



博士(食品栄養科学)
管理栄養士
かじや かつこ
加治屋 勝子

2004年3月 静岡県立大学大学院 博士課程 修了
2004年4月 山口大学医学部医学科 助手
2007年4月 (組織改編・職名変更)
山口大学大学院医学系研究科 助教
2011年10月 山口大学大学院医学系研究科 講師
2013年9月 鹿児島大学農学部
現在に至る

血管機能保持のための機能性成分同定及び作用機構解明

脳梗塞や心筋梗塞などの循環器疾患は、癌に次いで我が国死因の上位を占めており、突然死の主要原因となることから早急な対策が求められている。これらの病態は、脳や心臓などの臓器自身の異常ではなく、そこへ分布している血管に異常が生じ、血管の内腔が狭くなって血流が悪化することによって起こる。我々は、日頃から正常な血管機能を保つことで循環器疾患の発症を防ぐことを目指しており、本研究では、血管の収縮性に焦点を絞り、鹿児島県の農林水産資源(食品及び未利用資源)から機能性成分を探索し、予防機構の解明を目指した。本研究の詳細については、論文投稿中のため、現時点では内容を制限させていただかざるを得ないが、興味をお持ちの方は、直接、お問い合わせ願いたい。

1. 背景と目的

厚生労働省による平成25年人口動態統計において、血管関連疾患(心疾患および脳血管疾患)は日本人の死因の上位を占めている(表1)。血管関連疾患の発症は、治療の長期化や後遺症の問題だけでなく、寝たきり状態を引き起こす主要因にもなっており、個人的にも社会的にも損失が大きい。そのため、血管関連疾患の予防法を早急に確立する必要がある。

表1 日本人の死因(平成25年人口動態統計、厚生労働省)
(血管関連疾患は黄色マーク)

| 順位 | 死因 | 割合(%) | 順位 | 死因 | 割合(%) |
|----|-------|-------|----|-------|-------|
| 1 | 悪性新生物 | 28.8 | 5 | 老衰 | 5.5 |
| 2 | 心疾患 | 15.5 | 6 | 不慮の事故 | 3.1 |
| 3 | 肺炎 | 9.7 | 7 | 自殺 | 2.1 |
| 4 | 脳血管疾患 | 9.3 | 8 | その他 | 26.0 |

近年、血管内皮機能の低下によって起こる血管関連疾患について多くの報告があった。血管は外側から、外膜、中膜、内膜の三層で構成されており、血管の最も内側に位置し血液と接している内膜には、血管内皮細胞が存在している。血管内皮細胞からは、血管弛緩因子である一酸化窒素(NO)が放出されており、この発見はノーベル医学・生理学賞を受賞(1998年)するほどの医学的に重要な発見であり、大きな注目を集

めた。NOは、血管の収縮と弛緩を制御することで、血圧の調節や血液の体内分布を調整する重要な役割を担っているほか、白血球やマクロファージなどの血管内皮への付着によって形成される血栓を防ぐ機能もある。しかしながら、喫煙者や、脂質異常症(高脂血症、高コレステロール血症など)、糖尿病、虚血性心疾患などを患っている方は、血管内皮細胞が常に酸化ストレス・酸化LDLに曝されているため、血管内皮細胞が傷害され、NO産生が抑制されてしまう。その結果、更に血管内皮機能が低下し、血圧が高くなるなどの血管関連疾患を併発してしまうという悪循環が起きる。そのため、血管関連疾患の予防を目指し、血管機能を正常に保つことが重要である。本研究では、鹿児島県の農林水産資源(可食部及び廃棄部を含む)に注目し、正常な血管内皮機能の維持に役立つ機能性成分を探索し、予防機構の解明を目指した。

2. 方法と結果

2-1. 材料

離島を含む鹿児島県全域から食品及び廃棄部(未利用資源)を収集した。各種農産物は、適当な大きさにカット後、ホモジナイズし凍結乾燥粉末にした。評価試料は、野菜類(根菜類、果菜類、葉茎菜類、マメ類など)及び果樹類を合わせて可食部65サンプル、非可食部40サンプルを用いた。試料は、それぞれメタノール/水抽出とヘキサン/ジクロロメタン抽出を行い、合計210サンプルを評価した。

2-2. *in vitro* 試験

血管を構成している血管平滑筋細胞や血管内皮細胞は、ストレス環境に曝されると活性酸素分子種(ROS)の産生を促進し、生じたROSは、膜脂質の過酸化やDNAの酸化を起こし、細胞機能を障害する。そのため、血管保護(血管障害予防)のためには抗酸化物質が有効である。我々は、膨大なサンプル数の中から抗酸化作用の高い物質を絞り込むため、簡易的に抗酸化作用を調べることができるジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル捕捉活性試験をおこなった(図1)。DPPHラジカルは、不対電子を持つ安定な人工的ラジカルであり、生体内には存在しない。活性酸素ではないが、活性酸素と同様に他の物質と反応し、酸化させる作用を持っている。通常、ラジカルは不安定な物質のため、短時間で別の物質へと変換されていく。そのため、反応性の高いラジカルを評価試験に用いるのは困難であり、人工的に作られた安定なDPPHラジカルは抗酸化作用を調べる上で非常に扱いやすい物質である。

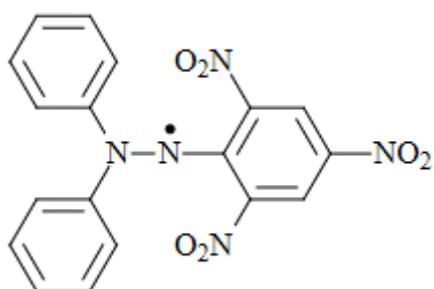


図1. DPPH ラジカルの化学構造

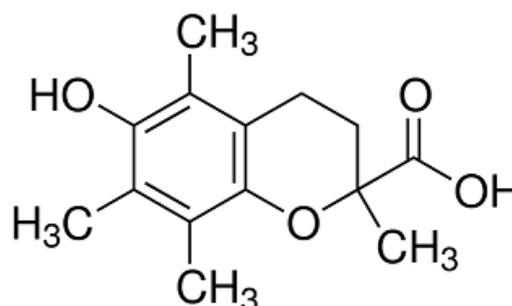


図2. Trolox の化学構造

本法を用いて農産物のDPPHラジカル捕捉能を調べた結果、根菜類に高い抗酸化作用が認められた。

2-3. 細胞を用いた試験

HCAECに対する根菜類の細胞傷害性について、コハク酸塩テトラゾリウム還元酵素を使用するWST法を用いて調べた(図3)。この方法は、生きている細胞のみと反応して生成する水溶性のホルマザン色素の吸光度を直接測定することで生細胞数を計測することが出来る。また、WST法は、細胞に対する毒性が低く、毒性試験を行った細胞をそのまま他の試験に使用出来るのも特徴である。評価した濃度範囲の根菜類は、

HCAEC に対して致命的な毒性は無いと考えられた。

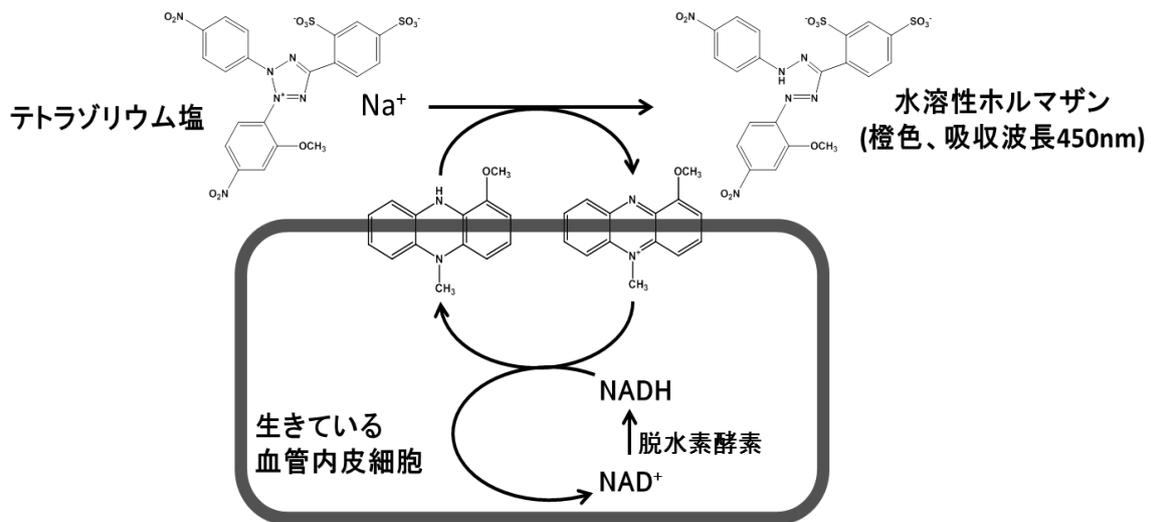


図 3. 細胞毒性試験の概要

HCAEC は、NO を放出することで血管内皮機能を保護している。NO は、生理的条件下では直接測定出来るが、生体外での直接的な測定方法は確立されていない。しかし、間接的には測定可能である。NO は半減期が短く不安定なため、NO の酸化物である亜硝酸イオン (NO_2^-) や硝酸イオン (NO_3^-) の濃度から測定する必要がある (図 4)。



図 4. NO の合成と酸化

NO_2^- は 2, 3-ジアミノナフタレンと反応し、ナフタレントリアゾールの蛍光付加体を形成するため、この蛍光度を検出した (図 5)。

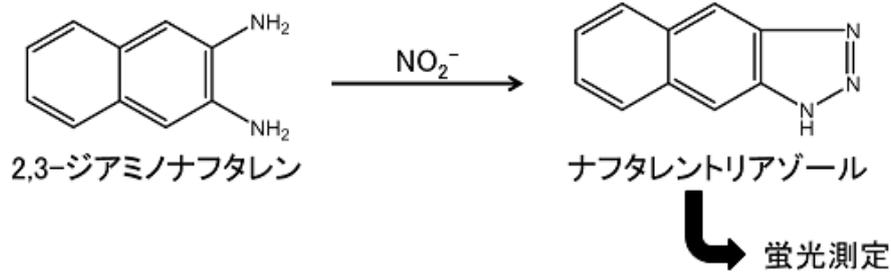


図 5. NO_2^- 濃度測定の原理

根菜類を用いて NO 産生量を測定したところ、いくつかの品種において、 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ 濃度の急激な上昇が見られた。

3. NO 産生機構の検討

正常な血管内皮細胞からは NO が放出されているが、活性酸素が大量に発生すると血管内皮細胞が損傷され、

細胞数の減少により NO 産生量も減少する。前述の抗酸化作用の測定結果より、根菜類に高い抗酸化作用が認められたため、活性酸素の発生が抑えられ HCAEC を保護することで細胞数が減少せず、結果的に NO 産生量が増加するという仮説①を立てた。HCAEC を用いて活性酸素分解酵素（スーパーオキシドディスムターゼ SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ）による NO 産生量の検証実験をおこなった。その結果、活性酸素分解酵素によって HCAEC 細胞数の増減と NO 産生量の増減が比例しておらず、根菜類の抗酸化性と HCAEC の NO 産生量は直接的に関係していないと考えられた。次に、根菜類が、NO 合成酵素(NOS)を活性化することで、NO 産生量が増加するという仮説②を立てた。NOS は、アミノ酸である L-アルギニンと酸素から、L-シトルリンと NO を合成する代謝反応に関与する酵素で、常時細胞内に一定量存在する構成型 NOS (constitutive NOS; cNOS) と、炎症やストレスにより誘導される誘導型 NOS (inducible NOS; iNOS) に分類され、更に cNOS には神経型(neuronal NOS; nNOS)と血管内皮型(endothelial NOS; eNOS)が存在する。NO 合成酵素の関与については、現在、検討中である。

4. 組織を用いた試験

実際に血管が異常収縮した場合に試料が血管弛緩に貢献できるかどうか、実験動物を用いて評価した。今回、血管収縮判定試験を行った野菜類(根菜類、果菜類、葉茎菜類、マメ類など)及び果樹類の中には異常収縮を抑制する高い効果を持つものがあったが、血管内皮機能に働きかけるものだけではなく、血管平滑筋へ直接作用しているものも認められた。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) 加治屋勝子 他3名, 血管医学, 9, 2008.
- 2) K. Kajiya, et. al, Foods & Food Ingredients J. 217, 284-288, 2012.
- 3) 加治屋勝子, 化学と生物, 50, 269-276, 2012.
- 4) C. Rask-Madsen, et. al, Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab., 3, 46-56, 2007.
- 5) T. Inoguchi, et. al, Diabetes, 49, 1939-1945, 2000.
- 6) K. Nashiki, et. al, PLoS ONE, 8, e80349. doi:10.1371/journal.pone.0080349, 2013.
- 7) K. Ozawa, et. al, Sci. Rep., 3, 2202. doi:10.1038/srep02202, 2013.
- 8) H-A. Lee, et. al, Food Sci. Nutri., 19, 70-177, 2014.