

高血圧による血管および臓器障害における炎症細胞の動態と アズキによる軽減効果

向井友花¹⁾

1) 青森県立保健大学

Key Words ①高血圧 ②炎症 ③酸化ストレス ④アズキ

I. はじめに

高血圧の長期的放置は動脈硬化を招き、日本人の三大死因のうちの二大疾患である脳卒中や心血管疾患など、生命に関わる病気を引き起こす。したがって、疾病の早期発見にとどまることなく、健康を増進し疾病の発病を予防する一次予防の重要性が指摘されている。こうした流れから、現在、疾病の予防や健康の維持・増進に役立つ食品成分の生体調節機能の探索と実用化開発が精力的に行われつつある。

生体は、酸化と抗酸化の巧妙なバランスのもとに維持されているが、高血圧状態では酸化ストレスが亢進し、血管内皮や腎臓などの臓器で活性酸素が過剰に産生される¹⁾。活性酸素の一種であるスーパーオキシド (O_2^-) は、血管弛緩の作用を有する一酸化窒素 (NO) と容易に結合してしまうため、さらなる血圧上昇を招く。また活性酸素は、レドックス (酸化還元) に関連する転写因子 (NF- κ B など) の活性化を促し、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) を始めとする種々の生理活性因子の産生を誘導するため、炎症細胞 (単球/マクロファージ系やリンパ球など) が血管内皮や臓器内に集積する。その後、単球/マクロファージ系は酸化した LDL-コレステロールを取り込んで泡沫細胞と化し、動脈硬化の病変が形成される²⁾。したがって、高血圧の発症や炎症細胞の増加は、動脈硬化の進展に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方、アズキは北海道および東北地方で生産量が多く、餡などの和菓子や赤飯として日本で古くから伝統的に食されている食品である。アズキはポリフェノールや食物繊維、サポニンなど多くの生体調節機能を有する成分を含むことが明らかになっており^{3,4)}、日本人にはなじみが深く、経験的にも健康に寄与する食材として知られているが、高血圧に伴う動脈硬化の発症・進展に深く関与する炎症細胞の挙動やそれに関わる生理活性物質の産生に及ぼすアズキの影響については、ほとんどわかっていない。

本研究では、アズキが動脈硬化の発症や進展に果たす生理的役割を解明するため、高血圧状態にあるモデルラット (高血圧自然発症ラット; SHR) にポリフェノールや食物繊維を多く含むアズキ種皮を長期間投与し、アズキ種皮が高血圧を緩和するかを調べた。さらに、①血管内皮における活性酸素 (ここでは、 O_2^-) の産生量を抑制するか、②マクロファージなどの炎症細胞の集積に関与する生理活性物質 (MCP-1) や、炎症細胞から放出される生理活性物質 (プロスタグランジンやトロンボキサン) の産生に関与する酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) の発現を抑制するかを検討した。

II. 材料および方法

1. アズキ種皮の採取およびアズキ種皮含有飼料の作製

北海道産のアズキ（エリモショウズ; *Vigna angularis*）を4倍容の蒸留水に25℃で一晩浸漬した後、種皮を剥皮および乾燥し、グラインダーを用いて粉碎した粉末をアズキ種皮粉末（ABSC ; Azuki Beans Seed Coat）として実験に供した。ABSCには、ポリフェノール類（総ポリフェノールとして76.3 g/kg）および食物繊維（733 g/kg）が豊富に含まれている。ABSCを標準動物飼料であるMF固型飼料（オリエンタル酵母工業）に0.1%、および1.0%の濃度で添加して、ABSC含有飼料を作製した。

2. 実験動物、投与方法および試料の採取

4週齢、雄性の高血圧自然発症ラット（SHR）および対照として正常血圧のWistar Kyoto rat（WKY）を実験に供した。14週間の予備飼育後、収縮期血圧が180mmHg以上になったSHRを3群に分け、0%、0.1%または1.0%ABSC含有飼料を8週間与えた。同週齢のWKYは2群にわけ、0%または1.0%ABSC含有飼料を同様に与えた。投与期間中、2週間ごとに血圧を尾部カフ法により測定した。投与終了後、一晩絶食しエーテル麻酔下で採血し、遠心分離して血漿を採取した。屠殺し、臓器を速やかに採取し重量を測定した。大動脈は生理食塩水中で4℃にて一晩、腎臓は皮質および髄質部分に分割し-80℃にて測定に供するまで保存した。

3. スーパーオキシド産生量の測定

大動脈は約2mmのリング状にカットし、腎皮質は緩衝液中で破碎して腎皮質ホモジネートを調製し、それぞれO₂産生量の測定に供した。NADPH オキシダーゼ由来のO₂産生量は、ルシゲニンを用いた化学発光法により測定した。

4. MCP-1 の mRNA 発現量の測定

大動脈から総RNAを抽出し、MCP-1のmRNAの発現量をリアルタイムPCR法により測定した。

5. シクロオキシゲナーゼ-2 および誘導型 NO 合成酵素のタンパク質発現量の測定

大動脈を緩衝液中で破碎して大動脈ホモジネートを調製した。大動脈ホモジネートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、ウエスタンブロット法にて、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）および誘導型NO合成酵素（iNOS）タンパク質の発現量を測定した。

III. 結果および考察

1. 体重の変化

投与期間中、SHRおよびWKYともに体重は増加した（図1）。ABSC投与による体重への影響は見られなかった。

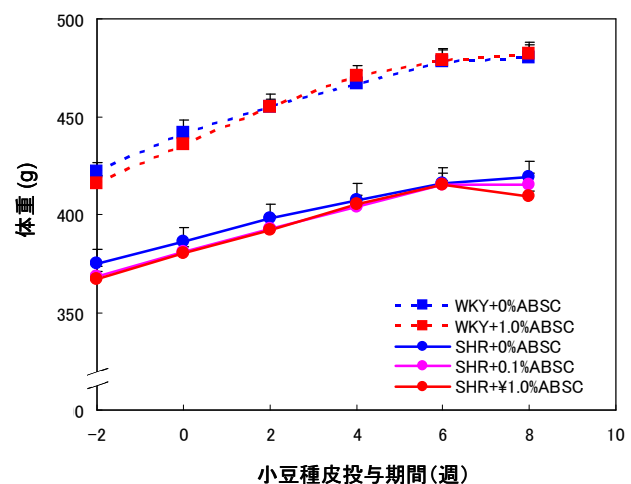


図1 SHRおよびWKYの体重に及ぼすABSCの影響。平均値±標準誤差（n=8）。

2. 血圧の変化

投与期間中、SHR の収縮期血圧はWKY より有意に高く推移した (図 2)。SHR の 0%ABSC 群は、収縮期血圧が上昇し続けたのに対し、0.1%および1.0%ABSC 群の収縮期血圧は投与2週目から0%ABSC 群に比べて有意に低値を示した。このことから、ABSC は血圧上昇抑制効果を有するものと考えられた。

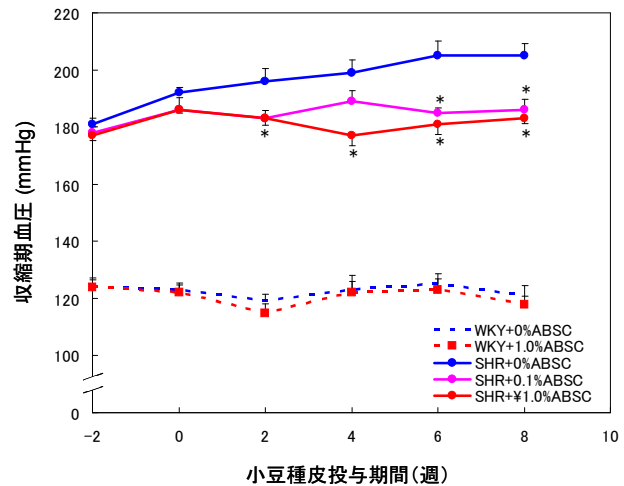


図2 SHRおよびWKYの収縮期血圧に及ぼすABSCの影響。
*p<0.05 vs SHR+0%ABSC, 平均値±標準誤差 (n=8) .

3. 大動脈および腎皮質における O₂⁻ 産生

大動脈におけるNADPHを基質としたNADPHオキシダーゼ由来O₂⁻産生量を図3Aに示した。SHRの0%ABSC群ではWKY群に比べO₂⁻量が有意に増加しており、血管内皮における酸化ストレスが亢進していることが示唆された。これに対し、SHRの0.1%および1.0%ABSC群ではO₂⁻量が有意に減少していた。これらのことより、ABSCはSHRで亢進した血管内皮における酸化ストレスを軽減する効果を有することが示唆された。一方、腎皮質におけるO₂⁻産生量にはABSC投与による有意な差は見られなかった (図3B)。

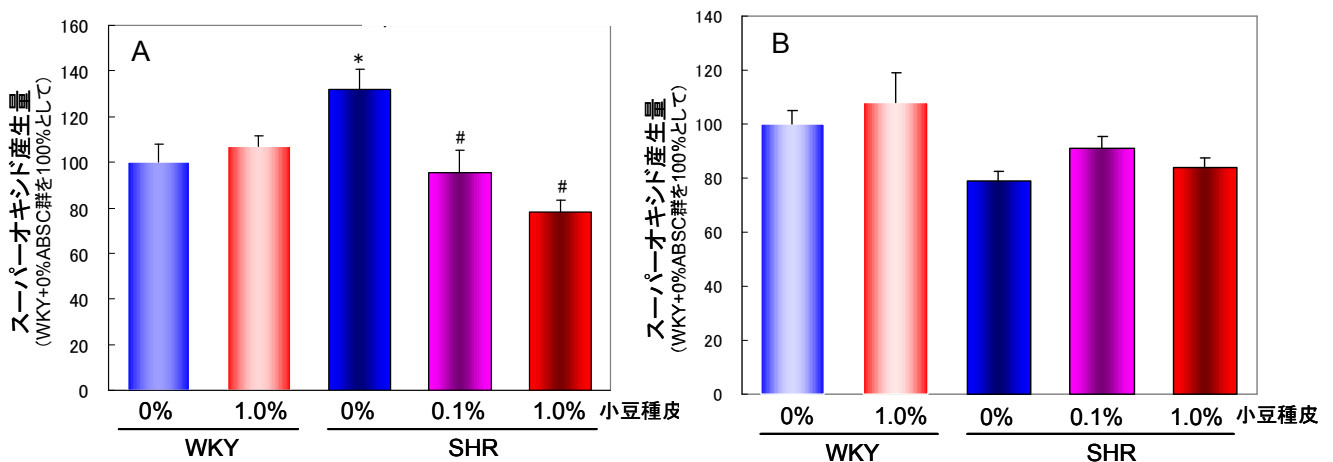


図3 SHRおよびWKYの大動脈(A)および腎皮質(B)におけるNADPHオキシダーゼ由来O₂⁻産生量に及ぼすABSCの影響。*p<0.05 vs WKY+0%ABSC, #p<0.05 vs SHR+0%ABSC, 平均値±標準誤差 (n=8) .

4. MCP-1 mRNA および COX-2, iNOS タンパク質の発現

炎症細胞の一種マクロファージの遊走や活性を調節する炎症性サイトカインであるMCP-1の大動脈におけるmRNA発現量を測定した結果、SHRの0%群ではWKY群と比較して有意に増加していたが、1.0%ABSC投与により抑制された。このことから、ABSCはMCP-1の発現を転写レベルで抑制し、炎症細胞の浸潤を抑制している可能性が示された。

炎症時にサイトカインの刺激により誘導されるCOX-2の大動脈におけるタンパク質発現量を測定した結果、SHRの0%群ではWKY群と比較して有意に増加していたが、

1.0%ABSC 投与により抑制された。このことから、ABSC は COX-2 の発現を抑制し、炎症時に COX-2 を介して亢進するプロスタグランジン E₂ (血管透過性などに作用) やプロスタグランジン I₂ (血管拡張及び発痛などに作用) を抑制している可能性が示された。

一方、炎症時に誘導される iNOS から多量かつ持続的に一酸化窒素 (NO) が生成された場合⁵⁾、大動脈で主に NAD(P)H オキシダーゼにより産生される O₂⁻と結合し、血管障害性のあるペルオキシナイトライトが生成され、さらなる炎症反応を招くことが知られている。そこで大動脈における iNOS タンパク質の発現量を測定した結果、SHR の 0%群では WKY 群と比較して有意に増加していたが、1.0%ABSC 投与により抑制された。このことから、ABSC は iNOS の発現を抑制し、ペルオキシナイトライトの生成を抑制している可能性が示された。

VI. 結論

ポリフェノール類および食物繊維含有量の多い ABSC を、高血圧状態にある SHR に 8 週間長期投与した。その結果、投与 2 週目から SHR の血圧上昇が抑制された。また、0.1 および 1.0%ABSC を投与した SHR の大動脈では、0%群と比較して O₂⁻産生の抑制が認められた。さらに、1.0%ABSC を投与した SHR の大動脈では、0%群と比較して MCP-1 の mRNA、COX-2 および iNOS タンパク質発現の抑制が認められた。これらのことから、ABSC は血圧上昇抑制作用を有し、血管内皮における酸化ストレスを軽減し、炎症反応を抑制することが明らかとなり、動脈硬化症の発症や進展の予防に有効である可能性が示された。

V. 参考文献

- 1) Kerr S, Brosnan JM, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 33, 1353-8, 1999.
- 2) 倉林正彦. 酸化ストレスと動脈硬化, 医学の歩み 218, 77-82, 2006.
- 3) 篠原和毅, 近藤和雄. 小豆などの雑豆類、大地からの健康学 155-70, 2001.
- 4) Kitagawa I, Wang HK, Saito M, Yoshikawa M. Saponin and Sapogenol. XXXII. Chemical Constituents of the Seeds of *Vigna angularis* (WILLD.) OHWI et OHASHI. (2). Azukisaponins I, II, III, and IV. *Chem Pharm Bull* 31(2), 674-82, 1983.
- 5) Kumar U, Chen J, Sapoznikhov V, Canteros G, White BH, Sidhu A. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens*. 27(1), 17-31, 2005.

VII. 発表

- ・ 向井友花, 畑井朝子, 佐藤伸. アズキ種皮による高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧上昇抑制および血管内スーパーオキシド産生抑制効果. 日本家政学会第 60 回大会, 兵庫, 2009.5. (発表予定)
- ・ Mukai Y, Sato S. Azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats suppress superoxide production and NAD(P)H oxidase subunits expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. 第 41 回日本動脈硬化学会総会, 山口, 2009.7. (発表予定)