

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700604  
 研究課題名 (和文) 緑茶成分エピガロカテキンガレートによる脳卒中発症予防のメカニズム  
 研究課題名 (英文) Mechanism for prevention of spontaneous stroke by epigallocatechin gallate in rats.

研究代表者  
 田淵 正樹 (TABUCHI MASAKI)  
 近畿大学・医学部・助教  
 研究者番号：20340771

## 研究成果の概要：

緑茶の摂取が脳卒中発症を予防する機序を明らかにするために、悪性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット M-SHRSP に緑茶の主要成分エピガロカテキンガレート (EGCG) を長期間摂取させた。EGCG の摂取により、収縮期血圧の上昇抑制、アンジオテンシン II の生成抑制、酸化ストレスの生成抑制、および耐糖能異常の改善が観察された。EGCG はこれらの機序を介して脳卒中発症を予防していることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：循環器・高血圧，食品，緑茶カテキン，脳卒中，酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、医療の進歩により脳卒中を死因とする死亡率は減少しているものの、脳卒中の患者数は増加の一途をたどっている。脳卒中の特徴は発症後長期にわたり、重篤な身体機能障害や知能・精神機能障害を残すことで、寝たきり者の原因の 36.5%を脳血管疾患が占める。このことは、脳卒中に対する医療費が非常に高額であることにもつながっている。このように脳卒中は社会的影響のきわめて大きい疾患であることから、その予防あるいは脳卒中発症後の脳障害の軽減は非常に重

要な課題である。

(2) 茶の飲用によるヒト脳卒中への影響に関しては、いくつかの疫学研究が報告されている。オランダの Keli らは、紅茶を 1 日 4.7 杯以上飲用する人は 2.6 杯未満の人よりも脳卒中発症率が有意に低下していることを報告している。国内では、栗山らにより、宮城県民の 11 年間の追跡調査から、脳梗塞による死亡率が緑茶摂取量依存的に低下したとの報告がある。

(3) 研究代表者は、悪性の高血圧を伴い脳卒中を自然発症するラットである悪性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats: M-SHRSP) を用い、脳卒中発症前後の生体機能の変化、すなわち体重減少・飲水量の増加・尿量の増加等の代謝機能変化、四肢の麻痺・過敏性などの神経症状の発現、血清中の一酸化窒素代謝産物 (NO<sub>x</sub>) 濃度の一過性の上昇が観察され、これらを指標として自然発症脳卒中モデルにおける脳卒中発症を推定する手法を確立した。

(4) 予備実験として、5週齢の M-SHRSP を 2 群に分け、一方は緑茶カテキン群として緑茶カテキン抽出物の水溶液を、他方は対照群として蒸留水を自由に飲水させたところ、緑茶カテキン群の血圧上昇が対照群に比べて穏やかに抑制されることを見出した。さらに、(3) で示した指標を用いて脳卒中発症日を推定したところ、緑茶カテキン群の脳卒中発症日が遅延する結果が得られた。

(5) 以上のような背景から、我が国の伝統飲料である緑茶の摂取が、脳卒中発症の予防に有効である可能性が期待され、その予防機序を解明する意義は大きいと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、緑茶の摂取が脳卒中の発症を予防する機序を解明することであり、具体的には、緑茶の主要成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) を脳卒中自然発症モデル M-SHRSP に摂取させたときの、血圧、脳卒中病態、およびこれらに関連する生体因子への影響を明らかにすることである。

(2) 脳卒中発症における最大の危険因子は高血圧であるが、降圧薬の開発が進歩した現在においても脳卒中患者は増加していることから、血圧以外にも脳卒中発症に関与する因子の存在が考えられる。本研究では、血圧以外の因子として、酸化ストレス、糖代謝指標、およびアディポサイトカインに着目し、これら因子と脳卒中発症との関わり、EGCG 投与による影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 動物の処置、血圧測定、脳卒中発症日の推定および脳病変の確認

雄性 M-SHRSP を用い、5 週齢より 0.3% EGCG 水溶液を 8 週間自由摂取させ EGCG 群 (n=17) とし、対照群 (n=17) には蒸留水を自由摂取させた。血圧は尾カフ法を用いて測定した。血液は、尾静脈より採取した。脳卒中発症は、体重の減少、神経症状の観察により推定した。実験終了時にペントバルビタール麻酔下、全

血を採取し、致死させた。直ちに脳を摘出し、病理組織標本を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色により脳病変の病理学的検索を行った。

(2) 血漿レニン活性、アンジオテンシン II 濃度、アルドステロン濃度の測定

EGCG 投与 8 週間後の血漿レニン活性および血漿アンジオテンシン II 濃度は RIA 法、血漿アルドステロン濃度は ELISA 法を用いて測定した。

(3) 酸化ストレス指標の測定

EGCG 摂取 8 週間後の血漿一酸化窒素代謝産物濃度をグリース法により、EGCG 摂取 6 週間後における尿 8-OHdG および尿バイオピリン濃度を ELISA 法により測定した。

(4) eNOS および NADPH oxidase サブユニット mRNA 発現の定量

一部のラット (各群 n=6) について、EGCG 摂取 5 週間後に胸部大動脈を摘出し、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) と NADPH オキシダーゼのサブユニット (Nox1, Nox2, p22<sup>phox</sup>) mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した。

(5) 血漿アディポネクチン濃度の測定

血漿アディポネクチン濃度は ELISA 法により測定した。M-SHRSP の血漿アディポネクチン濃度の加齢変化、正常血圧動物 Wistar Kyoto rats (WKY) との比較を行った。さらに、EGCG 摂取 4~8 週間後の血漿アディポネクチン濃度を測定した。

(6) 経口グルコース負荷試験

予備検討において、M-SHRSP はインスリン分泌低下により、著しい耐糖能異常を有することを見出した。そこで、EGCG が M-SHRSP の耐糖能に及ぼす影響を観察するために、4 週齢の雄性 M-SHRSP を用い、0.3% EGCG 水溶液を 3 週間自由摂取させ EGCG 群 (n=5) とし、対照群 (n=5) には蒸留水を自由摂取させた。20 時間絶食の後、経口グルコース負荷 (2g/kg BW) を行い、0、15、30、60、90、120 分後の血糖値を自己検査用グルコース測定器により、血漿インスリン濃度を ELISA 法により測定した。

## 4. 研究成果

(1) EGCG の収縮期血圧、脳卒中発症日、脳病変に対する影響

実験開始 4 週間後までに、対照群と EGCG 群に収縮期血圧の差は認められなかったが、投与 5 週間後以降に EGCG 群で収縮期血圧の上昇が抑制された。投与 7 週間後 (生後 12 週齢) における収縮期血圧は対照群 272 ± 4

mmHg に対し、EGCG 群で  $247 \pm 3$  mmHg ( $p < 0.001$ ) であった (図 1)。

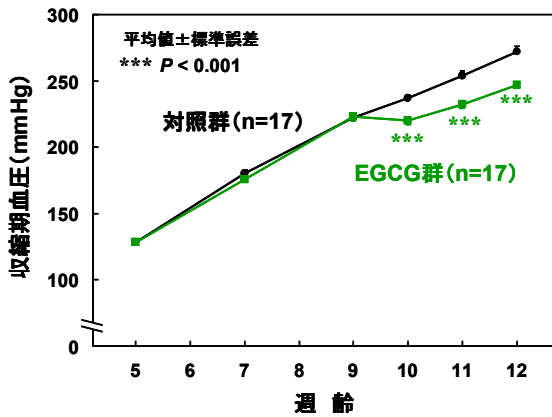


図 1. EGCG 摂取による収縮期血圧への影響

各群の脳卒中発症率の推移を図 2 に示した。EGCG 摂取により、脳卒中発症日の有意な遅延 ( $p < 0.01$ ) が認められた。実験終了時 (13 週齢) における脳卒中発症率は対照群 82%、EGCG 群 41% であり、摘出した脳の病理検索を行ったところ、脳卒中発症を推定したラットの脳内には、確かに病変 (脳梗塞、脳出血、脳浮腫) が認められた。

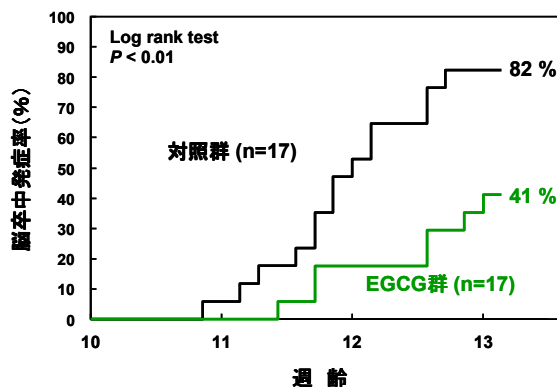


図 2. EGCG 摂取による脳卒中発症遅延効果

(2) EGCG のレニン・アンジオテンシン系への影響

EGCG 摂取 8 週間後の血漿レニン活性は両群に差は認められなかったが (対照群  $10.7 \pm 0.3$ 、EGCG 群  $9.1 \pm 0.4$  ng/mL/hr、NS)、血漿アンジオテンシン II 濃度は著明に低下し (対照群  $31.1 \pm 1.2$ 、EGCG 群  $15.3 \pm 0.5$  pg/mL、 $p < 0.001$ )、血漿アルドステロン濃度も低値を示した (対照群  $1.49 \pm 0.14$ 、EGCG 群  $0.56 \pm 0.07$  ng/mL、 $p < 0.05$ ) (図 3)。

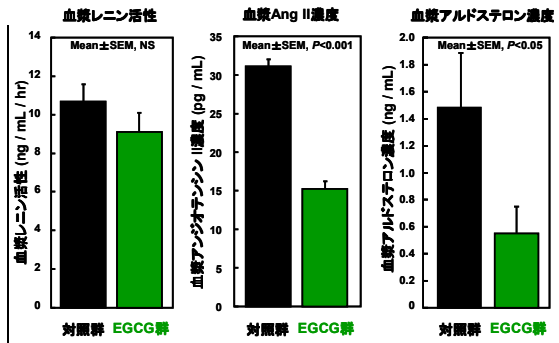


図 3. EGCG 摂取によるレニン・アンジオテンシン系への影響

(3) EGCG の酸化ストレス指標に対する影響

EGCG 摂取 8 週間後の血漿一酸化窒素代謝産物濃度は対照群  $36.3 \pm 12.2$   $\mu$ g/mL に比し、EGCG 群で  $15.9 \pm 1.6$   $\mu$ g/mL と有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。EGCG 摂取 6 週間後における尿 8-OHdG 濃度は両群に差は認められなかったが (対照群  $26.6 \pm 2.7$ 、EGCG 群  $26.3 \pm 2.8$  ng/mg Cre、NS)、尿バイオピリン濃度は、対照群  $17.0 \pm 3.2$  Unit/g Cre. に比し、EGCG 群  $9.9 \pm 0.8$  Unit/g Cre. と有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。

(4) EGCG の eNOS および NADPH oxidase サブユニット mRNA に対する影響

EGCG 摂取 5 週間後の胸部大動脈における eNOS および NADPH オキシダーゼのサブユニット (Nox1、Nox2、p22<sup>phox</sup>) mRNA 発現に差異は認められなかった。

(5) M-SHRSP の血漿アディポネクチン濃度の変動および EGCG が血漿アディポネクチン濃度に与える影響

9-10 週齢の WKY および M-SHRSP における血漿アディポネクチン濃度に差は認められなかったが (WKY;  $4.20 \pm 0.65$ 、M-SHRSP;  $4.61 \pm 0.26$   $\mu$ g/mL、NS)、M-SHRSP で脳卒中発症後 (12-13 週齢) に著明な血漿アディポネクチン濃度が低下することを見出した。

EGCG 摂取 4~8 週間後の血漿アディポネクチン濃度を測定したところ、対照群との間に血漿アディポネクチン濃度の差は認められなかった。

(6) EGCG が M-SHRSP の糖代謝に与える影響

7 週齢の WKY および M-SHRSP に経口グルコース負荷 (2g/kg BW) 試験を行ったところ、M-SHRSP はインスリン分泌低下により、WKY に比し、著しい耐糖能異常を示した (図 4)。

3 週間の EGCG 摂取により、M-SHRSP の耐糖能異常は一部改善された (図 4 左)。一方、EGCG 摂取では、インスリン分泌にはほとんど影響しなかったことから (図 4 右)、EGCG 摂

取による耐糖能異常の改善は、腸管におけるブドウ糖吸収の抑制またはインスリン抵抗性の改善が関与しているものと推察された。

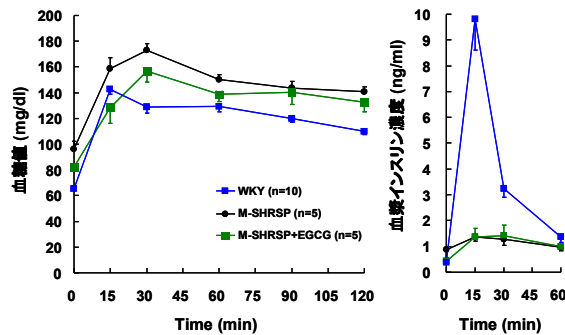


図4. EGCG 摂取による耐糖能異常の改善効果

(7) 以上の結果より、緑茶成分 EGCG の摂取が脳卒中の発症を予防することを明らかとした。EGCG は長期にわたる摂取により、アンジオテンシン II の生成抑制に働き、収縮期血圧の上昇を穏やかに抑制した。

M-SHRSP は、その形質がやせ形であり、本研究で明らかにしたように、インスリン分泌不足に伴う耐糖能異常を有する、いわば日本人に極めて近いモデルであることが明らかとなった。EGCG 摂取は、インスリン分泌を改善しないものの、耐糖能異常を一部改善しており、このことも血圧上昇の抑制に部分的ではあるが作用しているものと考えられた。

また、脳卒中発症や病態の進行に酸化ストレスが関与していることが明らかにされているが、EGCG の摂取は酸化ストレス、特に一酸化窒素の過剰生成を抑制することで脳卒中病態を改善することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 田渕正樹(他 4 名、3 番目)、Hypersensitivity caused by suppression of descending inhibitory pathways following lumbar intrathecal injection of lidocaine in rats, *Acta Med. Kinki Univ.*、査読有、33(1-2)、2008 年、47-54
- ② 田渕正樹(他 4 名、3 番目)、Acetylsalicylic acid provides cerebrovascular protection from oxidant damage in salt-loaded stroke-prone rats, *Life Sci.*、査読有、82(13-14)、2008 年、806-815

- ③ 田渕正樹(他 7 名、2 番目)、Nicorandil may change the sympathetic nerve activity of SHR. Cg-Leptcp/NDmcr rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*、査読有、34(s1)、2007 年、S31-32

- ④ 田渕正樹(他 8 名、3 番目)、高血圧・肥満自然発症ラット (SHR. Cg-Leprcp/NDmcr) の循環パラメータに対するニコランジルの影響—テレメトリ装置を用いた検討—, *Therapeutic Research*、査読有、28(3)、2007 年、413-418

- ⑤ 田渕正樹(他 5 名、3 番目)、Involvement of thromboxane A2 receptor in the cerebrovascular damage of salt-loaded stroke-prone rats, *J. Hypertens.*、査読有、25(4)、2007 年、861-870

- ⑥ 田渕正樹(他 5 名、5 番目)、Preventive effects of green tea catechins on spontaneous stroke in rats, *Med. Sci. Monit.*、査読有、13(2)、2007 年、BR40-45

[学会発表] (計 5 件)

- ① 田渕正樹、エピガロカテキンガレートの脳卒中発症抑制効果、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007 年 5 月 20 日、京都
- ② 田渕正樹、緑茶成分エピガロカテキンガレートのラット脳卒中発症遅延効果、第 55 回日本生化学会近畿支部例会、2007 年 5 月 24 日、大阪
- ③ 田渕正樹、Protective effects of epigallocatechin gallate on spontaneous stroke in malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats, 第 13 回国際 SHR シンポジウム、2008 年 6 月 21 日、プラハ
- ④ 田渕正樹、長期自発的運動のラット脳卒中発症予防効果、第 16 回日本運動生理学会大会、2008 年 8 月 2 日、奈良
- ⑤ 田渕正樹、悪性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットにおける血中アディポネクチン濃度変化の検討、第 29 回日本肥満学会、2008 年 10 月 18 日、大分

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田渕 正樹 (TABUCHI MASAKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20340771