

2019 年度 課程博士学位論文

亜麻仁の高血圧モデルラットにおける降圧及び腎保護効果と
その作用機序に関する薬理学的研究

臨床薬理学分野

渡部裕介

本論文は、以下の報告内容を総括したものである。

1. Yusuke Watanabe, Kaori Ohata, Ayaka Fukanoki, Naoto Fujimoto, Maruri Matsumoto, Naseratun Nessa, Hiroe Toba, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata. Antihypertensive and renoprotective effects of dietary flaxseed and its mechanism of action in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Pharmacology*. **2020**, 105, 54-62. [第 1、2、3 章]

目次

序論.....	1
第1章.....	10
第1節 緒言.....	10
第2節 実験材料及び方法.....	11
1. 実験動物.....	11
2. 試験物質.....	11
3. その他の試薬.....	11
4. 試験物質含有飼料の作製.....	11
5. DOCA 食塩負荷高血圧モデルの作製.....	11
6. 試験物質の投与.....	12
7. 収縮期血圧の測定.....	12
8. 生化学データの測定.....	12
9. 統計処理.....	13
第3節 結果.....	14
1. 飲水量及び尿量の推移.....	14
2. 収縮期血圧の推移.....	15
3. 尿中蛋白排泄量の推移.....	16
第4節 考察.....	17
第5節 小括.....	23
第2章.....	24
第1節 緒言.....	24
第2節 実験材料及び方法.....	26
1. 実験動物.....	26
2. 試験物質.....	26
3. その他の試薬.....	26
4. 試験物質含有飼料の作製.....	27
5. DOCA 食塩負荷高血圧モデルの作製.....	27
6. 試験物質の投与.....	27
7. 収縮期血圧の測定.....	28
8. 生化学データの測定.....	28
9. 統計処理.....	28
第3節 結果.....	29
1. 飲水量及び尿量の推移.....	29
2. 収縮期血圧の推移.....	30
3. 尿中蛋白排泄量の推移.....	31
第4節 考察.....	32
第5節 小括.....	34

第3章	35
第1節 緒言	35
第2節 実験材料及び方法	37
1. 実験動物	37
2. 試験物質	37
3. その他の試薬	37
4. DOCA 食塩負荷高血圧モデルの作製	37
5. 試験物質の投与	37
6. 収縮期血圧の測定	38
7. 収縮期血圧、平均動脈圧及び心拍数の観血的測定並びに各種組織の採取及び保存	38
8. 自律神経活動の測定	39
9. 腎マロンジアルデヒド量の測定	41
10. 腎及び血漿 ACE 活性の測定	41
11. RNA の精製及び cDNA の合成	41
12. 定量的リアルタイム PCR	42
13. 統計処理	43
第3節 結果	44
1. 平均動脈圧	44
2. 交感神経活動	45
3. 副交感神経活動	46
4. 腎及び血漿 ACE 活性	47
5. 腎マロンジアルデヒド量	48
6. 腎 gp91phox、p22phox 及び p47phox mRNA 発現量	49
7. 腎 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量	50
8. 視床下部 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量	51
第4節 考察	52
第5節 小括	57
総括	58
引用文献	60
謝辞	67

略語表

ACE	Angiotensin converting enzyme
ALA	Alpha-linolenic acid
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ARB	Angiotensin II type 1 receptor blocker
AT1	Angiotensin II type 1
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CMC	Carboxymethyl cellulose
CRP	C-reactive protein
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHA	Docosahexaenoic acid
DHET	Dihydroxyeicosatrienoic acid
DiHOME	Dihydroxyoctadecenoic acid
DOCA	Deoxycorticosterone acetate
EET	Epoxyeicosatrienoic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
EpOME	Epoxyoctadecenoic acid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPR120	G protein-coupled receptor 120
gp91phox	gp91 phagocyte oxidase
HHL	Hippuryl-His-leu
HR	Heart rate
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mean arterial pressure
MC	Methyl cellulose
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDA	Malondialdehyde
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PCR	Polymerase chain reaction
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLSD	Protected least significant difference
PVN	Paraventricular hypothalamic nucleus
p22phox	p22 phagocyte oxidase

p47phox	p47 phagocyte oxidase
QOL	Quality of Life
RAS	Renin-angiotensin system
RNA	Ribonucleic acid
RVLM	Rostral ventrolateral medulla
SBP	Systolic blood pressure
SDG	Secoisolariciresinol diglucoside
sEH	Soluble epoxide hydrolase
SHR	Spontaneously hypertensive rat
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
5-HT	5-hydroxytryptamine

序論

高血圧とは、安静状態での血圧が慢性的に正常値よりも高い状態を指す。2010 年時点で、世界の成人人口の約 3 分の 1、即ち 13.9 億人が高血圧症に罹患していると試算されており、2025 年までに高血圧を呈する成人人口は 15.6 億人に達すると予測されている [1, 2]。また、本邦における 2010 年の高血圧有病者数は、約 4300 万人（男性 2300 万人、女性 2000 万人）と試算されており [3]、高齢化に伴い高血圧有病者数はさらに増加することが予想される。高血圧は、心疾患及び脳血管疾患の発症に関わる最大のリスクファクターであると共に、慢性腎臓病の発症リスクを上昇させる [3-5]。また、高血圧は、各種疾患を合併することで死亡リスクをも上昇させる。本邦では、高血圧は、脳心血管病における最大の死亡原因とされており、年間約 10 万人が高血圧により死亡していると試算されている [3]。最近では、ストレスと高血圧との関連が注目されており、心理的・社会的ストレスによる高血圧発症リスクの増加や、ヨガ、瞑想等によるストレス管理の高血圧に対する有効性が報告されている [3]。さらに、環境ストレス等に起因するストレス性高血圧は、心、腎、脳の臓器障害並びに心血管イベントリスクとそれによる死亡リスクを増加させる [6]。したがって、各種関連疾患の発症予防や死亡リスクの低減のために、適切な薬物治療、生活習慣の改善及びストレスの緩和により血圧を制御することが重要である。近年では、健康意識の向上と相まって、多様な生理機能を有する成分を含む「機能性食品」が注目を集めている。生活習慣の改善の中でも、食事への介入は、薬物療法と比較して有効性に関しては劣るものの、効果がマイルドであり、副作用リスクも少なく、更に一般社会への受け入れやすさから、日常の血圧の制御に有用な手法の一つと考えられる [7-9]。

亜麻仁 (flaxseed) は、亜麻科の植物である亜麻 (学名: *Linum usitatissimum*) の種子であり、現在はカナダを中心に、中国、アメリカ、インド等、全世界で広く栽培されている。原産は欧州の地中海地方で、人類が初めて栽培した植物の一つとされている [10]。紀元前 7000 年代にはトルコやシリアで、紀元前 5000 年代にはエジプトでも栽培され、ミイラを包む布地に利用されていた [11, 12]。食用としての認知は西暦 800 年代であり、この時代では、種子から搾った油を食に供し、茎は布地 (リンネル) や紙に利用されていた。中世から近世にかけて、亜麻仁の栽培は欧州全域に拡大し、新大陸の北米には 17 世紀に伝播し、1617 年にカナダで、1753 年にアメリカで商業栽培が始まったとされている [13]。亜麻仁の栽培は寒冷地に適しており、北米、特にカナダは世界の生産量のおおよそ半分を担う最大の輸出国である [14]。

亜麻仁は、オメガ 3 不飽和脂肪酸である α -リノレン酸 (ALA)、フェノール化合物の一種であるリグナン及び食物繊維といった機能性成分を豊富に含むことから、機能性食品として取り扱われている (Figure 1) [10]。本邦では、亜麻仁を焙煎し、粉末状にした亜麻仁粉末や、亜麻の種子を圧搾して得られる植物油である亜麻仁油が市販されている。ALA は、亜麻仁種子中に 23%、亜麻仁油中に 57% 含有されている。特に、亜麻仁油は、その構成成分の半分以上を ALA が占めており、ALA を含む他の植物油と比較して 7 倍以上の含量を有することから、本邦にて機能性表示食品に指定されている (Figure 2) [14, 15]。ALA (オメガ 3 脂肪酸) やリノール酸 (オメガ 6 脂肪酸) (Figure 3) は、体内で他の脂肪酸から合成することができないため、食品を介して摂取する必要がある「必須脂肪酸」である。これら必須脂肪酸のうち、オメガ 3 脂肪酸である ALA が欠乏すると、鱗状皮膚炎、出血性皮

膚炎、結節性皮膚炎、成長障害等を生じることが知られている [16]。厚生労働省策定の「日本人の食事摂取基準(2020年版)」では、オメガ3脂肪酸は、成人男性で2.0~2.2 g/day、成人女性で1.6~2.0 g/dayの摂取が目標値として設定されており、現時点での摂取量は、成人男性で約2.0 g/day、成人女性で約1.8 g/dayと摂取目標は達成できている [16]。オメガ3脂肪酸は、脂質代謝改善作用等の有益な効果が示唆されており、生活習慣病予防の目的で継続した摂取が望まれる成分である [16]。リグナンは植物の種子や皮、茎に多く含まれるフェノール化合物の一種であり、ゴマや亜麻に含まれており、ゴマに含まれるリグナンの一種にセサミン、亜麻に含まれるリグナンの一種にセコイソラリシレシノールジグルコシド (SDG) (Figure 3) が挙げられる [17]。SDG は、腸内細菌によってエンテロリグナンであるエンテロジオールやエンテロラクトンに変換され (Figure 4)、それらが女性ホルモンであるエストロゲンと類似の作用を有することから、植物エストロゲンと呼ばれ、更年期障害等の婦人科系の症状に効果を示す [17]。また、リグナンは、強力な抗酸化作用を示すとともに、コレステロール降下作用 [18] や肝機能改善作用 [19] を有することが知られている。リグナンは、様々な食物 (種子類、穀類、豆類、野菜類、ベリー類等) に含まれるが、亜麻仁には他の食物と比較して非常に多くのリグナン (SDG として) が含まれており (Table 1) [20]、リグナンの摂取に最適な食物である。食物繊維は、人の消化酵素で消化されない食物中の難消化性成分の総体と定義され、不溶性食物繊維であるセルロースやリグニン、水溶性食物繊維であるペクチンやアルギン酸が該当する。食物繊維には、整腸効果に基づく便秘予防の他、心筋梗塞リスクの低下、血糖値上昇の抑制、血液中のコレステロール濃度の低下など、多くの生理機能を示すことが明らかにされている [21]。厚生労働省策定の「日本人の食事摂取基準(2020年版)」では、食物繊維の1日あたりの摂取目標量は、18~69歳の男性で20 g以上、同年代の女性で18 g以上とされているが [16]、近年の平均摂取量は約14 g/dayと目標値を下回っており、積極的な摂取が望まれる食品成分である。このように、亜麻仁は機能性成分を豊富に含むため、現代社会において偏りがちな食生活に対してバランスの良い栄養摂取の提供を可能にする機能性食品と言える。

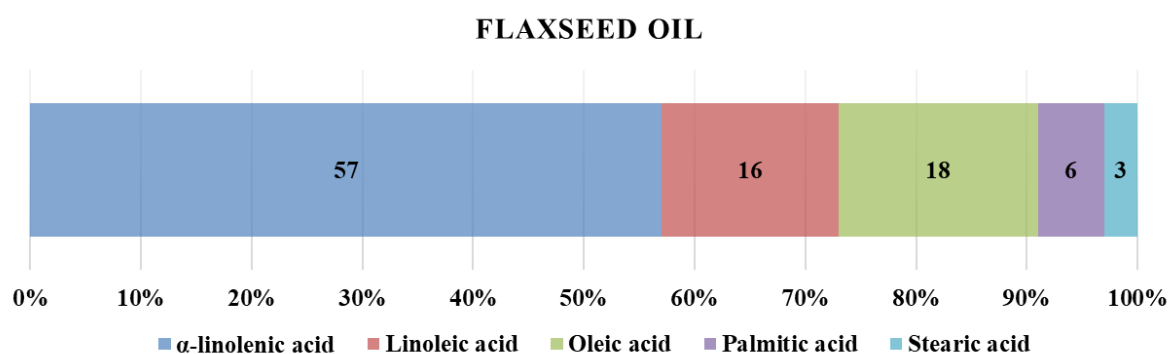
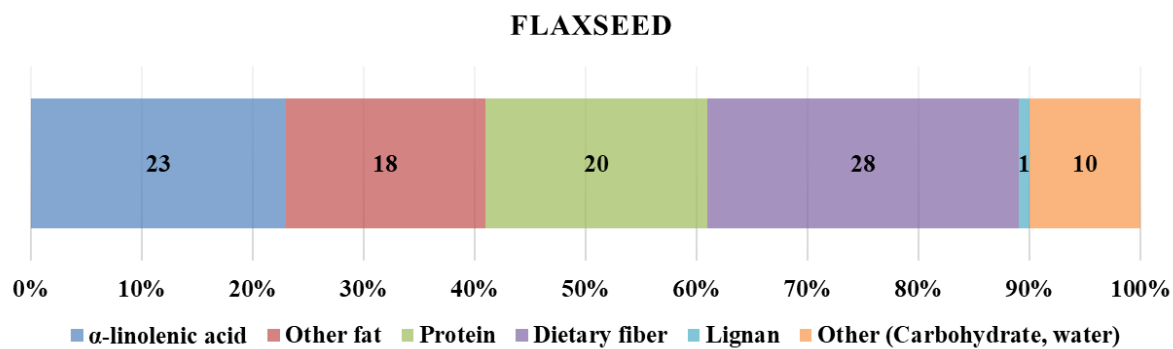


Figure 1. Constituents of flaxseed and flaxseed oil.

文献番号 14 (一部改变)

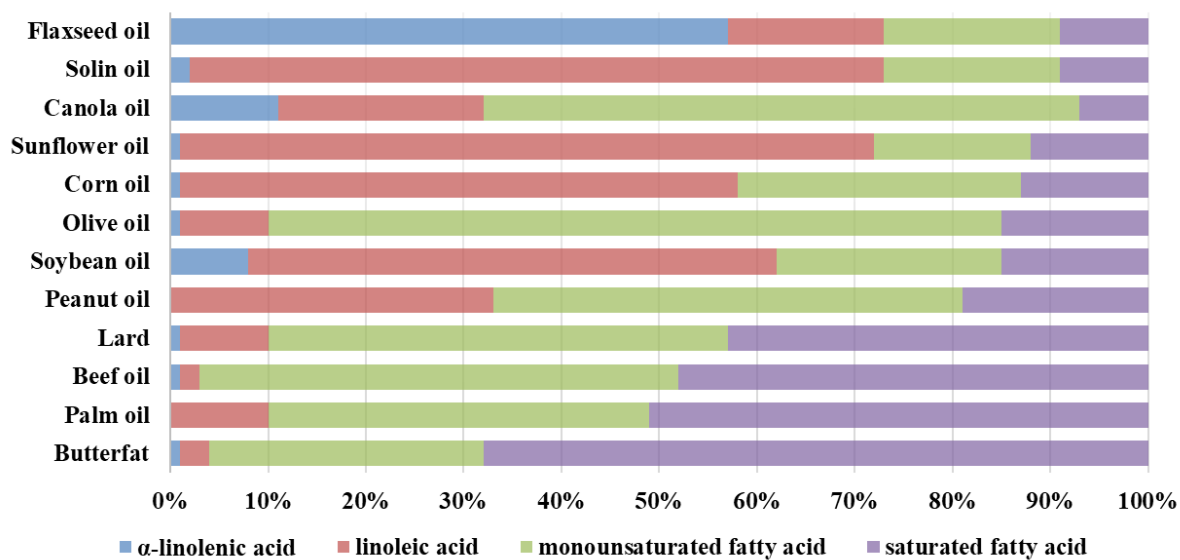
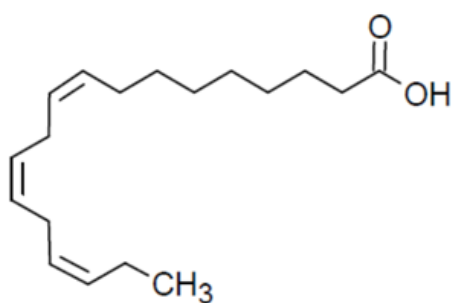
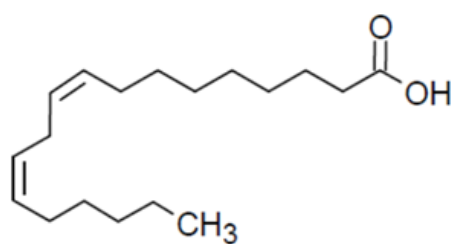


Figure 2. Comparison of saturated and unsaturated fatty acids in dietary fats and oils.

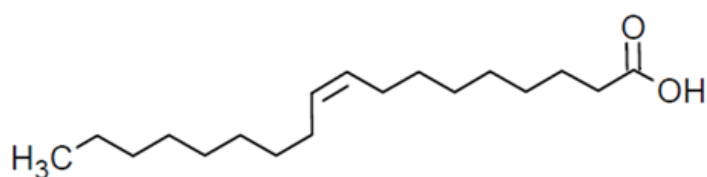
文献番号 15 (一部改变)



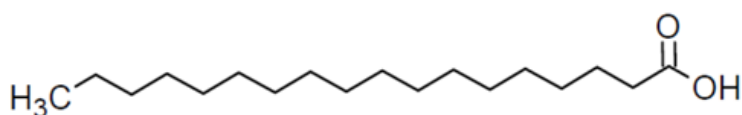
α -Linolenic acid (ALA)



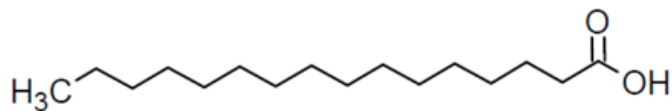
Linoleic acid



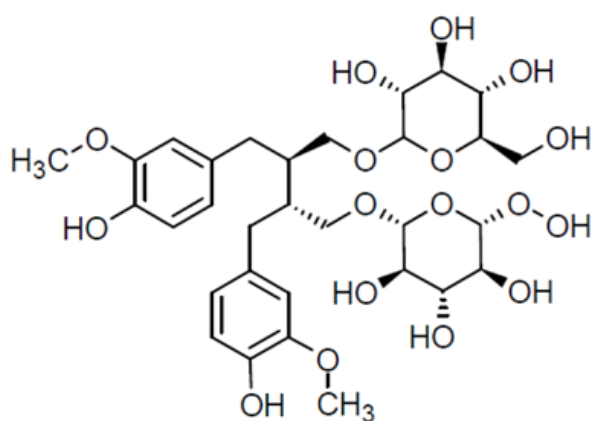
Oleic acid



Stearic acid



Palmitic acid



Secoisolariciresinol diglucoside (SDG)

Figure 3. Structures of α -linolenic acid, linoleic acid, oleic acid, stearic acid, palmitic acid, and secoisolariciresinol diglucoside.

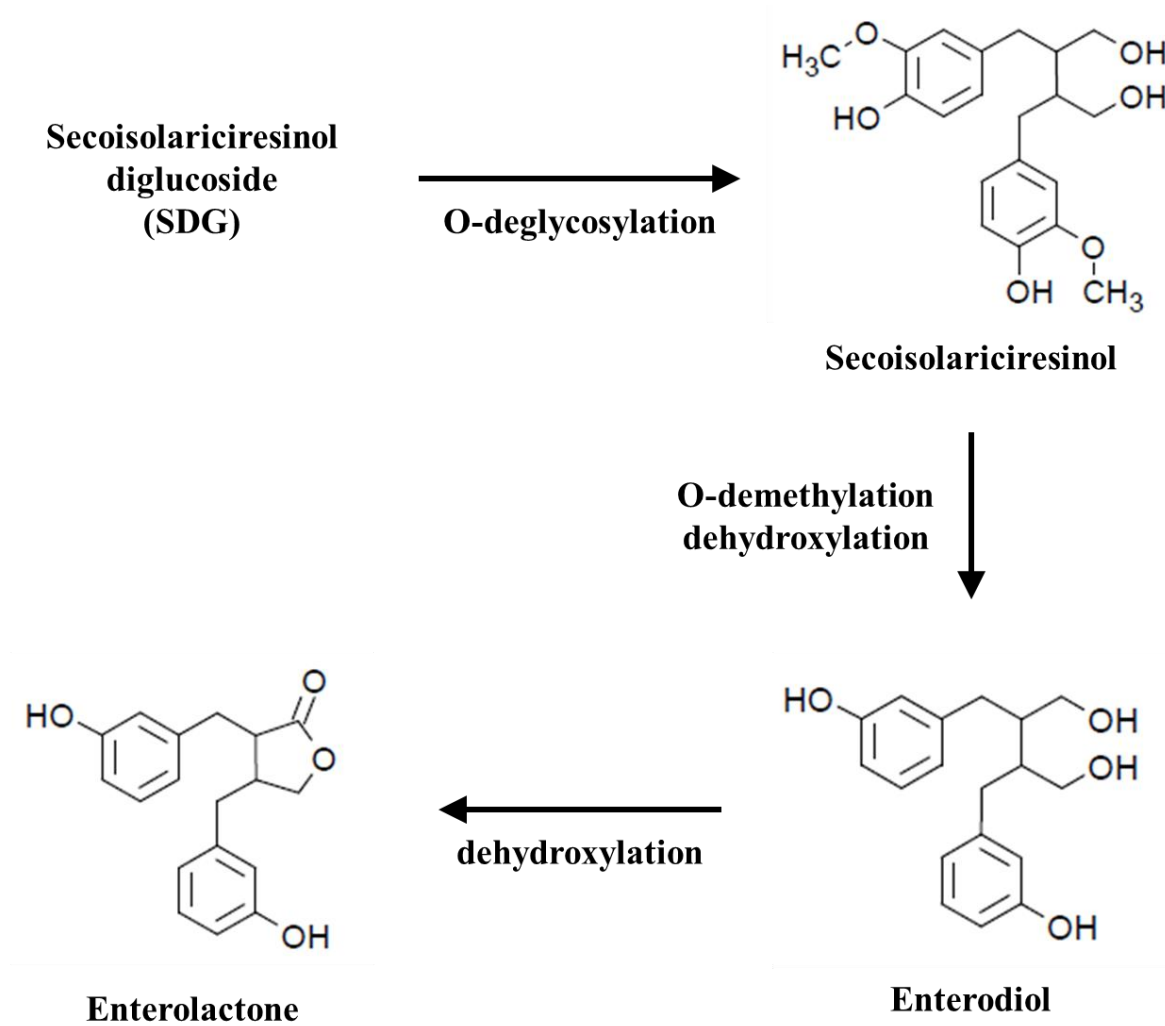


Figure 4. Structures of enterolignans and metabolic pathway of SDG to enterodiols and enterolactone.

Table 1. Lignan contents in various foods.

Food and food group	Secoisolariciresinol (μg/g)
Seeds	
Flaxseed	3699
Sunflower	6.1
Caraway	2.21
Pumpkin	213.7
Legumes	
Soybean	2.73
Peanut	3.33
Pigeon pea	0.5
Urid dahl bean	2.4
Nuts	
Walnut	1.63
Almond	1.07
Berries	
Blackberry	37.1
Lingonberry	15.1
Strawberry	12.1
Cranberry	15.1
Red currant	1.6
Cereals	
Oatmeal	0.1
Oat bran	0.24
Rye meal, whole grain	0.5
Rye bran	1.32
Vegetables	
Broccoli	4.14
Garlic	3.79
Carrots	1.92
Coffee and tea	
Arabia coffee	7.16
Green tea	24.6
Black tea	15.9

文献番号 20 (一部改变)

亜麻仁の高血圧に対する有効性に関しては、軽度の高血圧を呈する末梢動脈疾患患者を対象としたカナダにおける無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験（FLAX-PAD trial）において、亜麻仁粉末が血圧降下作用を示すことが報告されている [22]。本報告では、1日あたり 30 g の亜麻仁粉末を 6 ヶ月間摂取することにより収縮期血圧（SBP）がプラセボ群と比較して約 15 mmHg 低下したと、並びに SBP の低下の程度が血中 ALA 濃度と負の相関関係にあることが示されている。本報告における亜麻仁粉末の効果（SBP の約 15 mmHg の降下）は、他の機能性食品の介入による効果と比較して同等かそれ以上であり、多くの高血圧治療薬の効果にも匹敵する [23]。また、軽度の高血圧を呈する脂質代謝異常症患者を対象としたギリシャにおける前向きランダム化並行群間比較試験では、亜麻仁油（15 mL/day）を 12 週間摂取した群において、摂取後にプラセボ群と比較して有意な血圧の低下を認めたことが報告されている [24]。このように、2 つの臨床研究において、亜麻仁が降圧効果を示すことが報告されており、その作用に ALA が関与している可能性が示唆されている。しかし、亜麻仁の有効性における ALA 以外の機能性成分の関与や詳細な作用機序等、未だ解明されていない点が多い。また、高血圧が慢性腎臓病のリスクファクターの一つであるように、高血圧と腎機能障害には密接な関連性が形成されており、相互に増悪し合う関係にあることから、高血圧患者における血圧の適切なコントロールは、慢性腎臓病への進行を防ぐ重要な手段となる [25]。亜麻仁は、血圧の上昇に付随して生じる腎機能障害に対しても保護的に作用することが高血圧モデルラットを用いた実験において報告されており [26]、亜麻仁の摂取が、高血圧患者において、血圧の管理やその後の慢性腎臓病への進行予防に有用である可能性が示唆されている。しかしながら、腎保護効果についても、亜麻仁の腎臓への直接的な作用に基づく効果か、或いは降圧効果に基づいた二次的な効果かについては不明である。

亜麻仁は、血漿中のレニン活性やアンジオテンシン変換酵素（ACE）活性を抑制する作用が報告されており、レニン-アンジオテンシン系（RAS）の抑制を介して降圧効果を発揮していると考えられている [26-28]。RAS は、血圧や体液調節に関与する全身性の循環 RAS と、脳、心臓、腎臓、血管等で組織特異的に発現し、各種臓器の機能調節や疾患進展（炎症及び線維化反応による病的な組織リモデリング）に関与する組織 RAS に大別される [29]。循環 RAS は、腎臓由来のレニンと肺由来の ACE が、肝臓由来のアンジオテンシノーゲンからアンジオテンシン I（Ang I）を介してアンジオテンシン II（Ang II）に変換する機構であり、Ang II の産生の際は循環血漿中となる。一方で、組織 RAS を有する臓器では、臓器内で Ang II の産生に必要な環境が整っており、Ang II の産生が一つの臓器内で完結する。ACE 阻害薬やアンジオテンシン II type 1（AT1）受容体拮抗薬（ARB）は、循環 RAS と組織 RAS をともに阻害するが、循環 RAS の阻害では短期的な降圧効果、組織 RAS の阻害では高血圧病態下での臓器障害に対する長期的な臓器保護効果が期待できる。前述のとおり、亜麻仁は、血漿中のレニン及び ACE 活性を阻害することが報告されていることから、循環 RAS の抑制に基づいて降圧効果を発揮することが示唆される。

亜麻仁と高血圧の研究において、未だ解明されていない点を三項目にまとめた。即ち、①亜麻仁に含まれる ALA 以外の各種機能性成分の降圧効果及び腎保護効果、②亜麻仁の降圧及び腎保護効果における循環 RAS 阻害以外の作用機序、特に高血圧の成因論に重要な交感神経の関与、並びに③ストレス性の血圧上昇に対する効果（ストレス耐性）である。①に関しては、前述のとおり、臨床研究に

において亜麻仁の効果発現における ALA の関与が示唆されているが、リグナンや食物繊維等のその他の機能性成分の関与は明らかではない。亜麻仁の降圧及び腎保護効果に関わる機能性成分の解明は、亜麻仁の作用機序解析において有用な情報となる。②に関しては、循環 RAS 阻害作用が示唆されているが、その他の作用機序は不明である。含有される有効成分の多い機能性食品については作用機序の解明が不十分な場合が多いが、臨床応用時の主作用や副作用を説明するうえで、作用機序は不可欠な情報となる。降圧効果に関わる作用機序として第一に挙げられるものは、「RAS」とともに高血圧の成因論の二本柱を成す「交感神経の過活動」である [30]。交感神経活動の評価法として、ヒトでは 24 時間畜尿中のカテコールアミン排泄量で評価されることが多いが、ばらつきも大きく、精度の高い評価が困難である。そこで、本研究では、ヒトのストレス度チェックに用いられる心拍の揺らぎ解析に加え、ヒトでは評価が困難な収縮期血圧の揺らぎ解析を行うことで、より正確に交感神経活動と副交感神経活動を評価し、それらに及ぼす亜麻仁の影響を検討した。また、脳内炎症が高血圧における交感神経過興奮の原因の一つであること [31] や、高血圧病態下では、腎臓の RAS が活性化し、酸化ストレスや炎症を介して腎機能障害を誘導すること [32, 33] が報告されていることから、本研究では、昇圧に関わる「脳内炎症と交感神経過活動」、並びに腎機能障害に関わる「腎 RAS と酸化ストレス及び炎症反応」に着目し、亜麻仁の作用機序探索を行った。③に関しては、前述の如く、ストレスと高血圧は相互に因果関係にあり、且つ、心血管イベントのリスクファクターでもある [3, 6]。ストレスは、不安、不眠によるクオリティ・オブ・ライフ (QOL) の低下のみならず、心血管イベントの発症により死亡リスクを増加させるため、ストレス耐性効果は QOL の改善や死亡リスクの低減に有用である。そこで、本研究では、亜麻仁のストレス性の心血管反応への影響についても明らかにすることとした。

酢酸デオキシコルチコステロン (DOCA) 食塩負荷高血圧モデルラットは、ヒトの食塩感受性高血圧に類似した特性を示す高血圧モデルであり、血圧降下作用の評価に用いられる一般的な薬効評価モデルの 1 つである [34, 35]。本モデルでは、食塩負荷による体液量の増加、DOCA による腎でのナトリウム再吸収の促進並びに片腎切除による腎への負荷増大が重なり、重度の高血圧とともに、酸化ストレスや炎症を伴った腎機能障害が認められる [36-38]。また、DOCA 及び食塩の処置は、交感神経系の過活動と脳内の自律神経中枢における炎症を引き起こす [39-41]。交感神経活動の亢進は、末梢でのカテコールアミンの産生を介して、心拍出量の増大、血管収縮、腎臓でのレニン産生を促し、血圧を上昇させる [42]。さらに、脳内の炎症は交感神経活動を亢進させることから [31]、脳内炎症とそれに付随した交感神経の過活動は、高血圧における重要な病因の一つであると考えられる。加えて、本モデルでは、水及びナトリウムの貯留に基づくネガティブフィードバックにより血漿レニン活性が低下するため、ACE 阻害薬や ARB の投与による循環 RAS の阻害では降圧効果が認められない [43, 44]。したがって、本モデルは、循環 RAS 非依存性の降圧機序の解明に有用なモデルである。

本研究では、上述した①～③の未解明の点を明らかにすることを目的に、DOCA 食塩負荷高血圧モデルを用いて、以下の検討を行った。まず、これまでに本モデルにおける亜麻仁粉末及び亜麻仁油の腎・血管系への効果は報告されていないため、第 1 章では、本モデルを用いて、亜麻仁粉末及び亜麻仁油の降圧効果、腎保護効果を明らかにするとともに、両者の効果の差異について検討した。続いて、第 2 章では、亜麻仁に含まれる各種機能性成分の降圧効果及び腎保護効果を明らかにするため、亜麻

仁に含有されるリグナンと食物繊維の昇圧及び腎機能障害に対する影響を検討し、亜麻仁粉末の効果と比較した。最後に、第3章では、亜麻仁の降圧効果及び腎保護効果に関わる作用機序の解明を目的に、高血圧及び腎機能障害の病態発症及び進展に関わる自律神経活動、脳内炎症、腎 ACE 活性、腎酸化ストレス及び腎炎症に着目し、これらに対する亜麻仁油の影響を評価した。また、ストレス性の昇圧と自律神経活動変化に対する影響も併せて評価し、ストレス耐性効果について検討した。

第1章

亜麻仁の DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットにおける降圧及び腎保護効果

第1節 緒言

機能性食品は、近年の健康志向の高まりに伴い、食品科学分野において注目を集めている。数多くの機能性食品の中でも、亜麻科植物の種子である亜麻仁 (flaxseed) は、生体に有益な多様な機能を有する食品として、本邦を含め各国から支持されている [9]。亜麻仁は、オメガ3 不飽和脂肪酸である ALA、フェノール化合物の一種であり抗酸化物質であるリグナン及び腸内環境の正常化を担う食物繊維等の機能性成分を豊富に含む (Figure 1) [10]。本邦では、亜麻仁を焙煎し、粉末状にしたものが販売されている。また、亜麻の種子の圧搾により得られる植物油である亜麻仁油は、亜麻仁とは異なり脂質以外の成分を含まないが、亜麻仁の主要な機能性成分である ALA を豊富に含む (Figure 2) [10] ことが知られており、機能性表示食品として販売されている。このように、亜麻仁は、手軽に入手でき且つ機能性成分を豊富に含むため、日常の食生活に適切に取り入れることで、健康維持、疾病予防が簡便に行える可能性を秘めている。

亜麻仁の有益な機能の一つとして、血圧降下作用が挙げられる。亜麻仁は、軽症高血圧患者や薬剤誘発性の高血圧モデル動物において、血圧降下作用を示すことが報告されている [22, 26]。また、亜麻仁は、高血圧モデル動物の昇圧に付随して生じる腎機能障害に対しても保護的に作用することが報告されている [26]。高血圧と腎機能障害は密接に関連しており、相互に悪化する関係性、即ち悪循環を形成することはよく知られている。実際、臨床研究において、高血圧の適切な治療により腎機能低下の進行が抑制されることが明らかにされている [45]。これは、血圧の適切なコントロールが慢性腎臓病への進行を防ぐ重要な手段であることを示している。以上の点を踏まえると、亜麻仁の摂取は、高血圧患者における血圧の管理及び慢性腎臓病への進行予防に有用と考えられるが、その詳細な機序は、依然として十分には明らかにされていない。

DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットは、ヒトの食塩感受性高血圧に類似した特性を示す高血圧モデルであり、血圧降下作用の評価に用いられる一般的な薬効評価モデルの1つである。また、DOCA の投与及び食塩の摂取は、重度の高血圧を誘導するとともに、昇圧に伴った重篤な腎機能障害を引き起こす [37]。一方で、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットは、RAS を阻害する ACE 阻害薬や ARB による降圧効果が認められないことが、薬剤の開発段階から広く知られている [43, 44]。したがって、本モデルは、亜麻仁の降圧効果に占める RAS 阻害の成分を除外できるとともに、血圧の上昇及びそれに伴い引き起こされる腎機能障害に対する被験物質の有効性の有無を明らかにするために有用なモデルである。しかしながら、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットの昇圧及び腎機能障害に対する亜麻仁粉末及び亜麻仁油の効果については報告されていない。

そこで、第1章では、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットを用いて、亜麻仁粉末及び亜麻仁油の昇圧及び腎機能障害に対する影響を評価し、亜麻仁粉末及び亜麻仁油の降圧、腎保護効果並びに両者の効果の差異について検討した。

第2節 実験材料及び方法

1. 実験動物

実験には、5週齢の雄性 Wistar/ST ラット（120～140 g）（清水実験材料株式会社、京都）を使用した。動物は標準的実験条件である温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 及び12時間毎に明暗となる環境下で飼育し、固形飼料（実験動物用固形飼料MF、オリエンタル酵母工業、東京）及び水道水を自由摂取させた。1週間以上予備飼育した後、無作為に群分けを行い、実験を行った。本研究における動物実験は、すべて京都薬科大学動物実験委員会に申請し、承認を得た上で「京都薬科大学動物実験実施規程」に準じて実施した。

2. 試験物質

亜麻仁粉末及び亜麻仁油は、日本製粉株式会社（東京）より供与されたものを使用した。

3. その他の試薬

DOCA、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na）及びメチルセルロース（MC）は、ナカライテスク株式会社（京都）より、塩化ナトリウム及びマイクロ TP-テストワコーは、富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）より、Tween-20 は Santa Cruz Biotechnology（Dallas, TX）より購入した。

4. 試験物質含有飼料の作製

固形飼料をミルミキサー（JMB-400、株式会社山善、大阪）で粉碎し、粉碎固形飼料 3.5 g と水道水 1.2 mL を混合した後、1.3 g の亜麻仁粉末を加えて混和し、再び固形飼料 1 個に成形して 1 日自然乾燥させたものを亜麻仁粉末含有固形飼料（1.2 g 含有）とした。成形後の試験物質含有固形飼料は強度が劣り、摂食時の飼料粉碎に伴い約 10% の損失が見込まれるため、固形飼料作製時には、目的とする含量に約 10% 加えた量を用いた。

5. DOCA 食塩負荷高血圧モデルの作製

三種混合麻酔〔ドミツール（0.375 mg/kg、日本全薬工業株式会社、福島）、ミタゾラム「サンド」（2 mg/kg、サンド株式会社、東京）、ベトルファール（2.5 mg/kg、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京）、5 mL/kg の容量で投与〕下、ラットの右側背部を 2 cm 程度切開して右腎臓を露出させ、腎被膜を剥離して腎臓と副腎を分離させた後、腎動静脈及び輸尿管を結紮し、腎臓を摘除した。縫合により閉腹し、5% ビビテン液（大日本住友製薬株式会社、大阪）で縫合部を消毒した後、1 週間の回復期を設けた。1 週間後、ラットを無作為に、対照群、亜麻仁粉末（1.2 g/day）群（Low powder 群）、亜麻仁粉末（2.4 g/day）群（High powder 群）、亜麻仁油（0.6 mL/day）群（Low oil 群）及び亜麻仁油（1.2 mL/day）群（High oil 群）の 5 群に振り分けた。

DOCA 溶液は、DOCA を 8 mg/mL、CMC を 3 mg/mL、MC を 10.5 mg/mL 及び塩化ナトリウムを 9 mg/mL となるように各試薬を蒸留水に添加後、Tween-20 を 1 滴添加して一晩攪拌し、調製した。

食塩液は、塩化ナトリウムを 0.5 w/v% の濃度となるように水道水に溶解して調製した。DOCA 食塩負荷高血圧モデルは、8 mg/mL DOCA 溶液を 5 mL/kg の容量で 1 週間に 1 回、計 3 回 (day 0、day 7 及び day 14) 皮下投与 (テルモ注射針、21G を使用) するとともに、食塩液を 3 週間 (day 0～day 21) 自由飲水させることで作製した。

6. 試験物質の投与

試験物質の投与は、day 0 から day 21 まで、以下のとおり行った。Low powder 群及び High powder 群には、亜麻仁粉末含有固形飼料 (1.2 g 含有) をそれぞれ 1 日 1 個及び 1 日 2 個与えた。Low oil 群及び High oil 群には、亜麻仁油をそれぞれ 0.6 mL/day 及び 1.2 mL/day の容量で 1 日 1 回経口投与した。対照群には、特別な処置は行わず、通常の固形飼料を自由摂取させるとともに、水道水を自由飲水させた。Low powder 群と Low oil 群及び High powder 群と High oil 群は、1 日当たりの ALA 摂取量が等しくなるように用量を設定した (それぞれ、0.3 g/day 及び 0.6 g/day)。Table 2 に各群の試験物質に含まれる成分量を記載した。

Table 2. Amount of ALA, lignan or dietary fiber contained in the test substance administered to each group.

Group	Test substance	Dosage	Ingredients		
			ALA	Lignan	Dietary fiber
Low powder	Flaxseed powder	1.2 g/day	0.3 g	6.6 mg	0.26 g
High powder	Flaxseed powder	2.4 g/day	0.6 g	13.2 mg	0.52 g
Low oil	Flaxseed oil	0.6 ml/day	0.3 g	—	—
High oil	Flaxseed oil	1.2 ml/day	0.6 g	—	—

ALA, α -linolenic acid.

7. 収縮期血圧の測定

Day 0、day 7、day 14 及び day 21 に、収縮期血圧 (systolic blood pressure : SBP) を測定した。SBP は、tail-cuff 法 (BP-98A-L、株式会社ソフトロン、東京) にて覚醒下で測定した。以下に測定方法の詳細を記載した。ラットを円筒状の保温器にセットして保体、保温 (保温器設定 : 39°C) し、カフプローブを尾の付け根にセットして、約 5 分静置した。5 分間の静置後、血圧を連続して 5 回測定し、5 回の測定で得られた SBP の平均値を個体値とした。

8. 生化学データの測定

Day -1、day 6、day 13 及び day 20 に、代謝ケージを用いて 24 時間の飲水量及び尿量を測定した。飲水量は、測定前の給水ビン重量から測定後の給水ビン重量を差し引いて算出した。尿量は、採尿に用いたビーカーの重量を事前に測定し、24 時間蓄尿後の「尿 + ビーカー」の重量からビーカーの重量を差し引いて算出した。採取した尿は、遠心分離 (3000 rpm、4°C、5 分間) により餌や糞便等の不純物を遠沈させた後、上清を回収し、使用時まで -80°C で凍結保存した (尿サンプル)。回収

した尿サンプルは、腎機能障害の指標となる尿中蛋白排泄量の測定に用いた。尿中蛋白排泄量は、マイクロ TP-テストワコー付属の発色試薬と尿サンプルを混合して発色させ、紫外可視吸光光度計（SmartSpec 3000、BIO-RAD、Hercules、CA）にて 600 nm の吸光度を測定することにより定量した。

9. 統計処理

結果は、すべて平均 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で示した。統計処理には、統計解析ソフト Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。飲水量、尿量、SBP 及び尿中蛋白排泄量の群間比較には反復測定分散分析を用いた。有意差検定には Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) 法を用い、 $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3節 結果

1. 飲水量及び尿量の推移

対照群の飲水量は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 30.1 ± 1.5 、 76.0 ± 10.0 、 93.4 ± 15.8 及び 80.8 ± 26.4 mL/day であり、DOCA 食塩の負荷により day 7 で急増し、day 14 で最高値を示した後、day 21 で僅かに減少した。Low powder 群、High powder 群、Low oil 群及び High oil 群の飲水量は、試験期間を通して対照群の飲水量と同様の推移を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Table 3)。

対照群の尿量は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 16.5 ± 1.4 、 61.2 ± 8.1 、 74.6 ± 13.8 及び 63.4 ± 21.1 mL/day であり、DOCA 食塩の負荷により day 7 で急増し、day 14 で最高値を示した後、day 21 で僅かに減少した。対照群の尿量の推移は、飲水量の推移と一致していた。Low powder 群、High powder 群、Low oil 群及び High oil 群の尿量は、試験期間を通して対照群と同様の推移を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Table 3)。

以上より、食塩の負荷量は、試験期間を通して各群で同程度であると想定された。

Table 3. The changes in water intake and urine volume in the control, low powder, high powder, low oil, and high oil group.

Parameters	Experimental group	Day			
		0	7	14	21
Water intake (mL/day)	Control	30.1 ± 1.5	76.0 ± 10.0	93.4 ± 15.8	80.8 ± 26.4
	Low powder	34.1 ± 0.9	52.2 ± 5.5	79.6 ± 7.9	75.4 ± 10.6
	High powder	31.0 ± 2.4	64.8 ± 8.7	106.6 ± 11.3	96.0 ± 15.8
	Low oil	30.6 ± 0.7	88.4 ± 13.7	109.2 ± 15.7	88.6 ± 10.9
	High oil	29.7 ± 1.5	92.8 ± 16.7	101.0 ± 20.1	95.0 ± 15.1
Urine volume (mL/day)	Control	16.5 ± 1.4	61.2 ± 8.1	74.6 ± 13.8	63.4 ± 21.1
	Low powder	19.8 ± 1.8	35.8 ± 3.7	57.4 ± 8.3	54.2 ± 6.3
	High powder	18.2 ± 0.8	48.6 ± 6.1	74.0 ± 11.5	79.2 ± 12.7
	Low oil	19.8 ± 1.3	67.6 ± 13.4	87.0 ± 11.8	66.8 ± 9.5
	High oil	21.6 ± 1.2	73.2 ± 14.7	73.2 ± 14.4	74.8 ± 14.5

The values represent the mean \pm SEM of data from 6 animals.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Table 2.

2. 収縮期血圧の推移

対照群の SBP は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 105.9 ± 1.4 、 155.2 ± 5.0 、 196.1 ± 5.9 及び 229.6 ± 6.0 mmHg であり、DOCA 食塩の負荷により経時的に上昇した。Low powder 群、High powder 群、Low oil 群及び High oil 群の SBP は、day 7 の時点でそれぞれ 128.3 ± 6.8 、 135.4 ± 5.4 、 124.8 ± 9.8 及び 117.4 ± 7.9 mmHg であり、いずれも DOCA 食塩負荷の初期段階から対照群の SBP と比較して低値を示した。また、それぞれの群の day 14 の時点での SBP は 173.5 ± 10.0 、 170.3 ± 11.6 、 184.0 ± 12.3 及び 165.0 ± 4.1 mmHg、day 21 の時点での SBP は 192.6 ± 10.1 、 178.1 ± 11.0 、 192.5 ± 10.2 及び 207.5 ± 14.2 mmHg であり、いずれも対照群の対応する時点の SBP と比較して低値を示しており、対照群との間に統計学的な差が認められた (Figure 5)。Powder 群と oil 群又は低用量群と高用量群の SBP の推移に、大きな差は認められなかった。

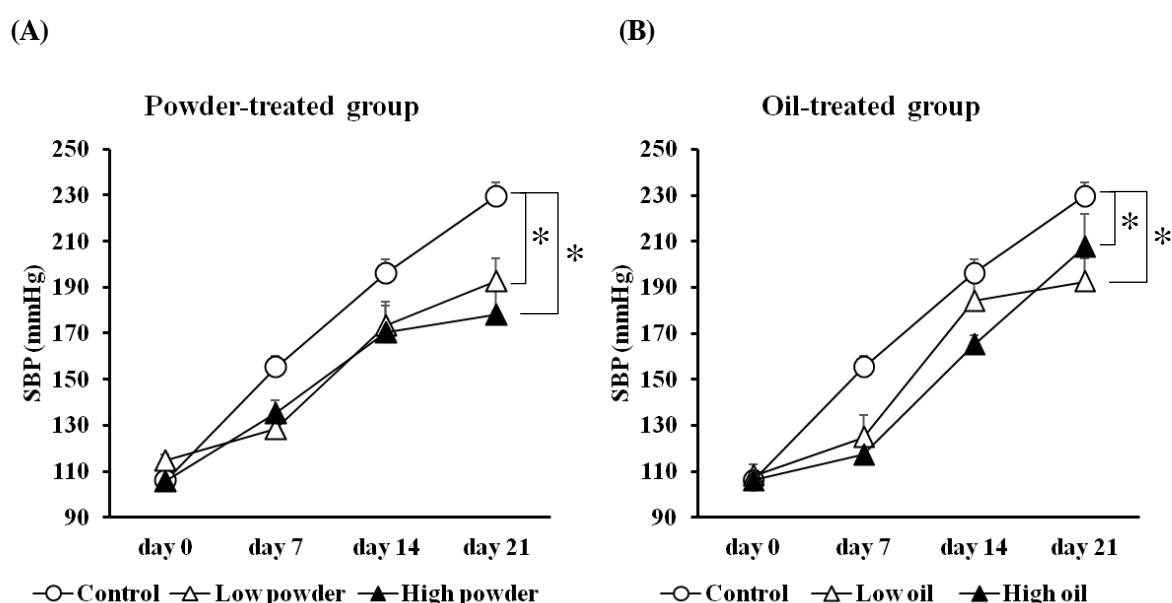


Figure 5. Effects of flaxseed powder and flaxseed oil on the SBP in DOCA-salt rats. (A) Flaxseed powder (low, 1.2 g/day; high, 2.4 g/day) supplemented diets were administered from day 0 to day 21. (B) Flaxseed oil (low, 0.6 mL/day; high, 1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. The SBP was measured at the indicated time points. Data points and bars show the mean \pm SEM of data from 6 animals. * $p < 0.05$ versus the control group. SBP, systolic blood pressure.

Watanabe et al. *Pharmacology*. 2019, 105, 54-62. Figure 1.

3. 尿中蛋白排泄量の推移

対照群の尿中蛋白排泄量は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 2.3 ± 0.1 、 35.5 ± 14.2 、 105.2 ± 33.5 及び 331.4 ± 38.1 mg/day であり、DOCA 食塩の負荷により経時的に上昇した。Low powder 群、High powder 群及び High oil 群の尿中蛋白排泄量は、day 7 の時点でそれぞれ 6.3 ± 1.8 、 7.7 ± 1.7 及び 8.8 ± 1.9 mg/day であり、いずれも DOCA 食塩負荷の初期段階から対照群の尿中蛋白排泄量と比較して低値を示した。また、それぞれの群の day 14 の時点での尿中蛋白排泄量は 35.3 ± 11.7 、 64.3 ± 23.6 及び 43.3 ± 10.9 mmHg、day 21 の時点での尿中蛋白排泄量は 181.8 ± 52.7 、 151.3 ± 31.5 及び 171.1 ± 54.6 mmHg であり、いずれも対照群の対応する時点の尿中蛋白排泄量と比較して低値を示しており、対照群との間に統計学的な差が認められた (Figure 6)。Low powder 群、High powder 群及び High oil 群の尿中蛋白排泄量の推移に、大きな差は認められなかった。Low oil 群の尿中蛋白排泄量は、day 7、day 14 及び day 21 の時点でそれぞれ 14.1 ± 4.6 、 97.4 ± 41.3 及び 218.0 ± 46.7 mg/day であり、day 7 及び day 21 では対照群の尿中蛋白排泄量よりも低値を示したが、day 14 では対照群と同程度の値を示し、試験期間を通して対照群との間に統計学的な差は認められなかった。

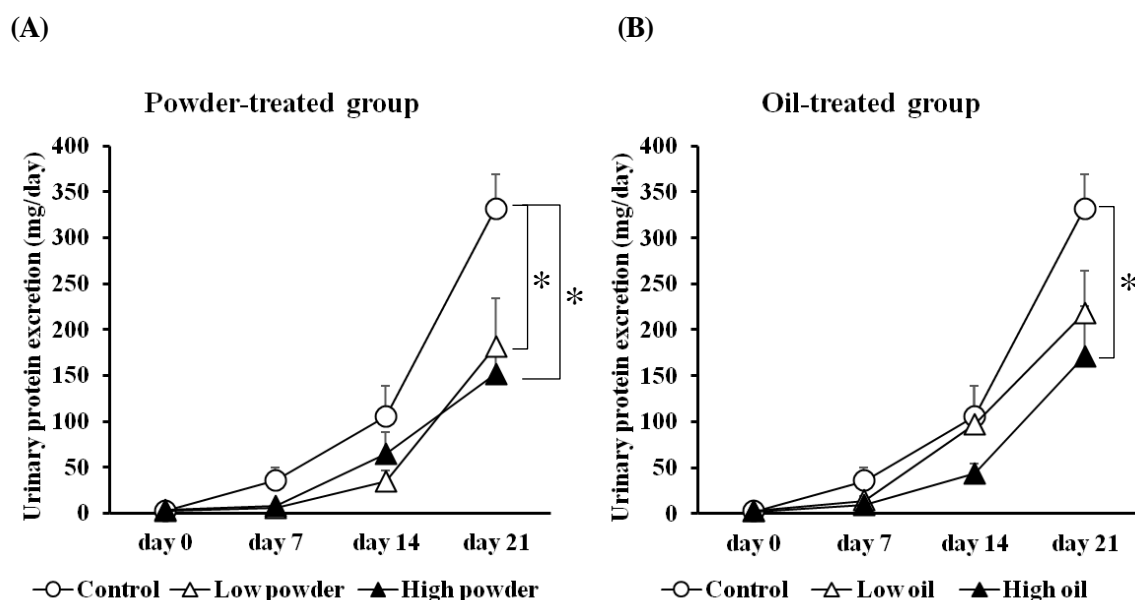


Figure 6. Effects of flaxseed powder and flaxseed oil on the urinary protein excretion in DOCA-salt rats. (A) Flaxseed powder (low, 1.2 g/day; high, 2.4 g/day) supplemented diets were administered from day 0 to day 21. (B) Flaxseed oil (low, 0.6 mL/day; high, 1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. The urinary protein excretion was measured at the indicated time points. Data points and bars show the mean \pm SEM of data from 6 animals. * $p < 0.05$ versus the control group.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Figure 1.

第4節 考察

本章において、1.2 g/day 及び 2.4 g/day の亜麻仁粉末並びに 0.6 mL/day 及び 1.2 mL/day の亜麻仁油が DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットで認められた SBP の経時的な上昇を抑制すること、また両投与量の亜麻仁粉末並びに高用量の亜麻仁油が同モデルラットの血圧上昇に伴い観察された腎機能障害を抑制することを見出した。

カナダにおける、110 人の軽症高血圧を呈する末梢動脈疾患患者を対象とした無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験 (FLAX-PAD trial) において、亜麻仁粉末 (30 g/day) を 6 ヶ月間摂取した群では、プラセボ群と比較して収縮期血圧及び拡張期血圧が有意に低下することが報告されている [22]。また、ギリシャにおける、87 人の脂質代謝異常症患者を対象とした前向きランダム化並行群間比較試験において、オメガ 3 不飽和脂肪酸である ALA を含む亜麻仁油 (15 mL/day) を 12 週間摂取した群では、摂取後に有意な血圧の低下を認めたのに対し、オメガ 6 不飽和脂肪酸であるリノール酸を含む紅花油 (15 mL/day) を同様に摂取した群では血圧の低下は認められなかったことが報告されている [24]。このように、亜麻仁粉末及び亜麻仁油は、高血圧を呈するヒトにおいて降圧作用を示すことが報告されている。本研究で用いた亜麻仁粉末及び亜麻仁油の用量は、ラットの体重を 200 g とした場合、それぞれ 6~12 g/kg/day 及び 3~6 mL/kg/day となり、体表面積を基に算出したヒト等価用量は、それぞれ 1~2 g/kg/day 及び 0.5~1 mL/kg/day となる (体表面積換算係数は 6 [46])。上述の臨床報告では、ヒトの体重を 60 kg とした場合、亜麻仁粉末として 0.5 g/kg/day、亜麻仁油として 0.25 mL/kg/day を投与しており、本研究では臨床研究での投与量の 2~4 倍高い用量を使用したことになる。一方、Al-Bishri らは、シクロスポリン誘発性の血圧上昇を示すラットに 10 w/w% の亜麻仁粉末を 8 週間摂取させることで、SBP 及び拡張期血圧が対照群と比較して有意に低下することを報告している [26]。本報告のラットの平均摂餌量は約 22 g/day であることから、投与量は約 2.2 g/day となる。また、Ogawa らは、10 w/w% の亜麻仁油添加食を自然発症高血圧モデルラット (SHR) に 4 週間摂取させることで、SBP が対照群と比較して有意に低下することを報告している [27]。本報告のラットの平均摂餌量は 16 g/day であること、また亜麻仁油の比重は 0.93 であることから、投与量は約 1.7 mL/day となる。これらの知見から、ラットモデルにおける降圧効果の評価に用いられる亜麻仁粉末及び亜麻仁油の用量は既報と本研究で概ね一致しており、本研究で得られた結果は、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットに対する亜麻仁粉末及び亜麻仁油の有効性の検証という点で、妥当なものであると考えられる。

DOCA 食塩負荷高血圧モデルは、各種高血圧治療薬の降圧効果の評価に用いられている。Toba らは、本モデルにおいて、カルシウム拮抗薬であるアムロジピン (1 mg/kg) 及びシルニジピン (1 mg/kg) が、4 週間の経口投与により SBP を約 10 mmHg 降下させることを報告している [37]。Schupp らは、同モデルにおいて、利尿薬であるスピロノラクトン (50 mg/kg) が 6 週間の経口投与により SBP を約 15 mmHg 降下させることを報告している [47]。Callens-el Amrani らは、同モデルにおいて、 β 遮断薬であるプロプラノロール (15 mg/kg) が 7 週間の経口投与により SBP を約 30 mmHg 降下させることを報告している [48]。一方、本研究では、亜麻仁粉末及び亜麻仁油は、3 週間の経口投与により SBP を 20~50 mmHg 降下させた。既報と本研究では薬効評価期間やモデルの作製条件 (DOCA 溶液や食塩液の濃度) が異なるため、試験物質の有効性を比較して亜麻仁の降圧効果の強度を考察することは

難しいが、いずれにしても、各種高血圧治療薬が有効性を示す高血圧モデルにおいて、亜麻仁も同様に明確な降圧効果を示すことが明らかとなった。本研究において、DOCA 食塩負荷高血圧モデルは、急激かつ持続的な SBP の上昇とともに重度の腎機能障害を示し、亜麻仁粉末及び亜麻仁油は、これらの昇圧と腎機能障害をともに抑制した。亜麻仁の高血圧に対する動物実験としては、これまでに、シクロスポリン誘発高血圧モデルを用いた亜麻仁粉末の降圧及び腎保護効果 [26]、並びに SHR を用いた亜麻仁油の降圧効果 [49] が報告されているが、一つ目の報告における対照群の血圧は約 130 mmHg、二つ目の報告における対照群の血圧は約 160 mmHg であり、いずれも本研究のモデル (約 230 mmHg) と比較して高血圧病態は軽度であった。また、腎機能は、血圧の上昇に伴って低下することが一般的に知られていることから、既報のモデルの腎機能障害は、本研究のモデルと比較しても軽度であると想定される。これらの知見と本研究の結果より、亜麻仁は、軽度の高血圧のみならず比較的重度の高血圧に対しても降圧効果を発揮するとともに、重度の高血圧に基づいて生じた腎機能障害に対しても保護的に作用することが明らかとなった。先述の亜麻仁粉末及び亜麻仁油を用いた臨床研究では、比較的重症の高血圧を呈する患者を対象として有効性評価が行われていたが、本章において、亜麻仁は、重度の高血圧を呈する患者に対しても降圧及び腎保護効果を発揮するポテンシャルを秘めた機能性食品であることを示唆する結果が得られた。さらに、緒言で述べたとおり、本モデルは RAS 阻害による降圧効果が期待できないことから、亜麻仁が RAS の寄与の少ない昇圧反応に対しても抑制効果を示すことが明らかとなった。本モデルに類似の病態を示す食塩感受性高血圧患者は、ACE 阻害薬や ARB といった RAS 阻害薬による治療に対して耐性を示すことが知られている [50]。したがって、亜麻仁は、昇圧に RAS の関与する高血圧のみならず、RAS 阻害薬に耐性を示す食塩感受性高血圧に対しても有用である可能性が示唆された。最近では、高血圧治療ガイドラインにおいて、特定保健用食品や機能性表示食品の承認申請に必要な臨床試験要件が降圧薬のそれに比して少ない点、並びにそれらの食品に含まれる降圧効果を有する成分には十分な作用が期待できない点から、降圧薬の代替品にはならず、降圧効果に過剰な期待を持たないように指導するとともに、摂取について積極的には勧めないことが記載されるようになった [3]。そのため、本章の結果に基づいて、亜麻仁の摂取を薬物療法の代替として高血圧患者に対して勧めることは適切ではないが、亜麻仁の最大効力を証明することができたという点では、意義深い結果と考えられる。

亜麻仁粉末及び亜麻仁油は、本モデルにおいて、いずれの用量でも昇圧を抑制し、また Low oil 群を除き明確な腎保護効果を示した。各試験物質投与群において SBP の推移に明確な群間差はなかったが、day 21 の SBP は High powder 群で最も低かった。また、Low oil 群を除き、尿中蛋白排泄量の推移にも明確な群間差はなかったが、day 21 の尿中蛋白排泄量は High powder 群で最も低かった。これら結果より、高用量の亜麻仁粉末が最も強い降圧及び腎保護効果を示すことが示唆された。一方、低用量群に着目すると、降圧効果には亜麻仁粉末投与群と亜麻仁油投与群で差はなかったが、腎保護効果は亜麻仁粉末投与群でのみ認められた。これらの結果から、亜麻仁粉末は、亜麻仁油と比較して高血圧及び腎機能障害に対して高い有効性を発揮することが示唆された。亜麻仁粉末が亜麻仁油と比較して高血圧及び腎機能障害に対してより高い有効性を示した要因として、含有成分の違いが挙げられる。亜麻仁粉末は、脂肪酸である ALA に加えてリグナン及び食物繊維を豊富に含むのに対して、亜麻仁油は脂肪酸のみで構成される。本研究では、亜麻仁粉末と亜麻仁油に含まれる ALA の含量が

一致するように投与量を設定しているため、亜麻仁粉末に含まれる ALA 以外の成分の存在が、より強い降圧及び腎保護効果の発揮に繋がったと推察された。実際、リグナン及び食物繊維はそれぞれ単独で降圧効果を示すことが報告されているが [19, 35]、本研究で用いた亜麻仁粉末の投与物中に含まれるリグナン及び食物繊維が、本モデルの昇圧に及ぼす影響は不明である。本件については、第 2 章で詳細を述べる。また、亜麻仁粉末及び亜麻仁油は、本モデルの昇圧と腎機能障害の両方に対して有効性を認めたが、腎保護効果が腎への直接作用に起因するものか或いは昇圧抑制効果に基づく間接的な作用に起因するものかについては、第 3 章で考察する。

ALA を主成分とする亜麻仁油は、本モデルにおいて明確な降圧及び腎保護効果を示した。亜麻仁油には、遊離脂肪酸として、オメガ 3 不飽和脂肪酸である ALA の他に、オメガ 6 多価不飽和脂肪酸であるリノール酸、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸並びに飽和脂肪酸であるパルミチン酸及びステアリン酸が含まれており (Figure 1 及び Figure 3) [14, 24]、亜麻仁油中では、これらとグリセロールがエステルを形成したトリアシルグリセロール又はジアシルグリセロールとして存在している [51]。これらの脂肪酸のうち、不飽和脂肪酸であるリノール酸とオレイン酸は、軽症高血圧患者又は高血圧モデルラットに対する ALA との比較試験において、ALA と同量を投与しても降圧効果を示さないことが報告されている [24, 27]。また、飽和脂肪酸を多く含有する食品の長期的な摂取は、高血圧リスクを高める可能性が示唆されている [52]。以上の知見より、本モデルにおける亜麻仁油の降圧及び腎保護効果に寄与する脂肪酸は ALA であると考えられた。

オメガ 3 多価不飽和脂肪酸については、臨床研究においてその降圧効果が実証されており、血圧コントロールを目的とした食生活の改善の一環として、オメガ 3 多価不飽和脂肪酸を豊富に含む食品の摂取が推奨されている [53, 54, 55]。主なオメガ 3 多価不飽和脂肪酸として、ALA 並びにその代謝産物であるエイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) (Figure 7) が挙げられる。これらは、オメガ 6 多価不飽和脂肪酸であるリノール酸、 γ -リノレン酸及びアラキドン酸 (Figure 7) よりも強力な ACE 阻害作用を示すことが報告されている [56]。また、摂取された EPA や DHA は、生体膜リン脂質のアラキドン酸と置き換わることにより、血漿中における血管収縮性のトロンボキサン類の低下と血管拡張性のプロスタサイクリン類の上昇を誘導することが報告されている (Figure 8) [57]。以上の知見より、ACE 阻害作用やアラキドン酸との置換によるプロスタノイドバランスの変化が、オメガ 3 多価不飽和脂肪酸の降圧効果に関わる作用機序と推察される。ALA は、ACE 阻害作用に基づいて降圧効果を発揮することが示唆されている [26]。また、ALA は生体内で代謝されて EPA 及び DHA へ変換されるため、プロスタノイドバランスへの影響も期待される。したがって、亜麻仁の降圧効果及び腎保護効果の発揮に関わる作用機序の一部として、上述した ALA の作用の関与が示唆される。亜麻仁の本モデルにおける効果の発現に関わる作用機序については、第 3 章で詳細を述べる。

亜麻仁は、血圧降下作用以外にもコレステロール降下作用 [18] や肝機能改善作用 [19] が報告されている。臨床研究でも、亜麻仁 (30 g/day) の 40 日間投与により高脂血症に対して有効性を示すこと [58]、また、亜麻仁 (30 g/day) の 12 週間投与により非アルコール性脂肪性肝疾患 [59] に対して有効性を示すことが報告されており、他の疾患に対しても、高血圧と同等の用量で有効性を示すことが期待される。亜麻仁の副作用については、上述の臨床研究及び高血圧患者に対する研究を含め、

亜麻仁の投与による明確な副作用は認められておらず、ヒトにおいては長期投与でも良好な忍容性を示すことが明らかとなっている。一方、マウスを用いた実験において、0.6～1.4 mL/day の用量の亜麻仁油の単回経口投与により、糞中水分量が増加することが報告されており、本作用はムスカリン受容体刺激に基づいた作用であることが示唆されている [60]。今回行った研究では、亜麻仁の連投による明らかな下痢の誘発は認められておらず、臨床研究でも下痢の誘発を示す報告はないため、亜麻仁の摂取による下痢のリスクは極めて少ないと考えられる。しかし、動物種は異なるものの、本研究で薬効評価に用いた用量とほぼ同じ用量で便の軟化が認められたこと、並びに、亜麻仁が臨床において便秘を改善する効果が報告されていること [61] を考慮すると、軟便体質等の感受性の高いヒトにおいては、亜麻仁を摂取する際は継続した便のチェック等の自己管理が必要かもしれない。

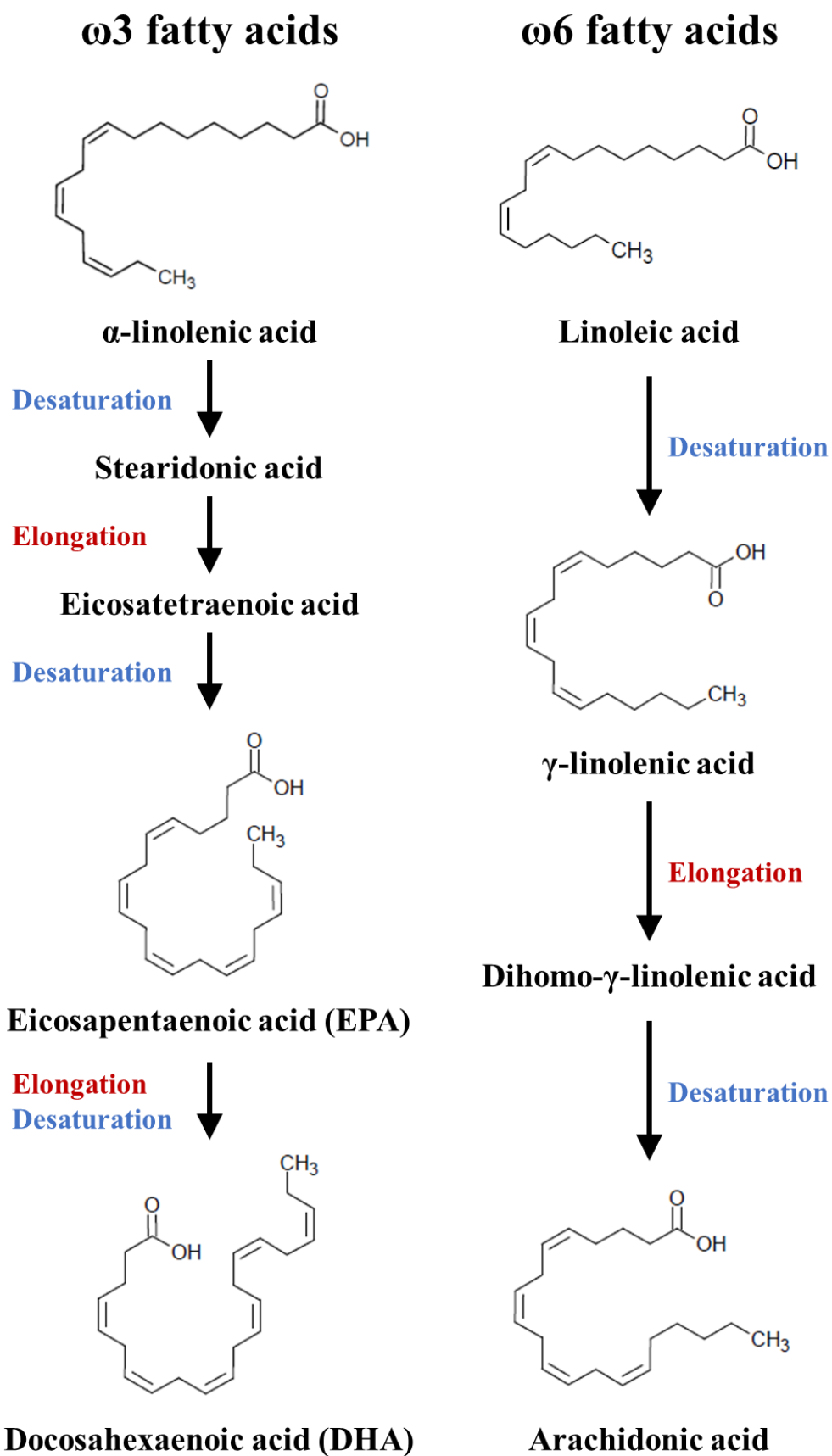
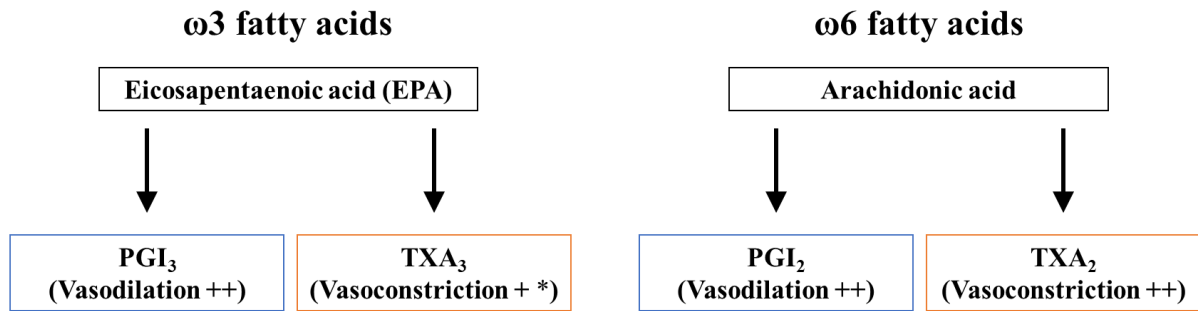


Figure 7. Structures and metabolic pathway of fatty acids.



*: The vasoconstriction of TXA₃ is about 1/10 of TXA₂ [62].

Figure 8. Effects of metabolites of EPA and arachidonic acid on blood vessels.

Ingestion of ALA changes the proportion of fatty acids that make up the membrane phospholipids (increase in EPA and decrease in arachidonic acid). The change results in increased production of PGI₃ and TXA₃, prostanoids derived from EPA, and a decrease in PGI₂ and TXA₂, a prostanoid derived from arachidonic acid. Decrease in TXA₂, a potent vasoconstrictor, and increase in PGI₃, a vasodilator, result in dilation of blood vessels and lowering of blood pressure.

第5節 小括

本章では、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットを用いて、亜麻仁粉末及び亜麻仁油が、比較的重度な昇圧及び腎機能障害に対して、降圧効果及び腎保護効果を示すことを明らかにした。また、本モデルにおいて、亜麻仁粉末が、亜麻仁油と比較してより高い降圧効果及び腎保護効果を示すことを見出した。これは、亜麻仁粉末に含まれる ALA 以外の成分の存在に起因する現象であると推察された。

第2章

亜麻仁の降圧及び腎保護効果における各種機能性成分の関与

第1節 緒言

亜麻仁は、オメガ3不飽和脂肪酸であるALA、フェノール化合物であるリグナン及び食物繊維といった機能性成分を豊富に含む (Figure 1) [10]。亜麻仁の主要な機能性成分であるALAは必須脂肪酸であり、その含量は亜麻仁の全構成成分の23%を占める [14]。また、亜麻仁には、リグナン及び食物繊維 (水溶性及び不溶性) がそれぞれ0.1~2.6% 及び28% の割合で含まれている [14]。

ALAは、体内で他の脂肪酸から合成することができないため、食品を介して摂取する必要がある「必須脂肪酸」であり、その欠乏により、鱗状皮膚炎、出血性皮膚炎、結節性皮膚炎、成長障害等を生じることが知られている [16]。リグナンは植物に含まれるフェノール化合物の一種であり、亜麻仁に含まれる代表的なリグナンとしてSDGが挙げられる [17]。SDG (Figure 3) は、腸内細菌によってエンテロリグナンであるエンテロジオールやエンテロラクトンに変換されることでエストロゲン様の作用を発揮し (Figure 4)、更年期障害等の婦人科系の症状に効果を示す。また、強力な抗酸化作用を示すとともに、コレステロール降下作用 [18] や肝機能改善作用 [19] を有することが知られている。リグナンは、様々な食物に含まれるが、亜麻仁には他の食物と比較して非常に多くのリグナン (SDG) が含まれている (Table 1) [20]。食物繊維は、食物中の難消化性成分の総体と定義され、不溶性食物繊維であるセルロースやリグニン、水溶性食物繊維であるペクチンやアルギン酸が該当する。食物繊維には、整腸効果に基づく便秘予防の他、心筋梗塞リスクの低下、血糖値上昇の抑制、血液中のコレステロール濃度の低下など、多くの生理機能を示すことが示唆されている [21]。

亜麻仁に含まれるこれらの成分は、それぞれが単独で血圧降下作用を示すことが報告されている。Ogawaらは、ALAを0.8 g/dayの用量で摂取させることにより、SHRで認められる昇圧が抑制されることを報告している [27]。Sawantらは、亜麻仁リグナンの濃縮物を80~160 mg/dayの用量で経口投与することにより、DOCA食塩負荷高血圧モデルラットの昇圧が抑制されることを報告している [63]。また、食物繊維については、オオバコ由来の食物繊維やカカオ殻由来の食物繊維が、それぞれ1.6 g/day 及び0.75 g/dayの用量で、SHRの昇圧を抑制することが報告されている [64, 65]。第1章の薬効評価で使用した亜麻仁粉末の投与物中に含まれるALA、リグナン及び食物繊維の量は、低用量亜麻仁 (1.2 g/day) の場合はそれぞれ0.3 g/day、6.6 mg/day 及び0.26 g/day、高用量亜麻仁 (2.4 g/day) の場合はそれぞれ0.6 g/day、13.2 mg/day 及び0.52 g/day となり、本研究と既報の用量を比較すると、既報ではALAは1.3~2.7倍、リグナンは12~24倍、食物繊維は3~6倍高い投与量を使用していることになる。このように、既報の実験におけるALA、リグナン及び食物繊維の投与量は比較的多く、亜麻仁に含有される量の機能性成分の降圧効果及び腎保護作用については、これまで検討されておらず不明である。第1章の結果より、ALAを主成分とする亜麻仁油は、亜麻仁粉末には僅かに劣るものの、明確な降圧効果を示したことから、亜麻仁の効果発現においてALAが重要な役割を担うことは示唆されるが、依然としてリグナンと食物繊維の寄与に関しては不明である。複数の機能性成分を含む食

品において、効果発現に関わる主成分を解明することは、作用機序解析において有用な情報となる。

そこで、第2章では、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットを用いて、亜麻仁粉末の機能性成分である亜麻仁リグナン及び亜麻仁由来食物繊維の昇圧及び腎機能障害に対する影響を評価した。また、亜麻仁リグナン及び亜麻仁由来食物繊維と亜麻仁粉末の降圧効果及び腎保護効果を比較し、これらの効果に関わる主要成分について考察した。

第2節 実験材料及び方法

1. 実験動物

第1章に準ずる。

2. 試験物質

亜麻仁粉末、亜麻仁リグナン及び亜麻仁由来食物繊維は、日本製粉株式会社より供与されたものを使用した。亜麻仁リグナン及び亜麻仁由来食物繊維は、ともに日本製粉株式会社にて精製された試験用サンプルである。以下に精製法を簡潔に記載した (Figure 9)。

亜麻仁リグナン：亜麻仁搾油粕 300 g を含水エタノール抽出 (70 度、3 時間) し、樹脂精製して得た (純度 90%)。

亜麻仁由来食物繊維：亜麻仁リグナンの抽出残渣を、水抽出 (80 度、4 時間) により水溶性食物繊維と食物繊維抽出残渣 (不溶性食物繊維) に分離した。亜麻仁搾油粕 300 g から分離された水溶性食物繊維と食物繊維抽出残渣は、それぞれ 57.9 g 及び 173 g であった。したがって、本試験で使用する亜麻仁由来食物繊維は、水溶性食物繊維と食物繊維抽出残渣を 57.9 対 173 で含有する混合物である。

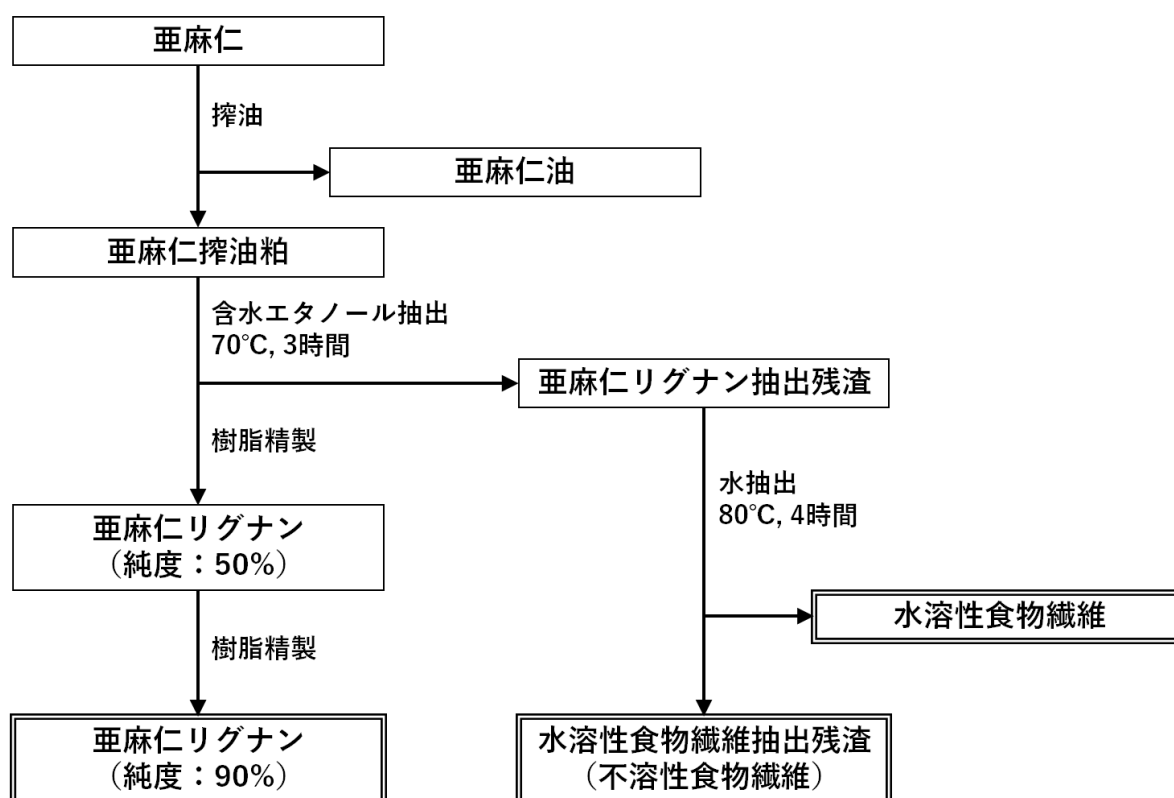


Figure 9. Purification flow of flaxseed lignan and flaxseed fiber.

3. その他の試薬

第1章に準ずる。

4. 試験物質含有飼料の作製

固形飼料をミルミキサーで粉砕し、粉砕固形飼料 3.5 g と水道水 1.2 mL を混合した後、1.3 g の亜麻仁粉末、7.3 mg の亜麻仁リグナン若しくは 0.29 g の亜麻仁由来食物繊維を加えて混和し、再び固形飼料 1 個に成形して 1 日自然乾燥させたものを、それぞれ亜麻仁粉末含有固形飼料 (1.2 g 含有)、亜麻仁リグナン含有固形飼料 (6.6 mg 含有) 又は亜麻仁由来食物繊維含有固形飼料 (0.26 g 含有) とした。成形後の試験物質含有固形飼料は強度が劣り、摂食時の飼料粉砕に伴い約 10% の損失が見込まれるため、固形飼料作製時には、目的とする含量に約 10% 加えた量を用いた。

5. DOCA 食塩負荷高血圧モデルの作製

三種混合麻酔下、ラットの右側背部を 2 cm 程度切開して右腎臓を露出させ、腎被膜を剥離して腎臓と副腎を分離させた後、腎動静脈及び輸尿管を結紮し、腎臓を摘除した。縫合により閉腹し、5% ビビテン液で縫合部を消毒した後、1 週間の回復期を設けた。1 週間後、ラットを無作為に、対照群、Low powder 群、亜麻仁リグナン (6.6 mg/day) 群 (Lignan 群) 及び亜麻仁由来食物繊維 (0.26 g/day) 群 (Fiber 群) の 4 群に振り分けた。

DOCA 溶液は、DOCA を 8 mg/mL、CMC-Na を 3 mg/mL、MC を 10.5 mg/mL 及び塩化ナトリウムを 9 mg/mL となるように各試薬を蒸留水に添加後、Tween-20 を 1 滴添加して一晩攪拌し、調製した。食塩液は、塩化ナトリウムを 0.5 w/v% の濃度となるように水道水に溶解して調製した。DOCA 食塩負荷高血圧モデルは、8 mg/mL DOCA 溶液を 5 mL/kg の容量で 1 週間に 1 回、計 3 回 (day 0、day 7 及び day 14) 皮下投与 (テルモ注射針、21G を使用) するとともに、食塩液を 3 週間 (day 0 ~ day 21) 自由飲水させることで作製した。

6. 試験物質の投与

Low powder 群、Lignan 群及び Fiber 群には、それぞれ、亜麻仁粉末含有固形飼料 (1.2 g 含有)、亜麻仁リグナン含有固形飼料 (6.6 mg 含有) 及び亜麻仁由来食物繊維含有固形飼料 (0.26 g 含有) を 1 日 1 個与えた。対照群には、特別な処置は行わず、通常の固形飼料を自由摂取させるとともに、水道水を自由飲水させた。Lignan 群及び Fiber 群の用量は、Low powder 群の投与量である 1.2 g の亜麻仁粉末に含有されるリグナン及び食物繊維の量を基に設定した。Table 4 に各群の試験物質に含まれる成分量を記載した。

Table 4. Amount of ALA, lignan or dietary fiber contained in the test substance administered to each group.

Group	Test substance	Dosage	Ingredients		
			ALA	Lignan	Dietary fiber
Low powder	Flaxseed powder	1.2 g/day	0.3 g	6.6 mg	0.26 g
Lignan	Flaxseed lignan	6.6 mg/day	—	6.6 mg	—
Fiber	Flaxseed fiber	0.26 g/day	—	—	0.26 g

ALA, α -linolenic acid.

7. 収縮期血圧の測定
第1章に準ずる。
8. 生化学データの測定
第1章に準ずる。
9. 統計処理
第1章に準ずる。

第3節 結果

1. 飲水量及び尿量の推移

対照群の飲水量は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 35.4 ± 2.2 、 91.6 ± 10.2 、 93.0 ± 9.2 及び 66.0 ± 14.5 mL/day であり、DOCA 食塩の負荷により day 7 で急増し、day 14 で最高値を示した後、day 21 で僅かに減少した。Low powder 群、Lignan 群及び Fiber 群の飲水量は、試験期間を通して対照群の飲水量と同様の推移を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Table 5)。

対照群の尿量は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 18.8 ± 1.7 、 76.8 ± 13.0 、 71.2 ± 9.8 及び 76.8 ± 11.3 mL/day であり、DOCA 食塩の負荷により day 7 で急増した後、day 21 まで概ね一定の値を示した。対照群の尿量の推移は、飲水量の推移と概ね一致していた。Low powder 群、Lignan 群及び Fiber 群の尿量は、試験期間を通して対照群と同様の推移を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Table 5)。

以上より、食塩の負荷量は、試験期間を通して各群で同程度であると想定された。

Table 5. The changes in water intake and urine volume in the control, low powder, lignan, and fiber group.

Parameters	Experimental group	Day			
		0	7	14	21
Water intake (mL/day)	Control	35.4 ± 2.2	91.6 ± 10.2	93.0 ± 9.2	66.0 ± 14.5
	Low powder	35.5 ± 3.1	79.5 ± 9.0	93.6 ± 10.8	89.9 ± 6.4
	Lignan	36.1 ± 1.4	83.7 ± 3.5	93.9 ± 8.8	67.2 ± 6.1
	Fiber	34.5 ± 2.2	69.3 ± 3.6	92.0 ± 9.9	66.4 ± 9.5
Urine volume (mL/day)	Control	18.8 ± 1.7	76.8 ± 13.0	71.2 ± 9.8	76.8 ± 11.3
	Low powder	17.9 ± 2.7	56.5 ± 8.0	80.5 ± 6.1	77.1 ± 5.5
	Lignan	19.0 ± 1.3	63.5 ± 3.2	74.4 ± 6.2	72.6 ± 7.9
	Fiber	17.8 ± 2.4	49.9 ± 3.7	73.4 ± 8.4	78.8 ± 8.6

The values represent the mean \pm SEM of data from 6 animals.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Table 3. (一部追加)

2. 収縮期血圧の推移

対照群の SBP は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 120.6 ± 1.5 、 133.1 ± 4.0 、 167.6 ± 7.5 及び 220.1 ± 0.2 mmHg であり、DOCA 食塩の負荷により経時的に上昇した。Low powder 群の SBP は、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 122.4 ± 3.7 、 152.6 ± 5.3 及び 189.1 ± 6.5 mmHg であり、第 1 章で示した結果と同様に、試験期間を通して対照群の SBP よりも低値を推移し、対照群との間に統計学的な差が認められた (Figure 10)。一方、Lignan 群の SBP は、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 127.4 ± 3.0 、 181.6 ± 5.8 及び 218.8 ± 8.9 mmHg、Fiber 群の SBP は、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 128.5 ± 2.8 、 169.6 ± 5.8 及び 213.5 ± 8.5 mmHg であり、試験期間を通して対照群の SBP と同様の推移を示し、対照群との間に統計学的な差は認められなかった。

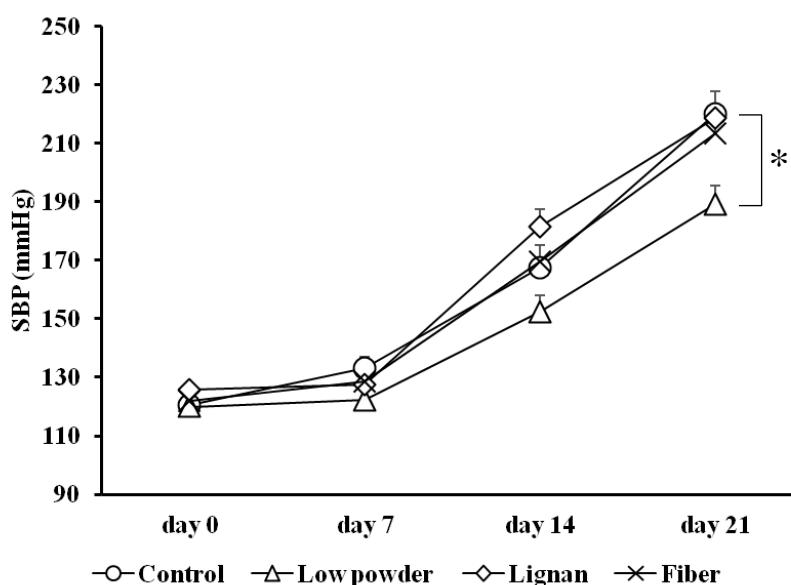


Figure 10. Effects of flaxseed powder, flaxseed lignan and flaxseed fiber on the SBP in DOCA-salt rats. Flaxseed powder (1.2 g/day) supplemented diets, flaxseed lignan (6.6 mg/day) supplemented diet, and flaxseed fiber (0.26 g/day) supplemented diet were administered from day 0 to day 21. The SBP was measured at the indicated time points. Data points and bars show the mean \pm SEM of data from 6 animals. * $p < 0.05$ versus the control group. There was no significant difference between the control group and the lignan or fiber group. SBP, systolic blood pressure.

Watanabe et al. *Pharmacology*. 2019, 105, 54-62. Figure 2. (一部追加)

3. 尿中蛋白排泄量の推移

対照群の尿中蛋白排泄量は、day 0、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 3.5 ± 0.7 、 39.0 ± 4.7 、 134.3 ± 16.0 及び 223.6 ± 38.6 mg/day であり、DOCA 食塩の負荷により経時的に上昇した。Low powder 群の尿中蛋白排泄量は、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 21.2 ± 2.6 、 86.5 ± 14.2 及び 151.9 ± 12.1 mg/day であり、第 1 章で示した結果と同様に、試験期間を通して対照群の尿中蛋白排泄量よりも低値を推移し、対照群との間に統計学的な差が認められた (Figure 11)。一方、Lignan 群の尿中蛋白排泄量は、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 49.2 ± 7.0 、 101.3 ± 19.2 及び 243.4 ± 23.7 mg/day、Fiber 群の尿中蛋白排泄量は、day 7、day 14 及び day 21 でそれぞれ 36.1 ± 8.3 、 107.2 ± 21.1 及び 228.0 ± 18.7 mg/day であり、試験期間を通して対照群の尿中蛋白排泄量と同様の推移を示し、対照群との間に統計学的な差は認められなかった。

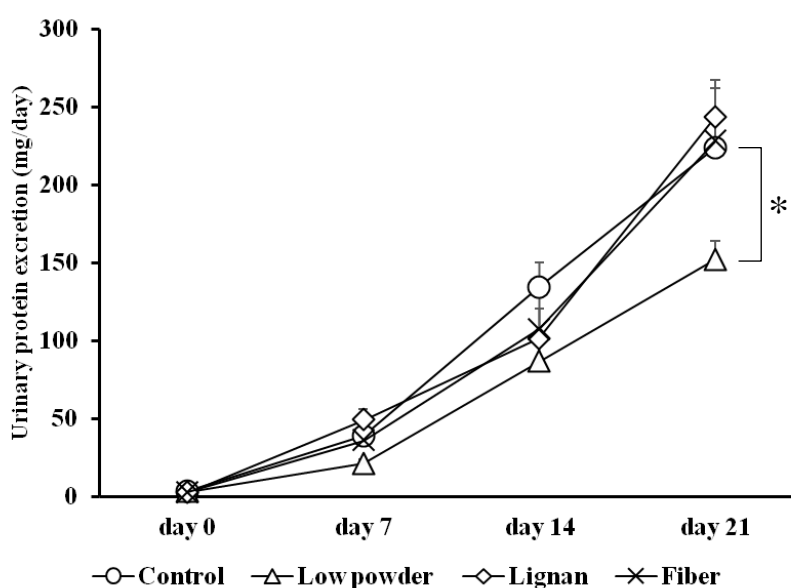


Figure 11. Effects of flaxseed powder, flaxseed lignan and flaxseed fiber on the urinary protein excretion in DOCA-salt rats. Flaxseed powder (1.2 g/day) supplemented diets, flaxseed lignan (6.6 mg/day) supplemented diet, and flaxseed fiber (0.26 g/day) supplemented diet were administered from day 0 to day 21. The urinary protein excretion was measured at the indicated time points. Data points and bars show the mean \pm SEM of data from 6 animals. * $p < 0.05$ versus the control group. There was no significant difference between the control group and the lignan or fiber group.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Figure 2. (一部追加)

第4節 考察

亜麻仁粉末は、ALA、リグナン及び食物繊維を豊富に含んでおり、文献報告 [27, 63-65] より、これらの機能性成分はそれぞれが降圧効果に寄与する可能性が示唆されている。第1章の結果より、ALAを主成分とする亜麻仁油が明確な降圧効果を示したことから、亜麻仁の効果発現においてALAが大きく寄与する可能性は示唆されるが、依然としてリグナンと食物繊維の寄与に関しては不明である。本章において、亜麻仁粉末は、第1章と同様に DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットに対して降圧及び腎保護効果を示した。一方で、亜麻仁リグナン及び亜麻仁由来食物繊維は、本モデルの昇圧及び腎機能障害に対して全く抑制効果を示さなかった。したがって、亜麻仁粉末中に含まれるリグナン及び食物繊維は、単独では降圧及び腎保護効果を示さないことが明らかとなり、ALA が亜麻仁の効果発現に関わる主要な機能性成分であることが示唆された。

亜麻仁に含まれるリグナンである SDG は、植物エストロゲン的一种であり、抗酸化作用を有する物質である。Sawant らは、亜麻仁リグナンが、400 mg/kg/day 及び 800 mg/kg/day の用量では DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットの昇圧を抑制するが、200 mg/kg/day の用量では明確な抑制効果が発揮されないことを報告している [63]。一方、本研究では、Low powder 群に投与した試験物質中に含まれるリグナン量と同量 (6.6 mg/day) を亜麻仁リグナン群に投与しており、その用量は、試験時のラットの体重を 200 g とした場合、33 mg/kg/day となる。したがって、本章で用いたリグナンの用量は、既報 [63] におけるリグナンの有効用量と比較して明らかに低く、本章の結果は、リグナン本来の降圧効果を十分に表現できていない可能性が考えられた。一方、亜麻仁リグナンである SDG を 5 mg の用量で単回静脈内投与することにより、Ang I の静脈内投与により誘発される昇圧反応（循環 RAS の関与する昇圧反応）が抑制されることが報告されている [28]。本報告の SDG の用量は、本章で用いた亜麻仁リグナンの用量である 6.6 mg と同程度であることから、投与経路による血中曝露の差やモデルの違い（昇圧における循環 RAS の関与の有無）がリグナンの降圧効果を左右する可能性も推察された。いずれにしても、亜麻仁粉末が DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットにおいて明確な降圧及び腎保護効果を発揮したことから、亜麻仁粉末に含まれる量のリグナンは、本モデルにおける亜麻仁粉末の効果発現にほとんど寄与しないことが明らかとなった。

食物繊維に関しては、Obata らが、1.6 g/day の用量の食物繊維を投与することで、ナトリウムの糞中排泄の促進に基づいて、高食塩負荷 SHR で認められる昇圧反応が抑制されることを報告している [64]。また、Sánchez らは、カカオの殻から得られた水溶性食物繊維を 0.75 g/day の用量で投与することで、SHR の昇圧に対して抑制効果を発揮することを報告している [65]。上述の報告と本研究では、薬効評価に用いている食物繊維の種類が異なるため、直接比較することはできない。しかし、本章で用いた食物繊維の用量である 0.26 g/day と比較しても、既報において約 3～6 倍高い用量が用いられているため、本章で食物繊維が降圧効果を認めなかった要因の一つとして投与量が十分でなかった可能性が挙げられる。また、本研究で使用した DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットは、SHR と比較して急激かつ重度な血圧の上昇を呈するモデルであるため [66, 67]、モデルの病態の差が、本研究と既報で食物繊維の効果に乖離が生じたもう一つの要因と考えられた。いずれにしても、亜麻仁粉末に含ま

れる食物繊維は、リグナンと同様に、本モデルにおける亜麻仁粉末の効果発現にほとんど寄与しないことが明らかとなった。

本モデルにおいて、亜麻仁粉末が亜麻仁油と比較して高い降圧効果及び腎保護効果を示すことを第1章で明らかにした。第1章及び本章の結果から、亜麻仁粉末に含有されるリグナンや食物繊維以外の有効成分が、亜麻仁粉末の効果に寄与する可能性が考えられた。但し、ALA、リグナン及び食物繊維以外の成分の高血圧に対する有効性については不明な点が多く、それらの降圧効果、腎保護効果への寄与の解明については、更なる研究が必要である。

第5節 小括

本章では、第1章で有効性を示した用量の亜麻仁粉末に含有される亜麻仁リグナン及び亜麻仁由来食物繊維が、それぞれ単独では DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットの昇圧及び腎機能障害に対して抑制効果を認めないことを明らかにし、本モデルにおける亜麻仁の降圧及び腎保護効果の発現には、リグナン及び食物繊維はほとんど寄与しないことを見出した。第1章及び本章の結果より、本モデルにおける亜麻仁の降圧及び腎保護効果に関わる主要な機能性成分は ALA であることが示唆された。

第3章

亜麻仁の降圧及び腎保護効果に関わる作用機序

第1節 緒言

亜麻仁は、有効成分として ALA、リグナン及び食物繊維を豊富に含むが [9]、第1章及び第2章の結果より、ALA が亜麻仁の効果発現に関わる主たる機能性成分であることが明らかとなった。亜麻仁は、血漿中のレニン活性や ACE 活性を阻害することで血圧降下作用を示すことが報告されている [26, 27]。したがって、亜麻仁の降圧及び腎保護効果に関わる作用機序の一つとして、循環 RAS の阻害作用が示唆される。また、ALA の代謝産物である EPA や DHA は、生体膜リン脂質のアラキドン酸と置き換わることでプロスタノイドバランス（トロンボキサン / プロスタサイクリン）を血管拡張性に偏向させることが知られている (Figure 9) [57]。プロスタノイドバランスへの影響に関しては、亜麻仁との直接的な関連性を示唆する報告はないが、ALA が亜麻仁の効果発現に関わる機能性成分であることから、亜麻仁の有効性に部分的に寄与することが推察される。しかし、高血圧には、循環 RAS 以外にも複数の成因が関与しており、これらに対する亜麻仁の影響については明らかではない。機能性食品や生薬などでは複数の有効成分が含有されているものもあり、その場合、作用機序の解明が不十分なことが多いが、臨床応用時の主作用や副作用を説明するうえで作用機序は不可欠な情報となるため、医薬品同様に作用機序の解明は必須と考えられる。

降圧効果について、循環 RAS 以外の作用機序を考える場合、第一に挙げられる機序は、「RAS」とともに高血圧の病態形成に重要役割を担う「交感神経の過活動」である [42]。また、最近では、脳内炎症が高血圧における交感神経過興奮の原因の一つであると言われている [31]。さらに、RAS には、血圧や体液調節に関与する全身性の循環 RAS に加えて、臓器特異的に発現して機能調節や疾患進展に関与する組織RASが存在しており [29]、高血圧病態下では、腎臓のRASが独立して活性化し、酸化ストレスや炎症を介して腎機能障害を誘導することが知られている [32, 33]。これらのことから、本章では、①昇圧に関わる「脳内炎症と交感神経過活動」並びに②腎機能障害に関わる「腎 RAS と酸化ストレス及び炎症反応」に着目して作用機序解析を行うこととした。

また、近年では、ストレスと高血圧との関連が注目されており、メタ解析の結果、環境ストレス等に起因するストレス性高血圧が心血管イベントリスクを増加させることが明らかとなっている [3, 6]。このような状況下で、ストレスの緩和に繋がる機能性食品の摂取は、ストレス性高血圧における血圧管理に有用と考えられる [68]。しかし、これまでに、亜麻仁のストレス性の心血管反応に対する影響については報告されていない。昨今の震災や異常気象に伴う大規模災害及び避難生活をもたらす環境ストレスと心血管疾患の発症予防の面から、亜麻仁のストレス耐性効果の有無とその機序の解明に向けた検討は有用と考えられる。

DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットは、DOCA の投与及び食塩の摂取によりナトリウムと水の貯留を来し、重度の高血圧を示すとともに、昇圧に付随して、RAS の活性化、腎臓の炎症並びに酸化ストレスを伴う腎機能障害を呈する [36-38]。また、本モデルは、交感神経系の過活動と脳内の心血

管制御中枢である視床下部室傍核 (PVN) の炎症を誘導することが報告されている [39-41]。さらに、本モデルで認められる昇圧は、循環 RAS の阻害では抑制されないことが知られている [43]。そのため、本モデルは、被験物質の循環 RAS 非依存的な作用機序に基づいて発揮される降圧効果の有無を明らかにするために有用である。

そこで、本章では、循環 RAS 非依存的な昇圧及びそれに伴う腎機能障害を呈する DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットを用いて、循環 RAS 阻害作用以外の機序として、腎 ACE 活性、腎酸化ストレス、自律神経活性並びに腎及び脳内炎症に焦点を当て、亜麻仁の降圧及び腎保護効果に関わる作用機序を解析した。また、ストレス性の昇圧と自律神経活動変化に対する影響も併せて評価し、ストレス耐性効果について検討した。なお、第 1 章及び第 2 章において、本モデルにおける亜麻仁の降圧及び腎保護効果に寄与する成分が ALA であることを見出したため、本章では、ALA を主成分とする亜麻仁油 (1.2 mL/day) を用いて作用機序の解析を行った。

第2節 実験材料及び方法

1. 実験動物

第1章に準ずる。

2. 試験物質

亜麻仁油は、日本製粉株式会社より供与されたものを使用した。

3. その他の試薬

DOCA、CMC 及び MC は、ナカライテスク株式会社より購入した。塩化ナトリウムは、富士フィルム和光純薬株式会社より、Tween-20 は Santa Cruz Biotechnology より購入した。TBARS Assay Kit は、Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI) より、Pierce BCA Protein Assay Kit は、サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社 (東京) より購入した。Hippuryl-His-leu は、株式会社ペプチド研究所 (大阪) より、ISOGEN は、株式会社ニッポンジーン (東京) より購入した。PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 及び SYBR Premix Ex Taq II は、タカラバイオ株式会社 (滋賀) より購入した。各種リアルタイム PCR 用プライマーは、株式会社ファスマック (神奈川) で合成したものを購入した。

4. DOCA 食塩負荷高血圧モデルの作製

三種混合麻酔下、ラットの右側背部を 2 cm 程度切開して右腎臓を露出させ、腎被膜を剥離して腎臓と副腎を分離させた後、腎動静脈及び輸尿管を結紮し、腎臓を摘除した。縫合により閉腹し、5%ヒビテン液で縫合部を消毒した後、1 週間の回復期を設けた。1 週間後、ラットを無作為に、対照群及び High oil 群の 2 群に分別した。また、三種混合麻酔下、右腎臓を摘出することなく、背部に切開及び縫合処置のみを施したラットを用意し、偽手術群とした。

DOCA 溶液は、DOCA を 8 mg/mL、CMC-Na を 3 mg/mL、MC を 10.5 mg/mL 及び塩化ナトリウムを 9 mg/mL となるように各試薬を蒸留水に添加後、Tween-20 を 1 滴添加して一晩攪拌し、調製した。食塩液は、塩化ナトリウムを 0.5 w/v% の濃度となるように水道水に溶解して調製した。DOCA 食塩負荷高血圧モデルは、8 mg/mL DOCA 溶液を 5 mL/kg の容量で 1 週間に 1 回、計 3 回 (day 0、day 7 及び day 14) 皮下投与 (テルモ注射針、21G を使用) するとともに、食塩液を 3 週間 (day 0 ~ day 21) 自由飲水させることで作製した。偽手術群には、蒸留水を 5 mL/kg の容量で 1 週間に 1 回、計 3 回 (day 0、day 7 及び day 14) 皮下投与 (テルモ注射針、21G を使用) するとともに、水道水を 3 週間 (day 0 ~ day 21) 自由飲水させた。

5. 試験物質の投与

High oil 群には、亜麻仁油を 1.2 mL/day の容量で 1 日 1 回、day 0 から day 21 まで経口投与した。本用量は、第 1 章の High oil 群に投与した量と同じである。偽手術群及び対照群には、水道水を 1.2 mL/day の容量で 1 日 1 回、day 0 から day 21 まで経口投与した。

6. 収縮期血圧の測定

第1章に準ずる。

7. 収縮期血圧、平均動脈圧及び心拍数の観血的測定並びに各種組織の採取及び保存

Day 21 の SBP 測定終了後に、三種混合麻酔下でラットの左鼠径部を 1.5 cm 程度切開して左大腿動脈を露出させ、クレンメにより一時的に血流を止めて血管を切開した。ポリエチレンチューブ (PE10 fused into PE50、Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ) の一端にヘパリンナトリウム溶液 (76.5 U/mL、ナカライテスク株式会社) を充填した 1 mL シリンジを接続し、チューブ内にヘパリンナトリウム溶液を充填させたもの (カニューレ) を用意した。血管の切開部よりカニューレの他端を挿入し、縫合糸でカニューレを血管に固定した後、クレンメを外して血流を再開させた。カニューレの一端に接続されている 1 mL シリンジを外して虫ピンで閉口した後、背部皮下を通して頸背部に露出させ、縫合糸と軟組織接合用接着剤 (アロンアルファ A「三共」、第一三共、東京) にて固定した。また、左鼠径部を縫合により塞ぎ、5% ヒビテン液で縫合部を消毒した。一晩の回復期の後、ラットを安静時、自由行動下で、頸背部に露出させたカニューレを圧トランスデューサー (TruWave、エドワーズライフサイエンス、東京) に接続し、ストレンアンプ (AS1202、NEC 三栄株式会社、東京) を介して、循環動態パラメーター解析ソフトウェア フラクレット (Jr.2、長岡実業株式会社、兵庫) にて、安静時の SBP、平均動脈圧 (MAP) 及び心拍数 (HR) を記録した (Figure 12)。その後、小型振とう機 (NR-1、タイテック株式会社、埼玉) にセットしたケージにラットを載せ、毎分 150 回の速度の振動ストレスを 6 分間負荷した際の SBP、MAP 及び HR を記録した。ストレス負荷時の MAP から安静時の MAP を差し引いた値を、ストレス負荷前後での MAP の変化量とした。

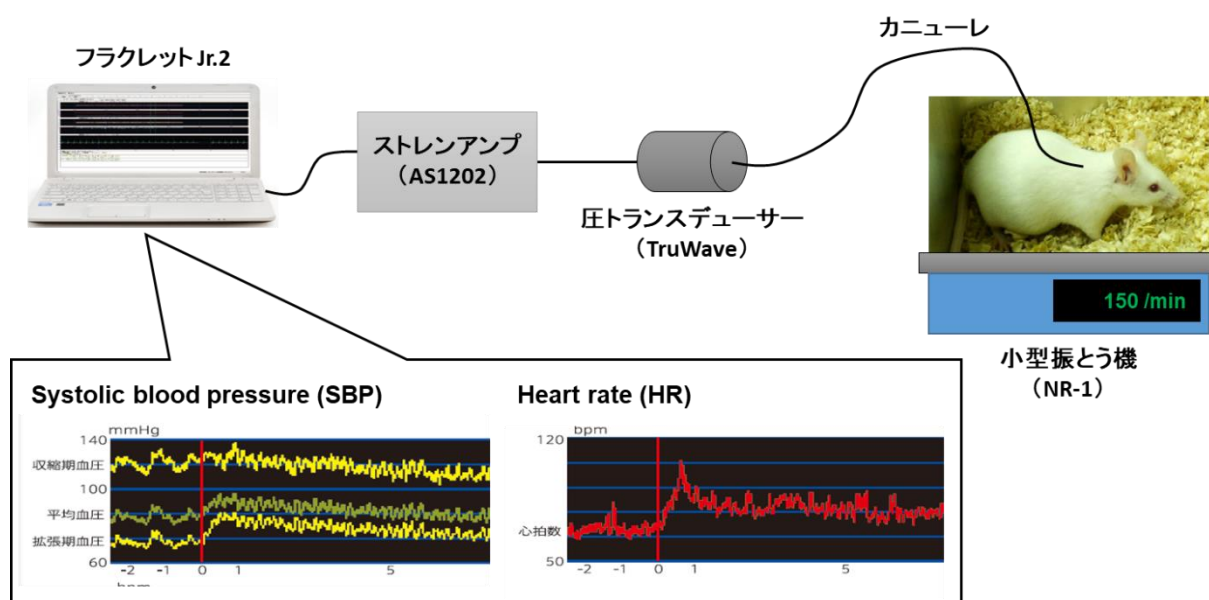


Figure 12. Schematic diagram of measurement of SBP, MAP and HR.

上記の実験の後、三種混合麻酔下で腹部大動脈より採血し、腹部大動脈及び後大静脈を切断して、放血により安楽死させた。安楽死後、左腎臓及び脳を摘出し、脳より視床下部領域を切り出した。視床下部の保存領域は、Paxinos & Watson の脳地図 [65]に従って決定した。即ち、ブレグマより後方 0.0~4.0 mm (A: 0.0~4.0 mm) の脳切片を切り出した後、Figure 13 に示すとおり、正中から両側へ 2.5 mm ずつ (L: -2.5~2.5 mm)、脳表面から 6.0 mm の地点から脳底部まで (H: -6.0 mm~) の領域を切り出した (Figure 13、赤枠の領域)。採取した血液は、予めヘパリンナトリウム溶液 (15.3 U/mL、ナカライテスク株式会社) を添加したチューブに移して抗凝固処理を施し、遠心分離 (3000 rpm、4°C、15 分間) 後、血漿成分を回収した。血漿、腎臓及び視床下部は、使用時まで -80°C で凍結保存した

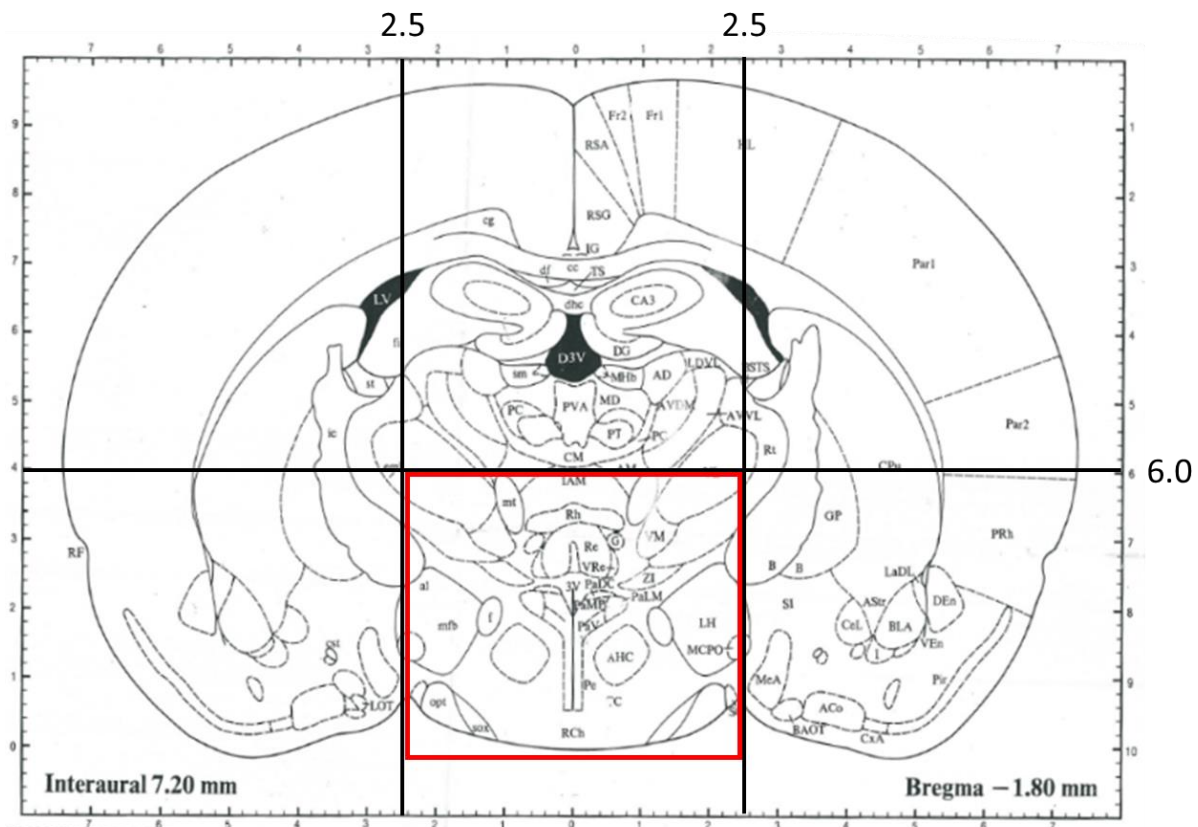


Figure 13. Schematic diagram of the storage area in the brain.

The brain region surrounded by the red line was cut out and stored frozen.

文献番号 69 (一部改変)

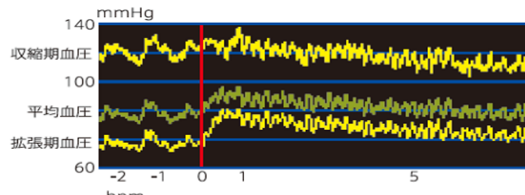
8. 自律神経活動の測定

循環動態パラメーター解析ソフトウェア フラクレットを用いて、SBP の時系列データ波形及び HR の R-R 間隔の時系列データ波形に周波数解析を施し、SBP 変動及び R-R 間隔変動のパワースペクトラル密度を算出した [70]。SBP 変動の低周波数成分 (0.25~0.75 Hz) のパワースペクトラル密度 (mmHg $\sqrt{\text{Hz}}$) を交感神経活動の指標、R-R 間隔変動の高周波数成分 (0.75~3 Hz) のパワースペクトラル密度 (msec $\sqrt{\text{Hz}}$) を副交感神経活動の指標とした。交感神経活動及び副交感神経活動は、

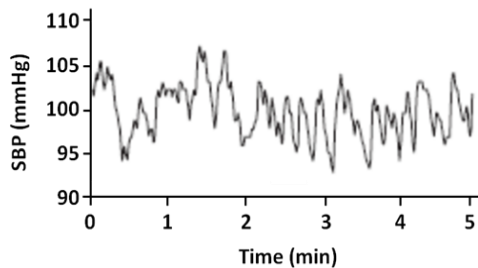
安静時とストレス負荷時のSBP及びHRからそれぞれ算出し、ストレス負荷時の神経活動から安静時の神経活動を差し引いた値を、ストレス負荷前後での神経活動の変化量とした。自律神経活動測定の詳細をFigure 14に示した。

Systolic blood pressure (SBP)

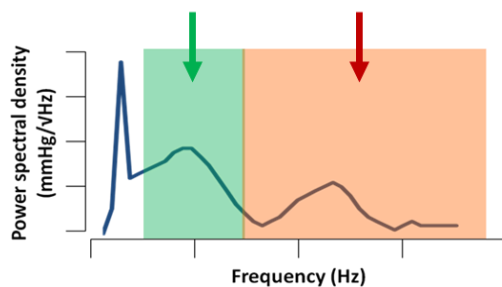
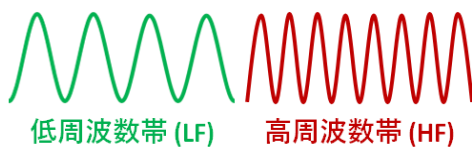
測定データ



SBP変動の時系列データ波形



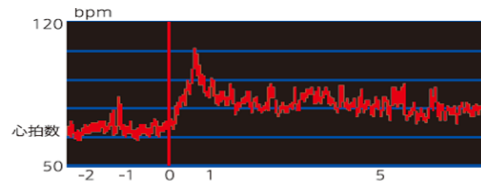
周波数解析 ↓



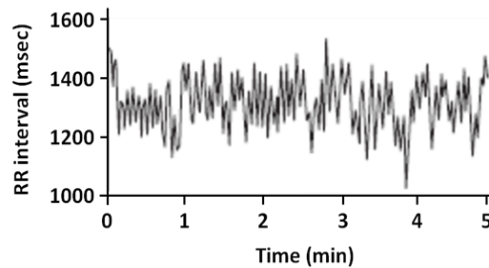
SBP変動の低周波成分
⇒ 交感神経活動

Heart rate (HR)

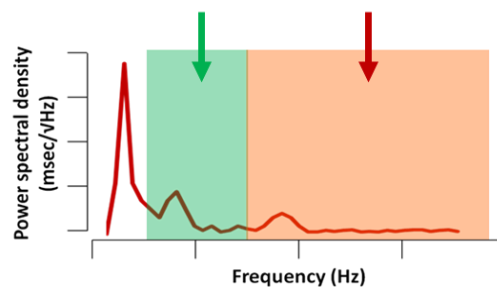
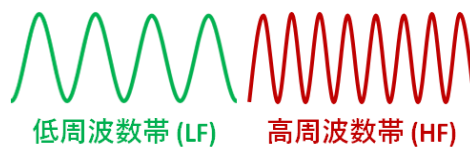
測定データ



R-R間隔変動の時系列データ波形



周波数解析 ↓



R-R間隔変動の高周波成分
⇒ 副交感神経活動

Figure 14. Schematic diagram for assessment of autonomic nervous system.

Power spectral densities of the low-frequency band (0.25–0.75 Hz) of SBP fluctuation and the high-frequency band (0.75–3 Hz) of RR interval fluctuation of heart rate were calculated as indices of sympathetic nerve activity and parasympathetic nerve activity, respectively.

9. 腎マロンジアルデヒド量の測定

腎臓における酸化ストレスの測定を目的に、酸化ストレスマーカーとして用いられる脂質過酸化生成物であるマロンジアルデヒド (MDA) の定量を行った。腎臓を小剪刀で細切後、1 mL の抽出液 [25 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% NP-40、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、Protease Inhibitor Cocktail (ナカライテスク株式会社)、pH 7.6] 中で TissueLyser (QIAGEN、Venlo、Netherlands) を用いて均質化した後、遠心分離 (1600 rpm、4°C、10 分間) し、上清をサンプル溶液として回収した。

サンプル溶液中の MDA 量は、TBARS Assay Kit を用い、マルチラベルプレートカウンター (Wallac 1420、ARVO MX、Perkin Elmer、Waltham、MA) にて 530 nm の吸光度を測定することにより定量した。腎サンプル溶液中の MDA 量は、測定に使用した腎サンプル溶液の蛋白質濃度で補正した値 (mol/mg protein) で表現した。腎サンプル溶液の蛋白質濃度の測定には、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いた。

10. 腎及び血漿 ACE 活性の測定

腎臓を小剪刀で細切後、1 mL の抽出液 (20 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L 酢酸マグネシウム、30 mmol/L KCl、250 mmol/L スクロース、0.5% NP-40、pH 8.3) 中で TissueLyser を用いて均質化し、4°C で 24 時間静置した後、遠心分離 (10000 rpm、4°C、15 分間) し、上清を腎臓サンプル溶液として回収した。

ACE 活性は、合成基質である Hippuryl-His-leu (HHL) から生成される馬尿酸を定量することで測定した。25 μ L の腎臓及び血漿サンプル溶液に 250 μ L の基質溶液 (5 mmol/L HHL を含有する PBS、pH 8.3) を添加し、37°C で 10 分間静置した。その後、3% メタリン酸溶液を加えて反応を停止させた後、遠心分離 (10000 rpm、4°C、10 分間) し、上清を回収した。上清を逆相カラム (内径: 4.6 mm \times 250 mm、東ソー株式会社、神奈川) に通した後、10 mmol/L の KH_2PO_4 及び CH_3OH (1 : 1、pH 3.0) で溶出した。反応生成物である馬尿酸は、UV 検出器 (UVD-120、EICOM、京都) を用いて、波長 218 nm の紫外外部吸光度を指標に検出した。1 unit (U) の ACE 活性は、1 分あたり 1 mmol の馬尿酸を生成する酵素活性として定義し、血漿サンプル溶液中の ACE 活性は測定に使用したサンプルの容量で補正した値 (U/mL)、腎臓サンプル溶液中の ACE 活性は測定に使用した腎サンプル溶液の蛋白質濃度で補正した値 (U/g protein) で表現した。腎臓サンプル溶液の蛋白質濃度の測定には、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いた。

11. RNA の精製及び cDNA の合成

腎臓及び視床下部の total RNA は ISOGEN を用いて精製した。100 mg の腎臓又は視床下部を小剪刀で細切後、1 mL の ISOGEN 中で TissueLyser を用いて均質化した後、室温で 5 分間静置した。0.2 mL のクロロホルムを添加して 15 秒間激しく混合し、室温で 15 分間静置した後、遠心分離 (12000 rpm、4°C、15 分間) した。上層を回収後、5 μ L の p-ブロモアニソール (富士フイルム和光純薬株式会社) を添加して 15 秒間激しく混合し、室温で 3 分間静置した後、遠心分離 (12000 rpm、4°C、15 分間) した。上清を回収後、0.5 mL のイソプロパノールを添加し、室温で 10 分間静置した後、

遠心分離（12000 rpm、室温、10 分間）した。上清を除去後、0.5 mL の 75%エタノールを添加し、ボルテックスで沈殿を破碎後、遠心分離（5000 rpm、室温、3 分間）した。上清を除去後、50 μ L の diethylpyrocarbonate 処理水（DEPC 処理水、ナカライテスク株式会社）で沈殿を溶解し、total RNA 溶液とした。Total RNA の濃度は、UV/Vis Spectrophotometer（DU730、BECKMAN COULTER、Brea、CA）で測定した。cDNA は、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser を用いて、0.5 μ g の total RNA より合成した。DEPC 処理水で 0.5 μ g/7 μ L の濃度に調製した total RNA 溶液に、当該キット付属の 5x gDNA Eraser Buffer 及び gDNA Eraser をそれぞれ 2 μ L 及び 1 μ L 添加し、サーマルサイクラー（BIO-RAD）にて 42°C で 2 分反応後、4°C で静置した。次いで、反応後の溶液に、当該キット付属の 5 × PrimeScript Buffer 2、PrimeScript RT Enzyme Mix I、RT Primer Mix 及び RNase free water をそれぞれ 4 μ L、1 μ L、1 μ L 及び 4 μ L 添加し、サーマルサイクラーにて 37°C で 15 分、85°C で 5 秒の逆転写反応を行い、反応後は 4°C で静置した。

12. 定量的リアルタイム PCR

腎臓における酸化ストレスの評価を目的に、活性酸素種の生成に関わる主要な酵素である nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼの構成分子 [gp91 phagocyte oxidase (gp91phox) : 酵素活性本体、p22 phagocyte oxidase (p22phox) : 細胞膜に存在する補助因子、p47 phagocyte oxidase (p47phox) : 細胞内に存在する補助因子] の遺伝子発現を定量した。また、腎臓及び視床下部における炎症反応の評価を目的に、各種炎症性サイトカイン [インターロイキン 1 β (IL-1 β)、インターロイキン 6 (IL-6) 及び腫瘍壊死因子- α (TNF- α)] 並びにケモカイン [単球走化性因子-1 (MCP-1)] の遺伝子発現を定量した。これらの mRNA 発現量は、SYBR Premix Ex Taq II を用いてリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（リアルタイム PCR）にて測定した。SYBR Premix Ex Taq II、定量遺伝子のフォワードプライマー、定量遺伝子のリバースプライマー、cDNA 溶液及び DEPC 処理水を、それぞれ 12.5 μ L、0.5 μ L、0.5 μ L、2.0 μ L 及び 9.5 μ L 加えて混合液を調製し、Thermal Cycler Dice Real-Time System（TP850、タカラバイオ株式会社）にセットして、「95°C で 30 秒」の反応を 1 サイクル、次いで「95°C で 5 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒」の反応を 40 サイクル、最後に「95°C で 15 秒、60°C で 30 秒、95°C で 15 秒」の反応を 1 サイクル行った。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）遺伝子を内部標準とした $\Delta\Delta$ CT 法により各種遺伝子の相対発現量を算出し、偽手術群を 1 とした際の各群の相対値を求めた。本研究で用いた各種プライマーの配列は、Table 6 に記載した。

Table 6. List of primers used for real time PCR.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
gp91phox	CCAGTGAAGATGTGTTTCAGCT	GCACAGCCAGTAGAAGTAGAT
p22phox	GCTCATCTGTCTGCTGGAGTA	ACGACCTCATCTGTAACTGGA
p47phox	TCACCGAGATCTACGAGTTC	ATCCCATGAGGCTGTTGAAGT
IL-1 β	CAGCTTTTCGACAGTGAGGAGA	GTCGAGATGCTGCTGTGAGA
IL-6	TCTCCTCTCCGGACTTGTGAA	CTCTCCGCAAGAGACTTCCA
TNF- α	TAGCAAACCACCAAGCGGAG	TGAAATGGCAAACCGGCTGA
MCP-1	TGTTACAGTTGCTGCCTGT	GATCTCACTTGTTCTGGTC

GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL-1 β , Interleukin-1 beta; IL-6, Interleukin-6; TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha; MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1; gp91phox, gp91 phagocyte oxidase; p22phox, p22 phagocyte oxidase; p47phox, p47 phagocyte oxidase.

13. 統計処理

結果は、すべて平均 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で示した。統計処理には、統計解析ソフト Stat View 5.0 を用いた。MAP、交感神経活動、副交感神経活動、MAP 変化量、交感神経活動変化量、副交感神経活動変化量、腎 ACE 活性、血漿 ACE 活性、腎 MDA 量、及び各種遺伝子発現量の群間比較には要因分散分析を用いた。有意差検定には PLSD 法を用い、 $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3節 結果

1. 平均動脈圧

安静時における偽手術群及び対照群の MAP は、それぞれ 119.2 ± 6.8 及び 203.1 ± 1.5 mmHg であり、DOCA 食塩の負荷により上昇し、群間に統計学的な差が認められた。安静時における High oil 群の MAP は 167.8 ± 13.6 mmHg であり、対照群の MAP と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 15A)。

ストレス負荷前後での偽手術群及び対照群の MAP 変化量は、それぞれ 3.4 ± 0.7 及び 9.1 ± 0.9 mmHg であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。ストレス負荷前後での High oil 群の MAP 変化量は 3.9 ± 0.7 mmHg であり、対照群の MAP 変化量と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 15B)。

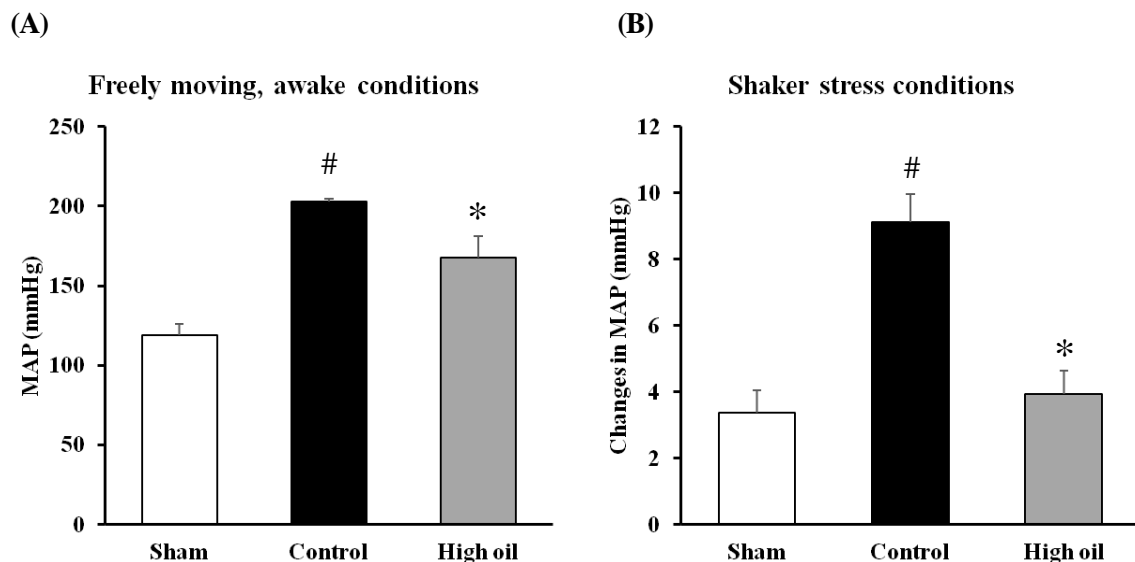


Figure 15. Effects of flaxseed oil on MAP in DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. On day 21, MAP was recorded under freely moving, awake conditions. Then, rats were placed on a reciprocal shaker, and MAP was recorded under shaker stress conditions. The changes in MAP was calculated by subtracting the value obtained under shaker stress from the value obtained under free-moving, awake conditions. (A) MAP under freely moving, awake conditions; (B) Changes in MAP induced by shaker stress. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. * p < 0.05 versus the control group. MAP, mean arterial pressure.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Figure 4.

2. 交感神経活動

安静時における偽手術群及び対照群の交感神経活動は、それぞれ 0.6 ± 0.1 及び 1.4 ± 0.02 mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ であり、DOCA 食塩の負荷により上昇し、群間に統計学的な差が認められた。安静時における High oil 群の交感神経活動は 1.1 ± 0.1 mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ であり、対照群の交感神経活動と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 16A)。

ストレス負荷前後での偽手術群及び対照群の交感神経活動変化量は、それぞれ 0.5 ± 0.2 及び 1.4 ± 0.1 mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。ストレス負荷前後での High oil 群の交感神経活動変化量は 0.5 ± 0.2 mmHg/ $\sqrt{\text{Hz}}$ であり、対照群の交感神経活動変化量と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 16B)。

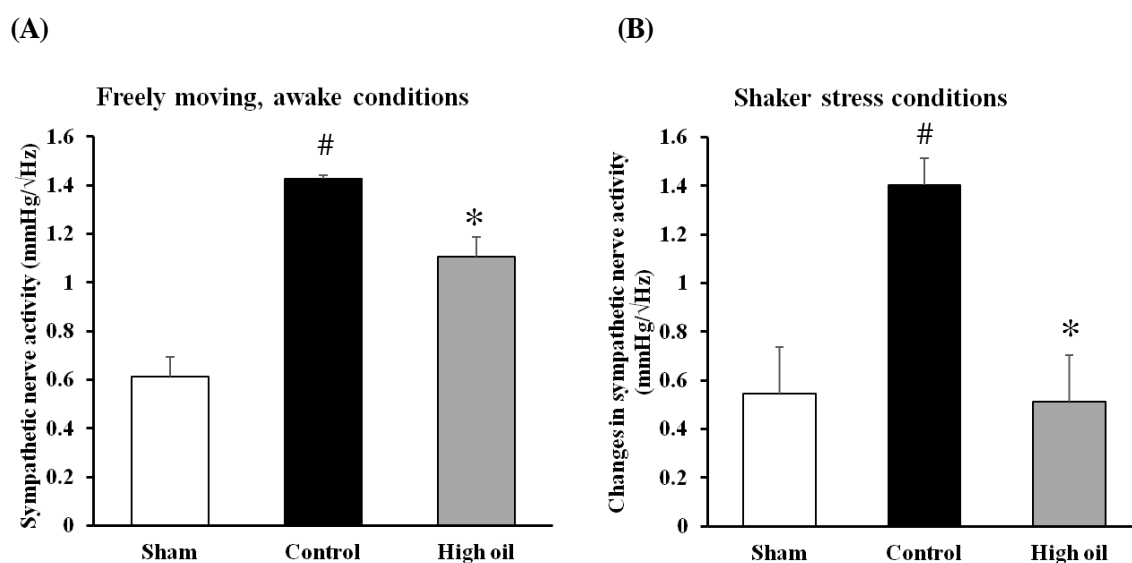


Figure 16. Effects of flaxseed oil on sympathetic nerve activity in DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. On day 21, SBP was recorded under freely moving, awake conditions. Then, rats were placed on a reciprocal shaker, and SBP was recorded under shaker stress conditions. A power spectral density of the low-frequency band (0.25–0.75 Hz) of SBP fluctuation was calculated as an index of sympathetic nerve activity. The changes in sympathetic nerve activity was calculated by subtracting the value obtained under shaker stress from the value obtained under free-moving, awake conditions. (A) Sympathetic nerve activity under freely moving, awake conditions; (B) Changes in sympathetic nerve activity induced by shaker stress. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. * p < 0.05 versus the control group.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Figure 4.

3. 副交感神経活動

安静時における偽手術群及び対照群の副交感神経活動は、それぞれ 2.2 ± 0.1 及び 1.7 ± 0.1 msec/√Hz であり、DOCA 食塩の負荷により低下し、群間に統計学的な差が認められた。安静時における High oil 群の副交感神経活動は 2.0 ± 0.1 msec/√Hz であり、対照群の副交感神経活動と比較して高値を示したが、群間に統計学的な差は認められなかった (Figure 17A)。

ストレス負荷前後での偽手術群及び対照群の副交感神経活動変化量は、それぞれ 0.2 ± 0.1 及び 0.8 ± 0.1 msec/√Hz であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。ストレス負荷前後での High oil 群の副交感神経活動変化量は 0.9 ± 0.2 msec/√Hz であり、対照群の副交感神経活動変化量と同程度の値を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Figure 17B)。

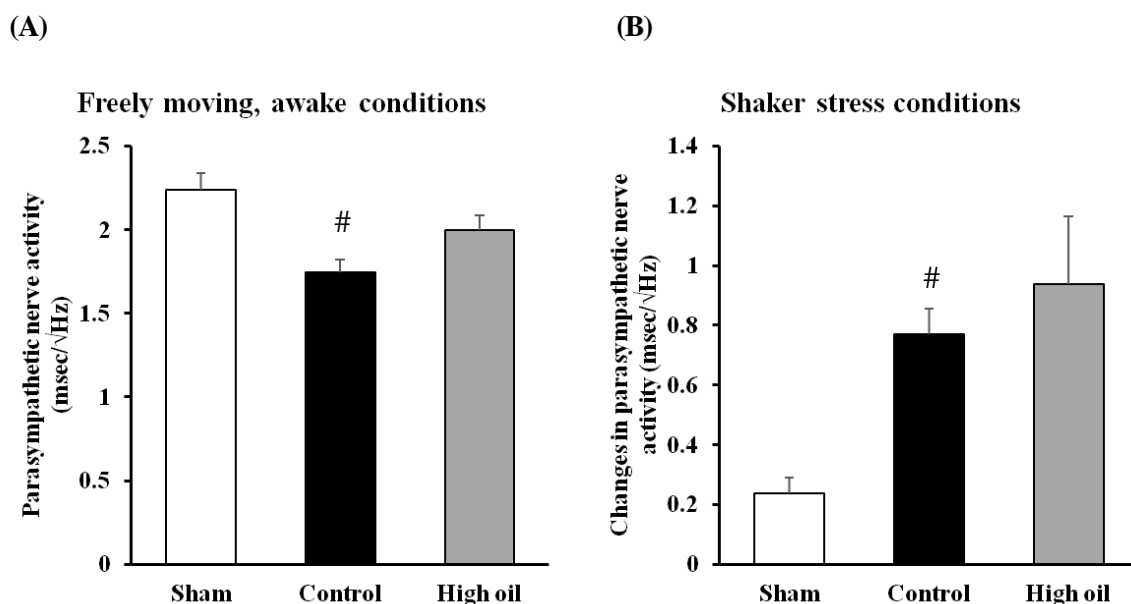


Figure 17. Effects of flaxseed oil on parasympathetic nerve activity in DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. On day 21, heart rate was recorded under freely moving, awake conditions. Then, rats were placed on a reciprocal shaker, and heart rate was recorded under shaker stress conditions. A power spectral density of the high-frequency band (0.75–3 Hz) of RR interval fluctuation of heart rate was calculated as an index of parasympathetic nerve activity. The changes in parasympathetic nerve activity was calculated by subtracting the value obtained under shaker stress from the value obtained under free-moving, awake conditions. (A) Parasympathetic nerve activity under freely moving, awake conditions; (B) Changes in parasympathetic nerve activity induced by shaker stress. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. [#] < 0.05 versus the sham group.

4. 腎及び血漿 ACE 活性

偽手術群及び対照群の腎 ACE 活性は、それぞれ 7.3 ± 0.5 及び 9.8 ± 0.3 mU/g protein であり、DOCA 食塩の負荷により上昇し、群間に統計学的な差が認められた。High oil 群の腎 ACE 活性は 6.8 ± 0.5 mU/g protein であり、対照群の腎 ACE 活性と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 18A)。

偽手術群及び対照群の血漿 ACE 活性は、それぞれ 143.8 ± 10.2 及び 115.7 ± 3.2 μ U/mL であり、DOCA 食塩の負荷により低下し、群間に統計学的な差が認められた。High oil 群の血漿 ACE 活性は 114.6 ± 5.6 μ U/mL であり、対照群の血漿 ACE 活性と同程度の値を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Figure 18B)。

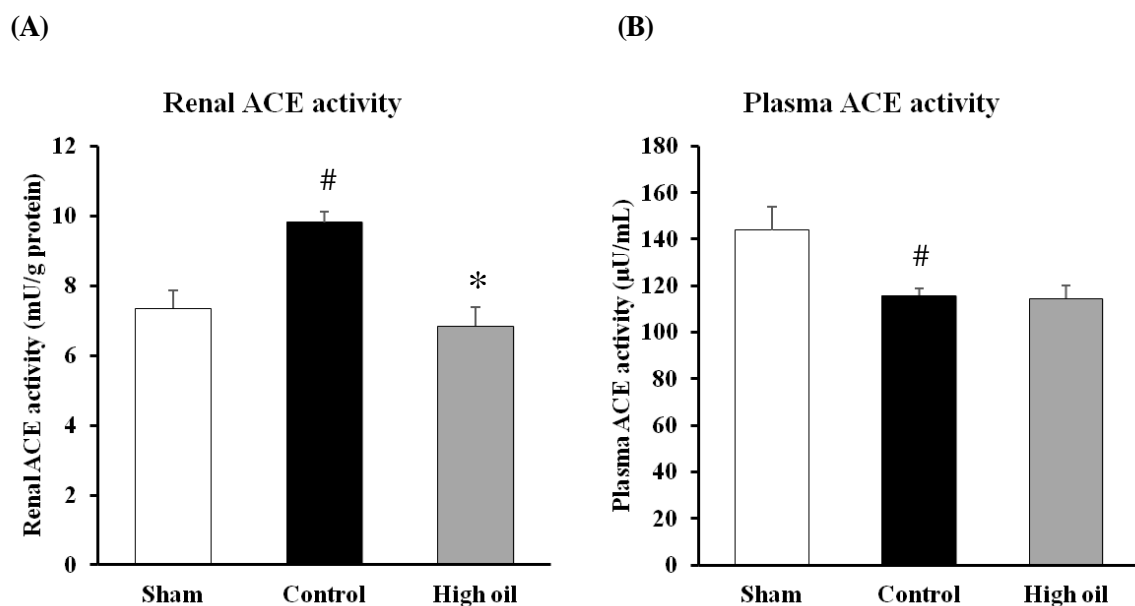


Figure 18. Effects of flaxseed oil on renal ACE activity and plasma ACE activity in DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to 21 by gavage. Rats were sacrificed on day 21, the kidney and the plasma were collected, and the ACE activity in the kidney and the plasma were measured. (A) ACE activity in the kidney; (B) ACE activity in the plasma. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. * p < 0.05 versus the control group. ACE, angiotensin-converting enzyme.

Watanabe et al. *Pharmacology*. 2019, 105, 54-62. Figure 3. (一部追加)

5. 腎マロンジアルデヒド量

酸化ストレスの指標として、脂質過酸化分解生成物である MDA の腎臓内含量を測定した。偽手術群及び対照群の腎 MDA 量は、それぞれ 1.1 ± 0.02 及び 2.6 ± 0.4 nmol/mg protein であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。High oil 群の腎 MDA 量は 2.8 ± 0.5 nmol/mg protein であり、対照群の腎 MDA 量と同程度の値を示し、群間に統計学的な差は認められなかった (Figure 19)。

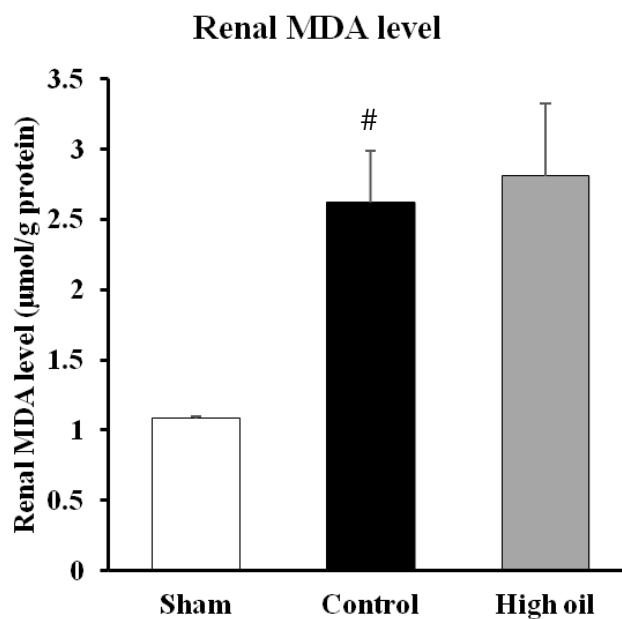


Figure 19. Effects of flaxseed oil on renal MDA level in DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to 21 by gavage. Rats were sacrificed on day 21, the kidney was collected, and the MDA level in the kidney was measured. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. MDA, malondialdehyde.

6. 腎 gp91phox、p22phox 及び p47phox mRNA 発現量

活性酸素を生成し酸化ストレスの誘導に関わる nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼの構成分子である gp91phox、p22phox 及び p47phox の腎臓内遺伝子発現量を測定した。偽手術群の腎 gp91phox、p22phox 及び p47phox mRNA 発現量を 1 とした際の対照群の各 mRNA の発現量は、それぞれ 7.1 ± 2.0 、 14.7 ± 4.8 及び 4.2 ± 0.7 であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。High oil 群の腎 gp91phox、p22phox 及び p47phox mRNA 発現量は、それぞれ 4.5 ± 1.4 、 12.9 ± 3.8 及び 3.5 ± 0.9 であり、対照群の各 mRNA 発現量と比較して僅かに低値を示したが、群間に統計学的な差は認められなかった (Figure 20)。

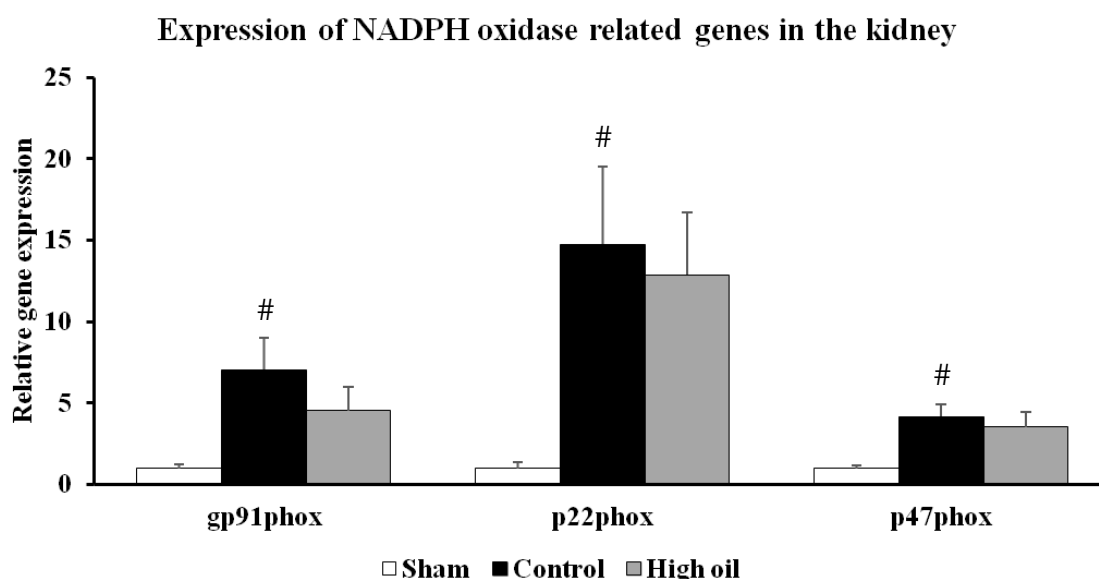


Figure 20. Effects of flaxseed oil on the increased gene expression of gp91phox, p22phox, and p47phox in the kidney of DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. Rats were sacrificed on day 21, the kidney was removed, and the gene expression of gp91phox, p22phox, and p47phox was measured using quantitative real-time PCR. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. gp91phox, gp91 phagocyte oxidase; p22phox, p22 phagocyte oxidase; p47phox, p47 phagocyte oxidase.

7. 腎 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量

炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6 及び TNF- α 並びに単球走化性因子である MCP-1 の腎臓内遺伝子発現量を測定した。偽手術群の腎臓 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量を 1 とした際の対照群の各 mRNA の発現量は、それぞれ 10.8 ± 2.7 、 4.0 ± 0.4 、 4.8 ± 0.5 及び 11.0 ± 1.6 であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。High oil 群の腎 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量は、それぞれ 3.2 ± 1.0 、 2.0 ± 0.2 、 2.0 ± 0.3 及び 5.6 ± 1.6 であり、対照群の各 mRNA 発現量と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 21)。

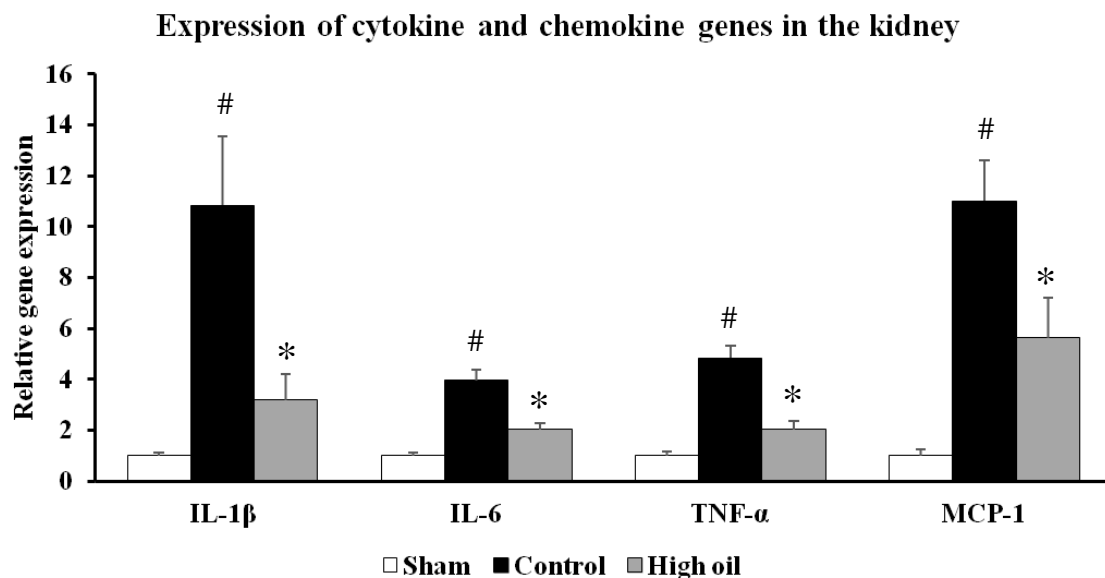


Figure 21. Effects of flaxseed oil on the increased gene expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 in the kidney of DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. Rats were sacrificed on day 21, the kidney was removed, and the gene expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 was measured using quantitative real-time PCR. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. * p < 0.05 versus the control group. IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Figure 5.

8. 視床下部 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量

炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6 及び TNF- α 並びに単球走化性因子である MCP-1 の視床下部内遺伝子発現量を測定した。偽手術群の視床下部 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量を 1 とした際の対照群の各 mRNA の発現量は、それぞれ 1.8 ± 0.3 、 7.8 ± 1.1 、 4.4 ± 0.9 及び 9.1 ± 1.2 であり、DOCA 食塩の負荷により増加し、群間に統計学的な差が認められた。High oil 群の視床下部 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1 mRNA 発現量は、それぞれ 0.8 ± 0.1 、 2.9 ± 1.3 、 1.9 ± 0.2 及び 3.2 ± 1.4 であり、対照群の各 mRNA 発現量と比較して低値を示し、群間に統計学的な差が認められた (Figure 22)。

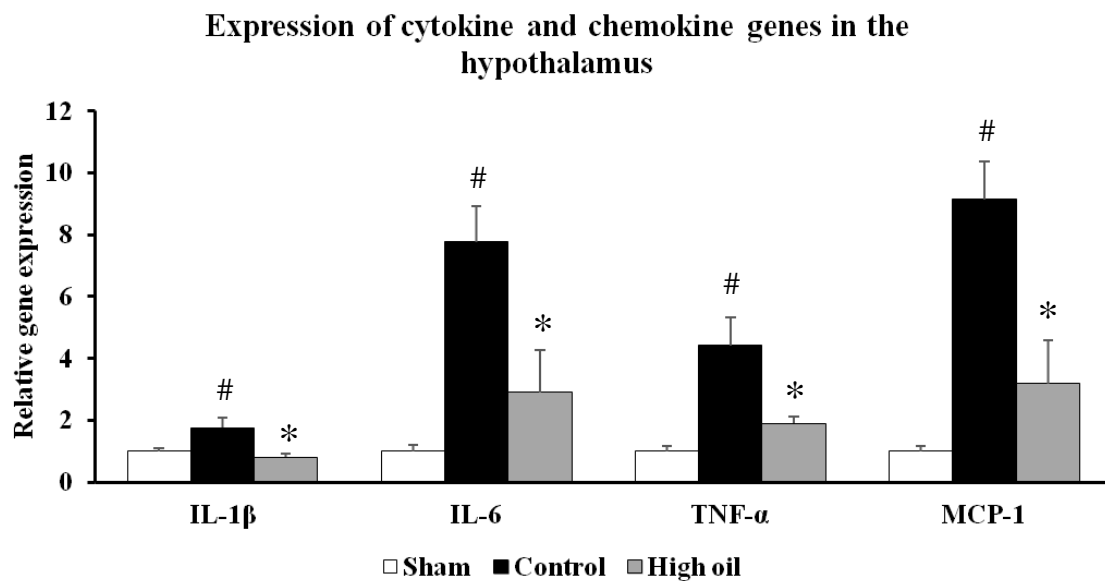


Figure 22. Effects of flaxseed oil on the increased gene expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 in the hypothalamus of DOCA-salt rats on day 21. Flaxseed oil (1.2 mL/day) was administered once daily from day 0 to day 21 by gavage. Rats were sacrificed on day 21, the hypothalamus was removed, and the gene expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and MCP-1 was measured using quantitative real-time PCR. Columns and bars show the mean \pm SEM of data from 4 or 6 animals. # < 0.05 versus the sham group. * p < 0.05 versus the control group. IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1.

Watanabe et al. *Pharmacology*. **2019**, 105, 54-62. Figure 5.

第4節 考察

DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットは、DOCA 及び食塩の処置により血圧と尿中蛋白排泄量の著しい上昇を示す。一方で、本モデルの血漿レニン活性並びに血漿中 Ang I 及び Ang II 量は、病態非誘発ラットと比較して低下することが報告されている [44, 71]。本研究でも、対照群の血漿 ACE 活性は、偽手術群と比較して低下していた。さらに、本モデルラットで認められる昇圧は、ACE 阻害薬や ARB 等の RAS に作用する降圧薬の全身投与では抑制できないことが知られている [43, 72]。これらのことから、本モデルの昇圧及びそれに伴う腎機能障害は、循環 RAS 非依存的な作用機序に基づいて誘発される症状とされている。第1章において、亜麻仁油は、本モデルの昇圧及び腎機能障害に対して明確な抑制効果を示した。したがって、亜麻仁油のこれらの効果は、循環 RAS の抑制以外の作用機序に基づいていると想定される。

交感神経活動の過剰な活性化と副交感神経活動の低下は、ヒトの高血圧病態における重要な要素の一つである。交感神経中枢である頭側延髄腹外側野 (RVLM) から投射される遠心性神経出力の増大は、末梢交感神経終末からのノルアドレナリン放出を介して、心臓 β 受容体の刺激による心収縮性増大及び血管 α 受容体の刺激による血管収縮を誘導し、血圧を上昇させる [73]。また、放出されたノルアドレナリンは、腎傍糸球体細胞 β 受容体の刺激によるレニン産生とそれに付随した Ang II 及びアルドステロン産生の亢進や腎尿細管細胞 α 受容体の刺激によるナトリウム再吸収の促進にも関わる [73]。これらの交感神経過活動及びそれに基づく現象は、副交感神経出力の低下によりさらに増強される [74]。このような交感神経活動の増加は、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットでも同様に、血圧の上昇と維持の一因となることが知られている。Reid らは、本モデルにおいて血漿中のカテコールアミン量が上昇すること報告している [75]。Mu らは、本モデルにおいて、腎交感神経活動が増加することを報告している [76]。また、末梢交感神経の除神経により、DOCA 食塩負荷により誘発される昇圧と血漿ノルアドレナリン量の増加は抑制される [75]。本章の検討において、DOCA 及び食塩を負荷したラットでは、安静時にて、交感神経活動の上昇と副交感神経活動の低下が MAP の上昇に伴って認められ、高血圧患者と同様の病態を示した。これに対して、亜麻仁油は、副交感神経活動の低下には影響しなかったが、MAP の上昇及び交感神経活動の上昇を明確に抑制した。したがって、交感神経系の過活動の抑制と、それに付随するノルアドレナリン放出抑制 (心臓 β 受容体刺激を介した心収縮性増大の抑制、血管 α 受容体刺激を介した血管収縮の抑制、及び腎尿細管細胞 α 受容体刺激を介したナトリウム再吸収の抑制) は、亜麻仁の降圧効果に関わる作用機序の一つと考えられた。なお、本モデルでは降圧効果に循環 RAS 阻害が寄与しないことから、腎傍糸球体細胞 β 受容体刺激を介したレニン産生とそれに付随した Ang II 及びアルドステロン産生の亢進に関しては、亜麻仁の効果に関与しないものと推察された。体内に取り込まれた ALA は、肝臓にて EPA や DHA に代謝される。代謝産物の一つである EPA は、アストロサイトにおけるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) の生成を阻害することが報告されている [77]。 PGE_2 はプレシナプスにおいてセロトニンの放出を抑制する内因性物質であるため、EPA は、間接的にプレシナプスからのセロトニン遊離を増加させる [77]。実際、ヒト血漿中の EPA 量は、脳脊髄液中のセロトニン代謝産物と正相関することが知られている [78]。もう一つの代謝産物である DHA は、ポストシナプスでのセロトニン受容体拡散を増加させ、セロト

ニン神経伝達を向上させることが報告されている [77]。放出されたセロトニンは、交感神経終末に発現する 5-HT_{1B/1D} 受容体の活性化を介して神経終末からのノルアドレナリン放出を減少させ、結果的に交感神経活動を抑制させる [79, 80]。したがって、亜麻仁油の交感神経活動抑制作用には、EPA や DHA によるセロトニン作動性神経伝達の制御が関与していると推察された。

高血圧患者において、血漿中の炎症関連因子 [IL-6、TNF- α 及び CRP (C-reactive protein)] の濃度と血圧に正の相関を認めることが報告されている [81, 82]。また、血漿中の炎症関連因子の増加は、健常人における高血圧発症リスクの増加と関連することが知られている [83]。近年では、脳内、特に循環調節中枢である PVA の炎症が交感神経過活動の誘導とその後の血圧制御に関与することが実証されており [84]、脳内炎症に基づいた交感神経系制御機構が高血圧の病因の一つとして注目されている。本章の検討において、DOCA 食塩を負荷した対照群では、偽手術群に比して視床下部における炎症性メディエーター (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1) の遺伝子発現量の増加が認められており、既報 [27, 28] と同様の結果が得られている。高血圧モデル動物の視床下部、特に PVN では、活性化ミクログリアの浸潤や炎症性サイトカイン量の増加が認められる [84, 85]。炎症性サイトカインは、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸のアストロサイトからの産生を促すことで、神経伝達を亢進させることが報告されている [86]。したがって、ミクログリアの活性化とそれに付随した炎症性サイトカインの産生は、視床下部の神経興奮性に影響し、交感神経過活動を誘発すると考えられる。本検討において、亜麻仁油は対照群で観察された炎症性メディエーターの遺伝子発現の増加を顕著に抑制した。ALA は、神経炎症を伴う神経変性疾患モデル動物において、ミクログリアの活性化とその後の炎症性サイトカイン産生を減少させる作用を有することが報告されており [87, 88]、*in vivo* においても神経炎症に対して抑制作用を示すことが示唆されている。以上より、DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットにおける亜麻仁の降圧効果の作用機序として、ALA による脳内での抗炎症作用とそれに基づいた交感神経活動の抑制の関与が示唆された。

ストレスは、遺伝的素因や生活習慣と共に、高血圧の発症及び進行に関わるリスクファクターとされている [89]。急性のストレス負荷は、交感神経出力の増加、並びにそれに付随した心拍数の増加、心収縮力の増大、血管収縮及び副腎髄質と交感神経終末からのカテコールアミン分泌量の増加を誘導し、血圧を上昇、維持させる [90]。振動ストレスは、環境ストレスの一種として、以前より動物のストレス研究に用いられてきた。本章の検討において、DOCA 及び食塩を負荷した対照群では、急性の振動ストレスの負荷により、負荷前後での MAP 変化量及び交感神経活動変化量が、偽手術群と比較して増加しており、高血圧病態下における急性ストレスに対する自律神経性の応答が認められた。また、対照群の副交感神経活動は、安静時では偽手術群と比較して低値を示したが、ストレス負荷前後での対照群の副交感神経活動変化量は偽手術群と比較して増加していた。本現象は、急性ストレス負荷時の一過性かつ代償性の副交感神経応答であると考えられた。一方、亜麻仁油は、MAP 変化量及び交感神経活動変化量の増加を抑制し、高血圧病態下でのストレス応答に対しても抑制作用を発揮することが示唆された。ALA の代謝産物である DHA 及び EPA は、セロトニン作動性神経伝達を活性化することにより、ストレス軽減効果やリラックス効果をもたらす可能性がある [79, 80]。実際、Hamazaki らは、臨床研究において、DHA 及び EPA を摂取することにより、心理的ストレスが軽減されることを実証している [91, 92]。本研究においても、亜麻仁に含有される ALA が生体内で EPA や

DHA に変換された結果、ストレス耐性効果が発揮されたと推察される。心理的要因や物理的要因に基づく環境ストレスは、血圧を一過性に上昇させるだけでなく、断続的な曝露により心血管イベントの発症リスクを上昇させることが知られている [6]。特に、災害時には、多くの環境ストレスに曝露されることから、持続的な血圧上昇（震災高血圧）が生じる [93]。そのため、心血管イベントリスクの低減のためにストレスケアが必要となる。亜麻仁は、ストレス耐性効果を有するのみならず、種々栄養成分を豊富に含み、バランスの良い栄養摂取が可能である。また、自然災害や避難場所でのストレス性の昇圧にも効果が期待でき、且つ保存が可能な点から、災害食としても有用であると考えられる。

RAS は、全身の体液量と血圧の調整に関わる循環 RAS と、臓器局所に発現し、機能調節や病態形成に関わる組織 RAS に分類される [29]。腎臓では、レニン、レニンの基質となるアンジオテンシノーゲン、及び Ang I を Ang II へ変換する ACE が近位尿細管細胞で発現しており、近位尿細管内にて RAS が完結することが明らかにされている [94]。この腎 RAS の活性化は、炎症と酸化ストレスの誘導を介して、組織障害を引き起こすことが知られている [32, 33]。Ang II は、サイトカインやケモカインの産生を刺激することにより、炎症性細胞の組織への浸潤と浸潤組織での炎症を促す。Dai らは、Ang II が単球からの MCP-1 の産生を誘導することを報告している [95]。Guo らは、Ang II がマクロファージからの IL-1 β 、IL-6 及び TNF- α 産生を促すことを報告している [96]。また、Ang II は、ヒト腎尿細管細胞において、AT1 受容体を介して NADPH オキシダーゼ活性を上昇させて酸化ストレスを誘導する [97]。ACE 阻害薬の全身投与は、前述のように DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットの昇圧には影響を及ぼさないが、腎機能障害を抑制することが報告されている [98]。実際、本研究でも、DOCA 及び食塩の処置により、血漿 ACE 活性は低下するが、腎 ACE 活性は上昇し、さらに腎組織における炎症性メディエーター（IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及び MCP-1）の遺伝子発現の増加、活性酸素の生成に関わる NADPH オキシダーゼを構成する各種サブユニット（gp91phox、p22phox 及び p47phox）の遺伝子発現の増加、並びに酸化ストレスマーカーである腎 MDA 量の増加を認めた。したがって、本モデルでは、腎組織 RAS は、循環 RAS と独立して腎病態を制御しており、腎組織 RAS の抑制が腎機能障害の抑制に繋がると考えられる。本章において、亜麻仁油は、本モデルで認められた腎 ACE 活性の上昇及び炎症性メディエーターの遺伝子発現の増加に対して抑制作用を示したが、NADPH オキシダーゼ関連因子の遺伝子発現の増加や腎 MDA 量の増加に対しては明確な影響を及ぼさなかった。したがって、亜麻仁の腎保護効果には、降圧効果に基づく間接的な作用に加えて、ACE 阻害作用と抗炎症作用を介した腎への直接的な作用の関与が示唆された。

これまでに述べたとおり、ALA は、*in vitro* にて ACE 阻害活性を示すこと [26]、代謝産物である EPA や DHA がセロトニン作動性神経伝達の調節作用を示すこと [77] が報告されている。したがって、本章で認められた亜麻仁油による腎 ACE 阻害作用や交感神経活動抑制作用は、ALA やその代謝産物が血漿タンパクであるアルブミンに結合し、遊離脂肪酸の状態を血液循環を介して全身組織に移行し、各組織にて直接的に発揮された作用であると想定される。また、ALA の腎及び視床下部における抗炎症作用発現メカニズムとしては、①オキシリピン（脂質酸化物）代謝酵素である可溶性エポキシドヒドロラーゼ（sEH）の阻害（Figure 23）、②脂肪酸受容体である GPR120 を介した炎症性細胞への直接作用の関与が考えられる。sEH は、リノール酸の cytochrome P450 代謝産物であるエポキシ

オクタデセン酸 (EpOME) 及びアラキドン酸の cytochrome P450 代謝産物であるエポキシエイコサトリエン酸 (EET) を、それぞれジヒドロキシオクタデセン酸 (DiHOME) 及びジヒドロキシエイコサトリエン酸 (DHET) に加水分解する酵素である (Figure 23) [99]。これらのオキシリピンのうち、EET は抗炎症作用を有することが知られている [94]。EET は、in vitro において、LPS 刺激によるマクロファージからの IL-1 β 、IL-6 及び TNF- α の産生を抑制することが報告されている [100]。また、sEH 阻害剤は、in vivo において、血漿中 EET 量を増加させるとともに、LPS 投与による血漿中 IL-6 量の上昇を抑制することが報告されている [101]。ALA はヒトの sEH 活性を抑制することから [102]、ALA が sEH 活性を阻害し、生体内での EET 量を上昇させた結果として、抗炎症作用を発揮したと推察された。GPR120 を介した作用については、ALA、EPA、DHA といったオメガ 3 多価不飽和脂肪酸が GPR120 に対してアゴニスト活性を有すること、また、in vitro において、DHA や GPR120 アゴニストである GW9508 が LPS 刺激によるマクロファージからの IL-6 及び TNF- α 産生を抑制することが報告されている [103, 104]。GPR120 は、視床下部のミクログリアでも発現が確認されており、GPR120 のノックダウンにより IL-1 β 、IL-6 等の炎症性サイトカインの産生が抑制されることが知られている [105]。以上の知見から、摂取された ALA 或いは代謝を受けて変換された EPA 又は DHA が、炎症性細胞に発現する GPR120 を介して抗炎症作用を示す可能性も考えられた。一方で、sEH 活性抑制作用や GPR120 アゴニスト活性は、オメガ 6 多価不飽和脂肪酸であるリノール酸やアラキドン酸では認められないことが報告されており [102, 104]、これらの作用は、オメガ 3 多価不飽和脂肪酸特異的な作用であることが示唆された。以上より、本章で観察された亜麻仁油による交感神経活動抑制作用、腎 ACE 阻害作用並びに腎及び視床下部における抗炎症作用は、ALA 又はその代謝産物によって発揮されることが推察された。

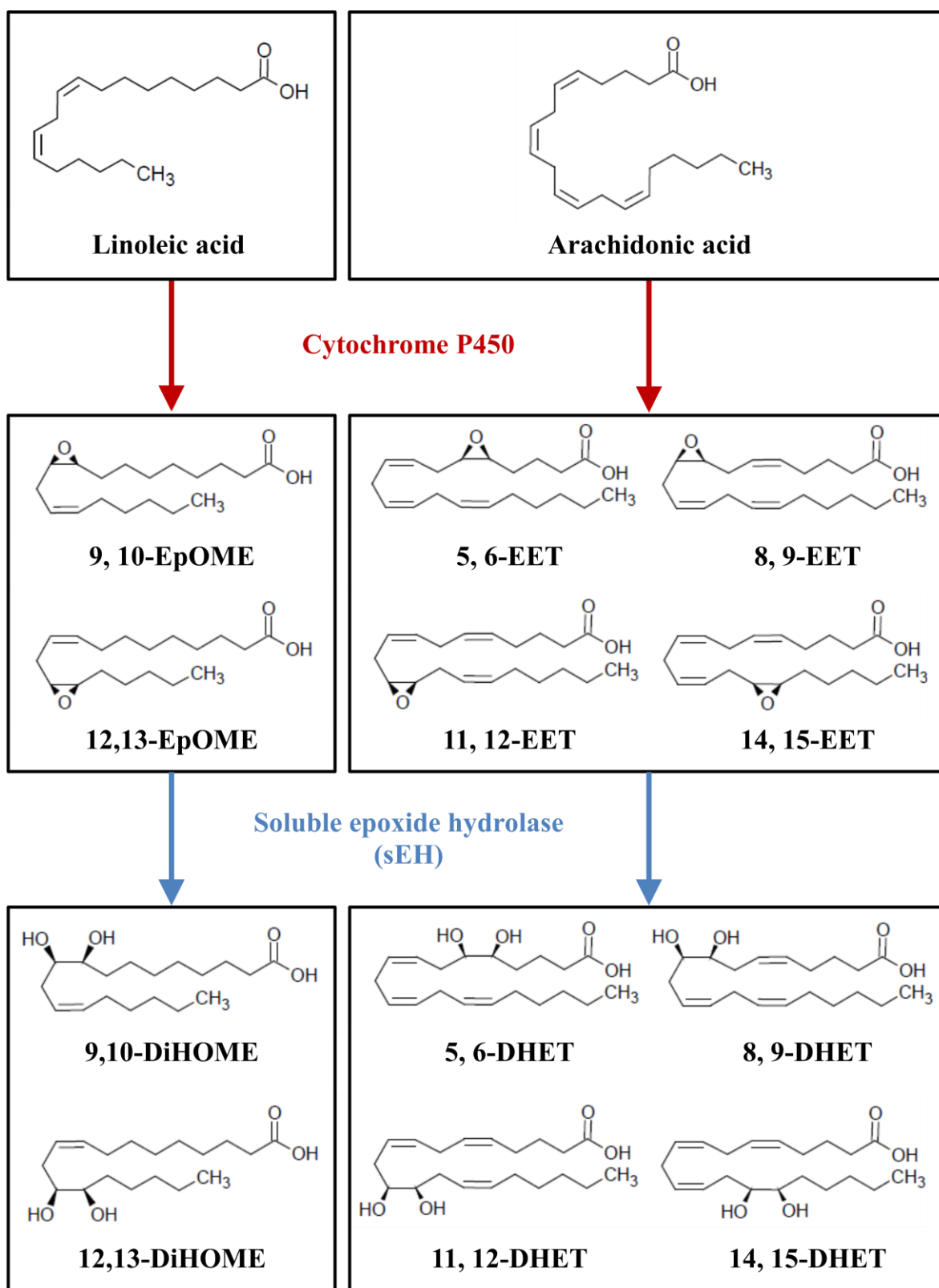


Figure 23. Metabolic pathway of oxylipins.

EpOME, epoxyoctadecenoic acid; DiHOME, dihydroxyoctadecenoic acid; EET, epoxyeicosatrienoic acid; DHET, dihydroxyeicosatrienoic acid.

第5節 小括

本章では、亜麻仁油が、DOCA 食塩負荷で認められた安静時の交感神経活動の上昇、視床下部の炎症性メディエーター遺伝子発現量の増加、腎 ACE 活性の上昇並びに腎臓の炎症性メディエーター遺伝子発現量の増加に対して抑制効果を示すことを見出した。本結果より、亜麻仁の降圧効果には、視床下部での抗炎症作用及び交感神経活動の抑制作用の関与が示唆された。また、亜麻仁の腎保護効果には、降圧効果を介した間接的な作用に加えて、腎組織 RAS 及び腎炎症に対する抑制作用の関与が示唆された。さらに、亜麻仁は、本モデルのストレス負荷による交感神経興奮とそれに伴う昇圧反応に対して抑制作用を示すことが明らかとなり、ストレス耐性効果を発揮することが示唆された (Figure 24)。

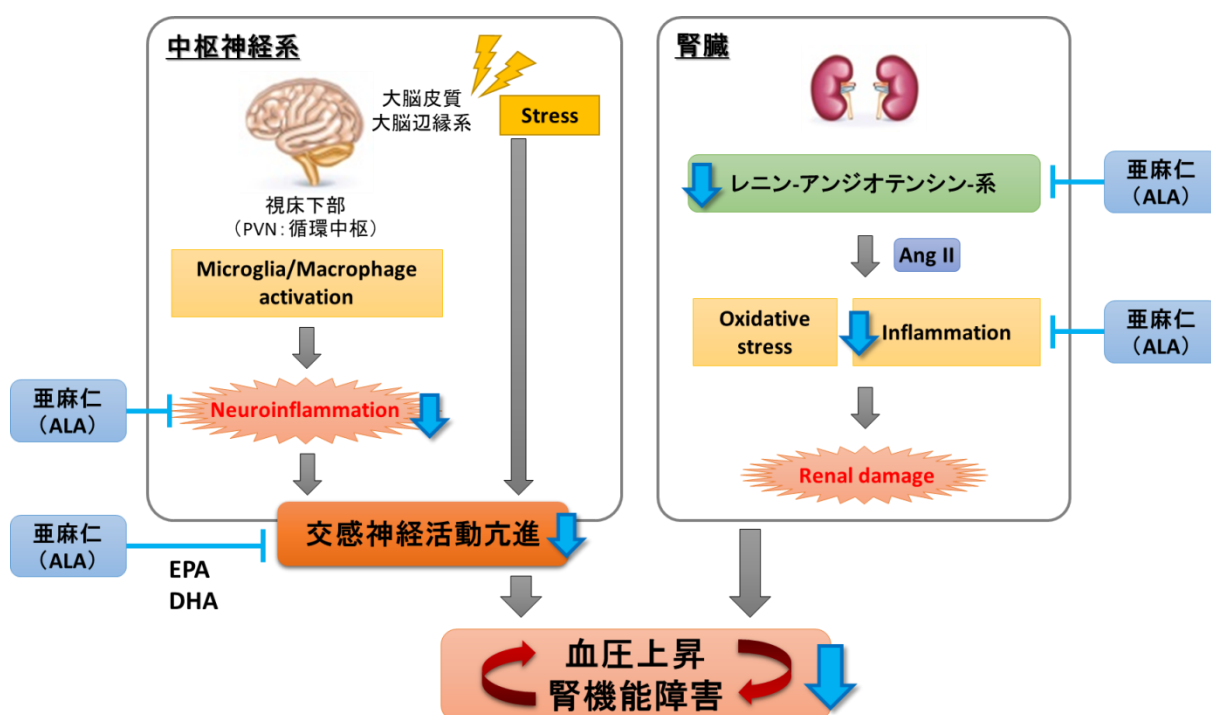


Figure 24: Schematic diagram for the mechanism of action related to antihypertensive and renoprotective effects of flaxseed.

Ang II, Angiotensin II; ALA, α -linolenic acid; DHA, Docosahexaenoic acid, EPA, Eicosapentaenoic acid; PVN, Paraventricular hypothalamic nucleus.

総括

亜麻仁は、亜麻科の植物の種子であり、ALA、リグナン及び食物繊維を豊富に含む機能性食品である。高血圧については、軽症の高血圧を呈する患者を対象とした臨床研究において、亜麻仁粉末及び亜麻仁油が降圧効果を認めることが報告されている。また、亜麻仁の降圧効果の作用機序として、循環 RAS 阻害作用が示唆されている。しかし、亜麻仁の降圧効果の発現に関わる機能性成分や、亜麻仁の降圧効果に寄与する循環 RAS 阻害作用以外の機序については報告がなく、未解明な部分が多い。

本研究では、亜麻仁の降圧効果及び腎保護効果とそれらに関わる作用機序の解明を目的に、重度の昇圧と腎機能障害を示す高血圧の代表的な実験動物モデルであり、かつ循環 RAS の抑制による降圧効果が期待できない点の特徴とする DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットを用いて、昇圧及び腎機能障害に対する亜麻仁の機能性成分の影響を検討するとともに、高血圧及び腎機能障害の発症及び進展に関与する自律神経活動、脳及び腎炎症、ACE 活性並びに酸化ストレスを中心に、作用機序の解明に関する検討を行った。また、ストレス性の心血管応答に対する亜麻仁の効果についても併せて検討した。

第 1 章では、亜麻仁を焙煎し粉末状にしたもので、機能性成分として ALA、リグナン及び食物繊維を含有する亜麻仁粉末と、亜麻仁の圧搾により得られる植物油で、機能性成分として ALA のみ含有する亜麻仁油が、いずれも本モデルの重度な昇圧及び腎機能障害に対して抑制効果を示すことを明らかにした。また、亜麻仁粉末が、亜麻仁油と比較してより高い降圧及び腎保護効果を示すことを見出した。亜麻仁粉末は、ALA 以外にも複数の成分で構成されており、この点が亜麻仁油と比較してより高い有効性を示した要因と考えられた。

第 2 章では、亜麻仁の機能性成分であるリグナン及び食物繊維の昇圧及び腎機能障害に対する影響を検討し、いずれの成分も単独では DOCA 食塩負荷高血圧モデルラットの昇圧及び腎機能障害に対して抑制効果を示さないことを明らかにした。第 1 章及び本章の結果より、本モデルにおける亜麻仁の降圧及び腎保護効果に関わる主要な機能性成分は、ALA であることが示唆された。

第 3 章では、ALA を主成分とする亜麻仁油が、DOCA 食塩負荷で認められた安静時の交感神経活動の上昇、視床下部の炎症性メディエーター遺伝子発現量の増加、腎 ACE 活性の上昇並びに腎臓の炎症性メディエーター遺伝子発現量の増加に対して抑制効果を示すことを見出した。本結果より、亜麻仁の降圧効果には、脳内炎症の抑制に基づいた交感神経過活動の抑制、また腎保護効果には、降圧効果に基づいた二次的な作用に加えて、腎臓での RAS 阻害作用と抗炎症作用が関与することが示唆された。また、亜麻仁は、ストレス負荷による MAP と交感神経活動の上昇を抑制したことから、ストレス耐性効果を有することが示唆された。

以上より、本研究を通して、以下のことが明らかとなった。

1. 亜麻仁の降圧及び腎保護効果の発現に寄与する機能性成分は ALA であると示唆されたこと
2. 亜麻仁の降圧作用には「脳内炎症とそれに伴う交感神経過興奮」に対する抑制作用が関与すること、並びに腎保護効果には降圧効果に基づく二次的な作用に加えて、「腎臓における RAS 阻害作用と抗炎症作用」が関与すること
3. 高血圧病態下における急性のストレス応答に対して、ストレス耐性効果を示すこと

高血圧は、2010 年時点でその有病者数が日本国民の 3 分の 1 を占める国民病であり、高齢化によりさらに増加することが予想される。また、高血圧は慢性腎臓病のリスクファクターであることから、高血圧患者における血圧の適切なコントロールは、慢性腎臓病への進行を防ぐ重要な手段となる。本研究において、亜麻仁は、比較的重度の高血圧とそれに付随して生じる腎機能障害に対して有効性を示すことが明らかとなったことから、亜麻仁の摂取が、高血圧患者における血圧のコントロールや慢性腎臓病への進行の予防に有用である可能性が示唆された。高血圧治療ガイドライン 2019 において、特定保健用食品や機能性表示食品は高血圧治療に使用される医療用医薬品の代替品にはならず、降圧効果に過剰な期待を持たないように指導するとともに、摂取について積極的には勧めないことが記載されている。そのため、高血圧患者に対して亜麻仁の摂取を勧めることは適切ではないが、高血圧に対する亜麻仁の最大効力を証明するとともに、亜麻仁の降圧効果に関わる有効成分を特定して作用機序の一端を解明し、今後の臨床応用をサポートするデータを取得することができたという点で、本研究成果は意義深いと考える。

ストレスと高血圧は深く関連しており、心理的、社会的、物理的ストレス等の環境ストレスに起因するストレス性高血圧は、QOL の低下を招くのみならず、心血管イベントリスクを増加させることから、ストレスの緩和やストレス耐性が期待できる機能性食品の摂取は、心血管イベントの発症リスクの低減や回避という点で有用である。本研究では、亜麻仁がストレス耐性効果を有することが期待できる成果を得ることができ、亜麻仁の有用性が示された。ストレスは、現代社会の様々な場面で遭遇する外部刺激であるが、特に、災害時には多くの環境ストレスに暴露され、持続的な昇圧を招くため、ストレスケアは重要でなる。亜麻仁は、ストレス耐性効果を有するのみならず、種々の栄養成分を豊富に含み、バランスの良い栄養摂取により、自然災害からの非難に伴う初動時の偏向した食生活（菓子パン、カップ麺、おにぎり等）の是正が可能であることから、備蓄可能な災害食としても有用である。

以上、本研究を通して、亜麻仁の血圧管理における有用性と作用機序の一端を明らかにすることができた。予防医学の必要性が叫ばれるなか、亜麻仁は、「食」を通して健康をサポートする機能性食品として今まさに注目されており、今後の臨床での活用が期待される。

引用文献

1. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, Chen J, He J. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. **2016**, 134, 441-450.
2. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. **2005**, 365, 217-223.
3. 高血圧治療ガイドライン 2019 (JSH2019) . ライフサイエンス出版株式会社, 東京, **2019**.
4. Qureshi AI, Suri MF, Kirmani JF, Divani AA. Prevalence and trends of prehypertension and hypertension in United States: National Health and Nutrition Examination Surveys 1976 to 2000. *Med. Sci. Monit*. **2005**, 11, CR403-409.
5. Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE, Roccella EJ. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988-1994 and 1999-2004. *Hypertension*. **2008**, 52, 818-827.
6. 荻尾七臣. 仮面高血圧—病態と治療—. *J. Jpn. Soc. Int. Med*. **2007**, 96, 79-85.
7. Ferrara LA, Ricci F, Viola S, DE Luca G, Ferrara F, DI Fronzo V, Gente R, Staiano L, Pacioni D. Dietary pattern and blood pressure control in a hypertension outpatient clinic. *Hypertens. Res*. **2007**, 30, 1043-1050.
8. Kawamura A, Kajiya K, Kishi H, Inagaki J, Mitarai M, Oda H, Umemoto S, Kobayashi S. Effects of the DASH-JUMP dietary intervention in Japanese participants with high-normal blood pressure and stage 1 hypertension: an open-label single-arm trial. *Hypertens. Res*. **2016**, 39, 777-785.
9. Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. **2003**, 17, 253-271.
10. Kajla P, Sharma A, Sood DR. Flaxseed-a potential functional food source. *J. Food Sci. Technol*. **2015**, 52, 1857-1871.
11. Qamar H, Ilyas M, Shabbir G, Irshad G, Nisar F, Abbas SM, Ghias M, Arshad A. Flax: Ancient to modern food. *Pure Appl. Biol*. **2019**, 8, 2269-2276.
12. Gaertner EE. The History and Use of Milkweed (*Asclepias syriaca L.*). *Econ. Bot*. **1979**, 33, 119-123.
13. You FM, Cloutier S, Rashid KY, Duguid SD. Flax (*Linum usitatissimum L.*) Genomics and Breeding. In Al-Khayri, JM, Jain SM, Johnson DV. Eds., *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*. Springer. **2019**, 277-317.
14. Morris DH. *Flax – A Health and Nutrition Primer. Fourth Edition*. Flax Council of Canada. **2007**.
15. Ren G, Zhang W, Sun S, Duan X, Zhang Z. Enhanced Extraction of Oil from Flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) Using Microwave Pre-treatment. *J. Oleo. Sci*. **2015**, 64, 1043-1047.
16. 「日本人の食事摂取基準（2020 年版）」策定検討会報告書. 厚生労働省健康局. 2020. <https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586553.pdf>.
17. Imran M, Ahmad N, Anjum FM, Khan MK, Mushtaq Z, Nadeem M, Hussain S. Potential protective properties of flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutr. J*. **2015**, 14, 71.
18. Fukumitsu S, Aida K, Shimizu H, Toyoda K. Flaxseed lignan lowers blood cholesterol and decreases liver

- disease risk factors in moderately hypercholesterolemic men. *Nutr. Res.* **2010**, 30, 441-446.
19. Zhang W, Wang X, Liu Y, Tian H, Flickinger B, Empie MW, Sun SZ. Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolaemic subjects. *Br. J. Nutr.* **2008**, 99, 1301-1319.
 20. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 76, 1191-1201.
 21. Riccioni G, Sblendorio V, Gemello E, Di Bello B, Scotti L, Cusenza S, D'Orazio N. Dietary fibers and cardiometabolic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 1524-1540.
 22. Rodriguez-Leyva D, Weighell W, Edel AL, La-Vallee R, Dibrov E, Pinneker R, et al. Potent antihypertensive action of dietary flaxseed in hypertensive patients. *Hypertension*. **2013**, 62, 1081-1089.
 23. Czernichow S, Zanchetti A, Turnbull F, Barzi F, Ninomiya T, Kengne AP, Lambers Heerspink HJ, Perkovic V, Huxley R, Arima H, Patel A, Chalmers J, Woodward M, MacMahon S, Neal B; Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. The effects of blood pressure reduction and of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events according to baseline blood pressure: meta-analysis of randomized trials. *J. Hypertens.* **2011**, 29, 4-16.
 24. Paschos GK, Magkos F, Panagiotakos DB, Votteas V, Zampelas A. Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2007**, 61, 1201-1206.
 25. Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR. Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am. J. Kidney Dis.* **2019**, 74, 120-131.
 26. Al-Bishri WM. Favorable effects of flaxseed supplemented diet on liver and kidney functions in hypertensive Wistar rats. *J. Oleo. Sci.* **2013**, 62, 709-715.
 27. Ogawa A, Suzuki Y, Aoyama T, Takeuchi H. Dietary alpha-linolenic acid inhibits angiotensin-converting enzyme activity and mRNA expression levels in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J. Oleo. Sci.* **2009**, 58, 355-360.
 28. Prasad K. Secoisolariciresinol Diglucoside (SDG) Isolated from Flaxseed, an Alternative to ACE Inhibitors in the Treatment of Hypertension. *Int. J. Angiol.* **2013**, 22, 235-238.
 29. 香美 祥二. 腎臓レニン・アンジオテンシン系 (RAS) : 生命の環を支え、脅かすもの. *Jap. J. Pediatr. Nephrol.* **2014**, 26, 227-231.
 30. Covic A, Segall L. Sympathetic and Renin–Angiotensin Activity in the Pathophysiology of Hypertension. In G. Jagadeesh et al. (eds.), *Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease*. Springer. 2015. 723-749.
 31. Waki H, Gouraud SS. Brain inflammation in neurogenic hypertension. *World J. Hypertens.* **2014**, 4, 1-6.
 32. Xu Z, Li W, Han J, Zou C, Huang W, Yu W, Shan X, Lum H, Li X, Liang G. Angiotensin II induces kidney inflammatory injury and fibrosis through binding to myeloid differentiation protein-2 (MD2). *Sci. Rep.* **2017**, 7, 44911.
 33. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO. Mol. Med.* **2010**, 2, 247-257.

34. 小杉武史, 五味朋子, 池田壽雄. DOCA 食塩高血圧ラットにおける食塩依存性血圧上昇に関与する腎トロンボキサンの役割. *Jpn. J. Nephrol.* **1995**, 37, 497-502.
35. Basting T, Lazartigues E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr. Hypertens. Rep.* **2017**, 19, 32.
36. Seifi B, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Golab F, Bakhshi E. Changes in serum and renal vitamin E levels in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Transplant. Proc.* **2009**, 41, 2910-2911.
37. Toba H, Yoshida M, Tojo C, Nakano A, Oshima Y, Kojima Y, Noda K, Wang J, Kobara M, Nakata T. L/N-type calcium channel blocker cilnidipine ameliorates proteinuria and inhibits the renal renin-angiotensin-aldosterone system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertens. Res.* **2011**, 34, 521-529.
38. Wang D, Luo Y, Myakala K, Orlicky DJ, Dobrinskikh E, Wang X, Levi M. Serelaxin improves cardiac and renal function in DOCA-salt hypertensive rats. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 9793.
39. Yemane H, Busauskas M, Burris SK, Knuepfer MM. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. *Exp. Physiol.* **2010**, 95, 51-55.
40. Xia H, Sriramula S, Chhabra KH, Lazartigues E. Brain angiotensin-converting enzyme type 2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. *Circ. Res.* **2013**, 113, 1087-1096.
41. Sriramula S, Xia H, Xu P, Lazartigues E. Brain-targeted angiotensin-converting enzyme 2 overexpression attenuates neurogenic hypertension by inhibiting cyclooxygenase-mediated inflammation. *Hypertension.* **2015**, 65, 577-586.
42. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, 7, 335-346.
43. Fujita H, Takeda K, Miki S, Morimoto S, Kawa T, Uchida A, Itoh H, Nakata T, Sasaki S, Nakagawa M. Chronic angiotensin blockade with candesartan cilexetil in DOCA/salt hypertensive rats reduces cardiac hypertrophy and coronary resistance without affecting blood pressure. *Hypertens. Res.* **1997**, 20, 263-267.
44. 田島義博, DOCA-salt 高血圧ラットにおける体液分布の経時的変化,及びその役割. *Kitakanto Med. J.* **1984**, 34, 1-7.
45. Bakris GL, Williams M, Dworkin L, Elliott WJ, Epstein M, Toto R, Tuttle K, Douglas J, Hsueh W, Sowers J. Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group. *Am. J. Kidney Dis.* **2000**, 36, 646-661.
46. Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* **1966**, 50, 219-244.
47. Schupp N, Kolkhof P, Queisser N, Gärtner S, Schmid U, Kretschmer A, Hartmann E, Oli RG, Schäfer S, Stopper H. Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats. *FASEB J.* **2011**, 25: 968-978.
48. Callens-el Amrani F, Paolaggi F, Swynghedauw B. Remodelling of the heart in DOCA-salt hypertensive rats by propranolol and by an alpha-2 agonist, rilmenidine. *J Hypertens.* **1989**, 7: 947-954.
49. Sekine S, Sasanuki S, Aoyama T, Takeuchi H. Lowering systolic blood pressure and increases in vasodilator levels in SHR with oral alpha-linolenic acid administration. *J. Oleo. Sci.* **2007**, 56, 341-345.

50. Hasegawa H, Kanozawa K, Asakura J, Takayanagi K, Komuro O, Fukada H, Tokushima H, Kogure H, Matsuzawa M, Mitarai T. Significance of estimated salt excretion as a possible predictor of the efficacy of concomitant angiotensin receptor blocker (ARB) and low-dose thiazide in patients with ARB resistance. *Hypertens. Res.* **2013**, 36, 776-782.
51. Holcapek M, Jandera P, Zderadicka P, Hrubá L. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1010, 195-215.
52. Wang L, Manson JE, Forman JP, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. Dietary fatty acids and the risk of hypertension in middle-aged and older women. *Hypertension.* **2010**, 56, 598-604.
53. Cicero AF, Derosa G, Di Gregori V, Bove M, Gaddi AV, Borghi C. Omega 3 polyunsaturated fatty acids supplementation and blood pressure levels in hypertriglyceridemic patients with untreated normal-high blood pressure and with or without metabolic syndrome: a retrospective study. *Clin. Exp. Hypertens.* **2010**, 32, 137-144.
54. Filipovic MG, Aeschbacher S, Reiner MF, Stivala S, Gobbato S, Bonetti N, Risch M, Risch L, Camici GG, Luescher TF, von Schacky C, Conen D, Beer JH. Whole blood omega-3 fatty acid concentrations are inversely associated with blood pressure in young, healthy adults. *J. Hypertens.* **2018**, 36, 1548-1554.
55. Miller PE, Van Elswyk M, Alexander DD. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Hypertens.* **2014**, 27, 885-896.
56. Kumar KV, Das UN. Effect of cis-unsaturated fatty acids, prostaglandins, and free radicals on angiotensin-converting enzyme activity in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1997**, 214, 374-379.
57. Grynberg A. Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. *J. Hum. Hypertens.* **2005**, 19, S25-33.
58. Torkan M, Entezari MH, Siavash M. Effect of flaxseed on blood lipid level in hyperlipidemic patients. *Rev. Recent Clin. Trials.* **2015**, 10, 61-67.
59. Yari Z, Rahimlou M, Eslamparast T, Ebrahimi-Daryani N, Poustchi H, Hekmatdoost A. Flaxseed supplementation in non-alcoholic fatty liver disease: a pilot randomized, open labeled, controlled study. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, 67, 461-469.
60. Hanif Palla A, Gilani AH. Dual effectiveness of Flaxseed in constipation and diarrhea: Possible mechanism. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, 169, 60-68.
61. Soltanian N, Janghorbani M. A randomized trial of the effects of flaxseed to manage constipation, weight, glycemia, and lipids in constipated patients with type 2 diabetes. *Nutr. Metab. (Lond).* **2018**, 15, 36.
62. Lawrence GD. *The Fats of Life: Essential Fatty Acids in Health and Disease*. Rutgers University Press. **2013**.
63. Sawant SH, Bodhankar SL. Flax lignan concentrate reverses alterations in blood pressure, left ventricular functions, lipid profile and antioxidant status in DOCA-salt induced renal hypertension in rats. *Ren. Fail.* **2016**, 38, 411-423.
64. Obata K, Ikeda K, Yamasaki M, Yamori Y. Dietary fiber, psyllium, attenuates salt-accelerated hypertension

- in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **1998**, 16, 1959-1964.
65. Sánchez D, Quiñones M, Moulay L, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure of a soluble cocoa fiber product in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1493-1501.
 66. Toba H, Nakamori A, Tanaka Y, Yukiya R, Tatsuoka K, Narutaki M, Tokitaka M, Hariu H, Kobara M, Nakata T. Oral L-histidine exerts antihypertensive effects via central histamine H3 receptors and decreases nitric oxide content in the rostral ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2010**, 37, 62-68.
 67. Koizumi T, Taguchi K, Mizuta I, Toba H, Ohigashi M, Onishi O, Ikoma K, Miyata S, Nakata T, Tanaka M, Foulquier S, Steinbusch HWM, Mizuno T. Transiently proliferating perivascular microglia harbor M1 type and precede cerebrovascular changes in a chronic hypertension model. *J. Neuroinflammation.* **2019**, 16, 79.
 68. Singh K. Nutrient and Stress Management. *J. Nutr. Food Sci.* **2016**, 6:4.
 69. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition. Academic Press, **1997**.
 70. Ogawa Y, Iwasaki K, Kato J. Apparatus for Assessment of Autonomic Nervous System by Spectral Analysis. *Anesthesia 21 Century.* **2011**, 13, 2554-2559.
 71. Ogawa T, Linz W, Schölkens BA, de Bold AJ. Variable renal atrial natriuretic factor gene expression in hypertension. *Hypertension.* **1999**, 33, 1342-1347.
 72. Grobe JL, Buehrer BA, Hilzendeger AM, Liu X, Davis DR, Xu D, Sigmund CD. Angiotensinergic signaling in the brain mediates metabolic effects of deoxycorticosterone (DOCA)-salt in C57 mice. *Hypertension.* **2011**, 57, 600-607.
 73. 岸拓弥. 交感神経活性化が高血圧の根源である. *Circulation control.* **2014**, 35, 190-193.
 74. Goit RK, Ansari AH. Reduced parasympathetic tone in newly diagnosed essential hypertension. *Indian. Heart. J.* **2016**, 68, 153-157.
 75. Reid JK, Zivin JA, Kopin I. Central and peripheral adrenergic mechanisms in the development of deoxycorticosterone-saline hypertension in rats. *Circ. Res.* **1975**, 37, 569-579.
 76. Mu S, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, Kawakami-Mori F, Marumo T, Yatomi Y, Geller DS, Tanaka H, Fujita T. Epigenetic modulation of the renal β -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. *Nat. Med.* **2011**, 17, 573-580.
 77. Patrick RP, Ames BN. Vitamin D and the omega-3 fatty acids control serotonin synthesis and action, part 2: relevance for ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, and impulsive behaviour. *FASEB. J.* **2015**, 29, 2207-2222.
 78. Hibbeln JR, Linnoila M, Umhau JC, Rawlings R, George DT, Salem N Jr. Essential fatty acids predict metabolites of serotonin and dopamine in cerebrospinal fluid among healthy control subjects, and early- and late-onset alcoholics. *Biol. Psychiatry.* **1998**, 44, 235-242.
 79. Molderings GJ, Werner K, Likungu J, Göthert M. Inhibition of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human saphenous vein via presynaptic 5-HT receptors similar to the 5-HT 1D subtype. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **1990**, 342, 371-377.
 80. Molderings GJ, Fink K, Schlicker E, Göthert M. Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT1B

- receptors of the rat vena cava. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1987**, 336, 245-250.
81. Kim KI, Lee JH, Chang HJ, Cho YS, Youn TJ, Chung WY, Chae IH, Choi DJ, Park KU, Kim CH. Association between blood pressure variability and inflammatory marker in hypertensive patients. *Circ. J.* **2008**, 72, 293-298.
 82. Pruijm M, Vollenweider P, Mooser V, Paccaud F, Preisig M, Waeber G, Marques-Vidal P, Burnier M, Bochud M. Inflammatory markers and blood pressure: sex differences and the effect of fat mass in the CoLaus Study. *J. Hum. Hypertens.* **2013**, 27, 169-175.
 83. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA.* **2003**, 290, 2945-2951.
 84. Santisteban MM, Ahmari N, Carvajal JM, Zingler MB, Qi Y, Kim S, Joseph J, Garcia-Pereira F, Johnson RD, Shenoy V, Raizada MK, Zubcevic J. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension. *Circ. Res.* **2015**, 117, 178-191.
 85. Shi P, Diez-Freire C, Jun JY, Qi Y, Katovich MJ, Li Q, Sriramula S, Francis J, Sumners C, Raizada MK. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension.* **2010**, 56, 297-303.
 86. Haroon E, Miller AH, Sanacora G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacol.* **2017**, 42, 193-215.
 87. Yip PK, Pizzasegola C, Gladman S, Biggio ML, Marino M, Jayasinghe M, Ullah F, Dyll SC, Malaspina A, Bendotti C, Michael-Titus A. The omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid accelerates disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS. One.* **2013**, 8, e61626.
 88. Belayev L, Khoutorova L, Atkins KD, Eady TN, Hong S, Lu Y, Obenaus A, Bazan NG. Docosahexaenoic Acid therapy of experimental ischemic stroke. *Transl. Stroke. Res.* **2011**, 2, 33-41.
 89. Spruill TM. Chronic Psychosocial Stress and Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **2010**, 12, 10-16.
 90. Ayada C, Toru Ü, Korkut Y. The relationship of stress and blood pressure effectors. *Hippokratia.* **2015**, 19, 99-108.
 91. Hamazaki T, Itomura M, Sawazaki S, Nagao Y. Anti-stress effects of DHA. *Biofactors.* **2000**, 13, 41-45.
 92. Itomura M, Hamazaki K, Sawazaki S, Kobayashi M, Terasawa K, Watanabe S, Hamazaki T. The effect of fish oil on physical aggression in schoolchildren--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Nutr. Biochem.* **2005**, 16, 163-171.
 93. 災害時循環器疾患の予防・管理に関するガイドライン: 日本循環器学会/日本高血圧学会/日本心臓病学会合同ガイドライン. 日本循環器学会. 東京, **2015**.
 94. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* **2007**, 59: 251-287.
 95. Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B. Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 152, 1042-1048.
 96. Guo F, Chen XL, Wang F, Liang X, Sun YX, Wang YJ. Role of angiotensin II type 1 receptor in angiotensin II-induced cytokine production in macrophages. *J. Interferon. Cytokine. Res.* **2011**, 31, 351-361.
 97. Fang F, Liu GC, Kim C, Yassa R, Zhou J, Scholey JW. Adiponectin attenuates angiotensin II-induced oxidative stress in renal tubular cells through AMPK and cAMP-Epac signal transduction pathways. *Am. J.*

- Physiol. Renal. Physiol.* **2013**, 304, F1366-1374.
98. Peng H, Carretero OA, Alfie ME, Masura JA, Rhaleb NE. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin type 1 receptor antagonist in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice lacking Ren-2 gene. *Hypertension*. **2001**, 37, 974-980.
 99. Morisseau C1, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, 53, 37-58.
 100. Dai M, Wu L, He Z, Zhang S, Chen C, Xu X, Wang P, Gruzdev A, Zeldin DC, Wang DW. Epoxyeicosatrienoic acids regulate macrophage polarization and prevent LPS-induced cardiac dysfunction. *J. Cell. Physiol.* **2015**, 230, 2108-2119.
 101. Schmelzer KR, Kubala L, Newman JW, Kim IH, Eiserich JP, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2005**, 102, 9772-9777.
 102. Caligiuri SP, Aukema HM, Ravandi A, Guzman R, Dibrov E, Pierce GN. Flaxseed consumption reduces blood pressure in patients with hypertension by altering circulating oxylipins via an α -linolenic acid-induced inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Hypertension*. **2014**, 64, 53-59.
 103. Burns RN, Moniri NH. Agonism with the omega-3 fatty acids alpha-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **2010**, 396, 1030-1035.
 104. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. **2010**, 142, 687-698.
 105. Dragano NRV, Solon C, Ramalho AF, de Moura RF, Razolli DS, Christiansen E, Azevedo C, Ulven T, Velloso LA. Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *J Neuroinflammation*. **2017**, 14, 91.

謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際し、研究の基礎から論文作成に至るまで、終始格別なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田徹男 教授に深甚なる謝意を表します。

副査として、本論文の作成に当たり、ご助言並びにご指導とご高閲を賜りました京都薬科大学 生薬学分野 松田久司 教授並びに京都薬科大学 病態生化学分野 秋葉聡 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に当たり、貴重なご助言とご助力を賜りました京都薬科大学 臨床薬理学分野 小原幸 准教授並びに鳥羽裕恵 助教に深謝致します。

末筆ながら、多大なるご助力を戴きました京都薬科大学 臨床薬理学分野 大畑佳織氏、深野木文香氏、藤本直人氏、松本万瑠里氏、Naseratun Nessa 氏をはじめとする教室員の皆様に感謝致します。