

[原著論文]

ナガイモ投与の自然発症高血圧ラットの血圧上昇抑制に及ぼす影響

野澤めぐみ¹⁾²⁾ 佐藤 伸¹⁾³⁾ 羽鳥 有香¹⁾ 井澤 弘美³⁾ 嵯峨井 勝¹⁾³⁾

Effect of yam (*Dioscorea batatas*) treatments on suppression of blood pressure, and renal and vascular nitric oxide synthase expression in spontaneously hypertensive rats

Megumi Nozawa¹⁾²⁾ Shin Sato¹⁾³⁾ Yuka Hatori¹⁾
Hiromi Izawa³⁾ Masaru Sagai¹⁾³⁾

要約

一酸化窒素 (NO) は血管の弛緩作用を持ち、血圧調節に重要な役割を演じている。一方、生体内で産生され、酸化ストレスをもたらすスーパーオキシド (O_2^-) は血圧を上昇させることが知られている。それゆえ、高血圧状態では O_2^- が産生し、NO と反応するため、血管弛緩に有効な NO 量が低下していると考えられている。そこで、私たちは、抗酸化能をもつ食品成分が活性酸素を消去することができれば、血圧上昇を抑制できるのではないかと考えた。ナガイモ (*Dioscorea batatas*) には抗酸化作用を示す物質が含まれていることが試験管内実験で報告されている。しかし、ナガイモの血圧に及ぼす影響に関する科学的知見はほとんどない。そこで、本研究では自然発症高血圧ラット (SHR) を用いてナガイモに血圧上昇抑制作用があるかどうかを検討し、さらにその作用機序を明らかにすることを試みた。

5 週齢の雄の SHR および正常血圧の Wistar Kyoto ラット (WKY) に市販のナガイモ粉末を標準動物飼料 (CE-2 飼料、日本クレア社) に混合した飼料を与えた。動物を WKY + ナガイモ 0% 飼料群、+ 5% 群および SHR + 0% 群、SHR + 0.56% 群、SHR + 1.67% 群、SHR + 5% 群の 6 群に分け、各飼料を 15 週間自由に摂取させた。ナガイモ投与期間中に体重および収縮期血圧を 2 週間に 1 回測定し、投与終了後に採血し、摘出した臓器重量を測定した。血液の「サラサラ度」を示す血液レオロジー、血漿脂質成分、酸化ストレス指標としての過酸化脂質 (LPO) およびグルタチオン (GSH) 濃度を測定した。腎臓中の内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) および O_2^- と NO の反応性生物 (ONOO⁻) から生じるニトロチロシン (nTyr) の発現量をウェスタンブロット法により測定した。また、大動脈および腎臓中の eNOS の分布を免疫組織化学的に観察した。

その結果、加齢に伴う SHR の血圧上昇は WKY に比べて顕著であった。SHR + 0% 群に比べて SHR + 1.67% 群と SHR + 5% 群で血圧上昇の抑制傾向がみられ、投与 15 週目には約 20 mmHg の有意な血圧上昇抑制効果が認められた。血液レオロジー、血漿中脂質成分および GSH・LPO 値ではナガイモによる変化はみられなかった。腎臓中の eNOS 発現量は WKY + 0% 群に比べ SHR + 0% 群で有意に高く、nTyr の発現量も高い傾向にあった。SHR + 0% 群と SHR + 5% 群では、いずれの発現量にも差は認められなかった。免疫染色法を用いた大動脈と腎臓の eNOS 発現は、WKY + 0% 群に比べて SHR + 0% 群の血管内皮と尿管に強い陽性反応が認められた。これに対して、血管内皮では SHR + 0% 群に比べて 5% 群では反応が弱くなり、血管内皮の eNOS 発現が低減していた。

以上から、ナガイモ投与により SHR の血圧上昇が有意に抑制され、大動脈の eNOS 発現が低下する

1) 青森県立保健大学 大学院健康科学研究科 生活健康科学分野

Department of Life Sciences, Graduate School of Health Sciences, Aomori University of Health and Welfare

2) 現 医療法人 手稲溪仁会病院 (札幌市)

Present address: Medical Corporation Teine Keijinkai Hospital (Sapporo city)

3) 青森県立保健大学 健康科学部人間総合科学科目

Division of Human Sciences, Faculty of Health Sciences, Aomori University of Health and Welfare

傾向が認められた。このナガイモによる血圧上昇の抑制機序の一つとして、ナガイモ中の抗酸化成分が体内の O_2^- を消去したため、 O_2^- と反応して O_2^- 消去に働いていた NO を産生する血管内皮中の eNOS の発現を低減したものと考えられた。

Abstract

The purpose of this study was to determine whether yam (*Dioscorea batatas*) could alleviate hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) and modulate the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the kidney and the aorta. Five-week-old male SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) were used. SHR were divided into four groups with 0, 0.56, 1.67 and 5% diets of yam. WKY were divided into two groups with 0 and 5% diets. Systolic blood pressure (SBP) was measured. At the end of the 15-week treatment period, the expression and localization of eNOS protein in the kidney and the aorta were examined by Western blot or immunohistochemical analyses. The SBP in SHR elevated markedly with aging compared with that in WKY. Compared with SBP of the yam-untreated SHR, SBP of 5% yam-treated SHR showed a significant attenuation of approximately 20 mmHg. The yam-untreated SHR showed a marked upregulation of eNOS proteins in the kidney by Western blot, compared with the WKY group. No significant difference was found in the eNOS expression between the yam-treated and -untreated SHR. In immunohistochemical analysis, strong immunoreactivities against the eNOS antibody were seen in the aorta of the untreated SHR. In contrast, the intensities of eNOS signal in the aorta of 5% yam-treated SHR were weaker than those of the untreated SHR. In conclusion, our results suggest that the yam may, at least in part, play a role in modulating the upregulation of eNOS in the aorta of SHR, and that the modulation in the aorta might be associated with the attenuation of hypertension.

(J.Aomori Univ.Health Welf.6(3): 369-378, 2005)

キーワード：高血圧、ナガイモ、一酸化窒素合成酵素

Key words : hypertension, yam (*Dioscorea batatas*), nitric oxide synthase

I. はじめに

今日の高齢社会では、単に命を永らえるだけではなく、寝たきりや認知障害になることなく健康で、かつ日常生活動作ができる“健康寿命”の延伸が求められている。特に、健康寿命と関連の深い高血圧は、動脈硬化が原因とされる冠動脈疾患や脳血管障害などの重要な危険因子である。これらの予防のために、栄養、運動、喫煙などの生活習慣の改善が極めて重要である。それゆえ、高血圧を食事成分の摂取で予防することが可能になれば、その恩恵は計り知れない。

血圧上昇には、様々な調節因子が関与しているが、近年、高血圧と活性酸素との関連が、高血圧モデルラットやヒトにおいて明らかになってきた¹⁻⁴⁾。また、高血圧状態が続くと酸化ストレスによって臓器障害が起こることも知られている⁵⁾。フリーラジカル的一种である一酸化窒素 (nitric oxide:NO) は体内で NO 合成酵素 (NOS) から産生され、様々な生理的役割を演じている。たとえば、血管内皮細胞に存在する NOS (eNOS) から産生された NO は、血管平滑筋の弛緩に関与する。一方、eNOS は L-アルギニンの欠乏と Nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate (NADPH) の存在下では、NO を合成するよりも分子状酸素を還元してスーパーオキシド (O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2) を産生することが知られている⁶⁾。また、NO は活性酸素、特に、 O_2^- と容易に反応し、パーオキシナイトライト ($ONOO^-$) の生成を経て、最終生成物であるニトロチロシンとなる⁷⁻⁹⁾。ニトロチロシンが増加することで $ONOO^-$ の増加あるいは NO の減少が推測される。 O_2^- が増加する高血圧においては、血漿や腎臓中のニトロチロシンが増加し、その結果、血管の弛緩に有効な NO が減少して血圧が上昇することが分かってきた。ビタミン C や E を高血圧の実験動物に投与すると、血圧上昇が抑制される¹⁰⁾。これは抗酸化物質であるビタミン C や E が O_2^- を捕捉することによって、NO と O_2^- との反応生成物が増加せず、血管弛緩に有効な NO が減少しないためと考えられている¹⁰⁾。

青森県の特産品であるナガイモ (*Dioscorea batatas*) は、滋養強壮や疲労回復に良いとされてきたが、未だ科学的に十分検討されてはいない。これまで当研究室のラットを用いた実験でナガイモが LDL-コレステロール値を低下させ、HDL-コレステロール値を高めて動脈

硬化性疾患を予防する作用が期待できることと、動脈硬化の原因になる酸化型 LDL の生成を抑える抗酸化作用もあることを見出した¹¹⁾。台湾の研究グループは、ナガイモを界面活性剤添加および加熱処理等により抽出した物質が抗酸化作用を示すことを報告している¹²⁾¹³⁾。さらに、ナガイモが属するヤマノイモ科のダイジョ (*D. alata*) がアセトアミノフェン投与で生じた肝臓や腎臓の酸化的障害を軽減したという報告もある¹⁴⁾。このように近年、ヤマノイモ科食品の生理調節機能に関する研究が行なわれているが、その研究のほとんどが試験管内実験であり、ナガイモの高血圧の予防効果や軽減効果に関する知見はほとんどみあたらない。もし、ナガイモが抗酸化作用により生体内で O_2^- 等を消去するならば、生体内での NO 量の相対的増加が予想され、血管を弛緩する方向に作用することが推測される。そこで、本研究ではナガイモの新規生理調節機能を明らかにするために、自然発症高血圧ラット (Spontaneously hypertensive rat : SHR) にナガイモを長期間投与し、血圧上昇を抑制する作用があるかどうか、ならびにその作用の機序について検討した。

II. 実験材料および方法

本研究はすべて「青森県立保健大学動物実験に関する倫理指針」に従って実施された。

1. 実験動物

5 週齢の雄性的 SHR と、その対照動物である正常血圧の Wistar Kyoto Rat (WKY) (いずれも日本 SLC 株式会社) を実験動物として使用した。動物は 4 週齢で購入後、1 週間馴化させてから実験に供した。飼育環境は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 7\%$ 、各 12 時間の明暗サイクルとした。

2. 群分けおよび試料の採取

ナガイモの冷凍乾燥粉末 (おいらせ農業協同組合) を購入し、これを標準動物飼料 (CE-2 飼料, 日本クレア株式会社) に混合し、ナガイモ含有固形飼料を作製した。また、ナガイモを含まない CE-2 固形飼料のみの対照食をナガイモ 0% 飼料と記した。WKY へのナガイモ投与量は 0% および 5% とし、SHR のナガイモ投与用量は、最高用量を 5% とし、公比 4 として中用量の 1.67% と最低用量を 0.56% の 3 用量とした。なお、CE-2 飼料の組成は変更せず、単純にナガイモを重量比で添加し、固形化した飼料を用いた。CE-2 飼料の組成は、水分 8.6%、粗タンパク質 24.9%、粗脂肪 4.6%、非窒素抽出物 (炭水化物を含む) 51.5%、粗繊維 3.7%、粗灰分 6.7% である。

飼料投与群は、1) WKY + ナガイモ 0% 飼料群、2) WKY + 5% 群、3) SHR + 0% 群、4) SHR + 0.56% 群、5) SHR + 1.67% 群、6) SHR + 5% 群の 6 群とした。各群とも 1 群の動物数は 8 匹 ($n = 8$) とした。飼料は 15 週間投与し、飲料水は蒸留水を与えた。飼料および飲料水は自由摂取とした。動物の血漿や臓器等の試料の採取は、ナガイモ投与開始後 16 週目に行なった。

ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で血液を採取し、40 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を十分に灌流させ、直ちに心臓、大動脈、腎臓、肝臓を摘出し、重量を測定した。各臓器の一部を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光純薬工業株式会社) で固定し、残りを -80°C の冷凍庫にて保存した。

3. 測定項目

3.1. 体重および血圧

実験期間中に体重を 2 週間に 1 回測定した。血圧測定にはラット・マウス用非観血式血圧計 (MODEL MK-1130 : 室町機械株式会社) を使用し、2 週間に 1 回測定した。

3.2. 血液レオロジー (流動性) の測定

血液レオロジーには、細胞マイクロレオロジー測定装置 (MC-FAN : 日立原町電子工業株式会社) を用いて、新鮮血液 $100 \mu\text{l}$ が血液フィルターチップ (Bloody 6-5 L : 日立原町電子工業株式会社) を通過する時間を測定した。得られた血液通過時間 (血液レオロジー「流動性 = 血液サラサラ度」) は、直前に測定された $100 \mu\text{l}$ の生理食塩液 (大塚製薬株式会社) の通過時間を用いて、次式により計算した。血液通過時間 = (実際の血液通過時間 \times 12 秒) / 生理食塩液通過時間

3.3. 血液生化学分析

血漿中のトリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-Chol)、HDL-コレステロール (HDL-Chol) および尿素窒素 (BUN) の各濃度はドライケム (生化学自動分析装置; 富士ドライケム 3500 V : 富士写真フイルム株式会社) を用いて測定した。

3.4. 過酸化脂質 (LPO) およびグルタチオン

(GSH) の測定

血漿中の酸化ストレス指標として LPO 濃度を測定した。血漿中の LPO 濃度は、過酸化脂質-テストワコー (和光純薬工業株式会社) 臨床検査用キットを用いて測定した。腎臓中の LPO 濃度は、Ohkawa らの方法¹⁵⁾ によって測定した。腎臓内の還元型 GSH 濃度は、Tietze の方法¹⁶⁾ によって測定した。

3.5. ウェスタンブロット法

0.5 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に、0.5 mol/l EDTA (株式会社同仁化学研究所)、1.0 mol/l ジチオスレイトール、200mmol/l フェニルメチルスルホニルフルオリド (いずれも、和光純薬工業株式会社)、アプロチニン溶液 (5-10 trypsin inhibitor unit/ml)、1 mg/ml ロイペプチン溶液、1 mg/ml ペプスタチン A 溶液 (いずれも、SIGMA-ALDRICH 社) を加えて融解用緩衝液 (Lysis buffer) とし、ホモジナイズした。ホモジネート液を 15,000 rpm、10 分間、4 °C で遠心し、上清を採取し、試料とした。タンパク質濃度は Protein Assay 試液 (BIO RAD 社) を使用した。ゲル濃度を 10% として SDS (Sodium dodecylsulfate) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、泳動後、直ちにニトロセルロース膜 (Bio Rad 社) に転写した。ブロッティング終了後、ニトロセルロース膜を 5% スキムミルクブロッキング溶液に 4 °C で一晩浸した。一次抗体として抗マウス eNOS 抗体 (BD Biosciences 社) (1:1000) および抗マウス iNOS 抗体 (BD Biosciences 社) (1:1000) あるいはニトロロシチン (Update 社) (1:250) を加えた後、HRP 標識二次抗体である抗マウス IgG 抗体 (Update 社) (1:1000) を反応させた。抗原の検出には ECL ウェスタンブロッティングシステム (Amersham Biosciences 社) により化学発光のシグナル (バンド) を画像解析し、定量した。

3.6. 病理組織学および免疫組織化学的検査

臓器を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で固定し、定法に従いパラフィンブロックを作製し、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。免疫組織化学的検査では、切片を脱パラフィン処理した後、3% 過酸化水素水を加えた。その後、10% ウマ血清を加え、37°C で 30 分間反応させ、一次抗体である抗マウス eNOS 抗体 (BD Biosciences 社) (1:500) と一晩 4 °C で反応させた。染色には LSAB 2 キット / HRP (ダコ社) を用い、ビオチン標識二次抗体を加え、30 分間反

応させ、次でペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加えて反応させた。発色には 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液を用いた。対比染色にはヘマトキシリン染色を用いた。

4. 統計処理

各群間の平均値の有意差検定は、分散分析を行ったのち、Tukey 法 (多重比較法) を用いて行なった。結果は平均値 ± 標準誤差で示した。検定には Excel 統計 Ver. 3.0 (株式会社エスミ) を使用した。

III. 結果

1. ナガイモの体重および臓器重量に及ぼす影響 (Fig. 1, Table 1)

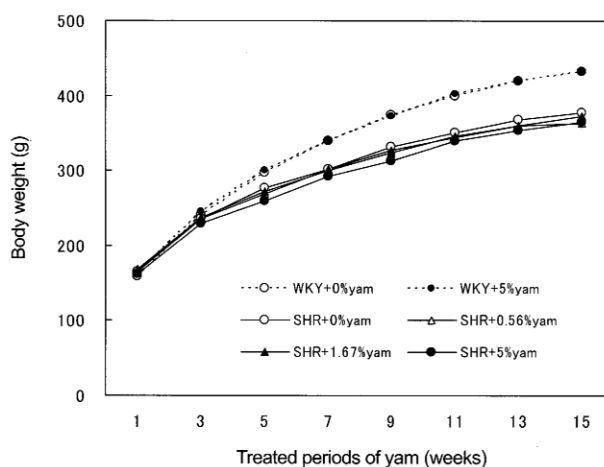


Fig. 1. Effect of yam treatments on body weights in SHR and WKY. Values are expressed as mean (n= 8).

体重は、いずれの群もナガイモ投与開始時から屠殺時まで順調に増加していたが、SHR 各群の体重は WKY 各群に比べ、実験開始後 5 週目から有意に低下した。一方、WKY 群および SHR 群ともに、ナガイモ投与の有無による体重変化はみられなかった。

心臓および肝臓重量は、WKY 各群に比べ SHR 各群で高値を示した。腎臓重量は WKY + 0% 群に比べ SHR

Table 1. Liver, kidney and heart weights and, body weights in SHR and WKY treated with dietary yam.

Group	BW* (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Heart (g)	Relative Liver (%)	Relative Kidney (%)	Relative Heart (%)
WKY 0%	419±5	11.5±0.24	3.24±0.09	1.18±0.03	2.74±0.04	0.77±0.02	0.28±0.01
WKY 5%	426±11	11.2±0.40	3.28±0.75	1.16±0.04	2.62±0.06	0.75±0.02	0.27±0.01
SHR 0%	367±9 ^a	12.8±0.36	3.10±0.10	1.53±0.03	3.50±0.06 ^a	0.85±0.03	0.42±0.01 ^a
SHR 0.56%	359±6 ^a	12.4±0.26	3.17±0.13	1.45±0.04	3.44±0.03 ^a	0.88±0.03	0.41±0.01 ^a
SHR 1.67%	361±5 ^a	12.2±0.33	3.43±0.16	1.45±0.02	3.37±0.06 ^a	0.95±0.04 ^a	0.40±0.01 ^a
SHR 5%	356±5 ^a	12.7±0.19	3.26±0.08	1.48±0.03	3.57±0.06 ^a	0.91±0.02 ^a	0.42±0.01 ^a

^ap<0.05 vs WKY + 0% yam. Each value represents mean ± SEM (n=8). *:at sacrifice.

+ 0 % 群では減少していた。また、腎臓の相対重量は WKY + 0 % 群に比べ、SHR + 1.67 % 群や SHR + 5 % 群では高値を示した。しかしながら、WKY 群および SHR 群ともに、ナガイモ投与の有無による肝臓、腎臓および心臓の重量への影響はみられなかった。

2. ナガイモの収縮期血圧および心拍数に及ぼす影響 (Fig. 2)

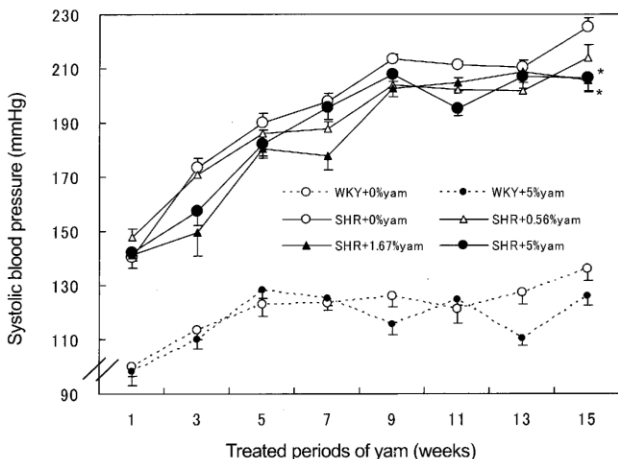


Fig. 2. Effect of yam treatments on development of blood pressure in SHR and WKY. Values are expressed as mean (n = 8). * p < 0.05 vs SHR + 0 % yam.

加齢にともない SHR 群の血圧は、ナガイモ投与後 3 週から上昇し、投与開始後 7 週目にはおよそ 200 mmHg となった。加齢に伴う SHR の血圧上昇は、WKY のそれに比べて顕著であり、実験開始時から WKY 群より有意に高値を示した。一方、SHR のナガイモ投与群の血圧は、SHR + 0 % 群に比べて SHR + 1.67 % 及び 5 % 群で 3 週目から上昇の抑制傾向がみられ、投与後 15 週目には約 20 mmHg の有意な血圧上昇の抑制効果が認められた。WKY 群の血圧は、投与後 5 週まで上昇したが、その後は大きな変動はみられなかった。また、WKY + 0 % 群と 5 % 群の間には有意差は認められなかった。なお、心拍数は WKY 群と SHR 群ともに、投与期間中に大きな変化はなかった。

3. ナガイモの血液生化学的検査値に及ぼす影響 (Table 2)

Table 2 に TG、T-Chol、HDL-Chol および BUN 値を示した。TG 値は SHR のナガイモ投与群でやや減少する傾向がみられた。T-Chol および HDL-Chol 値は、SHR 群間ではナガイモ投与の有無による影響は認められなかった。BUN 値もナガイモ投与の有無による有意な変化はみられなかった。

Table 2. Plasma triglyceride (TG), total cholesterol (T-Chol), HDL-cholesterol (HDL-Chol) and blood urea nitrogen (BUN) in SHR and WKY.

Group	TG (mg/dl)	T-Chol (mg/dl)	HDL-cho (mg/dl)	BUN (mg/dl)
WKY 0%	57.3±1.5	122.8±4.2	83.1±5.2	14.4±0.5
WKY 5%	41.6±3.0	110.2±3.7	98.4±5.7	15.9±0.8
SHR 0%	68.8±4.1	60.9±3.1 ^a	45.4±1.7 ^a	21.9±1.3 ^a
SHR 0.56%	56.4±3.5	65.4±1.3 ^a	36.4±1.4 ^a	24.4±0.7 ^a
SHR 1.67%	59.8±2.4	67.6±2.2 ^a	35.8±2.9 ^a	24.1±0.9 ^a
SHR 5%	60.3±3.2	62.4±1.1 ^a	54.8±5.0 ^a	26.1±1.6 ^a

^ap < 0.05 vs WKY + 0 % yam. Each value represents mean ± SEM (n=8).

4. ナガイモの血液レオロジーに及ぼす影響

屠殺時に、採血した新鮮血 100 μ l の流動性測定としての毛細血管様チップ内通過時間 (秒 / 100 μ l) は、SHR 群及び WKY 群のいずれの動物とも、平均値 44 ~ 47 秒の範囲にあり、ナガイモ投与の有無による有意な差はみられなかった。このことから、血漿中脂質成分の変化 (Table 2) と血液レオロジーには直接の関連は強くないと推察された。

5. ナガイモの腎臓中グルタチオン (GSH) および過酸化脂質 (LPO) 量に及ぼす影響 (Table 3)

一般に、酸化ストレスの指標の一つである GSH は、高

血圧では腎臓中で減少することが知られているので¹⁷⁾、GSH を測定した。SHR の GSH 値は、5 % 群を除き WKY より低い傾向がみられ、酸化ストレス状態にある傾向を示していた。しかし、ナガイモ投与の有無による GSH 濃度の有意な変化は認められなかった。一方、LPO 値は、SHR + 0 % 群に比べて、SHR の 0.56 及び 5 % 群で高値であった。このことは、ナガイモ投与により腎臓中の酸化ストレスが増大するとも考えられたが、ナガイモ投与依存はみられなかった。

Table 3. Effects of yam treatments on GSH and LPO in kidney in WKY and SHR.

Group		GSH (nmol/mg protein)	LPO (nmol/mg protein)
WKY	0%	1.56±0.27	3.67±0.15
	5%	1.67±0.22	3.71±0.14
SHR	0%	1.38±0.20	3.90±0.27
	0.56%	1.32±0.16	4.16±0.26 ^a
	1.67%	1.08±0.15	3.79±0.13
	5%	1.86±0.51	5.65±0.86 ^a

^ap<0.05 vs WKY + 0 % yam. Each value represents mean ± SEM (n=7-8).

6. ナガイモ投与による eNOS およびニトロチロシン (nTyr) の発現量に及ぼす影響 (Fig. 3)

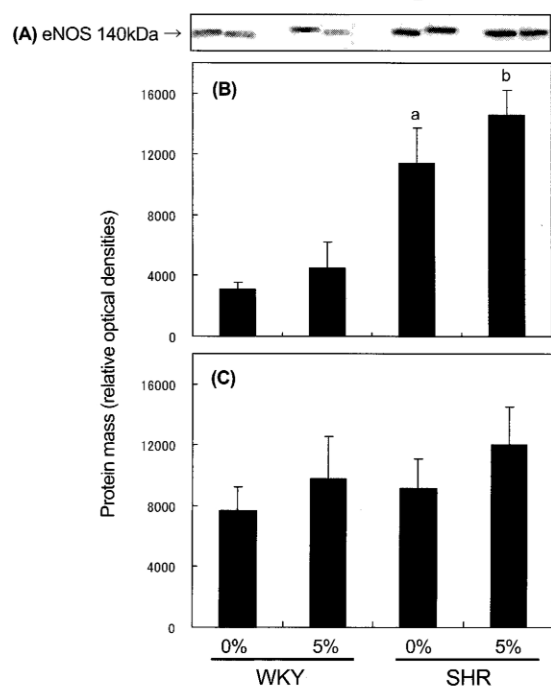


Fig. 3. Effect of yam treatments on the expression levels of eNOS (A, B) and nitrotyrosine (C) proteins in SHR and WKY. (A) : Representative Western blots of eNOS protein. Values are expressed as mean±SEM (n= 8). ^a p<0.05 vs WKY +0% yam, ^b p<0.05 vs WKY +5% yam.

高血圧では腎臓の eNOS の発現が亢進していることが知られており¹⁸⁾¹⁹⁾、eNOS により産生される NO には血管弛緩作用があるが、NO は O₂⁻ と反応し ONOO⁻ を生成し、SHR の体内では血管弛緩に有効な NO 量の減少が予想される。そこで、SHR+ 5 %群において血圧上昇の抑制がみられたので、腎臓中の eNOS および nTyr の発現量を測定した。eNOS タンパク質の発現量は WKY 各群に比べ、SHR 各群で高値であった。一方、SHR + 0 %群と 5 %群との間には有意な差は認められなかった。この結果は、ナガイモは腎臓の eNOS 発現には影響を及ぼしていないことを示している。

SHR 各群で eNOS 発現が増加したので、NO 量が増加していると予想された。このことは NO が O₂⁻ と反応し ONOO⁻ を生成し、最終生成産物である nTyr が増加することで判定できる。そこで、nTyr 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。腎臓中 nTyr の発現量は、WKY + 0 %群に比べ、SHR + 0 %群あるいは SHR + 5 %群でやや高かったが、いずれの群においても有意差は認められなかった。

7. 腎臓および大動脈の病理組織学的および免疫組織化学的検査 (Fig. 4)

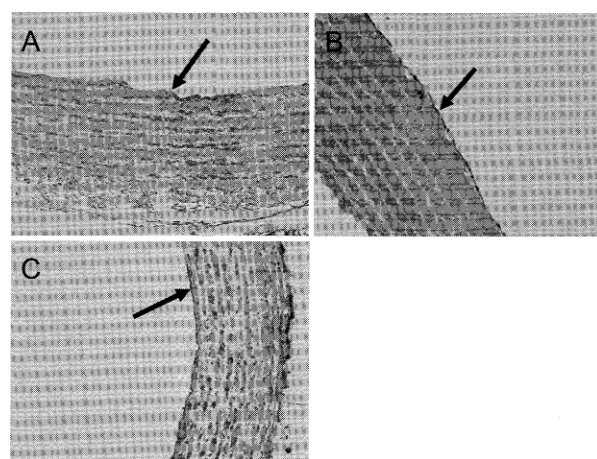


Fig. 4. Immunohistochemical staining for eNOS protein antigen in the aorta. A : WKY + 0 % yam, B : SHR + 0 % yam and C : SHR + 5 % yam. Staining of endothelial cells for the antigen is indicated as arrows, and counterstaining with hematoxylin is carried out. Original magnification is x10.

ナガイモ各投与群の大動脈および腎臓の組織像に著しい差は観察されなかった。WKY + 0 %群と SHR + 0 %群を比べて、糸球体やボーマン囊、尿細管の組織形態に顕著な変化はなく、WKY 群、SHR 群でもナガイモ投与の有無による影響はみられなかった。

Fig. 3 の結果と eNOS の分布の関連を明らかにするために、eNOS タンパク質の免疫組織化学的検査を行った。

腎臓では、WKY + 0 %群に比べてSHR + 0 %群の尿細管内皮や血管内皮にeNOSの陽性反応が強く観察された。また、SHR + 5 %群ではSHR + 0 %群と比較して、腎臓内血管内皮のeNOSの発現は同等あるいはやや減弱していた。一方、WKY + 0 %群に比べてWKY + 5 %群では腎臓内血管内皮にeNOSの反応は若干強く観察され、Fig. 3の結果は免疫組織化学的にもほぼ支持された。大動脈では、eNOSは血管内皮に陽性反応が観察された。SHR + 0 %群ではWKY + 0 %群に比べて、血管内皮に強い陽性反応が認められた。SHR + 5 %群ではSHR + 0 %群と比較して、血管内皮の反応は減弱していた。これらの結果は、ナガイモによって大動脈の血管内皮細胞のeNOSタンパク質の発現が低下していることを示していた。なお、WKY群ではナガイモ投与の有無による影響はみられなかった。

IV. 考察

生活習慣病の多くは、生体内に活性酸素が生成されることで、DNAが酸化的に損傷されたり、酵素が酸化変性を受けたり、脂質の過酸化反応によって細胞膜が障害を受けたり、脂質成分そのものが酸化変性することと関連している。特に、近年、高血圧と活性酸素との関連が研究され、活性酸素によって高血圧が引き起こされることも明らかとなっている¹⁻⁴⁾。一方、ナガイモは滋養強壮や疲労回復に良いとされているにもかかわらず、これまで有効性を示す知見は少なかった。しかし、近年、ナガイモには抗酸化作用を有する物質が含まれていることがわかってきた¹²⁻¹⁴⁾。

本研究では、ナガイモに新規生理調節機能としての血圧上昇抑制作用があるかどうかを検討した。その結果、自然発症高血圧ラット (SHR) にナガイモを投与した1.67%群および5%群の血圧は、非投与群に比べて3週目から上昇抑制傾向がみられ、ナガイモ投与後15週目にはおよそ20 mmHgの血圧上昇が抑制された (Fig. 2)。このことは、ナガイモは、血圧上昇を抑制する成分を含んでいることを示している。

一般に、血液中にTGやT-Choが多く貯留することにより高脂血症となり、動脈硬化や高血圧を誘発する²⁰⁾。一方、HDL-Choは肝臓で生成され、血管壁や臓器に過剰に蓄積したコレステロールを回収し、肝臓にて胆汁酸やその他のものへと処理される。従って、末梢のコレステロールが肝臓に運ばれ処理されるということは、血中コレステロール量が減少し、血管抵抗性が減少すると推察される。SHRは自然に高血圧を発症すると同時に、コレステロール代謝異常を示すことが知られている。そこで、ナガイモがコレステロール等の血漿中脂質成分と血液流動性に及ぼす影響について検討した (Table 2)。その結

果、血漿中脂質成分や血液流動性に及ぼすナガイモの影響は見出せず、SHRの血圧上昇を抑制する効果に脂質成分や血液流動性は直接的に関係している結果ではなかった。

近年、高血圧と活性酸素との関連が明らかになり、血管内皮の機能障害に活性酸素が関与しているという研究がなされている²¹⁾。高血圧状態ではNAD(P)Hオキシダーゼ等により活性酸素であるO₂⁻が増加している。一方、フリーラジカル的一种であるNOは、血管内ではeNOSによって産生され血管弛緩作用を持つが、このNOはO₂⁻と容易に反応してONOO⁻になる。それゆえ、内皮由来NOの生体内有効量は減少する。また、ONOO⁻は活性酸素種の中でも毒性が最も強く、組織や細胞に障害を及ぼす。また、NOはeNOS発現の制御に負のフィードバック作用を担っており²²⁾、ONOO⁻によるNO不活性の増加はNO生体内有効量の減少につながり、高血圧を誘発してNOSの代償的なアップレギュレーションに大きく影響していると考えられている¹⁸⁾¹⁹⁾。そこで、ナガイモが腎臓あるいは大動脈中のeNOSタンパク質の発現に及ぼす影響について検討した。SHR群のeNOSタンパク質の発現がWKY群よりも高かったことは、NO量の減少により上昇した血圧を正常に戻そうとするため、NO量を増やすeNOSが代償的に発現増加したためと考えられる。加えて、nTyr量はWKY + 0 %群に比べSHR + 0 %群で高い傾向であり、nTyrの増加も、ONOO⁻の増加あるいはNOの減少の可能性を示していた。一方、SHRのナガイモ非投与群と5%投与群の間には、eNOSの発現量あるいはnTyr量に差は認められなかった。これらの結果は、ナガイモ投与は腎臓のNO量あるいはeNOS発現には影響を及ぼしていないことを示している。

一般に、高血圧が持続すると、腎臓では細動脈の内膜や中膜の肥厚が起こる。内膜が肥厚すると、血管内腔の狭窄が生じ、血管の抵抗性が上昇するため腎硬化症、つまり、高血圧性腎症が発症する²²⁾。そこで本研究では、腎臓障害の程度や障害抑制効果の有無を観察し、また、免疫染色により腎臓や大動脈のeNOS発現の分布を観察し、ナガイモが腎臓や大動脈のeNOSに及ぼす影響を検討した。腎臓の病理組織学的検査では、WKYとSHRを比べて、顕著な変化はみられなかったことから、ナガイモによる組織障害はほとんどないことが推測された。ナガイモ非投与群の免疫組織化学的検査では、WKYに比べてSHRの腎臓の尿細管や血管内皮にeNOS陽性反応が強く観察された。一方、SHR + 5 %群ではSHR + 0 %群と比較して、血管内皮のeNOS発現は同等あるいはやや減弱し、ウエスタンブロッティングによる結果 (Fig. 3)をほぼ支持していた。この結果から、腎臓ではナガイモはeNOSの発現にほとんど影響していないことが推

測された。

血圧は、心臓に近い大動脈で最も高く、動脈が枝分かれするにしたがって低くなり、細動脈で急激に低下する。そこで、胸部大動脈の内皮細胞での eNOS 発現を免疫組織化学的に調べた。SHR + 0 % 群の大動脈では WKY + 0 % 群に比べて、血管内皮に強い陽性反応が認められた (Fig. 4)。これに対して、SHR + 5 % 群では SHR + 0 % 群と比較して、血管内皮の反応は減弱しており、ナガイモ投与が大動脈の血管内皮の eNOS タンパク質の発現を低下する可能性を示していた。このことから、ナガイモ投与による血圧の上昇抑制は、少なくとも、血管内皮の eNOS 発現と関連している可能性が示唆された。

以上のことから、ナガイモには用量依存性は認められなかったが、SHR の血圧上昇を有意に抑制し、血管中の eNOS 発現を低減させる作用が認められた。このナガイモによる血圧上昇の抑制機序の 1 つとして、ナガイモ中の抗酸化成分が体内の O_2^- を消去したため、 O_2^- と反応して O_2^- 消去に働いていた NO を産生する血管内皮の eNOS 発現を低減させたものと考えられる。

今後、血管内皮の血圧調節に果たす役割は、非常に大きいので⁵⁾、大動脈の eNOS 発現量を定量し、血管内皮に及ぼすナガイモの作用をさらに詳しく検討する必要がある。最後に、本研究の結果は、ヒトでも医薬品に頼らず、食品によって血圧上昇を抑制できる可能性があることを示唆している。こうした知見の積み重ねにより、高血圧などの生活習慣病の一次予防や二次予防に有用な機能性食品等が開発され、食事療法等に利用されるのが望ましいと考えられる。

(受理日：平成17年10月18日)

謝 辞

本研究は、青森県立保健大学・健康科学研究センターの平成16~17年度特別研究費の助成を受けた研究結果の一部であり、関係者のご協力とご指導に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Negishi H, Ikeda K, Noguchi T, et al. : The relation of oxidative DNA damage to hypertension and other cardiovascular risk factors in Tanzania. *J Hypertens*, 19, 529-533, 2001.
- 2) Lacy F, O'Connor D, Schmid-Schonbein G. : Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*, 16, 291-303, 1998.
- 3) Russo C, Olivieri O, Girelli D, et al. : Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*, 16, 1267-1271, 1998.
- 4) McIntyre M, Hamilton C, Rees D, et al. : Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension*, 30, 1517-1524, 1997.
- 5) 東幸仁, 吉栖正生 : 酸化ストレス・活性酸素, *日本臨床*, 62 (1), 49-55, 2004.
- 6) 井上正康, 佐藤英介, 谷口直之, 浅田浩二 [編] : NO とスーパーオキシド - 臓器特性と分子病態 -, *メディカルトリビューン*, pp. 23, 1995.
- 7) Beckman JS, Koppenol WH : Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*, 271, 1424-1437, 1996.
- 8) Halliwell B : What nitrates tyrosine ? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo ? *FEBS Lett*. 411, 157-160, 1997.
- 9) Eiserich JP, Vliet A, Handelman GJ, et al. : Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clinical Nutrition*, 62, 1490-1500, 1995.
- 10) Xin C, Touyz RM, Park JB, et al. : Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*, 38, 606-611, 2001.
- 11) 井澤弘美, 嵯峨井勝 : ナガイモの記憶学習能力低下抑制および血中成分改善に関する研究. *日本農芸化学年次大会2002年度大会講演要旨集*, pp. 110, 2002.
- 12) Hou WC, Lee MH, Liang HJ, et al. : Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J Agric Food Chem*, 49, 4956-4960, 2001.
- 13) Hou WC, Hsu FL, Lee MH : Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. *Planta Med*, 68, 1072-1076, 2002.
- 14) Lee SC, Tsai CC, Chen JC, et al. : Effects of "Chinese yam" on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 23, 503-508, 2002.
- 15) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358, 1979.

- 16) Tieze F: Disulfide reduction in rat liver: Evidence for the presence of nonspecific nucleotide dependent disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch Biochem Biophys*, 138, 177-188, 1987.
- 17) Welch WJ, Tojo A, Wilcox CS: Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feedback in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278, 769-776, 2000.
- 18) Vaziri N, Wang X: cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension*, 34, 1237-1241, 1999.
- 19) Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL: Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*, 36, 957-64, 2000.
- 20) 島本和明 [編]: インスリン抵抗性と生活習慣病, 診断と治療社, pp. 119, 2003.
- 21) McIntyre M, Bohr D, Dominiczak A: Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension*, 34, 539-545, 1999.
- 22) 林 晃一: 腎保護を視点とした高血圧性臓器障害の予防・治療, *日本臨床*, 6 (1), 135-141, 2004.