

テアニン投与による高酸素負荷ラット網膜血管新生への影響

平松 類¹⁾, 中西 孝子²⁾, 竹中 康子¹⁾, 植田 俊彦¹⁾, 友安 幸子¹⁾
池谷 幸信³⁾, 嶋田 努³⁾, 油田 正樹³⁾, 安原 一²⁾, 小出 良平¹⁾

¹⁾昭和大学医学部眼科学教室, ²⁾昭和大学医学部第 2 薬理学教室, ³⁾武蔵野大学薬学部薬学研究所

要 約

目 的：テアニンの高酸素負荷ラットにおける網膜血管新生抑制効果を調べる。

方 法：高酸素負荷網膜血管新生モデル (OIR) は Sprague-Dawley ラット新生仔に 80% 酸素負荷し作製した。テアニン投与を 5 mg/kg (5 mg 群) または 50 mg/kg (50 mg 群) で行い, 対照として水 (水群) を 1 日 1 回 6 日齢から 17 日齢まで経口投与した。18 日齢で屠殺し眼球を摘出し, 総網膜面積に対する無血管野面積割合 (% AVA) と網膜血管新生スコア (NVscore) を測定した。

結 果：% AVA は水群で $18.9 \pm 2.9\%$ (平均値 \pm 標準誤差, $n=16$) となり, 5 mg 投与により $13.2 \pm 2.8\%$ (n

$=16$), 50 mg 群では $9.4 \pm 2.2\%$ ($n=14$) ($p<0.05$) と水群に比べ有意に減少した。NV score は水群で 4.7 ± 0.6 , 5 mg 群では 4.2 ± 0.5 , 50 mg 群では 3.4 ± 0.6 となった。

結 論：テアニンは高酸素負荷ラットにおける網膜血管新生を抑制させ, 未熟児網膜症に対する予防薬となりうる可能性が示唆された。(日眼会誌 112 : 669—673, 2008)

キーワード：高酸素負荷虚血網膜症, テアニン, 血管新生, 未熟児網膜症

The Effect of Theanine on Oxygen-induced Retinal Neovascularization in the Neonatal Rat

Rui Hiramatsu¹⁾, Takako Nakanishi-Ueda²⁾, Yasuko Takenaka¹⁾, Toshihiko Ueda¹⁾, Sachiko Tomoyasu¹⁾, Yukinobu Iketani³⁾, Tsutomu Shimada³⁾, Masaki Aburada³⁾, Hajime Yasuhara²⁾ and Ryohei Koide¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

³⁾Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Musashino University

Abstract

Purpose : This study was aimed to investigate the preventive effects of theanine treatment on a rat model of oxygen-induced ischemic retinopathy (OIR).

Methods : OIR was induced by maintaining the Sprague-Dawley neonatal rats in 80% oxygen. The rats were treated once daily with gastric gavage of theanine (5 or 50 mg/kg) or distilled water (DW) from postnatal days 6 to 17. The retinal neovascularization (NV) was scored and avascular areas (AVAs) were measured as a % of total retinal area (% AVAs) at day 18.

Results : The % AVAs in 5 mg/kg theanine ($13.2 \pm 2.8\%$), and 50 mg/kg theanine ($9.4 \pm 2.2\%$, $p<0.05$) treatment were lower than those in DW (18.9 ± 2.9

$\%$). The NV scores with 5 mg/kg theanine (4.2 ± 0.5) or 50 mg/kg theanine (3.4 ± 0.6) treatment were lower than those with DW (4.7 ± 0.6).

Conclusion : Theanine treatment suppresses the neovascularization in a rat model of OIR. These results suggest that theanine may prevent retinopathy of prematurity.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 669—673, 2008)

Key words : Oxygen-induced ischemic retinopathy, Theanine, Neovascularization, Retinopathy of prematurity

別刷請求先 : 142-0088 東京都品川区旗の台 1—5—8 昭和大学医学部眼科学教室 植田 俊彦

(平成 19 年 8 月 29 日受付, 平成 20 年 3 月 12 日改訂受理) E-mail : tueda@med.showa-u.ac.jp

Reprint requests to : Toshihiko Ueda, M. D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-0088, Japan

(Received August 29, 2007 and accepted in revised form March 12, 2008)

I 緒 言

進行した未熟児網膜症では、外科的治療を行っても、予後が悪い場合が多い¹⁾。したがって、予防的着想に基づく薬物治療などの研究が重要となるが、未だ確立されたものはない。これまで著者らは、安全性や経済性を考慮し、入手が容易な天然有機化合物の中から、臨床応用可能な物質を模索してきた²⁾。その結果、緑茶成分に網膜血管新生の抑制効果があることを見出した³⁾。

緑茶には *in vitro* において vascular endothelial growth factor (VEGF) の産生抑制⁴⁾ および VEGF 受容体の活性化を阻害するという報告⁵⁾ や、角膜血管新生を抑制したという報告⁶⁾ もあり、新生血管を伴う疾患の予防効果が期待されている。また、カフェイン、カテキン類など種々の成分が含まれている。しかし、単に水溶性あるいは脂溶性の溶媒で抽出した場合は含まれる緑茶中のカフェイン濃度が高いために、特に新生児を対象とした場合は循環器系、中枢神経系への興奮作用などが有害な影響を与えることが危惧される。そこで、高酸素負荷ラット網膜血管新生モデル (oxygen-induced ischemic retinopathy : OIR) を用いて、これまで緑茶を有機溶媒などで分画、分離精製を行いカフェイン以外の有効成分による網膜血管新生抑制作用を探索した⁷⁾。その結果、*n*-butanol 抽出後の水溶性分画に強い血管新生抑制効果があることが分かった。さらに、その分画を高速液体クロマトグラフィーで分析するとテアニンという分子量 174.2 のアミノ酸が高濃度含まれていることが明らかになった。

テアニンは、Sakato⁸⁾ により命名されて以来、その生理活性作用が注目されるようになった。乾燥茶葉重量中には 1~2% 含有され、緑茶全成分における総アミノ酸の約 50% を占めている。ラットにおいて脳内セロトニンの産生抑制やドーパミン放出を促進させる⁹⁾ ことなどが報告されている。抗腫瘍薬の増強効果¹⁰⁾ や抗酸化作用¹¹⁾ も報告されている。また、人工胃液中で安定であり腸内細菌によっても分解されず¹²⁾、さらに Na 依存性担体を介して小腸を輸送される性質をもっているため経口投与に適している¹³⁾¹⁴⁾。また、テアニンは血液脳関門を leucine-preferring transport system の輸送系 (L 系) を介することによって通過し、脳内に取り込まれると考えられている⁹⁾。

今回、このテアニン投与による OIR における網膜血管新生に対する効果を調べた。

II 実験方法

1. OIR の作製

Sprague-Dawley ラット (日本クレア, 東京) を用いた。複数の母ラットから得られた新生仔ラット ($n=36$ 匹) を無作為に二群に分けた。Hasebe らの方法に準じ

て、酸素負荷群 (OIR 群 : $n=26$ 匹) では、生後直後から 12 日齢まで、80% 酸素下で 20.5 時間、大気下で 0.5 時間、次いで 3 時間かけて徐々に 80% 酸素負荷に戻すという周期で飼育し、その後 13 日齢から大気中で 18 日齢まで飼育した¹⁵⁾¹⁶⁾。大気群では、($n=10$ 匹 : 20 眼) は通常の大気下で飼育した。なお、本実験は昭和大学動物実験実施指針に基づき計画し、昭和大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. テアニンの投与方法

L-theanine (東京化成工業株式会社, 東京) の投与量は、5 mg/kg body weight (5 mg 群 : OIR 群 = 8 匹, 大気群 = 4 匹) または 50 mg/kg body weight (50 mg 群 : OIR 群 = 8 匹, 大気群 = 4 匹)、対照には精製水 (水群 : OIR 群 = 8 匹, 大気群 = 4 匹) を用い、それぞれ 5 ml/kg body weight に調製し、6 日齢から 17 日齢まで経口投与した。

3. 網膜血管新生の解析方法

生後 18 日齢のラットをペントバルビタールナトリウム (Somunopentyl[®], 共立製薬, 東京) 麻酔下 (0.65 mg/g body weight, 腹腔内投与) で屠殺し、直ちに眼球を摘出し、0.1 mM Cacodylate buffer (Sigma, MO, USA) で調製した 4% パラホルムアルデヒド (Polyscience, PA, USA) にて固定した。固定後、眼球から網膜を摘出し、ADPase 染色にて網膜血管を染色した。網膜を上下左右の 4 象限に分割切開した後、血管新生スコア [neovascularization (NV) score] を算定し、その後 Reynaud ら¹⁶⁾ の方法で網膜展開標本を作製した。NV score は Hasebe ら¹⁵⁾ の基準によって評価し、4 象限に分け、各象限ごとの NV score を合計した。Score 算定に際しては、score 0 : 血管新生観察されず、1 : 5 個未満の glomerular buds, 2 : 5 個以上の glomerular buds または frond, 3 : 新生血管の隆起が 1 象限の半分以内、4 : 新生血管の隆起が 1 象限の半分以上とし、薬物投与量を把握していない第三者によって無作為に測定され評価された。網膜展開標本はデジタルカメラ (F 3, Nikon, Japan) で撮影しそれぞれの映像をコンピュータ (PC) にてデジタル処理し、NIH image ソフト (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で無血管野および総網膜面積を測定し、総網膜面積に対する無血管野面積の割合 (% avascular area : % AVA) を算出した¹⁵⁾。実験対象ラット 36 匹 (72 眼) 中、6 眼が染色不良により判定不能なため解析から削除した。

4. 統計解析

統計学的解析は Steel-Dwass の方法を用いて行った。NV score と % AVA の相関性は二変量解析により求めた。また、すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で表し、危険率 5% 未満を有意とした。

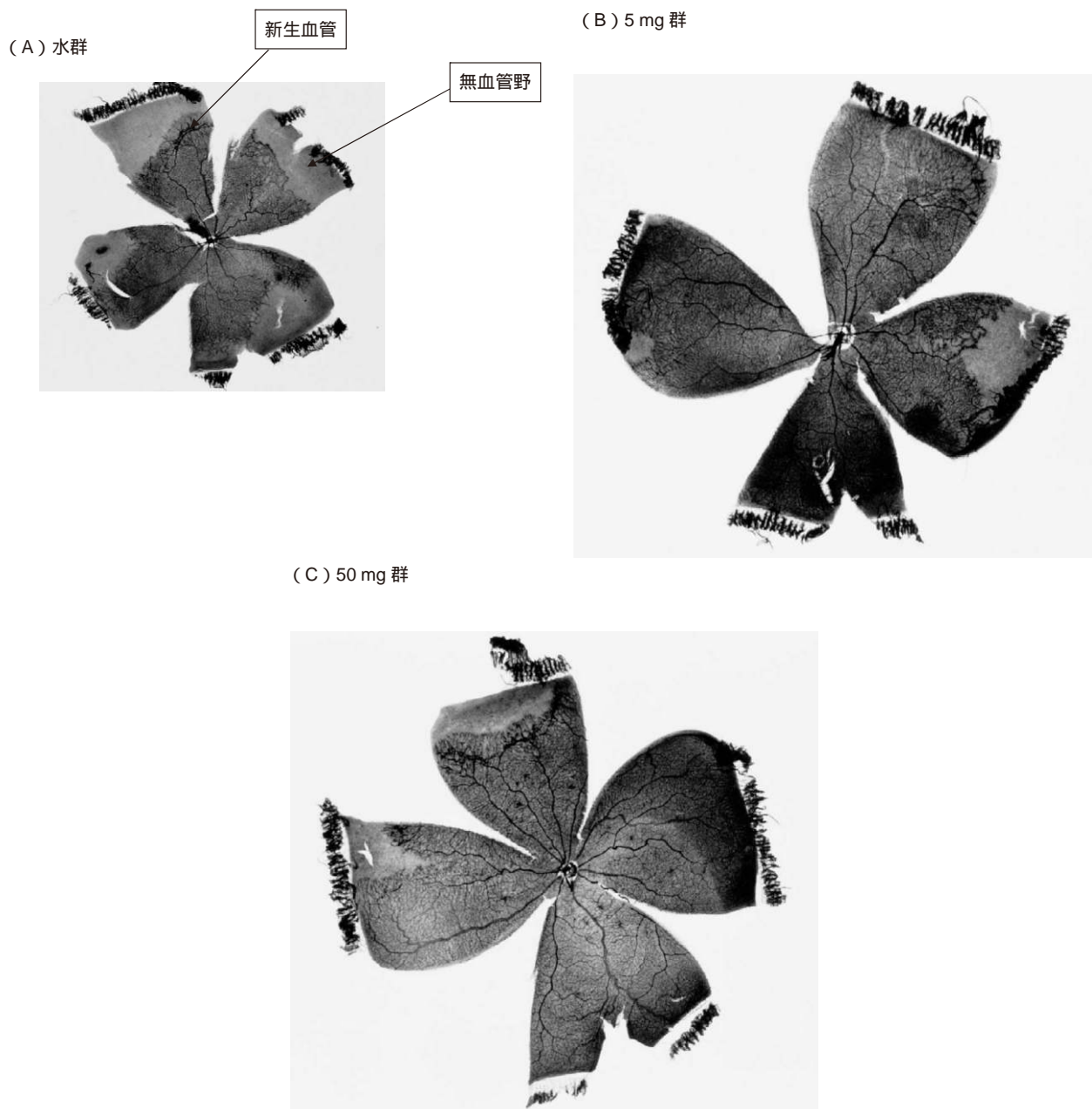


図 1 高酸素負荷ラット網膜血管新生モデル(OIR)網膜展開標本例.

(A)水群 : NV score 6, % AVA 34.5, (B)5 mg 群 : NV score 5, % AVA 8.7, (C)50 mg 群 : NV score 4, % AVA 7.2.

Ⅲ 結 果

大気群または OIR 群いずれにおいてもテアニン投与による体重変化には水群と差はなかった。

生直後から通常の大気中で飼育したラット (n=12) においては, 生後 18 日で鋸状縁まで正常に血管形成されていて (NV score=0), 無血管野は全象限で観察されなかった (% AVA=0%)。したがって, テアニンを 5 mg/kg または 50 mg/kg 投与しても眼底所見に差はなかった。それに対し, OIR 群では, いずれかの象限で無血管野が残存していた。具体例を図 1 に示した。これ

ら NV score と % AVA の結果関係を二変量解析した結果, 正の相関が得られた ($r=0.53$, $p<0.01$) (図 2)。

OIR 群の平均 % AVA はそれぞれ水群では $18.9 \pm 2.9\%$ (n=16 眼), 5 mg 群では $13.2 \pm 2.8\%$ (n=16 眼), 50 mg 群では $9.4 \pm 2.2\%$ (n=14 眼) であった。テアニン 50 mg 群では水群に比べ有意に % AVA が減少した ($p=0.03$) (図 3)。OIR 群の平均 NV score はそれぞれ水群では 4.7 ± 0.6 (n=16 眼), テアニン 5 mg 群では 4.2 ± 0.5 (n=16 眼), 50 mg 群では 3.4 ± 0.6 (n=14 眼) であった (図 4)。

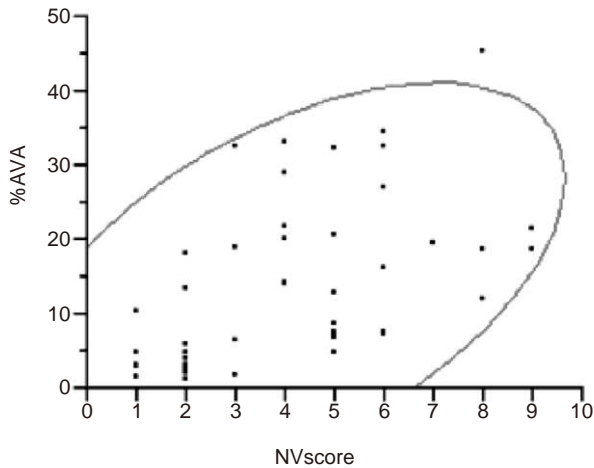


図 2 OIR における neovascularization (NV) score と % avascular area (% AVA) の相関性。
x 軸に NVscore を、y 軸に % AVA を示した。曲線は二変量正規楕円を示す ($p=0.950$)。NVscore と % AVA の間で正の相関を示した ($r=0.53$, $p<0.01$)。

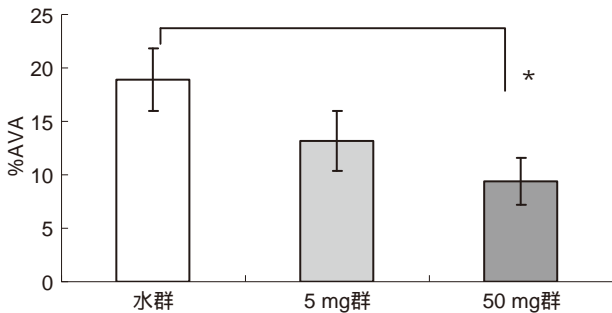


図 3 OIR に対するテアニン投与による % AVA への影響。
数値は平均値 \pm 標準誤差 % で表示した。水群 : $n=16$ 眼, 5 mg 群 : $n=16$ 眼, 50 mg 群 : $n=14$ 眼。
* : $p<0.05$ 。

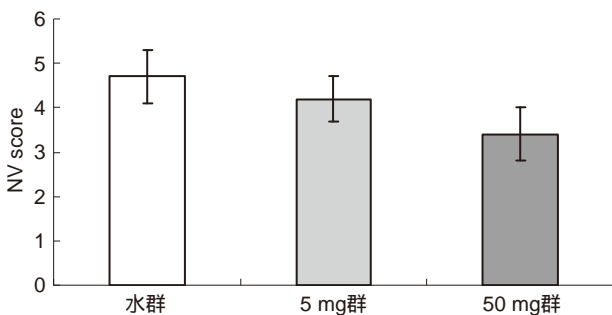


図 4 OIR に対するテアニン投与による NV score への影響。
数値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。水群 : $n=16$ 眼, 5 mg 群 : $n=16$ 眼, 50 mg 群 : $n=14$ 眼。

IV 考 按

緑茶中に含まれるテアニンの 5 あるいは 50 mg/kg body weight の経口投与によって、OIR の血管新生が抑

制され、無血管野面積が減少したことは、将来、未熟児網膜症の発症、増悪の予防に役立つ可能性がある。

OIR は未熟児網膜症をはじめとする網膜血管新生にかかわる疾病の病態モデルとして有用であり、それら疾病の病因や治療法解明のために多くの研究で使用されてきた⁵⁾⁶⁾。

現在、この新生血管発生の機序は 2 つの相に分けて考えられている。生直後のラットの網膜では、乳頭部から血管がわずかに伸びた状態であり無血管野は広い。生理的には、astrocyte などから VEGF が産生され乳頭から周囲に向けて血管が進展していく。この時期に高濃度の酸素に曝露されることにより、VEGF の発現が抑制されるとともに、血管が収縮し、酸化ストレスによって血管内皮細胞のアポトーシスが生じる (Phase I)。

Phase I に引き続いて、12 日齢以降、大気中環境下という急激な相対的低酸素状態に曝され、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) を介して¹⁷⁾¹⁸⁾ astrocyte などから VEGF が急激に産生され、病的な血管増殖が起こるものと考えられている (Phase II)。

正常な血管が末梢の無血管野方向に進展するので、Dorey ら¹⁹⁾の報告と同様に、今回実験した 80% 酸素負荷ラットにおいても % AVA が高値であればあるほど、NV score は高値となり、両者の関係は正の相関を示した (図 2)。

今回の実験系は、未熟児網膜症の臨床研究が倫理的に難しいので、その代替モデルとしての有用性は高いと考えられる。今回の実験において、テアニン 50 mg/kg 投与群では水群に比べ、有意に無血管野 (% AVA) を抑制した。このことより、未熟児新生児を高濃度酸素環境下で保育する際にテアニンを投与すると、網膜血管の新生は抑制され、結果として未熟児網膜症の発症が阻止されることが示唆される。

今回は実験的にこれら作用の機序を明らかにすることはできなかったが、未熟児網膜症の発症要因として相対的低濃度酸素状態による血管収縮作用²⁰⁾²¹⁾や、低出生体重児においては血漿中にセロトニンの前駆体である L-tryptophan が上昇することが報告されている²²⁾。テアニンは血管収縮作用を有するセロトニンの吸収や産生を抑制する²³⁾²⁴⁾ことから、抗血管収縮作用による機序も推測される。また、抗酸化作用¹¹⁾を有することから、酸化ストレスによる血管新生作用に対する抑制効果も推測される。さらに、過酸化脂質誘導ウサギ角膜血管新生モデルではテアニン点眼により血管新生は抑制されるとの報告²⁵⁾がある。しかし、テアニンの作用機序、眼内への移行に関する問題、中枢系への作用など、臨床応用のためにはさらに詳細な検討が必要である。今後のさらなる研究により、将来、未熟児網膜症に対する予防薬となりうる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、本実験中、多大なる協力をいただいた、昭和大学眼科学教室研究補助員小沢江美氏に深謝いたします。

文 献

- 1) **Chiang MF, Arons RR, Flynn JT, Starren JB** : Incidence of retinopathy of prematurity from 1996 to 2000. *Ophthalmology* 111 : 1317—1325, 2004.
- 2) 小菅正太郎, 恩田秀寿, 竹中康子, 中西孝子, 植田俊彦, 亀川真季, 他 : 柴茶湯の高酸素負荷ラット網膜血管新生への影響. *日眼会誌* 110 : 683—688, 2006.
- 3) **Minami M, Hasebe Y, Nakanishi-Ueda T, Iwai S, Ueda T, Dorey CK, et al** : Inhibition of oxygen-induced retinal neovascularization in the neonatal rat by green tea extract. *J Clin Biochem Nutr* 33 : 23—31, 2003.
- 4) **Sartippour MR, Shao ZM, Herber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, et al** : Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J Nutr* 132 : 2307—2311, 2002.
- 5) **Lamy S, Gingras D, Béliveau R** : Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res* 62 : 381—385, 2002.
- 6) **Cao Y, Cao R** : Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398 : 381, 1999.
- 7) **Saito Y, Hasebe Y, Ueda T, Nakanishi-Ueda T, Kosuge S, Aburada M, et al** : Effects of green tea fractions on oxygen-induced retinal neovascularization in the neonatal rat. *J Clin Biochem Nutr* 41 : 43—49, 2007.
- 8) **Sakato Y** : The chemical constituents of tea III. A new amide theanine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 23 : 262—267, 1949.
- 9) **Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, Terashima T** : Effect of theanine, *r*-glutamyl-ethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochem Res* 23 : 667—673, 1998.
- 10) **Sugiyama T, Sadzuka Y** : Enhancing effects of green tea components on the antitumor activity of adriamycin against M5076 ovarian sarcoma. *Cancer Lett* 133 : 19—26, 1998.
- 11) **Yokozawa T, Dong E** : Influence of green tea and its three major components upon lowdensity lipoprotein oxidation. *Exp Toxicol Pathol* 49 : 329—335, 1997.
- 12) **Asatoor AM** : Tea as a source of urinary ethylamine. *Nature* 210 : 1358—1360, 1966.
- 13) **Kitaoka S, Hayashi H, Yokogoshi H, Suzuki Y** : Transmural potential changes associated with the *in vitro* absorption of theanine in the guinea pig intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 60 : 1768—1771, 1996.
- 14) **Terashima T, Takido J, Yokogoshi H** : Time-dependent changes of amino acids in the serum, liver, brain and urine of rats administered with theanine. *Biosci Biotechnol Biochem* 63 : 615—618, 1999.
- 15) **Hasebe Y, Thomson LR, Dorey CK** : Pentoxifylline inhibition of vasculogenesis in the neonatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2774—2778, 2000.
- 16) **Reynaud X, Dorey CK** : Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3169—3177, 1994.
- 17) **Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al** : Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina : temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 182—189, 1999.
- 18) **Brafman A, Mett I, Shafir M, Gottlieb H, Damari G, Gozlan-Kelner S, et al** : Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP 801-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3796—3805, 2004.
- 19) **Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF** : Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 114 : 1210—1217, 1996.
- 20) **Ashton N, Ward B, Serpell G** : Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 38 : 397—432, 1954.
- 21) **Patz A, Eastham A, Higginbotham DH, Kleh T** : Oxygen studies in retrolental fibroplasia. II. The production of the microscopic changes of retrolental fibroplasia in experimental animals. *Am J Ophthalmol* 36 : 1511—1522, 1953.
- 22) **Hernández J, Manjarréz GG, Chagoya G** : New-born humans and rats malnourished in utero : free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res* 488 : 1—13, 1989.
- 23) **Yokogoshi H, Mochizuki M, Saitoh K** : Theanine-induced reduction of brain serotonin concentration in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 62 : 816—817, 1998.
- 24) **Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka YM, Takihara-Matsuura T, Kakuda T, Takeuchi N** : Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 59 : 615—618, 1995.
- 25) **Ueda T, Nakanishi-Ueda T, Shimada T, Aburada M, Hiramatsu R, Ito I, et al** : L-Theanine suppresses lipid hydroperoxide-induced rabbit corneal neovascularization. the Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting Program Summary Book : 1706, 2007.