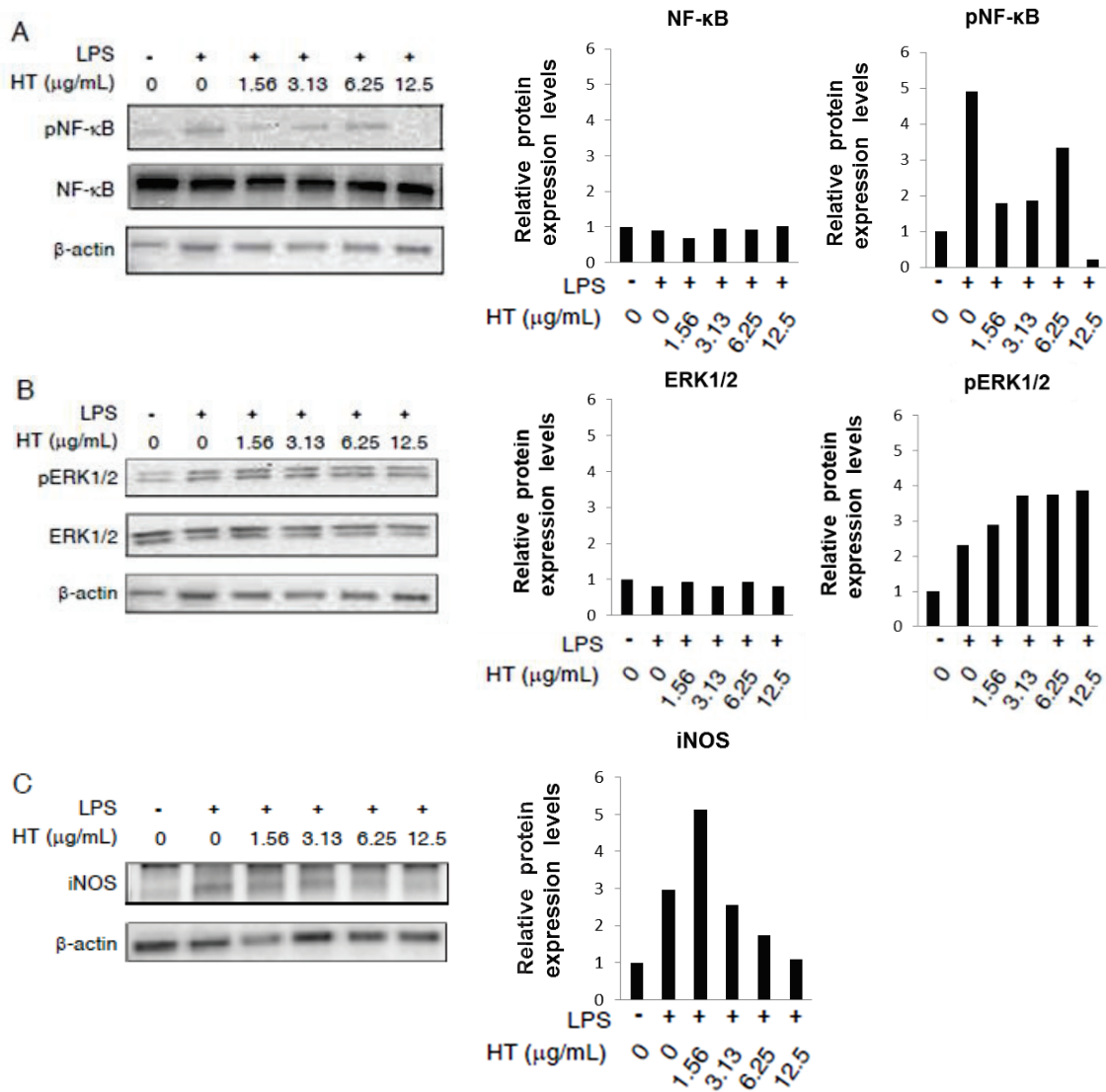
(n = 4).



**Fig. 5.** Concentration of NO, PGE<sub>2</sub>, TNF-α and IL-1β in the culture supernatant and COX-2 in the cell extract of RAW264.7 cells cultured with LPS (0.25 μg/mL) and HT (0–12.5 μg/mL) for 24 h.

NO concentration was measured by Griess method. Concentration of PGE<sub>2</sub>, TNF-α, IL-1β and COX-2 was measured by ELISA.

Mean ± S.E. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Williams' multiple comparison test) (n = 3).



**Fig. 6.** Expression of pNF-κB (A), pERK1/2 (B), and iNOS (C) in RAW264.7 cells cultured with LPS (0.25 μg/mL) and HT (0–12.5 μg/mL).

Western blotting analysis was used to determine the levels of these proteins in cells treated for 15 min (A, B) or 6 h (C). Representative results of duplicate experiments are shown. The graph shows the relative protein expression levels measured by Quantity One Ver 4.5.

## 第2章

細胞内シグナル因子の inhibitor を用いた hydroxytyrosol の作用機序の解析

## 緒言

古来よりフランス等の地中海沿岸に住む人々は比較的高脂肪食を摂取するにも関わらず、長寿で、心臓病や特定のがんなど、生活習慣病とされる病気の発症率が劇的に低いことが知られていた (38–41)。アメリカの生理学者 Ancel Keys は、この事実が「食事のスタイルの違い」との仮説の元で研究を行い、オリーブオイルを始めとする Mediterranean food に動脈硬化を防ぐ抗酸化作用があることを明らかにした (42)。その後の研究において、オリーブオイル中に見られる小さなフェノール分子である HT は強力な抗酸化活性を発揮し、抗炎症、抗血栓、抗腫瘍及び抗菌作用等を持つことが明らかとなった (4–12, 18)。

第 1 章において、HT が、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 において LPS 刺激で誘導される NO 及び PGE<sub>2</sub> 産生を抑制することを明らかにした。さらに、HT は 12.5 µg/mL 以上の濃度では NF-κB シグナル伝達経路を抑制することで、iNOS, COX-2 及び IL-1β 遺伝子の発現を抑制し、12.5 µg/mL より低い濃度では別のシグナル伝達経路に関与することで炎症反応を調節する可能性を見出した。

HT が低濃度で作用しているシグナル伝達経路として、種々のサイトカインや酸化ストレス等により活性化される分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase: MAPK) (43, 44) が関与する経路も考えられる。MAPK は、ERK1/2, p38, JNK の 3 つに大別され、それぞれの上流域において特異的なカスケードを形成している (45)。ERK1/2 は増殖因子受容体などの下流で細胞の増殖や分化のシグナル伝達に関与し、一方 JNK と p38 はストレス刺激や炎

症性サイトカインなどで活性化されアポトーシスシグナル伝達に関与している。

HT の抗炎症作用の機序の解明は、副作用の少ない新規抗炎症薬の開発に繋がる可能性があると考え、細胞内シグナル因子の inhibitor 用いた実験を行い、HT の抗炎症作用機序における MAPK の関与について検証した。

## 材料及び方法

### 被験物質等

HT 及び LPS の由来及び調製方法は第 1 章と同様である。

細胞内シグナル因子の inhibitor として、和光純薬工業株式会社の U0126 (ERK1/2 経路阻害) (46), SB203580 (p38 阻害) (47) 及び SP600125 (JNK 阻害) (48) を用いた。Celastrol (NF- $\kappa$ B 経路阻害) (49) は東京化成工業株式会社の製品を用いた。各 inhibitor を dimethylsulfoxide (同仁化学研究所, 大阪, 日本) を用いて 1 mg/mL の濃度になるよう溶解し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 実験方法

#### 1. 細胞上清中の NO, PGE<sub>2</sub> 及び TNF- $\alpha$ の濃度測定

第 1 章と同様の方法で RAW264.7 細胞を培養した。至適細胞数に増殖後, 抑制作用が生じる濃度である 10  $\mu\text{M}$  の U0126, SB203580, SP600125 及び celastrol (46-49) をそれぞれ加えてさらに 2 時間培養した。その後, 1) 培養液のみ, 2) LPS 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , 3) LPS 0.25  $\mu\text{g/mL}$ +HT (1.56–12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) をそれぞれ添加した well を設け CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養 24 時間後に細胞上清を回収した。細胞上清中の NO, PGE<sub>2</sub> 及び TNF- $\alpha$  濃度の測定を, Nitric Oxide (total) detection kit (Enzo Life Sciences), Prostaglandin E2 ELISA Kit (Abcam) 及び Mouse TNF alpha SimpleStep ELISA<sup>®</sup> Kit (Abcam) を用いて実施した。

#### 2. Western blotting による細胞内シグナル因子の発現解析

1 と同様の実験を行い, Western blotting 解析のために, 15 分後に細胞を回収し

て、第1章と同様の方法で pNF- $\kappa$ B 及び pERK1/2 の発現を解析した。一次抗体には抗 NF- $\kappa$ B, 抗 pNF- $\kappa$ B, 抗 ERK1/2, 抗 pERK1/2, 抗 p38, 抗 pp38, 抗 JNK 及び抗 pJNK (Cell Signaling Technology) を 0.3%スキムミルク含有 TBS-T で 1,000 倍希釈して用いた。

#### *統計処理*

結果は、平均  $\pm$  標準誤差 (S.E.) として示した。有意差検定については、ウィリアムズの多重比較試験を用いた。有意水準は両側 5%とした。統計解析には SAS 及び EXSUS を使用した。



## 結果

### 1. RAW264.7 細胞の培養液中の NO, TNF- $\alpha$ , 及び PGE<sub>2</sub> 濃度

NO に関して, U0126 (ERK1/2 経路阻害), SB203580 (p38 阻害) 及び SP600125 (JNK 阻害) で処理した RAW264.7 細胞においては, LPS 誘発性の NO 産生は inhibitor 処理しなかった細胞 (Fig. 5) と同程度に認められた。また, これら LPS 誘発性の NO の産生は HT によって濃度依存的に抑制された。Celastrol (NF- $\kappa$ B 経路阻害) で処理した細胞については, NO の産生は認められなかった (Fig. 7)。

TNF- $\alpha$  に関して, U0126, SB203580 及び SP600125 で処理した RAW264.7 細胞においては, LPS 誘発性の TNF- $\alpha$  産生は inhibitor 処理しなかった細胞 (Fig. 5) と比較して 1/5~1/10 程度に抑制された。なお, LPS 誘発性の TNF- $\alpha$  産生は U0126 で処理した細胞においては, HT (1.56~3.13  $\mu$ g/mL) によって濃度依存的に抑制された。SB203580 及び SP600125 で処理した細胞においては HT 添加によって, やや低下する傾向が認められたが, 有意な変化ではなかった。Celastrol で処理した細胞においては, TNF- $\alpha$  の産生は認められなかった (Fig. 8)。

PGE<sub>2</sub> に関して, U0126, SB203580 及び SP600125 で処理した RAW264.7 細胞においては, LPS 誘発性の PGE<sub>2</sub> 産生は inhibitor 処理しなかった細胞 (Fig. 5) と比較して 1/5 程度に抑制された。なお, これら LPS 誘発性の PGE<sub>2</sub> 産生は, HT によって濃度依存的に抑制された。Celastrol で処理した細胞においては, LPS 誘発性の PGE<sub>2</sub> 産生の変化は認められなかった (Fig. 9)。

### 2. RAW264.7 細胞における NF- $\kappa$ B 関連タンパク質の発現

Western blotting 法を用いて、各 inhibitor で処理した RAW264.7 細胞について、HT 存在または非存在下での pNF- $\kappa$ B 及び pERK1/2 のタンパク質発現を評価した。Celastrol 処理細胞では、LPS (0.25  $\mu$ g/mL) の添加によっても、pNF- $\kappa$ B の発現は全く認められなかった (Fig. 10A)。U0126 処理細胞では、inhibitor 処理しなかった細胞 (Fig. 6B) と比較して、pERK1/2 の発現が不明瞭であった。また、pERK1/2 の発現は、HT の存在によって抑制されなかった (Fig. 10B)。p38 及び JNK に関しては LPS 刺激によるリン酸化が確認できなかったため、inhibitor を用いた実験は実施しなかった (データ非表示)。

## 考察

HTが作用するシグナル伝達経路を明らかにするため、NF- $\kappa$ B及びERK1/2, p38, JNKの3つMAPKに対して、inhibitorを用いて各経路を阻害した際のHTの作用の変化を評価した。

NF- $\kappa$ B阻害薬であるcelastrolはRAW264.7細胞におけるNOの産生を完全に抑制したが、ERK1/2阻害薬であるU0126, p38阻害薬であるSB203580, JNK阻害薬であるSP600125については、NO産生の抑制作用は認められなかった。LPS誘発性のNO産生と各MAPKの関係はこれまでに複数報告されている。Chanら(32)は、ERK1/2阻害薬であるPD-98059及びp38阻害薬であるSB-203580をRAW264.7細胞に処理後にLPS刺激した結果、PD-98059処理細胞ではNOの産生が抑制されたが、SB203580処理細胞では抑制は認められなかったと報告している。一方で、Bhatら(50)はグリア細胞を用いた実験を行い、ERK1/2, p38いずれの経路を阻害した場合でも、LPS誘発性のNOは抑制されたと報告している。また、Chenら(51)はLPS誘発性のiNOSの上昇はp38経路によって制御されるが、ERK1/2経路は関与しないと報告している。JNK経路に関しても、LPS誘発性のNO産生に促進的に働くという報告もある一方で(52)、JNK経路を阻害してもNO産生に変化はないという報告もある(32)。今回の実験では、NF- $\kappa$ B阻害薬であるcelastrol以外はNO産生に直接影響を与えなかった。本結果より、各MAPKはLPS(0.25  $\mu$ g/mL)刺激条件下のRAW264.7細胞においては単独ではNOの産生を促進することではなく、NF- $\kappa$ Bの活性化がNOの産生に主体的に関わっている可能性が示唆された。本結果は、各MAPKがNF- $\kappa$ Bの活性化に補足的に働くという研究報告

(53) と一致するものである。また, p38 及び JNK 経路では activator protein 1 (AP-1) の活性化を介して iNOS の産生を増加させるが, AP-1 の活性は LPS 刺激によって起こらないという報告もある (54, 55)。この報告は, 今回 Western blotting において LPS 刺激による p38 及び JNK のリン酸化を捉えられなかった事実を裏付けるものと考えられる。

HT は各 MAPK の阻害の有無に関わらず, 濃度依存的に NO 産生を抑制したことから, HT の作用点は ERK1/2, p38, JNK 経路上には無く, かつ NF- $\kappa$ B 経路よりも下流にある可能性が高いと考えられた。第 1 章の結果を踏まえると, HT は 12.5  $\mu$ g/mL の濃度では NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を抑制することで, iNOS, COX-2 及び IL-1 $\beta$  遺伝子の発現を抑制し, 12.5  $\mu$ g/mL より低い濃度では NF- $\kappa$ B 経路よりも下流にあるシグナル経路に作用して, 上記の遺伝子群を抑制していると考えられる。

TNF- $\alpha$  に関して, U0126 (ERK1/2 経路阻害), SB203580 (p38 阻害) 及び SP600125 (JNK 阻害) で処理した細胞では, LPS 誘発性の TNF- $\alpha$  産生は inhibitor 処理しなかった細胞と比較して 1/5~1/10 程度に抑制された。本結果は, 同様に inhibitor を用いた過去の報告とも一致しており, ERK1/2 及び JNK 経路が TNF 遺伝子転写に, また p38 経路が転写後の調節過程に関与していると考えられた (56)。Celastrol で処理した細胞については, TNF- $\alpha$  の産生は全く認められなかったことから, NO と同様に NF- $\kappa$ B の活性化が TNF- $\alpha$  の産生に主体的に関わっていることが示唆された。なお, これらの TNF- $\alpha$  産生について, SB203580 及び SP600125 で処理した細胞については HT 処理によって低下傾向を示し, U0126 で処理した細胞については, HT によって濃度依存的に有意に抑制された。第 1 章において,

HT は TNF- $\alpha$  産生に対し抑制的な作用を示したことから、今回の結果は前回の結果と一致するものであった。TNF- $\alpha$  産生抑制に関して、HT は U0126, SB203580 及び SP600125 と相乗効果を示したと捉えると、HT の作用点は ERK1/2, p38, JNK 経路上以外にあると考えられた。なお、Western blotting において、U0126 処理条件下で HT 処理による pERK1/2 の抑制は認められておらず、HT の作用点が ERK1/2 経路上に無いという仮説を裏付ける結果であった。

PGE<sub>2</sub> に関して、U0126 (ERK1/2 経路障害), SB203580 (p38 障害) 及び SP600125 (JNK 障害) で処理した細胞では、LPS 誘発性の PGE<sub>2</sub> 産生は inhibitor 処理しなかった細胞と比較して 1/5 程度に抑制された。TNF- $\alpha$  同様に PGE<sub>2</sub> が MAPK により制御されていることは多数報告されている (57-59)。また、NO と TNF- $\alpha$  同様に celestrol で処理した細胞については、LPS 誘発性の PGE<sub>2</sub> 産生増加は認められなかった。これらの結果から、LPS 誘発性の炎症には NF- $\kappa$ B 経路が主体で関わっていることが確認された。なお、TNF- $\alpha$  と異なり、これらの PGE<sub>2</sub> 産生は、U0126, SB203580 及び SP600125 処理細胞のいずれにおいても、HT によって濃度依存的に抑制された。

第 2 章における結果により、HT の作用点は ERK1/2, p38, JNK 経路上には無く、かつ NF- $\kappa$ B 経路よりも下流にある可能性が高いことが明らかとなった (Fig. 11)。また、HT は、NO, TNF- $\alpha$  及び PGE<sub>2</sub> 産生に対して抑制的に働くことが確かめられた。第 1 章及び第 2 章の結果から、HT は NSAIDs や COX-2 阻害剤等の既存の抗炎症薬とは異なるメカニズムで抗炎症作用を示すことが明らかとなった。次章では、動物モデルを用いて HT の抗炎症作用を評価した。

## 小括

第 1 章において、HT が、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 において LPS 刺激で誘導される NO 及び PGE<sub>2</sub> 産生を抑制することを明らかにした。

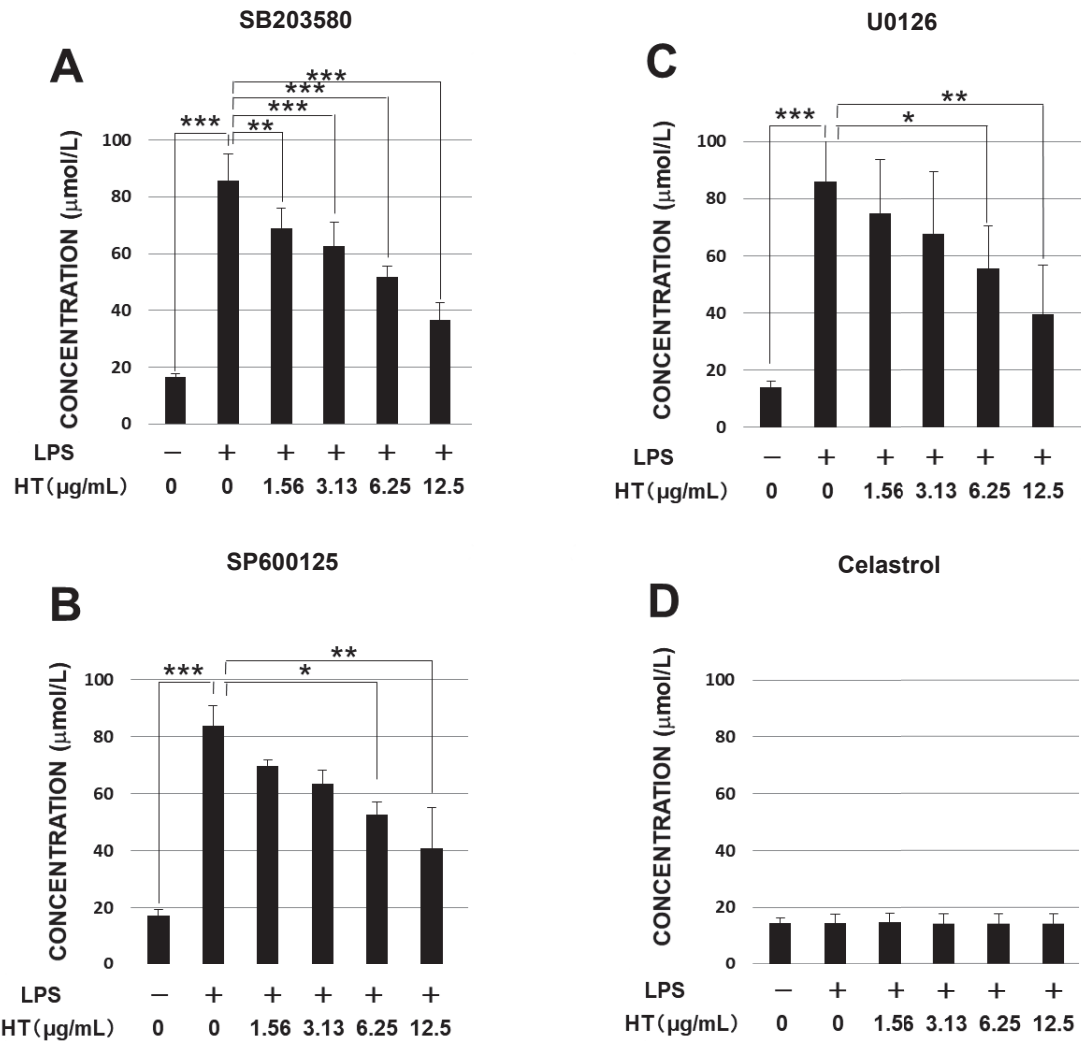
HT が作用するシグナル伝達経路を明らかにするため、NF-κB 及び ERK1/2, p38, JNK の 3 つ MAPK に対して、inhibitor を用いて各経路を阻害した際の HT の作用の変化を評価した。

結果、MAPK の阻害により TNF-α 及び PGE<sub>2</sub> の産生は低下し、HT の処理により産生量はさらに低下した。また、NO の産生量は MAPK の阻害により変化しなかったが、HT の処理により低下した。本結果より、HT の作用点は ERK1/2, p38, JNK 経路上には無く、かつ NF-κB 経路よりも下流にある可能性が高いことが明らかとなった。第 1 章の結果を踏まえると、HT は 12.5 μg/mL の濃度では NF-κB シグナル伝達経路を抑制することで、iNOS, COX-2 及び IL-1β 遺伝子の発現を抑制し、12.5 μg/mL より低い濃度では NF-κB 経路よりも下流にあるシグナル経路に作用していると考えられた。

また、HT は、NO 及び PGE<sub>2</sub> 産生に対しては抑制的に働くが、TNF-α に対しては作用を示さない点が確かめられた。これは既存の抗炎症薬である NSAIDs や COX-2 阻害剤には見られない作用であった。

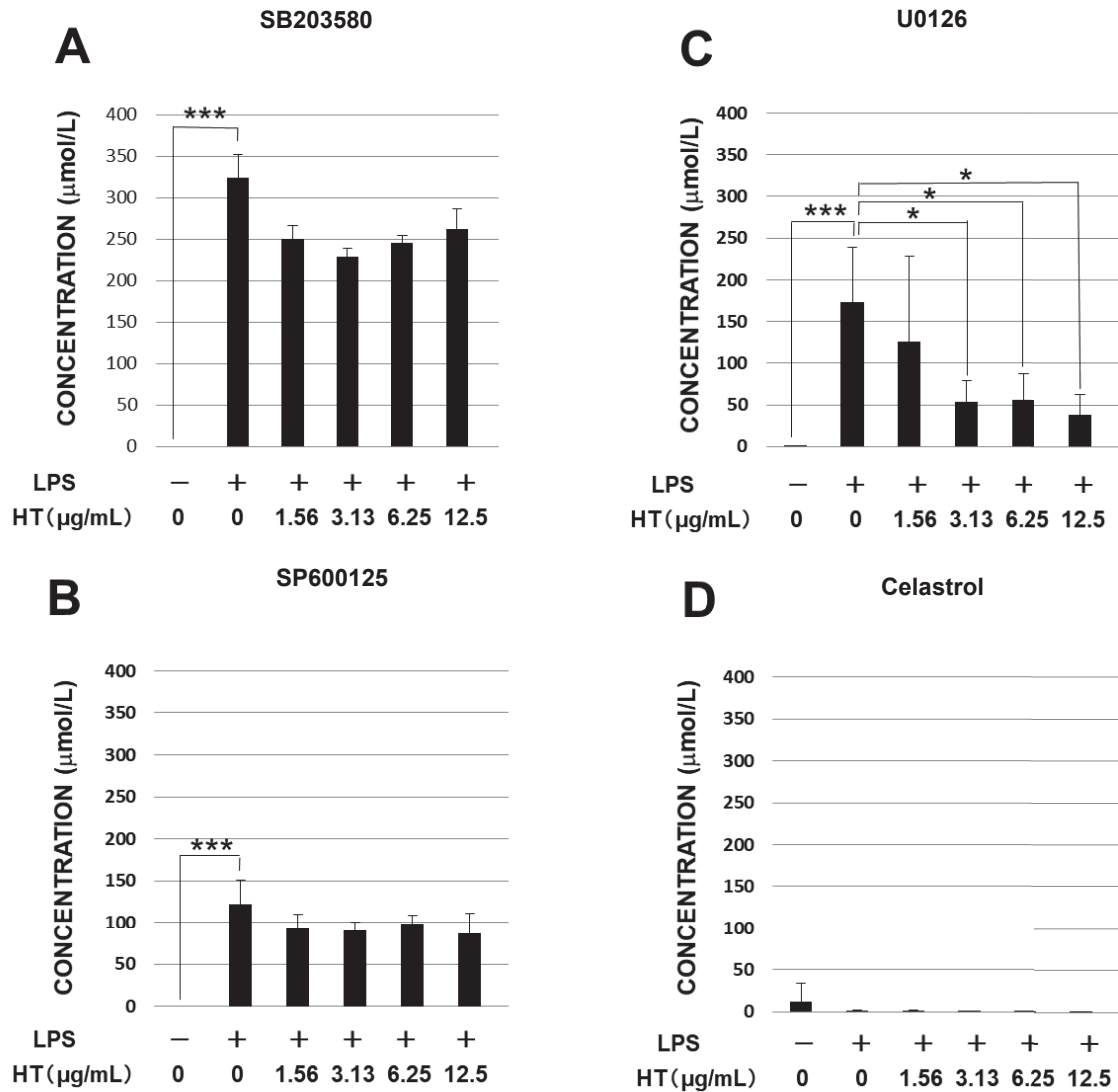
第 1 章及び第 2 章の結果から、HT は既存の抗炎症薬とは異なるメカニズムで抗炎症作用を示すことが明らかとなった。次に、動物モデルを用いて HT の抗炎症作用を評価した。

图表



**Fig. 7. NO production by RAW264.7 cells cultured with LPS (0.25 µg/mL) and HT (0–12.5 µg/mL) for 24 h following the treatment with cellular signaling pathway inhibitors.**

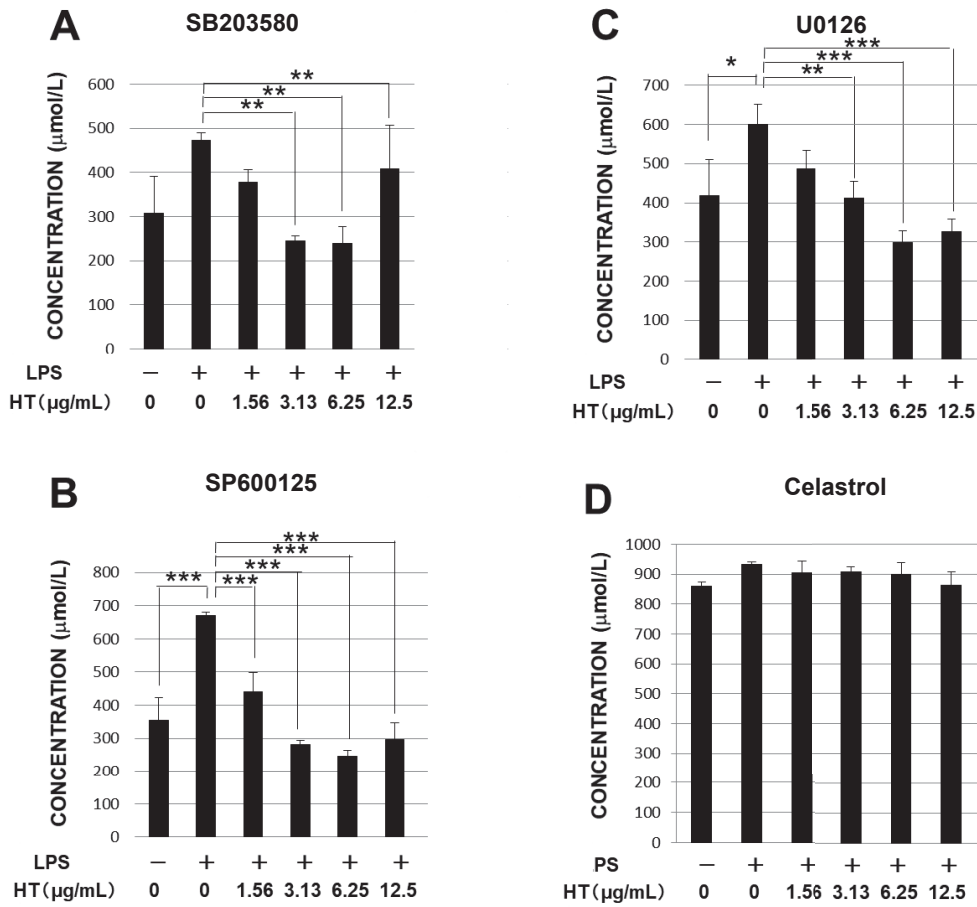
Cells were treated with (A) 10 µM SB203580, (B) 10 µM SP600125, (C) 10 µM U0126, or (D) 10 µM celastrol for 2 h before the LPS stimulation. NO concentration in the culture supernatant of RAW264.7 cells was measured by Griess method. Mean ± S.E. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Williams' multiple comparison test) (n = 3).



**Fig. 8. TNF- $\alpha$  production by RAW264.7 cells cultured with LPS (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ) and HT (0–12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h following the treatment with cellular signaling pathway inhibitors.**

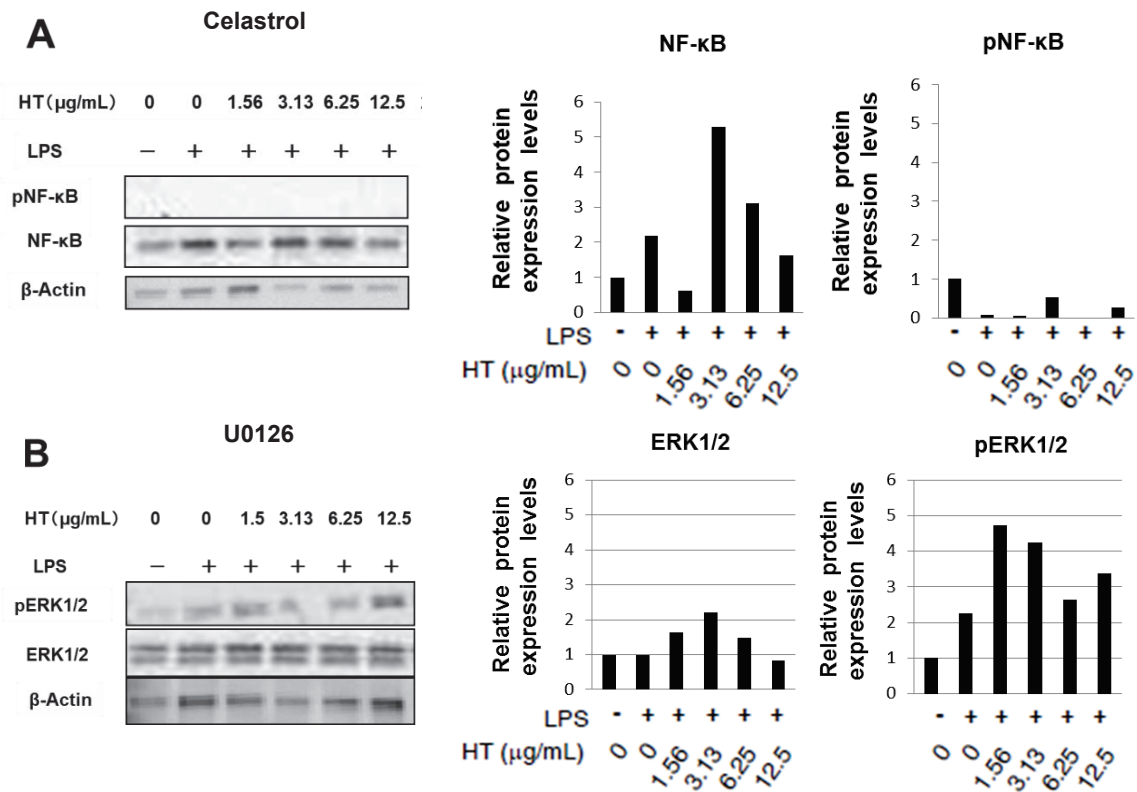
Cells were treated with (A) 10  $\mu\text{M}$  SB203580, (B) 10  $\mu\text{M}$  SP600125, (C) 10  $\mu\text{M}$  U0126, or (D) 10  $\mu\text{M}$  celestrol for 2 h before the LPS stimulation. TNF- $\alpha$  concentration in the culture supernatant of RAW264.7 cells was measured by ELISA. Mean  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Williams' multiple comparison test) ( $n = 3$ ).





**Fig. 9. PGE<sub>2</sub> production by RAW264.7 cells cultured with LPS (0.25 μg/mL) and HT (0–12.5 μg/mL) for 24 h following the treatment with cellular signaling pathway inhibitors.**

Cells were treated with (A) 10 μM SB203580, (B) 10 μM SP600125, (C) 10 μM U0126, or (D) 10 μM celastrol for 2 h before the LPS stimulation. PGE<sub>2</sub> concentration in the culture supernatant of RAW264.7 cells was measured by ELISA. Mean ± S.E. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Williams' multiple comparison test) (n = 3).



**Fig. 10.** Expression of pNF- $\kappa\text{B}$  (A), pERK1/2 (B) in RAW264.7 cells stimulated with LPS (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ) and HT (0–12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) following the treatment with cellular signaling pathway inhibitors.

Western blotting analysis was used to determine the levels of these proteins in the cells treated for 15 min. Representative results of duplicate experiments are shown. Cells were treated with (A) 10  $\mu\text{M}$  celastrol or (B) 10  $\mu\text{M}$  U0126 for 2 h before the LPS stimulation. The graph shows the relative protein expression levels measured by Quantity One Ver 4.5.

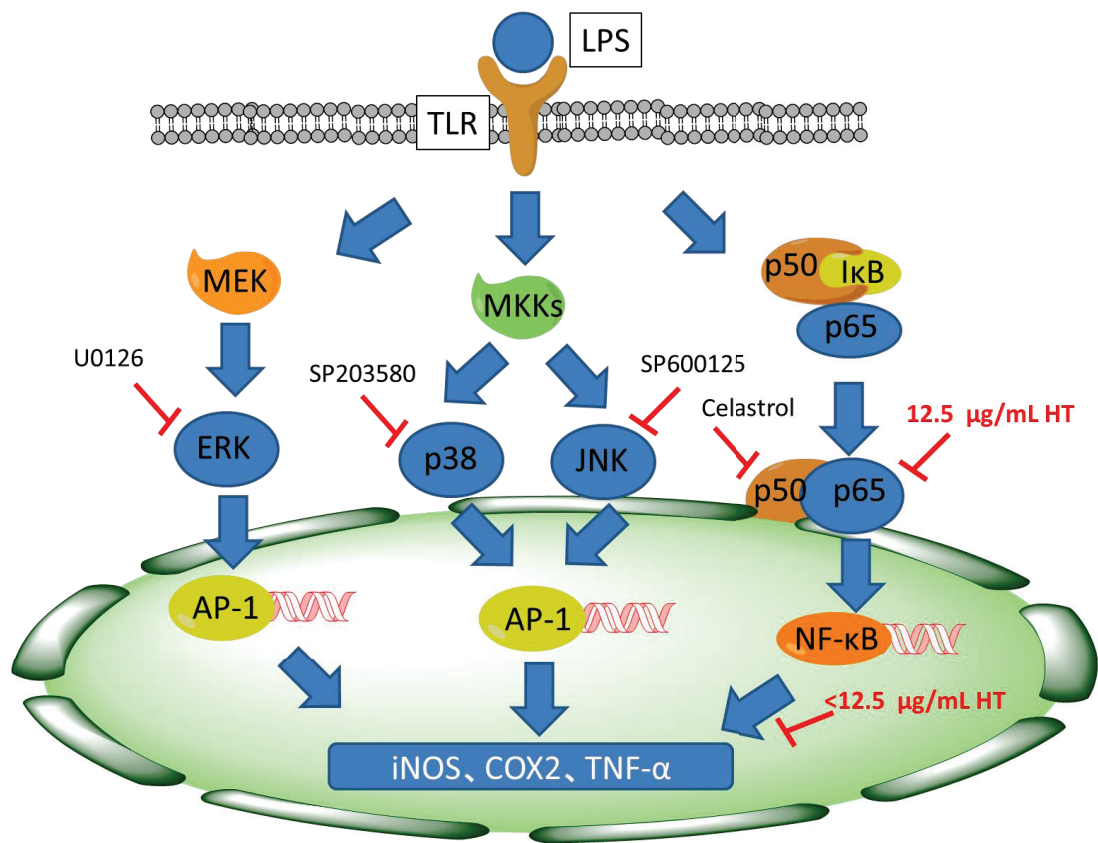


Fig. 11. Possible mechanism of anti-inflammatory activity of HT

### 第3章

ラットカラゲニン肢浮腫モデルを用いた hydroxytyrosol の抗炎症作用の評価

## 緒言

現在、関節リウマチ及び変形性関節症など慢性炎症性疼痛に対して既存の NSAIDs 及び COX-2 選択的阻害剤と同等以上の抗炎症・鎮痛効果を示し、消化管障害等の副作用リスクが軽減された新規消炎鎮痛薬の開発が望まれている (60)。我々は *in vitro* 研究において、HT が、LPS 誘発性の iNOS, COX-2 及び IL-1 $\beta$  遺伝子の発現を抑制し、結果として NO 及び PGE<sub>2</sub> の産生量を減少させることを見出した。本研究では、HT の新規消炎鎮痛薬としての可能性を見据え、*in vivo* における抗炎症活性を評価することを目的とした。

カラゲニン誘発ラット肢浮腫モデルは、抗炎症薬の効果を評価するのに適していると考えられている (61, 62)。カラゲニン誘発ラット肢浮腫モデルにおける腫脹は急性滲出による腫脹である (63)。カラゲニンは PG, ロイコトリエン, ヒスタミン, セロトニン, ブラジキニン及び TNF- $\alpha$  を含む炎症誘発性メディエーターの放出を刺激する。これらの炎症誘発性メディエーターにより、局所で微小循環系の拡張と充血、血管透過性の亢進が起こり、続いて白血球の血管外での遊走が起こる。血管透過性亢進は血漿蛋白を伴って水が血管の外へ漏れ出すことによって起こる。これにより投与後 5 時間以内に進行性の浮腫を誘発する (61)。

本研究では、カラゲニン誘発ラット肢浮腫モデルを用いて HT の抗炎症活性を評価した。加えて、代表的な NSAIDs のインドメタシン (64) 及び選択的 COX-2 阻害剤であるセレコキシブ (65) などの既存治療薬と有効性を比較した。

## 材料及び方法

### 試験物質の由来

HT の由来は第 1 章と同様である。インドメタシン、カラゲニン及び媒体として用いた 0.5 w/v% メチルセルロース溶液 (0.5 % MC) は, 和光純薬工業株式会社から, セレコキシブは東京化成工業株式会社からそれぞれ購入した。

### 試験物質の調製

#### (1) HT の調製

100 mg/mL の溶液を蒸留水で 2 倍希釈して, 50 mg/mL に調製した。

#### (2) インドメタシン懸濁液の調製

インドメタシンを適量秤量し, メノウ乳鉢を用いて十分に粉碎し, 0.5% MC を徐々に加えて 3 mg/mL の懸濁液になるように用時調製した。

#### (3) セレコキシブ懸濁液の調製

セレコキシブを適量秤量し, メノウ乳鉢を用いて十分に粉碎し, 0.5% MC を徐々に加えて 10 mg/mL 溶液の懸濁液になるように用時調製した。

#### (4) カラゲニン溶液の調製

カラゲニンを適量秤量し, 1.0%になるように蒸留水を加え, スターラーを用いて一晩攪拌して調製した。

## 供試動物

当試験は、科研製薬株式会社 (藤枝, 静岡県, 日本, HS 財団認定番号: 15-047) の動物実験の実施に関する規定及びその他の関係法令を遵守し, 承認された動物実験計画書 (許可番号: S16-012) に従って実施した。5 週齢の Sprague-Dawley (CrI:CD (SD)) 系統の雄性ラットを日本チャールス・リバー株式会社 (厚木繁殖センター, 神奈川県, 日本) から購入し, 7 日間実験環境に馴化させた。飼育室は温度  $23 \pm 3$  °C, 湿度  $50 \pm 20\%$  に設定し, 飼育室内の換気頻度は 1 時間あたり 17 回以上とした。明暗サイクルを 12 時間とし, 7:00-19:00 を明期とした。1 ケージ (W 450×D 500×H 350mm, 金網ケージ) 当たり 1 匹のラットを収容した。馴化期間中, 基礎飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) 及び上水 (藤枝市, 静岡県, 日本) を自由摂取させた。馴化後, ラットを層別無作為化法にて, 最新の体重に基づいて各群に振り分け試験に使用した。

## 実験方法

群構成を以下に示す。

群番号	群	足蹠皮下投与	試験物質	投与容量	例数
1	無処置対照群	生理食塩液	0.5% MC	10 mL/kg	5
2	適合対照群	1.0% カラゲニン溶 液	0.5% MC		
3	HT 500 mg/kg 群		HT 50 mg/mL		
4	セレコキシブ 100 mg/kg 群		セレコキシブ 10 mg/mL		
5	インドメタシン 30 mg/kg 群		インドメタシン 3 mg/mL		

無処置対照群は血液学検査、血液生化学検査における比較対照として設定した。用量設定に関して、HTは2 g/kgの用量でラットに毒性を示さないと報告されていることから(36)、毒性影響が無く薬効が期待できる用量として500 mg/kgを設定した。第4章においてアスピリンとの併用による副作用影響を検討するため、セレコキシブに関しては、比較対照として、薬効を示しかつ単独の投与では消化管障害を示さない既知用量(66)を設定した。インドメタシンに関しては、陽性対照として薬効を示しかつ単独の投与で消化管障害を示す既知用量(67)を設定した。

#### 1. 肢容積測定及び浮腫率と浮腫抑制率の算出

試験物質を10 mL/kgの容量でラットに強制経口投与した。既報(68)に基づき投与1時間後、1.0%カラゲニン溶液0.1mLをラット右後足の足蹠に皮下投与した。肢容積は、プレチスモメーター(Model 7141, Ugo Basile, Milan, Italy)を用いて、カラゲニン投与前及び投与後1, 2, 3, 4及び5時間に測定した。既報(61)に基づき以下の式を使用して、浮腫率(% swelling)及び浮腫抑制率(% inhibition)を計算した。

$$\% \text{ swelling} = (V_x - V_0) / V_0 \times 100 \quad (x = 1-5)$$

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Control} - \text{Test}) / \text{Control} \times 100$$

$V_0$ 及び $V_x$ はそれぞれカラゲニン投与前(0時間)及び1, 2, 3, 4及び5時間後の後肢容積であり、Control及びTestはそれぞれ適合対照群及び試験物質投与



群における平均容積である。

## 2. 肢組織の病理組織学的検査

すべての動物を、肢容積の最終測定後、イソフルラン吸入麻酔下で腹部大静脈及び大動脈を切断して放血により安楽殺した。安楽殺後、肢組織を採取し 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、脱脂及びギ酸・クエン酸ナトリウム法による脱灰を行った。固定後、脱水、脱脂、パラフィン浸透し、パラフィン包埋した。パラフィブロックは薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施した。染色標本を検鏡し、以下の基準に従い、混合細胞浸潤及び浮腫の程度について病理学的なグレード付けを行った：0, negative; 1, minimal; 2, slight; 3, moderate.

## 3. 血液学的検査

安楽殺時に EDTA-2K を用いて採取した血液を用いて、総合血液検査装置 (ADVIA120, Bayer AG, Leverkusen, Germany) により以下の検査を行った。

・総合血液検査装置 (ADVIA120) による検査項目、単位及び測定方法

赤血球数	RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリ法
ヘモグロビン濃度	Hemoglobin	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法
ヘマトクリット値	Hematocrit	%	計算式: (平均赤血球容積 $\times$ 赤血球) / 10
平均赤血球容積	MCV	fL	2 角度レーザーフローサイトメトリ法
平均赤血球ヘモグロビン量	MCH	pg	計算式: (ヘモグロビン量 $\times$ 赤血球数) / 10
平均赤血球ヘモグロビン濃度	MCHC	g/dL	計算式: ヘモグロビン量 / (赤血球数 $\times$ 平均赤血球容積) $\times 1000$
血小板数	Platelet	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリ法

			一法
白血球数	WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリー法
網状赤血球数及び百分率	Reticulocyte	$\times 10^3/\mu\text{L}$	RNA 染色法によるレーザーフローサイトメトリー法
リンパ球数及び百分率	Lymphocyte	$\times 10^3/\mu\text{L}$	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法
好中球数及び百分率	Neutrophil	$\times 10^3/\mu\text{L}$	
好酸球数及び百分率	Eosinophil	$\times 10^3/\mu\text{L}$	
好塩基球数及び百分率	Basophil	$\times 10^3/\mu\text{L}$	
単球数及び百分率	Monocyte	$\times 10^3/\mu\text{L}$	

#### 4. 血液生化学的検査

安楽殺時にヘパリンリチウムを用いて採取した血液を、直ちに冷却遠心分離機 (05PR-22, 日立工機株式会社, 東京, 日本) を用いた遠心分離 (4 °C, 毎分 3,000 回転, 15 分間) を行い, 血漿を分離した。得られた血漿を用いて, 生化学自動分析装置 (LABOSPECT 006) により以下の検査を行った。

・自動分析装置 (LABOSPECT 006) による検査項目, 単位及び測定方法

総蛋白値	T.Protein	g/dL	ビウレット法
アルブミン値	Albumin	g/dL	BCG 法
アルブミン・グロブリン比	A/G ratio	—	総蛋白及びアルブミン値から算出
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性	AST	U/L	JSCC 標準化対応法
アラニンアミノトランスフェラーゼ活性	ALT	U/L	JSCC 標準化対応法
アルカリホスファターゼ活性	ALP	U/L	JSCC 標準化対応法
血糖値	Glucose	mg/dL	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法

尿素窒素値	Ureanitrogen	mg/dL	ウレアーゼ・GIDH 法, アンモニア 消去法
クレアチニン値	Creatinine	mg/dL	クレアチニナーゼ・HMMPS 法
総コレステロール値	Cholesterol	mg/dL	コレステロールオキシダーゼ・ HMMPS 法
トリグリセリド値	Triglyceride	mg/dL	GPO・HMMPS 法, グリセリン消去 法
リン脂質値	Phospholipid	mg/dL	コリンオキシダーゼ・DAOS 法
無機リン値	Inor-P	mg/dL	PNP・XDH 法
ナトリウム値	Sodium	mEq/L	イオン選択電極法
カリウム値	Potassium	mEq/L	イオン選択電極法
クロール値	Chloride	mEq/L	イオン選択電極法

### 統計解析

結果は、平均 ± 標準誤差 (S.E.) として示した。定量的データ (浮腫率, 血液学及び血液生化学検査項目) については、Bartlett の検定により等分散性を検討し、等分散の場合は Student's t-test 法を用いて検定を行った。等分散と認められなかった場合については Wilcoxon rank sum test の検定を行った。定性的データ (病理評価グレード) については累積  $\chi^2$  検定を行った。有意差検定の最低有意水準は両側 5%とした。浮腫率及び病理評価グレードに関しては、適合対照群 (2 群) と試験物質投与群 (3-5 群) との間で統計を実施した。血液学及び血液生化学検査に関しては、無処置対照群 (1 群) と適合対照群 (2 群) 及び適合対照群 (2 群) と試験物質投与群 (3-5 群) との間で統計を実施した。統計解析には SAS 及び EXSUS を使用した。

## 結果

### 1. ラットカラゲニン肢浮腫モデルにおける HT の抗浮腫作用

カラゲニン誘発ラット肢浮腫モデルにおける HT の抗炎症作用を評価した。肢容積は、すべての群においてカラゲニン投与後に増加した (Fig. 12)。HT 投与群では、カラゲニン投与 2, 3 及び 5 時間後において、適合対照群よりも有意に浮腫率が低下した ( $p < 0.05$ )。セレコキシブ投与群では、カラゲニン投与 1, 2 及び 3 時間後で適合対照群よりも有意に浮腫率が低下した ( $p < 0.05$ )。インドメタシン投与群では、カラゲニン投与 2, 3, 4 及び 5 時間後で適合対照群よりも有意に浮腫率が低下した ( $p < 0.01$ ) (Fig. 13)。

カラゲニン投与 1, 2, 3, 4 及び 5 時間後の浮腫抑制率は、HT 投与群ではそれぞれ 0.34%, 13.3%, 19.2%, 20.9%及び 22.9%であった。セレコキシブ投与群では 49.6%, 33.4%, 24.0%, 17.6%及び 14.2%, インドメタシン投与群では 52.7%, 61.5%, 52.1%, 51.6%及び 47.9%であった (Fig. 14)。

手技的ミスにより、適合対照群の 1 匹にはカラゲニンを適切に投与できなかった。従って、この動物は評価から除外した。本措置により 1 例欠損値となったが、統計解析に必要なデータ数は得られており、試験の信頼性に影響を及ぼさないと判断した。

### 2. 肢組織における病理組織学的検査

カラゲニン投与 5 時間後における病理組織学的評価において、足甲部に軽度の混合細胞浸潤及び中程度の浮腫がすべての動物で認められた。しかし、病理学的

グレード付けに基づく混合細胞浸潤の程度は、HT 群 ( $p < 0.05$ )、セレコキシブ群 ( $p < 0.01$ ) 及びインドメタシン群 ( $p < 0.05$ ) において適合対照群より有意に低かった。さらに、浮腫の程度はセレコキシブ群 ( $p < 0.01$ ) 及びインドメタシン群 ( $p < 0.01$ ) において適合対照群より有意に低かった (Fig. 15, Fig. 16)。

### 3. 血液学検査及び血液生化学検査

血液学検査において、無処置対照群と比較して、適合対照群では好中球数の有意な増加及びリンパ球の有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。適合対照群と試験物質投与群との比較では、有意な差は認められなかった (Table 2)。

血液生化学検査において、無処置対照群と比較して、適合対照群ではカリウムの有意な低下が認められた。適合対照群と試験物質投与群との比較では、HT 群で無機リンの有意な増加、セレコキシブ群でアルブミンの有意な低下、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性、尿素窒素値、無機リン、カリウムの有意な増加が認められた。インドメタシン群では、総蛋白及びアルブミンの有意な低下、無機リン、カリウムの有意な増加が認められた (Table 3)。

## 考察

本試験では、ラットカラゲニン肢浮腫モデルを用いて HT, セレコキシブ及びインドメタシンの抗炎症効果を検討した。適合対照群に認められた経時的な肢容積の増加に対して、HT, セレコキシブ及びインドメタシンは肢容積の増加を有意に抑制した。HT の有意な抑制効果はカラゲニン投与後 2 時間から認められ、投与後 5 時間で最大の抑制作用を示した (% inhibition : 22.9%)。

対照的に、セレコキシブ及びインドメタシンは、それぞれカラゲニン投与後 1 時間 (% inhibition : 49.6%) 及び 2 時間 (% inhibition : 61.5%) から有意に肢浮腫を抑制した。HT はセレコキシブ及びインドメタシンより抑制作用は弱かったが、その効果は時間とともに増加する傾向にあった。一方で、セレコキシブ及びインドメタシンの効果は時間とともに減少した。従って、HT は遅行性の抗炎症作用を持つ可能性があり、HT とセレコキシブまたはインドメタシンとの組合せにより、投与初期から後期まで持続的な抗炎症効果が得られる可能性が示唆された。

病理組織学的検査において、混合細胞浸潤の程度は、HT, セレコキシブ及びインドメタシン投与群で適合対照群より有意に低かった。浸潤細胞は、リンパ球、好中球、好酸球及び単核細胞から構成されていた。炎症性細胞浸潤及び体液の漏出は、ヒスタミン、セロトニン及び PG の放出によって引き起こされ、炎症部位での浮腫をもたらす (69)。従って、セレコキシブ及びインドメタシンについて知られるように、HT は、PGE<sub>2</sub> の産生を減少させることによって、ヒスタミン、セロトニン及び PG などの炎症性メディエーターの産生を抑制し、抗炎症効果を示すものと考えられた (70, 71)。なお、HT は混合細胞浸潤を抑制した一方、浮腫を

抑制しなかった理由として、浮腫は炎症の初期に毛細血管の拡張により生じる反応であるのに対し、混合細胞浸潤は炎症の初期以降に炎症性細胞が障害部位に遊走しておこる反応であるため (72)、遅効性の HT は炎症初期反応である浮腫を抑制できなかった可能性が考えられた。

カラゲニン<sup>1</sup>は COX-2 を活性化し、COX-2 はアラキドン酸を基質として PGE<sub>2</sub>などを生成することで炎症反応を促進する。また NO は COX-2、ホスホリパーゼ A2 (PLA<sub>2</sub>) を S-ニトロシル化することで活性化し、PGE<sub>2</sub>の産生を増強させ炎症反応を亢進させる (63)。第 1 章において、我々は HT が NO 及び PGE<sub>2</sub>の産生を抑制することを明らかにしており、これらの作用が本実験において浮腫形成抑制作用に繋がったと考えられた。第 1 章及び 3 章において、HT の NO 及び PGE<sub>2</sub>産生抑制作用、カラゲニン浮腫形成抑制作用をそれぞれ確認し、HT の抗炎症作用の有効性を確認することができた。そこで、次に現在の治療薬で認められる副作用の一つである消化管障害の誘発の有無について HT を評価した。

## 小括

我々は *in vitro* 研究において、HT が、LPS 誘発性の iNOS、COX-2 及び IL-1 $\beta$  遺伝子の発現を抑制し、結果として NO 及び PGE<sub>2</sub> の産生量を減少させることを見出した。本研究では、HT の新規消炎鎮痛薬としての可能性を見据え、*in vivo* における抗炎症活性を評価することを目的とした。

試験物質として、0.5% MC (適合対照群)、HT (500 mg/kg)、セレコキシブ (100 mg/kg)、インドメタシン (30 mg/kg) を、カラゲニン投与 1 時間前に経口投与した。カラゲニン投与後に肢容積を測定し、肢容積の変化量を指標に抗炎症効果を評価した。HT はセレコキシブ及びインドメタシンより肢浮腫抑制作用は弱かったが、その効果は時間とともに増加した。一方で、セレコキシブ及びインドメタシンの効果は時間とともに減少した。従って、HT は遅行性の抗炎症作用を持つ可能性があり、HT とセレコキシブまたはインドメタシンとの組合せにより、投与初期から後期まで持続的な抗炎症効果が得られる可能性が示唆された。

第 1 章及び第 3 章において、NO 及び PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用、カラゲニン浮腫形成抑制作用をそれぞれ確認し、HT の抗炎症作用を確認することができた。HT に抗炎症作用が認められたことから、次に現在の治療薬に認められる副作用の中で最も問題となる消化管障害誘発の有無について HT を評価した。



**Table 2. Hematology in the rat paw edema model**

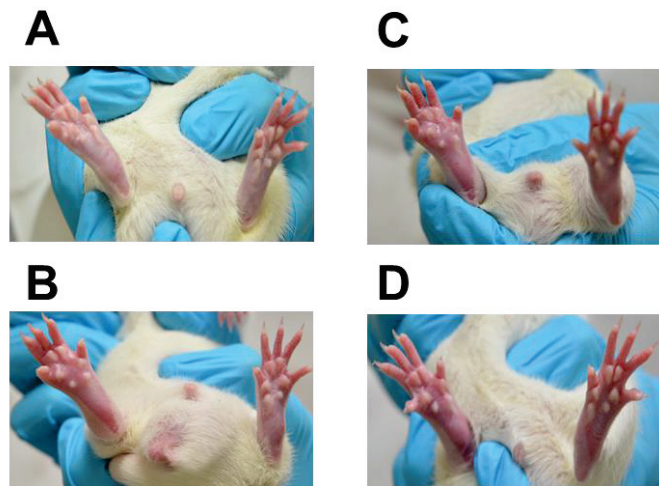
Group No.	1		2		3		4		5	
	0.5%MC+Saline		0.5%MC+Carrageenan		HT+Carrageenan		Celecoxib+Carrageenan		Indomethacin+Carrageenan	
Group	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5
N	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5
RBC	5.968 ± 0.195	6.268 ± 0.408	6.084 ± 0.208	6.084 ± 0.208	5.858 ± 0.239	5.858 ± 0.239	5.978 ± 0.220	5.978 ± 0.220	5.978 ± 0.239	5.978 ± 0.220
Hemoglobin	13.60 ± 0.31	14.00 ± 0.78	13.72 ± 0.32	13.72 ± 0.32	13.18 ± 0.34	13.18 ± 0.34	13.64 ± 0.42	13.64 ± 0.42	13.18 ± 0.34	13.64 ± 0.42
Hematocrit	40.14 ± 0.85	41.58 ± 2.03	41.60 ± 1.31	41.60 ± 1.31	39.38 ± 0.98	39.38 ± 0.98	40.10 ± 1.10	40.10 ± 1.10	39.38 ± 0.98	40.10 ± 1.10
MCV	67.26 ± 1.75	66.43 ± 2.64	68.42 ± 2.03	68.42 ± 2.03	67.26 ± 2.39	67.26 ± 2.39	67.12 ± 1.62	67.12 ± 1.62	67.26 ± 2.39	67.12 ± 1.62
MCH	22.76 ± 0.42	22.33 ± 1.03	22.58 ± 0.81	22.58 ± 0.81	22.50 ± 0.85	22.50 ± 0.85	22.80 ± 0.52	22.80 ± 0.52	22.50 ± 0.85	22.80 ± 0.52
MCHC	33.88 ± 0.59	33.63 ± 0.33	33.00 ± 0.47	33.00 ± 0.47	33.46 ± 0.21	33.46 ± 0.21	33.98 ± 0.43	33.98 ± 0.43	33.46 ± 0.21	33.98 ± 0.43
platelet	1097.2 ± 214.1	1364.5 ± 124.1	1341.2 ± 92.0	1341.2 ± 92.0	1328.4 ± 160.8	1328.4 ± 160.8	1273.8 ± 122.3	1273.8 ± 122.3	1328.4 ± 160.8	1273.8 ± 122.3
WBC	9.490 ± 1.775	9.015 ± 1.766	6.982 ± 0.802	6.982 ± 0.802	8.486 ± 1.469	8.486 ± 1.469	8.524 ± 1.110	8.524 ± 1.110	8.486 ± 1.469	8.524 ± 1.110
Reticulocyte	537.48 ± 44.43	524.53 ± 46.99	497.66 ± 45.43	497.66 ± 45.43	467.70 ± 33.36	467.70 ± 33.36	460.34 ± 38.79	460.34 ± 38.79	467.70 ± 33.36	460.34 ± 38.79
Neutrophil	1.868 ± 0.664	4.743 ± 0.741 <sup>a</sup>	3.874 ± 0.711	3.874 ± 0.711	4.128 ± 0.854	4.128 ± 0.854	4.880 ± 0.851	4.880 ± 0.851	4.128 ± 0.854	4.880 ± 0.851
Lymphocyte	7.060 ± 0.938	3.853 ± 1.267 <sup>a</sup>	2.752 ± 0.432	2.752 ± 0.432	4.004 ± 0.784	4.004 ± 0.784	3.292 ± 0.402	3.292 ± 0.402	4.004 ± 0.784	3.292 ± 0.402
Monocyte	0.382 ± 0.168	0.280 ± 0.074	0.248 ± 0.079	0.248 ± 0.079	0.230 ± 0.060	0.230 ± 0.060	0.224 ± 0.034	0.224 ± 0.034	0.230 ± 0.060	0.224 ± 0.034
Eosinophil	0.134 ± 0.121	0.100 ± 0.008	0.072 ± 0.026	0.072 ± 0.026	0.080 ± 0.049	0.080 ± 0.049	0.110 ± 0.037	0.110 ± 0.037	0.080 ± 0.049	0.110 ± 0.037
Basophil	0.026 ± 0.009	0.013 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.016 ± 0.009	0.016 ± 0.009	0.010 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.016 ± 0.009	0.010 ± 0.000

<sup>a</sup>. p < 0.05 compared with control (Student's t-test). Each value represents the mean ± standard error of the mean of data from five animals, except for the control group, in which data from only four animals was used.

**Table 3. Blood chemistry in the rat paw edema model**

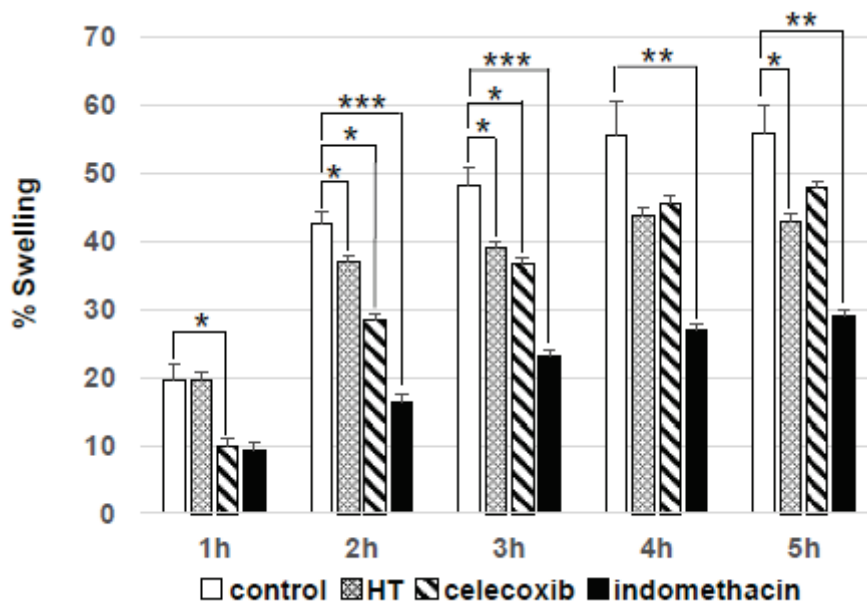
Group No.	1		2		3		4		5	
	0.5%MC+Saline		0.5%MC+Carrageenan		HT+Carrageenan		Celecoxib+Carrageenan		Indomethacin+Carrageenan	
N	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5
T.Protein	4.98 ± 0.08	5.15 ± 0.17	5.20 ± 0.10	4.96 ± 0.11	4.38 ± 0.28 <sup>b</sup>					
Albumin	3.96 ± 0.11	4.00 ± 0.08	4.08 ± 0.04	3.84 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.42 ± 0.26 <sup>c</sup>					
A/G ratio	3.908 ± 0.408	3.510 ± 0.373	3.662 ± 0.280	3.454 ± 0.325	3.584 ± 0.421					
AST	92.2 ± 6.8	99.3 ± 4.3	99.0 ± 3.5	104.4 ± 4.3 <sup>b</sup>	83.8 ± 7.6					
ALT	43.2 ± 3.6	40.8 ± 3.5	42.8 ± 5.1	44.6 ± 4.2	38.2 ± 5.3					
ALP	1330.6 ± 358.2	1448.5 ± 487.9	1333.8 ± 240.2	1129.8 ± 173.2	965.4 ± 190.0					
Glucose	183.0 ± 10.9	163.5 ± 20.0	159.8 ± 12.1	161.2 ± 20.8	149.0 ± 12.6					
Ureanitrogen	9.06 ± 1.45	7.45 ± 1.59	8.74 ± 1.27	12.22 ± 1.46 <sup>c</sup>	16.26 ± 4.78 <sup>c</sup>					
Creatinine	0.182 ± 0.018	0.180 ± 0.018	0.196 ± 0.011	0.178 ± 0.013	0.192 ± 0.013					
Cholesterol	77.4 ± 11.6	79.3 ± 12.1	81.0 ± 10.0	80.0 ± 7.4	71.4 ± 10.5					
Triglyceride	50.2 ± 23.7	30.5 ± 9.1	21.8 ± 8.0	38.0 ± 21.5	44.2 ± 27.0					
Phospholipid	130.0 ± 16.6	134.5 ± 14.8	124.4 ± 11.1	140.2 ± 11.8	126.2 ± 15.0					
Inor-P	9.44 ± 0.46	8.88 ± 0.50	9.54 ± 0.30 <sup>b</sup>	9.84 ± 0.52 <sup>b</sup>	9.32 ± 0.65					
Sodium	144.6 ± 0.9	144.8 ± 2.1	144.4 ± 1.3	145.0 ± 1.6	142.8 ± 1.5					
Potassium	4.32 ± 0.29	3.60 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.34	4.56 ± 0.61 <sup>b</sup>	4.50 ± 0.37 <sup>b</sup>					
Chloride	102.8 ± 1.9	103.0 ± 0.8	102.2 ± 0.8	102.6 ± 1.5	103.0 ± 0.7					

<sup>a</sup>.  $p < 0.05$  compared with group 1 (Student's t-test). <sup>b</sup>.  $p < 0.05$  compared with group 2 (Student's t-test). <sup>c</sup>.  $p < 0.05$  compared with group 2 (Wilcoxon rank sum test). Each value represents the mean ± standard error of the mean of data from five animals, except for the group 2, in which data from only four animals was used.



**Fig. 12. Image showing the hind paw of rat 1 h after carrageenan or saline injection and treatment with HT and celecoxib.**

(A) 0.5 w/v % methyl cellulose and saline injection, (B) 0.5 w/v % methyl cellulose and carrageenan injection, (C) HT and carrageenan injection, (D) celecoxib and carrageenan injection. Indomethacin data was not shown.



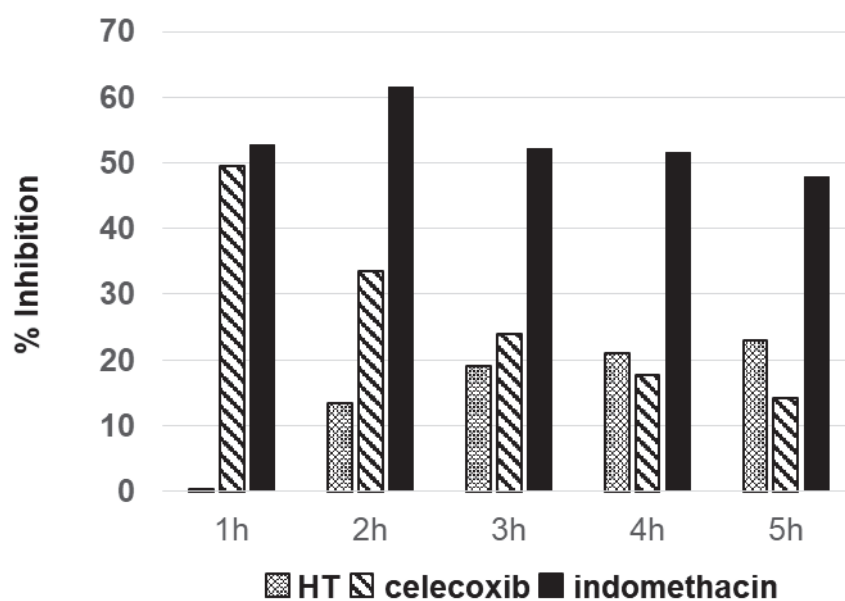
**Fig. 13.** The % swelling volume after carrageenan injection and treatment with HT, celecoxib, and indomethacin on rat paw edema 1, 2, 3, 4, and 5 h after carrageenan injection.

% swelling was calculated by the following formula:

$$\% \text{ swelling} = (V_x - V_0) / V_0 \quad (x = 1-5)$$

where  $V_0$  and  $V_x$  are the hind paw volumes before (0 h) and 1, 2, 3, 4, and 5 h after carrageenan injection, respectively.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control (Student's t-test). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of data from five animals, except for the control group, in which data from only four animals was used.

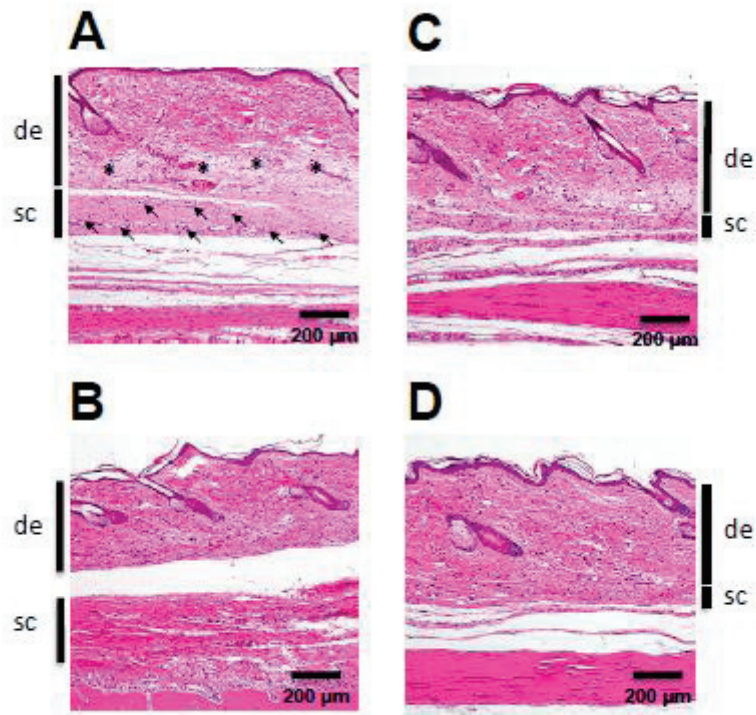


**Fig. 14. The % Inhibition by HT, celecoxib, and indomethacin in the rat paw edema model.**

% Inhibition was calculated by the following formula:

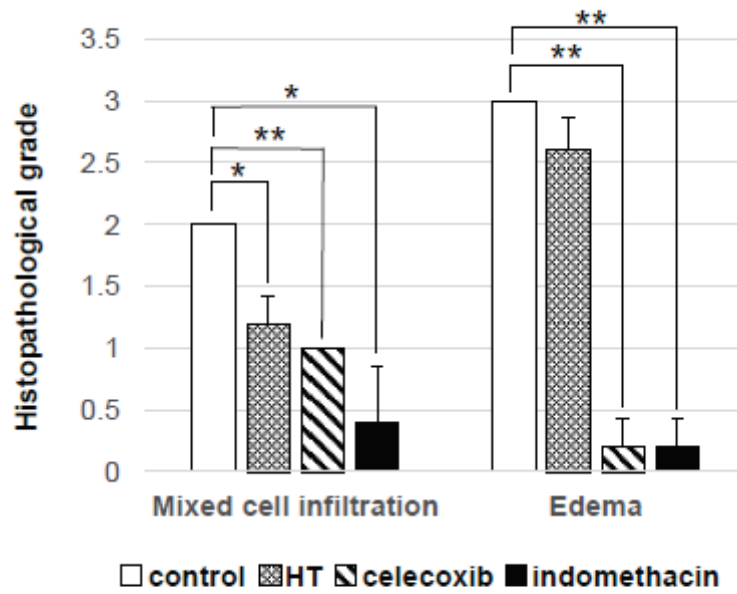
$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Control} - \text{Test}) / \text{Control} \times 100$$

where Control and Test are the mean volumes in the control and test groups, respectively.



**Fig. 15. Histological staining of rat hind paw tissue sections 5 h after carrageenan injection.**

Representative images of tissue injury in (A) 0.5 w/v % methyl cellulose as control, (B) HT, (C) celecoxib, and (D) indomethacin. A shows evident dermal edema (\*), and subcutaneous mononuclear cell infiltration (↑). They were weaker in B, C and D. de: dermis, sc: subcutis.



**Fig. 16. Histopathological grading of rat hind paw tissue sections 5 h after carrageenan injection.**

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control (cumulative  $\chi^2$  test). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of data from five animals, except for the control group, in which data from only four animals was used.

## 第4章

Hydroxytyrosol の経口投与によるアスピリン誘発胃潰瘍への影響



## 緒言

これまでの研究において、我々は HT が既存の NSAIDs 及び COX-2 選択的阻害剤と比較して抗炎症効果は弱いものの、持続的な薬理作用があることを明らかにした。

NSAIDs 及び COX-2 選択的阻害剤は関節リウマチ及び変形性関節症等の慢性炎症の疼痛管理のため長期投与されるが (73)、高齢患者では心筋梗塞など血栓形成性の疾患を誘発する可能性が指摘されており、虚血性心疾患リスクの高い症例には血小板凝集抑制効果に優れる低用量アスピリン (low-dose aspirin; LDA) (74) との併用投与が推奨されている (60, 75, 76)。

しかし、NSAIDs 及び COX-2 選択的阻害剤は、単剤に比べてアスピリン併用時には胃粘膜障害を増悪させるため併用注意とされている (76-78)。これには、NSAIDs 及び選択的 COX-2 阻害剤の薬理作用が深く関わっている。COX-1 及び COX-2 は、PG を産生する酵素である (79)。NSAIDs 及び選択的 COX-2 阻害剤による COX 阻害は、PG のレベルを低下させ、疼痛及び炎症を抑制する (70)。しかし、COX-2 は胃においては胃粘膜を保護する PG を生成する (80)。COX-2 は、ラット及びマウスを用いた実験において、胃潰瘍の治癒に重要な役割を果たすことが報告されている (81, 82)。胃が虚血状態の場合には、COX-2 の発現は促進されるが、NSAIDs または選択的 COX-2 阻害剤の投与は、本発現を抑制し、虚血状態が亢進し胃障害を悪化させる (83)。これらのことから、アスピリンと併用しても胃粘膜障害を生じない抗炎症薬が望まれている。HT は第 1 章及び第 3 章の結果から、COX-2 阻害作用が弱い可能性が示唆され、アスピリン併用時の胃粘膜障害

に及ぼす影響は NSAIDs 及び COX-2 選択的阻害剤と比べて軽度であることが期待される。以上より、本試験では、カラゲニンモデル実験と同じ系統、週齢及び性のラットを用い、単回経口投与した HT, NSAIDs であるインドメタシン及び COX-2 選択的阻害剤セレコキシブのアスピリン誘発胃潰瘍に及ぼす影響について検討した。

## 材料及び方法

### 試験物質

HT, セレコキシブ, インドメタシン及び媒体として用いた 0.5 % MC の由来は前述と同様である。アスピリンは, 和光純薬工業株式会社から購入した。

### 試験物質の調製

HT 溶液, セレコキシブ懸濁液, インドメタシン懸濁液の調製方法は第 1 及び第 3 章と同様とした。アスピリンについては, アスピリンを適量秤量し, メノウ乳鉢を用いて十分に粉碎し, 0.5% MC を徐々に加えて 5 mg/mL の懸濁液になるように用時調製した。

### 供試動物

用いた動物の由来及び飼育方法は第 3 章と同様である。なお, 当試験は, 科研製薬株式会社の動物実験の実施に関する規定及びその他の関係法令を遵守して, 承認された動物実験計画書 (許可番号: S17-049) に従って実施した。

## 実験方法

群構成を以下に示す。

群	アスピリン投与	試験物質	投与容量	例数
対照群	アスピリン 5 mg/mL	0.5% MC	10 mL/kg	5
HT 500 mg/kg 群		HT 50 mg/mL		
セレコキシブ 100 mg/kg 群		セレコキシブ 10 mg/mL		
インドメタシン 30 mg/kg 群		インドメタシン 3 mg/mL		

### 1. 胃の潰瘍面積の測定及び胃の傷害面積の算出

試験物質を 10 mL/kg の容量で経口投与した 1 時間後にアスピリン 5 mg/mL 溶液を 10 mL/kg の容量で経口投与した。アスピリン懸濁液投与後 4 時間に第 3 章と同一の方法で放血致死させた。速やかに胃を摘出し、噴門部をクレンメでとめ、幽門部から 2 w/v% 中性ホルマリン液 (10 w/v% 中性ホルマリン液をリン酸緩衝生理食塩水で 5 倍希釈して調製) を 8 mL 充填して幽門部をクレンメで閉塞した。胃を 2 w/v% 中性ホルマリン液中で約 10 分間固定した後、噴門部から大弯中央部に沿って幽門部まで切開し、胃粘膜表面の潰瘍の有無を確認した。胃粘膜障害 (潰瘍) が認められた個体については、画像解析ソフト (ImageJ, 米国国立衛生研究所) を用いて潰瘍面積 (mm<sup>2</sup>) を測定した。測定した潰瘍面積から以下の計算式を用いて胃の傷害面積 (% gastric damage area) を算出した。

$$\% \text{ gastric damage area} = \text{lengths of hemorrhagic lesions (mm)} \times 100 / \text{total stomach area (mm}^2\text{)}.$$

## 2. 血液学的検査及び血液生化学検査

第3章と同様の方法で採血及び測定を行った。検査項目も第3章と同様である。

### 統計解析

結果は、平均 ± 標準誤差 (S.E.) として示した。胃の傷害面積について、Bartlett の検定により等分散性を検討し、等分散の場合は Student's t-test 法を用いて検定を行った。等分散と認められなかった場合については Wilcoxon rank sum test の検定を行った。統計解析には SAS 及び EXSUS を使用した。

## 結果

### 1. 胃の潰瘍面積の測定及び胃の傷害面積の算出

HT とアスピリンを併用した場合の胃粘膜障害のリスクを評価した。対照群において、出血性びらんによって代表される胃障害はアスピリン単独では認められなかった (Fig. 17 A)。同様に、アスピリンと HT の併用投与においても胃障害は認められなかった (Fig. 17B)。対照的に、アスピリン及びセレコキシブまたはインドメタシンの併用投与は、明瞭な胃障害を引き起こした (Fig. 17C, Fig. 17D)。胃の傷害面積は、セレコキシブまたはインドメタシン投与群において、有意に高い値を示した (Fig. 18)。

### 2. 血液学検査及び血液生化学検査

血液学的検査では、セレコキシブ及びインドメタシン投与群において、赤血球数及び白血球数が増加傾向であった。しかし、HT 投与群では変化がなかった (Table 4, Fig. 19A, Fig. 19B)。網状赤血球数は、インドメタシン群においてのみ増加傾向にあった (Table 4, Fig. 19C)。好中球数は、セレコキシブ及びインドメタシン群で有意に増加したが、HT 群では変化がなかった (Table 4, Fig. 19D)。

血液生化学検査では、対照群と比較して有意な変化は認められなかった (Table 5)。

## 考察

LDA は、血栓症を予防するための効果的な治療法であり、近年、処方数が増加している (73)。しかし、アスピリンは低用量でも消化管粘膜障害を誘発する可能性があり (77)、NSAIDs と LDA の両方が胃障害のリスクファクターとなるとされる (67)。NSAIDs 誘発性胃粘膜障害は、主に、酸性環境下での粘膜細胞直接障害と COX 阻害作用による胃粘膜 PG の抑制によって引き起こされる (67, 81, 84)。NSAIDs には酸性、塩基性及び中性が存在するが、抗炎症作用が強いのは酸性 NSAIDs であり、インドメタシンも酸性 NSAIDs に該当する。酸性 NSAIDs は酸性環境である胃内腔において非イオン状態であり、容易に胃内壁から吸収される。吸収された酸性 NSAIDs は、呼吸・エネルギー代謝の障害から粘膜上皮の破綻を引き起こす。また、粘液の疎水性を減少させ胃酸やペプシンによる局所的粘膜障害を増悪する (86)。PG は粘液産生、重炭酸分泌、微小循環を促進し、消化管粘膜の恒常性を維持する重要な生理活性物質であるが、NSAIDs は内因性 PG の抑制を介して粘膜防御機構の破綻をきたす (86, 87)。

一方、選択的 COX-2 阻害剤であるセレコキシブに起因する消化性潰瘍の合併症 (出血、穿孔及び通過障害) の発生率はごく僅かである (88)。さらに、別の選択的 COX-2 阻害剤であるロフェコキシブによる治療後の胃十二指腸潰瘍の発生頻度は、非特異的 COX 阻害剤であるイブプロフェンによる治療後のそれよりも明らかに低い (89)。これらの結果に基づき、COX-2 阻害剤は、NSAIDs とは異なり胃腸の副作用のない鎮痛/消炎作用を発揮すると考えられていた。しかし、アスピリンと選択的 COX-2 阻害剤との併用は、出血性潰瘍のリスクを著しく増加さ

せることが明らかとなっており (90), COX-2 阻害剤の投与も高齢者にとっては大きなリスクとなっている (85)。

LDA は、特に高齢者における様々な疾患の予防及び治療のために処方されている。また、インドメタシン及びセレコキシブは、リウマチのような慢性炎症疾患の治療にも使用される。しかし、これらの薬剤を、LDA 投薬中の高齢患者に使用すると、胃腸管障害を引き起こす可能性がある (91)。対照的に、本研究結果において、HT はアスピリンと同時投与しても胃障害を生じさせなかった。HT は、食品や栄養補助食品として既に市販されており (37), 高用量 (2 g/kg) でもげっ歯類で毒性は認められていない (36)。HT が胃障害を引き起こさない理由は依然不明であるが、第3章の結果から、*in vivo* における COX-2 阻害作用はセレコキシブ及びインドメタシンよりも HT は弱いことが明らかとなっており、このことが胃障害の軽減に繋がっている可能性が考えられた。

HT の抗炎症活性の機序を解明するためには更なる研究が必要であるが、本研究結果より HT は投与後長時間、副作用無く薬効を発揮し続けることが期待されるため、新しい抗炎症薬として開発できる可能性が考えられた。



## 小括

HT は第 1 章及び第 3 章の結果から、COX-2 阻害作用が弱いことが示唆され、アスピリン併用時の胃粘膜障害に及ぼす影響は NSAIDs 及び COX-2 選択的阻害剤と比べて軽度であることが期待された。本章では、これらのメリットを考慮して、第 3 章と同じ系統、週齢及び性のラットを用いて HT、インドメタシン及びセレコキシブのアスピリン誘発胃潰瘍に及ぼす影響を検討した。

比較対照として用いたインドメタシン及びセレコキシブが明瞭な胃障害を引き起こしたのに対し、HT はアスピリンと同時投与しても胃障害を生じさせなかった。予測通りの結果が得られたことより、HT は、*in vivo* における COX-2 阻害作用がインドメタシン及びセレコキシブよりも弱いことが、胃障害の軽減に繋がっている可能性が考えられた。

图表

**Table 4. Hematology in the rat model of gastric damage after co-administration of aspirin and anti-inflammatory agents**

Group No.	1		2		3		4	
	0.5%MC+Aspirin		HT+Aspirin		Celecoxib+Aspirin		Indomethacin+Aspirin	
N	5		5		5		5	
RBC	6.890	± 0.124	6.870	± 0.220	7.024	± 0.159	7.026	± 0.083
Hemoglobin	15.92	± 0.50	15.68	± 0.44	16.02	± 0.53	16.14	± 0.64
Hematocrit	44.06	± 1.47	43.72	± 0.95	44.22	± 1.03	44.08	± 1.26
MCV	63.94	± 1.30	63.70	± 2.81	62.92	± 0.66	62.70	± 1.45
MCH	23.08	± 0.53	22.88	± 1.16	22.78	± 0.55	22.96	± 0.82
MCHC	36.10	± 0.86	35.90	± 0.42	36.22	± 0.68	36.62	± 0.69
platelet	1530.0	± 21.7	1420.6	± 57.5 <sup>b</sup>	1514.0	± 222.9	1412.2	± 219.5
WBC	6.510	± 2.703	5.708	± 1.457	7.166	± 1.681	7.522	± 1.216
Reticulocyte	389.86	± 19.29	383.36	± 22.93	369.40	± 27.82	406.00	± 7.81
Neutrophil	0.638	± 0.182	1.060	± 0.434	1.236	± 0.384 <sup>a</sup>	1.434	± 0.534 <sup>a</sup>
Lymphocyte	5.584	± 2.434	4.292	± 1.043	5.594	± 1.251	5.702	± 0.925
Monocyte	0.166	± 0.096	0.252	± 0.104	0.216	± 0.068	0.240	± 0.064
Eosinophil	0.052	± 0.013	0.036	± 0.015	0.036	± 0.019	0.050	± 0.019
Basophil	0.026	± 0.025	0.016	± 0.009	0.024	± 0.011	0.024	± 0.005

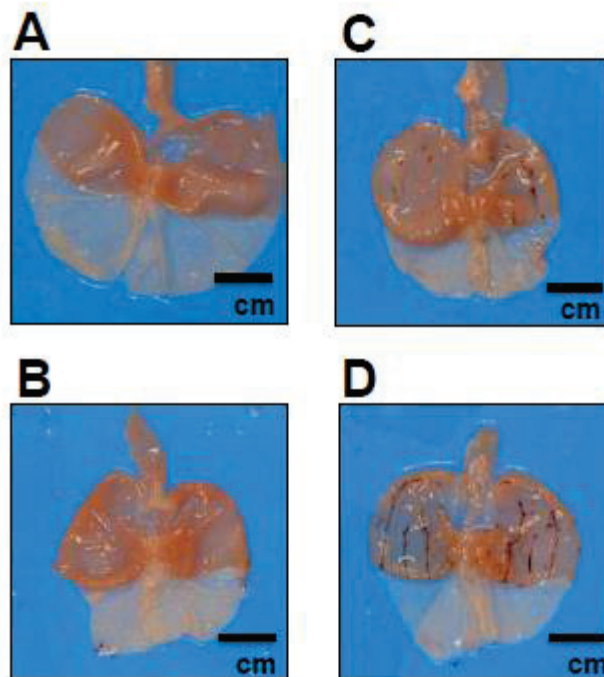
<sup>a</sup>.  $p < 0.05$  compared with group 1 (Student's t-test). <sup>b</sup>.  $p < 0.05$  compared with group 1 (Wilcoxon rank sum test).

Each value represents the mean ± standard error of the mean of data from five animals, except for the group 2, in which data from only four animals was used.

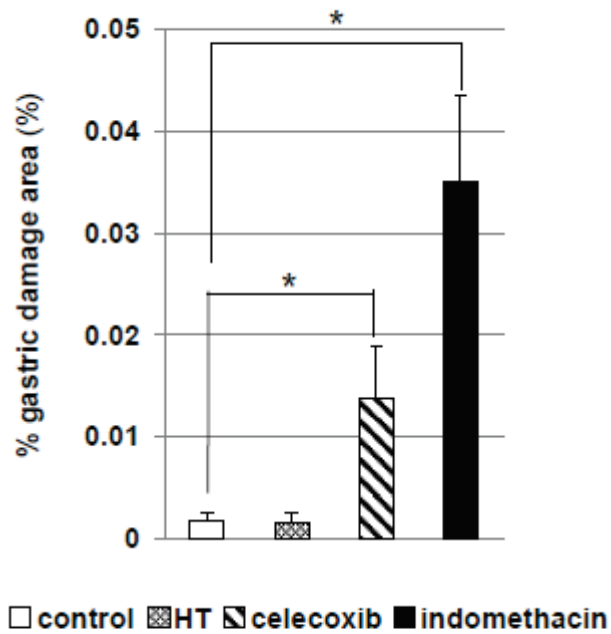
**Table 5. Blood chemistry in the rat model of gastric damage after aspirin co-administration**

Group No. Group	1		2		3		4	
	0.5%MC+Aspirin		HT+Aspirin		Celecoxib+Aspirin		Indomethacin+Aspirin	
N	5		5		5		5	
T.Protein	5.30	± 0.19	5.36	± 0.19	5.24	± 0.09	5.10	± 0.20
Albumin	4.06	± 0.18	4.04	± 0.11	3.98	± 0.08	3.94	± 0.17
A/G ratio	3.312	± 0.432	3.082	± 0.276	3.166	± 0.169	3.412	± 0.282
AST	75.8	± 6.0	79.2	± 9.7	77.6	± 5.6	73.6	± 4.2
ALT	21.4	± 2.1	23.4	± 2.5	23.2	± 2.9	20.6	± 0.9
ALP	878.4	± 149.8	1024.8	± 177.2	970.2	± 268.3	931.0	± 268.3
Glucose	127.4	± 23.5	147.2	± 19.1	160.2	± 22.4	136.4	± 23.9
Ureanitrogen	11.40	± 2.98	11.90	± 1.03	14.44	± 1.80	12.46	± 3.36
Creatinine	0.170	± 0.010	0.180	± 0.019	0.194	± 0.013 <sup>a</sup>	0.184	± 0.027
Cholesterol	58.0	± 10.7	55.8	± 11.3	58.6	± 11.8	58.4	± 10.5
Triglyceride	30.6	± 12.1	25.0	± 3.3	36.6	± 9.3	37.6	± 19.0
Phospholipid	85.6	± 13.0	81.2	± 10.1	87.0	± 11.1	88.0	± 12.8
Inor-P	8.30	± 0.49	8.56	± 0.71	8.76	± 0.28	8.62	± 0.24
Sodium	142.2	± 0.8	142.2	± 1.5	141.6	± 1.1	141.2	± 0.8
Potassium	4.04	± 0.23	3.82	± 0.19	4.08	± 0.08	3.92	± 0.22
Chloride	108.0	± 2.3	108.4	± 2.6	106.4	± 1.5	105.4	± 0.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>.  $p < 0.05$  compared with group 1 (Student's t-test). Each value represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of data from five animals, except for the group 2, in which data from only four animals was used.

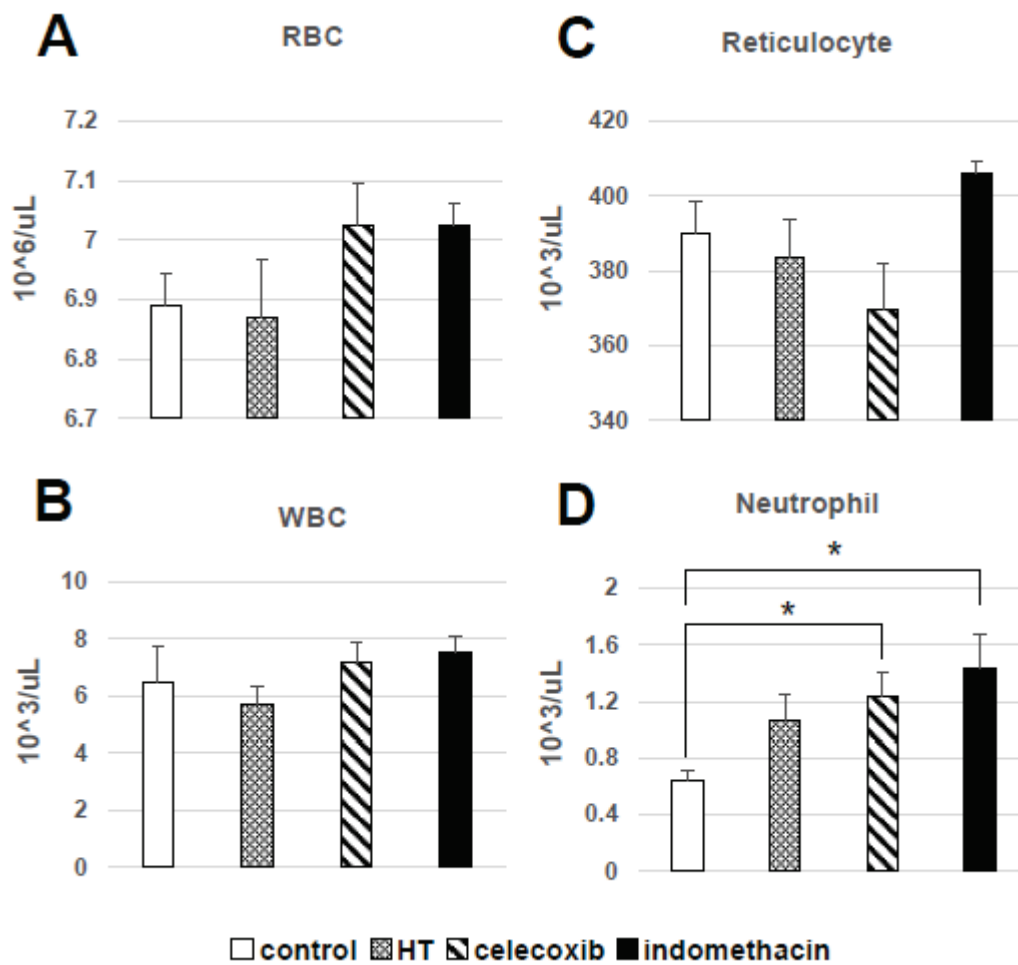


**Fig. 17.** Photographs of rat stomachs 4 h after co-administration of aspirin (50 mg/kg) with (A) 0.5 w/v % methyl cellulose as control, (B) HT, (C) celecoxib, and (D) indomethacin.



**Fig. 18.** The % gastric damage area of rat stomachs 4 h after co-administration of aspirin (50 mg/kg) with 0.5 w/v% methyl cellulose as control, HT, celecoxib, and indomethacin.

\* $p < 0.05$  compared with control (Wilcoxon rank sum test). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of data from five animals.



**Fig. 19. Blood parameters in the rat model of gastric damage after co-administration of aspirin (50 mg/kg) with 0.5 w/v % methyl cellulose as control, HT, celecoxib, and indomethacin.**

The number of (A) RBCs, (B) WBCs, (C) reticulocytes, and (D) neutrophils in blood samples collected from the abdominal aorta. \* $p < 0.05$  compared with control (Student's t-test). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of data from five animals.

## 総括

近年、がんや生活習慣病などの慢性疾患の病態形成に、慢性炎症が深く関わっていることが注目されている。慢性炎症では、酸化ストレスなどの刺激を受けた臓器の細胞から放出される自己由来のたんぱく質成分が、マクロファージにより認識され、サイトカイン、PGE<sub>2</sub>、NOをはじめとした様々な炎症性メディエーターが産生される結果、恒常的な炎症反応が誘導される。このように、マクロファージと慢性炎症との関連が注目されており、これらの予防に役立つ新規化合物の探索が進められている。

天然物由来物質である HT はオリーブの葉や実に豊富に含まれる低分子フェノール化合物であり、*in vitro* 実験において抗炎症、抗酸化、抗ウイルス及び抗菌作用を示すことが明らかとなっているが、その作用メカニズムは依然として不明な点が多い。そこで、本研究では HT の抗炎症効果に関して、その作用機序を明らかにするとともに、動物モデルにおける抗炎症作用を明らかにすることを目的とした。

第1章では HT について、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて、LPS 誘発性炎症における HT の抗炎症作用を評価した。その結果、HT は 12.5 µg/mL の濃度では NF-κB シグナル伝達経路を抑制することで、TNF-α 遺伝子発現、IL-1β 産生、COX-2-PGE<sub>2</sub> 及び iNOS-NO 系を抑制し、12.5 µg/mL より低い濃度では別のシグナル伝達経路に関与することで炎症反応を調節する可能性が考えられた。一方、HT は LPS 誘発性の pERK1/2 発現を抑制しなかった。HT の抗炎症効果を完全に理解するためにはさらなる研究が必要であるが、本研究では、HT が LPS 刺

激 RAW264.7 細胞に対して抗炎症効果を有することが確認された。

第 2 章では、HT が作用するシグナル伝達経路を明らかにするため、NF- $\kappa$ B 及び ERK1/2, p38, JNK の 3 つ MAPK に対して、それぞれを阻害する inhibitor を用いて、各経路を阻害した際の HT の作用の変化を評価した。結果、MAPK の阻害により TNF- $\alpha$  及び PGE<sub>2</sub> の産生は低下し、HT の処理により産生量はさらに低下した。また、NO の産生量は MAPK の阻害により変化しなかったが、HT の処理により低下した。これらの結果より、HT の作用点は ERK1/2, p38, JNK 経路上には無く、かつ NF- $\kappa$ B 経路よりも下流にある可能性が高いことが明らかとなった。第 1 章の結果を踏まえると、HT は高濃度では NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を抑制することで、炎症メディエーター関連遺伝子の発現を抑制し、低濃度では NF- $\kappa$ B 経路よりも下流にあるシグナル経路に作用し、炎症発現を抑制していると考えられた。また、HT は NO 及び PGE<sub>2</sub> 産生に対しては抑制的に働くが、TNF- $\alpha$  に対しては抑制作用を示さず、既存の抗炎症薬である NSAIDs や COX-2 阻害剤と異なる作用メカニズムを持つ可能性が考えられた。

第 3 章では、カラゲニン誘発肢浮腫モデルを用いて、HT の抗炎症作用及び病態への関与を検討した。カラゲニン投与前及び投与後 1, 2, 3, 4 及び 5 時間に肢容積を測定し、肢容積の変化量を指標に抗炎症効果を評価した結果、HT はセレコキシブ及びインドメタシンより肢浮腫抑制作用は弱かったが、その効果は時間とともに増加した。一方で、セレコキシブ及びインドメタシンの効果は時間とともに減少した。従って、HT は遅行性の抗炎症作用を持つ可能性があり、HT とセレコキシブまたはインドメタシンとの組合せにより、投与初期から後期まで持続的な抗炎症効果が得られる可能性が示唆された。



加えて第 4 章では、HT の経口投与によるアスピリン誘発胃潰瘍への影響を検討した。比較対照として用いたセレコキシブ及びインドメタシンが明瞭な胃障害を引き起こしたのに対し、HT はアスピリンと同時投与しても胃障害を生じさせなかった。HT は、食品や栄養補助食品で既に市販されており、高用量 (2 g/kg) でも毒性影響は認められていない。第 1 章及び第 3 章の結果から、*in vivo* における HT の COX-2 阻害作用はセレコキシブ及びインドメタシンよりも弱いことが明らかとなっており、この効果の弱さが胃障害の軽減に繋がっている可能性が考えられた。

抗炎症活性の機序を解明するためには更なる研究が必要であるが、HT は投与後長時間、副作用無く薬効を発揮し続けることができるため、新しい抗炎症薬として開発できる可能性が考えられた。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇切なるご指導，ご鞭撻を賜りました帯広畜産大学 獣医学研究部門 基礎獣医学分野 小川晴子教授に深く感謝いたします。

また，本研究にあたり有益なるご指導，ご助言を頂きました帯広畜産大学 獣医学研究部門 基礎獣医学分野 今井邦俊教授，グローバルアグロメディシン研究センターの武田洋平特任助教に深謝いたします。

本論文の作成にあたり，貴重なご助言とご校閲を賜りました帯広畜産大学 獣医学研究部門 石井利明教授，岩手大学 農学部 共同獣医学科 宇塚雄次教授，東京農工大学 農学研究院 動物生命科学部門 佐々木一昭准教授，岐阜大学応用生物科学部 獣医薬理学研究室 海野年弘教授に厚く御礼申し上げます。

また，本研究の機会を与えてくださいました科研製薬株式会社社長 大沼哲夫氏，研究開発本部部長 家田力氏，研究企画部部長 綿貫充氏，新薬創生センターセンター長 小倉浩暢氏，薬物動態・安全性部部長 薩川正広氏並びに前部長 箕輪賢治氏に深く感謝いたします。

実験に際しご協力くださいました科研製薬株式会社新薬創生センター 薬物動態・安全性部の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に，終始多大な協力のもと私を支えてくれました家族には心から感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 204–212.
2. 小川佳宏. 慢性炎症: 生活習慣病や癌などの各種疾患に共通する基盤病態. *実験医学.* 2010; 28: 1688–1692.
3. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998; 95: 588–593.
4. Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibargüen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur. J. Nutr.* 2012; 51: 497–506.
5. Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, Cinelli MP, Carnuccio R. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2005; 371: 457–465.
6. Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2009; 379: 581–586.
7. Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Med.* 2011; 77: 1890–1897.
8. Visioli F, Caruso D, Plasmati E, Patelli R, Mulinacci N, Romani A, Galli G, Galli C.

- Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic. Res.* 2001; 34: 301–305.
9. Visioli F, Galli C, Plasmati E, Viappiani S, Hernandez A, Colombo C, Sala A. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation.* 2000; 102: 2169–2171.
  10. Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Res.* 2009; 83: 35–44.
  11. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999; 51: 971–974.
  12. Takeda Y, Bui VN, Iwasaki K, Kobayashi T, Ogawa H, Imai K. Influence of olive-derived hydroxytyrosol on the toll-like receptor 4-dependent inflammatory response of mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 446: 1225–1230.
  13. Michalek SM, Moore RN, McGhee JR, Rosenstreich DL, Mergenhagen SE. The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. *J. Infect Dis.* 1980; 141: 55–63.
  14. Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* 1995; 74: 1057–1065.
  15. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun K,

- Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE 2 production by asiatic acid via NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.* 2008; 8: 431–441.
16. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 1996; 316: 209–215.
17. Denlinger LC, Fisetto PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD, Nguyen B, Proctor RA, Bertics PJ, Corbett JA. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 337–342.
18. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.* 2002; 13: 636–644.
19. Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation in THP-1 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2009; 32: 578–582.
20. van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect. Immun.* 1999; 67: 3824–3829.
21. Chu AJ, Wang ZG, Walton MA, Seto A. Involvement of MAPK activation in bacterial endotoxin-inducible tissue factor upregulation in human monocytic THP-1 cells. *J. Surg. Res.* 2001; 101: 85–90.
22. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE

- guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009; 55: 611–622.
23. Jie S, Xueji Z, Mark B, Harry F. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors.* 2003; 3: 276–84.
  24. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17: 338–344.
  25. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* 2014; 5: 316.
  26. Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, Cho YS, Rimbach G, Packer L, Chung AS. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine IL-1 production in LPS-stimulated RAW 264.7. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000; 168: 64–71.
  27. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311: 1413–1418.
  28. Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009; a001651.
  29. Chowdhury TT, Bader DL, Lee DA. Dynamic compression counteracts IL-1 $\beta$ -induced release of nitric oxide and PGE 2 by superficial zone chondrocytes cultured in agarose constructs. *Osteoarthr. Cartil.* 2003; 11: 688–696.
  30. Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* 1997; 61: 2073–2081.
  31. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. Evidence for involvement of NF- $\kappa$ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 $\beta$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 237: 28–32.

32. Chan ED, Riches DWH. IFN- $\gamma$  + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38mapk in a mouse macrophage cell line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280: C441–C450.
33. Son K, Kim Y. In vivo cisplatin-exposed macrophages increase immunostimulant-induced nitric oxide synthesis for tumor cell killing. *Cancer Res.* 1995; 55: 5524–5527.
34. Matsui H, Shimokawa O, Kaneko T, Nagano Y, Rai K, Hyodo I. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011; 48: 107–111.
35. Perneger TV, Whelton PK, Klag MJ. Risk of kidney failure associated with the use of acetaminophen, aspirin, and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 1675–1679.
36. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29: 1492–1498.
37. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from Laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* 2010; 68: 191–206.
38. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992; 339: 1523–1526.
39. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-densitylipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993; 341: 454–457.
40. Constant J. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin. Cardiol.*

- 1997; 20: 420–424.
41. Providencia R. Cardiovascular protection from alcoholic drinks: scientific basis of the French Paradox. *Rev. Port. Cardiol.* 2006; 25: 1043–1058.
  42. Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 61: 1321S–1323S.
  43. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Wu Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science.* 1997; 278: 860–866.
  44. Hsiao G, Shen MY, Chang WC, Cheng YW, Pan SL, Kuo YH, Chen TF, Sheu JR. A novel antioxidant, octyl caffeate, suppression of LPS/IFN- $\gamma$ -induced inducible nitric oxide synthase gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 1383–1392.
  45. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 14843–14846.
  46. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 18623–18632.
  47. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 1995; 364: 229–233.
  48. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad.*



- Sci. U S A. 2001; 98: 13681–13686.
49. Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan CG, Sun D. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 162–170.
  50. Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J. Neurosci.* 1998; 18: 1633–1641.
  51. Chen CC, Wang JK. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol. Pharmacol.* 1999; 55: 481–488.
  52. Ryu SJ, Choi HS, Yoon KY, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. Oleuropein suppresses LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cell and zebrafish. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 2098–2105.
  53. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- $\kappa$ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 3285–3290.
  54. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AD, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993; 90: 9730–9734.
  55. Xie Q, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon- $\gamma$  and

- bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1779–1784.
56. 秀和泉. 炎症性疾患に関わる腫瘍壊死因子 (TNF) の産生・放出. *日本薬理学雑誌*. 2003; 121: 163–173.
57. Xia Q, Hu Q, Wang H, Yang H, Gao F, Ren H, Chen D, Fu C, Zheng L, Zhen X, Ying Z, Wang G. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis.* 2015; 6: e1702.
58. Yu KR, Lee JY, Kim HS, Hong IS, Choi SW, Seo Y, Kang I, Kim JJ, Lee BC, Lee S, Kurtz A, Seo KW, Kang KS. A p38 MAPK-mediated alteration of COX-2/PGE2 regulates immunomodulatory properties in human mesenchymal stem cell aging. *PLoS One.* 2014; 9: e10242.
59. Gong Y, Xue B, Jiao J, Jing L, Wang X. Triptolide inhibits COX-2 expression and PGE2 release by suppressing the activity of NF-kappaB and JNK in LPS-treated microglia. *J. Neurochem.* 2008; 107: 779–788.
60. 越智隆弘, 山本一彦, 龍順之助. 関節リウマチの診療ガイドライン (改訂版) 診断のマニュアルと EBM に基づく治療ガイドライン. 財団法人日本リウマチ財団. 2004.
61. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 2003; 225: 115–121.
62. Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, Ohara N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan induced rat hind paw edema. *Phyther. Res.* 2007; 21: 452–456.
63. Katori M, Majima M, Harada Y. Possible background mechanisms of the effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis.

- Inflamm. Res. 1998; 47: S107–S111.
64. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994; 91: 12013–12017.
  65. Francischi JN, Chaves CT, Moura ACL, Lima AS, Rocha OA, Ferreira-Alves DL, Bakhle YS. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 137: 837–844.
  66. Yoshino T, Kimoto A, Kobayashi S, Noguchi M, Fukunaga M, Hayashi A, Miyata K, Sasamata M. Pharmacological profile of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Arzneimittelforschung.* 2005; 55: 394–402.
  67. Fiorucci S, de Lima OM Jr, Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, McKnight W, Dickey M, MaL, Romano M, Morelli A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived lipoxin A4 increases gastric resistance to aspirin-induced damage. *Gastroenterology.* 2002; 123: 1598–1608.
  68. Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2003; 4: 313–318.
  69. Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1969; 166: 96–103.
  70. Dahl JB, Kehlet H. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: rationale for use in severe postoperative pain. *Br. J. Anaesth.* 1991; 66: 703–712.
  71. Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, Tsuchiya S, Segi-Nishida E, Inazumi T, Kabashima K, Tanaka S, Murakami M, Narumiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2–EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J. Immunol.*

- 2014; 192: 1130–1137.
72. 梅村孝司. 動物病理学総論. 文永堂出版. 2005; 145–148.
73. Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 2373–2383.
74. Nakayama M, Iwakiri R, Hara M, Ootani H, Shimoda R, Tsunada S, Fujimoto K. Low-dose aspirin is a prominent cause of bleeding ulcers in patients who underwent emergency endoscopy. *J. Gastroenterol.* 2009; 44: 912–918.
75. Lanas A, Garcia-Rodriguez LA, Arroyo MT, Gomollon F, Feu F, Gonzalez-Perez A, Zapata E, Bastida G, Rodrigo L, Santolaria S, Guell M, de Argila CM, Quintero E, Borda F, Pique JM. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclooxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut.* 2006; 55: 1731–1738.
76. Laine L, Curtis SP, Cryer B, Kaur A, Cannon CP. Assessment of upper gastrointestinal safety of etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoids in the Multinational Etricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomized comparison. *Lancet.* 2007; 369: 465–473.
77. Takeuchi K, Tanaka A, Kato S, Aihara E, Amagase K. Effect of (S)-4-(1-(5-chloro-2-(4-fluorophenoxy)benzamido)ethyl) benzoic acid (CJ-42794), a selective antagonist of prostaglandin E receptor subtype 4, on ulcerogenic and healing responses in rat gastrointestinal mucosa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 322: 903–912.
78. Serrano P, Lanas A, Arroyo MT, Ferreira IJ. Risk of upper gastrointestinal bleeding in patients taking low-dose aspirin for the prevention of cardiovascular diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 1945–1953.

79. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68–69: 165–175.
80. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.* 1997; 49: 15–19.
81. Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology.* 1997; 112: 387–397.
82. Schmassmann A, Peskar BM, Stettler C, Netzer P, Stroff T, Flogerzi B, Halter F. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123: 795–804.
83. Brune K. Safety of anti-inflammatory treatment—new ways of thinking. *Rheumatology.* 2004; 43: i16–i20.
84. Matsui H, Shimokawa O, Kaneko T, Nagano Y, Rai K, Hyodo I. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. *J. Clin Biochem. Nutr.* 2011; 48: 107–111.
85. Giraud MN, Motta C, Romero JJ, Bommelaer G, Lichtenberger LM. Interaction of indomethacin and naproxen with gastric surface-active phospholipids: a possible mechanism for the gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57: 247–254.
86. 岩切龍一. NSAIDs 及び低用量アスピリンと消化管障害. *日本消化器病学会雑誌.* 2009; 106: 1575–1581.
87. Schoen RT, Vender RJ. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am. J. Med.* 1989; 86: 449–458.

88. Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Zhao WW, Geis GS. Antiinflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999; 282: 1921–1928.
89. Laine L, Harper S, Simon T, Bath R, Johanson J, Schwartz H, Stern S, Quan H, Bolognese J. A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis. Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group. *Gastroenterology*. 1999; 117: 776–783.
90. García Rodríguez LA, Barreales Tolosa L. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. *Gastroenterology*. 2007; 132: 498–506.
91. Miyake K, Ueki N, Suzuki K, Shinji Y, Kusunoki M, Hiratsuka T, Nishigaki H, Tatsuguchi A, Futagami S, Wada K, Tsukui T, Nakajima A, Yoshino S, Sakamoto C. Preventive therapy for non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulcers in Japanese patients with rheumatoid arthritis: the current situation and a prospective controlled-study of the preventive effects of lansoprazole or famotidine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2005; 21: 67–72.