

[論説]

青森県立保健大学・栄養学科における予防栄養学的研究 — 疾患モデル動物を用いたアプローチ —

佐藤 伸¹⁾ 向井 友花¹⁾

キーワード：①疾患モデル動物、②栄養、③生活習慣病、④高血圧、⑤糖尿病

I. はじめに

今日、栄養学、医学、薬学などをはじめとするさまざまな分野で、生命現象の解明、新規医薬品の開発あるいは食品添加物、化粧品等の新規物質の安全性の確認のための研究が精力的に行われている。その実験的方法にはさまざまなものがあるが、特に、動物実験は実証的な研究において欠かせないものとなっている。動物実験では、ラットやマウスなどの小動物が広く用いられているが、その理由は単に入手しやすく、取り扱いが簡単だからというのではなく、遺伝的に均一でかつその機能や生体構造がヒトの栄養代謝や構造に類似しているからである。もちろん、すべてがヒトの代謝に類似しているのではない。

一方、近年、生活習慣病をはじめとしたヒトの病態に類似した疾患をもつラットやマウス（疾患モデル動物）が多く見出され、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、肥満などの発症メカニズムの分子レベルでの解明に役立っている。一般に、疾患モデル動物は、大きく二つに分けられる¹⁾。一つは、自然発症モデルである。これは、動物の突然変異により動物が獲得した形質に依存したモデルである。このようなモデルの系統や特徴などの情報は、生物資源として集録されている疾患モデルラットのデータベース²⁾から得ることができる。もう一つは、実験的発症モデルである。これはある種の薬物投与、放射線照射、遺伝子改変等のような実験的な処理を施すことにより、特定の病態を作製するモデルである。このような疾患モデル動物の利用は、ヒトの疾患の原因遺伝子と異なる場合があるものの、ヒトの病態の背景にある発症メカニズムを解明するにはたいへん有効な手段である。

本学の栄養学科においても、疾患モデル動物を用いた研究は、ヒトの健康の維持・増進や疾病予防を念頭におき進められており、栄養素あるいは食品成分の代謝の分子メカニズムや病態における機能性の解明等の研究で重要な役割を果たしている。また、動物実験は、本学栄養

学科の学生に対して生化学、基礎栄養学等の学生実験において生命科学の教育を行うために必要不可欠でもある。

本稿では、筆者らがこれまで用いてきた疾患モデル動物について概説するとともに、食品成分の機能性を分子レベルで評価した一連の研究ならびに本学における動物実験の倫理的配慮を紹介する。

II. 高血圧とモデル動物

高血圧の長期的な放置は動脈硬化をまねき、心疾患、脳卒中、腎疾患等を引き起こす。血圧上昇には、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系をはじめ様々な要因が関与するが、近年、血管弛緩を促す一酸化窒素（NO）や活性酸素種、特にスーパーオキシド（O₂⁻）などのフリーラジカルを介した血管内皮機能異常が、重要な要因であることが明らかになりつつある。また、高血圧状態で増加するO₂⁻は、レドックスに関連する核内転写因子（NF-κBなど）を活性化させ、これに伴うケモカインの増加、マクロファージの活性化・遊走や接着分子の発現の亢進などが起こり、次いで血管平滑筋層の増殖や肥厚、炎症あるいはリモデリングなどを生じ、動脈硬化へと進展するといわれている。

高血圧を呈するモデル動物にはさまざまなものがあるが、研究によく用いられているのが、高血圧自然発症ラット（Spontaneously hypertensive rat; SHR）や食塩感受性高血圧モデルラット（Dahl salt-sensitive rat）である¹²⁾。また、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（Stroke-prone SHR; SHRSP）は、SHRから分離された系統で、食塩を負荷すると高血圧を重度に発症し、脳血管障害をおこし、全例が脳卒中を自然に発症することで汎用されている。SHRは、正常血圧を示すWistar Kyoto rat（WKY）から分離された系統で、加齢にともない12週齢以降、収縮期血圧が200 mmHg前後まで上昇する。このラットは、ヒトの本態性高血圧のモデル動物として医学、薬学、

1) 青森県立保健大学健康科学部栄養学科

Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, Aomori University of Health and Welfare

栄養学等のさまざまな分野でよく用いられている。

このようなモデル動物を用いて、実験的に、ブドウやタマネギに含まれているポリフェノールが抗酸化作用を示したり、血圧上昇を抑制したりするという報告が数多くなされている³⁴⁾。しかしながら、血管内皮の機能障害や動脈硬化へ至る一連のカスケードにおける予防改善のメカニズムは、十分に解明されていない。

筆者らも、ポリフェノールを多く含む小豆による高血圧の予防・改善効果および機序について検討してきた。小豆は、和菓子の原料や料理の素材として日本人にはなじみが深い食物のひとつであり、古来より薬用としても用いられてきた。しかし、小豆は「健康によい」とされながら、血圧上昇の予防や軽減に関連した科学的エビデンスはほとんどなかった。筆者らは、なぜ、小豆が「健康によい」のかについて上述した高血圧モデルラットを用いて調べた。SHR および WKY に長期間、小豆を経口投与し、血圧の上昇にともなう酸化ストレスや炎症に及ぼす影響を検討したので報告する。小豆種皮含有飼料を経口投与した結果、小豆種皮を投与した SHR の収縮

期血圧は非投与群に比べて低値を示し、血圧上昇の抑制効果が認められた (図 1)⁵⁾。また、 O_2^- の主な産生酵素である NAD(P)H オキシダーゼ由来の O_2^- 量を測定したところ、小豆種皮を投与した SHR の大動脈の O_2^- 産生量は非投与群に比べて低値を示した。小豆種皮は、 O_2^- 産生を低減することが示唆された。また、小豆の 80% エタノール抽出物 (小豆抽出物) を SHR に投与した結果、血管を弛緩させる作用をもつ NO の産生を強めることもわかった⁶⁾。一方、高血圧状態では慢性炎症がみられるので、炎症細胞の一つであるマクロファージの臓器への浸潤に及ぼす影響を調べた。その結果、心臓や腎臓のマクロファージ数は SHR の非投与群で増加したが、小豆抽出物投与群では減少した⁷⁾。また、各臓器ともにマクロファージ数と血圧との間には正の相関がみられた (図 2)。さらに、マクロファージの活性化や遊走に関与するケモカインの Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の mRNA の発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) と組み合わせたリアルタイム PCR 法により定量した結果、非投与群の MCP-1 mRNA 発現は WKY 群に比べて上昇したが、投与群では有意に抑制されることが判明した⁵⁾。

以上のことから、高血圧モデルラットである SHR を用いる研究は、小豆抽出物をはじめとする食品成分の高血圧における予防・改善効果を探索するのに非常に有効であり、加えて、食品成分がどのようなメカニズムで高血圧の予防に寄与するのかという栄養学的なエビデンスを蓄積するのに重要であることがわかる。

Ⅲ. 糖尿病とモデル動物

平成 18 年の国民健康・栄養調査によると、糖尿病が強く疑われる人は約 820 万人、糖尿病の可能性が否定できない人は、約 1050 万人いるという。糖尿病は大きくわけて 1 型糖尿病と 2 型糖尿病にわけられ、前者は自己免疫異常を基礎としたすい臓のランゲルハンス島の β 細

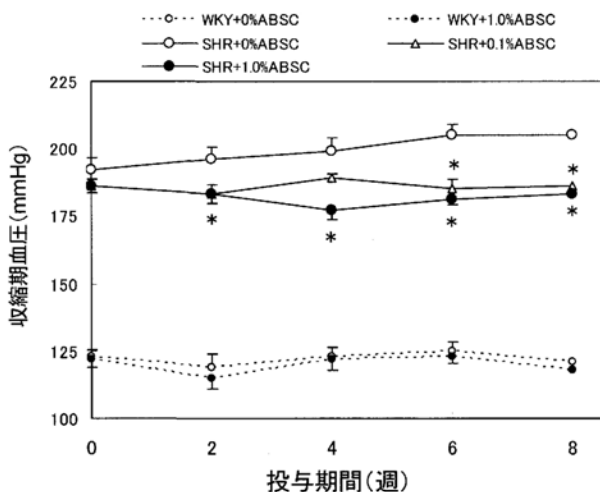


図 1 小豆種皮 (ABSC) 投与が収縮期血圧に及ぼす影響⁵⁾ 値は、平均値±標準誤差 (n=8)。* $p < 0.05$ vs SHR+0%ABSC 群。

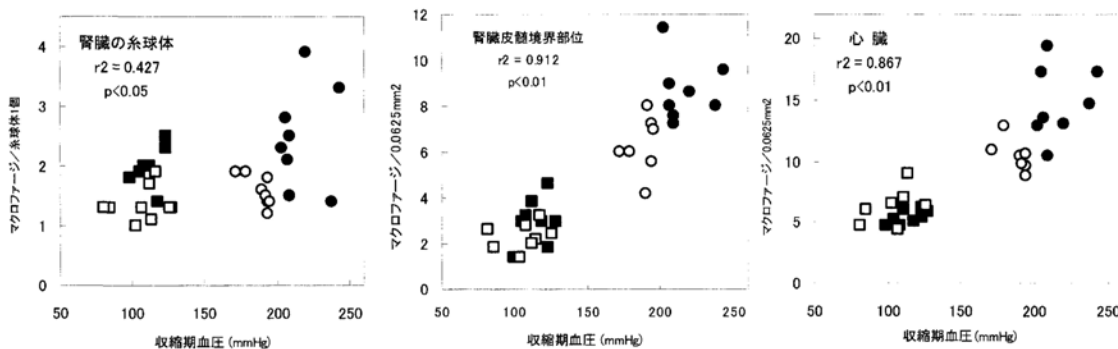


図 2 収縮期血圧とマクロファージ数の相関⁷⁾

□ ; WKY rats+0%小豆抽出物、■ ; WKY rats+0.8%小豆抽出物、○ ; SHR+0%小豆抽出物、● ; SHR+0.8%小豆抽出物

胞の破壊により、インスリン欠乏によって起こる。また、後者はβ細胞からインスリンの分泌能はあるものの、インスリン分泌の低下やインスリン抵抗性となり発症し、糖尿病患者全体の約95%を占めるといわれる。ヒトの糖尿病の治療効果や遺伝的な要因等に関する研究は、疫学研究により精力的に行われてきたが、調査に多大な時間を要し、さらに経済的負担も軽視できない。そこで、糖尿病の背景にある代謝の分子メカニズムを解き明かしたり、予防改善に役立つ食品成分を見出したりするためには、モデル動物の利用はたいへん有効である¹⁾。

糖尿病モデル動物には、自然発症モデルとしてBioBreeding (BB) ラット、db/db マウス、ob/ob マウス、KK マウス、NOD マウス、GK ラット等があり、また実験的発症モデルとしてはアロキサンやストレプトゾトシン (STZ) などの薬物で誘発させたモデルがある。たとえば、ラットにSTZを投与すると、特異的にすい臓のβ細胞を破壊し、高血糖となり糖尿病を発症する。一般に、高血糖状態では還元糖(グルコース)とタンパク質のアミノ基とが反応して生成される終末糖化産物などにより、O₂⁻の過剰産生が起こり、酸化ストレスが亢進すること知られている。また、糖尿病の合併症の一つである腎症の進行には糸球体硬化やマクロファージの浸潤が関連するという。

この項では、筆者らがSTZ誘発糖尿病モデルラットを用いて行ったリグノフェノール(LP)の腎障害の予防・改善効果に関する研究を紹介する⁸⁾。LPは、木材や植物の茎に多く含まれる成分であるリグニンから相分離変換システムにより調製される新素材であり、フェノール性水酸基が付加した広義のポリフェノールといえる。これまで、木材用の接着剤や感光性材料、高吸水性樹脂など多方面での応用が進んでいる。しかし、これまでLPの生体機能における知見、特に、糖尿病における生理調節機能や予防・改善効果に関する知見はほとんどなかった。筆者らは、LPの糖尿病における生理調節機能を明らかにするために、Wistar系ラットにSTZ溶液(65 mg/kg 体重)を単回投与し、糖尿病モデルを作製してLPの腎障害に及ぼす影響を検討した。糖尿病ラットに通常食(標準動物飼育飼料)、または異なる濃度のLPを飼料に添加して投与した。対照(健常)群には通常食を与えた。その結果、通常食を与えた糖尿病ラット(0% LP群)の血糖値は、対照群に比べて有意に上昇したが、LP各投与群との間には差はほとんどみられなかった。酸化ストレスの指標として、DNA中のグアニン塩基が活性酸素の作用により酸化損傷を受けることで生じる8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の24時間尿中濃度や腎臓中のNAD(P)Hオキシダーゼ由来のO₂⁻産生量を測定した。その結果、LP投与群では、0% LP群

に比べて有意に8-OHdG濃度の減少やO₂⁻産生量の減少が認められた。これらの結果から、LPは糖尿病の腎障害において生じる酸化ストレスを軽減することがわかった。また、組織学的に糖尿病ラットの糸球体のメサンジウム領域は、線維化にともないシリウスレッド染色により濃赤色を呈し、線維化面積率は増加したが、LP投与群では減少した。また、LP投与群のマクロファージ数は0% LP群に比べて有意に減少していた(図3)。以上の結果から、LPは糖尿病ラットの腎臓中マクロファージの浸潤や糸球体の線維化を抑制する可能性が示された。

このように、STZ誘発糖尿病モデル動物は、新規物質の糖尿病性腎症の予防・軽減効果を見出すのに非常に有効な手段であるといえる。

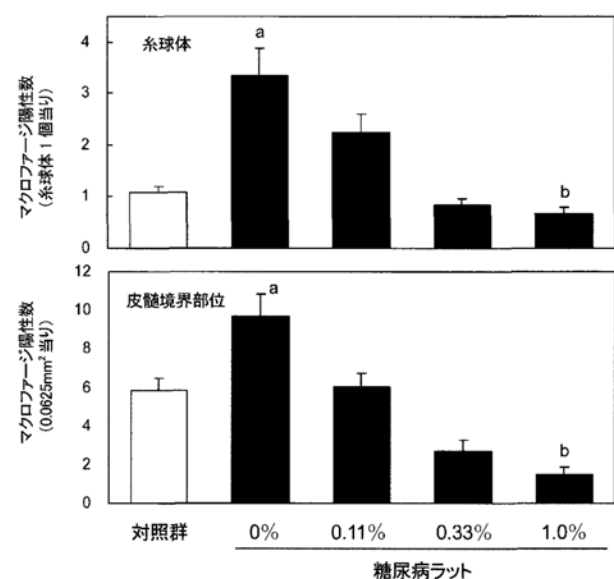


図3 リグノフェノール投与が腎臓のマクロファージ浸潤に及ぼす影響⁸⁾
 値は、平均値±標準誤差 (n=7-8)。^ap<0.05 vs 対照群、^bp<0.05 vs 0%糖尿病ラット群。

IV. 青森県立保健大学の動物実験における倫理的配慮

上述のように、疾患モデル動物は、ヒトの疾患の背景にある分子レベルでのメカニズムをはじめ生命活動の科学的理解や問題を解決する上で、きわめて重要な手段であるといえる。しかし、利用に当たっては、実験動物が命あるものであることを念頭におき、また動物愛護の観点および倫理的配慮から、適正に行われなければならない⁹⁻¹¹⁾。そのためには、動物実験実施者は動物に対する感謝と責任をもち、適正な飼育、保管、利用に際して実験動物の生理、生態、習性等を熟知することが必要である。

動物実験を始めるにあたり、Replacement (代替)、Reduction (削減)、Refinement (実験精度向上)の3Rは、基本理念である。本学においても、当該する動物実験における使用動物数の削減、代替法の活用、苦痛の程度、

苦痛の軽減・排除方法及び保定拘束の時間や倫理的配慮等の項目が記載されている動物実験計画審査願を動物実験委員会委員長に提出しなければならない。その後、動物実験委員会で審査を受け、承認後にはじめて「青森県立保健大学動物実験に関する指針」に従って動物実験を始めることができる。終了後には動物実験終了報告書を提出することになっている。本学では、このような管理のもと、温度、湿度、明暗時間等を制御した環境下で動物実験が適正に行われ、さらに、毎年9月には実験動物慰霊祭が行われている。

V. まとめ

本稿では、青森県立保健大学・栄養学科における疾患モデル動物を用いた予防栄養学的アプローチについて、高血圧および糖尿病のモデル動物を概説するとともに、筆者らが行ってきた研究を示してきた。疾患モデル動物を用いた試験では、リグノフェノールは高血糖状態における酸化ストレスや腎臓の炎症を抑制したり、血圧上昇を抑制したりすることがわかった。

今後も、本学科の予防栄養学的研究において生活習慣病をはじめとする疾患モデル動物は、栄養素の代謝の分子メカニズムや食品成分の疾病における新しい生理調節機能を見出したり、「健康によい」とされる食品の有効性に関する栄養学的エビデンスを構築するためには、欠かせない手段になると思われる。

VI. 参考文献

- 1) 木村修一、家森幸男 (1994) : 疾患モデル動物 — 栄養学研究への応用 — (日本栄養・食糧学会 監修) 建帛社、東京。
- 2) ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP - Rat) .
http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/Default_jp.aspx
- 3) Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. (2006) . Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res.* 40, 1054-65.
- 4) Dohadwala MM, Vita JA. (2009) . Grapes and cardiovascular disease. *J Nutr.* 139, 1788S-93S.
- 5) Mukai Y, Sato S. (2010) . Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* in press.
- 6) Mukai Y, Sato S (2009) . Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates

- blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 19, 491-7.
- 7) Sato S, Mukai Y, Yamate J, et al. (2008) . Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35, 43-9.
 - 8) Sato S, Mukai Y, Yamate J, et al. (2009) . Lignin-derived lignophenols attenuate oxidative and inflammatory damage to the kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res.* 43, 1205-13.
 - 9) 中釜 齊、北田一博、城石敏彦 (2007) : マウス・ラットなるほど Q&A、羊土社、東京。
 - 10) 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日 文部科学省告示第71号) http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm
 - 11) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日 環境省告示第88号) http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/nt_h180428_88.html