

<平成23年度助成>

ポリフェノール類の求心性知覚神経を介した メタボリックシンドローム予防作用の解明

越阪部 奈緒美

(芝浦工業大学システム理工学部生命科学科)

緒 言

これまでの疫学調査において、ポリフェノールの摂取と心疾患のリスクが負の相関を示すという報告は数多い^{1,2)}。また高ポリフェノール含有食品の栄養介入試験では血圧の低下やインシュリン感受性の上昇などメタボリックシンドロームの改善効果が認められている³⁻⁵⁾。しかしながら、その作用メカニズムについては現在までのところほとんどわかっていない。その理由としては、ここ10数年の研究で経口から摂取されたポリフェノールのほとんどは吸収されず、吸収された場合でも消化管で代謝を受け活性を失った代謝物として血中に存在することが明らかとなったことにある^{6,7)}。この事実により血中に移行した物質が標的臓器に分布し作用を引き起こすという、従来の薬理学的作用機序が否定されメカニズム解明に関する研究が滞っている。しかしながら、最近申請者らはポリフェノールの一種であるプロシアニジン単回経口投与した直後から骨格筋における微小循環動態が改善されることを *in vivo* 生体顕微鏡による検出法を採用することで見出した。このことは、この作用の発現が必ずしも数十分という時間を要する消化管での吸収を伴う必要性が無いことを示している。またこのとき、呼気分析によりエネルギー代謝を亢進させていることを初めて見出した。またこれらの作用は除知覚神経処理を行った実験動物においてキャンセルされることがわかった。これらのことから、ポリフェノールの心血管系に対する作用は、おそらくこれまで見出されて

いなかった消化管に分布する求心性知覚神経を介して発現すると考えられる。そこで本研究では、その作用メカニズムを解明するため、マウスまたはラットを用いて検討することとした。

実験1 Flavan 3-olsの循環系刺激作用：知覚神経除去ラットを用いた検討

実験動物

実験には体重は250-280gのWister系雄性ラット7週齢(埼玉動物実験供給所)を用い、飼育は室温23~25℃、12時間の明暗周期下で飼育を行った。動物実験は、芝浦工業大学動物実験委員会の許可のもと、ヘルシンキ宣言を遵守した倫理規範に従って実施した。

試 薬

Salbutamol、capsaicin、ペントバルビタール及びウレタンはSigma社製を用いた。Flavan 3-ols画分は(株)明治から供与されたものを用いた。実験に用いたflavan 3-ols画分の組成を表1に示す。

表1

Component	Content (%)
polyphenol	72.4
(+)-catechin	4.56
(-)-epicatechin	6.43
procyanidin B2	3.54
procyanidin B5	0.85
procyanidin C1	2.36
cinnamtannin A2	1.45

実験方法

動物をペントバルビタール麻酔下で、Salbutamol 0.6mg/kgを皮下投与した10分後にcapsaicin 20mg/kgを皮下投与、また2時間後にSalbutamol

0.6 mg/kgを皮下投与した10分後に capsaicin 30 mg/kgを皮下投与する。この操作を2日間行い、その2週間後に0.1% capsaicin 溶液を動物に点眼し、正常動物でおこるワイピングが消失したことを確認し、除知覚神経ラットとした。正常ラット (n=8) または除知覚神経ラット (n=8) にウレタン麻酔下で、胃内にカテーテルを留置し、小動物用血圧測定装置 ソフトロン社製 BP-98を用いて Tail-cuff 法にて、30分間血圧を測定した。その後留置したカテーテルを通じて flavan 3-ols 画分 10 mg/kgを投与して、1時間血圧を測定した。

統計処理

データはすべて平均±標準偏差で示した。各群の平均値の比較は Dannet 法で実施し、 $p < 0.05$ であった場合、有意な差とした。

実験結果

図1に示すように、正常ラットにおいては flavan 3-ols 画分 10 mg/kgの経口投与直後から平均血圧が上昇していくのに比べ、capsaicin 過剰投与によって知覚神経をブロックした除知覚神経ラットにおいては、その上昇が認められないことが分かった。

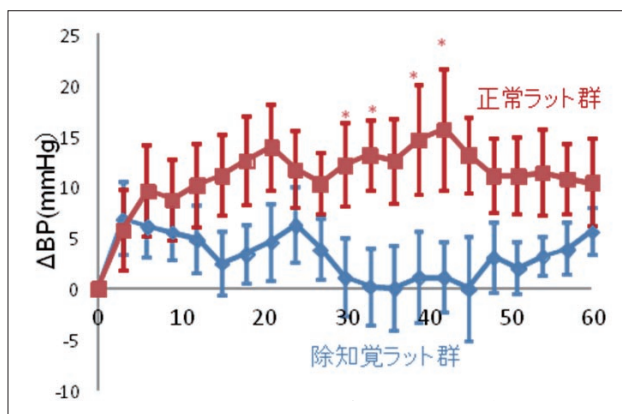


図1 Flavan 3-ols 単回投与による血圧上昇作用
～正常ラットと除知覚神経ラットの比較

実験2 Flavan 3-ols 単回投与によるエネルギー代謝修飾作用の検討

実験動物

実験には体重は25-30 gのICR系雄性マウス8週齢(日本クレア)を用い、飼育は室温23～

25℃、12時間の明暗周期下で飼育を行った。動物実験は、芝浦工業大学動物実験委員会の許可のもと、ヘルシンキ宣言を遵守した倫理規範に従って実施した。

試薬

Capsaicin、ペントバルビタールはSigma社製を用いた。Flavan 3-ols画分は(株)明治から供与されたものを用いた。

実験方法

動物は生理食塩水を投与した control 群 (n=13)、flavan 3-ols 画分 10 mg/kgを投与した flavan 3-ols 群 (n=13) または capsaicin 1 mg/kgを経口投与した capsaicin 群 (n=13) の3群に分け、行動量測定装置を搭載した小動物呼吸分析装置(室町機械社製 MK-5000RQ)専用チャンバーにて1時間馴化させた後、20時間の酸素消費量(VO_2)および二酸化炭素排出量(VCO_2)を測定した。呼吸交換比(RER: respiratory exchange ratio)、エネルギー消費量(EE: Energy expenditure)は以下の計算式によって算出した。

$$RER = VCO_2 / VO_2$$

$$EE \text{ (kcal)} = 3.9 \times VO_2 + 1.1 \times VCO_2$$

また、投与前、生理食塩水、flavan 3-ols 画分 10 mg/kgまたは capsaicin 1 mg/kgを投与2時間、4時間後に採血および解剖を実施した。血漿中カテコールアミン濃度をHPLC法にて測定し、褐色脂肪組織中の脱共役タンパク質1(UCP-1)のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法にて定量した。

統計処理

データはすべて平均±標準偏差で示した。各群の平均値の比較は Dannet 法で実施し、 $p < 0.05$ であった場合、有意な差とした。

実験結果

図2-aに投与後20時間の酸素消費量を、また図2-bに20時間に消費した総酸素消費量を示す。酸素消費量は flavan 3-ols 群で上昇傾向を示し、総

酸素消費量は control 群に比べて有意に増加したが、capsaicin 投与群では control 群との間に差異はなかった。

図 3-a に投与後 20 時間のエネルギー消費量を、また図 2-b に 20 時間に消費した総エネルギー消費量を示す。エネルギー消費量は flavan 3-ols 群で上昇傾向を示し、総エネルギー消費量は control 群に比べて有意に増加したが、capsaicin 投与群では変化が見られなかった。図 4 に flavan 3-ols

投与後の血中カテコールアミン濃度の変化について示したが、血中アドレナリン濃度には変化が認められなかったが、血中ノルアドレナリン濃度は flavan 3-ols 投与 2 時間後で有意な上昇が認められた。図 5 に flavan 3-ols 投与後の褐色脂肪組織中の UCP-1 の mRNA 発現量を示したが、投与後 2 時間で投与前に比較して有意な発現の増加が認められた。

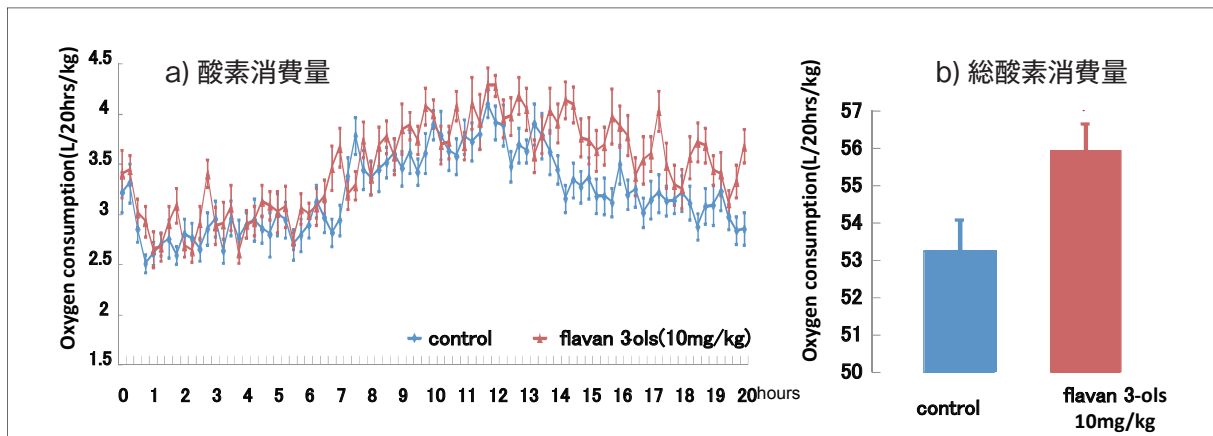


図 2 Flavan 3-ols 単回投与による酸素消費量の変化

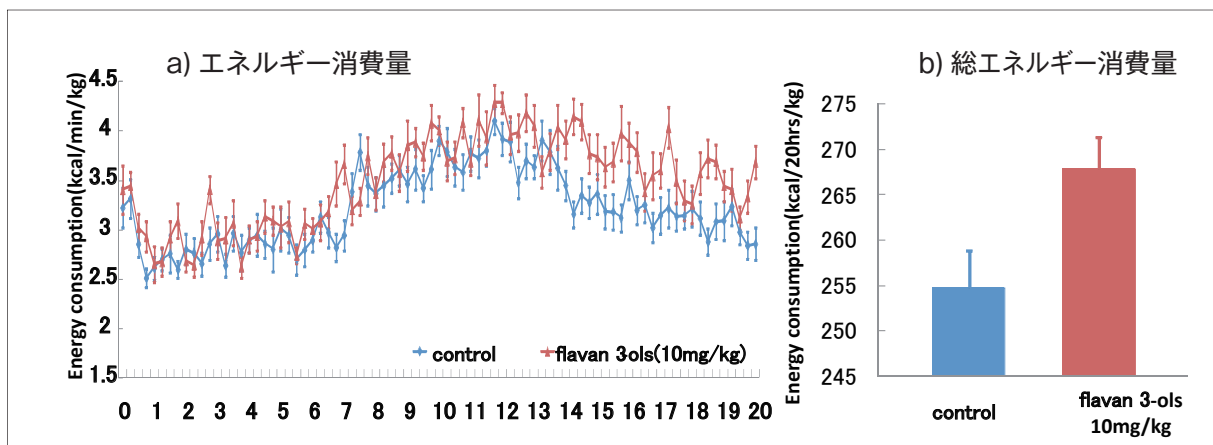


図 3 Flavan 3-ols 単回投与によるエネルギー消費量の変化

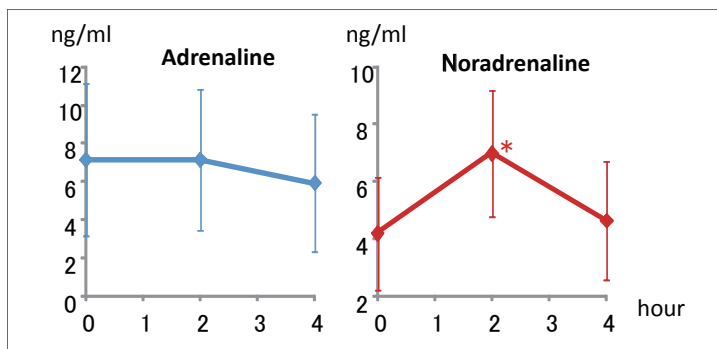


図 4 Flavan 3-ols 単回投与による血中カテコールアミン濃度の変化

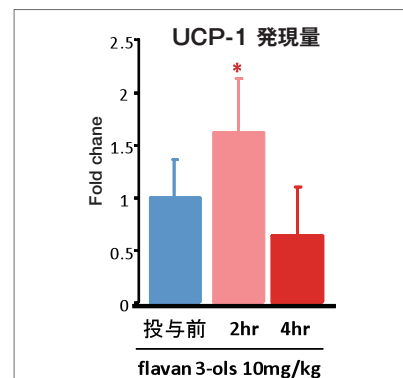


図 5 Flavan 3-ols 単回投与による褐色脂肪組織 UCP-1 発現量の変化

考 察

本実験の結果から、flavan 3-ols 単回投与による血圧上昇作用は消化管知覚神経を介して発現することが実験1の結果からわかった。また実験2では、flavan 3-ols 単回投与は血圧上昇だけではなく、エネルギー代謝を上昇させること(図3)、褐色脂肪組織中のUCP-1発現が増加すること(図5)が明らかとなった。同時に血漿中のノルアドレナリンがflavan 3-ols投与2時間後で有意に上昇することから、血圧上昇・エネルギー代謝亢進といったflavan 3-olsの作用はノルアドレナリンによって生じていることが示唆された。

前述したように、高ポリフェノール含有食品の栄養介入試験では血圧の低下やインシュリン感受性の上昇などメタボリックシンドロームの改善効果が認められているが、そのメカニズムについては未だ不明である。また最近の報告ではflavan 3-olsを豊富に含有する食品であるチョコレート摂取頻度とBody Mass Indexが負の相関を示すこと、すなわちチョコレートを摂取することで体重が減少することが報告されている⁸⁾。

哺乳動物において、エネルギー代謝に対して最も大きな影響を与えるのは交感神経系であり、様々な刺激に対して恒常性を保つため、視床下部から分泌された副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRH)によって興奮した交感神経は神経末端からノルアドレナリンを分泌し、副腎からカテコールアミンを血中に分泌させる。血中カテコールアミンは、全身に分布する α および β 受容体を介して、ホメオスタシスを調整する。これまでに食品成分の一つである唐辛子の辛味成分capsaicinが全身に分布する痛覚受容体であるTransient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)受容体および迷走神経を介してその刺激を視床に伝達し、その応答反応として交感神経が興奮し、副腎からのカテコールアミン分泌を短期的に劇的に増加さ

せることが知られている。このため、上昇した血中カテコールアミンが $\beta 3$ アドレナリン受容体を介して褐色脂肪細胞のUCP-1発現を上昇させ、エネルギー代謝を発熱の形で亢進することが報告されている⁹⁾。

本研究はcapsaicinと同様にflavan 3-olsにも血中カテコールアミン濃度を上昇させる作用を確認した初めての報告であるが、その作用はcapsaicinが投与数分後に血中カテコールアミン濃度を上昇させるといった急性的な反応であるのに対して、図5に示したようにflavan 3-olsは投与2時間後に有意な上昇が認められるといった緩やかな作用である点で大きく異なる。我々はこれまでにflavan 3-olsを反復投与した場合に、運動を継続した場合と同様に、骨格筋のミトコンドリア新生が促されることを見出している。しかしながらこれまでcapsaicinの反復投与によってこのような作用は見出されていない。Flavan 3-olsはcapsaicinと異なり、ある程度持続的に緩やかにカテコールアミンの放出を促すことで、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を刺激して、peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator α (PGC1 α)を活性化し、ミトコンドリア新生を促進し、運動の継続と同様に総合的にエネルギー代謝を亢進することが推測される。以上のことから本研究の結果、flavan 3-ols含有食品のメタボリックシンドローム改善メカニズムは、flavan 3-olsが消化管知覚神経を刺激し、その結果として分泌されるカテコールアミンによる恒常性維持反応である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団およびその関係者の皆さまに心より感謝致します。貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

文献

- 1) Arts ICW, Hollman PCH, Feskens EJM, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 227-32.
- 2) Arts ICW, Jacobs DR, Harnack LJ, Gross M, Folsom AR. Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women. *Epidemiology* 2001; 12: 668-75.
- 3) Tokede OA, Gaziano JM, Djoussé L. Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2011; A65: 879-86.
- 4) Shrive MG, Bauer SR, McDonald AC, Chowdhury NH, Coltart CE, Ding EL. Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies. *J Nutr* 2011; 141: 982-8.
- 5) Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A. Effects of chocolate, cocoa, and procyanidin on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr* 2012; 95: 740-51.
- 6) Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 142-8.
- 7) Spencer JP, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. Bioavailability of procyanidin and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 1023-39
- 8) Golomb BA, Koperski S, White HL. Association between more frequent chocolate consumption and lower body mass index. *Arch Intern Med* 2012; 172: 519-21.
- 9) Leung FW. Capsaicin-sensitive intestinal mucosal afferent mechanism and body fat distribution. *Life Sci* 2008; 83: 1-5.

Elucidation of polyphenols on metabolic syndrome improvement activity via afferent sensory nerve system

Naomi Osakabe

Shibaura Institute of Technology, Department of Bio-science and Technology

Numerous clinical studies have reported that ingestion of chocolate has a therapeutic effect on risk factors of the metabolic syndrome. However, the mechanisms of these effects are still unclear. In order to elucidate that, we made two studies. First, we evaluate the effect of flavan 3-ols which is one of polyphenol substances derived from chocolate, on blood pressure using denervation animal model. Ablation of gastric visceral afferent nerves was accomplished by high-dose capsaicin administration. Under urethan anesthesia, either normal or denerved rats were oral administrated flavan 3-ols (10 mg/kg), and their blood pressure was measured by tail-cuff method. In normal rat, mean blood pressure was significantly increased compared with before administration, but there was not changed in blood pressure of denerved rats. Second, the influences of flavan 3-ols derived from cacao on energy metabolism by the indirect calorimetric method. The animals were divided into two groups, and administrated distilled water or 10 mg/kg flavan 3-ols fraction. After administration, the value of oxygen consumption and carbon dioxide excretion were determined using respiratory gas analysis system for 20 hours. The total oxygen consumption was significantly increased by the administration of flavan 3-ols compared with distilled water treatment group. The total energy consumption was also elevated in flavan 3-ols group. Two hours after treatment, uncoupling protein-1 mRNA expression in brown adipose tissue determined by real time RT-PCR method, was significantly increased compared with before treatment. We also determined the concentration of catecholamine in blood of the animals. The level of adrenalin was not significantly changed throughout of the experimental period, but the content of noradrenalin was significantly elevated at 2 hours after administration of flavan 3-ols. These results suggest that the afferent sensory nerve system was contributed that the effect of flavan 3-ols on cardiovascular system or energy metabolism. Moreover, these effects were produced by the blood noradrenalin elevation. In conclusion, according to the results of these experiments, it was suggested that a part of the improvement of flavan 3-ols in chocolate on metabolic syndrome risk factors was caused by the stimulation of afferent sensory nerve system.