

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：萌芽研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19650211

研究課題名（和文）リグノフェノールを用いたリグニン本来の生理調節機能の探索

研究課題名（英文）Physiological functions of lignin-delivered lignophenols in animal models with hypertension or diabetes.

研究代表者 森永八江（MORINAGA YAE）

青森県立保健大学・健康科学部・助手

研究者番号：40404818

## 研究成果の概要：

リグノフェノール（LP）は、食物繊維であるリグニンから得られる新素材であり、フェノール性水酸基が付加したポリフェノールでもある。本研究では、食物繊維としての作用と抗酸化能を有するLPは、高血圧や糖尿病などの生活習慣病を予防・改善するかを高血圧や糖尿病モデル動物を用いて検討した。その結果、LPは血圧上昇を抑制し、高血糖状態で生じる酸化ストレスや炎症細胞の浸潤を抑制する機能を有する可能性が示された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	800,000	0	800,000
20年度	2,400,000	0	2,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：リグノフェノール、リグニン、食物繊維、ポリフェノール、高血圧、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣病、特に、高血圧の予防・改善策の1つとして食物繊維の十分な摂取が有効であると考えられている。また、高血圧や糖尿病などでは酸化ストレスが増大することも知られている。

食物繊維であるリグニンは、セルロースおよびヘミセルロースとともに植物体の細胞壁を形成する主要成分であり、地球上で生合成される有機物としてはセルロースに次いでいる。ヒトはリグニンを摂取しているが、構造上、リグニンをそのまま植物体

から抽出することは困難であるため、天然リグニンの生体に及ぼす影響は十分に解明されていない。

リグノフェノール（Lignophenol、LP）はリグニンから「相分離変換システム」により得られた新規素材であり、フェノール性水酸基が付加した広義のポリフェノールである。LPは、今日、紙を作る工程で多く排出されるクラフトリグニンとは異なり、縮合等の構造変化を伴わず、天然リグニンに近い立体構造、化学的特性を有しているのが特徴である。近年、LPは光増感太陽電池、

塗料、木材用の接着剤、包装・貼合用フィルムなど工業的に多方面での実用化研究が進んでいる。しかし、高血圧症におけるLPの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。一方、糖尿病においても高血糖状態により終末糖化産物(A GE)が生成し、活性酸素、特に、スーパーオキシド( $O_2^-$ )が過剰に産生され酸化ストレスが増大する。しかし、糖尿病におけるLPの生理調節機能に関する知見もほとんどなかった。

そこで、食物繊維としての作用と抗酸化能を有するLPは、高血圧や糖尿病などの生活習慣病の治療薬や生理機能物質のシーズとして有望ではないかと考え、本研究として企画した。

## 2. 研究の目的

(1) 実験 : LPの食物繊維としての機能を評価するために、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用いて、高分子量LP(分子量約21000)の血圧上昇抑制効果を検討した。

(2) 実験 : 実験では、高分子量LPを用いたので、本試験では高血圧自然発症ラット(SHR)を用いて、低分子化したLP(分子量約1600)の血圧上昇に及ぼす影響を検討した。

(3) 実験 : 高血糖状態におけるLPの生理調節機能を明らかにするために、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットにLP(分子量約1600)を投与し、LPは、血管内皮や腎臓の酸化ストレスを軽減するか、腎臓中の炎症細胞(マクロファージ)の浸潤を抑制するか、さらに、高血糖状態は脂質代謝に影響を与えるので、血中の中性脂肪や総コレステロールに及ぼすLPの影響も検討した。

## 3. 研究の方法

本研究は「青森県立保健大学動物実験に関する指針」に従って実施された。

### (1) 実験

実験動物およびLPの投与

SHRSPの飼料へのLP添加量は0%(対照)、0.12%、0.6%および3%とし5週間投与した。飲料水は1%食塩水を与え、飼料と飲料水は自由摂取とさせた。24時間採尿および採糞はLP投与開始後4週目に行った。

血圧、ナトリウム(Na)およびカリウム(K)濃度の測定

尾部カフ法により血圧および心拍を測定

した。屠殺時に得た血漿、24時間採尿および採糞中のNaおよびK濃度をイオン選択性分析装置あるいは高周波プラズマ質量分析で測定した。

### (2) 実験

実験動物およびLPの投与

高血圧自然発症ラット(SHR)とその対照動物である正常血圧のWistar Kyoto Rat(WKY)(雄性)を用いた。SHRおよびWKYを4群に分け6週間投与した。すなわち、SHRは0%LP群および1.0%LP群、WKYも同様に0%LP群および1.0%LP群である。0%LP群には標準動物飼料のみを投与した。投与期間中、2週間に1回、収縮期血圧を測定した。

血圧の測定

尾部カフ法により血圧および心拍を測定した。

### (3) 実験

糖尿病モデルの作製と投与

雄性Wistar系ラット(6週齢)を実験に用いた。ラットにSTZ(65 mg/kg)を尾静脈に単回投与し、血糖値が300 mg/dl以上の動物を糖尿病モデルラットとして実験に供した。

糖尿病ラットを4群に分け、LPを5週間投与した。すなわち、LP非投与群(0%LP群)、0.11%投与群、0.33%投与群および1.0%投与群である。0%LP群および対照群(健康ラット、8例)には、標準動物飼料のみを投与した。

血液生化学的検査

血漿を得た後、血漿中のグルコース(Glc)、尿素窒素(BUN)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-cho)、血漿および尿中クレアチニン(Cre)の各濃度を測定した。

酸化ストレスの程度

24時間尿中の8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)濃度をELISA法により定量した。

腎臓の皮質・髄質および大動脈のNAD(P)Hオキシターゼ由来の $O_2^-$ 産生量は、ルシゲニンを用いた化学発光法により測定した。

線維化の程度および免疫組織化学的検査

腎臓の線維化の程度を調べるために、薄切組織切片に線維を赤色に染めるシリウスレッド染色を施した。すべてのラットについて5箇所を無作為に選び、腎臓の糸球体の線維化領域の面積率を画像処理して計測した。

腎臓のマクロファージの出現を調べるた

めに、薄切組織切片にラット・マクロファージ ED1 抗体を用いた免疫染色を施した。腎臓の糸球体 50 箇所を無作為に選び、糸球体 1 箇所中の ED1 陽性マクロファージ数を、また腎臓の皮髄境界領域から 5 箇所を無作為に選び、単位面積(0.0625 mm<sup>2</sup>)あたりの ED1 陽性マクロファージ数を計測した。

#### 腎臓の MCP-1 の mRNA の定量

腎臓の皮質から総 RNA を抽出した。抽出した総 RNA の純度評価および定量は、バイオアナライザ 2100 (Agilent 社) を用いて確認した。次に cDNA を合成し、MCP-1 の mRNA を定量するために、リアルタイム RT-PCR 法を行った。内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA を定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験

高分子量 LP 投与による血圧および心拍数への影響

8 週齢に LP 投与を開始し、投与 3 週目の血圧測定では、対照群 (0% 投与群) と 3% 投与群を比較すると、およそ 25 mmHg ほど 3% 投与群が有意に低値を示した。また、投与 5 週目では、およそ 20 mmHg ほど 3% 投与群が有意に低値を示した (図 1)。この結果は、LP 投与により血圧上昇が抑制されることを示している。

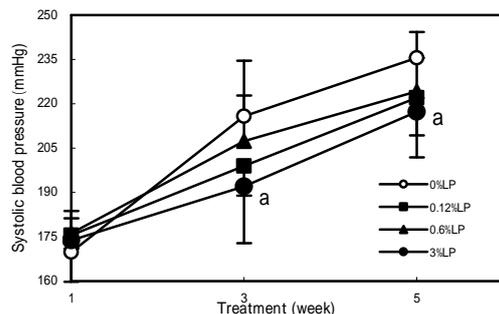


図 1. 高分子量 LP 投与による血圧の推移。値は平均値 ± 標準偏差で示した (n=4 7)。<sup>a</sup>p<0.05 vs 0%LP 投与群。

LP 投与による血漿、尿および糞中電解質濃度への影響

血漿中の Na および K 濃度は対照群と LP 各群には著しい差はみられなかった。一方、対照群と LP 高用量群の尿中 Na 濃度を比較すると LP 群で高値であった。糞 1g 当たりの Na 濃度はいずれの群でも有意な差はみられなかったが、1 日当たりの糞中 Na 濃度は対照群

と比べて、LP 高用量群で高い傾向がみられた。一方、糞 1g 当たりの K 濃度は LP 高用量群で有意に低く、1 日当たりの糞中 K 濃度も低くなる傾向がみられた。

以上のように、SHRSP に高分子量の LP を 5 週間投与した結果、血圧がおよそ 20mmHg ほど有意に低下し、LP は血圧上昇抑制作用を有することが判明した。また、LP 投与は、尿中への Na の排泄を促し、糞中への K の損失を抑制することが考えられた。この機序については、さらなる研究が必要ではあるが、高分子量の LP は少なくとも、Na や K 代謝に関与し、血圧上昇を抑制する可能性が示唆された。

#### (2) 実験

SHR+1.0%群の収縮期血圧は SHR+0%群に比べて低下した (図 2)。心拍数は著しい差は見られなかった。この結果から、LP は血圧上昇を抑制する可能性が示唆された。

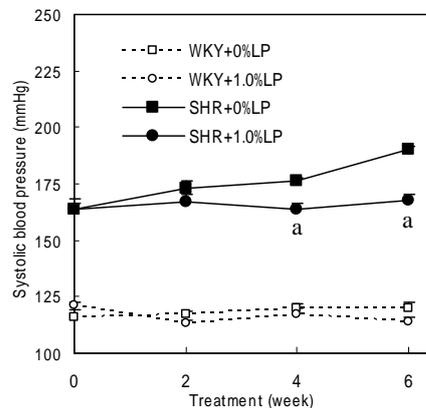


図 2. 低分子量 LP 投与による血圧の推移。値は平均値 ± 標準偏差で示した (n=7)。<sup>a</sup>p<0.05 vs SHR+0%LP 群。

#### (3) 実験

体重変化および臓器重量に及ぼす LP の影響

投与期間中 LP 投与に有無に関らず、糖尿病群の体重増加の程度は小さく、投与 5 週目では減少傾向がみられたが、LP 投与による有意な差は認められなかった。対照群は順調に増加した。0% LP 投与群の腎臓重量は、対照群に比べて増加したが、0.33%LP 群および 1.0%群では減少していた。

血液生化学的検査値に及ぼす LP の影響

0% LP 群の Glc 値は、対照群に比べて有意に上昇した。0% LP 群と他の LP 群を比べると、0.11%LP 群で Glc の高値を除き、Glc 値には有意な差は認められなかった。このことは、

STZ を投与した糖尿病ラットは高血糖状態であることを示していた。

BUN および Cre 濃度についてはいずれの投与群においても変化は認められなかった。

0% LP 群の TG 濃度は、対照群に比べて増加傾向がみられたが、0.33%LP および 1.0%群では減少した。また、0% LP 群の T-cho 濃度は、対照群に比べて増加傾向がみられたが、1.0% LP 群では減少した。これらの結果は、LP は糖尿病における脂質代謝に影響を及ぼすことを示していた。

#### 24 時間尿中の 8-OHdG 濃度に及ぼす LP の影響

LP0%群の 24 時間尿中の 8-OHdG 濃度は、対照群に比べて増加したが、LP を投与した各群では有意に低下した (図 3)。このことは、LP 投与は、高血糖状態の酸化ストレスを抑制することを示していた。

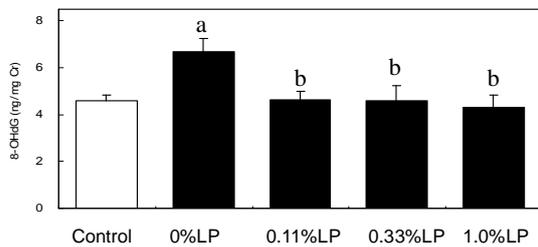


図 3. 24 時間尿中の 8-OHdG 濃度に及ぼす LP の影響。値は、平均値 ± 標準偏差で示した (n=6-7)。<sup>a</sup>p<0.05 vs Control 群。 <sup>b</sup>p<0.05 vs 0%LP 投与群。

#### 大動脈および腎臓中の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量に及ぼす LP の影響

0% LP 群の大動脈の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 量は、対照群に比べて有意に増加したが、1.0% LP 群では有意に減少した。また、0% LP 群の腎臓の皮質では O<sub>2</sub><sup>-</sup> 量は、対照群に比べて有意に増加したが、1.0% LP 群では有意に減少した。腎臓の髄質では 0% LP 群に比べて、1.0% LP 群で減少傾向がみられた。これらの結果から、LP は O<sub>2</sub><sup>-</sup> の産生を低減し、これによって生じると考えられる血管内皮障害が軽減されることが推察された。

#### 腎臓のマクロファージ浸潤に及ぼす LP の影響 (図 4)

糖尿病ラットである 0% LP 群の腎臓の糸球体のマクロファージ浸潤数は対照群に比べて増加したが、1.0%LP 投与群では減少し

た。また、0% LP 群の腎臓の皮髄境界領域のマクロファージ浸潤数は対照群に比べて有意に増加したが、LP 投与群では減少した。これらの結果は、LP は高血糖状態におけるマクロファージの浸潤を抑制することを示していた。

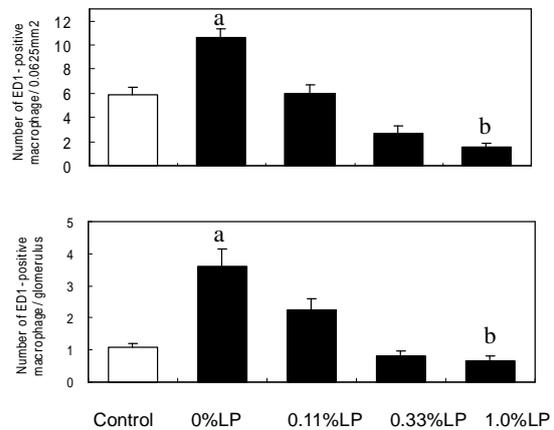


図 4. 腎臓の皮髄境界領域 (上段)、糸球体 (下段) 中のマクロファージ浸潤に及ぼす LP の影響。値は、平均値 ± 標準偏差で示した (n=6-7)。<sup>a</sup>p<0.05 vs Control 群。 <sup>b</sup>p<0.05 vs 0%LP 投与群。

腎臓の MCP-1 mRNA 発現に及ぼす LP の影響  
マクロファージの活性化や浸潤に関連する MCP-1 の mRNA は LP0%群では高値であったが、LP1.0%群では有意に低下した。

以上、3つの実験から、LP は血圧上昇を抑制し、高血糖状態で生じる酸化ストレスや炎症細胞の浸潤を抑制する可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

佐藤 伸、向井友花、乗鞍敏夫、森永八江、藤田修三、実験的糖尿病ラットの腎症に及ぼす新素材リグノフェノールの影響、第 63 回日本栄養・食糧学会大会、2009 年 5 月 20~22 日、長崎市

佐藤 伸、舩甚早紀、向井友花、森永八江、藤田修三、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの酸化ストレスに及ぼす新素材リグノフェノールの影響、第 62 回日本栄養・食糧学会大会、2008 年 5 月 2~4 日、埼玉県坂戸市

佐藤由貴江、森永八江、藤田修三、佐藤 伸、

リグノフェノールが脳卒中易発症ラット (SHRSP)の血圧上昇に及ぼす影響、2006 年度青森県保健医療福祉研究発表会、2007 年 2 月 16 日、青森市

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森永 八江 (MORINAGA YAE)  
青森県立保健大学・健康科学部・助手  
研究者番号：40404818

(2) 研究分担者

佐藤 伸 (SHIN SATO)  
青森県立保健大学・健康科学部・教授  
研究者番号：40310099

藤田 修三 (SYUZO FUJITA)  
青森県立保健大学・健康科学部・教授  
研究者番号：20173429

(3) 連携研究者

なし