

### 3 野菜を食べると何故体に良いか？

#### －生体内での亜硝酸由来の Nitric Oxide 産生系－

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬理学分野教授 玉置 俊晃

【日時・場所】平成23年11月26日（土） 10：00～11：30 松本大学 5号館524教室

【講師 略歴】1977年徳島大学医学部卒業後7年間徳島大学泌尿器科勤務

1984年香川医科大学医学部薬理学講座助手就任

1985年テキサス大学腎臓内科留学～1987年

1992年香川医科大学薬理学助教授就任

1996年徳島大学医学部薬理学講座教授就任

2009年徳島大学医学部長

2011年徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部長

#### <野菜の働き>

今日のお話するのは「野菜を食べると何故体に良いのか」ということですが、はっきり言ってよくわかっていません。1つの因子として、今日取り上げていますのは、ここにありますナイトリックオキサイド(nitric oxide)、NO というガスです。私が学生の頃、昭和40年代というのは、NO とか、NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>はノックス(NO<sub>x</sub>)と呼ばれまして、大気汚染の根源で、これは体に悪いものという認識が強かったのですが、1980年代に生体内に NO がありそうということがわかってきました。体の中で NO というのは、非常に大事だということがわかってきました。特に血管の内皮機能、動脈硬化にこの NO というのが大事だとわかってきました。一方、私どもの徳島大学には、全国で唯一医学部の中に栄養学科がございます。ということで、いろいろな病気に対して、食べ物がどのように効くのか、どのように体に良いのか、そういうことをサイエンスとしてきちんと明らかにしようという努力を、栄養学科の先生達と、私どもとでずっと研究を続けています。

それで野菜を食べると何故体に良いのかというと、1つ明らかなのは、野菜に含まれるカリウムです。カリウムがたくさんあると、ナトリウム利尿というのを起こしまして、おしっこの中にナトリウムが出て参ります。高血圧の方にお塩を控えさせるということをよく聞くとお思います。野菜をたくさん食べるとこの効果がございます。ところが腎臓の悪い方がカリウムを取りすぎると、今度は心臓が止まるというようなことが起こったりするような問題が起こります。ナトリウムを制限して、ナトリウムが少ない人でも、コントロールして、ナトリウムがかなり少なくなって、ナトリウムの影響がないという人に野菜を食べさせると、やはり血圧は下がるのです。これは食物繊維の効果なのか、よくわかりません。食物繊維を余分に摂らせても、なかなか血圧が下がったりしませんし、患者さんを2つのグループに分けて、食物繊維を大量に摂らす、摂らさないと分けて調べても、きれいな差が出て参りません。何か他のファクターもあるだろうと、私どもが注目しているのが、ナイトリックオキサイドということで、今日、お話しをさせていただきます。

1つ誤解のないようにしていただきたいのは、まだこれは人間で証明できていません。ネズミの段階で証明して、たぶん人間でも同じことが起こっているだろうと確信しておりますが、いろいろなテクニカルな問題で、微量な NO を生体で測ることがなかなかうまくいきませんので、人間では証明できておりません。

#### <徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部>

まずこのヘルスバイオサイエンス研究部は、皆さんなかなかわかりにくいと思いますので、少し

簡単にお話ししたいと思います。徳島大学には、キャンパスが3つありまして、私ども医学部がありますのは、蔵本キャンパスというキャンパスです。そこには医学部の中に医学科、栄養学科、保健学科、歯学部、歯学科、歯学部口腔保健学科、薬学部薬学科と、医歯学の医療系の学部が全部揃っています。その上に疾患酵素学研究センター、疾患ゲノム学研究センター、それから病院もあります。一大生命科学の研究キャンパスを形成しております、皆で仲良く一緒に研究しましょう、学生さんの教育も一緒にやりましょうと、ヘルスバイオサイエンス研究部というのを作っております。教育に関しましても、ヘルスバイオサイエンス研究部に、大学院が5つありますが、今、クラスター制度を作っております、学生さんを一人の教授とか准教授が指導するのではなく、いろいろよく似た研究仲間の先生方が集まって、数人の教授の下で、大学院生に勉強していただき、世界トップレベルの研究者になっていただきたいと考えています。またはいろいろな職種、医師だけでなく、歯科医師、栄養士、管理栄養士、助産師、看護師、臨床検査技師、それから放射線技師ですか、そういう方々が連携協力して、日本のリーダーとなれるような医療人を育てていこうと、こういう取り組みをしています。学生さんも医学部の大学に入ったら、医学部の講義しか聴けないのではなく、希望があればどこでも聴けます。それがどこでも単位になります。医学部の大学院に入っても、栄養学の先生に教えてもらっても良いなど、フレキシブルな制度を設けていまして、ユニークな取り組みということで、いろいろなところから評価していただいておりますが、まだ取り組みが始まって6年ほどです、本当に良い若い先生が出てくるのは、これからでございます。

ともかく徳島大学の紹介をちょっとさせていただきましたけれど、今日はナイトリックオキシドの話の少し初めにさせていただきます、私達が何を考えてこのような野菜とNOの関係のことを今研究しているかということ、少しずつお話しさせていただきます。その中で特に薬理学でいうところの1番キーファクターとなるのが、アセチルコリン(Acetylcholine)という物質です。皆さんも聞いたことがあると思います。アセチルコリンというのは、非常に古くから知られている物質で、1867年に合成に成功しましたし、いろいろな研究はもう今から100年も前には研究されています。

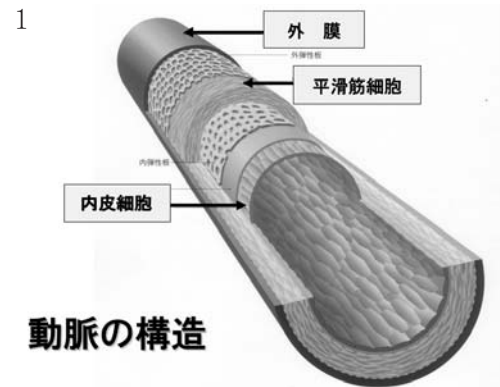
#### <アセチルコリンと内皮細胞>

何故そのようにいろいろ研究されているかというと、神経、特に自律神経の接前繊維と接後繊維のニューロトランスミッター、神経から神経への伝達を伝えるところの化学物質としてアセチルコリンは働きますし、また副交感神経の最終的な臓器に命令を伝える伝達物質としてアセチルコリンは働きます。皆さんも「自律神経」というのは聞いたことがあるかと思いますが、運動神経と違って、皆さんが意識しなくても体の中の調節を行う神経、要するに心臓を動かす、腸を動かす、そういうところに働くものが自律神経で、交感神経と副交感神経がございます。交感神経というのは、どちらかというと興奮したときに働く神経です。皆さんが朝起きて、体を動かすと交感神経が優位になって参ります。夜寝て、体がリラックスしているときには、副交感神経が優位になってきます。こういうときにアセチルコリンが出て、これが出過ぎると胃潰瘍になるなど、いろいろな問題を起こすことがあります。自律神経、胃を動かしたり心臓を動かしたりするときに働く神経の、その神経細胞が刺激されると分泌されて、その心臓なり血管なり、いろいろなものを刺激する物質としてアセチルコリンというものがございます。

ところがアセチルコリンの作用には、非常に奇妙な作用がございます。アセチルコリンというのを注射します。人間でも動物でもそうですが、血管が拡張して、血圧が下がります。血管が拡張するということは、血管がだらりとする、弛緩すると言います。ところが同じ平滑筋でも、膀胱とか肺、それから腸の平滑筋はアセチルコリンで収縮します。変ですよ。同じ体の中の平滑筋で、子宮とか呼吸器の肺とか、膀胱とかはアセチルコリンをやると、収縮する。だけど血管の平滑筋だけはだらりと弛緩する。非常に奇妙な現象が昔から知られていたのです。薬理学者としては、同じ系

統の細胞なのに、片一方は弛緩するのに、片一方は収縮する。どうしてこういうことが起こるのか、長くわからなかった。

長くわからなかったことですが、1980年、先ほど言いましたが、ニューヨークのファーチゴット (Robert Furchgott) 先生が、どうもこれは内皮細胞に問題があるのだと考えました。血管の平滑筋に問題があるのではなくて、どうもエンドセリアルセル(endothelial cell)、内皮細胞がいろいろ問題を起こしているのだらうということ、非常にシンプルな研究で見つけました。この血管と申しますのは、うちに一層の非常に薄い内皮細胞がございます (図1)。その周りに血管平滑筋とって、収縮する筋があります。これが収縮すると血管は細くなりますので圧が上がって、血圧が高くなります。これか弛緩して緩みますと血圧は下がります。それまでは、この内皮細胞というのは、ただ血液が直接血管平滑筋細胞にさわらないようにするための、ただ単なる障壁ぐらいにしか考えられていませんでした。ところがファーチゴットさんは何をされたかといいますと、動物の血管を取り出しまして、ここから血管にリンゲル液を流して、そこからこの血管の中を流れて落ちてきた液を、血管平滑筋にかけると、弛緩することを示しました。今度は、綿棒を使って、中をごしごしこすってやると、内皮細胞が取れてしまうのですが、同じようにリンゲル液を流してそれを血管にかけると弛緩しない。そういうことで、アセチルコリンが入っているとどうも内皮細胞を刺激して、血管を弛緩するような物質を出すのではないかということ、ファーチゴットさんが言い出しました。その時にはまだ NO のことはわかっていませんでした。



エンドテリウム・ディライブド・リラクシング・ファクター(endothelium -derived relaxing factor)、内皮由来の弛緩因子、EDRF ということ、ファーチゴットさんが言い出しました。どうもアセチルコリンというのは、直接血管平滑筋を弛緩させるのではなく、内皮をまず刺激して、内皮が何か因子を出して、その因子が血管平滑筋を弛緩させるのだというようなことを言い出しました。そうするとすぐに反応したのが、このニトログリセリン(nitroglycerin)の研究者でした。皆さん聞いたことがあると思います。ノーベル賞のノーベルがダイナマイトを作るときに使ったニトログリセリンですが、ニトログリセリンは狭心症、心臓の血管が狭くなったり、詰まったりして、非常に胸が痛くなる、そういう病気の時の特効薬としてニトログリセリンは効きます。それが何故効くのかというような研究をしていた人が、自分たちのやっている研究とよく似たデータだということに気づきまして、テキサス大学のムラッド(Ferid Murad)先生とか、ファーチゴットさん、ロサンゼルス大学のイグナロ(Louis Ignarro)とか、イギリスのモンカダ(Salvador Moncada)という先生達が一斉にこの因子に対する研究をしました。これが見つかったから5年ほどで、たぶん一酸化窒素、ナイトリックオキサイドというものが、血管の弛緩に非常に関係する物質ではないかということ、言い出しました。

### <NOの重要性>

詳しいことを省きますが、生体内のアルギニンから一酸化窒素合成酵素、NOシンターゼ(NOS:NO synthase)を介しまして、このNOという物質ができるということが、世界的にどんどん研究されてわかりました。はじめは血管内皮細胞だけだろうと考えられていたのですが、それだけでなく体の中のいろいろなところで、体の中でNOという物質、非常に分子量が小さなガスですが、できるということがわかってきました(図2)。最初にみつかったこのNOですが、eNOS、

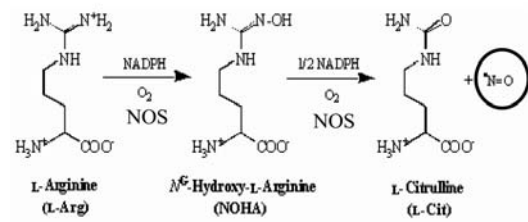
エンドテリアル NO シンセターゼ (endothelial NO synthase)、内皮由来の NO 合成酵素ですが、内皮細胞だけだと思っていたのが、平滑筋にも、マクロファージ、それから神経細胞、いろいろなところに NO が作られて、体の中の調節に非常に大きなファクターとして働くということがわかって参りました。

今考えられていることは、血管が、血管の内皮細胞、それからその外側に血管平滑筋がございませぬけれども、いろいろなストレスがかかったりアセチルコリンが刺激しても良いのですが、内皮細胞の中のエンドテリアル NOS、一般に eNOS と略しますが、eNOS を刺激することによってアミノ酸のアルギニンから NO が作られる。このナイトリックオキシド NO が、平滑筋のソリュブルグアニレートシクラーゼ (soluble guanylate cyclase) を刺激して、平滑筋内のサイクリック GMP (Cyclic guanosine monophosphate, cGMP) という物質を増やすことで、血管が拡張する。直接アセチルコリンがこの血管平滑筋を拡張しているのではないということが、はっきりしてきました。

先程も言いましたニトログリセリンというのは、硝酸  $\text{NO}_3$  をその分子の中に 3 つ持っておりまして、これがどのようにして切れて、NO ができるのかというのは、まだまだ十分解明はされていませんが、多分内皮細胞、その近傍でこの  $\text{NO}_3$  から NO が切り出されていると考えております。

これもまだまだ十分ではありませんが、少なくとも生体の中にこの NO ガスがある。それが血管の弛緩、収縮にもものすごく大きな影響を与えている。具体的にどういことが起こるかということ、皆さんのように若い学生さんは内皮細胞が非常に元気です。常に NO がたくさん出ています。ということで、少々刺激があつて血管が収縮しようと思つても、この NO ガスがたくさん出ていますので、血管はそんなに収縮しませんから血圧が高くない。ところが私くらいの歳になってきますと、老化現象で動脈硬化が起こってきます。動脈硬化が起こると何が起つているのかということ、多くの場合この内皮細胞が痛んできています。内皮細胞が痛んできて、この NO が出にくくなつていて。それで何が起つるかということ、興奮したりして交感神経が活性化されると、血管収縮しますが、その時この調整する NO が十分に出ないので、血圧が上がるといことが起つります。ということで、歳を取つてきて動脈硬化が進んでくると、血圧が上がるとい 1 つの大きな原因は、この内皮細胞が十分に働かなくなり、この NO が出なくなる。そのために動脈硬化も起つりますし、高血圧も起つるし、またこの NO というのは、血小板の凝固にも関係しますので、そういうところに血小板が凝集してくると、今度は血栓ができて血管がつぶれてしまう。またはそこにできた血栓が飛んで頭に行くと、脳梗塞になりますし、心臓に飛びますと心筋梗塞になりますし、いろいろな血管の病気が起つるということで、この内皮における NO の産生というのは、非常に重要なファクターになると考えております。そのようなすごい研究が続いたために、1998年にはノーベル生理学賞を、先程最初に EDRF ということを書き出したファーチゴット先生と、それが NO であろうということの解明に努めたイグナロ先生とムラッド先生にノーベル賞が贈られていまして、研究がどんどん進んで、今は NO の研究はたくさんのがされています。先程も言いましたが、血管だけでなく、脳神経細胞、神経伝達にも NO は関係してくるし、マクロファージのようにいろいろな細菌を殺すようなところにも NO は関わつて参ります。新しいところでは、男性の勃起機能、バイアグラというのを皆さんも聞いたことがあると思いますが、バイアグラなども NO が関与しているということがはっきりわかつてきました。いろいろなことがわかつてきております。

## 2 Nitric oxide (NO) Synthesis



### <若手の育成>

徳島というのは阿波踊りで有名です。「踊る阿呆に見る阿呆」と、皆阿呆ばかりです。徳島から高知に行くところにある、野球で有名な池田高校よりも高知よりのところにあります大歩危。こちらは小歩危。阿呆とぼけばかりです。鳴門の渦も左に巻いていて、踊る阿呆に見る阿呆。大歩危、小歩危に鳴門の左まきと、徳島は阿呆ばかりということになっています。その中でも徳島大学は頑張っていて、若い人を育てようとしておりますので、また何か機会がありましたら、お寄り下さい。

若手育成の一つとして、大学院生と一緒にワシントン D.C. に連れて行って、国際学会の発表をしてもらいました。今、徳島大学ではこういう学生たちに、全部出張旅費を援助しています。今年の9月に山口君、医学部の4年生（皆さんと一緒に22歳か23歳です）、彼が英語で発表するというので、これも大学で支援して、一緒にアメリカのオーランドに行って発表してもらいました。是非皆さんもいろいろ食べ物に対するサイエンスをして、どんどん世界に情報を発表して行ってください。頑張ってもらいたいと思います。若い人に頑張ってもらわないと、日本の国は良くなりませんので、是非頑張ってもらいたいと思います。

### <NOの測定>

それで私どもが最初に NO に取り組みだしたのは、1つは NO というのは小さい分子で、すぐに分解されるということで、非常に測定が難しかったのです。だから NO が代謝されて、NO<sub>2</sub> とか NO<sub>3</sub> になったものを測定します。先程ちょっと説明しましたが、サイクリック GMP という物質を増やすのですね、血管平滑筋などで。そこで刺激された後のものを調べたり、いろいろなことで測っているのですが、なかなかそのものを直接測れないということで、私どもの教室でこれを直接はかれないかということの研究を、最初に始めました。その時に使ったのが、エレクトロンパラマグネティックリゾナンス (Electron Paramagnetic Resonance) EPR。エレクトロンスピリゾナンス (Electron Spin Resonance) ESR と言ったりもしますが、この EPR 装置というのを使用すると、ラジカル種というのが、かなりスペシフィックに測ることができます。酸化ストレスとして作用する、酸素分子が還元されてできるスーパーオキサイドや、3電子還元してできるヒドロキシルラジカル (hydroxyl radical) こういうものが、こういう特殊な信号として出てきます。多ければ多いほど、この高さが高くなるので、これを積分するとだいたい体の中のラジカル種がどのくらい発生しているかがわかります。この NO というのは、3つの山があるシグナルが出てきます。それで NO というのは、酸素と一緒にヘモグロビンに非常にくっつきやすいので、血液中の赤血球を取ってきて、くっついて NO を測ることで、全身の NO がどのくらいできているのかを測ることができないかということで、いろいろやってみました。ヘモグロビンの鉄に NO がつきますと、3つの山になる特別なシグナルが出てきます。ところが体の中には非常に多くのラジカル種がありまして、なかなかそう簡単には測れていなかったのです (図3)。

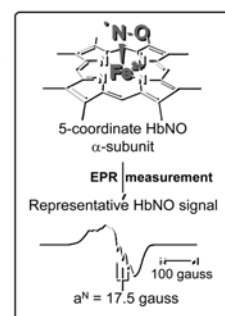
これはネズミの血ですが、血液を取るとこのようなシグナルが取れて、NO を薬物で、先程言った NO 合成酵素を止めてやることによって、血液にほとんど NO ができない状態にした動物を作ることができますが、全体のシグナルはほぼ同じようなシグナルになってきます。それは生体内にいろいろなラジカル種があるからということです。動物にあらかじめ薬で NO がほとんどできないような体にしておいて、そうすると先程言った話のようにものすごく血圧が上がってしまうのですが、そういう特殊な動物の血液を採っておい

### 3 EPR signal of HbNO

HbNOをEPRで測定すると、右に示したようなEPR signalが得られる。

このsignalは5配位型HbNOに基づくhyperfine coupling structure ( $a^N = 17.5$  gauss)を示す。

HbNOの測定は液体窒素温度で行う。



て、コンピューター上で引き算をしたら NO のシグナルが出てくるのではないかと考えました。この一般の動物の血液と、NO をなくした動物の血液を作りまして、コンピューター上で引き算をして、シグナルを取るという方法を開発しました。そうしたら結構きれいに NO シグナルが見られます (図4)。

今言ったように、コンピューター上で引き算をする方法を使って、NO のガスを少しずつバブリングして、少しずつ多くしていきますと、飽和した NO ガスと血液を混ぜたときに、濃度に従って、このシグナルが高くなって、R が0.9946 というほぼ直線に乗るくらいきれいなデータが出てきました (図5)。この方法で血液の NO を測定できます。内皮細胞が作った NO が血管の方向にも行きますし、血液の流れの中にも行きます。その流れの中でヘモグロビンがトラップした NO をこのようにきれいに測れるということです。それでは先程言いましたアルギニンというアミノ酸を入れると、基質になって NO ができるということがわかっていますので、ネズミに注射して、アルギニンをごく少量、血圧が変わらない程度に入れてやっても、明らかに用量依存的に NO シグナルが増えてきます。

一方、基質にならない D-アルギニンを入れますと、このようにほとんど変化しません (図6)。血圧の変化しない、ごく少量の生体内の変化でも、この方法を使えば血液を採りさえすれば、体の中の NO の変化がわかるだろうということで、この方法で動物実験をしています。

#### <NO 合成酵素阻害剤を使った動物実験>

ただし、先程言いましたように、動物を処理して NO ができない血液を作って引き算しないと、この測定方法は利用できません。ということは倫理的に人間にそんなことはできませんね。薬を使って、血圧が上がるけれど、NO がいない状態を作って引き算をするということは、倫理的にできませんので、これは人間には応用できない状態で、先程言いましたように、人間のデータはない状態です。

このエルネーム (L-NAME) というお薬は、NO 合成酵素を阻害するお薬で、これを投与しておくと、体の中の NO ができなくなって、血圧がものすごく上がって参ります。そのようなときに高血圧の薬としてレニンアンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System) を抑制する薬で ACE 阻害剤というものがございます。これは高血圧の時のレニンアンジオテンシン系を抑制することによって、酸化ストレスを軽減することによって、内皮障害を弱める。またはブラジキニン (bradykinin) の分解を予防して、NO の合成を高めるということで、内皮を保護するという可能性が指摘されています。

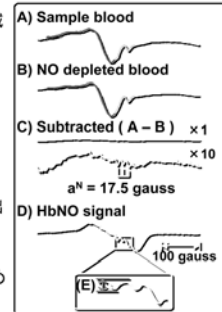
動物実験はいろいろ言われていますが、本当に NO が上がるということは誰も証明をしていな

#### 4 HbNO signal subtraction method

全血EPR signal (A) ではHbNO領域に他のsignalがoverlapしている。  
NO枯渇全血のEPR signal (B) ではHbNO signalがない以外は通常全血のEPR signalと同じである。

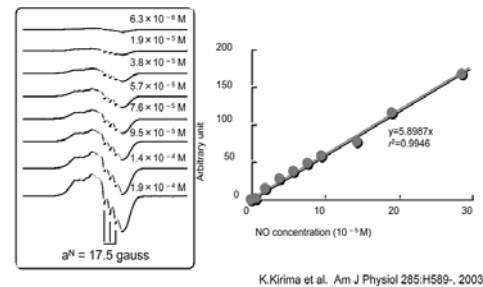
よって、(A)から(B)を差し引くことで微量のHbNO signalだけ(C, D)の検出に成功した。

HbNO定量は(E)のsignal強度を求めることを行った。



#### 5

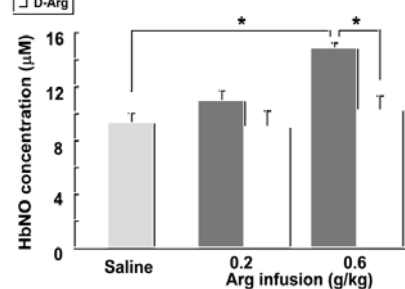
#### Relation between NO concentration and HbNO signal intensity



K.Kirima et al. Am J Physiol 285:H589-2003

#### 6

#### The influence of Arg infusion on HbNO concentration



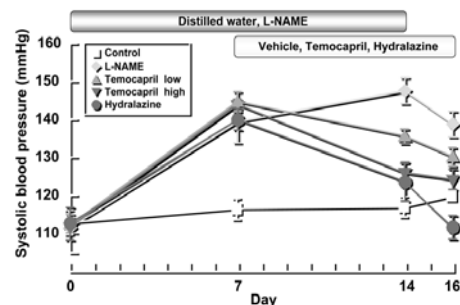
K.Kirima et al. Am J Physiol 285:H589-2003

かったのですが、それが証明できるだろうかと考えました。ACE 阻害剤の少量と大量、それから同じ血圧を下げる薬でも NO に余り関係ないだろうと言われているヒドララジン(hydralazine)というお薬をネズミに使ってみました。そうすると、このエルネームというのを初めからやりますと、血管内皮細胞の NO ができなくなってしまいますので血圧が上がって参ります。この上がった段階で、お水だけをやると、この血圧が下がりにません。まだ少し上がります。このテモカプリル(temocapril)という ACE 阻害剤を少量、投与しますと、このように量に従って、血圧が下がって参ります。それでヒドララジンというお薬でもこのように血圧が下がって来ます (図7)。

それでこのエルネームが入っていると、内皮細胞が NO を作れませんが、この時点で1回お薬を止めておきます。そうすると内皮に残っている機能に従って、NO ができると考えてこの時点で2日間ウォッシュアウトした段階で、血液の NO シグナルを調べてみました。エルネームをずっと飲んだ群では、血管内皮細胞がお年寄りの動脈硬化のように内皮機能が痛んできますので、エルネームのお薬をやめて2日間おいても、NO ガスというのは非常に少ししかできないところが ACE 阻害剤を少量、投与しますと、コントロールまでには戻りませんが、かなり障害が軽減されているということがわかると思います。同じように血圧を下げて、ヒドララジンで血圧を下げたものは、内皮の障害には余り効いていないと考えられます。ということで、たぶんこれは内皮機能の障害を測定する非常に良い実験方法として使えるのだろうと論文を発表しています。

7

The effect of L-NAME in combination with or without temocapril, hydralazine on systolic blood pressure

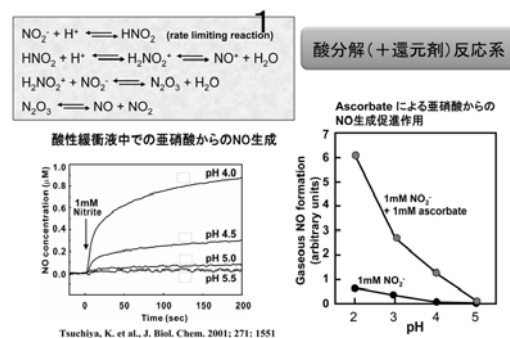


## <亜硝酸と NO>

そういうことを考えて私どもが研究をしているとき、いろいろな文献を当たっているときに、はたと気づいたのは、先程言いましたように、血管内皮細胞で動脈硬化を守るためにできる NO というのは、NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>に酸化されておしこの中に流れてって始末されてしまう。代謝されてしまう。NO<sub>2</sub>とかNO<sub>3</sub>は作用のない物質だと言われていました。ところが化学の本を見ますと、NO というのは、亜硝酸からもできると記載されています。それから亜硝酸由来 NO 産生は、キサンチンオキシダーゼ(xanthine oxidase)とか、ミトコンドリアエンザイム(mitochondria enzyme)から酵素的にできる。それからもう1つは酸性条件下でできます。酸性になるとNO<sub>2</sub>が勝手にNOになるという論文がありました。本当だろうかということで、早速実験してみました。この緩衝液、リンゲル液のような緩衝液の中に亜硝酸を入れて、NO ができるかどうか、NO ガスを検知する方法で調べてみます。そうすると、pH が5.5まではほとんど亜硝酸を入れても、NO ガスはできないのですが、5.0、4.5、4にすると、このように酸性条件下では亜硝酸を入れてやると、直ちにNO ガスができるということがはっきりわかります。そこにアスコルビン酸(ascorbic acid)とか、ポリフェノール(polyphenol)とか、還元能のあるものを入れてやると、さらにこれは強くなります(図8)。

ということで、体の中で pH が4以下のところが何処にあるのか? 体の中の血液は、皆さん、聞いていると思いますが、pH 7.4にほぼ一定に

## 8 亜硝酸塩からNOへの変換経路



固定されています。腎臓が悪くなければ、血液の pH は一定に保たれます。腎臓が悪くて血液透析をしている患者さんは7.2とか、7.0までになることはないのですが、7.2とか7.3など、少し酸性に傾くことはあります。もっとも体の中で酸性になるのは、胃です。胃の中は胃酸が出ていますので、pH 1とか2とか、すごく強酸になります。

ということで、今、体の中でアルギニンからできる NO は NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub>として体の外におしっこで排出されるのですが、今言いましたように、酸、pH 4 くらいでかなりできる。ということは胃の中でできるだろうと。食べる物の中で亜硝酸を持っている食べ物は何かというと、野菜なのです。

### <松本での思い出>

私は、今日、松本大学で講演させていただくことを、非常に光栄に思っています。というのも私は信州が大好きで、その最初のきっかけになったのが、北杜夫の「どくとるマンボウ 青春期」という本を高校時代に読みました。松本高校の寮のハチャメチャな内容に非常に興味を持ちまして、それ以来、上高地、乗鞍、美ヶ原などいろいろなところに、大学時代自転車をしていましたので、自転車で走り回っていました。乗鞍の山頂まで自転車で登りました。あの瓦礫の中、自転車を担いで登りました。バカなことをしていました。ということで、北杜夫さんが、私を松本好きにしていたいただいた恩人です。つい最近、他のおもしろい小説を読みました。「神様のカルテ」というものです。これも松本の救急病院がドラマの場所で、松本のいろいろなところが出て参ります。ちょうど卒業して5年目くらいのお医者さんの話ですが、先程紹介していただきましたが、私も卒業して7年間は臨床の医者をしていました。彼のようにほとんど24時間病院にいるような生活をしていたので、非常に興味を持って、この小説を1日で読んでしまいました。皆さんもできたら読んでみてください。松本の信州大学の卒業生が書いた文章です。そういうこともありまして、私は松本が大好きなので、今日、呼んで頂いたことに対して非常に感謝しております。

### <野菜を食べるとなぜ身体によいか Dash 食>

そういうようなことで、これから本論に入っていきますが、野菜を食べると何故体に良いか？その研究を始める一番きっかけとなったのが、今言ったように私どもが NO を測る方法の開発です。今、「開発」と簡単に言いましたが、失敗を繰り返し5年以上かかっています、やっと測れるようになりまして、それでいろいろなことがわかってきました。野菜には硝酸、亜硝酸が非常に多く含まれているということで、胃の酸性度が pH が1ということで、ここで亜硝酸由来 NO が、多分できるだろうということです。

これは日本高血圧学会のガイドラインです (図9)。高血圧の患者さんを見たときにどうしましょうということ。血圧が高いとお薬を飲みましょうということがありますが、その前に Lifestyle Modification、生活習慣を変えましょうということです。まず、お薬で治療するより、生活の習慣を変えましょう。生活習慣を変えるというのは、何をするのか？太ったらいけませんよ。しっかり運動をしましょうよ。酒は控えましょう。たばこは絶対だめですよ。野菜をしっかりと取りましょうということがあります。初めに少し言いましたが、野菜を取ると何故高血圧に良いか？体に良いか？いろいろなことが言われていますが、野菜を取ると何故体に良いのか？理由はわかっていません。カリウムがナトリウム利尿を起こして、体の中の塩分を洗い出すということがわかっています。けど、それだけでは全部を説明できない。

### 9 Decrease in BP by lifestyle modifications

Modification	recommendation	Expected decrease in systolic BP
Weight control	Maintaining a proper Body weight(BMI 18.5 ~ 24.9)	5~20 mmHg/10Kg
DASH diet	Increases in the intake of vegetables and fruits and restriction of the intake of cholesterol and saturated fatty acids	8~14 mmHg
Restriction of salt intake	Restriction of salt intake to Less than 6 g/day	2~8 mmHg
Exercise	Regular aerobic exercise for 30 min or longer every day	4~9 mmHg
Restriction of alcohol intake	20-30g/day or less in term of ethanol for men and 10-20 g/day or less for women	2~4 mmHg

JNC 7 2003



だけでも間違いなく、これで食生活を変えると高血圧の患者さんが、結構血圧が下がるということが、アメリカでいろいろ調べられています。

数年前に教室の若い先生とニューヨークでステーキを食べたときの写真です。肉ばかりで野菜のほとんどない食事はだめですということが、これは疫学的にもはっきりしています。スコットランドの人達の肉とかジャガイモばかり食べている人達は、心筋梗塞が無茶苦茶に多い。それに比べて日本人は野菜を多く食べているせいか、心筋梗塞が非常に少ないということがはっきりしていますし、野菜を食べると血管の動脈硬化とか血管障害が少ないということがはっきりしています。それでは「何故か」と言われると、なかなか説明が全部はできないというのが、現状です。

「Joint National Committee」という所が発表したアメリカにおける高血圧のデータがあります。この「Dash Diet」というのは、「Dietary Approaches to Stop Hyper Tension」と言って、食事を変えることによって、血圧を下げようという取組です。ここの食事というのは、地中海の人たちの食事。日本人の食事もかなり参考になっているようです。要するに野菜とか果物をたくさん取って、肉を少なくして、魚とか穀物を食べましょうという食事です。入院させてこの「Dash Diet」と呼ばれる vegetable と fruit を増やした食事をするだけで、血圧が10mmHg くらい下がりますということです。これは世界中どここの大学でやっても、同じことが起こっています。高血圧の患者さんに野菜の多い食べ物を食べさせると血圧は下がります。

### <亜硝酸とニトロソアミン>

そんなこともありまして、絶対に野菜に含まれる亜硝酸由来 NO 産生系があると信じております。この NO が多分血管に対して良いことをしているだろうと、私達は強く考えて、実験を行っております。ところが問題は亜硝酸塩というのは、昔から毒だと言われています。亜硝酸を赤ちゃんがたくさん取りすぎることによって、ヘモグロビンの機能が悪くなって、窒息を起こすということが言われています。これは赤ちゃんに限ってです。それともう1つ言われているのは、ニトロソアミン(nitrosamine)というアミノ酸に NO がくっついてできる物質が、癌を作る。胃癌とか消化器癌を作るということで、亜硝酸というのは、取りすぎると体に良くないということで、昔から毒ですという評価が高い。これは今、ものすごく反省時期になっていまして、そういうことがほぼ起こらないと考えられています。NO というのは、電子の数で NO<sup>+</sup>、NO<sup>•</sup>、NO<sup>-</sup>と3つの形態を取りますけれども、話が少しややこしくなりますが、NO<sup>+</sup>というのは、ニトロソアミンができるのですが、どうも生体の中ではいろいろの還元状態があるので、NO<sup>+</sup>というのは、そう簡単にはできないので、ニトロソアミンはできないだろうと、今考えています。これが、亜硝酸の研究をする人が少ない原因の1つでもあります。

### <野菜を食べるとなぜ身体によいか 亜硝酸が NO へ>

野菜を見ますと、白菜とかセロリ、タマネギ、茄子は、かなり亜硝酸が高く、硝酸も多い(図10)。ということで野菜の中には、硝酸、亜硝酸が非常に多く含まれているというのは、皆さん知っていることだと思います。それで飲み物で見えますと、ここにありますようにミネラルウォーターと比べまして、野菜ジュースの中に含まれている亜硝酸は数千倍高い濃度の亜硝酸が含まれています。缶ビール A と B の調査結果をみると、金沢医科大学の石橋先生に聞いたのですが、忘れてしまいましたが、どちらかが「スーパードライ」でどちらかが「一番搾り」だったのですが、これがものす

10 硝酸塩・亜硝酸塩の多い食物

Foods	亜硝酸塩 ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )	硝酸塩 ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )	NO <sub>x</sub> ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )
キャベツ	3.36	2485.22	2488.59
白菜	6.67	11642.47	11649.14
人参	5.97	1662.96	1668.93
大根	9.45	4396.47	4405.91
ネギ	8.93	521.36	530.29
ブロッコリー	6.84	1515.49	1522.32
カリフラワー	3.37	4321.06	4324.44
セロリ	3.80	13226.21	13230.01
茄子	16.14	1271.65	1287.79
玉ねぎ	14.46	913.21	927.67
じゃがいも	6.71	321.10	327.81
ごぼう	10.53	4228.16	4238.68
山芋	1.19	1259.67	1260.86
バナナ	10.23	434.95	445.16
しょうが	10.23	1809.62	1819.83
梅干	5.91	246.34	252.24
生姜	12.65	145.01	157.66

Himeno, M. J. Kanazawa Med. Univ. 2001; 26: 170

ごく違うのです。「使っているホップの原産地が違って、ホップに含まれている亜硝酸が違うから」というのが彼の説明でした。それはともかく、ミネラルウォーターと野菜ジュースを見ていただくと、数百倍から千倍くらいの差があるということです。野菜の中には、非常にこの亜硝酸が多い。先程の私の考えから行きますと、口から野菜を取りますと、胃液の中には酸がありますので、亜硝酸の  $\text{NO}_2^-$  が  $\text{NO}$  になることが先程の説明の中でもはっきりしていますので、多分そういうことが起こるだろうと思って調べていたら、既にそんなことをやっている人がいました。消化器内科の先生方が野菜の亜硝酸、ナイトレット (nitrite) を取ると、胃の中のガス、胃の中にチューブを入れておきまして、胃の中のガスを取ってきて、この  $\text{NO}$  がものすごく増えるということをすでに発表していました (図11)。

彼らは何を考えていたかという、この  $\text{NO}$  ガスというのは細菌を殺す作用がありますので、多分食べ物を食べると、皆さんが常に食あたりを起こすことなく、ほとんど食あたりを起こさないのは、この  $\text{NO}$  ガスがたくさん胃の中のできて、これが細菌を殺すので食あたりはいつも起こさないのだろうということを言っております。

私どもはこれが多分、分子量の小さいガスですので  $\text{NO}$  が粘膜を超えて血液に接すると、この  $\text{NO}$  が血液のヘモグロビンと一緒に、全身に運ばれていって、動脈硬化とか、お年寄りの内皮が傷んだ患者さんには、非常にこれが役に立つのだろうということを考えました。では、それを証明してあげようということで、ここに書いてありますように、食事で野菜から摂った亜硝酸が、本当に血液の中に入って役に立っているのであろうかということを、検討しました。その時に使ったのが、先程言った電子スピン共鳴法という装置を使いましたが、一ひねりしてあります。今、皆さんの体の中にある  $\text{N}$  というのは、 $^{14}\text{N}$  というものですが、 $^{14}\text{NO}$  は、3つの山のあるトリプレットシグナル (triplet signal) というのを出します。ところが  $^{15}\text{N}$  という安定同位体、放射線を出さない安定同位体の  $^{15}\text{N}$  という特殊な物質があります。

$^{15}\text{NO}$  は、おもしろいことにダブルット (doublet) のシグナルを出します (図12)。私どもは、この  $^{15}\text{N}$  でできた亜硝酸を作って、それをネズミに飲ませて  $^{15}\text{NO}$  が血液中にこれが出てくるのか調べます。これが出てくるのか？口から摂った亜硝酸が  $^{15}\text{N}$  で作ってあって、血液中に  $^{15}\text{NO}$  が出てくれば、口から摂った亜硝酸が  $\text{NO}$  になって、血液中に入って流れているということが証明できます。まずそれよりも先に、 $^{15}\text{N}$  は高いので、まずは  $^{14}\text{N}$  で実験したのですが、普通に血液を採りますと、拡大してもトリプレットシグナルがほんの少ししか出てきません。次に亜硝酸ナトリウムをびっくりするくらい大量に口から入れてやって、血液を採ってやりますと、きれいなトリプレットシグナルが出て参ります。ということは、多分口から亜硝酸を大量に飲ませてやると、胃酸で  $\text{NO}$  ができてそれが小さいガスなので、胃粘膜を超えて血液と結合して、静脈血から  $\text{NO}$  シグナルが出てくるのだろうと考えました。  $^{15}\text{N}$  でやるとどういことが起きるか。  $^{15}\text{N}$  の亜硝酸をどんどん飲ませてやって、15分ごと60分後シグナルを見ても、末梢血から採ったシグナルに2つの山の  $^{15}\text{N}$  に由来した

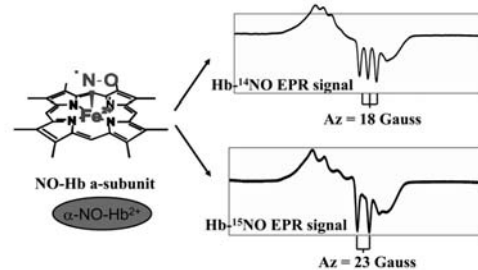
11

飲料中の  $\text{NO}_x$  含量

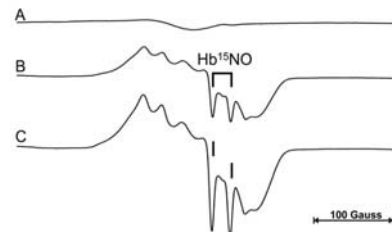
	$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_x^-$ ( $\mu\text{M}$ )
ミネラルウォーターA	0.09	1.39	1.48
ミネラルウォーターB	0.09	224.73	224.82
ミネラルウォーターC	0.07	8.71	8.78
ミネラルウォーターD	0.01	27.08	27.08
野菜ジュースA	4.45	7680.02	7684.71
野菜ジュースB	7.98	2137.69	2145.66
野菜ジュースC	4.08	1134.61	1138.69
缶ビールA	0.08	119.09	119.17
缶ビールB	6.15	254.62	260.78

金沢医科大学 薬理学教室 石橋隆治他

12

Na $^{14}\text{NO}_2$  および Na $^{15}\text{NO}_2$   
由来の HbNO シグナル

13

EPR signal of Hb $^{15}\text{NO}$  from  $^{15}\text{N}$ -nitrite administered rat.

B: Sodium  $^{15}\text{N}$ -nitrite (1mg/kg body weight) was orally administered to normotensive rats then collected the venous blood from the vena cava 15 minutes after the treatment of  $^{15}\text{N}$ -nitrite. C: same as B, but at 60 minutes after the treatment of  $^{15}\text{N}$ -nitrite. A: Distilled water received rat (control). EPR settings were same as Figure 2.

K. Tsuchiya et al. Am J Physiol H2163-2005

シグナルが出て参ります (図13)。ということは、口から入れた亜硝酸が NO ガスとなって、粘膜を超えて血液と結合して全身を流れているということで、野菜由来の亜硝酸を摂ると、多分体の中の NO が増えている。そういう現象が起こっているだろうということは、動物ネズミで証明されたということです。

先程言ったように、これが体の中の NO 合成酵素、NOS で起こっているのかどうかということを確認するために、先程のネズミ、NO 合成酵素をブロックする、機能を止めてしまう L-NAME というお薬を投与したネズミでやっても同じようにシグナルは出てきますので、この NO 合成酵素とは関係なしに起こっている。亜硝酸由来 NO は、多分物理化学的に胃酸の酸で出来ているのだろうということがはっきりしてきたと思います。

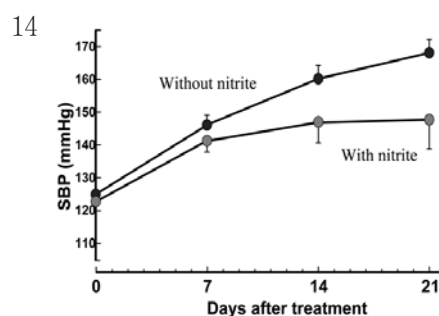
同じようにこの L-NAME を用いて生体内の NO をつぶしてやると、血圧が上がってくるのですが、一緒に亜硝酸を入れた水を飲ませると、血圧の上がり方が変わってきます。多分これは L-NAME という物質で NO 合成酵素を抑制してあって、NO が出来ないで血圧が上がるけれど、口から亜硝酸を入れてやることによって、内皮細胞は NO を作れないが、食べ物から摂った亜硝酸が NO として体の中で働いているのだろうという 1 つの証明です (図14)。

本当に NO シグナルが増えているのかということで、次に同じような実験をしています。L-NAME と亜硝酸を、飲み水にかなり大量を入れてあります。そうすると亜硝酸を入れておくと、用量に従って血圧の上がり方がやはり鈍くなります。それでこの L-NAME というのを 2 日前に打ち切って、血管内皮がどれくらい痛んでいるのかが NO で見られるだろうと考えました。亜硝酸を入れておくと、コントロールと差がないくらいまで NO シグナルが回復してきています (図15)。動脈硬化で内皮機能が痛んで血圧が上がるような患者さんに亜硝酸を摂らせると、非常に動脈硬化の予防になる可能性があるのではないかということを示すデータです。

#### <ネズミによる一般の野菜の摂取による亜硝酸量での検討>

これまでの研究は、ファーマコロジカルドース (Pharmacological dose) 薬理学濃度と言いまして、もう無茶苦茶な量を使用していました。このような無茶苦茶な量に達するだけの野菜は食べられませんので、食事で摂取する野菜量で本当にこれが起こっているかということ調べなければなりません。

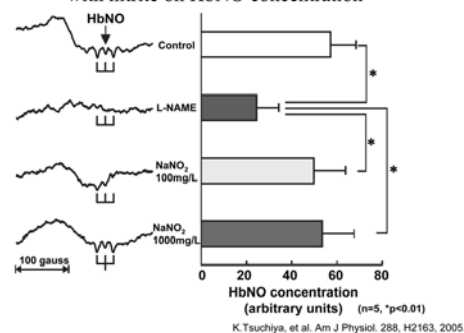
亜硝酸のこと、亜硝酸投与による生体の変化ということをやっている人間は、世界にそんなにたくさんいないだろうと思っていたのですが、NO に関する生理学的、病理学的とか、治療に使えないかと考えている人間がやはり世界に何人かはいるものです。アメリカのベセスダにある NIH (National Institutes of Health) という日本の厚生省のような所の非常に大きな研究所がありますが、そこで亜硝酸の国際シンポジウムが開催されるとの情報を得て、行ってみるとやはり 200 人くらい研究者がいました。やはりいろいろなこと、変なことに興味持つ研究者が世界にはたくさんいるということがわかりました。



Changes of systemic blood pressure (SBP) by nitrite treatment.

Rats received a drinking water containing L-NAME (1g/l) alone (●), or L-NAME with nitrite (1mg/ml) (○). SBP was monitored at 0, 7, 14, and 21th day of treatment using tail cuff method. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. K. Tsuchiya et al. Am J Physiol H2163, 2005

#### 15 Effect of chronic L-NAME treatment in combination with nitrite on HbNO concentration



(n=5, \*p<0.01)  
K. Tsuchiya, et al. Am J Physiol. 288, H2163, 2005.

それはともかく、その時に先程のこのような薬理的な、大量にやると血圧は下がるし、血液中に NO シグナルが増加しており、野菜の中に含まれている亜硝酸をたくさん摂ると、血圧も下がり体に良さそうだというデータを発表しました。だけど本当に野菜を食べるくらいの量で体に良いのかということをお次でやってみようということです。先程は亜硝酸ナトリウムを100mgとか1000mgとか、非常に大量に使いました。今回は亜硝酸を0.1mg、1mg、10mgと非常に少ない。非常に少ないと言っても、1mgというのは、日本人が少し野菜を多く摂っている人が摂るくらいの1日量です。ベジタリアンと言って、肉を食べずに野菜ばかりを食べている人がいますが、そういう野菜ばかり食べている人が摂るくらいの量が10mgかと思います。そういう推定で、先程のように100mgとか1000mgではなく、1桁2桁少ない量、人間が一般の生活で野菜を摂るときに摂る亜硝酸量で、本当にそんな良いことが起こるのかということをお、ネズミですがやってみました。

先程とまったく同じことをしました。L-NAME という薬品で NO 合成酵素をつぶしてやっています。つぶしてやったために、血圧が上がってくるのですが、それにごく少量の、この0.1mgというのは、多分アメリカとかヨーロッパで野菜の嫌いな人、皆さん方の野菜の嫌いな人もそうかも知れませんが、肉とかジャガイモばかり食べている人と思って下さい。1mgは、日本人で野菜を少し多く摂っている人。そして10mgは、ベジタリアン。動物の体重を比べてみても、余り変わりませんでした。薬理的量のように大量にやっていないので、血圧は先程のようにきれいに下がりません。ベジタリアンの人が摂る量のように少し多めにしたときだけ、有意の差が付いて下がりましたが、少量の所は有意の差が付くほどは下がりませんでした。ところが、血液中の先程お話しした私どもが開発した方法で、NO 量を測ってみますと、L-NAME だけで NO をブロックしますと、血液中のヘモグロビンに結合した NO は極端に減ります。それで野菜の嫌いな人が摂るくらいのごく微量の亜硝酸量では、NO シグナルは上がって参りません。ところが日本人の野菜好きの人、又はベジタリアンが食べる亜硝酸濃度になりますと、だいたい8割近くコントロールに戻ってくるくらい、血中の NO は増えて参ります (図16)。

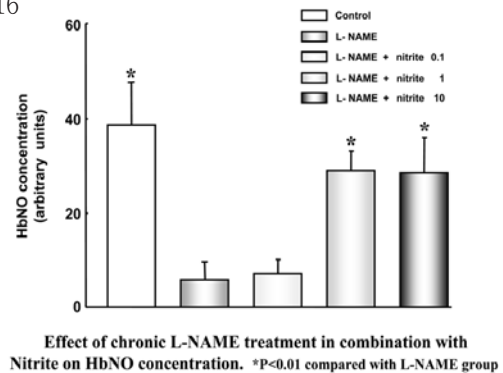
本当はもっと増えるかなと思ったのですが、いろいろな実験をしているのですが、体の中にどのような制御があるのかわかりませんが、ある程度の量以上たくさん摂っても血中の NO は増えないようです。その辺のメカニズムは今いろいろ検討していますので、また機会があったらお話しできるかも知れません。

野菜が嫌いな人の量では余り NO は増えない。日本人、特に野菜好きの日本人が食べるくらいの量を摂ると、NO シグナル量が正常近くに戻ると。これは覚えておいて下さい。高血圧とか NO が少なくなると、腎臓機能が悪くなる。糖尿病性腎症というのもそうですが、腎臓が悪くなったときにおしっこタンパクが増えるのですが、この L-NAME で NOS をブロックしてやると、腎臓の血管を痛めてやると腎臓障害が起こり、この動物のタンパク尿、おしっこタンパク量が2倍くらいに増えて参ります。同じように L-NAME で少量の亜硝酸を飲ませても、これは良くなりません。ところが先程示しましたように、日本人が摂るくらいの量、又はベジタリアンが摂るくらいの量を投与してやりますと、NO 量も増えましたが、腎臓障害も軽微であり全くコントロールと変わらない程度に改善してしまうということで、少なくとも腎臓障害にとってはこの NO は非常に良く効いているということになります。

#### <腎臓のタンパク尿と亜硝酸>

腎臓の組織です。糸球体というところは、おしっこを漉すところですが、この L-NAME という

16



お薬で体の中のNOを減してやると、赤く染まっているタンパク尿が明らかになります(図17)。

赤くぼつぼつとあるのは、タンパクが糸球体に沈着した状態です。腎臓の中に、血液が流れる血管があるのですが、これが「くしゃっ」と糸球体がつぶれてしまうような現象が、L-NAMEでNOを少なくすると起こります。先程言いましたように、日本人が摂るくらい、それからベジタリアンが摂るような亜硝酸量では、動物の血液中NO量が上がっているような状態で糸球体を見ますとコントロールとほぼ変わりません。タンパク尿もちらっと見られますが、ほぼタンパク尿もなくなって、腎臓のタンパク尿も減っているし、腎臓の形もどうも正常に近くなってきて、非常に良い状態に保たれている。

その腎臓の障害をいろいろなインデックスに分けて調べたのですが、これも全く同じです。いろいろなインデックスを調べているのですが、亜硝酸を飲むことで血中のNOが増えてきた動物では明らかに障害がない。コントロールとほぼ近いところまで良くなっています。いろいろなファクターを病理学的、組織学的に見ているのですが、良くなっているということです(図18)。

去年、亜硝酸の3回目の国際学会がスウェーデンでありました。スウェーデンというとノーベル賞があるところですが、そのノーベルフォーラムという会場であったのですが、その前にこのノーベルの像があります。この写真は、私と一緒に研究している土屋教授ですが、その隣の人が世界中で多分、一番亜硝酸、硝酸とNOの研究をしているカロリンスカ研究所の内科の先生です。「俺、ノーベル賞の選考委員になったので、将来うまくいったらお前ら推薦してあげる」と勝手なことを言っています。余り信用できません。そういうことがありました。

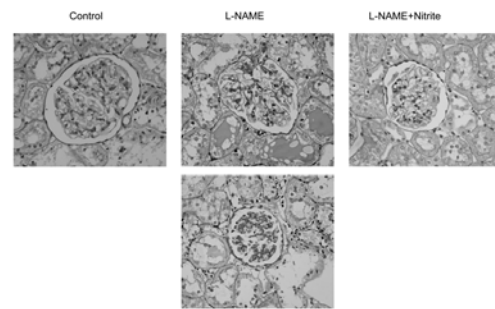
ということで、今お話ししたのは、あくまでもネズミのデータですが、皆さんが少し多めに野菜を摂ることで生体内に入ってくる亜硝酸量で、血管障害や動脈硬化を起こした人のNOが減少した分を補えるだろうと考えています。そういうことで野菜を食べると動脈硬化になっても血管障害を起こしにくい。あとのいろいろな病気を起こしにくくする可能性があるということです。

### <虚血性変化とNO>

それでこれから少し野菜とNOの話とは別になりますが、それではその他にも体の中で亜硝酸からNOが出来る経路があるのかどうかということについての興味があったので、調べました。体の中で酸性条件に起こるといのは、1つ起こるのは虚血性変化です。臓器に血液が行かなくなると、体の細胞が酸性化してきます。それほど強烈な酸性にはなりません。だいたいpH7.4が6.8とか6.9にしかありません。それ以上悪くなると、細胞は死んでしまいます。そういう状況でNOが出来るのではないかと考えました。というのは、血液中よりも肺とか肝臓、頭、腎臓、心臓の亜硝酸濃度というのは血液中よりも高いのです。これは臓器が障害されたときのソースになって、NOが出来るのではないかと考えました。

私は元々泌尿器科というところで、腎臓移植とか腎臓の手術ばかりしていましたので、腎臓に興味があります。腎臓の血管をクランプ(clamp)で血流を止めてやる。そうすると腎臓に血液が行か

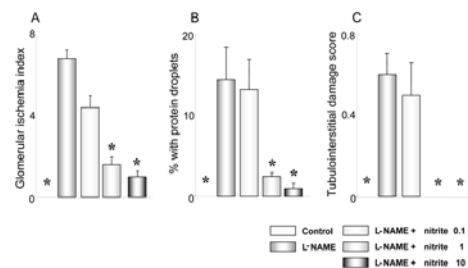
17



Attenuation of glomerular disease by nitrite treatment.

Rats received a drinking water (Control group) containing L-NAME (1g/l) alone (L-NAME group), or L-NAME with nitrite (10mg/L) (L-NAME+nitrite group) for eight weeks.

18



Semiquantitative assessment of renal injury. (A) Glomerular ischemia index, (B) % with protein droplets, (C) Tubulointerstitial damage score, \*P<0.01 compared with L-NAME group

なくなって、酸素も栄養もないので障害が起こります。その時 pH はだいたい7をちょっと切るくらい、6.8とか6.9になると言われています。その時に NO が出来るのではないかと考えてみました。同じように  $^{15}\text{N}$  というのを使って、他から出来たのではないということを確認するために、腎臓をクランプして45分おきます (図19)。それで腎臓の組織を取ってきて、腎臓組織は血液がたくさん含まれているので、腎臓の組織を測ってみますと、このように  $^{15}\text{N}$  で作成した亜硝酸からの NO が出来ていることがわかります。その時に血液の NO シグナルを見ても増えていません。45分経って、クランプを外して、腎臓に血液が流れるようにしてやると、腎臓の NO シグナルが減って全身にこれが流れて血中 NO シグナルが増加します。腎臓虚血にして障害を与えてやると腎臓の中の亜硝酸から NO がたくさんできます。

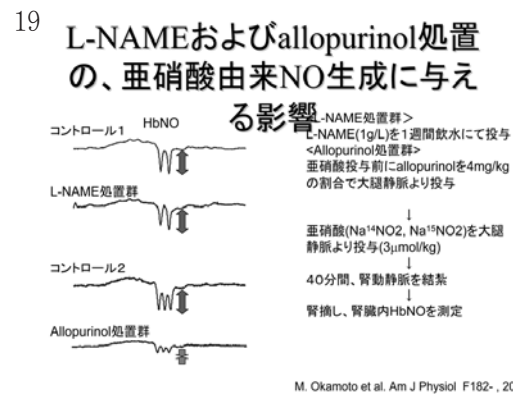
虚血障害の時に、どうも体の中、腎臓の中にある亜硝酸から NO が出来るのだということがわかりました。

この虚血性腎障害における亜硝酸由来 NO 産生系は、はじめは酸かなと思っていました。そうではなくて最初にあったと思いますが、体の中にあるキサンチンオキシターゼ (xanthine oxidase) というものが、亜硝酸から NO を作るということは昔から知られていまして、そのキサンチンオキシターゼをブロックするアロプリノール (allopurinol) というのを使ってやりますと、このほとんどが消えてしまいますので、これはどうも酸性になった6.8とか6.9では、そう簡単に NO は出来なくて、どうもこれは体の中のキサンチンオキシターゼという酵素を使って、腎臓では亜硝酸由来 NO が出来ているようだということがわかりました。少なくとも今までは、生体の中に入った亜硝酸とか硝酸とかいう物は、全く意味のないものと言われていたのですが、どうも違うと思います。先程言ったように、野菜を食べると体の中に NO が出来て、動脈硬化とか腎障害を予防できる可能性が十分ありますし、このような虚血性障害が起こったときに、腎臓を守るためにどうも亜硝酸から NO が出来て、いろいろな体を守っている。要するに、今までは内皮細胞でアルギニンから出来た NO は  $\text{NO}_2$ 、 $\text{NO}_3$  で、おしっこで出ていくだけだと考えていたのですが、どうもそうではなかろう。少なくとも  $\text{NO}_2$  は、体の中に NO が不足したときのリザーブとして働いて、いろいろな作用をする可能性があるということがわかって、生体の中でこういう事があるでしょうということがわかりました。

#### <まとめ>

これは最後のまとめでございます。今わかっていることは、全て動物の実験でまだまだ人間のデータとしては、証拠はないのですが、口から亜硝酸を飲ますと、血液中に NO として出てくる。それから飲み水の中に、生体内で NO を作ると言われる酵素をブロックしてやると、高血圧が発症したけれども、亜硝酸を大量に入れておくと、血圧が有意に下がります。それから L-NAME というのを8週間投与して、体の NO の産生を止めてやると、高血圧と共に、腎障害が発生するのですが、同時に食事で摂る、それも日本人の少し野菜の好きな人が摂るくらいの亜硝酸、又はベジタリアンの人が摂るくらいの少し多めの亜硝酸を少量入れてやっても、腎障害が抑制されました。多分腎臓の血管とか、いろいろな血管に良い働きが起こるでしょうということがわかりました。それだけでなく、どうもいろいろなところで臓器の虚血が起こるときには、生体内にある亜硝酸が NO と変わるようなメカニズムがあるだろうということがわかりました。

ということで、まだまだこれから研究を続ける必要がありますが、1つ野菜を食べると体に良い



のではないかということに対して、科学的なエビデンスの1つの証明ができたのではないかと思います。またこれから血中のNOの測定方法を改良しまして、人間でもわかるような測定法を、今準備しつつありますので、出来たらまた、そのうちに人間でのデータをご紹介していきたいと思っております。

今年の3月に私どもの教室の送別会をしたときのメンバーです。今日、お話ししたデータはこのような若い先生が一生懸命やってくれた結果です。特に先程スウェーデンの話もしましたが、土屋教授、彼はあっという間に出世して、40歳で教授になってしまいました。彼は今、徳島大学の薬学部にいますので、一緒にずっと仕事をやってくれています。それともう一人、桐間君という大学院生です。今は大塚製薬のラジカル研究所で働いています。最初にこのNOを測る方法、なかなかうまくいかなかったのですが、彼が5年間もかけて完成させてくれました。これだけのために大学院にずっと在籍しまして、この研究をするに当たって、彼が非常に貢献してくれました。それで頑張ったために大手製薬メーカーの研究所に務めることが出来ているのですが、こういう仲間たちに支えられて、今日の発表したデータが出来たということでございます。このような先生方に協力していただきました。ということで今日のお話を終わらせていただきます。

#### <質疑応答>

沖嶋／ それではまだ、少し時間がありますので質問をいただきたいと思っております。まずは私の方から1点。最後のほうのデータで、一般人が生理的に食べているであろう量の亜硝酸を与えたときに、血中のヘモグロビンに結合しているNO自体は1でも10でも変わらなかったということですが、それについて、例えばヘモグロビン以外のものに結合している、あるいはフリーのタイプのNOが、例えば血流の中であって、ヘモグロビンの中では飽和していて、他のNOがまだあるかも知れないという証拠はあるのでしょうか。

玉置／それは可能性としてはあります。それでNOが出てくるときに、ヘモグロビンにくっつくNOと、ヘモグロビンのグロブリン(globulin)の所のタンパクにNO<sub>2</sub>としてきて、スノータンパクと呼んでいますが、そういう形の物になることがあると言われております。ところがこのスノータンパクというのが、非常に生理的に役割を持っているという、デューク大学の先生で1人そればかりやっている先生がいますが、どうもそれを日本でやってみると、再現性が余りないので、よくわかりませんとしか答えようがないのですが、私どもはdataは持っていません。

それと私どもが測っているのは、あくまでも血管内にできる、あるいは食べ物から入ってくる亜硝酸から出来たNOが、ヘモグロビンにくっついていてのものを見ていますので、トータルを見ていくわけではないのです。それと血圧の変化とかを見てみますと、かなりパラレルに出てくるので、生体内で出来るNOの全体量の指標にはなると思っています。他のアルギニン、グロブリン、いろいろなタンパクと結合している全部をならしているわけではないので、沖嶋先生が言われるように、そういうものが大きなリザーブとして働いている可能性はありますが、ちょっとまだそこは検討できていません。

沖嶋／特に血圧との関係で見えてまして、血圧は10だと有意に下がっていましたがけれども、1ですとほぼ他のグループと同じくらいだったので、ひょっとしたらその部分というのは、ヘモグロビン以外にあるNO、あるいはヘモグロビンのNOが飽和してしまっている状態なのかと思いましたが、質問させていただきました。

それ以外にいかがでしょうか。せっかくの機会ですので。

藤岡／教員の藤岡と申します。大学の時にアルギニンのサプリメントで腎炎をやっていましたが、

糸球体腎炎に NO の作用で効果があったという論文を読んだ記憶があるのですが、アルギニン由来の NO と亜硝酸由来の NO というのは、比較できる物なのでしょうか。

玉置／私どもも、腎炎モデルにアルギニンをやると、腎障害が良くなるかということをやってみて、良くなるデータは持っています。ネズミなのですが。しかし、非常に良くわからない点がございまして。というのは、アルギニンを大量に飲ませますと、腸管で吸収されると門脈に入りますね。門脈に入ると肝臓に行くわけです。そうすると、どんなに多くのアルギニンをやっても、まず肝臓でトラップされてしまっていて、血中には余りアルギニンは出てこないのです。それなのに腎臓で効くのですよね。これは非常に僕らも、どう説明して良いのかわからなくて、肝臓で溜まるアルギニンが基質となって NO が増えているのかどうかということが、少しはつきりしません。先程お示しましたのは、アルギニンをごく微量点滴静注してやると、NO として増加するのがディテクトできて、アルギニンが血中に入っていくと、間違いなく NO の基質となりますので増えるのです。

経口から摂ったものが、どうなっていくのか、今お話ししたように、肝臓でトラップしまして、肝臓の入るところと出るところ、肝静脈と門脈の変化を見ますと、出ていくのは少ない。反対に腎臓などは、先程お示しましたが、腎臓の組織中の亜硝酸量は結構高くて、アルギニンなどを見ますと、腎臓で見ると反対なのです。腎臓に入っていくよりも出ていくアルギニンの方が多くて、多分腎臓でアルギニンが合成されていて、一部出ているのだろうと。それにどういう風な影響を与えているのかはまだよくわかっていませんし、多分、先生もご存知だと思いますが、アミノ酸をたくさん摂ると、血流量が増える。特に腎血流量が増えるということは昔からよく知られていますが、それも門脈が肝臓に入って、どのファクターが腎臓に効いているのかはよくわかっておりません。だから肝臓の中でアルギニンが増えるのは間違いのないのですが、それが NO のソースとしてどの程度出来ているのかというのは、私どもまだ、きちりとしたデータを持っていません。しかしおっしゃるように腎臓は良くなります。少なくともネズミでは、人間ではわかりませんが。ただ人間は間違いなく腎障害のある人は、アミノ酸を減らした方が腎障害の進行はゆっくりになります。アルギニンを本当に負荷するのが腎臓の悪い人にとって良いのかどうかというのは、これからもう少し検討する必要があるかというくらいのデータしか、私は知りません。

藤岡／野菜由来の NO の効果とは、比較対象にはならないということですか。

玉置／亜硝酸から出来るというのは、先程示しましたように、人間でもたぶん胃酸は同じですので、それから少なくとも人間で野菜や亜硝酸を摂らせたときに、胃の中にチューブを入れて胃の中のガスを摂ってきますと、NO 濃度ははっきり上がっています。そこは人間でもデータがあります。それはネズミでも人間でも粘膜を通る可能性は、ガスですので十分あると思います。そこは亜硝酸から NO が出来るのが人間でも多分起こっていると思っています。食事時のアルギニンが基質として NO の産生に関与するか？食べたアルギニンがどこまで行くのかはもう少し検討が必要かと思っています。

一般聴講／病院栄養士をしています中村と申します。

私もアルギニンは聞いたのですが、まだちょっと結果が出ていないということなのですね。だいたい人間の場合、アルギニンを入れるときには、1日に2.5mg とか入れるのですが、野菜に換算したらどれくらいなのかと思ったのですが、まだそういう回答が出ていないということですね。

それ以外に最初のほうの説明で、加齢によって内皮細胞が傷害されるので、NO 産生が落ちて高血圧になりやすいというお話だったのですが、それ以外で内皮細胞に障害を与える物としては、どういうものがあるのでしょうか。



玉置／いろいろなものがございます。それで今、はっきりしているのはレニン-アンジオテンシン系(Renin-Angiotensin System;RAS)が活性化しますと、NADPH オキシターゼという酸素をスーパーオキシドに変える酵素をアンジオテンシンⅡは刺激しますので、内皮障害が起こると言われています。そのために、今レニン-アンジオテンシン系を抑制する ARB というお薬とか、ACE 阻害剤というのが、内皮障害に非常に良いということが言われていまして、そのレニン-アンジオテンシン系の亢進が内皮障害を起こす。また、糖尿病でも同じだと思います。糖尿病でも酸化ストレスが非常に強くなっていると考えられています。AGEs(advanced glycation endproducts)と言われる、アドバンスグリケーションエンドプロダクトという、何種類もありますが、その一部の物はかなり酸化ストレスとして働きますので、そういうところが内皮障害を起こすというのは間違いございません。もう1つはやはり私どもは常に酸素を吸って生きているわけですが、この酸素が4電子還元して水になるまでの間に、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカル(hydroxyl radical)という、活性酸素種を作ります。人間の体の中に SOD(Superoxide dismutase)とか、いろいろな活性酸素種を処理する機能がありますが、どうしてもやはり少しずつダメージとして残っていくようです。どうしても加齢というファクター、長く生きていれば当然それだけ酸素を吸って生きている限りは、酸化ストレスとして内皮障害が起こってくるのは、どうしてもさけられない状況だと思います。そういうのが大きなファクターになると思います。

もう1つは血圧の圧、そのもののファクターも言われています。圧が高いと、それだけでアンジオテンシンⅡの活性化が起こるといった報告もありますし、そういう機械的な圧が高いだけで、内皮障害も起こるのだらうと言われています。

もう1つは、飽和脂肪酸です。動物の飽和脂肪酸とか、フリーファッティアシッド(遊離脂肪酸)も内皮障害をかなり起こすというのは、はっきりしている状況ですし、食べ物の一部によって内皮障害が起こるのは間違いなく起こっていると思います。そういういろいろなファクターが重なっていると思います。

一般聴講／それでは、糖尿病とか高脂血症の患者さんに将来的に、仮にならなくてもやはり血中に血糖とか、油がいっぱいあると、そういう内皮細胞を障害して胃の酸性が低下するのではという意味でも、野菜を食べる意味づけを話しても大丈夫ということですね。

玉置／そう考えています。それだけで全部問題が解決するわけではございませんが、糖尿病、高血圧で内皮障害が起こって、NO 酸性量が減ったときに、野菜を食べることによって、先程実験で示したようなことが、人間でも起こっていると思っています。まだそれは証明されていませんが、まず同じことが起こっているし、それは非常に食生活としては良いと思っています。

ただ1つだけ、腎障害がある方ですね、野菜はカリウムが多すぎますので、高カリウム血症になりますと、心停止を起こしたりしますので、そこは注意しなくてはなりません。私達はそういう人たちにでも、こういう亜硝酸のサプリメントを作れば良いのではないかと提案しています。先程言いましたように、亜硝酸は毒だという規定で、出来るだけ減らさないと考えられています。農水省も野菜を作るときに窒素飼料を出来るだけ減らさないという指導をしていますので、なかなか私どもの言うことを聞いてくれません。亜硝酸はそんなに悪くないと、世界中で今、反省時期に入っているの、少しまた変わるかもわかりませんが、毒だという所の意識が払拭できて、科学的なエビデンスを出さないと亜硝酸がサプリメントとして使える日はなかなか難しいかなと思っています。

一般聴講／最後に、もしご存知でしたら、野菜の亜硝酸というのは、調理法で何か変わりますか。

玉置／一番多く変わるのは、野沢菜のような発酵食品です。キムチとか野沢菜のように発酵させますと硝酸から亜硝酸がものすごく増えまして、漬け物というのは亜硝酸が非常に多いということがはっきりしてしまっていて、そういう意味では、漬け物というのは、塩が多くて悪玉とずっと言われていますが、塩が多いのは少し考え物かと思いますが、悪いばかりでもないかなと思っています。それと先程言いましたように、余りたくさん摂りすぎましても、血中には余り上がってきませんので、どこまで有効かはわかりませんが、少なくとも発酵したような物質は結構亜硝酸が多いと思っています。

学生／人間健康学部の滝沢ですが、今回は、サプリメントの面からや物質の面から、亜硝酸についてお話ししていただいたのですが、加工法によって違うと今話を聞きましたが、例えば野菜といってもいろいろな種類があります。全体的に生で食べたりした場合、何が一番亜硝酸が多いですか。

玉置／葉物野菜が一番多いと言われています。白菜とか、レタスとか、ほうれん草だったかな。先程言いましたように、それを発酵させて野沢菜のようにすると、もっと多くなると言われています。先程野菜ジュースでもお見せしましたように、野菜全体に大根等も結構入っていますし、どの野菜を取っても、かなり大量の亜硝酸は入っていますので、余り気にする必要はないかと思っています。亜硝酸に関しては、野菜はだいたいどれもたくさん入っています。

沖嶋／すみません、最後に私、学生からバカにされるような質問をしたいのですが、よろしいでしょうか。

今回は野菜ということで、亜硝酸についてやっていただいたのですが、同じ亜硝酸で、我々管理栄養士がピンと来るのは、食品添加物である発色剤の亜硝酸です。ハムとかソーセージに含まれていて、今までの感覚ですと、それは良くないものだと言われていたのですが、今回のお話を聞いていますと、例えば野菜嫌いの人がハムとかソーセージを食べたら良いのではないかと、単純に、塩分などは全く無視してなのですが、そのように思ったのですが。

玉置／その当たりも非常に気になって、ソーセージとか、ハム加工業者にどれくらい使っているのか問い合わせしてみたのですが、企業秘密で一切答えてもらえなかったもので、具体的にどれくらい入っているのか、自分で調べればよいのですが、尋ねても答えてくれなかったもので、今はわかりません。おっしゃるように、アスコルビン酸(ascorbic acid)と亜硝酸をかけて、肉に振りかけてきれいにしようとか、ソーセージに入れて見た目をよくしようとかやられているということは、私どもよく知っていますが、ちょっとその当たりの濃度は問い合わせただけで自分達で測定していないので、わかりません。

それでもやはり、たぶん皆さんのように若い人達は少々食べても問題ないと思いますが、やはり問題なく動物性の飽和脂肪酸は体に悪いということはかなりはっきりしていますので、できれば摂らない方が、特にある程度お年がたって、血圧が上がってきた方は、動物性タンパクを摂るのであれば、魚の方の不飽和脂肪酸を摂った方が、明らかに良いのは間違いないだろうと思います。あえてそれで亜硝酸がちょっと入っているからと言って、ファクターの悪い物が入っている物を摂る必要はないというのが、私の考えでございます。

沖嶋／おっしゃる通りだと思います。おそらく亜硝酸の量に関しては、食品衛生法で上限が決められていると思いますので、そこまでしか入っていないと考えて良いかと思っています。それでは最後に盛大な拍手でお礼をしたいと思います。