

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22580146

研究課題名（和文） In vivo 生体顕微鏡を用いた植物ポリフェノールの微小循環に対する作用の検証

研究課題名（英文） Evaluation of the effects of polyphenols in plant foods on the microcirculation in rats by In vivo intravital microscope.

研究代表者

越阪部 奈緒美 (OSAKABE NAOMI)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30554852

研究成果の概要（和文）：

本研究では、植物ポリフェノールの微小循環に対する作用を検証するためのツールとして in vivo 生体顕微鏡観察システムを構築し、それを利用した評価を実施した。対象としてラットの腸間膜細動脈および挙筋細動脈を選択し、麻酔下でプラスチックチャンバーにそれぞれの臓器を展開後、95% N₂-5% CO₂ でエアレーションした Krebs-Ringer でチャンバーを満たし、pH 7.3-4、37°C 条件下で CCD カメラを搭載した実態顕微鏡で直接的に血管の観察を試みた。その結果アセチルコリン (Ach) や phenylephrin の添加による血管の収縮・弛緩を可視化することができた。この実験系を用いて、高脂肪食負荷ラットにプロシアニジン を反復摂取させ、腸管膜細動脈の Ach に対する応答能を観察したところ、高脂肪食摂取によって Ach 応答性は顕著に元弱し血管内皮機能の低下が示唆されたが、プロシアニジン摂取群ではそのような変化は認められなかった。一方、麻酔下でプロシアニジン を単回投与した場合、挙筋細動脈血流の著明な上昇が確認されるとともに、大動脈における eNOS 発現量および血中 NO 代謝物濃度の有意な増加が認められた。これらの結果から、今回開発した in vivo 生体顕微鏡観察システムは食品成分の微小循環系を評価する有用なツールであることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed the observation system for microcirculation in several tissues of experimental animals in order to evaluate the effect of polyphenols in plant foods. To observe the microcirculation, a midline abdominal incision was made and the mesentery or cremaster muscle exteriorized and spread carefully over a plastic chamber. The chamber was connected to a reservoir that allowed continuous superfusion of the mesentery with Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.3-7.4) at 37°C. The Krebs-Ringer solution was aerated with 95% N₂-5% CO₂ using a peristaltic pump. In first study, the animals were allocated to 3 groups, and fed either a control diet, a high fat diet containing 15% lard, or the HFD with 2% cocoa (HFD-C) for 6 weeks. At the end of the experimental period, the mesentery was spread in a chamber, and the vessels were treated topically with phenylephrine, acetylcholine, or papaverine. The vascular responses to phenylephrine, acetylcholine-dependent vasodilatation and endothelium-independent vasodilatation were calculated by the diameter of the mesentery artery with each treatment. Topical treatment of mesenteric arterioles with acetylcholine caused a significantly greater response in the control compared with the HFD group. In the HFD-C group, acetylcholine-dependent vasodilatation was decreased marginally. Similarly, rats in the HFD group showed a

significant reduction in vascular sensitivity to phenylephrine compared with the control group. However, there was no significant difference between the control and HFD-C groups. The induction of endothelial-independent artery dilation was reduced slightly in the HFD group. Our results suggest that one of the hypotensive mechanisms of cocoa is due to amelioration of endothelial dysfunction in arterioles induced by an inappropriate diet.

In the second animal study, we evaluated the effects of a single oral administration of flavan-3ols in rats on cremaster muscle microcirculation using intravital video microscopy. First, the cremaster was exteriorized under anesthesia and spread in a chamber. Animals were orally administered 100 mg/kg body weight of cocoa, 10 mg/kg of the flavan-3ol fraction and (-)-epicatechin, or a mixture of xanthine derivatives equivalent to 100 mg cocoa. Red blood cell velocity in arterioles increased soon after administration of cocoa or flavan-3ols, and a significant elevation was observed from 5 min after treatment to 20 min after treatment compared with vehicle. This change was not observed after treatment with (-)-epicatechin or xanthine derivatives. The number of newly recruited capillaries in cremaster muscle was significantly increased from 15 min after cocoa or flavan-3ol treatment. Similarly, blood flow in the cremasteric artery as measured by a laser Doppler flow meter was significantly increased by cocoa or flavan-3ol treatment, but not by (-)-epicatechin or xanthine derivatives. Blood pressure and heart rate were also increased after administration of cocoa or flavan-3ols. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the aorta and NO metabolites levels in blood were also significantly elevated 30 min after treatment with flavan-3ols. These results suggest that a single oral administration of flavan-3ols increased blood flow, blood pressure, and heart rate, resulting in increased shear stress on vascular endothelial cells, resulting in eNOS expression. These acute effects of flavan-3ols suggest that ingestion of chocolate may improve vascular endothelial function. These results suggested that the in vivo intravital video-microscopy analysis is the one of the most useful tool to detect of the effect of polyphenol on microcirculation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：食品機能

キーワード：微小循環 in vivo ポリフェノール 生体顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

野菜や果物の色や苦みの成分であるポリ

フェノール類が様々な生理的作用を有し、その摂取が生活習慣病による死亡リスクを低

減させることが、1990年以降諸外国における疫学調査により明らかになってきた。中でも心血管系疾患に対して有効性が高いとされ、ポリフェノールを豊富に含む食品を高頻度に摂取することが、その死亡リスクを低減することが報告されている。この結果を受け、健常者と軽度高血圧症患者を対象とした栄養介入試験が実施され、赤ワイン・紅茶・チョコレート・大豆などの摂取が血圧の低下に繋がる事実が新たに確認された。特にチョコレートやココアに関して同様の条件下で実施された5試験について行われたメタアナリシスでは、血圧の有意な改善、すなわち良好な治療効果が認められている。また、ポリフェノールの循環系への直接的な作用については、摘出動脈血管を用いた *in vitro* 試験により、高濃度のポリフェノールが血管内皮細胞依存性の弛緩反応を促すことが報告されている。しかし、摘出血管による実験結果を、そのまま生理的条件下の反応として扱うことには問題が多く、*in vivo* 下での再検証が必要である。一方、申請者らによるポリフェノールの生体内動態に関する研究により、チョコレートをヒトが摂取した場合、その主要なポリフェノールであるエピカテキンの約30%は吸収されるが、その多くがグルクロン酸や硫酸抱合体といった代謝物として血中に存在し、エピカテキン自体の血中濃度は極めて低いことが示された。その後、他のポリフェノールについても同様の結果が国内外の研究グループによって報告され、前述の摘出血管による *in vitro* での実験結果におけるポリフェノール濃度が非生理的であったことが明らかになった。以上のことから、食品として摂取されたポリフェノールの循環系への効果を評価するためには、*in vivo* 生理的条件下でのデータの蓄積が不可欠である。*In vivo* 循環動態の評価に関し、申請者らは従来から生体顕微鏡の開発を行い、毛細血管レベルでの血流観察を行っている。その結果、抵抗血管として全身の血圧調節に関与する細動脈での内皮細胞由来の血管拡張は、細動脈血管径の違いにより、一酸化窒素(NO)依存性拡張因子と非NO依存拡張因子(EDHF)の関与の割合が異なることが明らかになった。また、ポリフェノールの評価時に重要因子になると考えられる高脂血症においては、これらの内皮細胞由来の血管拡張反応が減弱するという報告もある。これらの現状を鑑み、これまで申請者らが行ってきたポリフェノールの食品栄養学的研究法に、生体顕微鏡による微小循環研究法を組み合わせ、ポリフェノールの微小血管への作用を直接的に評価することの重要性を認識するに至った。

2. 研究の目的

植物性食品に含まれるポリフェノール類

の摂取が心血管系疾患の予防に有効であることが、種々の疫学調査により報告されている。しかしその作用機序、特に血流・血圧調節に関与する微小循環系への効果については不明である。本研究は、ポリフェノール摂取時の微小循環動態を、小動脈、細動脈、毛細血管の部位特異性反応として詳細に解析し、ポリフェノールの微小循環系への作用を明らかにすることを第一の目的とする。そのため、研究前半では、生理的条件下で血流・血管径変化を長期間観察可能な *in vivo* 生体顕微鏡システムの開発を行う。さらに開発システムを用い、各種疾患モデルを含む実験動物を対象とし、ポリフェノール摂取時の微小循環系への改善効果を *in vivo* で評価する。これらの結果と分子生物学的手法による *in vitro* 分析結果とを比較検討し、ポリフェノールの心血管系疾患予防作用機序を解明するとともに、本法を他の抗酸化物質にも適用可能な定量的評価法として確立することを最終目的とする。

3. 研究の方法

初年度では、現有する骨格筋微小循環観察用生体顕微鏡システムを、本研究目的に適した他組織への適用、さらにはポリフェノール摂取期間中長期間連続的に観察可能なものに整備することを目的とした。観察部位については、メタボリックシンドロームに大きく関与することが予測される腸間膜脂肪周囲に存在する腸間膜細動脈および全身のエネルギー代謝に対して大きく寄与すると考えられる骨格筋—その中でも比較的観察が容易な挙蹠筋微小循環を採用することとした。2年目には、初年度に確立した *In vivo* 生体顕微鏡システムを用い、高脂肪食によって腸間膜細動脈に誘導される血管内皮傷害に対するポリフェノール摂取の影響について検討することとした。腸間膜細動脈血流および各種薬物の *ex vivo* 投与による血管径変化を測定し、ポリフェノールによる血管内皮機能の改善作用を可視化することとした。研究最終年度では、ポリフェノールの急性的な微小循環および大循環に及ぼす影響について、挙蹠筋を用いて評価することとした。挙蹠筋をプレパレーションした後、挙蹠筋細動脈赤血球速度および開存毛細血管数を動画から測定することとした。また同時にレーザードップラー法を用いて挙蹠筋動脈血流を測定し、生体顕微鏡システムで測定した赤血球速度と比較することとした。実験に用いた動物は解剖に供し、大動脈における一酸化窒素合成酵素のタンパク質発現を Western blot 法で血中一酸化窒素代謝物濃度を Griess 法で測定することで、ポリフェノールの末梢血管に対する作用を総合的に解析し、心疾患予防に有用な基礎データを提供することとした。

4. 研究成果

本研究では、植物ポリフェノールの微小循環に対する作用を検証するためのツールとして in vivo 生体顕微鏡観察システムを構築し、それを利用した評価を実施した。対象としてラットの腸間膜細動脈および挙筋細動脈を選択し、麻酔下でプラスチックチャンバーにそれぞれの臓器を展開後、95% N₂-5% CO₂ でエアレーションした Krebs-Ringer でチャンバーを満たし、pH 7.3-4、37°C条件下で CCD カメラを搭載した実態顕微鏡で直接的に血管の観察を試みた。その結果アセチルコリン(Ach)やphenylephrinの添加による血管の収縮・弛緩を可視化することができた。この実験系を用いて、以下の評価を行った。実験1) Wistar 系雄性ラットに脂肪含有量 15% の高脂肪食またはココアを 2%含有させた高脂肪食を 6 週間摂取させた。飼育期間終了後に血圧および心拍数を tail cuff 法を用いて測定した。またウレタン麻酔下で、上記の方法に従ってラットの腸間膜をチャンバーに展開し、腸間膜細動脈の観察を試みた。腸間膜細動脈の Ach による血管拡張反応は、高脂肪食摂取によって有意に著しい低下を示した。しかしながら、この低下は 2%ココア含有高脂肪食群では認められなかった。次に phenylephrine によって誘導される最大血管拡張反応について検討したところ、高脂肪食では有意な低下が認められたが、ココア含有飼料群ではこの低下は認められなかった。更に血管内皮非依存性の血管拡張反応に対する影響を確認したところ、高脂肪食およびココア含有食において変化は認められなかった。このことからココアは高脂肪食摂取によって誘導される血管内皮機能の低下を抑制することが示唆された。実験2) ウレタン麻酔下で Wistar 系雄性ラットの挙筋を上記の方法に従いパレーションし、胃内にカニューレを留置した。その後顕微鏡下で挙筋細動脈および毛細血管の観察を試みた。定常時の挙筋微小循環動態を 10 分間観察した後、ココア (100mg/kg)、ココアから得たプロシアニジン画分 (10mg/kg)、(-)-epicatechin (10mg/kg) およびcaffeine および theobromin を含むキサンチン誘導体混液を胃内に強制投与し、更に 20 分観察を続けたところ、ココアおよびプロシアニジン摂取群では、挙筋細動脈赤血球速度の著明な上昇および開存毛細血管数の有意な増加が確認された。しかしながら、このような現象は (-)-epicatechin 群およびキサンチン誘導体群では認められなかった。また同様にラットを処置し、挙筋動脈血流をレーザードップラー血流計で測定するとともに、血圧および心拍数を tail cuff 法で測定し、その後採血および解剖に供した。ココアおよびプロシアニジン摂取群では、挙筋動脈血流の有意な

上昇が認められるとともに、血圧および心拍数の経時的な増加が認められた。また摘出した大動脈においては、プロシアニジンの投与により一酸化窒素合成酵素のタンパク質発現が有意に増加し、血中の一酸化窒素代謝物濃度の有意な増加が認められた。

これらの結果から、今回開発した in vivo 生体顕微鏡観察システムは食品成分の微小循環系を評価する有用なツールであることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Flavan 3-ols improve metabolic syndrome risk factors: evidence and mechanisms. Osakabe N. J Clin Biochem Nutr. 2013 52(3):186-92. (査読有)
- (2) Polyphenols in Theobroma cacao ameliorate microcirculation : In vivo intravital microscopic observation in rats. Osakabe N J. Food Drug Anal 20 288-291 2012 (査読無)
- (3) Ingestion of cocoa ameliorates endothelial dysfunction in mesentery arterioles induced by high fat diet in rats: An in vivo intravital microscopy study. Osakabe N, Shibata M. Life Sci.:91:1196-200.2012 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) カテキン重合物のメタボリックシンドローム予防メカニズムの解明 越阪部奈緒美 第 16 回日本フードファクター学会 (静岡県男女共同参画センター, 2012.11.13)
- (2) ポリフェノール化合物のラット循環系に対する作用強度の比較 越阪部 奈緒美、中里 嘉樹、有賀 望、安孫子 舞、柴田政廣 第 65 回日本栄養食糧学会大会 (お茶の水女子大学, 2012.5.16)
- (3) Polyphenols in Theobroma Cacao ameliorate microcirculation.:in vivo intravital microscopic observation in rats. Naomi Osakabe, Masahiro Shibata 5th International conference on food factors (Taiwan, 2011.11.21)
- (4) Amelioration of flavan 3-ols on microcirculation in rat cremaster muscle and mesentery evaluated by in vivo intravital microscopic technique. Naomi Osakabe, Masahiro Shibata 5th International conference of polyphenol and health (España, 2011.10.19)
- (5) 生体顕微鏡を用いたプロシアニジンの微小循環改善作用の検討 2 越阪部奈緒美、柴田政廣 2011 年度日本農芸化学会大会 (京大女子大学, 2011.3.24)
- (6) In vivo 生体顕微鏡による直接観察法を用

いたプロシアニジンの微小循環改善作用の
検討 越阪部奈緒美、柴田政廣 第15回
日本フードファクター学会（宮城・仙台市民
会館，2010.10.4）

(7) 生体顕微鏡を用いた直接観察法によるプ
ロシアニジンの微小循環改善作用の検証
越阪部奈緒美、柴田政廣 第4回日本ポリフ
ェノール学会（十文字女子大学，2010.8.6）

(8) 高脂食負荷が内皮依存性血管拡張機能に
及ぼす影響—ラット腸間膜細動脈の *in vivo*
観察による評価— 越阪部 奈緒美、柴田
政廣 第64回日本栄養食糧学会（アステ
ィとくしま，2010. 5.21）

〔図書〕（計1件）

カカオポリフェノールの構造と機能 越
阪部奈緒美 2012 pp231-246 {ポリフェノ
ール：薬用植物および食品の機能成分}（監
修 波多野力 CMC 出版）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越阪部 奈緒美 (OSAKABE NAOMI)
芝浦工業大学・システム理工学部・教授
研究者番号：30554852

(2) 研究分担者

柴田 政廣 (SHIBATA MASAHIRO)
芝浦工業大学・システム理工学部・教授
研究者番号：60158954