

## 喫煙習慣者におけるリンゴポリフェノールの血管内皮機能 改善効果に関する研究

葛 谷 恒 彦  
松 口 貴 子  
朧 谷 真 奈  
杉 谷 義 憲  
北 尾 悟

### 背景・目的

生活習慣病といわれているがん、動脈硬化（脳血管、心臓疾患）などの広範囲の疾患が酸素毒といわれる活性酸素やフリーラジカルと関連していることが近年明らかにされつつある。活性酸素とは、人間を含めた生物が呼吸をし、エネルギー代謝をしているときに3%程度生じる非常に強い酸化力をもつ酸素種で、様々な生体分子と反応し得る。これら活性酸素の生成が過剰になると、膜脂質の過酸化や蛋白分子の機能を障害することにより、細胞の酸化変性をもたらすことが知られている。このような活性酸素に曝されている現代で、食品界に多数存在する抗酸化物質は活性酸素を抑制、消去する力を持つため、第七の栄養素として疾病の一次予防や健康維持に効果があるのではないかと強い関心が寄せられている。その関心が今日の健康食品ブームにも反映され、さまざまな形で商品化され市場を賑わしつつある。しかしながら、これら健康食品は不明の点が多く、ことに臨床効果に関する科学的根拠は極めて乏しい。

そこで本研究では、抗酸化能が強いとされる縮合型タンニン（プロアントシアニジン）を豊富に含有するリンゴポリフェノールに着目し、その抗酸化活性の生体内効果を前腕動脈血流を非侵襲的に計測することにより解析した。タバコ煙中には活性酸素ラジカルを産生することが知られ、喫煙習慣者においては血管系に酸化ストレスが負荷されていることから、喫煙習慣者を今回の研究対象とした。

### 研究方法

#### 1. 食品抗酸化物の調整と抗酸化活性測定

りんご効果から抽出されたポリフェノール画分（純度90%以上、プロシアニジン50%、カテキン類10%、クロロゲン酸10%、その他ポリフェノール類30%：アップルフェノン<sup>®</sup>）アサヒビール（株）から入手し、これらをリンゴポリフェノールとして試用した。これらの *in vitro* における抗酸化活性を AAPH ラジカル・ルミノール化学発光抑制法で測定したところ、50%抑制濃度（IC50）はリンゴポリフェノール0.00224mg/ml と他の食品因子に比較して強力な抗酸化活性

を示した。ポリフェノール画分は水溶性に優れ、被験者に投与する場合、急性試験ではミネラルウォーター（軟水、pH7.4）200ml に、タブレット剤型のアップルフェノン<sup>®</sup>（純度 50%、リンゴポリフェノール画分250mg）2錠を溶解したものを、慢性試験ではアップルフェノン<sup>®</sup>を1日2錠経口投与した。

## 2. 研究対象

健常者 21名（男性 10名：平均年齢 39歳、女子 13名：平均年齢 22歳）を対象とした。このうちタバコ（20本/日以上）を1年以上習慣的に喫煙するもの 13名を喫煙者、喫煙習慣をもたない 8名を非喫煙者とした。

## 3. ストレンゲージプレチスモグラフィーによる前腕動脈血流量の測定

前腕動脈血流量をストレンゲージプレチスモグラフィー（ストレンゲージ/フォトプレチスモグラフ EC6：D.E.HOKANSON社）を用いて非観血的に測定した。被験者を5分間ベッド上に安静にさせ、この間に血圧、脈拍を測定した。測定腕の最も太い径を測り、その値より2cm短いストレンゲージを取り付け、次に上腕に動脈駆血用カフ、静脈駆血用カフを、また手首に駆血用カフを装着した。血流量は静脈閉塞後の前腕径の変化率として求めた。

### （i）安静時血流量の測定

手首の駆血用カフを収縮期血圧+50mmHgでクランプし、上腕の静脈駆血用カフには50mmHgの圧をかけて計5回、前腕径の増加度を計測記録し、その加算平均値を安静時血流量とした。

### （ii）血管内皮依存性血流増加反応の測定

安静時血流量の測定後、手首の駆血用カフには圧をかけたままで、上腕の動脈駆血用カフに収縮期血圧+75mmHgの圧をかけて前腕動脈流入を完全に遮断した。5分後、遮断開放と同時に、静脈駆血用カフに50mmHgの圧をかけ、7秒間前腕径の変化率を記録し、その後静脈駆血を開放した。この操作を15秒間隔で動脈駆血開放後3分まで繰り返した。

### （iii）ポリフェノールの効果

ポリフェノールの生体内における抗酸化作用を、リンゴポリフェノールの経口投与によって検討した。

#### a. 急性投与試験

アップルフェノン<sup>®</sup>2錠を200mlのミネラルウォーターに溶解し、経口投与した。

摂取1時間後に同様の方法で、安静時血流量と、血管内皮依存性血流増加反応（反応性充血）の測定を行った。この間、喫煙、摂食は禁止した。

## b. 慢性投与試験

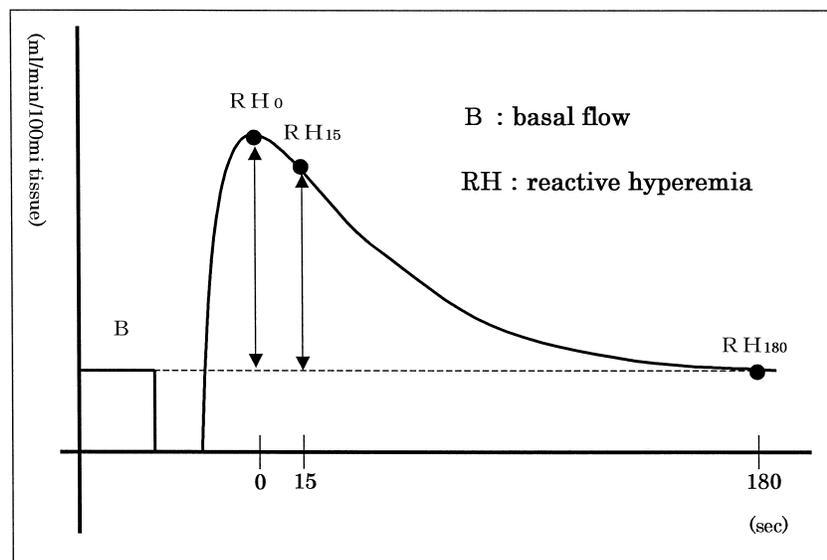
喫煙習慣のある者7名を対象とし、臨床試験を行った。まず、アップルフェノン®を1日2錠7日間経口投与した。このポリフェノール連投1週間後に同様の方法で、安静時血流量と、血管内皮依存性血流増加反応（反応性充血）の測定を行った。この7日間は、喫煙、食生活はとくに制限せず、通常の生活を継続させた。

## 結果

### 1. プレチスモグラフィによる血流測定の変現性

まず、安静時血流量（Basal flow）を測定し、その後5分間前腕動脈流入を完全に遮断した。動脈血流開放直後が最大値（反応性充血ピーク流量）を示し、その後血流量は漸減、180秒後には安静時血流量とほぼ同じ血流量に回復した。この反応性充血の血流増加反応を解析（図1）するために、反応性充血ピーク流量から安静時血流量を減じた値を $\Delta_0$ 、遮断開放15秒後の血流量から安静時血流量を減じた値を $\Delta_{15}$ 、遮断解放後180秒までの15秒毎の血流量から安静時血流量を減じた値の総和を $\Delta\Sigma$ とした。さらに反応性充血ピーク流量と安静時血流量の比を $RH_0/B$ とした。

Basal flow、 $\Delta_0$ 、 $\Delta_{15}$ 、 $\Delta\Sigma$ 、 $RH_0/B$ の同一個人の2度の測定結果の相関関係をグラフにした（図2～図6）。 $\Delta\Sigma$ においては個人内変動が大きく見られたが、 $\Delta_0$ 、 $\Delta_{15}$ 、 $RH_0/B$ は個人内変動が小さく、特に $\Delta_0$ で再現性が保たれていた。よって、 $\Delta_0$ を個人の血管拡張能を反映する指標とみなし、ポリフェノールの生体作用を追跡するマーカーとした。



$$\Delta_0 = RH_0 - B$$

$$\Delta_{15} = RH_{15} - B$$

$$\Delta\Sigma = (RH_0 - B) + (RH_{15} - B) + \dots + (RH_{180} - B)$$

$$RH_0 / B$$

図1 反応性充血時の血流動態

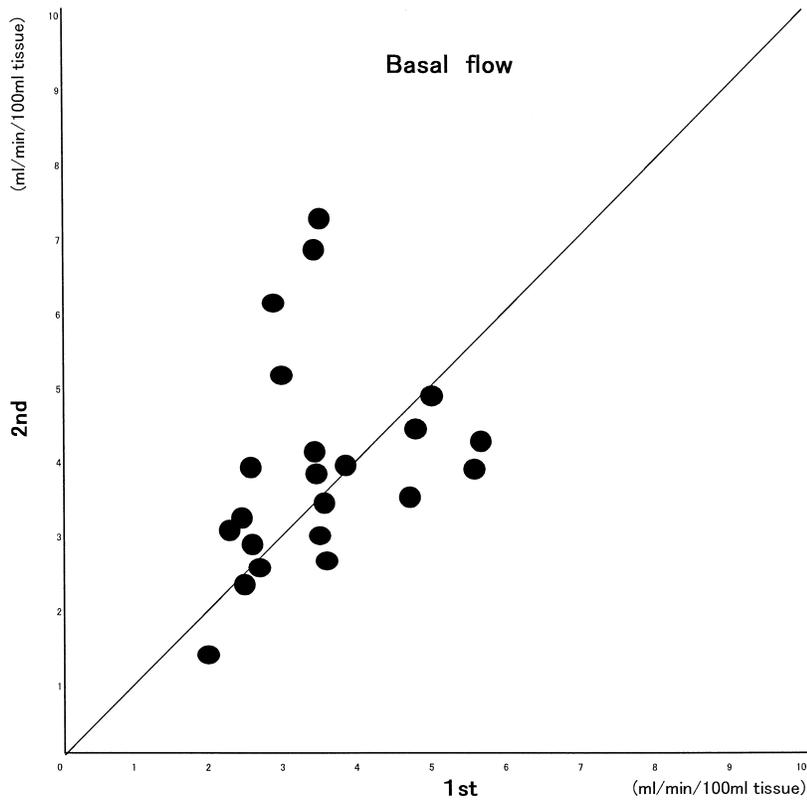


図2 安静時血流量の測定の再現性

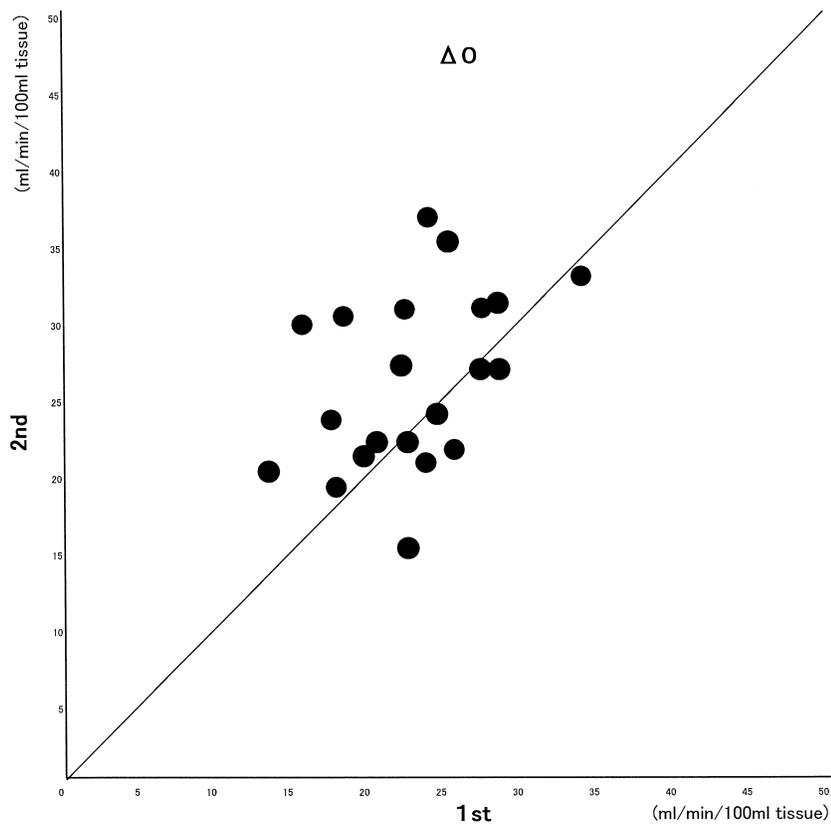


図3 反応性充血直後の血流増加 ( $\Delta O$ ) の再現性

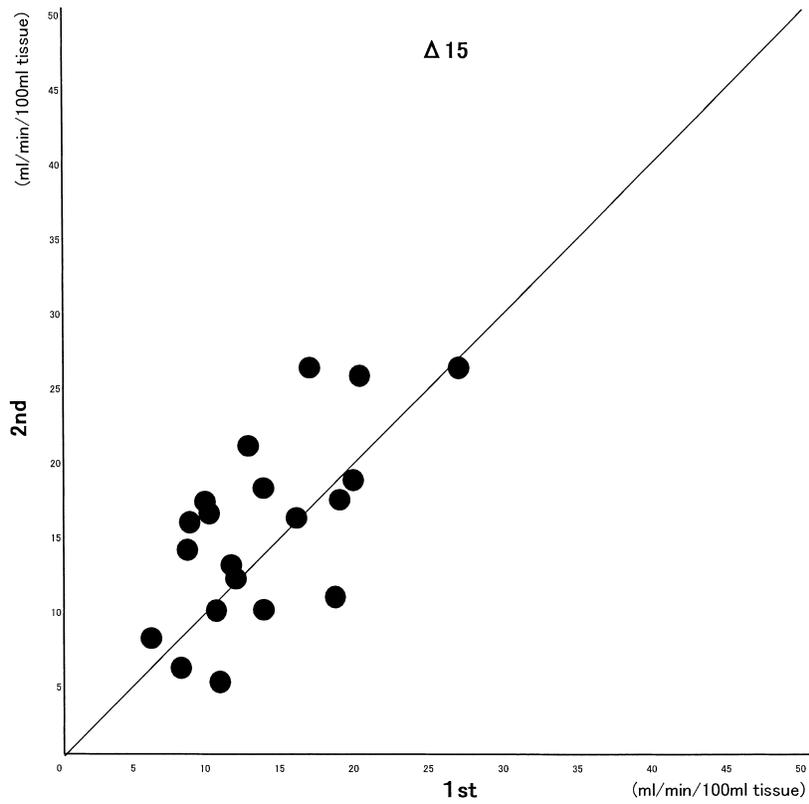


図4 反応性充血15秒後の血流増加 ( $\Delta 15$ ) の再現性

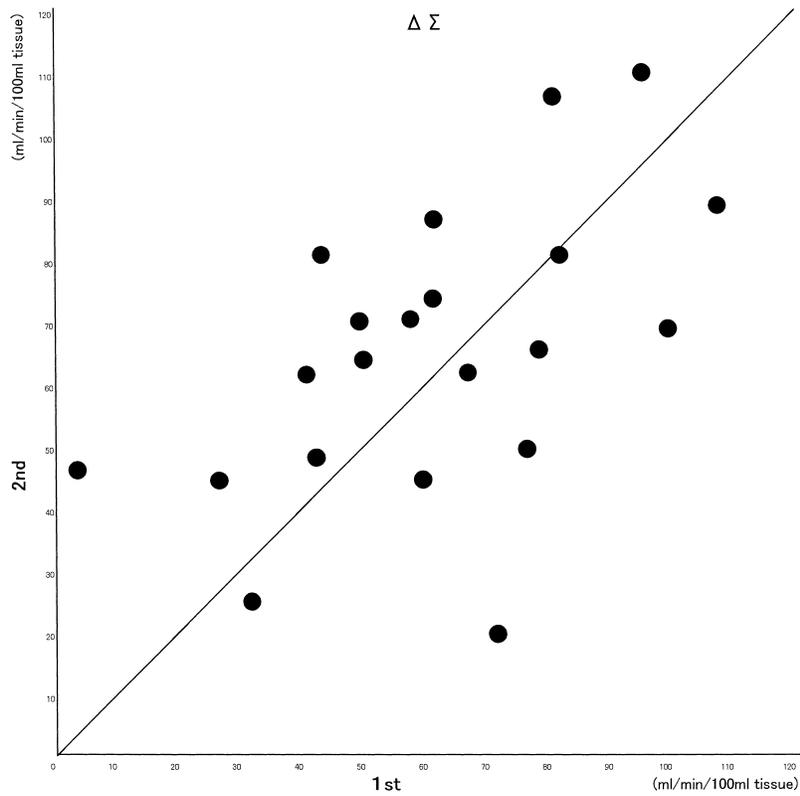


図5 反応性充血時の血流増加総量 ( $\Delta \Sigma$ ) の再現性

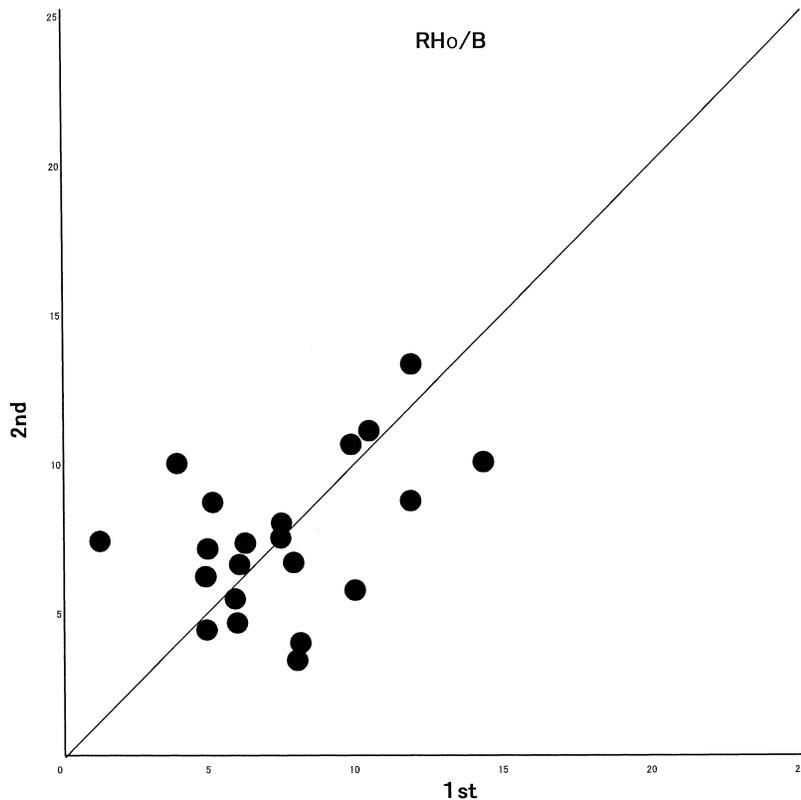


図6 反応性充血直後の血流増加率 ( $RH_0/B$ asal flow) の再現性

## 2. ポリフェノールによる血管内皮機能改善効果

### (i) 急性投与試験

被験者 21 名の反応性充血の平均値をリンゴポリフェノール急性投与前後で比較した (図 7, 8)。非喫煙者の平均値±標準偏差は投与前  $25.4 \pm 4.1$  ml/min/100ml tissue から投与 1 時間後  $22.4 \pm 6.1$  ml/min/100ml tissue を示した (図 7)。喫煙者の平均値はリンゴポリフェノール投与前  $24.6 \pm 6.7$  ml/min/100ml tissue から投与 1 時間後  $28.0 \pm 7.1$  ml/min/100ml tissue を示した (図 8)。リンゴポリフェノール投与により非喫煙者は 8 例中 2 例増加したのに対し喫煙者は 13 例中 8 例増加した。

図 9, 10 はリンゴポリフェノール投与前後の安静時血流量の変化を示した。非喫煙者のリンゴポリフェノール投与前  $3.1 \pm 1.7$  ml/min/100ml tissue から投与 1 時間後  $4.0 \pm 1.8$  ml/min/100ml tissue を示した (図 9)。喫煙者の平均値は投与前  $3.9 \pm$  標準偏差  $2.0$  ml/min/100ml tissue から投与 1 時間後  $4.2 \pm 2.1$  ml/min/100ml tissue を示した (図 10)。非喫煙者は 8 例中 5 例増加し、そのうち 3 例は顕著な増加を示した。喫煙者は 13 例中 6 例増加し、そのうち 3 例は顕著な増加を示した。

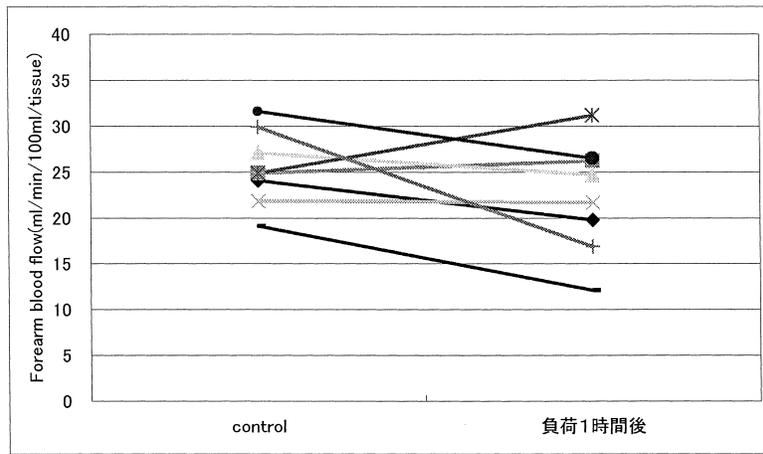


図7 リンゴポリフェノール投与後の反応性充血  
ピーク流量変化 $\Delta 0$  (非喫煙者)

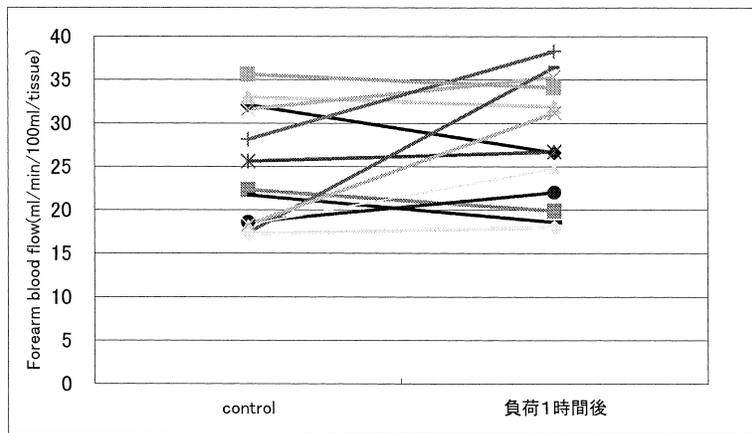


図8 リンゴポリフェノール投与後の反応性充血  
ピーク流量変化 $\Delta 0$  (喫煙者)

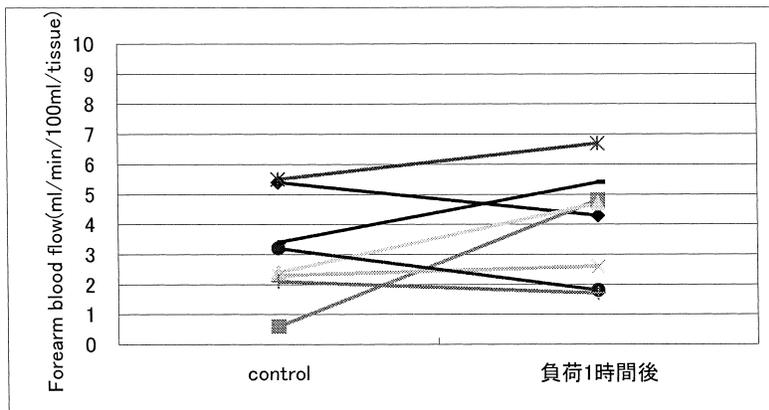


図9 リンゴポリフェノール投与後の Basal flow  
変化 (非喫煙者)

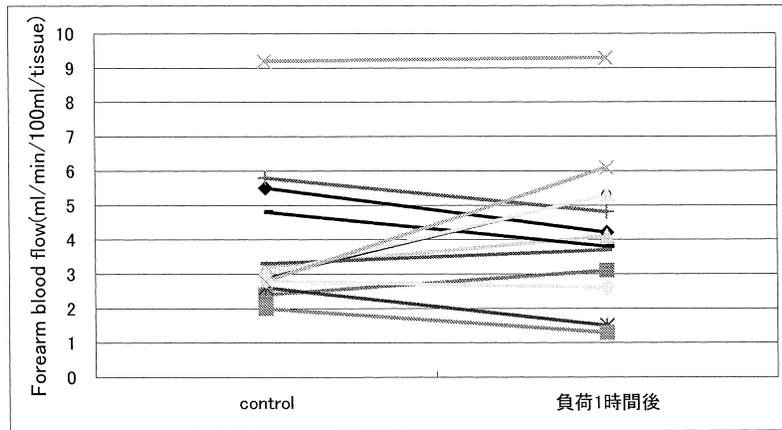


図10 リンゴポリフェノール投与後の Basal flow 変化（喫煙者）

(ii) 慢性投与試験

喫煙者は血管壁における内因性の抗酸化能が極めて低下していることにより、急性投与のポリフェノールによる抗酸化当量の補充が十分でない可能性が考えられるため喫煙者8名に対して慢性投与を行った。

図11-①から図11-⑧はリンゴポリフェノールの急性投与、慢性投与後の変化を症例毎に示したものである。8名の急性投与後、反応性充血ピーク流量の平均値の増加は軽微（投与前  $24.9 \pm 5.6 \rightarrow$  投与1時間後  $26.7 \pm 7.8 \text{ ml/min/100ml tissue}$ ）であったが、連投一週間後は顕著な増加を示した。（ $35.2 \pm 8.6 \text{ ml/min/100ml tissue}$ ）（図12）

この変化を被験者毎に解析すると、5名は顕著に増加し、3名は効果が見られなかった。

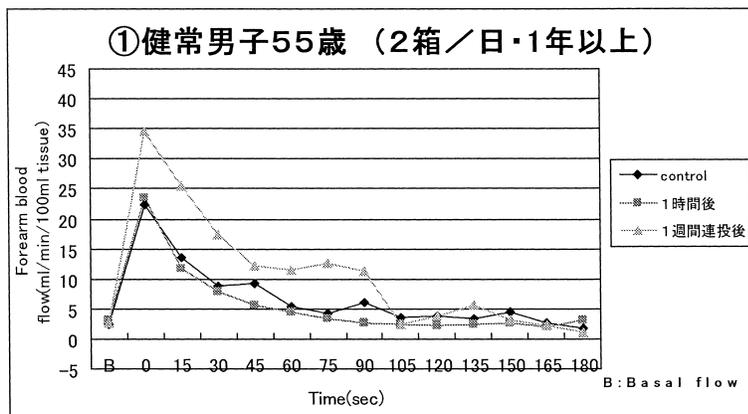
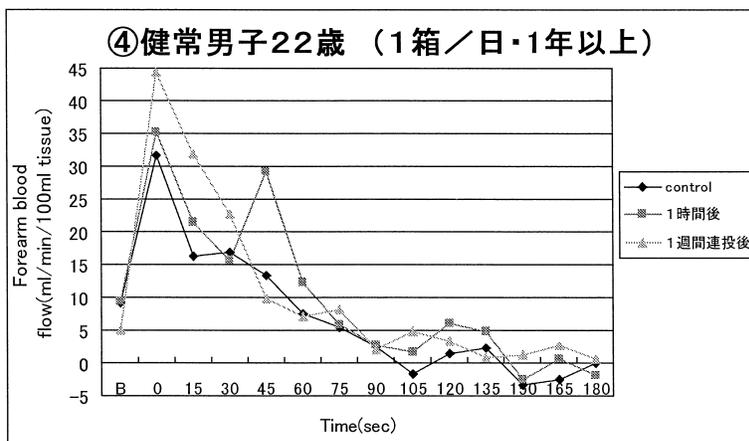
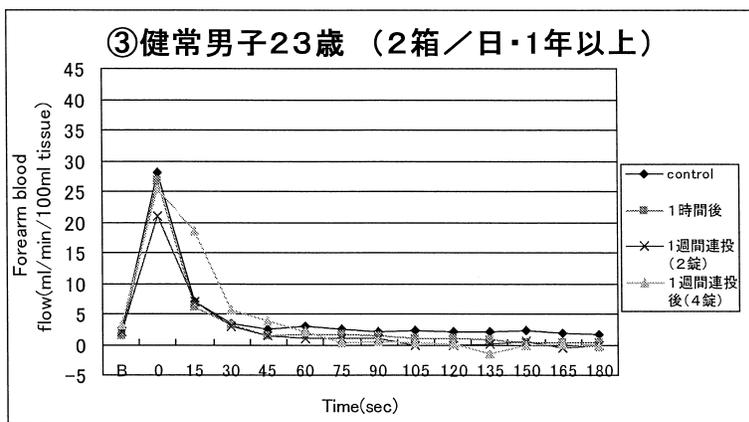
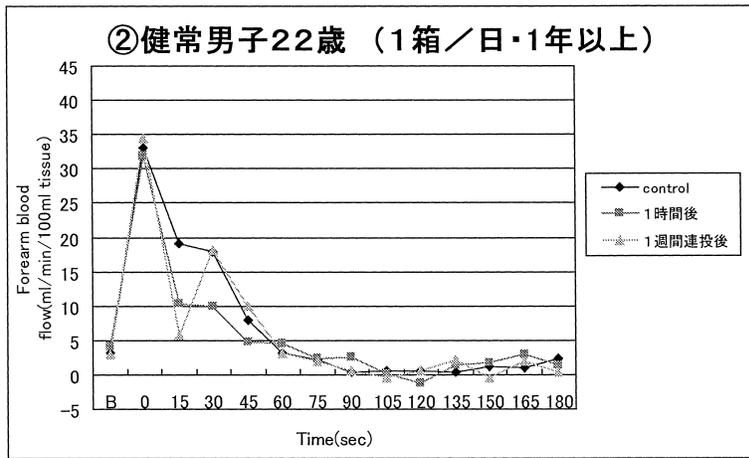
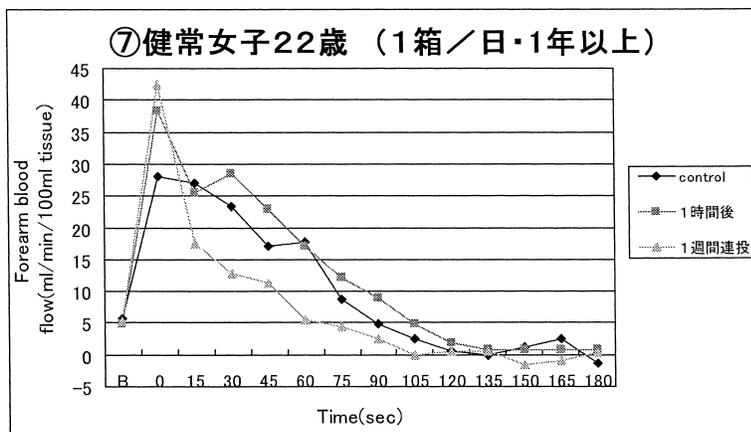
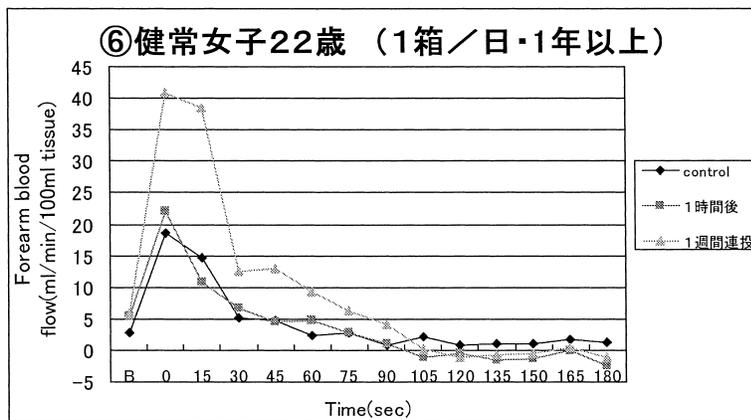
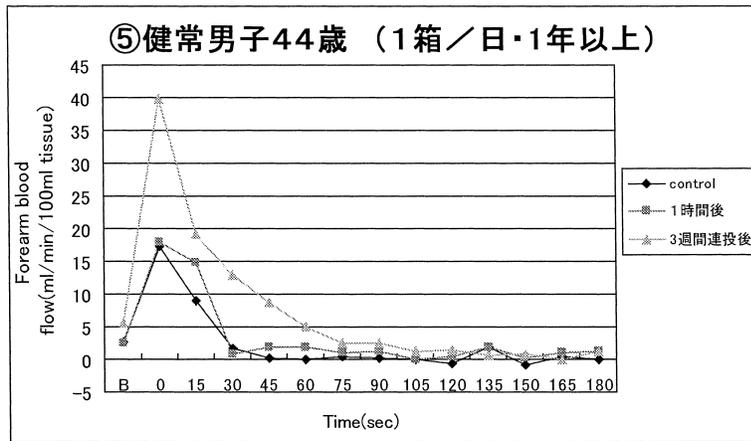


図11 リンゴポリフェノール慢性投与試験





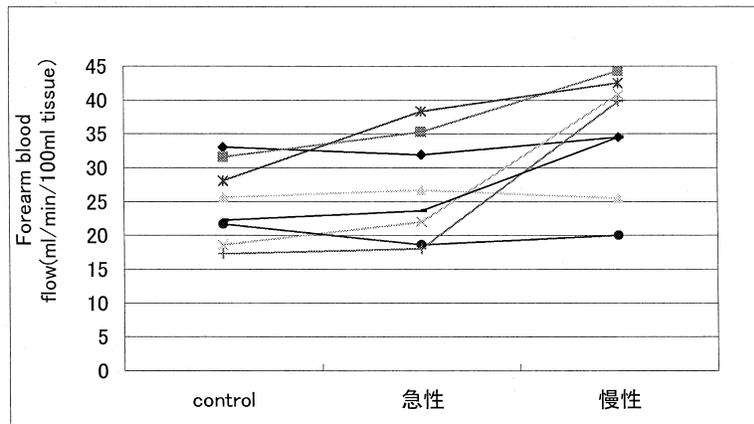
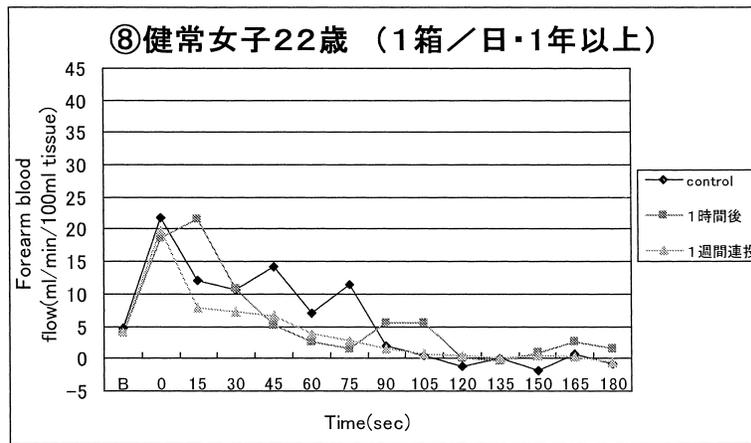


図 12 反応性充血ピーク流量変化 ( $\Delta 0$ )

### 考察

本研究は、前腕動脈の反応性充血に対する食品抗酸化物摂取の影響を解析することにより、食品の生体内抗酸化作用を検証したものである。これは、反応性充血時の血流増加が血管内皮依存性に生じること、すなわち血管内皮一酸化窒素合成酵素 (cNOS) の活性化により産生された一酸化窒素 (NO) が、中膜平滑筋を弛緩させること、さらに、この NO の作用は同時に産生される活性酸素 (スーパーオキシド) によって低下することから、血管壁に外因的に抗酸化物質を補充することによって、血管内皮依存性血流増加反応 (反応性充血) を増大させ得るとの仮説に基づいて行ったものである。

この仮説に基づいて抗酸化物質の効果を解析する前提として、まず反応性充血時の血流動態の個体内再現性について詳細に検討した。その結果、安静時血流量は血圧並びに脈拍数によって変動するものの、反応性充血による血流増加 (特に、駆血解放後早期) は各個体内で一定しており、再現性が認められた。よって、駆血開放直後の血流増加反応 ( $\Delta 0$ ) は血管内皮機能、すなわち NO 作用を反映する指標として、抗酸化物質の影響をある程度解析可能であると考えた。

今回、食品抗酸化物質として、他の食品因子に比べて強度の抗酸化活性をもつ純化・濃縮されたリンゴポリフェノールを用いて、反応性充血に対する効果を解析した。すなわち、酸化ストレスに繰り返し曝されている血管壁においては、内因性抗酸化能が低下していることから、外因的に補充されたポリフェノールの抗酸化活性により、NO作用が回復・増強することが予測される。リンゴポリフェノール摂取1時間後の反応性充血の変化( $\Delta 0$ )を解析した結果、非喫煙者の $\Delta 0$ で7例中2例増加したが、残りの5例では変化を示さなかった。ポリフェノール摂取後の変化が顕著に認められなかった理由としては、摂取後の生体内作用(消化・吸収)が不十分であった可能性、あるいは、被験者における血管壁の内因性抗酸化能が十分に保たれていたために外因的に補充したポリフェノールの効果が発現しなかった可能性などが考えられる。よって、血管壁に酸化ストレスを潜在する可能性のある症例(喫煙習慣者)を対象とし、リンゴポリフェノールの生体内抗酸化効果の比較を行った。その結果、急性投与の反応性充血ピーク流量平均値の増加は軽微であった。そのうち、急性投与であまり変化が認められなかった被験者8名に対しては、引き続き連投一週間(慢性投与)行ったところ8例中5例顕著な増加を示した(図11-①④⑤⑥⑦)。このことから、ヘビースモーカーでは、酸化ストレスの重積により血管壁における内因性抗酸化能が低下している状態にあり、ポリフェノールの単回投与では補充が不十分で、少なくとも1週間以上の連続投与によってはじめて効果が得られたものと推定される。

また被験者毎に見ると、急性投与で変化が出た例、慢性投与で変化が出た例、またどちらも変化が出なかった例、それぞれ異なる結果となった。これは喫煙習慣だけでなく、生活習慣や食生活によってもたらされる酸化障害が個人によって異なるためだと考えられる。

一例であるが、大柄で喫煙本数の多い被験者(図11-③)に対しては、一週間慢性投与に続けてさらに一週間、量を増やし(4錠/日)連続投与を行った。結果、一週間連投後はあまり変化が見られなかったが4錠にしたところ $\Delta 15$ の数値Control、急性、慢性(1週間)よりも高いことから若干の効果が見られたと推測される。

今後、中高年の非喫煙者、喫煙者に対するリンゴポリフェノールの生体内抗酸化効果の比較、体格に応じたリンゴポリフェノールの容量についての解析を進めることも残された課題である。さらに、喫煙習慣者のみならず、高血圧や糖尿病など酸化ストレスを潜在している生活習慣病素因者を対象として同様の解析を進める必要がある。

## 謝辞

リンゴポリフェノールの抗酸化活性(in vitro)測定において、被験者として志願して頂いた方々に感謝申し上げます。

## 参考文献

- ・井上正康, 活性酸素と医食同源～分子論的背景と医食の接点を求めて～, 共立出版株式会社
- ・中野稔・浅田浩二・大柳善彦活性酸素～生物での生成・消去・作用の分子機構～, 共立出版株式会社

- 中野稔・浅田浩二・柿沼カツ子, 活性酸素測定マニュアル, 講談社サイエンティフィック
- 岡島正樹, 日本人若年男性における常習喫煙に伴う生体酸化ストレスと内皮機能障害に関する検討, 金沢大学十全医学会雑誌; Vol.110 No.2: 159-170
- Y. Higashi・S. Sasaki・K. Nakagawa・H. Matsuura・T. Oshima・K. Chayama, ENDOTHELIAL FUNCTION AND OXIDATIVE STRESS IN RENOVASCULAR HYPERTENSION; Vol. 346 No. 25:1954-1962
- <http://www.lochol.jp/News/index.html>
- <http://www.fukuyama.hiroshima.med.or.jp/nosmoke/business/2001/131120.html>
- <http://www.asahibeer.co.jp/news/2003/0925.html>

