

## 食塩感受性高血圧におけるスピルリナの降圧作用機序について

石原 由夏<sup>1</sup>, 富永 信子<sup>1</sup>, 林 修<sup>2</sup>, 石井 恭子<sup>2</sup>, 仁科 正実<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 埼玉医科大学中央研究施設実験動物部門, <sup>2</sup> 女子栄養大学免疫検査学研究室

**概要** スピルリナ (*Spirulina platensis*) とは熱帯地方の塩湖に自生しているネンジュモ目ユレモ科に属するスパイラル状の藻類である。タンパク質, ビタミン, ミネラルなど 50 種類以上の栄養成分を豊富に含み, 湖の周辺で生活している原住民には古来より貴重な食料源として食されてきた。近年では健康補助食品として市販されており, 降圧作用, 抗癌作用, 抗酸化作用, 免疫賦活作用などが報告されている<sup>(1)</sup>。特に降圧作用はヒトやマウスで報告されているが, その作用機序は不明な点が多く, 科学的な根拠が求められている。また最近の研究ではスピルリナの主要成分である青色色素のフィコシアニンを摂取することにより, 高血圧自然発症モデルラット (SHR) で血圧を下げる事が報告されている<sup>(2)</sup>。

本研究では食塩感受性高血圧症モデルラット (DIS/Eis) を用い, 0.3%食塩添加飼料, 4.0%食塩添加飼料, 8.0%食塩添加飼料を与えた場合での phy 摂取群と非摂取群とでの降圧作用の違いを, 広範囲の化学成分を網羅的に分析可能なキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析 (CE-TOFMS) を利用したメタボロミクスの視点から解明することを目的としたが, DIS/Eis に対して phy による降圧作用は認められなかった。そのため phy 非摂取群で 0.3%食塩添加飼料, 4.0%食塩添加飼料, 8.0%食塩添加飼料を与えた場合での血圧上昇における代謝産物の変化を解析した。

結果より食塩感受性高血圧との相互関係にアスパラギン, 5-ヒドロキシリシン, ヒスチジン, プロリン, イミダゾール酢酸, ピペコリン酸, シトルリン, 4-ヒドロキシプロリン, メチオニン, オルニチン, グリシンの 11 種類の代謝物質の変動が観察され, 尿素回路と関連アミノ酸代謝および脂質代謝と関連アミノ酸代謝に影響を与えることが推察された。

### 1. 研究目的

日本人の塩分摂取量は世界的に見ても高く, 高血圧のリスクや脳梗塞, 腎障害などの合併症の危険が高まることが知られており, 日本人の約 4 割を占めると云われている食塩感受性高血圧を改善することは生活の質 (QOL) の向上に繋がると考えている。

一般的には食塩感受性高血圧は塩分を摂取するとアルドステロンが分泌され, アルドステロン濃度依存的に鉱質コルチコイド受容体 (MR) が活性化することで, 腎臓でのナトリウムの再吸収が起こり, 血圧が上昇する。しかし食塩感受性高血圧症モデルラット (DIS/Eis) では食塩負荷において高血圧が発生するが, 血中アルドステロン濃度低下にも関わらず, Rac1 と MR シグナルクロストークが MR 活性を修飾することが報告されている<sup>(3)</sup>。

スピルリナ (*Spirulina platensis*) はネンジュモ目ユレモ科

に属する 0.3~0.5 mm ほどのスパイラル状の藻類である。

その生育条件は, ①強い太陽光線, ②強アルカリ性の湖, ③水温 30~35°C という特殊な条件下であるため, 主に熱帯地方の湖で自生が確認されている。古来より貴重な食料源として, 湖の周辺で生活している原住民にはパンやスープとして食されており, 現在では理想的なバランス食として注目されている。アミノ酸, ビタミン, ミネラルなど 50 種類以上の栄養成分を含み, 特にタンパク質が 55~70% と高い含有率を持つことが分かっている。また色素成分として, 黄色色素の  $\beta$ -カロチン・ゼアキサンチン, 緑色色素のクロロフィル, 青色色素のフィコシアニン (phy) が含まれており, 特に phy は食品用青色着色料として氷菓や, 体色を鮮やかにする効果として錦鯉等の飼料にも使用されている。phy は 2 種のサブユニット  $\alpha$ ,  $\beta$  から構成されているフィコシアノビルリンを有する, 分子量 1.6 万~2.0 万のタンパク

質で、スピルリナに3~10%の割合で含まれている。

最近の研究ではphyの抗癌作用、降圧作用が注目されており、高血圧自然発症ラット(SHR)において血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の産生量が増加することで血管内皮機能が改善され、また血管拡張作用のあるアディポネクチンの分泌量が増加し血圧を下げる事が報告されている<sup>(2)</sup>。

本研究では高血圧に関与する代謝的变化とphyの相互作用の解明にSHRと高血圧発生メカニズムと異なる食塩感受性高血圧モデルラットのDIS/Eisを用い、広範囲の化学成分を網羅的に分析可能なキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析(CE-TOFMS)を利用した。

## 2. 研究方法

### 2.1 phy摂取群と非摂取群における体重・摂餌量・摂水量・血圧に及ぼす影響

#### 2.1.1 実験動物

動物実験は「埼玉医科大学動物実験規定」に基づき承認を受けて実施した。食塩感受性高血圧モデルラットであるDIS/Eis(日本エスエルシー株式会社)の3週齢、雄を導入後、飼料EF(オリエンタル酵母工業株式会社)と水道水を自由摂取させ1週間の順化期間を設けた。その後は標準食(0.3%食塩添加飼料)の飼料とイオン交換水(以下、RO水)を自由摂取させ、さらに1週間の順化期間を設け、5週齢から実験を開始した。室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、明期7:00~19:00とする12時間明暗サイクルに設定された動物実験飼育室で飼育を行った。

#### 2.1.2 飼料と飲水

飼料はMF(オリエンタル酵母工業株式会社)それぞれNaCl濃度を調整した0.3%食塩添加飼料・4.0%食塩添加飼料・8.0%食塩添加飼料を使用し、自由摂取させた。飲水はphy摂取群ではRO水を用いphy2 mg/mlに調整したものを、phy非摂取群ではRO水を自由摂取させた。phyはDICライフテック株式会社より分与されたものを使用した。

#### 2.1.3 体重・摂餌量・摂水量の測定

DIS/Eisを動物入荷時よりA~F群に分け(各群n=3)、A群:0.3%食塩添加飼料+RO水、B群:0.3%食塩添加飼料+phy2 mg/ml、C群:4.0%食塩添加飼料+RO水、D群:4.0%食塩添加飼料+phy2 mg/ml、E群:8.0%食塩添

加飼料+RO水、F群:8.0%食塩添加飼料+phy2 mg/mlをそれぞれ自由摂取させた。飼料・飲水共に5週間与え、その間体重・摂餌量・摂水量の測定は週3回測定した。

#### 2.1.4 血圧の測定

A~F群についてテールカフ法を用いて収縮期血圧(SBP)、平均血圧(MBP)、拡張期血圧(DBP)を測定した。測定は週1回(13:30~15:30)とし、測定装置はマウス・ラット用のSoftron非観血式自動血圧測定装置BP-98A(株式会社ソフロン)を使用した。測定する30分前にはラットを専用の固定器に入れ、測定環境に慣らしてから血圧を測定した。

#### 2.2 CE-MAS分析

上記2.1.3~2.1.4の実験終了後、イソフルランによる安楽死後に心臓採血にて血液サンプルを採取した。抗凝固剤はEDTA-2Kを使用し、1,200  $\mu\text{g}$ 、室温で10分間遠心を行い、血漿を得た。CE-MAS分析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社(HMT)に委託し、サンプル調整は業者のプロトコールに従った。2.1.4で実施した血圧測定でphy摂取群であるB群、D群、F群において降圧作用が認められなかったため、phy非摂取群であるA群、C群、E群の血漿についてCE-MAS分析を委託した。

#### 2.3 統計処理

##### 2.3.1 体重・摂餌量・摂水量・血圧

phy摂取群(B群・D群・F群)と非摂取群(A群・C群・E群)のそれぞれ3群間の比較は、一元配置分散分析(ANOVA)を行い、有意差が認められた場合はTukey-Kramer法による事後検定を行った。

各塩分濃度の飼料を与えた場合でのphy摂取群と非摂取群(A群・B群、C群・D群、E群・F群)の2群間の比較は、t検定を行い、有意水準は5%未満( $p<0.05$ )とした。

##### 2.3.2 CE-MAS分析

CE-MAS分析はAgilent CE-TOFMS system(Agilent Technologies社)、Capillary: Fused silica capillary i.d. 50  $\mu\text{m}$  x 80 cmのシステムで陽イオン性代謝産物、陰イオン性代謝産物を測定した。

各群より検出された代謝産物はWeich t-検定により比較し、有意水準を $p<0.05$ とした。また、主成分分析(PCA)にはSampleStat ver.3.14(HMT)を用いた。CE-MAS分析およびPCA解析はHMTに委託した。

### 3. 研究結果

#### 3. 1 phy 摂取群と非摂取群における体重・摂餌量・摂水量・血圧に及ぼす影響

##### 3. 1. 1 体重

群間における体重の有意差は認められなかった (Fig. 1)。

##### 3. 1. 2 摂餌量

群間における摂餌量の有意差は認められなかった (Fig. 2)。

##### 3. 1. 3 摂水量

各塩分濃度添加飼料での phy 摂取群と非摂取群では、A 群と B 群では 8~9 週齢時に、C 群と D 群では 8 と 10

週齢時に、E 群と F 群では 6~8 週齢時に有意差が認められた。また各塩分濃度添加飼料での phy 摂取群では B 群と D 群と F 群で、phy 非摂取群では A 群と C 群と E 群で 6 週齢時より有意差が認められた (Fig. 3)。

##### 3. 1. 4 血圧

収縮期血圧において各塩分濃度添加飼料での phy 摂取群と非摂取群では A 群と B 群、C 群と D 群、E 群と F 群のすべてで有意差は認められなかった。また各塩分濃度添加飼料での phy 摂取群では B 群と D 群と F 群で、phy 非摂取群では A 群と C 群と E 群で 7 週齢時より血圧の上昇が認められ、各塩分濃度添加飼料の違いによる血圧の上昇が認められた (Fig. 4)。

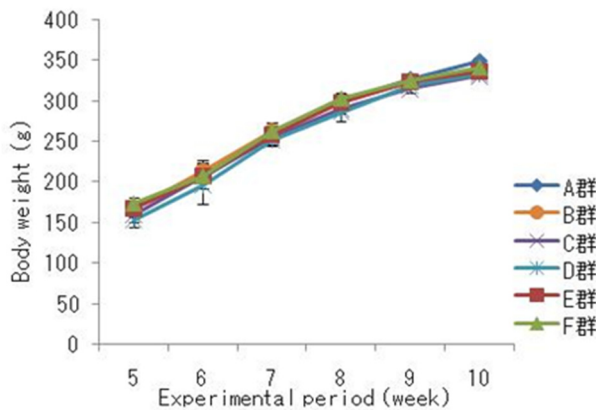


Fig.1. Body weight changes in rats. n=3, Mean±SD

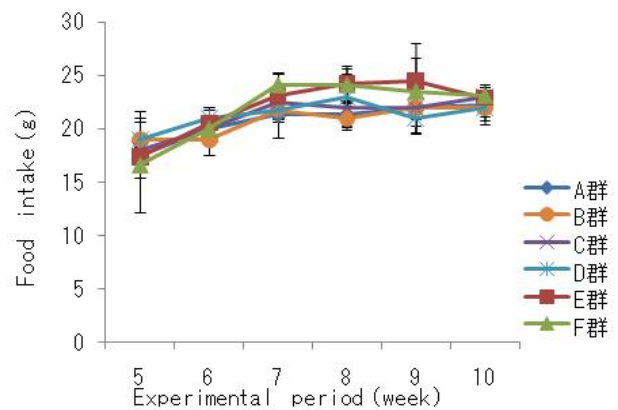


Fig.2. Food intake changes in rats. n=3, Mean±SD

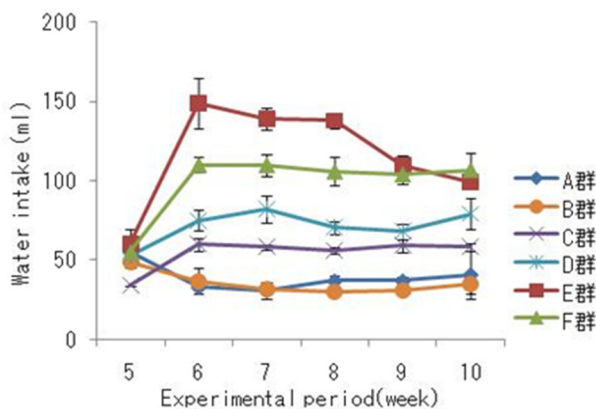


Fig.3. Water intake changes in rats. n=3, Mean±SD

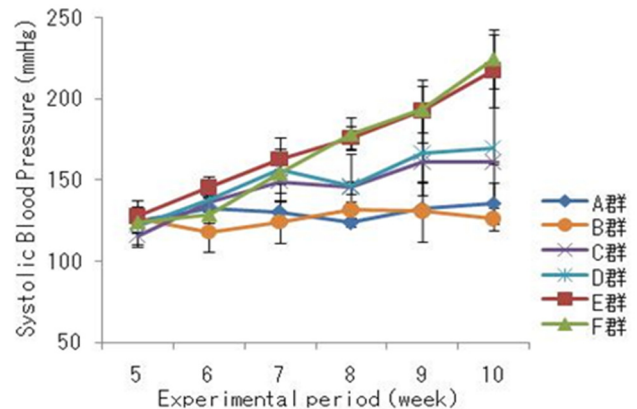


Fig.4. Systolic blood pressure changes in rats. n=3, Mean±SD

Fig. 1-4 Data are expressed from each group A, B, C, D, E and F. A: 0.3%-salt food and RO water; B: 0.3%-salt food and RO water included in phy (2 mg/ml); C: 4 %-salt food and RO water; D: 4%-salt food and RO water included in phy (2 mg/ml); E: 8%-salt food and RO water; F: 8%-salt food and RO water included in phy (2 mg/ml).

### 3. 2 CE-MAS 分析

A 群, C 群, E 群のラット血漿 9 試料について CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い, 陽イオン性代謝産物 117, 陰イオン性代謝産物 65 を含む, 182 の代謝産物のシグナルが検出された。

#### 3. 2. 1 主成分分析

検出された 182 の代謝産物の標準化したシグナル面積強度を用いた主成分分析では, A 群, C 群, E 群において PC1 と PC2 間には正の相関が認められた。E 群は A および C 群に比べ個体差の変動が大きかった (Fig. 5)。

#### 3. 2. 3 3 階層的クラスター解析

主成分分析より得られた試料間の相対値のパターンが類似した代謝産物を抽出した結果, 21 種類の代謝産物が群間の差異による影響を受けていた。その中でアスパラギン, 5-ヒドロキシリシン, ヒスチジン, プロリン, イミダゾール酢酸, ピペコリン酸, シトルリン, 4-ヒドロキシプロリン, メチオニン, オルニチン, グリシンの 11 種類の代謝産物の相

対面積強度は群間において有意差が認められた (Table 1, Fig. 6)。

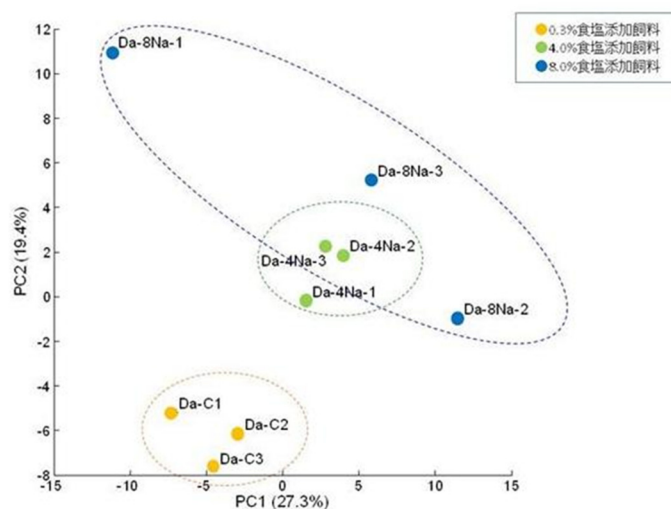
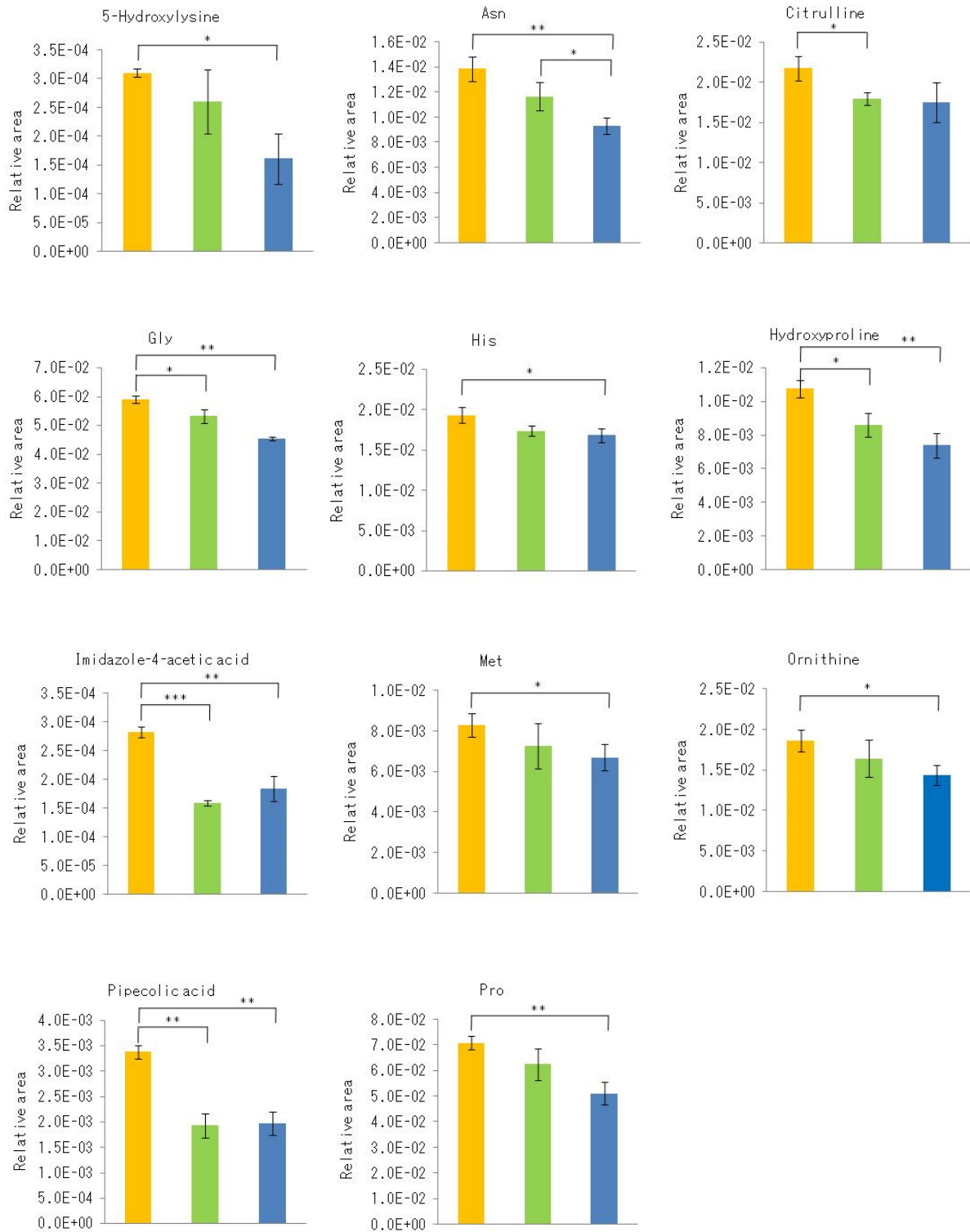


Fig.5. Principal component analysis of the rat plasma

Table 1. Metabolites correlated with salt sensitive hypertension

Compound name	4.0%-salt diet vs 0.3%-salt diet		8.0%-salt diet vs 0.3%-salt diet		8.0%-salt diet vs 4.0%-salt diet	
	Ratio	p-value	Ratio	p-value	Ratio	p-value
1-Methylhistidine	0.7	p<0.05	0.7	p<0.05	1.0	p=0.777
3-Methylhistidine						
1 <i>H</i> -Imidazole-4-propionic acid	0.5	p<0.01	0.7	p=0.144	1.4	p=0.331
2-Aminoisobutyric acid	0.8	p<0.01	0.8	p=0.058	1.0	p=0.830
2-Aminobutyric acid						
3-Phenylpropionic acid	0.7	p=0.096	0.5	p<0.05	0.7	p<0.05
5-Hydroxylysine	0.8	p=0.255	0.5	p<0.05	0.6	p=0.075
Asparagine	0.8	p=0.070	0.7	p<0.01	0.8	p<0.05
Citrulline	0.8	p<0.05	0.8	p=0.075	1.0	p=0.784
Glucaric acid	0.5	p<0.05	0.5	p<0.01	1.0	p=0.885
Glycine	0.9	p<0.05	0.8	p<0.01	0.9	p<0.05
Histidine	0.9	p=0.054	0.9	p<0.05	1.0	p=0.445
Homocitrulline	0.5	p<0.01	0.3	p<0.01	0.5	p<0.001
Hydroxyproline	0.8	p<0.05	0.7	p<0.01	0.9	p=0.104
Imidazole-4-acetic acid	0.6	p<0.001	0.7	p<0.01	1.2	p=0.180
Methionine	0.9	p=0.261	0.8	p<0.05	0.9	p=0.492
<i>N</i> -Methylalanine	0.7	p<0.05	0.7	p<0.05	1.0	p=0.941
<i>N</i> <sup>5</sup> -Ethylglutamine	0.4	p<0.001	0.4	p<0.001	0.9	p=0.272
<i>N</i> <sup>6</sup> -Methyllysine	0.8	p=0.128	0.8	p=0.074	0.9	p=0.275
Ornithine	0.9	p=0.234	0.8	p<0.05	0.9	p=0.276
Pipecolic acid	0.6	p<0.01	0.6	p<0.01	1.0	p=0.828
Proline	0.9	p=0.130	0.7	p<0.01	0.8	p=0.064
Thiamine phosphate	0.8	p=0.250	0.8	p=0.150	0.9	p=0.173



**Fig. 6.** Data are represented as relative area (mean  $\pm$  SD). Metabolites belonging to group A (0.3%-salt food and RO water), group C (4.0%-salt food and RO water), and group E (8.0%-salt food and RO water), respectively. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

Asn: Asparagine, Gly: Glycine, His: Histidine, Met: Methionine, Pro: Proline

#### 4. 考 察

DIS/Eis では、各塩分濃度添加飼料の違いにより摂水量に違いが認められ、さらに phy 摂取群・非摂取群でも飲水量の違いが認められた。phy 摂取群では全群で摂水量が低下し、結果として phy 摂取群間における phy の摂取量の違いが認められたが、SHR を用いた先行研究<sup>(2)</sup>では平均 phy75mg/day で降圧作用が認められているため、B 群では平均 phy71.6mg/day と十分量を摂取していないが、D 群では平均 phy142mg/day、F 群では平均 phy197mg/day であり、降圧作用が認められた以上の phy 量を摂取している。DIS/Eis において SHR と同様な phy との相互作用があるとすれば、血圧に影響を及ぼす phy 量を摂取したと考えられた。DIS/Eis の収縮期血圧では各塩分濃度添加飼料の違いによる血圧の上昇が認められたが、phy 摂取群・非摂取群間での血圧の違いは認められず、先行研究での SHR の高血圧自然発症への作用と比較し、DIS/Eis の食塩感受性高血圧では phy による降圧作用は認められず食塩感受性高血圧と phy の相互作用は無いことが示唆された。

CE-TOFMS による DIS/Eis の血漿のメタボローム解析では、高血圧を発症した群と対照群の比較において、尿素回路と関連するアミノ酸代謝である①アルギニン・プロリン代謝、②ヒスチジン代謝、③リシン代謝、脂質代謝と関連するアミノ酸代謝である④メチオニン代謝、尿素回路と脂質代謝と共に関連する⑤グリシン代謝それぞれに関連する代謝産物の生産に影響を与えていた。

①アルギニン・プロリン代謝ではシトルリン、オルニチン、プロリン、4-ヒドロキシプロリンが C 群と E 群で低値を示した (Fig. 6)。オルニチンは経路 a: 尿素回路でカルバモイルリン酸を取り込んでシトルリンになる経路、経路 b: プロリンから 4-ヒドロキシプロリンに変換される経路、経路 c: グルタミン酸から 2-オキシグルタル酸に変換され TCA 回路に入る経路がある。経路 a では、オルニチンと共にシトルリンが C 群と E 群で低値を示し、アルギノコハク酸とアルギニンは群間で有意差は認められなかった。よって C 群と E 群ではオルニチンとシトルリンの合成に関連する酵素であるアセチルオルニチンジアセチラーゼの活性の抑制が推測された。経路 b ではオルニチン、プロリン、4-ヒドロキシプロリンが C 群と E 群で低値を示したが、代謝経路自体が抑制されたのか、オルニチンが低値を示したためプロリン、4-ヒド

ロキシプロリンが低値を示したのかは不明である。経路 c はグルタミン酸および 2-オキシグルタル酸ともに群間で有意差は認められず DIS/Eis の高血圧発症では影響が少ない代謝経路であることが示唆された。

また、今回の結果ではアスパラギンも C 群と E 群で低値を示した (Fig. 6)。シトルリンからアルギノコハク酸への変換にはアスパラギン酸が関与しており、その活性が高まるためアスパラギンが低値を示す可能性も考えられた。

②ヒスチジン代謝ではヒスチジン、イミダゾール酢酸が C 群と E 群で低値を示した (Fig. 6)。ヒスチジンの代謝経路は、経路 d: ヒスチジンからイミダゾール酢酸となりリボヌクレオシド化されて尿中に排出される経路、経路 e: ウロカニン酸からグルタミン酸となる経路がある。したがって、C 群と E 群では経路 d の代謝経路の抑制が推測された。経路 e のグルタミン酸は群間で有意差は認められず DIS/Eis の高血圧発症では影響が少ない代謝経路であることが推測された。

③リシン代謝ではピペコリン酸と 5-ヒドロキシリジンが C 群と E 群で低値を示した (Fig. 6)。ともにリシンから合成されるが、群間でリシンの有意差は認められず、共通の酵素も認められないため2つの代謝産物が減少する原因は今後の検討課題としたい。しかし 5-ヒドロキシリシンとアルギニン・プロリン代謝の4-ヒドロキシプロリンは I 型コラーゲンと関連があり、その亢進により食塩感受性高血圧を発症した DIS/Eis では心臓の拡張不全や収縮不全を起こすことが報告されていることから<sup>(4)</sup>、I 型コラーゲンの増加に伴い、その原料である 5-ヒドロキシリシンと 4-ヒドロキシプロリンが減少する可能性が示唆された。

④メチオニン代謝では、メチオニンが C 群と E 群で低値を示した (Fig. 6)。メチオニンは DNA や RNA のメチル化や、システインの合成に関与する。メチオニン代謝の中間代謝物であるホモシステインや S-アデノシルメチオオニオンが観察されなかったため、C 群と E 群でメチオニンが低値を示した理由が、何らかの原因でメチオニンの摂取量が低下したためなのか、メチオニンの代謝が促進したためなのかは今後の検討課題としたい。

⑤グリシン代謝では、グリシンが C 群と E 群で低値を示した (Fig. 6)。グリシンはセリンから合成され、プリン塩基、血色素成分であるポルフィリン、クレアチン、グルタチオン、リン脂質などの前駆体となるだけでなく、コラーゲン分子の

形成にも重要な役割を果たす。グリシンの前駆体であるセリンでは群間の有意差が認められないことや、リシン代謝での I 型コラーゲンの亢進の可能性や、データには示していないがプリン代謝において C 群と E 群で代謝産物が増加したことより、DIS/Eis の高血圧の発症ではグリシンの代謝が促進したと考えられた。

以上より、CE-TOFMS を用いた DIS/Eis の血漿のメタボローム解析において高血圧を発症した群では、尿素回路と関連アミノ酸代謝産物と脂質代謝と関連アミノ酸代謝産物であるアスパラギン、5-ヒドロキシリシン、ヒスチジン、プロリン、イミダゾール酢酸、ピペコリン酸、シトルリン、4-ヒドロキシプロリン、メチオニン、オルニチン、グリシンの 11 種類の代謝産物が低値を示す傾向が認められ、食塩感受性高血圧と相互関係を示す代謝産物であることが推察された。また高血圧を発症した群では、主成分分析による階層的クラスタ解析からプリン代謝に関連する代謝産物は抽出されなかったが、数種のプリン代謝関連代謝産物が高値を示した。今後、これらの代謝産物についても食塩感受性高血圧との相互関係を検討する必要があると考えられた。

## 5. 今後の課題

phy を非添加と添加した飲用水を用いて、自由摂取での摂水量観察で、DIS/Eis の phy 摂取群・非摂取群間では phy への嗜好性によるものと考えられる摂水量の違いが認められた。定量的な phy 量における作用の検討では、今後は自由摂取から経口ゾンデを用いた経口投与を用い、高血圧症に対して phy に感受性を示す SHR と非感受性の DIR/Eis との違いをメタボロミクスの視点から比較・検討したいと考えている。

## 6. 謝辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成 27 年度研究助成によって実施された。

## 7. 文献

- 1) Curr. Phamace. Biotechnol, 9, 400-405, 2008
- 2) Nutr. Res, 33, 397-405, 2013
- 3) J. Clin. Invest., 121, 3233-3243, 2011
- 4) 平成 15 年度助成研究報告集 II, 285-295, 2005

## Effect of Spirulina on Salt Sensitive Hypertension

Yuka Ishihara<sup>1</sup>, Nobuko Tominaga<sup>1</sup>, Osamu Hayashi<sup>2</sup>, Kyoko Ishii<sup>2</sup>, Masami Nishina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saitama Medical University, <sup>2</sup> Kagawa Nutrition University

### Summary

We investigated the interrelationship between hypertension and several metabolic pathways, and beneficial effects of phycocyanin against hypertension. The previous study has demonstrated that phycocyanin prevents hypertension in a spontaneously hypertensive/NIH-corpulent rat. In this study, we used a salt-sensitive hypertension model (DIS/Eis) rat and compared metabolites in sera of the rat fed the food including 8%, 4% and 0.3% NaCl, respectively. Moreover we investigated the effects of phycocyanin against the hypertension in the rat which was fed phycocyanin with the food.

The 0.3% food did not affect blood pressure of the rat while the 8% and 4% food increased it. As a result, the 8% and 4% food caused to the rat hypertension. Phycocyanin did not affect against the hypertension of DIS/Eis rat induced with 8% and 4% NaCl, respectively.

Capillary electrophoresis mass spectrometry with time-of-flight (CE-TOFMAS) analysis identified 224 metabolites from the serum of the DIS/Eis rat. The analysis showed that 11 metabolites were present in significantly ( $p < 0.05$ ) lower concentrations in the DIS/Eis rats (4% and 8% NaCl), than in the DIS/Eis rat (0.3% NaCl). A multivariate statistical technique, principal component analysis, was used to process the data from CE-TOFMAS. The compounds of positively and negatively high loading in principal component including Asparagine, Citrulline, Imidazole-4-acetic acid, Histidine, Hydroxyproline, Ornithine, Proline, Glycine, 5-Hydroxylysine, Methionine and Pípecolic acid were involved in Urea cycle and Lipid metabolism, and those related amino acid metabolisms.

These results suggest that the metabolic-pathways in above the metabolisms are closely related to salt-sensitive hypertension.