

クルクミン投与がカルディオトキシン誘導性筋損傷における
炎症反応、酸化ストレスおよび炎症細胞浸潤に及ぼす影響
**Effects of curcumin administration on inflammatory reactions,
oxidative stress and inflammatory cell infiltration
in cardiotoxin-induced muscle damage**

加藤孝基¹⁾, 川西範明¹⁾, 高橋将記¹⁾, 椎葉大輔²⁾,
大塚喜彦³⁾, 今泉厚³⁾, 鈴木克彦⁴⁾

Kouki Kato¹⁾, Noriaki Kawanishi¹⁾, Masaki Takahashi¹⁾, Daisuke Shiva²⁾,
Yoshihiko Otsuka³⁾, Atsushi Imaizumi³⁾, Katsuhiko Suzuki⁴⁾

¹⁾早稲田大学スポーツ科学研究科

²⁾倉敷芸術科学大学生命科学部

³⁾株式会社セラバリュース

⁴⁾早稲田大学スポーツ科学学術院

¹⁾ Graduate school of Sport Sciences, Waseda University

²⁾ College of Life Science, Kurashiki University of Science and the Arts

³⁾ THERAVALUES CORPORATION

⁴⁾ Faculty of Sport Sciences, Waseda University

キーワード: 炎症反応、筋損傷、酸化ストレス、マクロファージ、好中球

Key words: inflammation, muscle damage, oxidative stress, macrophage, neutrophil

抄 録

【緒言】運動や外傷に伴う筋組織の損傷時には、炎症反応および酸化ストレスが誘導されることが知られている。近年、クルクミンは抗炎症作用および抗酸化作用を示すことが知られている。したがって、クルクミンの示すこれらの作用が、筋損傷後の組織の炎症反応および酸化ストレスにも影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では、カルディオトキシン誘導性の筋損傷モデルを用いて、クルクミン投与が炎症反応および酸化ストレスに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】9週齢のC57BL/6J雄マウス(n=14)の片足脚の前脛骨筋にカルディオトキシン、反対脚の前脛骨筋に対照としてPBSを注入した。また、クルクミン投与群にはカルディオトキシン投与直後にクルクミン3mgを含むPBS溶液を経口投与し、対照群にはPBSを同量経口投与した。クルクミン投与24時間後に採血および前脛骨筋を摘出した。筋組織中のサイトカインのタンパク質濃度はELISA法を用いて測定した。また、遺伝子発現量はreal-time PCR法を用いて測定した。

【結果】骨格筋組織内における炎症性サイトカインタンパク質濃度および遺伝子発現量は、カルディオトキシン投与脚においてPBS投与脚と比較して有意に高かった。しかしながら、クルクミン投与による有意な抑制はみられなかった。同様にhydrogen peroxideおよびNADPH-oxidaseの遺伝子発現

は、カルディオトキシン投与脚においてPBS投与脚と比較して有意に高かった。しかしながら、クルクミン投与による有意な抑制はみられなかった。

【結論】クルクミン投与はカルディオトキシン誘導性筋損傷後の炎症反応および酸化ストレスに影響を及ぼさない可能性が示された。

スポーツ科学研究, 9, 29-40, 2012 年, 受付日:2011 年 9 月 1 日, 受理日:2012 年 4 月 30 日
連絡先: 鈴木克彦 〒359-1192 埼玉県所沢市三ヶ島 2-579-15 早稲田大学スポーツ科学学術院
Tel & Fax: 04-2947-6898 E-mail: katsu.suzu@waseda.jp

I. 緒言

運動や外傷に伴い骨格筋組織の損傷が引き起こされると、炎症反応および酸化ストレスが誘導されることが知られている。実際に、圧迫損傷および薬物投与誘導性筋損傷モデルを用いた動物実験において、損傷後の前脛骨筋で炎症性サイトカインの一種である TNF- α の遺伝子発現が増加することが報告されている (Collins RA and Grounds MD, 2001; Pelosi L et al., 2007)。ヒトを対象とした研究においても、筋損傷を誘発するダウンヒル運動後には外側広筋の IL-1 β の遺伝子発現が増加することが報告されている (Fielding RA et al., 1993)。また、マウスにおいてダウンヒル運動後に腓腹筋の過酸化水素 (hydrogen peroxide: H₂O₂) や一酸化窒素 (NO) の濃度が増加することが報告されている (Liao P et al., 2010; Lima-Cabello E et al., 2010)。H₂O₂ は NADPH-oxidase を介して産生されることが明らかになっているが、NADPH-oxidase は主にマクロファージや好中球に存在することから酸化ストレスの誘導にはこれらの炎症細胞が重要と考えられている。興味深いことに、薬物投与やダウンヒル運動による筋損傷後にもマクロファージや好中球の活性化や組織浸潤が亢進することも明らかになっている (Tsivitse SK et al., 2003; Martinez CO et al., 2010)。したがって、筋損傷後の炎症反応や酸化ストレスの誘導にはマクロ

ファージや好中球が関与する可能性が考えられる。

天然ウコンの主成分であるクルクミンは様々な疾患モデルにおいて抗炎症作用、抗酸化作用を示すことが明らかにされている (Biswas SK et al., 2005; Menon VP and Sudheer AR, 2007)。実際に、クルクミンは誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の産生を抑制することが明らかにされている (Aggarwal BB et al., 2004)。iNOS はフリーラジカルの NO 産生を誘導することにより TNF- α などの炎症反応を増幅させる。さらに、クルクミンは、腸での吸収によりテトラヒドロクルクミンという抗酸化物質に変化することが知られており (Osawa T et al., 1995)、テトラヒドロクルクミンはマウスの生体内酸化を抑制することが報告されている (角ら, 2001)。興味深いことに、近年ダウンヒル運動を用いた動物実験において、クルクミン投与によりマウス骨格筋の IL-1 β 、IL-6、TNF- α タンパク質濃度の上昇が抑制されることが報告された (Davis JM et al., 2007)。加えて、我々はクルクミン投与がダウンヒル運動後の酸化ストレスを減少させ、これらの現象にマクロファージの浸潤抑制が関与する可能性について明らかにしている (未発表データ)。しかしながら、ダウンヒル運動は筋損傷の誘導に加え、様々な呼吸循環応答や代謝性変化などの全身的要因を伴うことが考えられる。IL-6 は運動中の糖・脂質代謝に関与し、エネルギー

供給に積極的に働くことが指摘されており (Pedersen BK et al., 2003)、1 時間以上の 60%Vo₂max の持久性運動時には、IL-6 および TNF- α の血漿濃度が増加することが報告されている (Pedersen BK et al., 2003; Nieman DC et al., 2003)。したがって、クルクミン投与による筋損傷後の炎症反応を検討するために、これらの全身的要因を排除した純粋な筋損傷モデルを用いる必要がある。マウスの骨格筋に筋損傷を惹起する薬物であるカルディオトキシンは、筋損傷を引き起こすだけでなく炎症反応および酸化ストレスを誘導することが明らかになっており、骨格筋の損傷と修復の機序を解明するために多くの研究で用いられている。

そこで本研究では、クルクミンを経口で単回投与し、マウスのカルディオトキシン誘導性筋損傷後の骨格筋組織の炎症反応、酸化ストレスおよび炎症細胞浸潤に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

II. 方法

1. 実験動物と飼育条件

本実験では 9 週齢の C57BL/6J 雄マウス (紀和実験動物研究所, Wakayama, Japan) を用いた。室温 21°C、湿度 35%、21:00-9:00 を暗期に 9:00-21:00 を明期に設定した飼育室において、ゲージ内で飼育した。MF (オリエンタル酵母, Tokyo, Japan) の飼料を使用し、飲水は水道水を用い、ともに自由摂取とした。マウス (n=14) の片足脚にカルディオトキシン (CTX)、反対脚にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を投与し、無作為にクルクミン非投与群 (n=7)、クルクミン投与群 (n=7) に群分けした。

なお、本実験は早稲田大学動物実験委員会の承認を得て行った (10K001)。

2. カルディオトキシン (cardiotoxin) 投与

片足脚の前脛骨筋に cardiotoxin (Sigma, St. Louis, MO, USA) を PBS で希釈し、10 μ mol/l 濃度で 100 μ l 注入した。また、対照として反対脚の前脛骨筋に PBS を 100 μ l 注入した。

3. クルクミン投与

クルクミン投与群には前脛骨筋にカルディオトキシンおよび PBS を注入した直後にイソフルラン吸入麻酔下にてマウス1匹あたりクルクミン (細粒化クルクミン: 株式会社セラバリュース, Tokyo, Japan) 成分 3mg を含む PBS を 200 μ l 経口投与した。クルクミン非投与群には PBS を 200 μ l 経口投与した。なお、経口投与にはマウス用ゾンデ (夏目製作所, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 筋組織採取

クルクミン投与 24 時間後に麻酔下で安楽死後に解剖を行い、両脚から前脛骨筋を摘出した。摘出した前脛骨筋は、RNA later (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) に浸して液体窒素で凍結させた後、-80°C の冷凍庫にて保存した。

5. Real-time quantitative PCR

前脛骨筋の Total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, California, USA) および RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Valencia, California, USA) を用いて抽出した。その後 Nano Drop system (Nano Drop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) を用いて RNA 濃度を測定した。Total mRNA は、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) を用いて、逆転写反応により cDNA を作製した。cDNA は、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems,

Carlsbad, California, USA)を用いて Fast real-time PCR 7500 装置 (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)により定量した。PCR 条件は、95°Cで 10 分間 cDNA を変性させた後に、1 サイクル 95°Cで 15 秒間、60°Cで 1 分間の条件で、40 サイクル繰り返した。

構成的に発現する遺伝子として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した。標的遺伝子および内因性遺伝子として使用したプライマーを表 1 に示した。

表 1. Real-time PCR に用いたプライマーの塩基配列

gene	forward	reverse
GAPDH	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
TNF- α	CCTCCCTCTCATCAGTTCTA	ACTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-6	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-1 β	CTGGAGAGTGTGGATCCCAAG	GGAAGACACGGATTCCATGGTG
IL-12	GGAGCACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
NADPH-oxidase	TTGGGTCAGCACTGGCTCTG	TGGCGGTGTCAGTGCTATC
iNOS	CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC	CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC
MCP-1	CTTCTGGGCTGCTGTTC	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
F4/80	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TNF- α : tumor necrosis factor-alpha
 IL: interleukin, NADPH-oxidase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase,
 iNOS: inducible nitric oxide synthase, MCP-1: monocyte chemotactic protein-1

6. タンパク質濃度測定

前脛骨筋は Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) with Protease inhibitor (Thermo, Rockford, Illinois, USA)溶液でホモジナイズした後、10,000xG、10 分間の条件で遠心操作を行い上清のタンパク質を分離した。タンパク濃度は BCA Protein Assay (Thermo, Rockford, Illinois, USA)を用いて測定した。

前脛骨筋内の TNF- α タンパク質濃度は Mouse TNF- α ELISA kit (R&D systems, Mckinley, Minnesota, USA)、MCP-1 タンパク質濃度は Mouse MCP-1 ELISA kit (R&D systems, Mckinley, Minnesota, USA)を用いて測定した。MPO タンパク質濃度は、Mouse MPO ELISA kit (Hycult Biotech, Uden, Netherland)を用いて測定した。なお、吸光度の測定には VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, California, USA)を使用した。

7. H₂O₂ 濃度測定

H₂O₂ 濃度は SensoLyte ADHP hydrogen peroxide assay kit (Fremount, California, USA)を用いて測定した。なお、蛍光強度の測定には FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Offenburg, Germany)を使用した。

8. 血漿中および前脛骨筋中のクルクミン濃度

マウス (n=4)にクルクミンを投与し、0, 1, 3, 6 および 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈から血液をヘパリン処理真空採血管 (TERUMO, Tokyo, Japan)に採取した。採取した血液は、2,600xG、10 分間の条件で遠心し、上清の血漿を分離し-80°Cにて凍結保存した。また、両脚から前脛骨筋を摘出した。摘出した前脛骨筋は液体窒素で凍結させた後、-80°Cにて凍結保存した。摘出した血漿および前脛骨筋は、HPLC-MS/MS システム法にて解析定量を行った (Sasaki et al., 2011)。

9. 統計処理

結果は、平均値±標準誤差で表した。カルディオトキシン投与およびクルクミン投与を要因とした測定項目の変化については二元配置分散分析を行い、有意水準は 5%未満とした。多重比較検定は Turkey's test を行い、有意水準は 5%未満とした。

III. 結果

クルクミン投与による血中および骨格筋組織におけるクルクミン濃度の変化

血中および骨格筋組織のクルクミン動態を検討するために、投与前、投与 1、3、6 および 24

時間後の血漿中および前脛骨筋のクルクミン濃度を測定したところ、いずれも投与 1 時間後にピークを示した (図 1A および B)。血漿中のクルクミン濃度は、投与前:0、投与 1 時間後: 2692.5 (2310.0~3170.0)、3 時間後:2325.0 (1800.0~2770.0)、6 時間後:1087.5 (740.0~1410.0)、24 時間後:97.3 (29.5~152.0){平均値 ng/mg (最小値~最大値)}であった。また、前脛骨筋のクルクミン濃度は、投与前:0、投与 1 時間後:18.1 (10.9~32.4)、3 時間後:15.6 (12.1~20.3)、6 時間後:5.0 (3.4~6.3)、24 時間後:0.6 (0.5~0.8) {平均値 ng/mg (最小値~最大値)}であった。

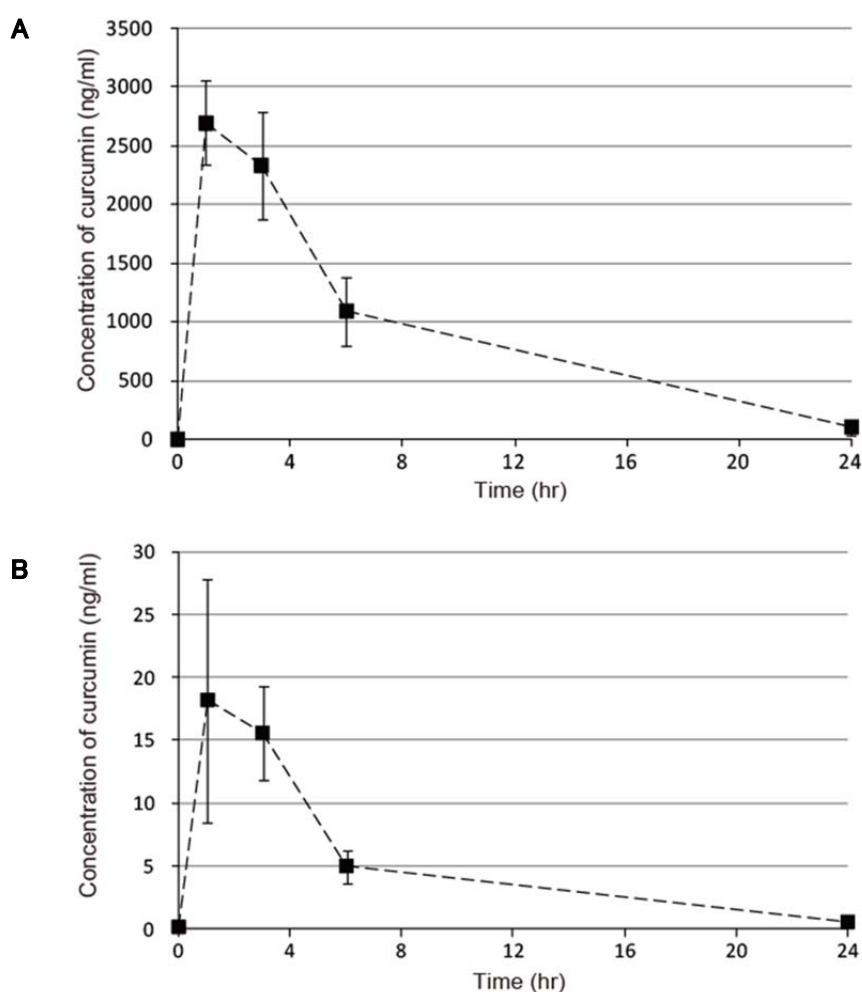


図 1. クルクミン投与0, 1, 3, 6, 24時間後のマウスの血漿クルクミン濃度 (A) および前脛骨筋のクルクミン濃度 (B) (平均値±標準誤差)

クルクミン投与によるカルディオトキシン誘導性の炎症反応の変化

骨格筋組織の炎症反応を検討するために、炎症性サイトカインのタンパク質濃度および遺伝子発現を測定した。TNF- α タンパク質濃度は PBS 投与脚においては検出感度 (7.8pg/mg)未満であったが、カルディオトキシン (CTX)投与脚においては検出感度以上の濃度を示した。しかしながら、CTX 投与脚においてク

ルクミン投与による有意な変化はみられなかった (8.75 \pm 0.64 vs 9.31 \pm 0.918 pg/mg) (図 2)。また、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6、IL-1 β および IL-12 の遺伝子発現は PBS 投与脚と比べて CTX 投与脚において有意な高値を示した。しかしながら、PBS 投与脚および CTX 投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 3A-D)。

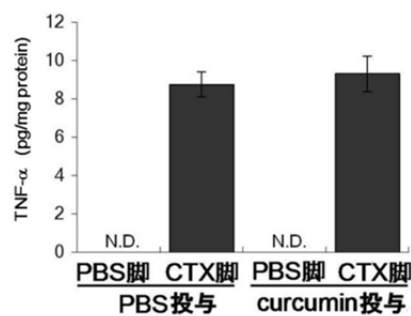


図 2. クルクミン投与および PBS 投与による PBS 投与脚およびカルディオトキシン (CTX) 投与脚の TNF- α のタンパク質濃度の変化 (平均値 \pm 標準誤差)

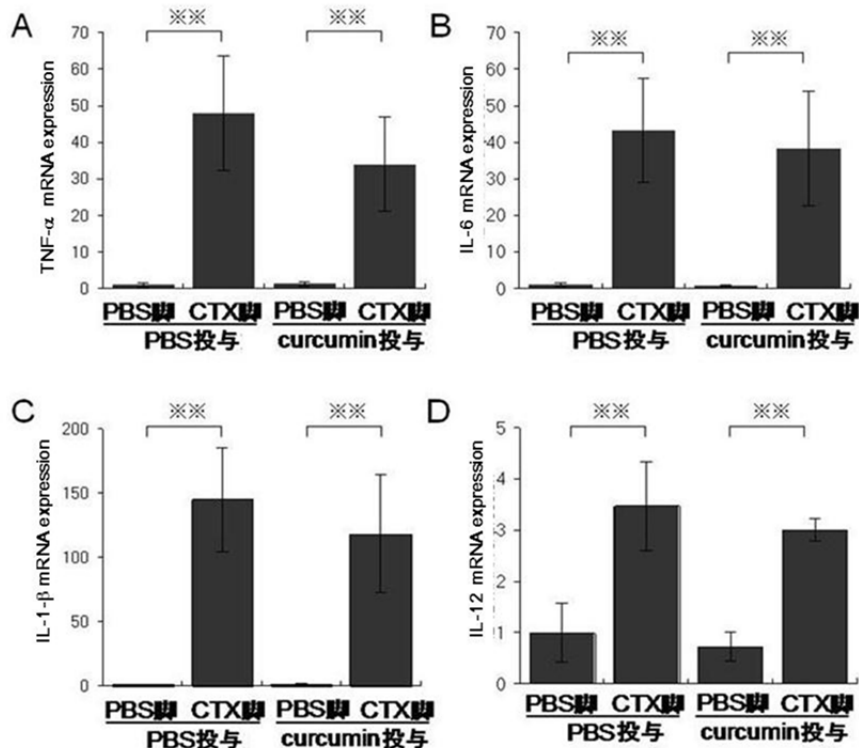


図 3. クルクミン投与および PBS 投与による PBS 投与脚およびカルディオトキシン (CTX)投与脚の TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), IL-12 (D)の遺伝子発現の変化 (平均値 \pm 標準誤差、***p<0.01)

クルクミン投与によるカルディオトキシン誘導性の酸化ストレスの変化

骨格筋組織の酸化ストレスを検討するために、過酸化水素 (H_2O_2) 濃度および NADPH-oxidase, iNOS の遺伝子発現を測定した。 H_2O_2 濃度は PBS 投与脚と比べて CTX 投与脚において有意に高値を示した。しかしながら、PBS 投与脚および CTX 投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 4)。同様に、 H_2O_2 の発生を誘導する NADPH-oxidase の遺伝子発現は PBS 投与脚と比べて CTX 投与脚において有意に高値を示

したが、PBS 投与脚および CTX 投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 5A)。加えて、NO を産生する iNOS の遺伝子発現は PBS 投与脚と比べて CTX 投与脚において有意な高値を示したが、PBS 投与脚および CTX 投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 5B)。また、ミエロペルオキシターゼ (MPO) のタンパク質濃度は PBS 投与脚と比べて CTX 投与脚において有意に高値を示したが、PBS 投与脚および CTX 投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 6)。

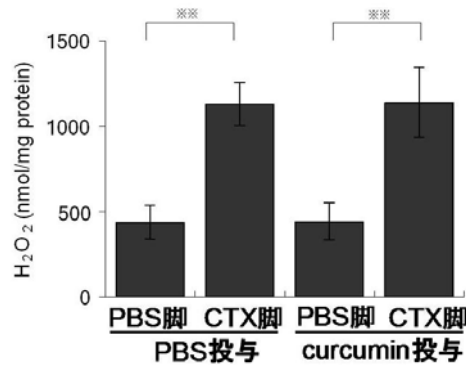


図 4. クルクミン投与および PBS 投与による PBS 投与脚およびカルディオトキシン (CTX)投与脚の H_2O_2 濃度の変化 (平均値±標準誤差、*** $p < 0.01$)

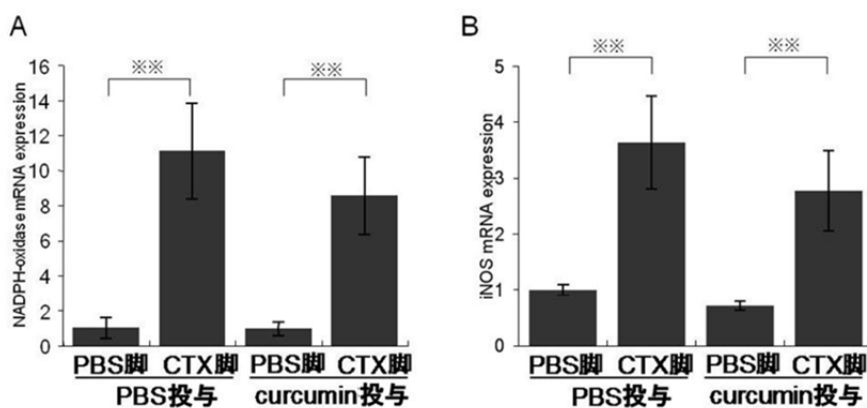


図 5. クルクミン投与および PBS 投与による PBS 投与脚およびカルディオトキシン (CTX)投与脚の NADPH-oxidase (A), iNOS (B) 遺伝子発現の変化 (平均値±標準誤差、*** $p < 0.01$)

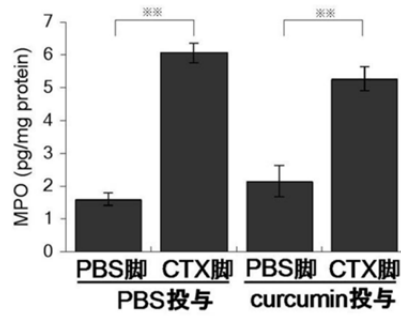


図 6. クルクミン投与およびPBS投与によるPBS投与脚およびカルディオトキシン (CTX)投与脚のMPOタンパク質濃度の変化 (平均値±標準誤差、**p<0.01)

クルクミン投与によるカルディオトキシン誘導性のマクロファージ浸潤の変化

骨格筋組織のマクロファージ浸潤を検討するために、F4/80 および MCP-1 の遺伝子発現を測定した。マクロファージの組織浸潤を特異的に誘導するMCP-1のタンパク質濃度はPBS投与脚と比べてCTX投与脚において有意に高値を示した。しかしながら、PBS投与脚およびCTX投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 7)。また、マクロファージ

に特異的に発現するタンパク質を認識する抗体F4/80の遺伝子発現はPBS投与脚と比べてCTX投与脚において有意に高値を示した。しかしながら、PBS投与脚およびCTX投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 8A)。加えて、MCP-1の遺伝子発現はPBS投与脚と比べてCTX投与脚において有意な高値を示した。しかしながら、PBS投与脚およびCTX投与脚ともにクルクミン投与による有意な変化はみられなかった (図 8B)。

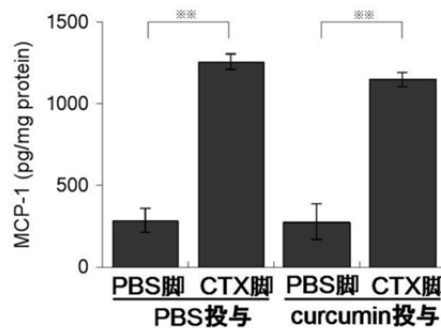


図 7. クルクミン投与およびPBS投与によるPBS投与脚およびカルディオトキシン (CTX)投与脚のMCP-1タンパク質濃度の変化 (平均値±標準誤差、**p<0.01)

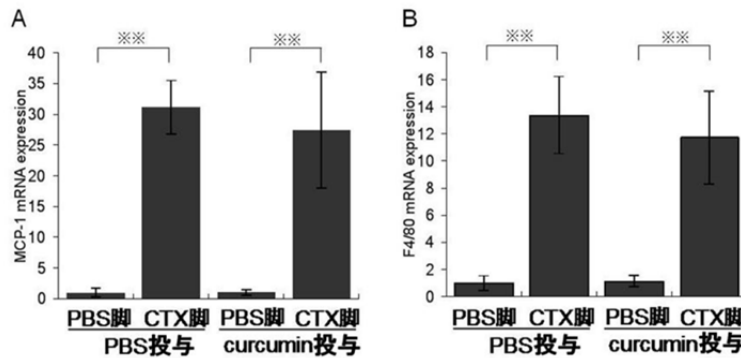


図 8. クルクミン投与およびPBS投与によるPBS投与脚およびカルディオトキシン (CTX)投与脚のMCP-1 (A), F4/80 (B) 遺伝子発現の変化 (平均値±標準誤差、**p<0.01)

IV. 考察

骨格筋の損傷に伴い炎症反応や酸化ストレスが誘導されることが明らかにされている。本研究では、マウス骨格筋の筋損傷を誘導する薬剤であるカルディオトキシン投与により、前脛骨筋における種々の炎症性サイトカインの遺伝子発現やタンパク質濃度が増加することに加え、 H_2O_2 濃度および NADPH-oxidase の遺伝子発現が増加することが示された。近年、骨格筋損傷時の炎症反応や酸化ストレスはマクロファージや好中球などの炎症細胞によって調節されていることが報告されているが、本研究ではカルディオトキシン投与によってマクロファージの浸潤を特異的に誘導する MCP-1 遺伝子発現や F4/80 遺伝子発現が増加することが示された。さらに、MPO 濃度がカルディオトキシン投与により増加することも示された。NADPH-oxidase は主にマクロファージや好中球の細胞膜に存在し、 H_2O_2 の産生を誘導することが知られている (Powers SK and Jackson MJ. 2008)。また、MPO は H_2O_2 から次亜塩素酸 (HOCl) 産生を誘導することが知られている。したがって、カルディオトキシン投与によって炎症反応や酸化ストレスが誘導されるが、これらの現象はマクロファージや好中球の浸潤亢進によって生じた可能性が考えられる。

一方で、抗炎症作用、抗酸化作用を示すクルクミンは筋損傷後の炎症反応を抑制することが明らかにされている。実際に、ダウンヒル運動を用いた筋損傷モデルにおいて、損傷 4 日前からのクルクミン投与により、損傷 24 時間後の TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカイン濃度が減少することが報告されている (Davis JM et al., 2007)。しかしながら、150 分のダウンヒル運動には物理的な筋損傷のみでなく様々な全身的要因の影響を伴うことから、純粋な筋損傷誘導モデルによる反応とは異なる可能性が考え

られる。本研究ではこれらの影響を除いた筋損傷時のクルクミン投与による影響を検討したが、クルクミン投与はカルディオトキシン投与 24 時間後の炎症性サイトカインの遺伝子発現、NADPH-oxidase 遺伝子発現および H_2O_2 濃度などの酸化ストレス指標に影響を及ぼさなかった。また、MCP-1 および F4/80 の遺伝子発現にも影響がみられなかったことから、本研究で用いた筋損傷モデルにおいては、少なくとも筋損傷後のクルクミン投与はマクロファージの浸潤を抑制することなく、炎症反応や酸化ストレスにも変化が認められなかった可能性が考えられる。有酸素運動時には、ミトコンドリア電子伝達系のアデノシン三リン酸 (ATP) 産生過程で H_2O_2 などの活性酸素が産生されることが知られている (Powers SK et al., 2008)。一方で、筋損傷時にはマクロファージなどの炎症細胞が組織に浸潤し、貪食を行った際に細胞膜に存在する酸化酵素である NADPH-oxidase が活性化され、 H_2O_2 などの活性酸素が生成されることが知られている (Halliwell B et al. 2007)。さらにこれらの活性酸素は、NF- κ B などのシグナル伝達経路を活性化し、IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導していることが知られている (Gloire G et al., 2006; Baeuerle PA, 1998)。本研究より、カルディオトキシン投与による炎症性サイトカインおよび活性酸素の増加は炎症細胞の組織浸潤によるものであり、局所的な筋組織損傷後の炎症反応と酸化ストレスは、クルクミン投与により抑制されないことが示唆された。今後は、クルクミンの示す運動時の炎症反応への影響について、筋損傷を伴わない低強度の持久性運動モデルを用いて検討する必要があると思われる。

また、クルクミンの影響が認められなかった要因として、ダウンヒル運動誘導性筋損傷に比べ、カルディオトキシン誘導性筋損傷時には炎症の

程度が大きいことが挙げられる。これまでに、150 分のダウンヒル運動 (22m/min, -14%) 24 時間後には、筋損傷マーカーであるクレアチンキナーゼ活性がおよそ 220U/L まで上昇することが報告されている (Davis et al., 2007)。一方で、カルディオトキシン投与 24 時間後にはおよそ 600U/L まで上昇する (Shi H et al., 2010)。さらに、Davisらによる研究 (2007)では、炎症性サイトカインである TNF- α のタンパク質濃度が、ダウンヒル運動 24 時間後に 20pg/100 μ g protein まで上昇したのに対し、我々の研究ではカルディオトキシン投与 24 時間後におよそ 85pg/100 μ g protein まで上昇した。したがって、カルディオトキシン誘導性筋損傷はダウンヒル誘導性筋損傷に比べ過度の炎症を伴うために、クルクミンの効果が認められなかったと考えられる。さらに、クルクミンの投与タイミングも影響を及ぼす要因と考えられる。Davis らの研究では、運動 72 時間前よりクルクミン粉末を含む餌を摂取させていたのに対し、我々はカルディオトキシン投与直後にクルクミンを経口投与した。本研究では、通常のクルクミンの約 30 倍もの吸収性が認められている細粒化された高吸収クルクミンを用いた。したがって、先行研究同様のプロトコルを用いるとクルクミンの吸収が過剰となるおそれがあるために本投与タイミングとした。Davis らの先行研究では血中および筋組織中のクルクミン濃度が検討されていないため、我々の研究とクルクミン吸収動態を比較することは困難であるが、これらのプロトコルの違いが及ぼす影響も検討する必要がある。さらに Davis らの研究ではヒラメ筋が用いられている。本研究では、カルディオトキシン投与筋損傷モデルで一般的に用いられている前脛骨筋を対象としたが、前脛骨筋はヒラメ筋に比べ速筋繊維が多く含まれているため、これらの筋繊維タイプの違いが及ぼす影響も考慮して今後実験を行う必要がある。

本研究では、過度の筋損傷モデルを用いてクルクミン投与の影響を検討したが、今後はより軽度な筋損傷モデルを用いることや、組織学的手法による免疫細胞の浸潤について検討することが必要である。また、本研究ではカルディオトキシン投与直後にクルクミン摂取を行ったが、損傷前から摂取させ、筋損傷抑制効果についてさらなる検討を行う必要があると考えられる。

V. 結論

カルディオトキシンによる筋損傷誘導により過剰な炎症反応および酸化ストレスが生じるものの、少なくとも筋損傷後のクルクミン投与はこれらの現象には影響を及ぼさない可能性が示された。

VI. 参考文献

- 1) Aggarwal BB, Shishodia S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Ann N Y Acad Sci.* 1030: 434-441. 2004.
- 2) Baeuerle PA. IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell.* 95(6): 729-731. 1998
- 3) Biswas SK, McClure D, Jimenez LA, Megson IL, Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal.* 7(1-2): 32-41.7: 32-41, 2005.
- 4) Collins RA, Grounds MD. The role of

- tumor necrosis factor- α (TNF- α) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-)/LT- α (-/-) mice. *J Histochem Cytochem.* 49(8): 989-1001, 2001.
- 5) Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(6): R2168-2173, 2007.
 - 6) Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, and Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 265: R166-R172, 1993.
 - 7) Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 72(11): 1493-1505. 2006
 - 8) Halliwell B. Gutteridge, J. Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Oxford Press*; 2007.
 - 9) Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298(3): R599-607, 2010.
 - 10) Lima-Cabello E, Cuevas MJ, Garatachea N, Baldini M, Almar M, González-Gallego J. Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor- κ B modulation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* Mar;108(3): 575-583, 2010.
 - 11) Martinez CO, McHale MJ, Wells JT, Ochoa O, Michalek JE, McManus LM, Shireman PK. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(3): R832-842, 2010.
 - 12) Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol.*595:105-125. Review, 2007.
 - 13) Nieman DC. Current perspective on exercise immunology. *Curr Sports Med Rep.* Oct; 2(5):239-242. Review. 2003
 - 14) Osawa T, Sugiyama Y, Inayoshi M, Kawakishi S. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Biosci Biotechnol Biochem.* Sep; 59(9): 1609-1612. 1995.
 - 15) Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C, Wannenes F, Battistini L, Rosenthal N, Molinaro M,

- Musarò A. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J.* 21(7): 1393-1402, 2007.
- 16) Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil.*;24(2-3): 113-119. Review. 2003
- 17) Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88: 1243-1276; 2008.
- 18) Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, Katanasaka Y, Takeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol Pharm Bull.* 34(5): 660-665. 2011
- 19) Tsivitse SK, McLoughlin TJ, Peterson JM, Mylona E, McGregor SJ, Pizza FX. Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 90(5-6): 633-638, 2003.
- 20) 角紘幸、上野有紀、堀尾文彦、沢田孝範、大澤俊彦:テトラヒドロクルクミンの糖尿病への効果日本農芸化学会誌:75 臨時増刊 288, 2001