

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32623

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750054

研究課題名(和文)クエン酸の摂取は低酸素血症に伴う続発性多血症の食事療法として有効か？

研究課題名(英文) Could citric acid be an effective food against plethora induced by hypoxemia in rats?

研究代表者

渡辺 睦行(Watanabe, Nakamichi)

昭和女子大学・生活機構研究科・准教授

研究者番号：90365809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多血症では血液流動性が著しく低下するため、脳梗塞を発症しやすく予後が悪い。本研究はクエン酸の摂取が低酸素血症に伴う多血症の食事療法として有効かどうかを明らかにすることを目的として実施した。しかし、本研究の条件では、クエン酸が多血症そのものに良い影響を与える可能性を示すことは出来なかった。一方で、クエン酸には低酸素曝露に伴う肝臓グリコーゲン量の低下を抑制する効果や、筋肉における炎症を抑制する効果があることが示された。以上より、生体が低酸素にさらされた際に生じる生体の好ましくない反応に対して、クエン酸はいくつかの良い効果を発揮する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Plethora causes an increase in cerebral infarction owing to a drastic decrease in blood fluidity. This study aimed to examine whether citric acid could be an effective food against plethora induced by hypoxemia in rats. Unfortunately, citric acid might not be an effective food. On the other hand, intake of citric acid was found to counteract the hypoxia-induced decrease in liver glycogen levels. Moreover, citric acid was found to have the potential to suppress inflammation in skeletal muscles. Therefore, citric acid might be effective against hypoxia.

研究分野：食品機能学

キーワード：クエン酸 低酸素 多血症

1. 研究開始当初の背景

心疾患や肺疾患では血中の酸素飽和度が低下するため、代償的に赤血球が過剰に産生され、続発性多血症となることが知られている。続発性多血症では血液流動性が著しく低下するため、脳梗塞を発症しやすく予後が悪い。そこで、ヘマトクリット値を正常に保つことが重要となるが、その治療として主に用いられているのは対症療法である瀉血(血液を体外に排出する)であり、その他の治療法はもちろんのこと、食事療法についても確立されていないのが現状である。

しかし最近、重度の続発性多血症患者にクエン酸入り飲料を摂取させると、ヘマトクリット値の低下に伴い血液流動性が改善し、日常生活動作が回復したとの症例研究が報告された。このメカニズムとして、摂取したクエン酸が TCA 回路に供給され効率的にエネルギー(ATP)が産生されること、クエン酸が血中のカルシウムイオンをキレートすることで血液凝固が抑制されることなどが挙げられている。しかし、摂取したクエン酸がミトコンドリアに入り TCA 回路が活性化される例は報告されていないこと、血中のクエン酸濃度は抗凝固剤として用いられているクエン酸濃度の 3000 分の 1 程度にしかならないことから、これらのメカニズムの真偽については不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クエン酸の摂取が低酸素血症に伴う多血症の食事療法として有効かどうか、またそのメカニズムはいかなるものかを、実験動物を用いて検証することである。具体的には以下のとおり。

(1) クエン酸の摂取によって赤血球中の 2,3-DPG (赤血球の変形能を高めるために重要な役割を果たしている) は上昇するのか、また、実際に赤血球の変形能が上昇するのか、全血流動性は向上するのかどうかを、ラットを用いて明らかにする。

(2) LPS (リポ多糖) によって炎症を誘発したマウスにクエン酸を摂取させることで、炎症が抑制されるのかを明らかにする。この時、血管内皮細胞の機能や血液流動性の評価を行う。

(3) 低酸素曝露したラットにクエン酸を摂取させた時、実際に血液流動性が改善されるのか、ヘマトクリット値の上昇が抑えられるのか、を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 9 週齢の SD 系雄ラットにクエン酸溶液

または蒸留水を、ゾンデを用いて胃内投与した(1群6匹)。投与30分後(最も血中クエン酸濃度が高くなる時間)に解剖を行い、腹部大動脈から血液を採取し、血液流動性、赤血球の変形能、赤血球中の 2,3-DPG 含量を測定した。クエン酸投与量は、体重 100g あたり 50mg とする(血中のクエン酸レベルが上昇するのに十分な量)。血液流動性は全血を、赤血球の変形能は赤血球を緩衝液に懸濁しヘマトクリット値を 50%としたものを、MCFAN (毛細血管の約 10 倍の圧力下にて、血液が、幅 5 μ m、約 8500 本の微細流路を、100 μ L 流れる時間を測定する)に供することで測定した。

(2) 9 週齢の SD 系雄ラットにクエン酸溶液または蒸留水を、ゾンデを用いて胃内投与した(1群6匹)。投与30分後(最も血中クエン酸濃度が高くなる時間)にリポポリサッカライド(LPS)を体重 100g あたり 0.1mg 腹腔内投与し、炎症を惹起した。腹腔内投与4時間後に腹部大動脈より採血を行い、全血を MCFAN に供し血液流動性を測定し炎症を評価した。

(3) 9 週齢の SD 系雄ラットを飲料水の違い(クエン酸飲料または蒸留水)にて2群に分けた後、1日6時間、3週間、低酸素(酸素濃度 10.5%)曝露し多血状態を誘導した。(この時、低酸素曝露しない2群も設けた)。群は以下のとおり。1) 常酸素-蒸留水群(Normoxia-DW)、2) 常酸素-クエン酸群(Normoxia-CA)、3) 低酸素-蒸留水群(Hypoxia-DW)、4) 低酸素-クエン酸群(Hypoxia-CA)。飼育期間中は、1週間に1回、ヘマトクリット値、血圧、体重、摂食量、摂水量を測定した。またエネルギー代謝の変化を想定するために、血糖値、乳酸値、肝臓・骨格筋(ヒラメ筋・腓腹筋)・心臓グリコーゲン含量も測定した。3週間の低酸素曝露終了後に、腹部大動脈より採血を行い全血の血液流動性を MCFAN にて測定した。また、2時間の低酸素曝露でも同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) クエン酸の摂取はラットの全血流動性、血小板の活性化、白血球の粘着性に影響を与えなかった。また、赤血球中の 2,3-DPG 含量についてもクエン酸摂取の良い影響はみられず、赤血球の変形能も変化しなかった。

(2) LPS の腹腔内投与によって、ラットの血液流動性は低下したが、クエン酸摂取の有効性を明らかにすることはできなかった。一方で、クエン酸の摂取は LPS 投与による体重減少を有意に抑制していた。さらに、LPS を投与していないラットへのクエン酸投与は、骨格筋(腓腹筋)におけるインターロイキン-1

(IL-1)およびIL-6のmRNAの発現量を有意に低下させた。また肝臓においても有意差はみられなかったものの同様の傾向がみられた。これらのことから、クエン酸が炎症の抑制に何らかの良い影響を与えている可能性が示された。

(3)3週間の低酸素曝露は、ラットのヘマトクリット値を有意に上昇させたが、クエン酸を摂取させてもヘマトクリット値の上昇は抑制されず (Fig.1) クエン酸には多血状態そのものを改善する効果はみられなかった。また、血液流動性は、低酸素およびクエン酸の摂取で低下する傾向がみられたが、有意差は認められなかった (Fig.2)。血糖値は、低酸素曝露で有意に低下したが、クエン酸摂取の影響はみられなかった。乳酸値は、低酸素曝露およびクエン酸摂取の影響を受けなかった。肝臓グリコーゲン含量は低酸素曝露により有意に低下したが、クエン酸摂取の影響はみられなかった (Fig.3)。一方で、骨格筋 (ヒラメ筋・腓腹筋) および心臓グリコーゲン含量は、低酸素曝露およびクエン酸摂取の影響を受けなかった。

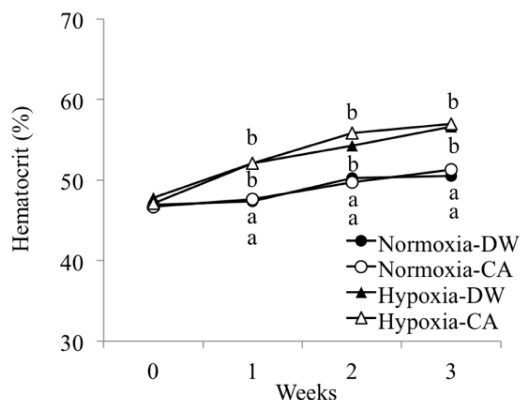


Fig.1 Changes of hematocrits
Data are mean.
Values with different superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

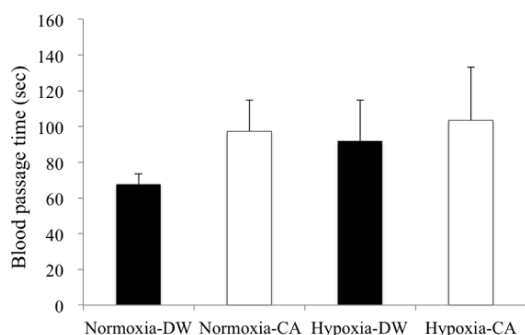


Fig.2 The blood passage times of 100µL of whole blood using MC-FAN
Data are mean \pm SE (n=5).

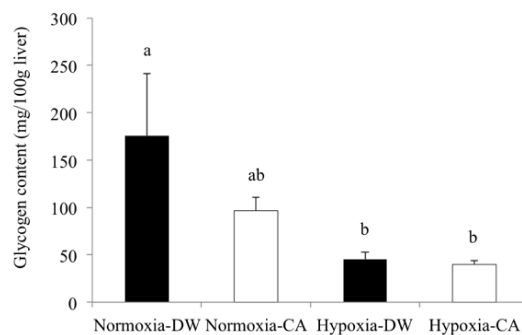


Fig.3 Glycogen contents in the liver
Data are mean \pm SE (n=5).
Values with different superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

2時間の急性低酸素曝露は、ラットの肝臓グリコーゲン含量を低下させたが、予めクエン酸を摂取させておくと、グリコーゲンの低下が抑制されることが明らかになった (Fig.4)。一方で、3週間の低酸素曝露時と同様に、骨格筋 (ヒラメ筋・腓腹筋) および心臓グリコーゲン含量は、低酸素曝露およびクエン酸摂取の影響を受けなかった。血糖値は、低酸素曝露およびクエン酸摂取の影響を受けなかった。乳酸値は、低酸素曝露によって有意に低下したが、クエン酸摂取による影響はみられなかった。

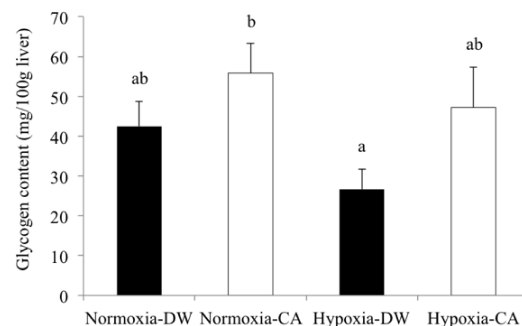


Fig.4 Glycogen contents in the liver
Data are mean \pm SE (n=7).
Values with different superscript letters are significantly different at $P<0.05$.

以上より、クエン酸摂取は低酸素曝露 (1日6時間、3週間) に伴うヘマトクリット値の上昇や血液流動性の低下を抑制しないことが示された。よって、本研究の条件では、クエン酸が多血症そのものに良い影響を与える可能性を示すことは出来なかった。

一方で、クエン酸には低酸素曝露 (2時間) に伴う肝臓グリコーゲン量の低下を抑制する効果や、筋肉における炎症性サイトカインの発現を抑制する効果があることが示され、生体が低酸素に曝された時に、クエン酸がいくつかの良い効果を発揮する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yurie Hara, Nakamichi Watanabe,
Effects of dietary citric acid on
metabolic indicators and gene
expression in the skeletal muscles of
fasted mice. Food and Nutrition
Sciences, 4, 1114-1119 (2013).(査読あ
り)

〔学会発表〕(計4件)

原百合恵・渡辺睦行、低酸素曝露に対す
る生体応答、日本ヘモレオロジー学会、
2013年11月16日、獨協医科大学日光医
療センター(栃木・日光)

Yurie Hara, Nakamichi Watanabe,
Effects of dietary citric acid on energy
metabolism of skeletal muscles and
liver in mice., International Congress
of Nutrition, 15th Sep. 2013, Granada
(Spain)

原百合恵・渡辺睦行、多血症モデルラッ
トの作製～呼吸器疾患に伴う多血症の食
事療法確立に向けて～、日本食品科学工
学会、2013年8月31日、実践女子大学
(東京・立川)

原百合恵・渡辺睦行、低酸素条件下で飼
育したラットはどうなるのか、日本栄
養・食糧学会、2013年5月24日、名古
屋大学(愛知・名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 睦行 (Watanabe, Nakamichi)
昭和女子大学・生活機構研究科・准教授
研究者番号：90365809