脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットの 虚血性脳障害に対するセサミンの予防効果

村 上 哲 男*, 吉 栖 肇*, 伊 藤 浩 行**

* 近畿大学農学部食品栄養学科

** 近畿大学高血圧研究所

Prophylactic Effects of Sesamin on Ischemic Cerebral Injury in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats

Tetsuo MURAKAMI,* Hajime YOSHIZUMI* and Hiroyuki ITO**

*Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture,
Kinki University, Nara 631

**Research Institute of Hypertension, Kinki University, Osaka 589

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 48, 189~193 (1995)

As part of a basic study on the prevention of ischemic cerebral injury, sesamin (5 g/kg Funabashi SP diet) was administered to stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) for 8 weeks from 8 weeks of age, and pathological and biochemical changes in the cerebral cortex were examined and compared with those in normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY). In the control SHRSP, cerebral softening was found in 4 of 8 rats (50%), whereas no pathological changes were evident in sesamin-treated rats. In control SHRSP, the uric acid content of the cerebral cortex was extremely high in comparison with that in control WKY, but it was significantly lower ($p < 0.05$) in sesamin-treated SHRSP. On the other hand, superoxide dismutase (SOD) activity was lower ($p < 0.05$) and Na/K-ATPase was higher ($p < 0.05$) in sesamin-treated SHRSP than in WKY. These results indicate that lipid peroxidation caused by free radicals is an important factor in ischemic cerebral injury, and that sesamin plays an important role in the scavenging of free radicals, thus preventing cerebral softening in SHRSP.

Key Words cerebral cortex, free radical, uric acid, superoxide dismutase, sesamin, SHRSP, WKY.

(Received December 14, 1994)

脳血管障害の病理発生に関しては、実験的にも臨床的にも、多くの研究がなされているが、虚血による神経細胞障害の発生機序に関しては、不明の点が数多く残されている。Demopoulos ら¹⁾が虚血性脳障害において、フリーラジカルの形成とそれに基づく脂質過酸化が重要な役割を演じていることを示して以来、脳におけるフリーラジカル障害について多くの研究がなされている。Kanemitsu ら²⁾は砂ネズミの総頸動脈を結紮した脳虚血モデルにおいて、尿酸値が異常に上昇することを見いだし、フリーラジカルの産生源としてキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系の関与を報告している。しかし、このモデルは急性のしかも一過性の虚血であり、ヒトの場

合のような慢性かつ持続性の虚血の場合とは病態が異なっている。Okamoto ら³⁾により分離生成された脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、高血圧の進展とともにその 95%以上が脳卒中病変を発症するので、ヒトの本態性高血圧およびそれによる脳卒中（脳軟化、脳出血）のモデルとして最適のものであり、世界各国で広く用いられている。われわれは⁴⁾、SHRSP を用いて食餌因子による脳卒中病変の予防や治療に関する基礎的な実験を行い、高血圧確立期からでも魚肉をタンパク源とした飼料の投与で血圧の低下がみられないにもかかわらず脳卒中病変の発生率が低下し、生存日数の延長がみられることを報告した。その機序として、脂質過酸化の抑制や、動脈壁エラスチンの減少の抑制あるいは血漿レニン活性や組織内アンギオテンシンⅠ変換酵素活性の低下等が考えられた^{5)~7)}。Ito ら⁸⁾は、SHRSP の大脳皮

* 〒631 奈良市中町 3327-204

** 〒589 大阪狭山市大野東 377-204

質における病態を生化学的に検索し、高血圧発症後のSHRSPの脳皮質では脂質過酸化の亢進および細胞膜関連酵素の異常がみられることを報告している。これらの結果は、SHRSPにおける虚血性脳障害にはフリーラジカルによる細胞膜の脂質過酸化が重要な原因であり、食餌因子の改善によりある程度予防できることを示唆している。そこで、今回の実験では高血圧およびその続発症の予防に関する食餌因子の影響について、古くから抗酸化能を有することが知られているゴマに注目し、その微量成分の一種であるリグナン類のセサミンの虚血性神経障害抑制作用を検討した。

実験方法

1. 材料および飼料

セサミンは、サントリィ(株)より提供されたものを使用した。このセサミンは精製ゴマ油から調製されたもので、(+)-セサミンが60%と(-)-エピセサミンが40%の混合物である。飼料は市販の船橋SP粉末飼料(船橋農場)を使用した。この飼料組成であるが、動物性タンパク質源にはホワイトフィッシュミールと脱脂粉乳、植物性タンパク質源には脱脂大豆を使用しており、水分が7.0%、粗タンパク質20.8%、粗脂肪4.5%、粗繊維3.4%、粗灰分5.7%、可溶性無窒素物58.6%である。

2. 実験動物および飼育条件

研究室で系統維持している8週齢の雄性SHRSPと対照として同週齢の正常圧のWistar-Kyotoラット(WKY)を用いた。SHRSPは系統により血圧の上昇や生存日数が異なる。本実験には血圧上昇が急激で、寿命の短い系統(SHRSP A₃系)を使用した。1群8匹としおのおの実験群と対照群に分け、4匹ずつステンレス製飼育ケージに入れて飼育した。対照群には上記の市販粉末飼料を、実験群にはこれに粉末セサミンを0.5%の割合で混合した飼料を与えた。ラットは室温23±1°C、湿度55±5%に設定し、12時間ごとの明暗切り替え条件(点灯7:00~19:00)のある飼育室で飼育した。飼料および飲料水は自由摂取させた。実験期間中、血圧と体重は毎週1回測定した。血圧は無麻酔下で尾動脈圧をTail-cuff法(モデル:KN-210-1, 夏目製作所)により測定した。16週齢(投与8週間後)に浅クロロフォルム麻酔下に断頭屠殺した。ただちに開頭を行い、脳重量の測定と肉眼的観察により、脳卒中病変の有無を検査した。その後大脳皮質を分離した。

3. スーパーオキシディスムターゼ(SOD)活性の測定

分離した大脳皮質の右大脳皮質後半部を0.25 Mシヨ糖-10 mMトリス緩衝液(pH 7.5)中でホモゲナイズし、遠心分離後(10,000 rpm, 10 min, 4°C)その上清をSOD

活性の粗酵素液とした。SOD活性の測定はOyanaguiの原法⁹⁾にしたがって、亜硝酸法により測定した。本法はキサンチン-キサンチンオキシダーゼによりヒポキサンチンから生じるスーパーオキシドアニオンをジアゾ化合物として捕えるもので、生成されるスーパーオキシドアニオンを50%阻害する量を試料の希釈系列から計算し、nitrite unit (NU)として表した。本法は、チトクロームc法に比べ、2.89倍の感度が認められた。

4. 細胞膜関連酵素活性の測定

細胞膜の機能障害を表す指標として、代表的な細胞膜関連酵素であるNa/K-ATPase活性をLamers and Stinisの方法¹⁰⁾に従って、分光光度法により測定した。なお、粗酵素液はSOD活性の測定用に調製したものを使用した。

5. 組織中の尿酸の測定

分離した大脳皮質の左大脳皮質後半部を2%メタリン酸ソーダ中でホモゲナイズし、遠心分離後(10,000 rpm, 10 min, 4°C)、その上清中の尿酸値を測定した。組織中の尿酸値は、Kanemitsuら⁹⁾の方法にしたがって、HPLC ED systemを用いて定量した。なおカラムの長さは250×4.0 mmとし、Chemco ODS-5-H (Chemco, Tokyo)を充填した。elution bufferにはPIC (Waters, Millipore Corporation, MA, USA)を用いた。

6. 統計処理

実験データは平均値±標準誤差で表した。結果は比較すべき数値の等分散性を検定後、Student's *t*-testによって、また、等分散性を示さなかったものについては、Welch's *t*-testにより有意差を判定した。なお、検定には、MUSCOT統計解析プログラム(YUKMS Co.)を使用し、*p*<0.05を有意とした。

結果

1. 血圧および体重

Fig. 1は、各群の血圧と体重の変化を示している。WKYでは、実験群と対照群はほぼ同様の血圧値を示し、両者の間に有意な差はみられなかった。SHRSPでは対照群の血圧はすでに270 mmHg近くまで上昇しているが、セサミン投与群でも対照群とほぼ同様の血圧を示し、血圧上昇抑制作用は認められなかった。一方、体重に関しても、WKYでもSHRSPでも、実験群と対照群は同様の値を示し、成長に対する影響は認められなかった。

2. 脳重量および脳卒中病変の発症

Table 1は各群における脳重量と脳卒中病変の発症率を示している。WKYでは両群ともに病変はまったく認められず、脳重量にも有意な差は認められなかった。一方、SHRSPでは両群の間に有意の差はみられなかったが、実験群は対照群に比べ低値を示す傾向がみられた。

Table 1. Brain weight and incidence of stroke lesion of SHRSP and WKY administered sesamin from 8 weeks of age.

Strain	Diets	Body weight (g)	Blood pressure (mmHg)	Brain weight (g)	Incidence of stroke (%)
WKY	Control (8) ¹	299 ± 18	140 ± 2	1.83 ± 0.08	0 (0/8) ²
	Sesamin (8)	295 ± 16	145 ± 5	1.74 ± 0.15	0 (0/8)
SHRSP	Control (8)	255 ± 13	267 ± 7	2.02 ± 0.09	50 (4/8)
	Sesamin (8)	252 ± 4	260 ± 7	1.80 ± 0.08	0 (0/8)

Results are expressed as mean ± SE. ¹ Number of rats examined, ² Rats with stroke/total number of rats.

Fig. 1. Changes of blood pressure and body weight of SHRSP and WKY administered sesamin.

Effects of sesamin diet (0.5%/Funabashi-SP diet) from 8 weeks of age on blood pressure in SHRSP and WKY. The values are expressed as the mean ± SE of 8 rats. The vertical bars indicate the s.e.m. ○, control group ($n=8$); ●, sesamin group ($n=8$).

とくに、対照群では脳重量が2gを越えるものが8例中4例にみられ、これらの大脳皮質には肉眼的にも明らかな軟化巣が認められた。しかし、セサミンを投与した群では脳重量が2gを越えるものはみられず、脳卒中病変もまったく認められなかった。

Fig. 2. Effects of sesamin on SOD activity in cerebral cortex of SHRSP and WKY.

Effects of sesamin diet (0.5%/Funabashi-SP diet) from 8 weeks of age on SOD activity in cerebral cortex of SHRSP and WKY. The values are expressed as the mean ± SE of 8 rats. Asterisks indicate significant difference from the control ($p < 0.05$). The vertical bars indicate the s.e.m.

3. SOD 活性および尿酸値

Fig. 2 は各群の大脳皮質における SOD 活性を示している。SHRSP の対照群は WKY の対照群とほぼ同様の活性を示し、両者の間に有意の差はみられなかった。また、WKY では実験群と対照群の間に有意の差はみられなかったが、SHRSP では実験群は対照群に比べ有意に低値を示した。一方、Fig. 3 にみられるように大脳皮質における尿酸値を比較すると SHRSP 対照群は著しい上昇を示しており、WKY の対照群に比べ明らかに高値を示した。WKY ではセサミン投与による影響はみられなかったが、SHRSP の実験群では尿酸値の上昇はみられず、対照群に比べ有意に低値であった。

4. Na/K-ATPase 活性

Fig. 4 は各群における Na/K-ATPase 活性の比較を示している。SHRSP の対照群の活性は WKY の対照群に比べ低値を示す傾向がみられたが、有意な差ではな

Fig. 3. Effects of sesamin on uric acid level in cerebral cortex of SHRSP and WKY.

Effects of sesamin diet (0.5%/Funabashi-SP diet) from 8 weeks of age on uric acid level in cerebral cortex of SHRSP and WKY. The values are expressed as the mean $\pm$ SE of 8 rats. Asterisks indicate significant difference from the control ($p < 0.01$). The vertical bars indicate the s.e.m.

Fig. 4. Effects of sesamin on Na/K ATPase activity in cerebral cortex of SHRSP and WKY.

Effects of sesamin diet (0.5%/Funabashi-SP diet) from 8 weeks of age on Na/K ATPase activity in cerebral cortex of SHRSP and WKY. The values are expressed as the mean $\pm$ SE of 8 rats. Asterisks indicate significant difference from the control ($p < 0.05$). The vertical bars indicate the s.e.m.

かった。WKYでは実験群も対照群も同様の活性を示したが、SHRSPでは実験群は対照群に比べ有意に高い活性を示した。

考 察

高血圧が長期間持続すると、動脈壁の肥厚や壊死などが生じ、そのために脳、心臓、腎臓などの重要臓器に虚血性的変化が生じることがよく知られている。とくに中枢神経系は虚血あるいは低酸素の影響を受けやすく、神経細胞は容易に変性・壊死に陥り、最も重症の場合には脳卒中病変(脳出血あるいは脳軟化)が生じる。したがって、虚血による細胞障害のメカニズムを解明することは、脳卒中の予防あるいは治療にとってきわめて重要な課題であるが、いまだ十分に明らかにされていない。虚血による脳障害の発生に関してフリーラジカルが重要な役割を演じており、それによる脂質過酸化が病因として重要であることが、数々の実験的研究により明らかにされている²¹⁾¹¹⁾¹²⁾が、一方では、その生理的意義を疑問視する報告もみられる¹³⁾。

われわれはSHRSPの赤血球におけるグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)活性の変動を経時的に測定し、酵素活性の低下と脳卒中病変の発症時期がよく一致することを見いだした¹⁴⁾¹⁵⁾。GSH-Pxは抗酸化作用を有する代表的な酵素であることから、生体内における抗酸化能の低下が組織障害を惹き起こすことが推測された。これらの結果は、高血圧による慢性的な持続性虚血に基づく脳障害の病因として、フリーラジカルによる脂質過

酸化が重要な役割を有していることを示している。そこで今回の実験では、抗酸化能を有することが知られているゴマ油に注目し、その微量構成成分の一つであるセサミンを投与し、脳障害に及ぼす影響を検討した。正常血圧のWKYではセサミン投与による著しい影響はみられなかったが、SHRSPでは対照群で脳卒中病変の認められるものがあり、かつ脳重量の増加がみられ、これらのラットでは尿酸値は著しく高値であった。尿酸はキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系の最終産物であり、その生成過程において多量のスーパーオキシドアニオンが生じる¹⁶⁾ことから、これらの結果は、SHRSPの大脳皮質における虚血性病変の発症には、キサンチンオキシダーゼ系に由来するスーパーオキシドおよびそれから生成される過酸化水素やヒドロキシラジカルなどが重要な障害因子として作用していることを示唆している。したがって、SHRSPの大脳皮質ではこれらのフリーラジカルにより、内皮細胞障害が生じ透過性が亢進するとともに、神経細胞そのものも障害されと考えられる。しかし、尿酸にはラジカルスカベンジャーとしての作用が認められており、虚血による脳障害の病態はきわめて複雑であると考えられる。一方、セサミン投与群では脳重量の増加はなく、脳卒中病変はまったく認められず、虚血性脳障害は明らかに防止された。このようなラットでは大脳皮質における尿酸値は明らかに低値であることから、セサミン投与によりヒポキサンチンの分解が抑制され、フリーラジカルの生成が防止されていることが推測

される。事実、セサミンを投与した SHRSP の大脳皮質では細胞膜障害のマーカーである Na/K-ATPase 活性は対照群に比べ有意に高く、細胞障害が軽度であることが示された。このようなセサミンの虚血性脳障害の発症防止の機序に関しては、キサンチンオキシダーゼ系の抑制あるいはラジカル捕捉作用が考えられる。キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系に対するセサミンの作用は、文献的にも報告はなく、また、今回の実験からも未だ不明である。セサミンには抗酸化作用が認められないことが知られている¹⁷⁾¹⁸⁾ ことから、セサミンそのものにラジカル捕捉作用があることが推測される。今回の実験では、セサミンを投与した SHRSP では SOD 活性が低値であった。SOD は代表的な消去系酵素であり、セサミン投与群における活性の低下はネガティブフィードバック機構によると考えられる。事実、浅見ら¹⁹⁾ はセサミンに OH ラジカルに対する捕捉活性が認められることを報告している。したがって、今回の実験の結果は、セサミンを投与された SHRSP の大脳皮質においては、虚血により生じるフリーラジカルが速やかに捕捉されることにより、内皮細胞障害および神経細胞障害の発生が防止されることを示している。これはセサミン投与 SHRSP では、尿酸値の異常な上昇が抑制されていることから、推測される。今回の実験では、虚血局所（大脳皮質）におけるラジカル産生と消去についてのみ検討した。一般にフリーラジカルの産生源としてはキサンチンオキシダーゼ系の他に好中球をはじめとする炎症性細胞や、細胞内におけるミトコンドリアなどがよく知られており、これらの関与も当然考えられなければならない。また、セサミンの作用についても局所における作用とともに血液や腎機能に対する作用など全身的な影響も考察する必要があり今後に残された課題である。

要 約

8 週齢の SHRSP にセサミン（市販粉末飼料中に 0.5% 添加）を 8 週間投与し、血圧や体重および大脳皮質におけるフリーラジカル障害に及ぼす影響を検討した。

1) WKY でも SHRSP でも、血圧や体重への影響は認められなかった。

2) SHRSP の対照群では脳重量の増加がみられ、半数に脳軟化巣が認められたが、セサミン投与群では脳重量の増加はなく、脳卒中病変の発生も認められなかった。

3) SHRSP の大脳皮質では尿酸値の著しい上昇がみ

られたが、これはセサミン投与により明らかに抑制された。

4) SHRSP のセサミン投与群では SOD 活性は対照群に比べ低値であった。

5) SHRSP のセサミン投与群では Na/K-ATPase 活性が対照群に比べ高値であった。

以上の結果より、セサミンは SHRSP の大脳皮質においてキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で産生されるフリーラジカルを速やかに捕捉することにより、虚血による障害を防止すると考えられる。

文 献

- Demopoulos, H., Flamm, E., Seligman, M., Power, R., Pietronigro, D. and Ransohoff, J.: Oxygen and Physiological Function (Joebsis, F.F., ed.), 491 (1977), Professional Information Library (Dallas)
- Kanemitsu, H., Tamura, A., Kirino, T., Oka, H., Sano, K., Iwamoto, T. and Yoshimura, M.: *Brain Res.*, 499, 367 (1989)
- Okamoto, K., Yamori, Y. and Nagaoka, A.: *Circ. Res.*, 34/35 (suppl. 1), 143 (1974)
- Murakami, T., Tsuji, A., Shigeoka, S. and Iizuka, Y.: *Jpn. Heart J.*, 28, 645 (1987)
- 村上哲男, 辻 章夫, 山本和夫, 岡本耕造: 栄食誌, 45, 129 (1992)
- 村上哲男, 辻 章夫, 山本和夫, 岡本耕造: 栄食誌, 45, 139 (1992)
- Murakami, T., Soga, M., Mitsunaga, T., Yoshizumi, H. and Ito, H.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 21, 453 (1994)
- Ito, H., Torii, M. and Suzuki, T.: *Int. J. Biochem.*, 12, 1801 (1993)
- Oyanagui, Y.: *Anal. Biochem.*, 142, 290 (1984)
- Lamers, J.M. and Stinis, J.T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 640, 521 (1981)
- Betz, A.R., Randall, J. and Martz, D.: *Am. J. Physiol.*, 260, H563 (1991)
- O'Neill, R.D.: *Brain Res.*, 507, 267 (1990)
- Schultz, V. and Lowenstein, J. M.: *J. Biol. Chem.*, 251, 485 (1976)
- Murakami, T., Soga, M. and Yoshizumi, H.: *Jpn. Heart J.*, 33, 530 (1992)
- Murakami, T., Takemori, K., Takeda, T. and Yoshizumi, H.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22, (1995) in press
- McCord, J.M.: *N. Engl. J. Med.*, 312, 159 (1985)
- Fukuda, Y., Osawa, T., Namiki, M. and Ozaki, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 49, 301 (1985)
- 並木満夫, 小林貞作 (編): ゴマの科学, 180 (1989), 朝倉書店(東京)
- 浅見純生, 秋元健吾, 阿部圭一, 赤松 剛, 小西恭子, 清水 昌, 菅野道廣, 山田英明: 農化, 67, 3 (1993)

(1994 年 12 月 14 日受理)