

平成 29 年度

神戸女子大学大学院家政学研究科

修士論文要旨

腎血管性高血圧ラットにおける Ginger Extract と食酢の 同時摂取による血圧上昇抑制効果の検討

博士前期課程 食物栄養学専攻 齊藤夏実

【背景・目的】

ショウガは保存食や香辛料、生薬として広範に亘って用いられてきた。特に、gingerol はショウガの辛味成分のうち最も多く、そのうち 6-gingerol が最も豊富に含まれている。当研究室ではこれまでに、腎血管性高血圧モデルラットにおいて ginger extract (GE) の継続的経口摂取が血圧上昇を抑制すること、gingerol と類似構造を持つ capsaicin の継続的経口摂取が血圧上昇を抑制し、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が増加傾向を示すことを確認している。高血圧自然発症ラットでは capsaicin が内皮細胞の The transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) を直接刺激し、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、Protein kinase B (Akt) を活性化させ、eNOS を活性化させることが報告されている。また、食酢は eNOS を活性化させ一酸化窒素 (NO) の産生が増加させることが報告されている。これより本研究では、ショウガと食酢の単独摂取に対して同時摂取による血圧上昇抑制効果について比較検討した。

実験 1 では 0.08% (w/w) GE と食酢の同時摂取が血圧上昇抑制効果を増強する可能性について検討を行ったが、GE の単独摂取と比べ有意な差がなく、食酢との同時摂取による有意な相加効果は確認できなかった。その理由として、実験 1 では GE の濃度が高かったと考えられたので、実験 2 では投与量を 0.04% (w/w) に下げ、食酢と同時摂取することでその効果の増強について検討した。さらに実験 3 では GE と食酢の同時摂取による血圧上昇抑制のメカニズムとして、PI3K-Akt-eNOS 経路が関与しているかそれぞれの mRNA 量を測定し、血管拡張因子である NO 産生量を測定した。

【方法】

実験動物として、6 週齢の SD 系雄性ラットを、麻酔下にて左腎臓動脈にクリップを設置した腎血管性高血圧モデル (2K1C) 群と、対照として偽手術 (SHAM) 群を用いた。実験飼料は、標準粉末飼料 (CTL) または CTL に対して 6-gingerol を 28% 含有した GE を 0.08% (実験 1)、0.04% (実験 2) (w/w) 添加した (GE 食)。飲水は水道水 (Veh) または水道水に食酢を 4.5% (v/v) 添加した (Vin)。SHAM 群には CTL+Veh を与え、2K1C はそれぞれ CTL+Veh、CTL+Vin、GE+Veh、GE+Vin を与えた 4 つの群に分けて検討した。実験期間中、毎週 tail-cuff 法による収縮期血圧 (SBP) 測定を行い、実験終了時に平均血圧 (MAP) の測定を行った。実験 3 では、胸部大動脈より real time RT-PCR 法にて PI3K、Akt、eNOS mRNA の発現量の測定を行い、血清サンプルより NO₂/NO₃ 量を測定した。

【結果・考察】

実験 1 では、2K1C-CTL+Veh 群の SBP と MAP は SHAM-CTL+Veh 群に比べて有意に高い値を示した。2K1C-GE+Veh 群の SBP、MAP は 2K1C-CTL+Veh 群に比べて有意に低い

値を示した。2K1C-CTL+Vin 群の SBP は 2K1C-CTL+Veh 群に比べて有意に低い値を示した。0.08% (w/w) GE と食酢の同時摂取について、2K1C-GE+Vin 群の SBP、MAP は 2K1C-CTL+Vin 群に比べて有意に低い値を示し、2K1C-GE+Veh 群の SBP、MAP は 2K1C-GE+Vin 群に比べて有意な差はなかった。これより、0.08% (w/w) GE は血圧上昇を強く抑制し、食酢との効果を観察することができなかつたと考えられた。

そこで GE の濃度を低下させた実験 2 では、SBP、MAP 共に同様の傾向を示したが、0.04% (w/w) GE と食酢の同時摂取では GE、食酢それぞれの単独摂取よりも有意に血圧上昇を抑制した。これより GE と食酢の同時摂取では血圧上昇抑制の相加効果が確認された。

実験 3 では GE と食酢の血圧上昇抑制のメカニズムとして、PI3K-Akt-eNOS 経路について検討した。それぞれ関与する mRNA 量を測定したところ、2K1C-GE+Veh 群の PI3K、Akt mRNA 量は 2K1C-GE+Vin 群に比べて有意に低い値を示し、その他の群では PI3K、Akt mRNA 量に有意な差はなかった。2K1C-GE+Veh 群の eNOS mRNA 量は 2K1C-CTL+Veh 群に比べて有意に高い値を示し、2K1C-CTL+Vin 群は 2K1C-CTL+Veh 群に比べて有意ではないものの低い傾向を示した。また、GE と食酢の同時摂取について、2K1C-GE+Vin 群の eNOS mRNA 量は 2K1C-CTL+Vin 群に比べて有意に高い値を示したが、2K1C-GE+Veh 群に比べると有意に低い値となり、同時摂取による相加効果は見られなかった。さらに血清中 NO₂/NO₃ 量は、2K1C-CTL+Veh 群に比べて 2K1C-GE+Veh 群で有意に高い値を示したが、その他の群では変化はなかった。これより、GE 摂取による血圧上昇抑制のメカニズムは PI3K、Akt を介さずに eNOS mRNA 量を増加させ、NO 産生を増加させることで血管拡張を引き起こしていると考えられる。また、食酢による血圧上昇抑制のメカニズムには PI3K-Akt-eNOS 経路を介した NO 産生の関与は認められず、その他の経路を介して血圧上昇抑制を行っていると考えられる。

【結論】

2K1C モデルラットにおいて、0.08% (w/w) GE と食酢の同時摂取は有意な血圧上昇抑制は見られなかった。また、2K1C モデルラットにおいて、0.04% (w/w) GE と食酢の同時摂取はそれぞれの単独摂取に比べて血圧上昇抑制の相加効果が見られた。GE 摂取による血圧上昇抑制のメカニズムは、eNOS を介した NO 産生の増加が関与していることが示唆されたが、PI3K、Akt の関与は認められなかった。また、食酢摂取による血圧上昇抑制のメカニズムとして PI3K-Akt-eNOS 経路の関与は認められなかった。

食物繊維摂取による発生部位別大腸癌の予防効果

—メタアナリシスを用いた検討—

博士前期課程 食物栄養学専攻 千家梨華

【背景・目的】

食物繊維は、人間の消化酵素によって加水分解されない食物中の難消化成分の総称である。1970年代バーキット氏が、食物繊維摂取量が多いアフリカ人では大腸癌が少ないことを報告して以来、食物繊維摂取による大腸癌の予防効果に関する研究がすすめられている。In vitroの実験では、食物繊維は発癌物質を吸着することが示されている。また動物実験では、腸内細菌が産生した短鎖脂肪酸が癌細胞のアポトーシスを増加させるなど、食物繊維が大腸癌予防に関与するという報告がある。一方、食物繊維摂取量と大腸癌発症率との関連を調べたコホート研究では、食物繊維摂取量増加に伴いリスクが減少したというものと変化が無いというものがあり、結論がでていない。結論が得られない理由として、私たちは食物繊維の大腸癌の発生部位によって予防効果が異なるという仮説をたてた。食物繊維と部位別の発症率との関連を調べた研究はいくつか行われているが、有意性の有無について未だに議論が続いている。しかし、大腸癌は発生しやすい位置と発生しにくい位置があることが知られており、食物繊維の予防効果も大腸癌が発生する位置によって異なる可能性がある。そこで、今までの食物繊維摂取量と大腸癌発症率との関連を調べたコホート研究をまとめてメタアナリシスを行うことによって、大腸癌発生部位による予防効果の差異の検討を行った。

【方法】

PubMedにより、1970～2017年6月までに発表された食物繊維摂取量と大腸癌発症率との関係を調べた論文を検索した。研究のデザインをコホート研究(33)に限定し、摂取量別に群分けがされており、群ごとの患者数、非患者の人年数、相対リスクが報告されている論文(20)を選択した。これらのデータを用いて、用量反応メタアナリシスを行った。分析には統計ソフトR (version 3.4.2)のパッケージ dosresmeta を使用し、食物繊維摂取量と大腸全体および部位別、男女別での癌発症率を検討した。出版バイアスの有無はRのパッケージ metafor を使用し分析した。食物繊維摂取量に対応する大腸癌リスクはすべて一日当たり10gの増加ごとのリスク変化として再計算した。

【結果】

食物繊維摂取量の増加に伴って大腸癌全体のリスクが減少した。一日当たり10gの増加ごとの大腸癌全体での相対リスクは0.92(信頼区間:0.89-0.94)であり有意なリスクの減少が見られた。部位別での発症リスクを検討したところ、近位結腸癌では0.97(0.92-1.02)、遠位結腸癌では0.88(0.83-0.94)、直腸癌では0.95(0.87-1.03)であった。遠位結腸癌では有意に発生率が低下したが、近位結腸癌、直腸癌では有意なリスクの減少は見られず、部位別で発生率の抑制効果が異なった。

次に男女別での発症リスクを検討したところ、男性では0.92(0.88-0.97)、女性では0.91

(0.88-0.95)であった。男女共に有意なリスクの減少が見られ、リスクの減少率に差は見られなかった。

【考察】

食物繊維の大腸癌抑制効果は癌が発生した部位によって異なる可能性がある。これまでのコホート研究で結果が一致しなかった理由として、食物繊維の効果が大腸の部位によって異なるため、リスク減少率が低い近位結腸癌、直腸癌の発生が多いコホートでは、有意な減少が見られにくくなることが予測される。食物繊維の大腸癌全体の予防メカニズムとしては、食物繊維の発癌物質吸着効果と便容積増大による排便の促進が示唆されている。大腸内の発癌物質が速やかに体外に排出されることで、発癌物質と大腸粘膜との接触時間が短くなり、発癌が抑えられた可能性がある。遠位結腸は、近位結腸に比べて便の通過時間が長いことが報告されている。そのため遠位結腸は発癌物質と大腸粘膜との接触時間が長いことが予想される。食物繊維を多く摂取することで遠位結腸に発癌物質が接触する時間が短くなり、発癌が抑えられた可能性が考えられた。

【結論】

食物繊維による大腸癌予防効果は、性別で差は見られないが、部位別では差が見られた。

ヘスペリジンの継続的経口摂取による血圧上昇抑制効果の

メカニズムの検討

博士前期課程 食物栄養学専攻 山岡結奈

【背景・目的】

ヘスペリジンはフラボノイド骨格を持つポリフェノールの一種で、かんきつ類の果皮などに多く含まれ、漢方薬である陳皮の有効成分としても知られている。ヘスペリジンは、抗酸化作用、脂質代謝改善作用などの生理作用を持つことが知られている。高血圧自然発症モデルラットを用いた実験においてヘスペリジンの慢性経口投与によって血圧降下作用が観察され、その作用に一酸化窒素 (NO) が関与していることが示唆されている。しかし、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

そこで本研究では、腎血管性高血圧 (2-kidney, 1-clip Goldblatt hypertension; 2K1C) モデルラットを用いて、ヘスペリジンの経口摂取が血圧に与える影響を観察した。また、その作用機序として NO の関与を調べるために、非選択的 NO 合成酵素阻害剤 (NG-Nitro-L-arginine methyl ester; L-NAME) 投与下でのヘスペリジンの経口摂取が血圧に及ぼす影響について観察するとともに、eNOS mRNA の発現量と血清中の NO₂/NO₃ を測定した。

【方法】

1. ヘスペリジンの経口摂取が血圧へ及ぼす影響の検討

予備飼育後、6 週齢時の SD 系雄ラットを用いて、麻酔下にて腎血管性高血圧モデルラット (2K1C) 群と、偽手術モデル (SHAM) 群を作成した。手術終了後、SHAM 群、2K1C 群に、コントロール食 (CTL) または 0.1% (w/w) ヘスペリジン添加食 (HES) をそれぞれ 6 週間摂取させた。飼料投与期間中、週 1 回 tail-cuff 法にて収縮期血圧 (SBP) を測定した。飼料投与期間終了時、麻酔下にて平均血圧 (MAP) の測定を行ない、脱血死させた後、腹部大動脈を摘出した。統計分析は分散分析および t 検定を行い、実験データは各群の平均値 ± 標準誤差 (SE) で表し、有意水準は 0.05 未満とした。

2. ヘスペリジンの血圧上昇抑制作用機序の検討

予備飼育後、6 週齢時の SD 系雄ラットを用いて麻酔下にて 2K1C 群と SHAM 群を作成した。手術終了後、SHAM 群、2K1C 群それぞれに、コントロール食 (CTL) または 0.1% (w/w) ヘスペリジン添加食 (HES) 及び、水道水 (Vehicle; Veh) または、L-NAME 添加水 (LN) をそれぞれ 6 週間摂取させた。L-NAME 添加水は L-NAME を水道水に 0.2g/L の濃度で調整した。飼料・飲水投与期間中、週 1 回 tail-cuff 法にて収縮期血圧 (SBP) を測定した。飼育期間終了時、麻酔下にて平均血圧 (MAP) の測定を行なった。また、実験 1 で得られた大動脈より RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により各群の eNOS mRNA 発現量の観察を行うとともに、血清中の NO₂/NO₃ の測定を行なった。統計分析は実験 1 と同様の方法で行なっ

た。

【結果】

1. ヘスペリジンの経口摂取が血圧へ及ぼす影響の検討

飼料投与期間を通して 2K1C-CTL 群の SBP は SHAM-CTL 群と比較して有意な上昇を示した ($p<0.001$)。一方ヘスペリジン摂取させた、2K1C-HES 群は 2K1C-CTL 群と比較して有意な低下を示した ($p<0.001$)。また SHAM-HES 群と SHAM-CTL 群では有意差は見られなかった。

最終週の SBP において、2K1C-CTL 群は SHAM-CTL 群と比較して有意に高い値を示した (170 ± 6 mmHg vs 117 ± 6 mmHg, $p<0.001$)。また、2K1C-CTL 群と比較して 2K1C-HES 群 (141 ± 4 mmHg) は有意に低い値となった ($p<0.01$)。2K1C-HES 群は SHAM-HES 群 (122 ± 7 mmHg) と比較して有意に高い値となった ($p<0.05$)。

麻酔下で測定した MAP の結果からは、SBP と同様に 2K1C-CTL 群は SHAM-CTL 群と比較して有意な血圧上昇が観察できた (143 ± 5 mmHg vs 126 ± 5 mmHg, $p<0.05$)。しかし、2K1C-HES 群 (135 ± 9 mmHg) は 2K1C-CTL 群と比較して有意差を示さなかった。

2. ヘスペリジンの血圧上昇抑制作用機序の検討

2K1C-CTL-Veh 群の収縮期血圧は実験 1 と同様、SHAM-CTL-Veh 群と比較して、有意に上昇した ($p<0.001$) のに対し、ヘスペリジンを与えた 2K1C-HES-Veh 群は、2K1C-CTL-Veh 群と比較すると血圧の上昇が有意に抑制された ($p<0.05$)。L-NAME を投与した SHAM-CTL-LN 群の収縮期血圧は SHAM-CTL-Veh 群と比較して有意に上昇し ($p<0.001$)、さらに 2K1C-CTL-LN 群は SHAM-CTL-LN 群と比較して有意に血圧が上昇した ($p<0.05$)。一方、ヘスペリジンを与えた 2K1C-HES-LN 群は、2K1C-CTL-LN 群と比較しても SBP に有意な差はみられず、ヘスペリジンによる血圧上昇抑制は観察されなかった。なお、SHAM 群に L-NAME を投与した場合においても SHAM-CTL-LN 群と SHAM-HES-LN 群の SBP に有意な差は見られなかった。

麻酔下で測定した MAP の結果からは、SBP と同様に 2K1C-CTL 群は SHAM-CTL 群と比較して有意な血圧上昇が観察できた (162 ± 6 mmHg vs 135 ± 4 mmHg, $p<0.05$)。2K1C-HES 群 (147 ± 3 mmHg) は 2K1C-CTL 群と比較して、有意ではなかったが、血圧の抑制傾向が観察された。L-NAME を投与した場合には、この抑制傾向は観察されなかった。

real time RT-PCR 法による各群の eNOS mRNA 発現量では、二元配置分散分析を行った結果、SHAM 群に比べ 2K1C 群は有意に高い値を示した ($p<0.05$) が、CTL 群と HES 群間に有意差は見られなかった。血清中の NO_2/NO_3 においては各群に有意差は見られなかった。

【考察】

SBP において Veh 群で観察された血圧上昇抑制は L-NAME 存在下では観察されないことから、ヘスペリジンの摂取による血圧抑制作用には NO が関与している可能性が示された。eNOS mRNA 発現量と血清中の NO_2/NO_3 においては各群に有意差は見られなかった。今後は eNOS の活性状態の観察を行ない、ヘスペリジンの血圧上昇抑制作用の機序についてさらに検討を進めていきたい。

【結論】

2K1C モデルラットにおいて、ヘスペリジンの継続的経口摂取は血圧上昇を抑制し、その作用機序に NO が関与している可能性が示唆された。

グルコースによる分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 輸送体遺伝子の 発現調節に関する研究

博士前期課程 食物栄養学専攻 山本優

【背景・目的】

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は、S6 kinase のリン酸化等を介して筋タンパク合成を促進するだけでなく、筋タンパク分解をも抑制し、様々な筋萎縮を抑制する。LAT1 は BCAA をはじめとする種々の中性アミノ酸のトランスポーターであるが、筋特異的 LAT1 ノックアウトマウスの骨格筋では、ロイシンによる S6 kinase リン酸化が抑制されているとの報告があり、BCAA 作用における LAT1 の重要性が指摘されている。

一方、糖尿病のヒトやマウスにおいて、血漿 BCAA は増加しているにもかかわらず、筋萎縮が見られることから、糖尿病では筋萎縮に対して BCAA が十分に作用していない可能性がある。またラット網膜毛細血管内皮細胞株において、LAT1 mRNA 量はグルコースにより低下するとの報告があることから、糖尿病では、骨格筋の LAT1 発現が減少し、筋細胞内への BCAA 取り込みが減少することにより、BCAA の効果が発揮されず、筋萎縮が引き起こされている可能性が考えられる。そこで実際に、骨格筋においても LAT1 mRNA 発現がグルコースによって調節されるのか、マウス筋細胞 C2C12 細胞を用いて検討した。

【方法】

細胞培養

10%牛胎児血清、ペニシリン G カリウム (100 µg/mL)、カナマイシン (15.5 µg/mL)、22.2 mM グルコースを含む Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM) を用いて、マウス筋細胞株 C2C12 細胞を 6 穴プレートもしくは 12 穴プレートで 80~100%コンフルエントになるまで培養したのち、メディアウムを 2%馬血清、ペニシリン G カリウム (100 µg/mL)、カナマイシン (15.5 µg/mL)、22.2 mM グルコースを含む DMEM (分化メディアウム) に置換した。その後、毎日、分化メディアウムを交換、5 日後に筋管細胞を形成させた。

1) 各種糖質の LAT1 mRNA 量に及ぼす効果

C2C12 筋管細胞もしくは未分化 C2C12 細胞のメディアウムを、グルコース、フルクトース、マンニトール、ガラクトース、あるいは 2-デオキシグルコース (400 mg/dL) を含む DMEM に変更、6 時間後にこの C2C12 細胞から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。2 µg の total RNA を用いて逆転写反応を行い、得られた cDNA をテンプレートとし、Thunderbird SYBR PCR Mix を使用して、LAT1 もしくは 4F2hc、SNAT2 mRNA 量を測定した。

2) AMPK 阻害薬、AMPK 活性化薬の LAT1 mRNA 量に及ぼす効果

400 mg/dL グルコース存在下、あるいは非存在下で、未分化 C2C12 細胞のメディアウムに AMPK 阻害薬である Dorsomorphin (20 mM) 、あるいは AMPK 活性化薬である AICAR (0.5 mM) を添加した。6 時間後に、1) と同様の方法で、LAT1 mRNA を測定した。また

AICAR と別の経路で AMPK を活性化させるメトホルミン (0.5 mM、5 mM) の LAT1 mRNA 量に及ぼす効果を検討した。

3) グルコースの AMPK リン酸化に及ぼす効果

未分化 C2C12 細胞のメディアウムに 400 mg/dL グルコースを添加後、6 時間培養を継続した。その後、界面活性剤、タンパク質分解酵素阻害薬、脱リン酸化酵素阻害薬等を含む可溶化緩衝液で分化 C2C12 細胞を溶解し、サンプルを調製した。タンパク質 45 μ g を含むサンプルを、SDS-PAGE で分離し、次いでメンブレンに転写した。Blocking One または Blocking One-P (Nacalai Tesque) で 30 分間ブロッキングした後、4°C で一次抗体とともに一晩インキュベートし、2 次抗体と共に室温で 2 時間インキュベートした。Amersham ECL Prime ウェスタンブロットニング検出試薬 (GE Healthcare) を用いて特異的バンド強度を検出し、Multi Gauge ソフトウェア (バージョン 3.0; Fujifilm) を使用し LAS-3000 Mini で定量した。なお、1 次抗体には、 α -tubulin、AMPK α 、phospho-AMPK α (Thr172)、2 次抗体には horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody、horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody を使用した。

【結果】

グルコースを含む培地で未分化、分化 C2C12 細胞をそれぞれ培養し、LAT1 及び LAT1 活性に関わる 4F2hc、SNAT2 の mRNA 量を測定したところ、グルコース無添加培地に比べ、LAT1 及び SNAT2 mRNA は減少した。4F2hc mRNA は減少傾向にあった。LAT1 mRNA の減少効果は、細胞内に輸送されないマンニトール、代謝されない 2-デオキシグルコースでは見られなかった。フルクトースはグルコースと同様の効果を示したが、ガラクトースではその効果が見られなかった。以上の結果から、細胞内 ATP 量と LAT1 mRNA 量の関連が示唆されたため、ATP/AMP 比によって活性が制御される AMPK の関与を考えた。

予想したように、AMPK 阻害剤である Dorsomorphin を加えたところ、グルコース非存在下であっても LAT1 mRNA 量は減少した。AMPK の活性化薬である AICAR を添加したところ、グルコース存在下においても LAT1 mRNA 量は増加した。AICAR と別の経路で AMPK を活性化させるメトホルミンによっても LAT1 mRNA 量の増加が見られた。また実際に、この実験条件において、グルコースは AMPK のリン酸化(活性化)を減弱させていた。

【考察】

今回の結果は、グルコースが C2C12 細胞中の AMPK を不活性化し、LAT1 mRNA 発現量を低下させた可能性を示唆している。この結果から検討すると、糖尿病患者では、高血糖により AMPK が不活性化し、LAT1 発現量が減少することで、BCAA の細胞内輸送が減少し、そのため血漿 BCAA が高値となっているにもかかわらず、筋委縮に対する BCAA の効果が見られない可能性が考えられる。

【結論】

C2C12 細胞において、グルコースは AMPK 活性を抑制して LAT1 mRNA 量を減少させる可能性が示唆された。

高血圧患者における高塩分食品・調味料の使用習慣に基づいた

塩分摂取量簡易評価方法の開発

博士前期課程 食物栄養学専攻 脇田久美子

【背景】

日本人の食塩摂取量は年々低下しているものの、依然目標量をはるかに上回った摂取量となっている。減塩の意識は必ずしも実際の減塩につながっていないことが報告されており、この要因の一つとして、日常の食塩摂取量の評価が困難であることが挙げられる。従って、日常的に食塩摂取量を評価するためのツールが必要である。

「高血圧治療ガイドライン 2014」における「食塩摂取量評価のガイドライン」には、高血圧専門施設においては、24 時間蓄尿による Na 排泄量測定が最も信頼性が高く、望ましい方法とされているが、日常的な食塩摂取量評価方法としては煩雑であり、患者の協力を得ることが難しいなどの問題点も挙げられる。そのため、一般医療施設においては、起床後第 2 尿や随時尿 Na、随時尿 Cr を用いて食塩摂取量を推定する方法が 24 時間蓄尿による Na 排泄量測定に比べ、信頼性はやや劣るが、簡便であり、実際の評価方法として推奨されている。また、身長、体重、年齢などを用いて算出する 24 時間尿 Cr 排泄量推計値を含む計算式を用いることにより信頼性向上を図ることができると言われている。しかし、一方で随時尿を用いた推定食塩摂取量は誤差が大きく、減塩指導に用いる際は複数回繰り返し測定する必要がある点や、日常的に栄養指導で用いるには患者の食塩摂取に寄与する食品の特定が困難な点など、問題点も挙げられる。

一方、従来行われてきた質問票を用いた食塩摂取量の評価は記入に比較的長い時間を要し、対象者の負担となる可能性が考えられる。また、解析にも時間を要するため、リアルタイムに対象者へ結果をフィードバックすることが困難である。

【目的】

高血圧患者におけるより簡易的な食塩摂取量評価方法として、使用調味料等の実技テストと高塩分食品等の摂取量・頻度についてのアンケート調査を組み合わせた評価法(以下、併せて「減塩教室アンケート」と呼ぶ)の開発を試みる研究を行った。一般医療施設における食塩摂取量評価方法として推奨されている随時尿を用いた推定食塩摂取量の値および FFQg から求めた 1 日食塩摂取量の値を用い、その妥当性について検討した。

【方法】

対象は神戸大学医学部附属病院循環器内科に通院している、年齢が 50 歳以上 80 歳未満の高血圧症を有する患者である。調査期間は 2017 年 3 月から 12 月に行った。

測定項目は(1)今回新たに作成した「減塩教室アンケート」、(2)食物摂取頻度調査(FFQg)、(3)血液生化学検査(尿素窒素、Cr、eGFR(計算値)、Na、K、Cl)、(4)尿検査(随時尿 Na、随時尿 Cr)、(5)血圧、(6)身長・体重である。(2)から(6)は 1 回目の栄養指導日に実施し、(1)は聞き取り部分と実技部分に分かれており、1 回目と 2 回目の栄養指導日にそれぞれ実施した。

【結果】

2017年12月までに減塩教室への参加が終了した患者は30例であり、性別は男性12名、女性18名で、年齢は平均70.8±5.9歳(平均±標準偏差)であった。

「減塩教室アンケート」とFFQgそれぞれの方法から求めた1日食塩摂取量との間に強い相関がみられた($r=0.895$ 、 $P<0.001$)。しかし、「減塩教室アンケート」とFFQg各々から求めた1日食塩摂取量と随時尿から求めた推定食塩摂取量との間に直接の関係はみられなかった。

また、「減塩教室アンケート」の項目のうち、対象者の週平均食塩摂取量に対する寄与率の低い9項目を減らした「簡易版減塩教室アンケート」とFFQg各々から求めた1日食塩摂取量との間にも強い相関がみられた($r=0.890$ 、 $P<0.001$)。

【考察】

「減塩教室アンケート」および「簡易版減塩教室アンケート」とFFQgそれぞれの方法から求めた1日食塩摂取量との間に強い相関がみられた。FFQgの妥当性については確認されており、今回、そのFFQgと強い相関がみられたことから、我々が開発した「減塩教室アンケート」ならびに「簡易版減塩教室アンケート」は従来のFFQgと同等の妥当性が得られる可能性が確認できた。

一方、随時尿から推定する食塩摂取量の値はFFQgから求める食塩摂取量と比較し、数値のばらつきが大きく、それゆえに、随時尿からの推定食塩摂取量と「減塩教室アンケート」、FFQgそれぞれの方法から求めた1日食塩摂取量との間に直接の関係はみられなかったと考えられる。減塩指導に用いるには1回の評価だけでは使用ができず、複数回繰り返し測定する必要があると考えられる。

【結論】

使用調味料等の実技テストと高塩分食品等の摂取量・頻度についてのアンケート調査を組み合わせた「減塩教室アンケート」は塩分摂取量評価方法として有用である可能性が示唆された。

ロイシンによる mTORC1 活性化に関する IGF-I の効果

博士前期課程 食物栄養学専攻 和気郁実

【背景・目的】

分岐鎖アミノ酸(BCAA)は筋タンパク合成促進、分解抑制に関与し、種々の筋萎縮を抑制する。しかし、成長ホルモン(GH)が欠損している spontaneous dwarf rat (SDR)に BCAA を経口投与してもデキサメサゾン誘導性の筋萎縮は抑制されず、SDR に GH を補償することにより BCAA の筋萎縮抑制効果は回復することを私どもの研究室は見出した。さらに、SDR 骨格筋では BCAA によるタンパク合成促進因子である mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)の活性化が認められなかったが、GH 補償後には認められるようになった。これらの成績は、BCAA の作用発現に GH が必要であることを示唆する。

最近、mTORC1 を阻害する物質として sestrin が作用する可能性が報告された。今回、上記 in vivo の結果を解釈するにあたって、sestrin の発現量が GH / IGF-I (インスリン様成長因子)に調節された結果、BCAA 反応性に変化が生じたと仮説を設け、その可能性を検討した。

【方法】

細胞培養

10%牛胎児血清、ペニシリン G カリウム(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、カナマイシン(15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、グルコース(400 mg/dL)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)を用いて、マウス筋細胞株 C2C12 細胞を 6 穴プレートもしくは 12 穴プレートで 80~100 %になるまで培養したのち、メディアウムを 2 %馬血清、ペニシリン G カリウム(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、カナマイシン(15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、グルコース(400 mg/dL)を含む DMEM(分化メディアウム)に置換した。その後、一日おきに、分化メディアウムを交換、5 日後に筋管細胞を形成させた。

Real Time PCR

IGF-1(100 ng/ml)、あるいは GH (100 ng/ml)を添加した血清を含まない DMEM に、分化 C2C12 細胞のメディアウムを置換し、5 時間後、分化 C2C12 細胞からトリゾールを使用して total RNA を抽出した。2 μg の RNA を使用して逆転写反応を行い、cDNA を調製した。調製した cDNA 各 1 μl を template としプライマー(10 μM)を含む 25 μl の反応液中で、real time thunderbird mix を使用し real time PCR を行った。インターナルコントロールとして β -actin の mRNA 量を用い sestrin の mRNA 量を測定した。

Western Blot

- ① ロイシン(0、0.2、1 mM)を添加した血清・アミノ酸不含有 DMEM に分化 C2C12 細胞のメディアウムを置換し、15 分後に界面活性剤、タンパク質分解酵素阻害薬、脱リン酸化酵素阻害薬等を含む緩衝液で分化 C2C12 細胞を溶解し、サンプルを調製した。
- ②IGF-1(0、1、10、100 ng/ml)を添加した血清・アミノ酸不含有 DMEM に、分化 C2C12 細胞のメディアウムを置換し、15 分あるいは 5 時間後に、①と同様の方法でサンプルを得た。
- ③IGF-1 100 ng/ml を添加した血清を含まない DMEM に分化 C2C12 細胞のメディアウムを置換し 5 時間培養した。その後、1 mM ロイシンを添加し、15 分後に、①と同様の方法でサンプルを得た。
- ④DEX 10 μg 、IGF-1 100 ng/ml を添加した血清を含まない DMEM に分化 C2C12 細胞のメ

ディウムを置換し5時間培養した。その後、1 mM ロイシンを添加し、15分後に、①と同様の方法でサンプルを得た。

40 µg のタンパク質を含むサンプルを使用し、SDS 電気泳動を行ったのち、PVDF 膜に転写、以下の抗体、ECL Prime chemiluminescence western blotting kit を使用して western blot を行った。目的とするバンドの濃度は、LAS-3000 mini で測定した。

- ・ p70 S6 Kinase (49D7) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)
- ・ Phospho-p70 S6 Kinase (The389) (108D2) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)
- ・ 4E-BP1 Antibody (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)
- ・ Phospho-4E-BP1 (Ser65) Antibody (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)
- ・ Monoclonal anti-alpha Tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ・ horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
- ・ horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

【結果・考察】

C2C12 細胞を筋管細胞に分化させたのち、GH(100 ng/mL)、あるいは IGF- I (100 ng/mL) を培養メディウムに添加し、5 時間後に RNA を抽出、RT-PCR で sestrin1、2、3 mRNA 量を測定したところ、GH は sestrin mRNA 量に影響を与えなかったが、一方、IGF-I は sestrin mRNA 量を減少させた。次に、ロイシンの mTORC1 活性化に IGF-I は影響を及ぼすか検討した。IGF-I で 5 時間刺激後ロイシン (1 mM) を添加し 15 分後に調べたところ、IGF-I 無刺激後のロイシン添加(コントロール)に比べ、IGF-I 刺激後のロイシン添加は、mTORC1 によって増強される eukaryotic initiation factor (eIF)4E-binding protein 1 (4E-BP1)、ribosomal protein S6 kinase (S6K)のリン酸化を亢進させた。

以上のことから、IGF-I は、sestrin 1、2、3 mRNA 量を減少させること、ロイシンによる mTORC1 活性化に影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、IGF-I により生じた sestrin1、2、3 mRNA 量の減少が、IGF-I 刺激後のロイシンの mTORC1 活性化に結びつくものかどうかは不明である。

【結論】

IGF-I は sestrin1、2、3mRNA 量を減少させ、IGF-I はロイシンの 4E-BP-1、S6K のリン酸化作用を増強することを見出した。

再生セルロースの結晶面と液体媒体との相互作用に関する研究

博士前期課程 生活造形学専攻 永野真理

【背景・目的】

再生セルロースとは天然のセルロース原料を一度溶解し、再び凝固・凝集させ得たものである。近い将来発生すると予想される綿の需要と供給量の差を解消するためには、再生セルロース繊維が有力であると考えている。しかし、これらの再生セルロースは最も親水性な高分子の一つであり、水に影響を受けやすいという欠点がある。水の影響の例を挙げると膨潤収縮、湿潤状態の摩擦作用によるフィブリル化、洗濯による著しいしわ等がある。これらの水に濡れやすい特性が再生セルロースの材料としての使用用途の可能性を狭めている。これらの課題を改善するための第一歩として両親媒性ポリマーであるセルロースの特徴を解明すべく、セルロースと主に水との相互作用について追究する。

【方法】

1. 水中・真空中でのセルロース分子鎖1本の挙動

- (1) 水中での挙動：縦、横、奥行きが 50\AA の箱に水分子を 4181 個、セルロース II 型結晶から取り出した重合度 8 のセルロース分子を 1 本投入し、分子動力学 (MD) 計算を行い、分子鎖の挙動について観察した。
- (2) 真空中での挙動：(1)と同じ大きさの箱にセルロース分子 1 本のみを投入、MD 計算を行い真空中での分子鎖の挙動について観察した。

2. 表面エネルギーの計算

セルロース II 型の結晶から (1-10)、(110) 結晶表面を切り出し、各表面に厚さ 30\AA の真空層を配置し、そのエネルギーを求めた。その後、式(1)を用いて各結晶表面の表面エネルギーを算出した。

$$\text{表面エネルギー} = (\text{VCE} - \text{CBE}) / \text{SA} \quad (1)$$

VCE：界面有（真空とセルロース）モデルのエネルギー， CBE：セルロースバルク（表面なし）モデルのエネルギー， SA：真空層に接するセルロースの表面積

3. 界面エネルギーの計算

セルロース II 型の (1-10)、(110) 結晶表面を切り出し、各表面に水またはオクタンの層を配置した。この時、水の層の厚さを $10\text{\AA} \sim 60\text{\AA}$ と変化させた。この液体層の厚みの違うモデルの界面エネルギーを式(2)を用いて算出した。

$$\text{界面エネルギー} = (\text{WCEorOCE} - (\text{CBE} + \text{WBEorOBE})) / \text{SA} \quad (2)$$

WCE：水とセルロースの界面があるモデルのエネルギー， OCE：オクタンとセルロースの界面があるモデルのエネルギー， WBE：水バルク（表面なし）モデルのエネルギー， OBE：オクタンバルク（表面なし）モデルのエネルギー， SA：水またはオクタンとセルロースの界面の表面積

【結果・考察】

1. 水中・真空中でのセルロース分子鎖1本の挙動

最もシンプルなモデルとしてセルロース分子鎖1本の水中及び真空中での挙動を観察した。水中では結晶中のセルロース分子と分子鎖の長さはほとんど変わらなかった。これはセルロース分子鎖の周りに水分子が大量に溶媒和した為に、水分子が鞘のようにセルロース分子鎖

の動きを制限したためと考えられる。一方、真空中では計算直後から形状の変化を繰り返し最終的には丸く糸まり状になった。大きな変化が見られなかった水中とは違い、真空ではセルロース分子鎖の動きを遮るものがなかった為に、セルロース分子鎖の形が大きく変化したのであろう。このように、セルロースと水は強い相互作用があることがうかがわれたことから、それを定量化する為に表面エネルギーと界面エネルギーの計算を試みた。

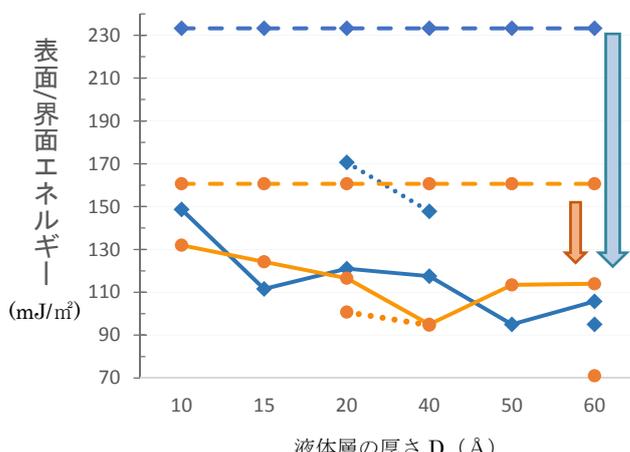


図1. 水・オクタンの層の違いによる界面エネルギーの変化と

各表面エネルギー：
 ●— 水と(1-10)面;
 ●— 水と(110)面;
 ●... オクタンと(1-10)面;
 ●... オクタンと(110)面;
 ●— (1-10)面の表面エネルギー;
 ●— (110)面の表面エネルギー.

1. 表面エネルギーの計算

(1-10)面の表面エネルギーは 233.269kcal/mol、(110)面の表面エネルギーは 160.651kcal/mol となった。(1-10)面の表面には水酸基が多数存在すること、一方で(110)面は表面には水酸基がほとんどなく C-H 水素原子が主に存在することから(1-10)面の方が(110)面に比べて表面エネルギーが高くなったと考えられる。

2. 界面エネルギーの計算

水・オクタンの厚さに変化を持たせたモデルの界面エネルギーを図1に示す。界面のエネルギーは液体媒体の層の厚さに依存性が認められ、水・オクタン共に層を厚くするとエネルギーは低くなる傾向がある。これは、表面近

傍の水分子やオクタン分子のエネルギーが高いことに起因するものと考えられる。実際に表面近傍の水のエネルギーを計算すると、界面近傍のエネルギーが 879.93J/molとなり、その他の部分のエネルギーの平均値 182.88 J/molに比べ、圧倒的に高くなっており界面近傍は非常に活性化していると考えられる。両液体媒体において界面エネルギーの値は表面エネルギーに比べ全体的に大きく低下しており、特に水の場合には(1-10)面が、オクタンの場合は(110)面の表面の安定化が著しいと判る。この図から、両表面は水やオクタンを加えることで安定化したと言え、特に水の場合は(1-10)表面は水酸基が出ている為に(110)表面に比べて大きく安定化したと考えられ、オクタンの場合は水酸基がほとんどなく C-H 水素原子が存在するだけである(110)表面の方が(1-10)表面に比べて安定したと考えられる。

【結論】

水中・真空中のセルロース分子鎖の MD 計算中の挙動観察により、セルロース分子は硬く伸びきり鎖になっていると言われているが、これは溶媒和に起因するものと考えられる。界面エネルギーには界面の表面近傍の水のエネルギーも含まれることから、界面エネルギーは水の層の厚さに依存性があるのであろう。また、水の場合は表面エネルギーと比較すると(1-10)表面は水酸基が出ている為に(110)表面に比べ水を加えることで著しく安定化し、オクタンの場合は水酸基がほとんどなく C-H 水素原子が主に存在する(110)表面の方が(1-10)表面に比べて親和性が高い為に安定化したと考えられる。