

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32623

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16218

研究課題名(和文)クエン酸は呼吸器疾患に有効な食品成分となり得るか？

研究課題名(英文)Citric acid effects on the inflammation in Effects of dietary citric acid on the inflammation in respiratory disease

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低酸素曝露がラットの自発運動量に及ぼす影響と、各臓器の炎症に及ぼす影響について明らかにすることを第一の目的とした。さらに、クエン酸の摂取が、低酸素曝露による自発運動量の低下や炎症の惹起を抑制しうるかどうかについてもあわせて検討した。結果、低酸素曝露は自発運動量を有意に低下させるが、予めクエン酸を摂取させておくことで有意な低下がみられなくなるが明らかになった。また、低酸素曝露はラットの、脳、肝臓、骨格筋、肺において炎症マーカーを上昇させないことが示された。クエン酸の摂取は、各臓器の炎症マーカーに影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：The first aim of this study was to clarify the effects of hypoxic exposure on spontaneous motor activity and inflammation in rats. The second aim was to validate the efficacy of dietary citric acid on those effects induced by hypoxic exposure. The results show that spontaneous motor activity in rats was significantly decreased by exposure to hypoxia, while dietary citric acid reduced the significance of the effect. Regarding inflammation, hypoxic exposure did not induce expression of inflammation makers in the brain, the liver, the skeletal muscles, and the lung of rats. Dietary citric acid did not affect inflammation makers in these organs.

研究分野：食品機能学

キーワード：クエン酸 低酸素 自発運動 炎症

1. 研究開始当初の背景

WHOによると、21世紀の10大死因のうちの4つが呼吸器疾患になると推察されている。現在日本でも、死因の第3位が肺炎、第9位が慢性閉塞性肺疾患(COPD)で、10大死因のうちの2つが呼吸器疾患であり、食事療法を含めた呼吸器疾患への新しいアプローチが必要であると考えられる。しかし、呼吸器疾患に対する食事療法の検討や食品成分によるアプローチはほとんどなされていないのが現状である。

これまでに我々は、ほぼ全ての呼吸器疾患に共通する基礎病態である「低酸素血症」に着目し研究を進めてきた。結果、ラットに酸素濃度10.5%で2時間の低酸素曝露を行うと、肝臓のグリコーゲン量が減少すること、さらに低酸素曝露後2時間の自発運動量が有意に減少することを明らかにしている。この結果は、呼吸器疾患患者では日常生活動作(ADL)が低下しているという事実とも一致する。

一方、我々は、ラットに予めクエン酸を摂取させておくと、低酸素曝露を行っても肝臓グリコーゲン量が減少しないことを明らかにしており(36th ESPEN Congress, 2014にてポスター発表)、クエン酸の摂取が低酸素曝露によって引き起こされる自発運動量の減少を抑制すること、すなわちクエン酸が呼吸器疾患患者のADL向上に寄与する食品成分になり得ることが期待される。

ところで近年、COPDをはじめとする呼吸器疾患は、肺や気管の単なる炎症ではなく全身性の炎症として捉えられており、これを抑制することが重要な課題の1つとなっている。この全身性の炎症は、低酸素誘導因子 HIF-

により惹起されることが報告されており、低酸素曝露そのものが全身性炎症の原因となっている可能性が高い。

一方で、Abdel-salamらは、クエン酸がリポ多糖(LPS)によって誘導されるラットの全身性炎症を抑制することを明らかにしている。また我々は、ニュートリゲノミクス解析により(Food Nutr Sci, 2013)、クエン酸が筋肉の炎症を抑制する可能性があることを明らかにしている。よって、クエン酸は低酸素誘導性の全身性炎症にも有効である可能性がある。

以上より、クエン酸は「自発運動量の増加、すなわちADLの改善」と「全身性炎症の抑制」という、呼吸器疾患における重大な2つの問題点を同時に解決し得る可能性を秘めた食品成分であると考えられる。

2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに、本研究ではクエン酸の摂取が呼吸器疾患に有効な食品成分となり得るかを、ラットを用いて検証した。具体的には以下の2点を明らかにすることを

目指した。1.クエン酸の摂取は、低酸素誘導性の自発運動量の減少を抑制するのかを明らかにする。自発運動量は回転ケージにて経時的に評価する。2.低酸素曝露により全身性炎症が誘導されるのか、また、その炎症に対してクエン酸投与が有効かどうか、を明らかにする。呼吸器疾患における「全身性炎症」は言葉だけが一人歩きしている感があり、全身性の炎症が一体どの臓器でどのように生じているのか、については全く報告がみられないため、肺や脳など臓器別の炎症の程度について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 自発運動量

8週齢の雄性SD系ラットを購入し1週間の予備飼育の後、4群に分け、回転ケージ内にて5日間飼育した。試験群は以下の4群(1群8匹)とした。

蒸留水摂取-常酸素群
蒸留水摂取-低酸素群
クエン酸摂取-常酸素群
クエン酸摂取-低酸素群

群分け後のラットに、蒸留水またはクエン酸溶液をゾンデを用いて胃内投与(200mg/体重300g)した。投与30分後(血中クエン酸濃度が高くなり始める頃)に、低酸素曝露群には低酸素曝露(酸素濃度10.5%:常酸素の半分)を2時間行った。

2時間低酸素曝露を行った後、回転ケージにてラットの走行距離(自発運動量)を経時的に測定し、低酸素曝露の影響およびクエン酸摂取の影響を検討した。

(2) 炎症

8週齢の雄性SD系ラットを購入し1週間の予備飼育の後、4群に分けた。試験群は以下の4群(1群8匹)とした。

蒸留水摂取-常酸素群
蒸留水摂取-低酸素群
クエン酸摂取-常酸素群
クエン酸摂取-低酸素群

群分け後のラットに、蒸留水またはクエン酸溶液をゾンデを用いて胃内投与(200mg/体重300g)する。投与30分後に、低酸素曝露群には低酸素曝露(酸素濃度10.5%:常酸素の半分)を2時間または6時間行った。

低酸素曝露後に解剖し、肺、脳、肝臓、骨格筋を採取する。各臓器のIL-1、IL-6、TNF-(炎症性サイトカイン)のmRNA発現量をリアルタイムPCRにて分析した。

また、各臓器の低酸素誘導因子HIF- α の安定化はウエスタンブロットにて測定した。

4. 研究成果

(1) 自発運動量

回転ケージにて測定した曝露後2時間(曝

露していない日は曝露した日と同一時刻、同一時間)の自発運動量を図1に示した。曝露前2日間の自発運動量の平均値を100とした時の相対自発運動量として示した。曝露後の値は、曝露した翌日から2日間の平均値で示した。低酸素曝露(蒸留水摂取-低酸素)はラットの自発運動量を、曝露前日2日間の平均よりも有意に低下させたが、予めクエン酸を投与しておく(クエン酸-低酸素)、自発運動量は低下傾向を示したものの有意差はみられなくなった。

以上より、クエン酸の摂取が低酸素曝露による自発運動量の低下を抑制する可能性が示された。

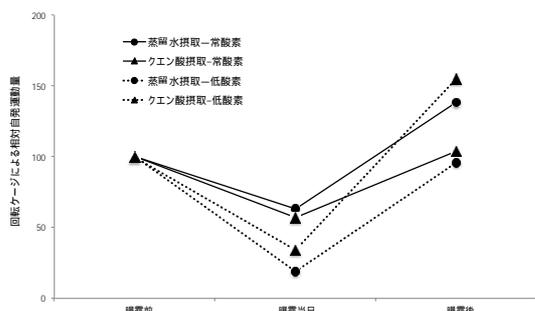


図1 回転ケージにおける相対自発運動量

(2) 炎症

酸素濃度 10.5%で2時間低酸素曝露した際の、肝臓、ヒラメ筋、腓腹筋、脳、肺における、炎症マーカー(IL-1, IL-6, TNF-α)の相対 mRNA 発現量を表1-1と表1-2に続けて示した。いずれの臓器においても、低酸素曝露による炎症マーカーの有意な上昇はみられず、IL-1は、肝臓、ヒラメ筋、腓腹筋で低酸素曝露により有意に低値を示した。また、ヒラメ筋では低酸素曝露により、TNF-αも有意に低値だった。また、血清の各炎症マーカー濃度にも有意差はみられなかった(データには示していない)。クエン酸の投与は、殆どの炎症マーカーに影響を与えなかったものの、ヒラメ筋と腓腹筋においてIL-1を有意に低下させた。また、酸素濃度10.5%で6時間の低酸素曝露でも、各臓器において炎症マーカーの上昇はみられなかった。

以上より、生体の低酸素は炎症を導くと一般には報告されているが、本研究の条件では、各臓器において炎症が惹起されることはなく、むしろ炎症が抑制される可能性が示された。

一方で、クエン酸投与は、骨格筋においてIL-1のmRNA発現を抑制したものの、各臓器における明確な炎症抑制効果を示すことは出来なかった。

表1-1 各臓器における炎症マーカー(IL-1β, IL-6, TNF-α)のmRNA発現比

		常酸素	
		蒸留水摂取	クエン酸摂取
肝臓	IL-1β	1.00 ± 0.11 a	1.00 ± 0.15 a
	IL-6	1.00 ± 0.26	1.49 ± 0.65
	TNF-α	1.00 ± 0.20	0.79 ± 0.13
ヒラメ筋	IL-1β	1.00 ± 0.14 a	0.49 ± 0.12 b
	IL-6	1.00 ± 0.20	1.27 ± 0.17
	TNF-α	1.00 ± 0.16 a	0.68 ± 0.15 a
腓腹筋	IL-1β	1.00 ± 0.19 a	0.46 ± 0.08 b
	IL-6	1.00 ± 0.12	1.65 ± 0.26
	TNF-α	1.00 ± 0.21	0.95 ± 0.24
脳	IL-1β	1.00 ± 0.15	0.94 ± 0.19
	IL-6	1.00 ± 0.13	0.84 ± 0.18
	TNF-α	1.00 ± 0.11	0.99 ± 0.21
肺	IL-1β	1.00 ± 0.07	1.02 ± 0.14
	IL-6	1.00 ± 0.38	0.68 ± 0.12
	TNF-α	1.00 ± 0.05	0.83 ± 0.05

データは平均値 ± 標準誤差で示した。

a, b: 異なる記号は有意差を表す (P < 0.05)

表1-2 各臓器における炎症マーカー(IL-1β, IL-6, TNF-α)のmRNA発現比

		低酸素	
		蒸留水摂取	クエン酸摂取
肝臓	IL-1β	0.43 ± 0.04 b	0.55 ± 0.04 b
	IL-6	2.40 ± 0.72	1.57 ± 0.53
	TNF-α	0.57 ± 0.09	0.73 ± 0.09
ヒラメ筋	IL-1β	0.69 ± 0.08 b	0.65 ± 0.07 b
	IL-6	0.66 ± 0.11	1.16 ± 0.48
	TNF-α	0.23 ± 0.03 b	0.22 ± 0.03 b
腓腹筋	IL-1β	0.29 ± 0.03 b	0.29 ± 0.05 b
	IL-6	1.23 ± 0.23	1.37 ± 0.14
	TNF-α	0.58 ± 0.05	0.81 ± 0.17
脳	IL-1β	0.66 ± 0.13	0.58 ± 0.06
	IL-6	1.53 ± 0.25	1.51 ± 0.19
	TNF-α	0.95 ± 0.15	0.97 ± 0.15
肺	IL-1β	0.91 ± 0.09	1.13 ± 0.06
	IL-6	0.62 ± 0.05	1.19 ± 0.37
	TNF-α	0.79 ± 0.07	0.84 ± 0.09

データは平均値 ± 標準誤差で示した。

a, b: 異なる記号は有意差を表す (P < 0.05)

これまで、低酸素曝露は HIF-1 の安定化を介して炎症を誘導することが細胞を用いた研究にて報告されているが、本研究のように生体(ラット)を低酸素曝露した場合には、必ずしも各臓器において炎症が誘発される訳ではないことが示された。本研究でも肝臓と骨格筋における HIF-1 の安定化をウエスタンブロットングにより検討したが、肝臓では HIF-1 は検出されず、骨格筋では検出されたものの、低酸素曝露により HIF-1 の安定化が高まることを示すことは出来なかった。生体が低酸素環境に曝された場合、肝臓や脳のような生命維持に必須の臓器では、血流量が高まることにより、むしろ臓器の酸素濃度が増加するとの報告もみられる。今度は、細胞の低酸素、生体の低酸素、臓器の低酸素の違いを意識しながら、研究を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

原百合恵・渡辺睦行、低酸素曝露により生じるラットの糖質代謝の変化と自発運動量の変化に対するクエン酸投与の影響、第70回日本栄養食糧学会、2016年5月14日、武庫川女子大学中央キャンパス(兵庫県・西宮市)

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