

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 5 月 21 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590663

研究課題名（和文）緑葉野菜に含まれる硝酸塩の摂取による虚血性脳障害予防に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Preventive effects of nitrate against ischemic brain injury.

研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：50272901

研究成果の概要（和文）：近年，食事で野菜を多く摂取する習慣が虚血性組織障害を軽減する可能性が示されている。野菜に含まれる硝酸塩が体内で亜硝酸塩となって貯蔵され，虚血時に一酸化窒素に変換されて保護作用を示すというものである。本研究において，ラットに中大脳動脈閉塞再灌流処置を行い，その直後に亜硝酸塩を静脈内投与すると，脳梗塞巣体積および脳浮腫の有意な減少が認められた。また，亜硝酸塩の長期経口摂取は，両側総頸動脈永久閉塞ラットにおける嚥下反射機能障害を軽減した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated whether nitrite exerts protective effects against ischemic brain injury induced by middle cerebral artery occlusion following reperfusion (MCAO/Re) or by chronic cerebral hypoperfusion (2VO) in rats. We found that infarct volume, edema, and the number of apoptotic cells in the rat brain determined after MCAO/Re were reduced by intravenous injection of nitrite. Chronic supplementation of nitrite improved the swallowing reflex in the 2VO rats. These results suggest that dietary supplementation of nitrite may relieve the ischemic brain injury and post-stroke dysphagia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）・代替医療

キーワード：亜硝酸塩，虚血性脳障害，一酸化窒素，嚥下障害，ラット

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳障害は，動脈硬化等が原因で脳に

酸素や栄養分を送る動脈が閉塞して生じる脳組織の循環障害であり，その代表的な疾患

として脳梗塞がある。脳梗塞発作が生じた際、処置が遅れるほど症状は重篤化し致死的になり、命を取りとめた場合でも半身の運動麻痺や摂食嚥下障害などの後遺症が患者の残りの生涯のQOLを著しく低下させる。また、脳細胞はきわめて虚血に脆弱であるため、脳梗塞に至る前段階の軽い脳虚血発作（一過性脳虚血発作）であっても、記憶に重要な海馬の神経細胞が損傷し、認知症等の原因となる。このように、脳梗塞をはじめとした脳虚血障害は介護が必要となる疾患の代表であり、その対策が急がれている。

近年、食事で野菜を多く摂取する習慣が虚血性組織障害を軽減する可能性が示されている。野菜に含まれる硝酸塩が口腔内の細菌によって亜硝酸塩となって組織に貯蔵され、虚血時に一酸化窒素（NO）に変換されることにより、血流を増加させて組織の保護に働くというものである。地中海式食事法が比較的脂質を多く含むにもかかわらず、虚血性心疾患の発症割合を低下させている理由としても、野菜からの硝酸塩の摂取が挙げられている。1980年代後半から注目されてきたNOは、血管内皮細胞において産生され強力な血管拡張作用を有する情報伝達物質として心血管系の機能維持に重要な役割を担っている。アテローム性動脈硬化症においては、動脈の内皮細胞の損傷によってNOの産生が減少し、これが心筋梗塞や脳卒中発作の原因となることが明らかになっている。したがって、硝酸塩を多く含む緑葉野菜やサプリメントの摂取によって、虚血性脳疾患の予防や障害の軽減できる可能性が考えられる。

申請者らは、これまでに様々な食品や食品成分の虚血性脳障害に対する保護作用を明らかにしてきた経緯から、亜硝酸塩・硝酸塩の摂取による脳保護効果について科学的に検証するという今回の研究テーマを着想するに至った。

2. 研究の目的

硝酸塩による細胞保護作用は、体内で亜硝酸塩から産生されたNOに由来するものと推

察されるが、脳内NO動態に与える影響や脳保護メカニズムの詳細は明らかではない。また、硝酸塩を緑葉野菜やサプリメントから摂取した場合の有効性や適切な摂取量等の具体的な知見は皆無である。そこで、本研究では、まず虚血性脳障害に対する亜硝酸塩の脳保護効果とそのメカニズムについて動物実験により検討することとした。有効な亜硝酸塩の用量を明らかにした上で、体内における変換率から硝酸塩の用量を推定し、その効果について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける亜硝酸塩の脳保護効果の検討

① モデルの作製と障害の評価：麻酔下、ラットに中大脳動脈閉塞再灌流処置

（MCAO/Re）を施し、亜硝酸塩（1.25-25 $\mu\text{mol/kg}$ ）を虚血直前または再灌流直後の2種類のタイミングで静脈内投与し、再灌流24時間後に神経症状をスコア化した。摘出した脳の組織サンプルを用いて、脳梗塞領域の定量、ヘマトキシリン・エオシン染色、TUNEL染色を行い、虚血による脳障害レベルを評価した。

② 脳血流量および脳内NO動態の同時測定：麻酔下のラットを脳定位固定装置に固定し、レーザードップラー式血流計のプロンプをラット側頭部頭蓋表面に取り付け、さらにNO分圧測定用電極を脳内に刺入し、局所の脳組織内の血流量およびNO動態をリアルタイムに同時測定し、これらの測定項目が亜硝酸塩の静脈内投与によってどのように変化するかについて検討した。

(2) ラット慢性脳低灌流モデルにおける亜硝酸塩長期経口摂取の脳保護効果の検討

① モデルの作製と障害の評価：麻酔下でラットの両側総頸動脈を永久結紮（2VO）し、慢性脳低灌流モデルを作製した。亜硝酸塩

（50 mg/L）は飲料水に溶解し、2VO処置の1週間前から処置後2週間まで計3週間、ラットに自由摂取させた。この間、ラットの血圧を、無麻酔無加温型非観血式血圧計を用いて

経時的に測定した。また、レーザードップラー血流計を用い、脳血流量を測定した。その後、脳を摘出し、組織染色によって虚血性脳障害の評価を行った。また、線条体での tyrosine hydroxylase (TH) の発現を免疫組織染色により調査した。

摂取された硝酸塩の 5% が体内で亜硝酸塩に変換されるとの報告があることから、硝酸塩は 1 g/L の濃度で亜硝酸塩と同様にラットに摂取させた。硝酸塩については、後述の嚔下機能障害に対する効果のみ検討を行った。

② 嚔下反射機能の測定

Kajii ら (2002) の方法を参考に、ウレタン麻酔したラットを背位に固定し、頸部を正中切開して気管および食道にカニューレを挿入した。刺激液注入用チューブの先端を喉頭蓋の近傍に固定し、刺激液 (水、クエン酸、カプサイシン) をシリンジポンプを用いて 3.3 $\mu\text{L}/\text{sec}$ 、15 秒間 (計 50 μL) 注入し、嚔下を誘発させた。誘発された嚔下反射は、顎舌骨筋から双極導出した筋電図にて記録し嚔下回数を計測した。

③ 虚血処置前後における脳組織中および血中の硝酸塩および亜硝酸塩含量の測定

脳組織中の硝酸塩・亜硝酸塩を定量し、亜硝酸塩摂取によりこれらの物質が組織に蓄積されるのか、虚血時に NO となり消費されるのかについて検証した。2VO 処置直前および 2VO 処置 24 時間後に線条体を摘出し、NO₂/NO₃ Assay Kit-FX (同仁化学) を用いて亜硝酸塩および硝酸塩含量を測定した。

4. 研究成果

(1) ラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける亜硝酸塩の脳保護効果

脳虚血を起こした直後に亜硝酸塩を静脈内投与すると、12.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量において脳梗塞巣体積および脳浮腫の有意な減少が認められた (Fig. 1)。また、同用量の亜硝酸塩は、大脳皮質や線条体の虚血周辺部において TUNNEL 陽性細胞数を有意に減少させた。一方、12.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ より低用量 (1.25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) および高用量 (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) ではこれらの脳

保護効果は消失した。また、亜硝酸塩を再灌流後に投与した場合は、どの用量においても脳保護効果は認められなかった。

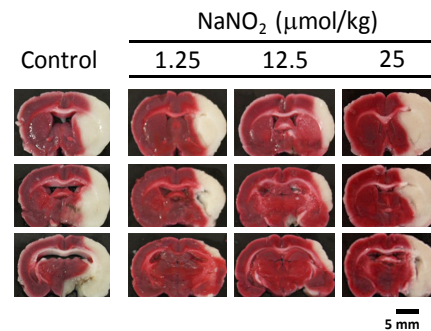


Fig. 1 MCAO/Re 処置による脳梗塞巣と亜硝酸塩投与の効果

12.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の亜硝酸投与による大脳皮質内の NO 濃度変化を NO 電極によって測定したところ、持続的な NO 濃度の上昇とこれに伴う脳血流量の増加が見られた。

以上の研究結果より、脳の虚血再灌流障害に対して亜硝酸塩が細胞保護作用を有することが推測されるものの、投与のタイミングおよび投与量によって現れる効果が異なることが明らかになった。

(2) ラット慢性脳低灌流モデルにおける亜硝酸塩長期経口摂取による脳保護効果

亜硝酸塩の急性投与による虚血性脳障害抑制効果についての知見が得られたため、次に、慢性脳低灌流モデルを用いて長期経口摂取の脳保護効果について検討を行った。

亜硝酸塩の長期摂取による血圧の変化は認められず、また、2VO 処置は血圧に影響しなかった。脳血流量は、2VO 処置により 50% 程度まで減少した。亜硝酸塩を経口摂取させたラットでは 2VO 処置直後の血流の減少度が小さい傾向がみられ、2 週間後の脳血流は亜硝酸塩を経口摂取させないラットと比較し有意に改善した。

組織学的検討から、2VO ラットの脳組織では、広範囲にわたって虚血性障害が生じていることが明らかとなった。亜硝酸塩は、線条体や視索、体性感覚野における障害を改善した。しかし、脳梁および海馬 CA1 の障害は改善されず、この違いは各部位の虚血に対す

る脆弱性の差異によると考えられた (表 1)。

また、組織染色の結果から、2VO ラットでは線条体における脳細胞死および TH 発現の低下が認められた。

表 1 慢性脳低灌流ラットの脳障害と亜硝酸塩の効果

観察部位	Sham	2VO-Water	2VO-NaNO ₂
体性感覚野	±	+++	++
海馬 CA1	±	++	++
線条体	±	+++	+
視索	±	+++	+
脳梁	±	±	±

障害の程度: ± 障害なし + 軽度 ++ 中等度 +++ 高度

2VO ラットでは、各種刺激液に対する嚔下反射機能の低下が認められた。3 週間の亜硝酸塩の経口摂取は、これらの障害を軽減した (Fig. 2)。一方、データは示さないが、硝酸塩 (1 g/L) は有意な効果を示さなかった。

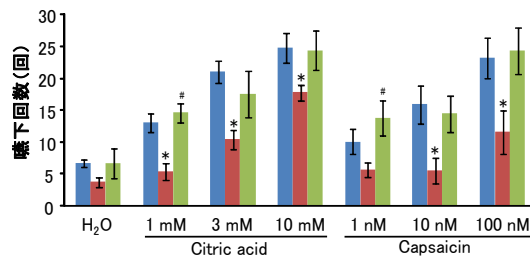


Fig. 2 2VO ラットにおける嚔下障害と亜硝酸塩投与の効果 (青: 擬手術群, 赤: 2VO 群, 緑: 2VO+亜硝酸塩群)

線条体組織中の亜硝酸塩量を測定したところ、2VO 処置前の亜硝酸塩摂取群の含量は、対照群の約 2 倍であった。2VO 処置後の亜硝酸塩含量は、処置前と比較し、両群において低下傾向が見られた。硝酸塩含量には群間、処置前後の差は認められなかった。これらの結果から、亜硝酸塩の継続的な摂取により、亜硝酸塩が脳組織に蓄積し、虚血によって消費されることが示唆された。

NO の虚血性障害に対する保護作用メカニズムとして、血管拡張作用、ラジカル発生抑制作用などが考えられる。本研究結果から、亜硝酸塩の継続的な摂取により、亜硝酸塩が脳組織に蓄積することが明らかとなった。ま

た、2VO 処置により組織中の亜硝酸塩が NO に変換・消費され、生じた NO が血流の補給を介して脳保護効果を示す可能性が示された。嚔下反射や咳反射に重要な伝達物質であるサブスタンス P の合成は、黒質-線条体系において生合成されるドパミンにより促進されることが報告されている。2VO ラットでは、脳虚血により黒質-線条体系ニューロンが障害され、ドパミン産生が減少し、サブスタンス P による反射シグナルが低下し、嚔下障害が生じると考えられる。亜硝酸塩は、2VO 処置による TH 発現量とドパミン含量の低下を共に抑制したことから、黒質-線条体系の障害を軽減することによって嚔下反射機能を維持したと考えられる。

以上、本研究結果より、亜硝酸塩はラットにおいて虚血または慢性脳低灌流による脳組織障害を軽減した。また、慢性脳低灌流による嚔下機能障害を抑制することが示唆された。今後は、本研究で明らかになった脳保護効果を示す亜硝酸塩摂取量に対応する硝酸塩および緑葉野菜の量を検討し、これらの摂取による効果およびそのメカニズムを解明する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Okazaki M., Iwata N., Takamura E., Kamiuchi S., Hibino Y.: Intravenous administration of sodium nitrite alleviates ischemia/reperfusion-induced cerebral injury in nondiabetic rats but not in diabetic rats. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, July, 2010, Copenhagen.
- ② Iwata N., Okazaki M., Takamura E., Kamiuchi S., Matsuzaki H., Hibino Y.: 正常血糖および糖尿病態ラットの虚血性脳障害に対する亜硝酸ナトリウムの効果 Effects of sodium nitrite on

ischemia/reperfusion-induced cerebral injury in non-diabetic and diabetic rats. 第85回日本薬理学会年会 2012/3/14~3/16 京都

- ③ Matsuzaki H., Toya E., Maruoka F., Hinami Y., Iwata N., Hibino Y., Okazaki M.: 亜硝酸塩の摂取は慢性脳低灌流による嚥下障害を改善させる Dietary supplementation of nitrite improves swallowing dysfunction induced by permanent bilateral common carotid artery occlusion in rats. 第85回日本薬理学会年会 2012年3月14日~16日 京都
- ④ 松崎 広和, 戸谷 英里佳, 丸岡 史佳, 日南 結子, 岩田 直洋, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流モデルラットの嚥下障害に対する亜硝酸塩の効果 第14回日本補完代替医療学会学術集会 平成23年11月5日, 6日 石川
- ⑤ 日南 結子, 松崎 広和, 戸谷 英里佳, 丸岡 史佳, 中里 友紀, 長島 かほり, 日比野 康英, 岡崎 真理: 両側総頸動脈永久結紮処置ラットの嚥下障害に対する亜硝酸塩摂取の効果 第15回日本補完代替医療学会学術集会 2012年11月17日, 18日 東京
- ⑥ 青柳 希実子, 松崎 広和, 木村 奈緒子, 木曾 友美子, 中田 由佳里, 加登 彩花, 日比野 康英, 岡崎 真理: 学習障害モデルラットに対するフェルラ酸の効果 第15回日本補完代替医療学会学術集会 2012年11月17日, 18日 東京
- ⑦ Matsuzaki H., Aoyagi K., Kimura N., Kiso Y., Nakata Y., Kato S., Iwata N., Hibino Y., Okazaki M.: Ferulic acid inhibits learning and memory impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. 第86回日本薬理学会年会 2013年3月21日~23日 福岡
- ⑧ 日南 結子, 松崎 広和, 戸谷 英里佳, 丸岡 史佳, 中里 友紀, 長島 かほり, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流による嚥下障害に対する亜硝酸塩摂取の効果 第133回日本薬学会大会 2013年3月27日~30日 横

浜

- ⑨ 中里 友紀, 松崎 広和, 長島 かほり, 日南 結子, 戸谷 英里佳, 丸岡 史佳, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットにおける亜硝酸塩の脳保護効果に関する組織学的検討 第133回日本薬学会大会 2013年3月27日~30日 横浜
- ⑩ 浅野 昂志, 松崎 広和, 横瀬 裕太, 日南 結子, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットにおける嚥下機能障害に対するフェルラ酸の効果 第133回日本薬学会大会 2013年3月27日~30日 横浜
- ⑪ 青柳 希実子, 松崎 広和, 木村 奈緒子, 木曾 友美子, 中田 由佳里, 加登 彩花, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流モデルラットの記憶学習障害に対するフェルラ酸の効果 第133回日本薬学会大会 2013年3月27日~30日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50272901

(2) 研究分担者

松崎 広和 (MATSUZAKI HIROKAZU)
城西大学・薬学部・助手
研究者番号: 80582238

日比野 康英 (HIBINO YASUhide)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号: 10189805

神内 伸也 (KAMIUCHI SHINYA)
城西大学・薬学部・助教
研究者番号: 80433647

岩田 直洋 (IWATA NAOHIRO)
城西大学・薬学部・助手
研究者番号: 50552759