

中分子ヘパリエルアミノ酸誘導体のラジカルスカベンジング作用及び  
機序の検討

Studies on the free radical-scavenging action of medium heparinyl  
amino acid derivatives and the elucidation of their mechanism.

論文内容の要旨

学位申請者 武田 誠一

学位論文題名

中分子ヘパリンアミノ酸誘導体のラジカルスカベンジング作用及び機序の検討

**Studies on the free radical-scavenging action of medium heparinyl amino acid derivatives and the elucidation of their mechanism.**

学位申請者 武田 誠一

**【緒言】**

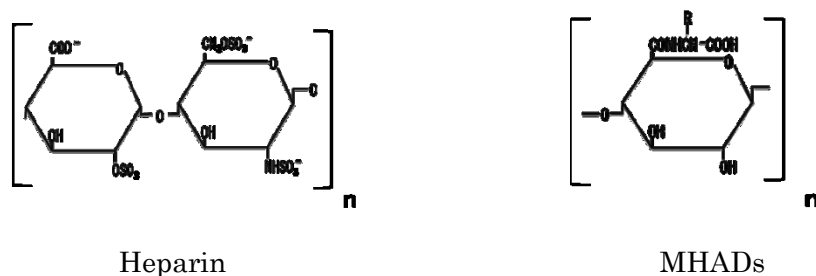
近年、ヘパリン (HE) の抗血液凝固作用に起因した副作用である出血傾向を軽減する目的で低分子 HE が開発され、HE に代わる抗血液凝固剤として医療現場で用いられるようになった<sup>1-3)</sup>。申請者の所属する製薬企業の主力製品は透析液である。HE 等の抗血液凝固剤は血液透析療法に不可欠であり、申請者の所属する製薬企業においても中分子 HE の研究を行うこととなった。この時申請者は、HE の抗血液凝固作用以外の薬理作用にも注目した。HE は抗血液凝固作用の他、リポ蛋白リパーゼの放出、補体活性化の抑制及び抗炎症作用等の報告がある<sup>4-7)</sup>。さらに血管内皮細胞から Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) の放出を促す作用も報告されている<sup>8-11)</sup>。一方で近年、フリーラジカルが様々な疾病 [癌 (血管新生)、腎障害あるいは心筋の障害等] に関与していることが報告されている<sup>12-16)</sup>。これらの疾病に対し SOD を使用した報告もある<sup>17-20)</sup>。しかし、人工的に合成した SOD には免疫原性があり<sup>21,22)</sup>、継続使用不可能である。他にエダラボンやトコフェロール等以外に、ラジカルスカベンジャーとして用いる医薬品は少ない。EC-SOD は銅を含む 135 KDa の内在性の SOD<sup>23-26)</sup>であり免疫原性はない。生体から EC-SOD を放出させるという HE の間接的なラジカルスカベンジング作用は、フリーラジカルが関与する疾病の予防や治療に有用かもしれない。しかしながら HE には出血傾向といった副作用があり、用量は制限される。低分子化することによって HE の出血傾向を軽減し、他の有益な薬理作用だけを残すことが可能ならば理想的であるが、これまでにそのような報告はない。申請者は通常の HE と、所属する企業で開発された中分子ヘパリン (MHE) 及び MHE にアミノ酸を付加した 11 種類の中分子ヘパリンアミノ酸誘導体<sup>27)</sup> (MHADs) を用いて出血傾向に関する項目の比較及びラジカルスカベンジング作用について検討を行い、HE よりも安全で有効な中分子ヘパリンアミノ酸誘導体を探索した。

**【第一章 *In vitro* における MHADs のフリーラジカル起因の細胞傷害に対する作用の検討】**

申請者はヒト正常血漿を検体として、HE、MHE 及び MHADs の *in vitro* における血液凝固能の検査項目である活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。またフリーラジカルによりヒトさい帯静脈内皮細胞 (HUV-EC) を傷害し、その傷害に対する MHADs の作用を検討した。

## 第一節 APTT の測定

既報の方法<sup>27)</sup>により HE 原末から合成した以下の MHADs (分子量 8,500~10,000) を実験に供した. すなわち, 中分子ヘパリン (MHE), 中分子ヘパリニルアラニン (MHA), 中分子ヘパリニルアスパラギン酸 (MHD), 中分子ヘパリニルフェニルアラニン (MHF), 中分子ヘパリニルグリシン (MHG), 中分子ヘパリニルヒスチジン (MHH), 中分子ヘパリニルロイシン (MHL), 中分子ヘパリニルメチオニン (MHM), 中分子ヘパリニルプロリン (MHP), 中分子ヘパリニルアルギニン (MHR), 中分子ヘパリニルセリン (MHS)及び中分子ヘパリニルチロシン (MHY) を用いた.



MHADs ではヘパリンを構成する糖の一部が右のような構造になっている.

ヒト正常血漿 9 容量に, マグネシウムとカルシウムを除いたリン酸緩衝生理食塩液 (PBS(-)) を用いて様々な濃度に調製した HE, MHE 及び MHADs の 1 容量を加えて被験血漿とした. 別に PBS(-) 1 容量をとり, 被験血漿と同様に操作し, 対照血漿とした. 被験血漿及び対照血漿につき, 活性化部分トロンボプラスチン試薬及び塩化カルシウム溶液を添加後, 血漿凝固時間自動測定器アメルング KC10A を用いて, 各血漿の APTT を測定した. Table 1 にヒト正常血漿の APTT を 100 秒に延長するのに要する各被験物質の濃度及び HE との比を表した. MHE はヒト正常血漿の APTT を 100 秒に延長するために, HE の 3.09 倍の濃度を必要とした. MHADs はヒト正常血漿の APTT を 100 秒に延長するために, HE の約 6~18 倍の濃度を必要とした.

Table 1. Effect of MHADs on APTT using human plasma.

Compounds	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of compounds that APTT is 100 seconds.	Ratio to the HE
HE	4.79	1.00
MHE	14.79	3.09
MHA	30.90	6.45
MHD	31.56	6.59
MHF	40.27	8.41
MHG	53.70	11.21
MHH	57.54	12.01
MHL	35.96	7.51
MHM	35.48	7.41
MHP	28.18	5.88
MHR	85.11	17.77
MHS	26.86	5.61
MHY	38.90	8.12

HE は様々な分子量の混合物であり、抗血液凝固作用はその分子量と相関する<sup>28)</sup>。MHE や MHADs より分子量の大きい HE は、今回用いた被験物質の中で最も強い出血傾向を示すことが考えられる。本結果より APTT を 100 秒に延長するのに、HE より高濃度が必要であった MHE や MHADs は、同濃度で比較した場合、HE より APTT 延長は軽度であると考えられる。さらに MHE よりも MHADs の APTT 延長は軽度であると考えられる。すなわち、MHADs は HE や MHE よりも出血傾向が発現するまでに高濃度を用いることが可能であることが判明した。また、同程度の分子量ながら MHADs と MHE の APTT の結果が異なるのは、アミノ酸付加による構造の変化に起因したアンチトロンビン III に対する親和性の変化などが生じている可能性がある。

## 第二節 フリーラジカルによる傷害後のヒトさい帯静脈内皮細胞 (HUV-EC) の cell viability 測定

実験には HUV-EC を供し、20%ウシ胎児血清及びウシ脳抽出液、Epidermal growth factor, ハイドロコーチゾン, ゲンタマイシン, アンフォテリシンを含んだ HE フリーの血管内皮細胞培養用添加因子セットを添加した M-199 培地を用いて培養した。in vitro において Hiebert と Liu の方法<sup>29)</sup>に準じてフリーラジカルを発生させた。すなわちフラスコ内で subconfluent な状態の HUV-EC を 0.25%トリプシン : 0.02% EDTA=1 : 1 混合溶液で処理し、回収し、6 穴プレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種し、1%ウシ胎児血清のみを含んだ M-199 培地を用いて 24 時間培養した。その後、6 穴プレートの各 well にキサントシン (X) (0~1  $\mu\text{mol/mL}$ ) 及びキサントシンオキシダーゼ (XO) (0.2 または 0.4 U/mL) を加えた。X 及び XO 添加 24 時間後にプレート中 HUV-EC を再びトリプシン : EDTA=1 : 1 混合溶液で処理し、回収した。回収した細胞浮遊液と同量の 0.2%トリパンブルー溶液を加えた。血球計算盤を用いて細胞とトリパンブルー混液中の細胞質・核全体が青染された細胞と非染色細胞を区別して計測し、cell viability を算出した。

予備検討として、HUV-EC に傷害を与えるために用いる X 及び XO の最適濃度の検討と、HUV-EC がフリーラジカルによって受ける傷害に対する HE の作用及び作用させるタイミングを検討した。X 及び XO の最適濃度の検討には X (0.001, 0.01, 0.1 あるいは  $1 \mu\text{mol/mL}$ ) 及び XO (0.2 あるいは 0.4 U/mL) を供した。HE を作用させるタイミングは HE (50  $\mu\text{g/mL}$ ) の濃度で、次の 3 通りの条件を検討した (Table 2)。

Table 2. Conditions of experiments.

	0	24hr	48hr	72hr
Normal	passage	media exchange	measure	
PBS(-)	passage	X+XO, PBS	measure	
HE-1	passage	HE	X+XO	measure
HE-2	passage	X+XO, HE	measure	
HE-3	passage	HE	X+XO, HE	measure

本文中における数値はすべて平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。群間の有意性は Bartlett 法にて分散の均一性を確認した後、Tukey 法により検定した。有意水準は 0.05 とした。

様々な濃度の X 及び XO により発生させたフリーラジカルによって HUV-EC は傷害を受け、cell viability の低下がみられた。このときの cell viability の低下は、Hiebert と Liu が報告した値<sup>15)</sup>と同様であった。以後の実験における X 及び XO の濃度は (X : 0.01 $\mu$ mol/mL, XO : 0.2 U/mL) とした (Figure 1)。

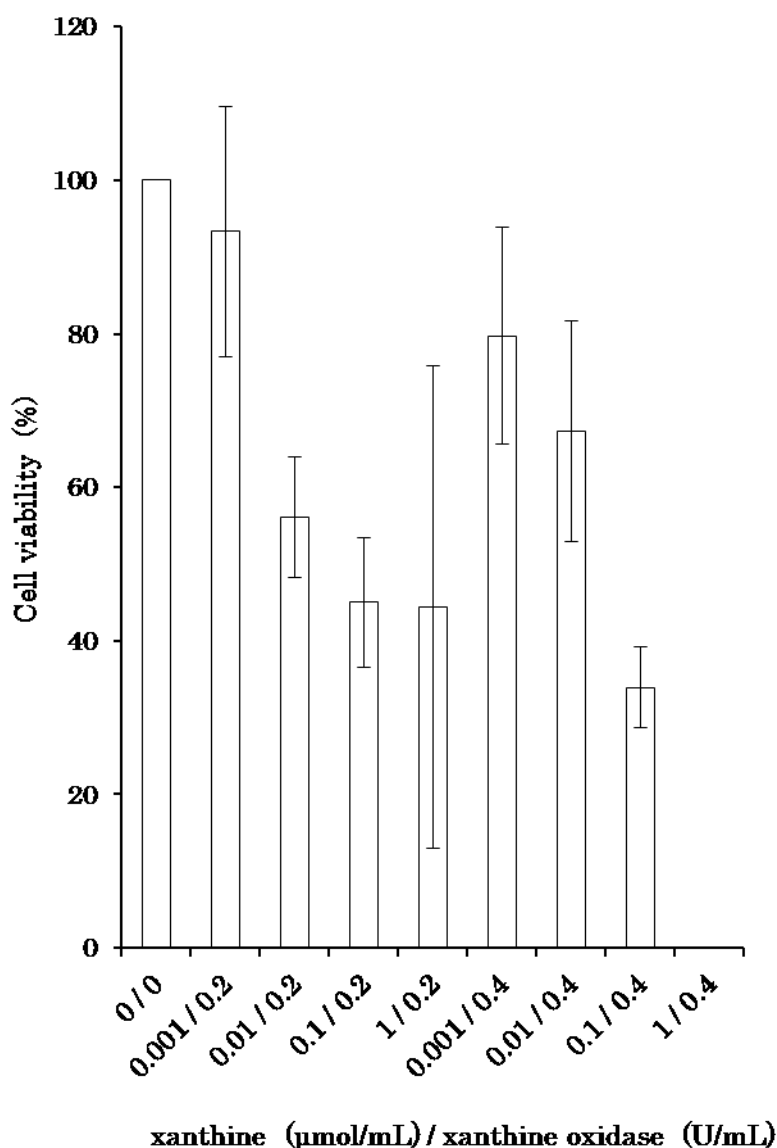


Figure 1. Cell viability after varying concentrations of xanthine and xanthine oxidase were added to media. The mean  $\pm$  S.E. of 3 cultures per group were shown.

HE-1 あるいは HE-3 パターン (Table 2) で HE を添加した場合, HUV-EC の cell viability の低下は抑制されなかった. 一方, HE-2 パターンの場合, cell viability の低下は有意に抑制された. 従って, 以後の MHADs を用いた実験は, HE-2 パターンで行った (Figure 2).

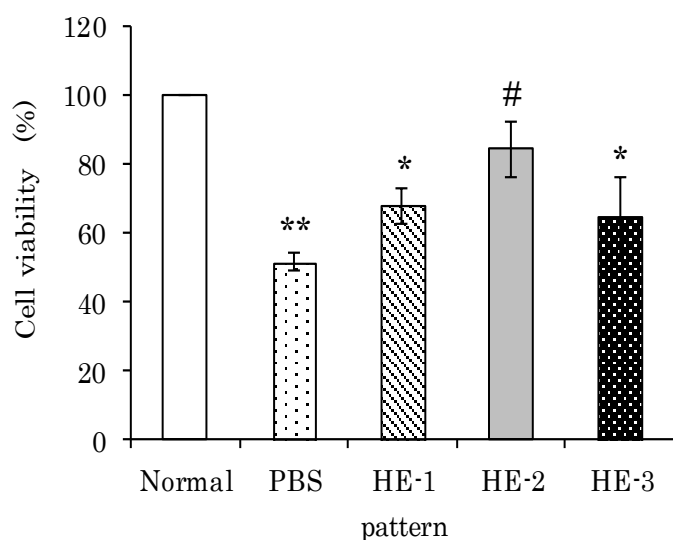


Figure 2. The protective effect of HE on viability of HUV-EC treated with X and XO. HE was added to medium at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

The mean  $\pm$  S.E. of 3 cultures per group were shown.

Significantly different at \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  VS. Normal,

# $P < 0.05$  VS. PBS(-).

MHADs を HE と同様に 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して, 細胞傷害抑制作用を検討した. X と XO により発生させたフリーラジカルによって, PBS(-) のみを加えた well においては, HUV-EC の cell viability の著しい低下がみられた. HE を作用させると HUV-EC の cell viability の低下を抑制する傾向がみられた. MHADs のうち MHD あるいは MHP を作用させると HUV-EC の cell viability の低下を抑制できなかったが, MHF, MHL 及び MHY を作用させると HUV-EC の cell viability の低下は有意に抑制された. また, その他の MHADs においても HUV-EC の cell viability の低下を抑制する傾向がみられた (Figure 3).

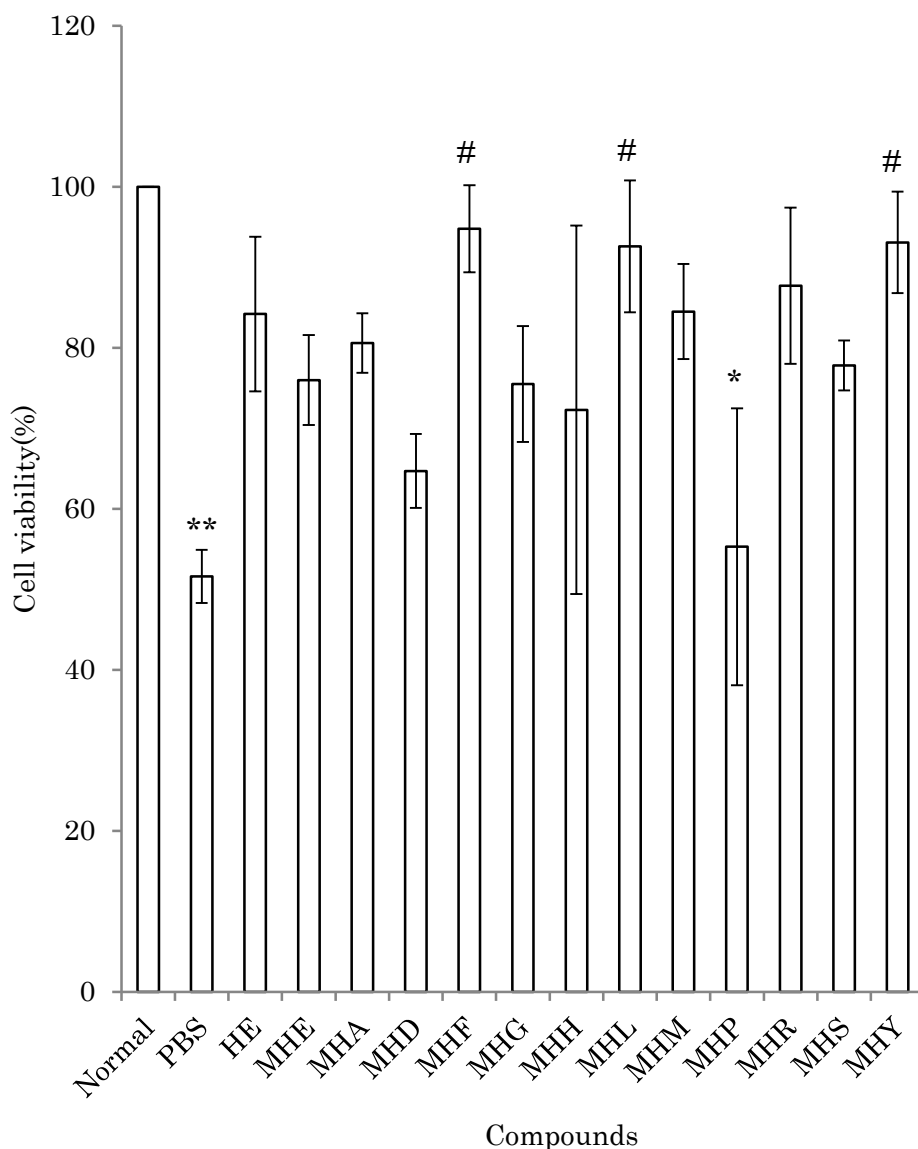


Figure 3. Effects of heparinyl amino acid derivatives on endothelial cells treated with X and XO. All compounds were added to medium at 50  $\mu\text{g/mL}$ . Experiments were performed in triplicate. Significantly different at \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  VS. Normal, # $P < 0.05$  VS. PBS(-).

MHF, MHL 及び MHY はフリーラジカルによる HUV-EC の cell viability の低下を有意に抑制した。MHD 及び MHP を除く他の MHADs は HUV-EC の cell viability の低下を抑制する傾向がみられた。体内に投与された HE は最初に血管内皮に結合し、血管内皮細胞からの EC-SOD の放出を促す<sup>1)</sup>。傷害を受けた HUV-EC の表面上は一時的にプラスに荷電する<sup>30)</sup>という報告がある。HE はマイナスに荷電したグリコサミノグリカ

ンであり、容易に HUV-EC に結合すると考えられる。HE から合成された MHE もマイナスに荷電している可能性があり、フェニルアラニン、ロイシン及びチロシンは酸性アミノ酸ではないが、MHF, MHL 及び MHY は全体的にはマイナスに荷電している可能性がある。

#### 【小括】

- MHE は、ヒト正常血漿の APTT を 100 秒に延長するのに、HE の 3.09 倍の濃度を必要とした。
- MHADs は、ヒト正常血漿の APTT を 100 秒に延長するのに、HE の約 6~18 倍の濃度を必要とした。
- 上記の結果より、同濃度を用いた場合、HE より MHE の APTT 延長は軽度であり、MHE よりも MHADs の APTT 延長はさらに軽度であると考えられた。
- MHADs は HE や MHE よりも出血傾向が発現するまでに高濃度を用いることが可能である。
- 同程度の分子量ながら、MHADs と MHE の APTT の結果が異なるのは、アミノ酸付加による構造の変化に起因したアンチトロンビン III に対する親和性の変化などが生じている可能性が考えられる。
- MHADs のうち MHF, MHL 及び MHY には、フリーラジカルにより傷害を受けた HUV-EC の cell viability の低下を有意に抑制する作用のあることが示唆された。

#### 【第二章 MHADs によるマウス虚血性足浮腫抑制作用の検討】

*in vitro* の検討<sup>31)</sup>により、HE の副作用である出血傾向を軽減する目的で合成した MHADs のうち、MHF, MHL 及び MHY に X 及び XO を用いて発生させたフリーラジカルによる細胞傷害を抑制する作用のあることが明らかとなった。次に、*in vivo* における MHF, MHL 及び MHY のラジカルスカベンジング作用ならびに HE, MHF 及び MHL の *ex vivo* におけるマウス血液凝固系 APTT に及ぼす影響を検討した。*in vivo* の検討には、Oyanagui と Sato の方法<sup>9,32)</sup>に準じてフリーラジカルによる傷害モデルで、被験物質のラジカルスカベンジング作用の検討に最適である、虚血-再灌流病態モデル動物である、マウス虚血性足浮腫モデルを供した。

##### 第一節 マウス虚血性足浮腫モデルの検討

4 週齢の ICR 系雄性マウスを購入し、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\% \text{ RH}$ 、換気オールフレッシュ 15 回/時間及び 12 時間交代の明暗サイクル (7:00 on~19:00 off) に設定された環境下で 1 週間の予備飼育を行った後、実験に供した。飼育期間中の摂餌・摂水は自由とした。他、実験動物の取扱いは扶桑薬品工業株式会社・実験動物委員会の作成した動物実験に関する社内規定を遵守した (承認番号: PDS9606)。



被験物質は既報の方法<sup>27)</sup>により合成した MHF, MHL, MHY (分子量各々8,500~10,000) 及び HE を用いた。

マウス虚血性足浮腫モデルは, Oyanagui と Sato の方法<sup>9,32)</sup>に準じて作製した。すなわち, マウスの右足首に輪ゴムを 10 または 13 回巻き付け, 足首より先の部分を虚血状態にし, その 20 分後輪ゴムをはずし, 血液を再循環させて浮腫を生じさせた。浮腫が生じた足の厚みは, 虚血終了時より 10, 40 及び 70 分後にダイヤルキャリパーゲージを用いて測定した。

MHF, MHL 及び MHY のマウス虚血性足浮腫抑制効果の予備検討を行った。すなわち溶媒の PBS(-), 被験物質である HE, MHF, MHL 及び MHY (各 5 mg/10 mL/kg) をマウスの虚血処置直前に尾静脈より投与し, 虚血終了 70 分後に足の厚みを測定した。

HE, MHF あるいは MHL (1.25~40 mg/10 mL/kg) をマウスに虚血処置直前に尾静脈より投与し, 虚血終了時より 10, 40 及び 70 分後に足の厚みを測定した。

各被験物質を 10.0 mg/10 mL/kg の用量でマウスの虚血中 [(虚血は 20 分間実施) 虚血終了 15 分前, 10 分前あるいは 5 分前] あるいは虚血終了直後に尾静脈より投与し, 虚血終了時より 10, 40 及び 70 分後に足の厚みを測定した。

本文中における数値は, 全て平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。群間の有意性は, Bartlett 法にて分散の均一性を確認した後, 等分散の場合は Tukey 法, 不等分散の場合は Kruskal-Wallis 法によってデータを順位変換した後, Tukey 法 [群間の例数が異なる場合は Spjotvoll & Stoliner-test (補正 Tukey 法)] により検定した。有意水準は 0.05 とした。

本病態モデルにおいて 10 または 13 回と輪ゴムを巻き付ける回数を変えることで, 生じる浮腫の程度に差はなかった (Figure 4)。

従って, 以後の実験において, マウスの足首に輪ゴムを 10 回巻き付けることとした。

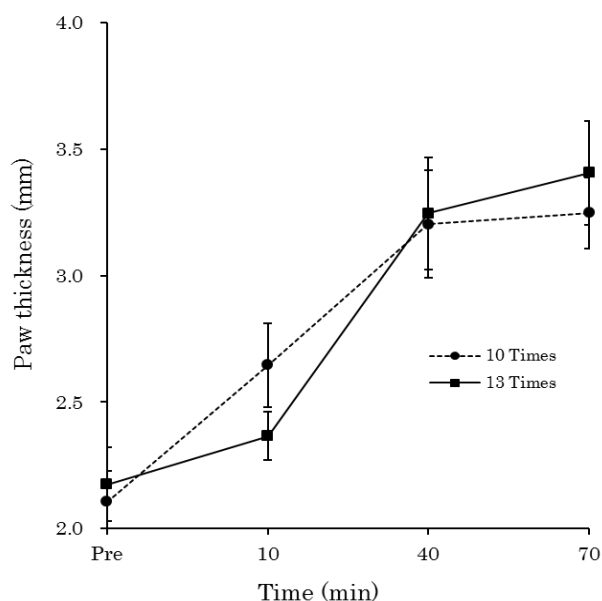


Figure 4. Time dependency of the ischemic paw swelling edema in the hind leg of mice, when bound 10 or 13 times using an elastic band. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of measurements in five animals.

各被験物質 (5 mg/10 mL/kg) をマウス虚血性足浮腫モデルの虚血処置直前に尾静脈より投与し、虚血終了 70 分後に足の厚みを測定したところ、MHF 及び MHL 投与群において有意な虚血性足浮腫抑制作用がみられた。HE 投与群においては虚血性足浮腫を抑制する傾向がみられた。MHY 投与群において虚血性足浮腫抑制作用は認められなかった (Table 3)。従って、以後の実験では、MHADs のうち、MHF 及び MHL について検討を続けることとした。

Table 3. Effects of MHF, MHL and MHY on ischemic paw edema in mice.

Compounds	Paw thickness (mm)	
	Pre	70 Min
PBS(-)	2.19 $\pm$ 0.05	4.12 $\pm$ 0.09
HE	2.16 $\pm$ 0.06	3.80 $\pm$ 0.09
MHF	2.11 $\pm$ 0.08	3.66 $\pm$ 0.14*
MHL	2.25 $\pm$ 0.04	3.75 $\pm$ 0.10*
MHY	2.18 $\pm$ 0.05	4.03 $\pm$ 0.18

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 8 animals.

Significantly different at \*P<0.05 VS. PBS(-).

各被験物質を様々な用量でマウスに虚血処置直前に尾静脈より投与し、HE の 2.5, 5.0 及び 10.0 mg/10 mL/kg 投与群, MHF 及び MHL の 2.5, 5.0 及び 10.0 mg/10 mL/kg 投与群において有意な虚血性足浮腫抑制作用がみられた (Table 4, 5).

Table 4. Effect of HE on ischemic paw edema in mice.

Compound	Dose (mg/kg)	Paw thickness (mm)			
		Pre	10 Min	40 Min	70 Min
PBS(-)		2.10 ± 0.04	2.42 ± 0.08	3.21 ± 0.10	3.20 ± 0.06
HE	1.25	2.17 ± 0.10	2.39 ± 0.14	3.07 ± 0.21	3.04 ± 0.13
	2.5	2.05 ± 0.03	2.11 ± 0.06	2.55 ± 0.11	2.60 ± 0.11*
	5.0	2.06 ± 0.06	2.09 ± 0.11	2.50 ± 0.12*	2.54 ± 0.10**
	10.0	2.22 ± 0.03	2.18 ± 0.14	2.38 ± 0.15*	2.68 ± 0.19
	20.0	2.06 ± 0.04	2.41 ± 0.13	3.07 ± 0.10	3.12 ± 0.14
	40.0	1.98 ± 0.08	2.28 ± 0.16	2.88 ± 0.21	3.20 ± 0.08

Each value represents the mean ± S.E. of 5 animals.

Significantly different at \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. PBS(-).

Table 5. Effects of MHF and MHL on ischemic paw edema in mice.

Compounds	Dose (mg/kg)	Paw thickness (mm)			
		Pre	10Min	40Min	70Min
PBS(-)		2.11 ± 0.02	2.61 ± 0.11	3.05 ± 0.09	3.07 ± 0.15
MHF	1.25	2.07 ± 0.02	2.43 ± 0.11	2.75 ± 0.10	2.71 ± 0.08
	2.5	2.11 ± 0.05	2.08 ± 0.04**	2.45 ± 0.05**	2.43 ± 0.07**
	5.0	2.08 ± 0.07	2.08 ± 0.05*	2.21 ± 0.08**	2.22 ± 0.09**
	10.0	2.03 ± 0.08	2.07 ± 0.07*	2.28 ± 0.09**	2.19 ± 0.09**
	20.0	2.17 ± 0.05	2.39 ± 0.13	2.70 ± 0.06	2.67 ± 0.05
	40.0	2.07 ± 0.03	2.42 ± 0.07	2.90 ± 0.12	2.74 ± 0.11
MHL	1.25	2.07 ± 0.02	2.35 ± 0.10	2.68 ± 0.15	2.70 ± 0.09
	2.5	2.17 ± 0.04	2.14 ± 0.04*	2.43 ± 0.07**	2.59 ± 0.15
	5.0	2.05 ± 0.08	2.12 ± 0.09	2.29 ± 0.09**	2.23 ± 0.13**
	10.0	2.05 ± 0.02	2.15 ± 0.08	2.29 ± 0.07**	2.26 ± 0.06**
	20.0	2.15 ± 0.07	2.32 ± 0.04	2.69 ± 0.08	2.79 ± 0.09
	40.0	2.08 ± 0.02	2.43 ± 0.10	2.75 ± 0.08	2.68 ± 0.11

Each value represents the mean ± S.E. of 8 animals.

Significantly different at \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. PBS(-).

HE (10.0 mg/10 mL/kg) 投与群においては、いずれの投与スケジュール[虚血中 (虚血は 20 分間実施) 虚血終了 15 分前, 10 分前あるいは 5 分前]においてもマウスの虚血性足浮腫抑制作用はみられなかった。MHF (10.0 mg/10 mL/kg) 投与群は、虚血終了 10 分後に全ての投与スケジュールにおいて有意な虚血性足浮腫抑制作用がみられた。また、虚血終了 5 分前投与群において、虚血終了 40 分後においても有意な虚血性足浮腫抑制作用がみられた。

一方, MHL (10.0 mg/10 mL/kg) 投与群においては, 虚血終了 5, 10 及び 15 分前投与群において, 虚血終了 10 分後に有意な虚血性足浮腫抑制作用がみられた. 虚血終了直後に投与した群において虚血性足浮腫抑制作用はみられなかった (Table 6, 7).

Table 6. Influence of timing of HE administration on inhibition of ischemic paw edema.

Compound	Timing	Paw thickness (mm)			
		Pre	10 Min	40 Min	70 Min
PBS(-)		2.10 ± 0.04	2.42 ± 0.08	3.21 ± 0.10	3.20 ± 0.06
HE	15 Min before	2.15 ± 0.07	2.44 ± 0.14	3.02 ± 0.10	2.95 ± 0.08
	10 Min before	2.12 ± 0.07	2.27 ± 0.07	3.05 ± 0.13	3.17 ± 0.11
	5 Min before	2.25 ± 0.06	2.55 ± 0.10	3.01 ± 0.08	3.24 ± 0.05
	immediately after	2.27 ± 0.11	2.68 ± 0.11	3.41 ± 0.26	3.16 ± 0.08

Each value represents the mean ± S.E. of 5 animals.

Table 7. Influence of timing of MHF and MHL administration on inhibition of ischemic paw edema.

Compounds	Timing	Paw thickness (mm)			
		Pre	10 Min	40 Min	70 Min
PBS(-)		2.11 ± 0.02	2.61 ± 0.11	3.05 ± 0.09	3.07 ± 0.15
MHF	15 Min before	2.13 ± 0.05	2.33 ± 0.07**	2.61 ± 0.14	2.82 ± 0.15
	10 Min before	2.04 ± 0.04	2.34 ± 0.06**	2.89 ± 0.08	2.96 ± 0.16
	5 Min before	2.08 ± 0.04	2.40 ± 0.06*	2.52 ± 0.12*	2.66 ± 0.10
	immediately after	2.02 ± 0.05	2.37 ± 0.07*	2.90 ± 0.12	2.84 ± 0.09
MHL	15 Min before	2.05 ± 0.04	2.23 ± 0.07**	2.56 ± 0.16	2.68 ± 0.16
	10 Min before	2.10 ± 0.05	2.24 ± 0.09**	2.57 ± 0.07	2.67 ± 0.12
	5 Min before	2.07 ± 0.04	2.25 ± 0.05**	2.62 ± 0.15	2.62 ± 0.10
	immediately after	2.05 ± 0.05	2.49 ± 0.08	2.71 ± 0.10	2.94 ± 0.13

Each value represents the mean ± S.E. of 8 animals.

Significantly different at \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. PBS(-).

申請者は *in vivo* において、MHADs のラジカルスカベンジング作用を検討するための予備試験として病態モデル作製を試みた。マウス虚血性足浮腫モデルは Oyanagui と Sato によって考案された病態モデル<sup>9,32)</sup>であるが、輪ゴムを何度巻きつけると実験に適した障害が生じるのか不明であった。Oyanagui と Sato の検討においては 10, 13 あるいは 15 回の間で輪ゴムを巻きつける回数に幅があった<sup>32,33)</sup>。そこで輪ゴムを 10 回巻きつけた場合と 13 回巻きつけた場合の比較を行ったところ、10 回巻きつけた場合と 13 回巻きつけた場合とで形成される浮腫の程度には差がなかった。従って、本検討には輪ゴムを 10 回巻きつけるモデルを用いることにした。

HE は、血中 EC-SOD 濃度を上昇させる<sup>8,10,11,29,34)</sup>、間接的なラジカルスカベンジャーとしての作用を有している<sup>28)</sup>ことが報告されている。また、Oyanagui と Sato の検討<sup>9)</sup>により HE をマウス虚血性足浮腫モデルに虚血処置前に投与した場合、虚血性浮腫抑制作用を示すこと、それは用量依存的なものではなく、釣り鐘型の用量-反応曲線を呈することが報告されている。申請者の検討においても同様な結果が得られた。HE の 2.5, 5.0 及び 10.0 mg/10 mL/kg 投与群 (虚血処置前に投与) において有意な虚血性浮腫抑制作用がみられた。以上の結果から、HE には虚血性浮腫に対する予防効果は認められるが、治療効果は認められなかった。

次に、MHF と MHL のマウス虚血性足浮腫モデルに対する効果を検討した。MHF あるいは MHL の 2.5, 5.0 及び 10.0 mg/10 mL/kg 投与群 (虚血処置前に投与) において有意な虚血性浮腫抑制作用がみられた。さらに、MHF を虚血終了後に投与した場合にも有意な虚血性浮腫抑制作用がみられた。すなわち、MHL は虚血性浮腫に対する予防効果は示すものの治療効果は有しないこと、MHF は虚血性浮腫に対して予防ならびに抑制効果を有することが明らかとなった。虚血-再灌流障害の一因として虚血時の細胞内  $Ca^{2+}$  overload が報告されている<sup>29,35,36)</sup>。Boffi らによると虚血時、細胞膜の透過性が変化し、細胞内  $Ca^{2+}$  の増加が生じ、これらの現象に起因して細胞膜に損傷が生じる<sup>37)</sup>。Inserre らは、カルパイン (細胞内プロテアーゼ、心筋虚血-再灌流障害に関与する非リソソームシステインプロテアーゼファミリーの一つ) が活性化するためには  $Ca^{2+}$ が必要であると報告した<sup>38)</sup>。申請者は、MHADs のうち MHF のみがラット受身皮膚アナフィラキシー反応を抑制するデータ及びマウスにおいて compound 48/80 投与による致死を抑制するデータを得ている (未発表)。前者はアナフィラキシー反応が生じることによって肥満細胞内の  $Ca^{2+}$ が増加し、肥満細胞の活性化が生じ、大量のヒスタミンが放出される病態モデルである<sup>39,40)</sup>。後者は非アレルギー性の刺激で肥満細胞内の  $Ca^{2+}$ が増加し、肥満細胞の活性化が生じ、大量のヒスタミンが放出される病態モデルである<sup>41,42)</sup>。従って、MHF は虚血処置前に投与した場合、細胞内  $Ca^{2+}$ 動態に影響を与えることにより足浮腫を抑制する可能性が考えられる。一方、虚血-再灌流障害の別因子として再灌流時に発生するフリーラジカルが挙げられる<sup>43)</sup>。MHF を虚血後に投与した場合にみられた足浮腫抑制作用は、*in vitro* の検討<sup>31)</sup>で明らかになったフリーラジカルによる傷害から防御する作用によるものと推察される。

## 第二節 HE, MHF 及び MHL の *ex vivo* における APTT に及ぼす影響

次に HE, MHF 及び MHL の *ex vivo* における APTT に及ぼす影響を検討した。HE (0.625, 1.25 及び 2.5 mg/10 mL/kg), MHF あるいは MHL (5.0, 10.0 及び 20.0 mg/10 mL/kg) をマウス尾静脈内に投与し, 30 または 90 分後にペントバルビタール麻酔 (50 mg/10 mL/kg) 下, 腹部大動脈より 3.8%クエン酸ナトリウム溶液を添加したシリンジを用いて採血 (3.8%クエン酸ナトリウム:血液=1:9) し, 遠心分離 (1,000×g, 10 min, 4°C) 後に血漿を得て, APTT を測定した。なお, マウス血漿の APTT の測定には活性化部分トロンボプラスチン試薬及び血漿凝固時間自動測定器アメルング KC10A を使用した。測定時間は 180 秒を限度とした。

HE (2.5 mg/10 mL/kg), MHF あるいは MHL (20.0 mg/10 mL/kg) をマウス尾静脈内に投与して 30 分後に, APTT が有意に延長した。投与 90 分後に, MHL による APTT の有意な延長及び延長傾向は PBS(-) レベルに回復したが, MHF においては, 10 mg/10 mL/kg 以上の用量において APTT の有意な延長が継続していた (Table 8)。

Table 8. Effects of HE, MHF and MHL on APTT in mice after induction of ischemia.

Compounds	Dose (mg/kg)	APTT (s)	
		30 Min	90 Min
PBS		25.3 ± 0.7	24.7 ± 0.3
HE	0.625	60.4 ± 5.1	23.0 ± 1.9
	1.25	133.8 ± 60.2	23.1 ± 2.0
	2.5	180.0 ± 0.0 **	43.9 ± 9.8
MHF	5	32.2 ± 1.6	26.8 ± 0.9
	10	51.7 ± 2.4	33.7 ± 1.2 **
	20	125.5 ± 18.8 **	39.1 ± 2.1 **
MHL	5	27.3 ± 1.0	25.7 ± 1.1
	10	38.7 ± 3.0	25.9 ± 0.8
	20	55.2 ± 2.8 *	28.2 ± 1.4

Each value represents the mean ± S.E. of 3 or 5 animals.

Significantly different at \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. PBS(-).

*in vitro* では APTT の検討において同等の作用を持つ MHL, MHF 及び MHY であるが, *in vivo* の作用はそれぞれ異なった。これはヒトとマウスの種差<sup>34)</sup>による可能性があると推察された。マウス虚血性足浮腫モデルに対して虚血処置前に投与した場合, 虚血性浮腫抑制作用を示す用量域の HE において APTT が有意に延長することが判明した。一方, 虚血性浮腫抑制作用を示す用量域の MHF あるいは MHL においては APTT の延長がみ

られないか軽度な延長しかみられなかった。以上のことから、HE よりも MHF や MHL の安全性が高いことが示唆された。

#### 【小括】

1. *in vitro* でみられた MHF のフリーラジカルによる傷害から防御する作用は *in vivo* ではみられなかった。これはヒトとマウスの種差による可能性がある。
2. MHF 及び MHL には、*in vivo* においてマウス虚血性足浮腫抑制作用が認められた。
3. MHF 及び MHL のマウス虚血性足浮腫抑制作用は、APTT の延長がみられないか軽度な延長がみられた用量域においてみられた。
4. MHF には、マウス虚血性足浮腫に対する予防的な効果（ラジカルスカベンジング作用）だけでなく、治療効果（虚血性障害抑制作用）も認められた。

#### 【第三章 MHF 及び MHL のマウス血中 EC-SOD 活性に及ぼす影響】

*in vitro* 及び *in vivo* の検討<sup>31,44)</sup>により MHF 及び MHL にラジカルスカベンジング作用のある可能性が示唆された。次に MHF 及び MHL の作用機序を明らかにするために、マウスにおいて MHF または MHL 投与時の血中 extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) 活性の変動を検討した。

4 週齢の ICR 系雄性マウスを購入し、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%\text{RH}$ 、換気オールフレッシュ 15 回/時間及び 12 時間交代の明暗サイクル (7:00 on~19:00 off) に設定された環境下で 1 週間の予備飼育を行った後、実験に供した。飼育期間中の摂餌・摂水は自由とした。他、実験動物の取扱いは扶桑薬品工業株式会社・実験動物委員会の作成した動物実験に関する社内規定を遵守した (承認番号: PDS9702)。

既報の方法<sup>27)</sup>により合成した MHF, MHL (分子量各々 8,500~10,000) 及び HE を用いた。

マウス尾静脈より HE, MHF または MHL (2.5, 5.0, 10.0, 20.0 あるいは 40.0 mg/10 mL/kg) を投与し、20 分後に抗凝固剤として 50  $\mu\text{L}$  のヘパリンナトリウム注射液を含んだ注射筒を用いてペントバルビタール麻酔 (50 mg/10 mL/kg) 下のマウス腹部大動脈より 0.5 mL 採血した。溶血に伴う赤血球からの SOD 漏出を避けるために、採血により得た血液は HE 10 U/mL 含有 0.25 M スクロース 2 mL を入れた試験管内に保管し、分析時まで氷冷した。このサンプルから 20  $\mu\text{L}$  を 0.25 M スクロース 2 mL 及び生理食塩液 10 mL を入れた試験管内にとり、軽く混和し、波長 418 nm における吸光度 (A) を測定した。この値を用いて後に採血量の多少に起因する誤差を補正した。次に、血液を遠心分離 (1,000  $\times\text{g}$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) し、上清を分取した。この上清中の EC-SOD 活性を Oyanagui と Sato の方法<sup>9)</sup>に準じて測定した。分析法の詳細は次のとおりである。

Table 10. EC-SOD activity measurement method by Oyanagui and Sato<sup>9)</sup>

	sample					blank				
	300	200	100	50	25	300	200	100	50	25
Plasma	300	200	100	50	25	300	200	100	50	25
0.25M Sucrose including HE 10 U/mL	-	100	200	250	275	-	100	200	250	275
10mM Hydroxylammonium chloride	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4mM Hypoxanthine	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
*Buffer	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Water (Milli-Q water)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

unit :  $\mu$ L

\*Buffer (pH8.2) : Sodium borate (20 mM), Potassium dihydrogen phosphate (30 mM) and Disodium ethylenediaminetetraacetate (1 mM).

試験管 (6 mL のガラス製 RI チューブ) 内に上記のとおり調製した. サンプルには XOD, (50 mU/mL), ブランクにはミリ Q 水をそれぞれ 200  $\mu$ L 加えて, 37°C で 30 分間軽く振とうしながらインキュベートした. 次に, 30  $\mu$ M N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩及び 450  $\mu$ M のスルファニル酸を含む 25% の酢酸 2 mL を加えて反応を停止させ, 30 分間室温放置後, 波長 550 nm における吸光度を測定し [動物 1 例ごとにサンプル 5 ケ, ブランク 5 ケ (計 10 ケ) の吸光値が得られた.], O.D. 550 nm [(+) XOD (サンプル) - (-) XOD (ブランク)]=(B) を求めた. コントロール (試験系に一切の SOD 含有試料を使わずに得た吸光値) を 100 とし各動物 5 つの (B) より IC<sub>50</sub> 値を求めた [= (C)]. 血中蛋白は SOD 活性を 15% 抑制するという報告<sup>45)</sup>より, (C) に 1.346 を乗じて値を補正し, さらに先に測定しておいた (A) からサンプルボリュームに関する補正を行った [= (D)]. (A) /0.506= (E) (正確に 0.5 mL 採血した場合, 吸光度は 0.506 になる<sup>6)</sup>), 続いて (D)×(E)=(F) を求め, SOD activity=100/ (F) (NU/mL Plasma) を算出した.

本文中における数値は全て平均値  $\pm$  標準誤差で表示した. 群間の有意性は Bartlett 法にて分散の均一性を確認した後, 等分散の場合は Tukey 法, 不等分散の場合は Kruskal-Wallis 法によってデータを順位変換した後, Spjotvoll & Stoline-test (補正 Tukey 法) により検定した. 有意水準は 0.05 とした.

HE の 2.5 mg/10 mL/kg 以上の用量の投与群において, マウス血中 EC-SOD 活性は有意な上昇がみられた. さらに, 10.0 mg/10 mL/kg の投与群においては EC-SOD 活性が control 群 [PBS(-) 投与群] の約 4 倍となり, 最大であった. HE の 10.0 mg/10 mL/kg 以上の用量の投与群において, EC-SOD 活性の上昇は頭打ちとなった. MHF は 2.5 mg/10mL/kg, MHL は 5.0 mg/10 mL/kg の投与群からマウス血中 EC-SOD 活性の有意な上昇がみられた. MHF 及び MHL の最大 EC-SOD 活性は control 群と比べ, MHF が約 5 倍, MHL が約 4 倍であった. 用量-EC-SOD 活性曲線は HE の場合と同様に釣り鐘型を呈した (Figure 5).



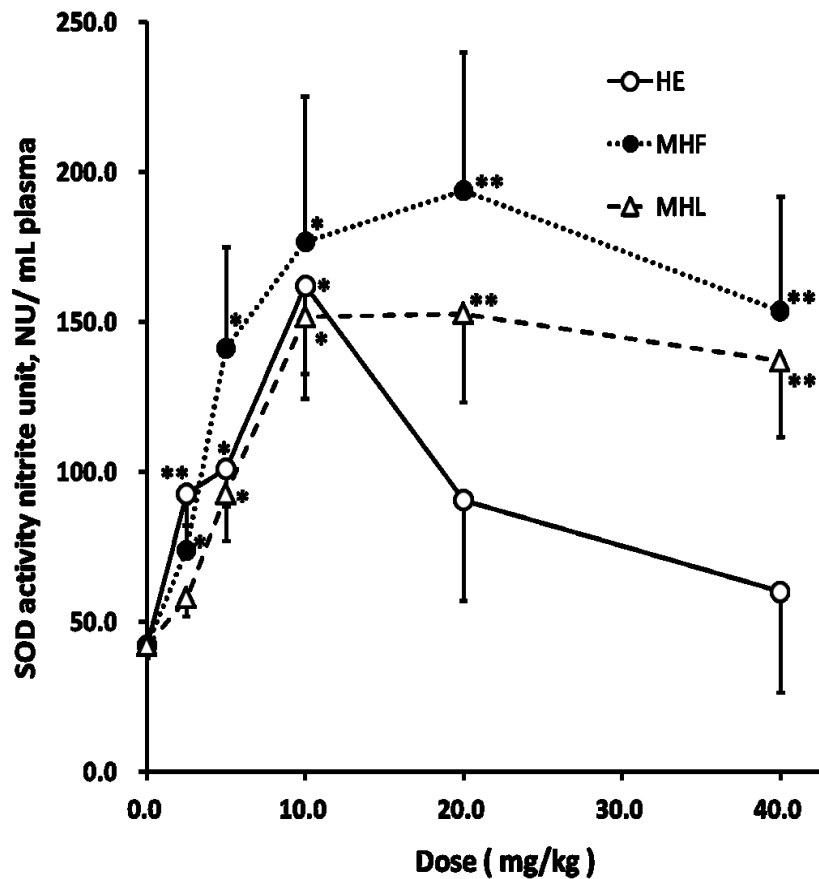


Figure 5. Increase in the plasma EC-SOD activity of mice injected by several doses of HE, MHF and MHL at 20 min after the injection. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 8 or 11 animals. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs. PBS(-) (by Spjotvoll and Stoliner-test).

HE, MHF または MHL (各 10 mg/10 ml/kg) の投与 5 分後にマウスの血中 EC-SOD 活性は最大となった。その後、時間経過とともに各群の血中 EC-SOD 活性は低下した。血中 EC-SOD 活性低下の程度は、HE 投与群において最も緩やかで、観察時間内において投与 20 分後以降ほとんど低下しなかった (Figure 6)。

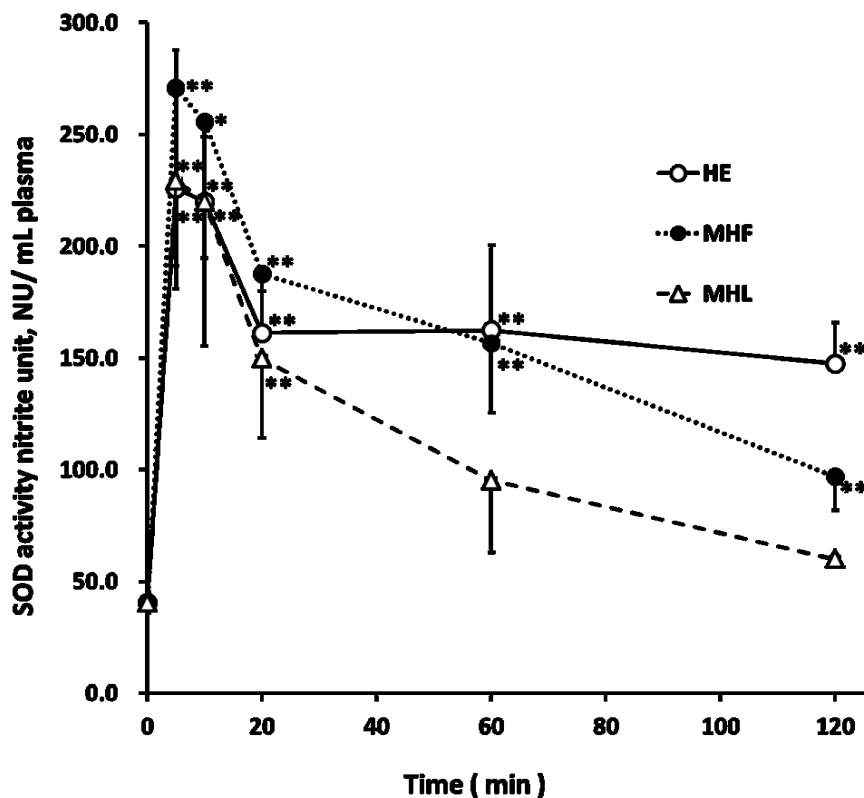


Figure 6. Time course of plasma EC-SOD activities of mice after the injection of HE, MHF and MHL (10 mg/10 ml/kg). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 8 or 10 animals. \*\*p<0.01, \*p<0.05 vs. PBS(-) (by Spjotvoll and Stoliner-test).

HE を静脈内投与することにより血中の EC-SOD 活性が上昇することがヒト、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ及びマウス等において報告<sup>8-11,29,34,46)</sup>されている。今回の検討においては入手あるいは飼育の安易さを考慮し、マウスを実験に供した。通常、SOD の活性単位 (Unit /mL) は McCord らのチトクロム C 法<sup>47)</sup>により得られる。しかし、チトクロム C 法は強いラジカルスカベンジング能を有する試料にしか適用できない。その上、作業が非常に煩雑で高感度な分光光度計も必要になる。申請者は、より簡便で必要とする試薬が安価かつ発色が良好で、吸光度変化が大きく通常の比色計でも測定可能、しかも感度がチトクロム C 法の 3 倍以上<sup>48)</sup>といわれる Oyanagui と Sato の亜硝酸キット法<sup>9)</sup>で測定した。最初に、様々な用量の HE, MHF 及び MHL を投与 20 分後のマウス血中 EC-SOD 活性を測定した。その際、採血やサンプルの保管に HE を用いているが、HE, MHF 及び MHL のいずれの投与群においてもマウスの血中 EC-SOD 活性の上昇がみられ、用量-EC-SOD 活性曲線は

用量依存的なものではなく、釣り鐘型を呈した。この点は、採血した（血管内皮が存在しない状態の）全血あるいは血漿に HE を加えても EC-SOD 活性は変化しないという

Karlsson らの報告<sup>8)</sup>により裏付けられる。HE 投与群は APTT の有意な延長がみられる用量<sup>44)</sup>である 2.5 mg/10 mL/kg 以上の投与群において血中 EC-SOD 活性の有意な上昇がみられた。MHF 及び MHL 投与群においては APTT の延長がみられない用量<sup>44)</sup>である、MHF においては 2.5 mg/10 mL/kg, MHL においては 5.0 mg/10 mL/kg から血中 EC-SOD 活性の有意な上昇がみられた。Oyanagui らによると生体内で EC-SOD は、通常活性化していない 4 量体の状態で血液中に存在しており、合計 4 カ所の HE-結合部位を有している<sup>9)</sup>。この 4 カ所の HE-結合部位のうち 2 カ所に HE（または HE 様物質）が結合すると他の EC-SOD と結合可能な状態になる。これが EC-SOD の活性化した状態である。しかし、活性化状態の EC-SOD の周囲に余剰の HE（または HE 様物質）が存在すると、EC-SOD の残りの HE-結合部位に HE（または HE 様物質）が結合し、EC-SOD は不活性化状態となる。MHF 及び MHL の作用機序も、用量-EC-SOD 活性曲線が釣り鐘型を呈するなど HE と同様であると考えられる。Karlsson ら<sup>8)</sup>と Oyanagui ら<sup>9)</sup>の報告と申請者の結果を併せ考えると、HE（または HE 様物質）の生体内への静脈内投与で EC-SOD 活性の上昇がみられるが、試験管内においては単に HE（または HE 様物質）のみで EC-SOD 活性は上昇しないと推察する。EC-SOD 活性の上昇には、生体内あるいは血管内皮細胞由来の別の因子が関与している可能性が考えられる。

各被験物質投与 20 分後の用量-EC-SOD 活性曲線において HE 高用量 (20 mg/10 mL/kg 以上) 投与群の EC-SOD 活性の低下は MHF あるいは MHL と比べて著しかった。これは HE の EC-SOD への結合能が MHF あるいは MHL と比べて強力なため、不活性化 EC-SOD が増加したのではないかと推察する。

次に、一定用量 (10 mg/10 mL/kg) の HE, MHF または MHL 投与時のマウス血中 EC-SOD 活性の経時的な変化を検討した。いずれの被験薬物も投与 5 分後にマウスの血中 EC-SOD 活性は最大となり、時間経過とともに低下した。MHF 投与群は、60 分後まで血中 EC-SOD 活性が HE より高かったが、HE 投与群は他の投与群と異なり、血中 EC-SOD 活性の低下の程度が緩やかで、投与 20 分後以降はほとんど変化しなかった。これは血中で EC-SOD と結合している被験薬物の分解速度に違いが生じたためではないかと推察する。つまり、HE より分子量の小さい MHF や MHL の方が速く分解されたためと推察される。いずれにせよ、本検討により MHF 及び MHL は血中の EC-SOD 活性を上昇させることにより間接的にラジカルスカベンジング作用を現すことが明らかとなった。出血傾向という観点から HE と比べて MHF はさらに高用量を用いることができる優位性があり、ラジカルスカベンジング作用を示す臨床応用可能な候補物質として HE より優れていると考える。

### 【小括】

- ・ HE, MHF 及び MHL のいずれの投与群においてもマウスの血中 EC-SOD 活性の上昇がみられた。
- ・ 今回用いた全ての被験物質において用量-EC-SOD 活性曲線は用量依存的なものではなく、釣り鐘型を呈した。
- ・ HE 投与群は APTT の有意な延長がみられる用量域において有意な血中 EC-SOD 活性の上昇がみられた。
- ・ MHF 及び MHL 投与群においては APTT の延長がみられないか軽度な延長がみられた用量域において有意な血中 EC-SOD 活性の上昇がみられた。

### 【総括】

HE と比べて出血傾向の副作用が軽減した MHF 及び MHL は、血管内皮細胞由来の EC-SOD の放出を促すことによって間接的なラジカルスカベンジング作用を発現することが示唆された。また、MHF は、他試験の結果（未公表）も併せ細胞内 Ca<sup>2+</sup>の増減を調節することにより虚血時に生じる障害を抑制している可能性が考えられる。

近年、循環器の疾患<sup>49,50</sup>、アルツハイマー病<sup>51</sup>、動脈硬化<sup>52</sup>、脳梗塞<sup>53</sup>、パーキンソン病<sup>54</sup>、膵炎<sup>55</sup>、糸球体腎炎<sup>56</sup>、糖尿病<sup>57</sup>、肝硬変<sup>58</sup>、胃潰瘍<sup>59</sup>、アトピー性皮膚炎<sup>60</sup>及び喘息<sup>61,62</sup>等様々な疾患にフリーラジカルの関与が報告され、EC-SOD の研究も進められている。また、いくつかのラジカルスカベンジャーが開発中である。今回の申請者による研究成果より、MHF は、出血傾向のリスクが HE より低く、内因性の EC-SOD 活性を上昇させる特徴がある物質であることが判明した。

### 【引用文献】

- 1) Salla E, Dimakakos E P, Tsagkouli S, Giozos I, Charpidou A, Kainis E and Syrigos K N: Venous Thromboembolism in Patients Diagnosed With Lung Cancer. *Angiology Nov*; P9, 2015.
- 2) Ezzatzadegan J S, Mahmoodi M S, Behroozi F, Roozbeh J and Emamghoreishi F: Effect of switching unfractionated heparin to low-molecular-weight heparin on serum potassium in hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis* 8: 475-480, 2014.
- 3) Chuang F R, Chen T C, Lee C H, Ng H Y, Wang I K, Chang H W, Chuang P H, Wu C H, Yang C C and Su Y J: Clinical safety and anticoagulation efficacy of low-molecular-weight heparins in chronic hemodialysis patients: a single medical center experience. *Ren Fail* 33: 990-997, 2011.

- 4) Lakshmi T S, Shanmugasundaram N, Shanmuganathan S, Karthikeyan K, Meenakshi J and Babu M: Controlled release of 2, 3 desulfated heparin exerts its anti-inflammatory activity by effectively inhibiting E-selectin. *J Biomed Mater Res* *95*: 118-128, 2010.
- 5) Qin Y, Prescott L M, Deitch E A and Kaiser V L: Heparin use in a rat hemorrhagic shock model induces biologic activity in mesenteric lymph separate from shock. *Shock* *35*: 411-421, 2011.
- 6) Tyrrell D J, Kilfeather S and Page C P: Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Tips* *16*: 198-204, 1995.
- 7) Oberkersch R, Attorresi A I and Calabrese G C: Low-molecular-weight heparin inhibition in classical complement activation pathway during pregnancy. *Thromb Res* *125*: e240-245, 2010.
- 8) Karlsson K and Marklund S L: Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem J* *242*: 55-59, 1987.
- 9) Oyanagui Y and Sato S: Heparin, a potent releasing agent of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD C), suppresses ischaemic paw oedema in mice. *Free Rad Res Comms* *9*: 87-99, 1990.
- 10) Becker M, Menger MD and Lehr H A: Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* *267*: H925-H930, 1994.
- 11) Adachi T, Yamada H, Futenma A, Kato K and Hirano K: Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase from (V) to plasma. *J Biochem* *117*: 586-590, 1995.
- 12) Horinouchi Y, Summers F A, Ehrenshaft M, Kawazoe K, Tsuchiya K, Tamaki T and Mason R P: Investigating free radical generation in HepG2 cells using immuno-spin trapping. *Free Radic Biol Med* *75*: Suppl S33, 2014.
- 13) Chaiswing L, Zhong W, Cullen J J, Oberley L W and Oberley T D: Extracellular redox state regulates features associated with prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* *68*: 5820-5826, 2008.
- 14) Naito R, Nishinakamura H, Watanabe T, Nakayama J and Kodama S: Edaravone, a free radical scavenger, accelerates wound healing in diabetic mice. *Wounds* *26*: 163-171, 2014.
- 15) Choe J Y, Park K Y and Kim S K: Oxidative stress by monosodium urate crystals promotes renal cell apoptosis through mitochondrial caspase-dependent pathway in human embryonic kidney 293 cells. *Apoptosis* *20*: 38-49, 2015.
- 16) Zhao S, Qian J, Wang J, Gong P, Yang Z, Cahoon J, Wu X, Duggal N, Lin C

and Tang W: Effects of Oxygen Concentrations on Postresuscitation Myocardial Oxidative Stress and Myocardial Function in a Rat Model of Cardiopulmonary Resuscitation. *Crit Care Med* 43: e560-e566, 2015.

- 17) Delaney C, Wright R H, Tang J R, Woods C, Villegas L, Sherlock L, Savani R C, Abman S H and Nozik G E: Lack of EC-SOD worsens alveolar and vascular development in a neonatal mouse model of bleomycin-induced bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 31: 166, 2015.
- 18) Hartney J M, Stidham T, Goldstrohm D A, Oberley D R E, Weaver M R, Valnickova H Z, Scavenius C, Benninger R K, Leahy K F, Johnson R, Gally F, Kosmider B, Zimmermann A K, Enghild J J, Nozik G E and Bowler R P: A common polymorphism in extracellular superoxide dismutase affects cardiopulmonary disease risk by altering protein distribution. *Circ Cardiovasc Genet* 7: 659-666, 2014.
- 19) Perveen S, Patel H, Arif A, Younis S, Codipilly C N and Ahmed M: Role of EC-SOD overexpression in preserving pulmonary angiogenesis inhibited by oxidative stress. *PLoS One* 7: e51945, 2012.
- 20) Manni M L, Tomai L P, Norris C A, Thomas L M, Kelley E E, Salter R D, Crapo J D, Chang L Y, Watkins S C, Piganelli J D and Oury T D: Extracellular superoxide dismutase in macrophages augments bacterial killing by promoting phagocytosis. *Am J Pathol* 178: 2752-2759, 2011.
- 21) Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Suzuki F, Hirano T and Maeda H: Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with Pyran-Polymer conjugated SOD. *Science* 244: 974-975, 1989.
- 22) Serena C, Calvo E, Clares M P, Diaz M L, Chicote J U, Beltrán D R, Fontova R and Rodriguez A: Significant in vivo anti-inflammatory activity of Pytren4Q-Mn a superoxide dismutase 2 (SOD2) mimetic scorpion-like Mn (II) complex. *PLoS One* 10: e0119102, 2015.
- 23) Tamai M, Furuta H, Kawashima H, Doi A, Hamanishi T, Shimomura H, Sakagashira S, Nishi M, Sasaki H, Sanke T and Nanjo K: Extracellular super oxide dismutase gene polymorphism is associated with insulin resistance and the susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 71: 140-145, 2006.
- 24) Kwon M J, Kim B, Lee Y S and Kim T Y: Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *J Dermatol Sci* 67: 81-87, 2012.
- 25) Markland S L, Holme E and Hellner L: Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 126: 41-51, 1982.

- 26) Nozik. G E, Suliman H B and Piantadosi C A: Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2466-2471, 2005.
- 27) 荒木宏昌, 西川裕之, 田中修一, 中村一基, 大谷裕也, 西村幸容, 島田千明, 武田誠一, 河合健蔵, 北川知津子, 桑原正明, 安部智之: 特許 特開平 9-286803, 1997.
- 28) Barrowcliffe T W, Mulloy B, Johnson E A and Thomas D P: The anticoagulant activity of heparin: measurement and relationship to chemical structure. *J Pharm Biomed Anal* 7: 217-226, 1989.
- 29) Hiebert L M and Liu J M: Heparin protects cultured arterial endothelial cells from damage by toxic oxygen metabolites. *Atherosclerosis* 83: 47-51, 1990.
- 30) Hiebert L M and Liu J M: Protective action of polyelectrolytes on endothelium. *Semin Thromb Hemost* 17: 42-46, 1991.
- 31) Takeda S, Toda T and Nakamura K: Middle molecular weight heparinyl amino acid derivatives (MHADs) function as indirect radical scavengers *in vitro*. *Pharmacol Pharmacy* 7: 117-123, 2016.
- 32) Oyanagui Y: Suppressions of ischemic paw oedema in mice, rats and guinea pigs by superoxide dismutases from different sources. *Free Radic Res Commun* 4: 385-396, 1988.
- 33) Oyanagui Y: Immunosuppressants enhance superoxide radical/nitric oxide-dependent dexamethasone suppression of ischemic paw edema in mice. *Eur J Pharmacol* 344: 241-249, 1998.
- 34) Karlsson K and Marklund SL: Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem J* 255: 223-228, 1988.
- 35) Bautista-Hernandez V, Karamanlidis G, McCully JD and Del Nido PJ: Cellular and molecular mechanisms of low cardiac output syndrome after pediatric cardiac surgery. *Curr Vasc Pharmacol* 14: 5-13, 2016.
- 36) Tripathi P and Misra MK: Therapeutic role of L-arginine on free radical-scavenging system in ischemic heart diseases. *Indian J Biochem Biophys* 46: 498-502, 2009.
- 37) Boffi FM, Ozaki J, Matsuki N, Inaba M, Desmaras E and Ono K: Effects of chemical ischemia on purine nucleotides, free-radical generation, lipids peroxidation and intracellular calcium levels in C2C12 myotube derived from mouse myocytes. *J Vet Med Sci* 64: 483-488, 2002.
- 38) Inserte J, Hernando V and Garcia-Dorado D: Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 96: 23-31, 2012.

- 39) Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC and Strait R: Molecular mechanism of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol* *115*: 449-457, 2005.
- 40) 古野忠秀: 顕微光学法によるマスト細胞活性化の分子機構の研究. *Yakugaku zasshi* *125*: 671-683, 2005.
- 41) 田坂賢二, 亀井千晃, 北角和浩, 出石啓治, 見尾光庸: Epinastine の代謝産物ならびに分解産物の薬理作用. *薬理と治療* *20*: 57-62, 1992
- 42) 山原條二, 松田久司, 下田博司, 割石紀子, 矢木信博, 村上啓寿, 吉川雅之: アマチャ成分ツンベルギノールAのI~IV型アレルギーに対する作用. *日本薬理学雑誌* *105*: 365-379, 1995
- 43) Kalogeris T, Baines CP, Krenz M and Korthuis RJ: Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* *298*: 229-317, 2012.
- 44) Takeda S, Toda T and Nakamura K: Inhibitory Effects of Medium Molecular Weight Heparinyl Amino Acid Derivatives on Ischemic Paw Edema in Mice. *In Vivo* *30*: 433-437, 2016.
- 45) Robinson DS and French JE: Heparin, the clearing factor lipase, and fat transport. *Pharmacol Rev* *12*: 241-263, 1960.
- 46) Oyanagui Y and Sato S: Suppression of carrageenan paw oedema in rats and mice by heparin-induced EC-SODs. *Free Radic Res Commun* *12*: 229-237, 1991.
- 47) McCord J M and Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte-prein (hemocuprein). *J Biol Chem* *244*: 6049-6055, 1969.
- 48) Oyanagui Y: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* *142*: 290-296, 1984.
- 49) Lüscher TF: Ageing, inflammation, and oxidative stress: final common pathways of cardiovascular disease. *Eur Heart J* *36*: 3381-3383, 2015.
- 50) Sun SJ, Wu XP, Song HL and Li GQ: Baicalin ameliorates isoproterenol induced acute myocardial infarction through iNOS, inflammation, oxidative stress and P38MAPK pathway in rat. *Int J Clin Exp Med* *8*: 22063-22072, 2015.
- 51) Prasad KN: Simultaneous activation of Nrf2 and elevation of antioxidant compounds for reducing oxidative stress and chronic inflammation in human Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* *153*: 41-47, 2016.
- 52) Perrotta I and Aquila S: The role of oxidative stress and autophagy in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* *2015*: 130315, 2015.
- 53) Zhang XH, Lei H, Liu AJ, Zou YX, Shen FM and Su DF: Increased oxidative stress is responsible for severer cerebral infarction in stroke-prone spontaneously



- hypertensive rats. *CNS Neurosci Ther* *17*: 590-598, 2011.
- 54) Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM, Bochi GV, Baldissarelli J, Kegler A, Santana D, Chaves CM, Schetinger MR, Moresco RN, Rieder CR and Figuera MR: Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease. An Observational Study of Injury Biomarkers. *PLoS One* *11*: e0146129, 2016.
- 55) Rustagi T and Njei B: Antioxidant therapy for pain reduction in patients with chronic pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Pancreas* *44*: 812-818, 2015.
- 56) Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, Shimizu M, Nishiyama A, Kawachi H and Kagami S: Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Transl Res* *158*: 235-248, 2011.
- 57) Saad MI, Abdelkhalek TM, Saleh MM, Kamel MA, Youssef M, Tawfik SH and Dominguez H: Insights into the molecular mechanisms of diabetes-induced endothelial dysfunction: focus on oxidative stress and endothelial progenitor cells. *Endocrine* *50*: 537-567, 2015.
- 58) Iwasa M, Kobayashi Y, Mifuji-Moroka R, Hara N, Miyachi H, Sugimoto R, Tanaka H, Fujita N, Gabazza EC and Takei Y: Branched-chain amino acid supplementation reduces oxidative stress and prolongs survival in rats with advanced liver cirrhosis. *PLoS One* *8*: e70309, 2013.
- 59) Singh LP, Mishra A, Saha D and Swarnakar S: Doxycycline blocks gastric ulcer by regulating matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress. *World J Gastroenterol* *17*: 3310-3321, 2011.
- 60) Plevnik Kapun A, Salobir J, Levart A, Tavčar Kalcher G, Nemeč Svete A and Kotnik T: Vitamin E supplementation in canine atopic dermatitis: improvement of clinical signs and effects on oxidative stress markers. *Vet Rec* *175*: 560, 2014.
- 61) Kacprzak D and Pawliczak R: Does aspirin-induced oxidative stress cause asthma exacerbation?. *Arch Med Sci* *11*: 494-504, 2015.
- 62) Al-Harbi NO, Nadeem A, Al-Harbi MM, Imam F, Al-Shabanah OA, Ahmad SF, Sayed-Ahmed MM and Bahashwan SA: Oxidative airway inflammation leads to systemic and vascular oxidative stress in a murine model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol* *26*: 237-245, 2015.