

# 博士論文

基礎および臨床的側面からみたアミノ酸投与が  
血管内皮機能および動脈壁硬化に及ぼす生理的影響  
に関する研究

森田匡彦

# 目次

略称一覧	… 1
序論	… 2
第1章 L-Arginine 代謝における L-Citrulline 投与の基礎的解析	… 8
1-1 目的	
1-2 実験材料および方法	
1-3 実験結果および図表	
1-4 考察とまとめ	
第2章 ストレス誘発末梢循環低下モデルの構築および L-Citrulline による 体温調節作用の検討	… 21
2-1 目的	
2-2 実験材料および方法	
2-3 実験結果および図表	
2-4 考察とまとめ	
第3章 虚血性脳血管障害モデルにおける L-Citrulline の生理作用の基礎的検討	… 31
3-1 目的	
3-2 実験材料および方法	
3-3 実験結果および図表	
3-4 考察とまとめ	
第4章 健常成人における L-Citrulline 摂取後の血漿 L-Arginine と一酸化窒素 (NO) レベルの相関解析、ならびに末梢循環動態に対する改善効果の検討	… 45
4-1 目的	
4-2 実験材料および方法	
4-3 実験結果および図表	
4-4 考察とまとめ	
第5章 健常成人における L-Citrulline 摂取が動脈伸展性に及ぼす作用の臨床的解析	… 56
5-1 目的	
5-2 実験材料および方法	
5-3 実験結果および図表	
5-4 考察とまとめ	

第6章 血管内皮機能に及ぼす L-Citrulline 摂取の臨床的解析	… 68
— 冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験 —	
6-1 目的	
6-2 実験材料および方法	
6-3 実験結果および図表	
6-4 考察とまとめ	
総括	… 82
参考文献	… 89
謝辞	… 96
論文 (業績) リスト	… 97

## 略称一覧

- eNOS : endothelial NO synthase
- NO : nitric oxide
- NO<sub>x</sub> : nitrite: NO<sup>2-</sup> + nitrate: NO<sup>3-</sup>
- cGMP : cyclic guanosine monophosphate
- ASS : argininosuccinate synthase
- ASL : argininosuccinate lyase
- SD : standard deviation
- SEM : standard error of the mean
- AUC : areas under the plasma concentration-time curve
- T<sub>max</sub> : time to reach the peak concentration
- SN1 : system N transporter 1
- L-NAME : NG-nitro-L-arginine methylester
- BCCAO : bilateral common carotid artery occlusion
- PBS : phosphate buffered saline
- PECAM-1 : platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
- PI : propidium iodide
- CaMK II : Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent proteinkinaseII
- 7-NI : 7-nitroindazole
- Veh : vehicle
- eNOS : endothelial NO synthase
- iNOS : inducible NO synthase
- nNOS : neuronal NO synthase
- CAT-1 : cationic amino acid transporter 1
- PWV : pulse wave velocity
- baPWV : brachial-ankle PWV
- ABI: ankle/brachial index
- ADMA : asymmetric dimethylarginine
- LDL : low density lipoprotein
- LOX-1 : lectin-like oxidized LDL receptor 1
- PRMT : protein arginine N-methyltransferases
- FMD : flow-mediated dilation
- LAB : LOX-1 ligand containing ApoB
- BSA : bovine serum albumin
- MELAS : Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes

## 序論

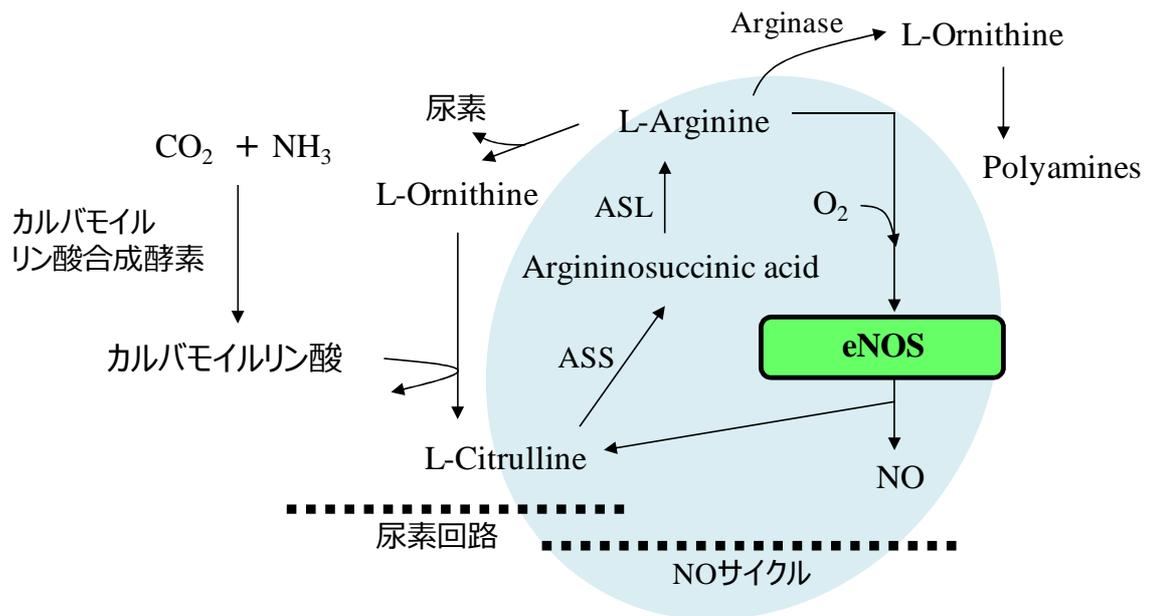
「ヒトは血管とともに老いる」と言われるように、加齢に伴い徐々に血管の硬化が進行し、アテローム性動脈硬化巣の出現頻度が上昇する。わが国の平成 26 年人口動態統計 (厚生労働省) によると、国民死因の第 1 位は悪性新生物であるが、第 2 位に心疾患があり、脳血管疾患も肺炎につき第 4 位と上位に位置する。つまり血管の障害を基盤とした病態は本質的に人々の健康維持に影響している。これら血管疾患は多くの場合、急性期治療や後遺症のために、個人としても社会としても負担は増大する [1]。従って、わが国をはじめ高齢化社会に直面している国々では、心血管疾患の増加は医学的・社会的に目下問題となっており、いかに若い頃から、老年期にかけて正常な血管機能を維持するかは重要な健康課題と考えられる。

臨床的に動脈硬化巣の進展の前段階として、血管壁の最も内腔層に位置する血管内皮が障害されることが多くの研究から明らかにされている [2,3]。血管内皮機能障害は、加齢により漸次増加を認めるが、高血圧、脂質異常症、糖尿病のほか、加齢、肥満、喫煙、閉経などの因子が血管内皮の障害を加速させるリスクとなる [4]。血管内皮は解剖学的には、血管組織の最も内側に位置する一層の細胞層であり、一酸化窒素 (NO)、内皮由来血管過分極因子、プロスタグランジン I<sub>2</sub>、C 型ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、アンジオテンシン II など多くの血管拡張・収縮に関わる生理活性物質が産生される [4]。このことから、血管内皮は生体における重要な内分泌器官と理解され、血管の動的恒常性、即ち血流の需要と供給に応じた正常な血管トナーズの調節に極めて重要な役割を果たしている。

言いかえれば、血管組織は血管内皮によって制御されており、その機能不全によりアテローム性動脈硬化症やそれに続く心血管イベントへと繋がる [5]。従って、血管機能に着目した研究を展開する場合、血管内皮の生理と代謝を十分理解したうえで、血管内皮を標的とした介入は非常に有用と思われる。

血管内皮が産生する血管作動物質の中で、今日最も研究が進んでいるものが NO である。1980 年、Nature 誌上に New York 州立大学 Furchgott 氏らにより、血管内皮細胞から極めて重要な血管弛緩物質が分泌されることが発表され [6]、これが後に NO であることが証明された。循環器研究の歴史上、革命的な発表となったが、その後、研究は急速に進み、NO の発見と生理的意義を解明した米国 3 博士らには 1998 年にノーベル生理学・医学賞が贈られている。

血管内皮細胞には NO 産生に関わる内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) が構成的に発現し、



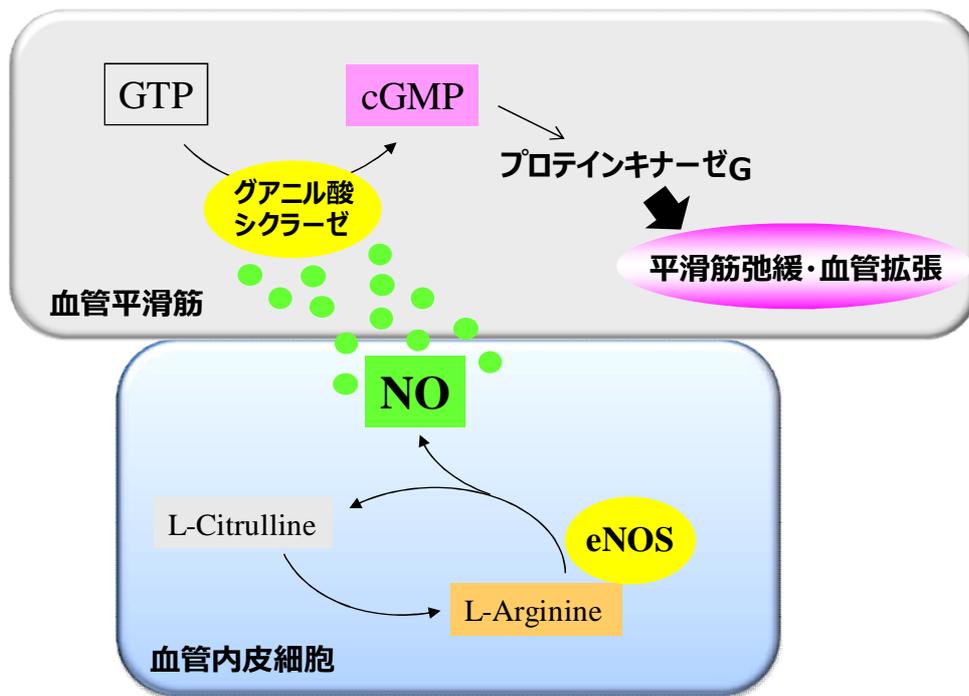
**Fig. 1** 一酸化窒素 (NO) サイクルと L-Citrulline 代謝経路概要

青枠の領域が NO サイクルを表す。NO : nitric oxide, eNOS : endothelial NO synthase, ASS : argininosuccinate synthase, ASL : argininosuccinate lyase.

NO を供給する [7]。この NO 産生に関わる経路は NO サイクルと称され、eNOS により、L-Arginine と酸素から NO と L-Citrulline が生成される (Fig. 1)。続いて L-Citrulline は、Argininosuccinate synthase (ASS) の働きにより Argininosuccinic acid を経由し、Argininosuccinate lyase (ASL) により再び L-Arginine へと変換される。こうして生成した NO は、ガス状ラジカル物質であるゆえ容易に細胞間を拡散しながら多様な生理作用を発揮するが、特に、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化 [8] を介して cGMP レベルの増加に寄与することで、血管平滑筋を弛緩させ、血管の緊張性を緩和し十分な血液が体内を巡る (Fig. 2)。また、血小板凝集抑制や血管平滑筋細胞の増殖抑制 [9]、動脈硬化のリスクファクターである LDL の酸化抑制 [10] など NO の生体調節機能は多岐に渡り、正常な末梢循環および血管機能の維持に重要な働きを担っている。一方、NO は神経系や免疫系でも多彩な作用を発揮する。中枢組織では神経型 NO 合成酵素 (nNOS) を介し神経伝達物質として作用するほか、免疫細胞では細菌感染時や炎症時にマクロファージに発現する誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を介し免疫応答にも寄与する [11]。

血管内皮での NO 産生系を賦活させ、血管機能を改善する目的で、eNOS 基質である L-Arginine 投与の介入例が報告されている [12-14]。しかし、動脈硬化モデル動物ならびに臨床研究において、L-Arginine 投与の有効性を示す結果は複数あるものの、最近の知見では、必ずしも長期的な有効性はないことが示唆されている [15,16]。その理由として、投与後の L-Arginine が主に腸管や肝臓で Arginase の強力な作用により代謝を受け、血管内皮では生物学的利用能が低いこと、および血管系疾患の場合、動脈組織で Arginase の発現自体が高まり NO 産生機構が抑制され [17]、L-Arginine の eNOS への利用に拮抗するためと考えられる。さらに、臨床での経口投与試験における L-Arginine 有効用量が、5~10 g 以上という点も、医薬製剤やサプリメントとして日常的に継続摂取するには過剰となっている。

興味深いことに、NO サイクルの構成代謝物質である L-Citrulline が、生体での L-Arginine の効率的な前駆体として機能することが近年注目されている。L-Citrulline ( $C_6H_{13}N_3O_3$ ) は、スイカ果汁中に発見されたアミノ酸の一種であり、生体内では遊離の状態では血中や各組織に遍在する。L 体アミノ酸のファミリーに含まれるが、L-Citrulline 自体がタンパク質の合成原料になることはなく、さまざまな代謝過程に関わる。L-Citrulline の供給組織としては、腸管が重要な役割を占め、L-Arginine または L-Glutamine などから、L-Ornithine を経由して L-Citrulline が生合成され、全身循環へ供給される [18]。このため、短腸症候群をはじめとした腸管機能不全症例では L-Citrulline の合成能が低下し、血中の L-Citrulline 濃度が顕著に低値となるため、腸管機能を評価する臨床マーカーとして血中 L-Citrulline 濃度が用いられている [18]。



**Fig. 2** 一酸化窒素 (NO) による血管拡張メカニズム

血管内皮細胞で endothelial NO synthase (eNOS) により産生された NO は血管平滑筋細胞の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、guanosine tri-phosphate (GTP) を基に細胞内 cyclic GMP (cGMP) 量を増加させる。cGMP はプロテインキナーゼ G を活性化することにより、血管平滑筋の拡張作用を示す。

また、肝臓において L-Citrulline は、生体にとって有害なアンモニアを無毒な尿素に変換する「尿素回路」の中間代謝物としても機能する (Fig. 1)。即ち、アンモニアはミトコンドリアにおいてカルバモイルリン酸合成酵素の触媒によりカルバモイルリン酸へと受け渡され、これが L-Ornithine と反応することで L-Citrulline が生成する。こうして生成した L-Citrulline は、Argininosuccinic acid を経て L-Arginine へと変換される [19]。

ここで、L-Arginine 代謝の見地において、血管組織の L-Arginine を増加させるには、当然ながら L-Arginine そのものを摂取した方が一見して有用と推察される。しかし上述の通り、摂取した L-Arginine は腸管、肝臓で Arginase により迅速に代謝され [17]、特に心血管疾患では Arginase の発現が亢進しているため、血管での生物学的利用能の低さが課題となる。近年、興味深いことに、L-Citrulline を経口摂取した場合、L-Arginine を等量摂取するよりも末梢血中 L-Arginine 濃度を上昇させ得ることが報告された [20]。これは、L-Arginine と異なり、L-Citrulline は摂取後、腸管や肝臓を通過する段階での代謝を免れ、大部分が末梢循環へ移行し L-Arginine に代謝変換されるためと推察される。この際、L-Citrulline の全身代謝において、L-Arginine への代謝変換を担う主たる臓器として腎臓が重要な役割を果たしている [18]。さらに、エンドトキシンショックにより血流を低減させたマウスにおいても、L-Citrulline 投与は L-Arginine 投与よりも組織微小循環を改善する可能性が報告された [21]。このことから、血管内皮細胞における L-Arginine の生物学的利用能を向上させる作用は、L-Citrulline の特筆すべき特性といえる。

この L-Citrulline は我が国では 2007 年より食品として使用が可能となっており、米国など諸外国においてもサプリメントとして用いられる。欧州の一部では、リンゴ酸塩の形態で抗疲労用途の OTC 医薬品としても使われている。また、L-Citrulline の安全性に関し、マウス急性経口毒性試験における LD<sub>50</sub> は 5 g/kg 以上であり、ラットにおける反復投与毒性試験においても毒性学的に問題となる結果は認められなかった (著者未発表データ)。

このように、L-Arginine 代謝・NO サイクルへの関与を背景に、循環器領域において、近年、L-Citrulline の研究が進み始めている。最近の報告では、L-Citrulline 投与により、心疾患患者において肺動脈圧が低下し、右心室機能 (右室駆出率) が改善したとする報告 [22] や、高血圧モデルラットにおける血圧低下作用 [23]、血管性機能障害モデルにおける勃起機能障害の改善作用 [24] なども見出されている。また、ヒトでの寒冷負荷試験において L-Citrulline 摂取は急激な血管収縮による昇圧反応の抑制を示すこと [25] や、L-Citrulline を多く含むスイカジュースを糖尿病ラットに投与

すると、アセチルコリンに対する血管弛緩反応を改善させることも示唆されている [26]。

しかしながら、血管の恒常性維持における基幹システムである血管内皮機能に着目すると、L-Citrulline の作用機作を検証した研究は少なく、如何にして摂取した L-Citrulline が血管内皮の障害を抑制し得るか、詳細な作用は不明である。また、機能性素材 (サプリメント) として社会に供するにあたっては、ヒトにおいて、動脈硬化性疾患に繋がる第一段階である血管内皮機能や、動脈の伸展性に及ぼす有効性を捉えることが極めて重要であるが、十分に臨床検討までなされていないのが現状である。

そこで本研究では、人々の正常な血管機能の維持に資する機能性素材として L-Citrulline を開発することを目的に、動物モデルでの解析に加え、基礎から臨床応用まで一貫した多角的な作用検討を行った。第 1 章では L-Arginine 代謝における L-Citrulline の基礎的解析を行い、生体における L-Arginine 利用能促進作用の側面から L-Citrulline の有用性をひも解いた。第 2 章、第 3 章では、ストレス誘発低体温モデルならびに虚血性脳血管障害モデル動物を用い、L-Citrulline の末梢循環への生理作用や血管内皮障害時の eNOS 発現、NO 産生能に与える影響、さらには虚血により誘発される神経障害や高次脳機能障害の抑制機序の詳細を明らかにした。第 4 章以降では、臨床研究としてヒトを対象に研究を進め、L-Citrulline 摂取後の血漿 L-Arginine と NO レベルの動態を解析し、ヒトでの末梢循環障害に対する改善効果を評価した。さらに、第 5 章、第 6 章では、L-Citrulline が動脈壁硬化に及ぼす臨床的解析、および冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験として血管内皮機能ならびに血管内皮の障害因子の制御を標的とした多角的な研究を行い、L-Citrulline が血管機能に与える作用の全容解明に迫った。

## 第 1 章

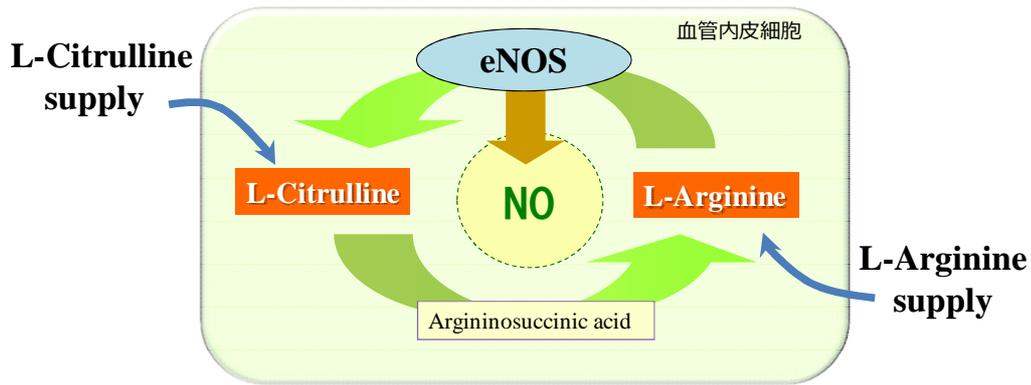
### L-Arginine 代謝における L-Citrulline 投与の基礎的解析

#### 1-1 目的

NO サイクルは血管の研究から明らかにされた。血管内皮では eNOS により L-Arginine と酸素から、NO と L-Citrulline が合成される [7,11]。この時、NO 生成における直接の基質である L-Arginine をいかに効率的に全身循環に供給するかが重要である。

L-Citrulline は生体内で ASS、ASL により代謝され、L-Arginine の前駆体となることが知られている [18,27]。しかし、経口的に L-Arginine と L-Citrulline 投与した後の血中 L-Arginine 代謝動態における差異については十分な検証がなされておらず、NO シグナルの賦活化を狙って研究を進める上で明らかにすべき研究課題と考えた。そこで本検討の第一ステップとして、L-Citrulline 経口投与が L-Arginine 全身循環に与える代謝上の有用性を、血中アミノ酸動態から評価した。さらに、L-Arginine を単独投与した条件と比較し、優位性を考察した。

さらに NO サイクルは L-Arginine と L-Citrulline 間の代謝変換を介するため “L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway” (Fig. 3) とも呼ばれる。L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway は eNOS への局所的な L-Arginine の供給に必須の代謝経路であり、NO 産生の基盤を担う [28]。林らによる先行研究 [29] では、高コレステロール食を与え血管障害を惹起したウサギモデルにおいて、12 週間に渡る L-Arginine と L-Citrulline の長期投与は eNOS のタンパク質発現レベルを改善し、動脈硬化病変の発症を解剖学的側面から著明に抑制したことが見出されている。NO サイクルへの詳細な代謝機序は評価されていないものの、これは血管障害で衰退する NO の生物学的利用能を改善した結果と解釈できる。



**Fig. 3 L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway と本検討のストラテジー**

しかしながら、これら研究は長期的介入から動脈硬化病変の治療を念頭にしたものであり、短期的かつ即効的に L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway を活性化する方法は未知である。よって、効率的に eNOS への L-Arginine 供給量を増大させ、NO 産生系を活性化する方法が見出せれば、サプリメントとしての開発、市場開拓において画期的な提案に繋がることを期待される。そこで本章では L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway の機構に着目し、その代謝構成物質の L-Arginine と L-Citrulline の同時投与により NO-cGMP pathway (Fig. 2) の賦活化がもたらされるとの仮説を立て (Fig. 3)、循環血中 L-Arginine レベルと NO の生物学的利用能、さらには血流に及ぼす影響を短期効果の視点から、包括的に検討した。

## 1-2 実験材料および方法

本実験に係る手順、方法、動物福祉への配慮は協和発酵バイオ (株) 動物実験倫理委員会ならびに名古屋大学動物実験委員会の指針を遵守し行われた。

投与試料は協和発酵バイオ (株) 製の L-Citrulline および L-Arginine のフリー体を用いた。実験動物には 9 週齢 Sprague-Dawley 雄性ラット (日本エスエルシー(株))、および 8 週齢ニュージーランドホワイト雄性ウサギ (北山ラベス(株)) を用いた。飼育期間中、ラットには標準食 (CE-2, 日本クレア(株)) および上水を自由摂取させ、室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル環境下で個別飼育した。ウサギには標準食を 1 日 120 g 与え、上水は自由摂取とし、室温  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間明暗サイクル環境下で個別飼育した。

## ラットへの頸静脈カテーテル留置

ラットには投与前に頸静脈カテーテルの留置を施した。即ち、ペントバルビタール Na により麻酔し (30 mg/kg, i.p.)、体温保持台に連結した顕微鏡下で頸静脈を露出させ、頭側と尾側をクリップで一時的にクランプした。続いて血管を切開しラウンドチップ型シリコンカテーテル (CNC, プライムテック(株)) を挿入し、血管に固定後、血管外のカテーテルを周辺組織に固定して再縫合した。カテーテル留置後は、血液の固化が起きないように 10% ヘパリン生理食塩水でカテーテル内を毎日洗浄しヘパリンロックした。

## L-Citrulline 経口投与後の循環血中アミノ酸レベルの解析

頸静脈カテーテルの留置後、ラットを 3 日間順化させ実験に供した。16 時間の絶食後、ラットを 2 群に分け (N=5)、イオン交換水に溶解した L-Citrulline (2.85 mmol/kg) または L-Arginine (2.85 mmol/kg) をラット用ゾンデを用いて 1 mL/100 g 体重の投与量となるよう単回経口投与した。なお、投与用量は先行研究 [29] および著者らの予備検討により決定した。投与前、および投与 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 時間後に頸静脈カテーテルから約 200  $\mu$ L ずつヘパリン採血チューブ (CJ-HL, テルモ(株)) に採血し、11,000G  $\times$  10 分遠心することで血漿を分取して以後のアミノ酸分析に用いた。

## L-Citrulline と L-Arginine の同時投与が循環血中アミノ酸レベル、および NO-cGMP pathway 賦活化に及ぼす作用解析

頸静脈カテーテル留置後、3 日間順化させたラット、またはウサギを 16 時間の絶食後、実験に供した。ラット (N=5)、またはウサギ (N=3) をそれぞれ 3 群に分け、イオン交換水に溶解した L-Citrulline (2.85 mmol/kg)、L-Arginine (2.85 mmol/kg) または L-Citrulline と L-Arginine の半量組合せ (各々 1.43 mmol/kg) を専用ゾンデを用い、ラットには 1 mL/100 g 体重、ウサギには 0.3 mL/100 g 体重の投与量となるよう単回経口投与した。投与前、および投与 0.5, 1, 2, 4 時間後にラットは頸静脈カテーテルから約 200  $\mu$ L ずつヘパリン採血チューブ (CJ-HL, テルモ(株)) に、ウサギは耳介静脈から約 400  $\mu$ L ずつヘパリン採血チューブ (CJ-HL, テルモ(株)) および EDTA-2Na 採血チューブ (CJ-NA, テルモ(株)) に採血し、11,000G  $\times$  10 分遠心することで血漿を分取して以後のアミノ酸、NO<sub>x</sub> (nitrite: NO<sup>2-</sup> + nitrate: NO<sup>3-</sup>)、cGMP の分析に用いた。また、NO-cGMP pathway の活性化を生理作用として捉えるため、ウサギにおいて投与 40 分後の耳介中心動脈の血流を評価した。

## 血漿アミノ酸、NO<sub>x</sub>、cGMP レベルの測定

アミノ酸分析には上述の手順で得たヘパリン血漿を用い、既報 [27] に準拠して行った。即ち、血漿に等量の 3% (w/v) スルホサリチル酸 (Wako chemicals) 水溶液を添加し混和後、氷上に 1 時間静置した。続いて 11,000G×15 分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、全自動アミノ酸アナライザー (JLC-500/V, JEOL) を用いて分析した。

NO<sub>x</sub> 分析には上述の手順で得た EDTA 血漿を用い、既報 [30] に準拠して行った。即ち、血漿に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に 15 分間静置した。続いて 11,000G×15 分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、酸化窒素 (NO<sub>x</sub>) 分析システム (ENO-10, Eicom) を用いて分析した。

cGMP 分析には上述の手順で得た EDTA 血漿を用い、既報[31]に準拠し酵素免疫法により行った。測定キットには cGMP Enzyme immunoassay System (RPN226, Amersham) を用い、付属のプロトコール指示書に従って測定した。

## ウサギ耳介中心動脈の血流動態の測定

上述の通り、ウサギにおいて投与 40 分後の耳介中心動脈の血流量を評価した。ウサギを無麻酔の状態ですずかに円筒型固定器に格納し、右側耳介外反面を露出させ安静にさせた。続いて、右側耳介中心動脈基部から 3 cm の位置と先端の 2 ヶ所に血流測定用プローブセットし、それぞれ血流量を測定して平均した。血流量の測定システムにはレーザードップラー血流イメージング装置 (LDPI: Laser Doppler Perfusion Imager PIMII, PERIMED AB, Linköping, Sweden) を用い、プローブから血管に照射したレーザー光の反射光を基に血流量を記録した。また同様に、イオン交換水のみを同量投与したウサギ (N=3) の耳介中心動脈の血流量を測定し、対照値とした。

## 統計解析

結果は平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。独立 2 群間データの有意差は、unpaired *t*-test を用いて検定した。多群間の平均値の比較には Non-Repeated Analysis of Variance (ANOVA) で比較した後、Bonferroni correction for multiple tests または Scheffe's test for multiple comparisons を用いて投与群間の有意差を求めた。有意水準は危険率 5 % 未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

### 1-3 実験結果および図表

#### L-Citrulline または L-Arginine 単回経口投与後のラット循環血漿中アミノ酸濃度の経時変化 (Fig. 4)

ラットに L-Citrulline または L-Arginine を単回経口投与した後、経時的に頸静脈に留置したカテーテルから採血を行い、アミノ酸アナライザーを用い血漿アミノ酸濃度の変動を定量解析した。血漿 L-Citrulline 濃度の経時変化 (Fig. 4 (A)) について、投与前の血漿 L-Citrulline 濃度の初期値は 50 ~ 90  $\mu\text{mol/L}$  の範囲であったのに対し、L-Citrulline 投与 0.5 時間後に  $T_{\text{max}}$  (Time to reach the peak concentration: 最高血中濃度到達時間) を示し、約 1,200  $\mu\text{mol/L}$  まで上昇が認められ、投与 4 時間後まで初期値と比べ有意に高値であった。一方、L-Arginine 投与は血漿 L-Citrulline 濃度に影響を与えなかった。

Fig. 4 (B) に示すように、ラットに L-Citrulline または L-Arginine を単回経口投与した後の血漿 L-Arginine 濃度は両群とも著しく増加した。L-Arginine 投与群では、投与 2 時間までに  $T_{\text{max}}$  を迎えるのに対し、L-Citrulline 投与群では投与後 4 時間以降に血漿 L-Arginine 濃度のピークを示し、その後、持続的に L-Arginine レベルを上昇させる作用が明らかとなった。この時の  $\text{AUC}_{0-12}$  (areas under the plasma concentration-time curve) を解析すると、L-Arginine 投与群と比較し、L-Citrulline 投与群は約 1.6 倍高値であり、有意な増大であった (Fig. 4 (C))。

#### L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与が循環血中 L-Arginine レベルに及ぼす影響 (Fig. 5)

L-Citrulline、L-Arginine または L-Citrulline と L-Arginine の半分用量の組合せをウサギおよびラットに単回経口投与後、投与前から 4 時間後までウサギは耳介静脈から、ラットは頸静脈カテーテルから連続的に採血し、循環血中 L-Arginine 濃度を測定した。

L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与が循環血中アミノ酸レベルに及ぼす影響を解析すると、興味深いことに、これら半量同時投与は、各単独投与群と比べ、投与後 1 時間以内の短期に血漿 L-Arginine レベルを速やかに増大させることを見出した。この特徴的な短期動態は、ウサギ (Fig. 5 (A)) およびラット (Fig. 5 (B)) の両方で観察された。

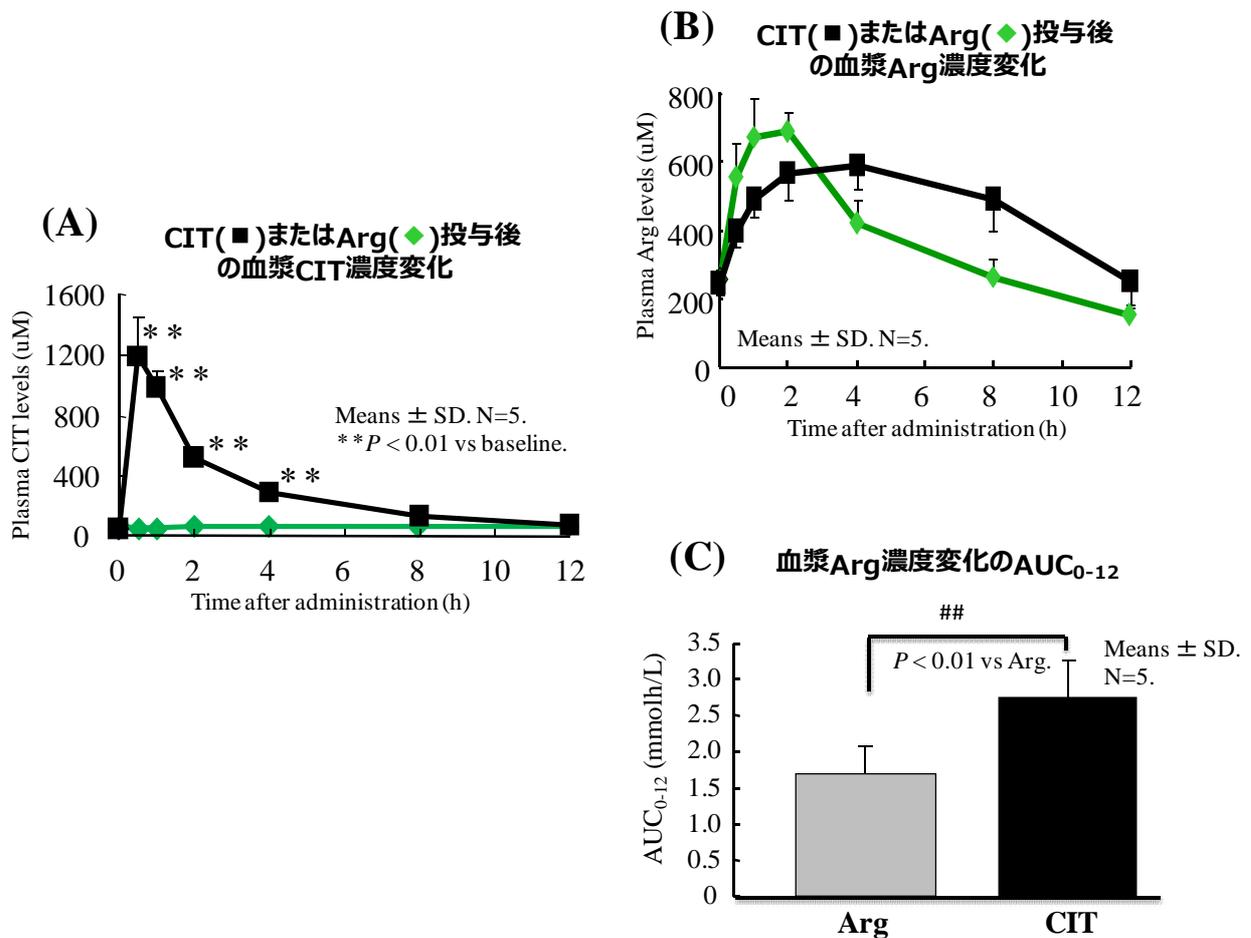
#### L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与が循環血中 NOx および cGMP レベルに及ぼす影響 (Fig. 6)

L-Citrulline、L-Arginine または L-Citrulline と L-Arginine の半分用量の組合せをウサギに単回経口投与後、投与前から 4 時間後まで連続的に耳介静脈から採血し、循環血中 NO<sub>x</sub>、cGMP レベルの経時変化を定量した。これにより、速効的な血漿 L-Arginine レベルの増大について、ウサギをモデルに NO-cGMP 系への影響を評価した (Fig. 6)。

L-Citrulline または L-Arginine 単独投与群では、血漿 NO<sub>x</sub> 濃度が初期値の約 40 μmol/L から 2 倍程度上昇したのに対し、L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与により、各単独群と比較し、さらに有意な血漿 NO<sub>x</sub> 濃度の増加が認められた (Fig. 6 (A))。血漿 cGMP 濃度の経時変化 (Fig. 6 (B)) においても、L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与は、投与後 1 時間以内の短期に cGMP レベルを速やかに増大させる傾向が認められた。一方、L-Citrulline 群においては、L-Arginine 群と比べ、投与 2 時間後に血漿 cGMP レベルが顕著に増大し、L-Arginine 投与との差異が示唆された。

### **L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与によるウサギ耳介中心動脈における血流量の変化 (Fig. 7)**

さらに、L-Citrulline、L-Arginine または L-Citrulline と L-Arginine の半分用量の組合せをウサギに単回経口投与し、血漿 L-Arginine 濃度および NO<sub>x</sub> レベルの最大血中濃度付近と推定された投与 40 分後において、レーザードップラー血流イメージング装置を用いて耳介中心動脈の血流量を評価した。Control 群と比較し、L-Citrulline または L-Arginine 投与群は血流量の上昇傾向を示したが、投与 40 分後においては有意な変化ではなかった。それに対し、L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与は、NO-cGMP pathway の変化を反映し、Control 群と比較し血流量が有意に増加した (Fig. 7)。



**Fig. 4** L-Citrulline または L-Arginine を単回経口投与後のラット循環血漿中アミノ酸濃度の経時変化

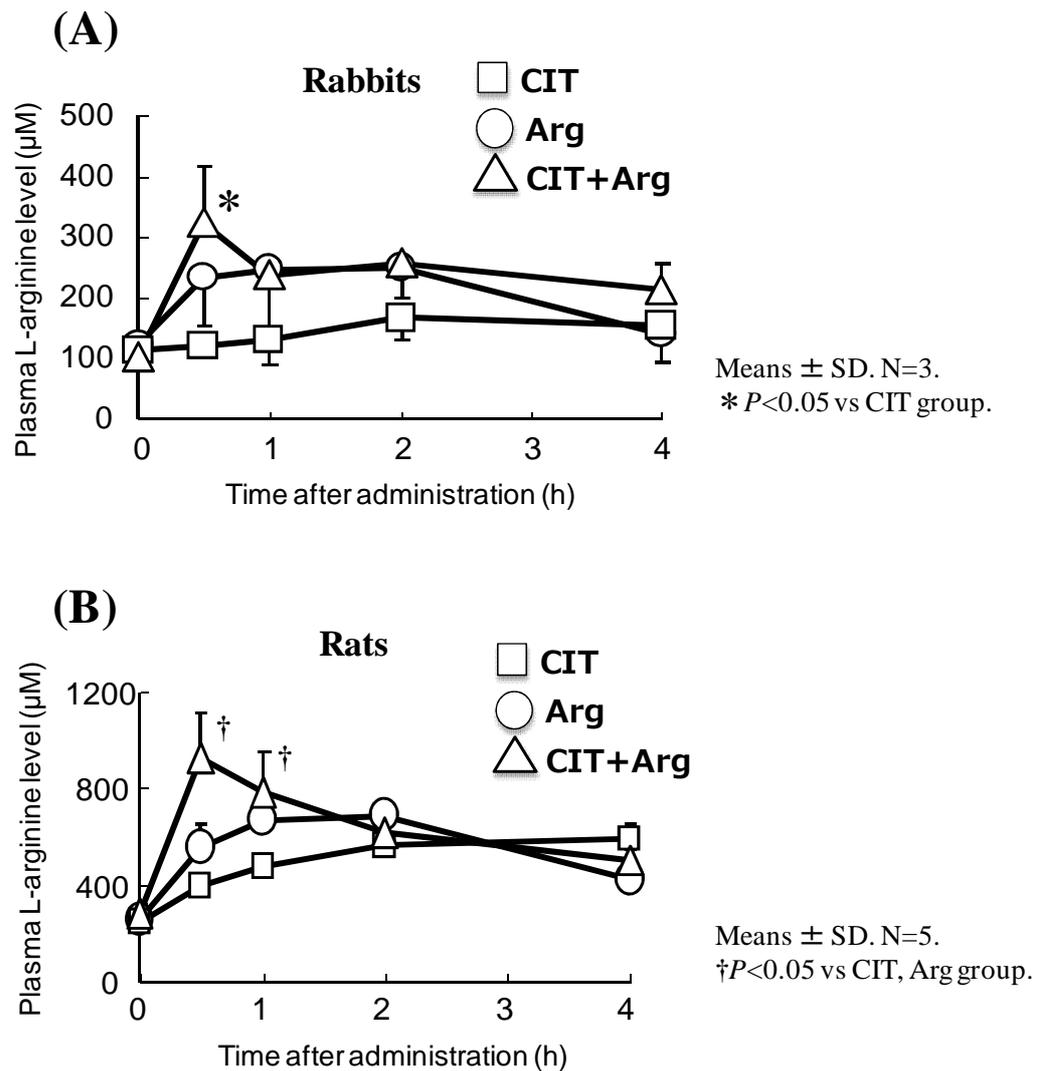
L-Citrulline (2.85 mmol/kg) または L-Arginine (2.85 mmol/kg) を単回経口投与後、頸静脈に留置したカテーテルから投与前、および投与0.5, 1, 2, 4, 8, 12 時間後に経時的に採血し、循環血中 L-Citrulline および L-Arginine 濃度変化を解析した。

(A) CIT (■) または Arg (◆) 投与後の血漿 CIT 濃度変化 : \*\*P < 0.01 vs baseline (0h).

(B) CIT (■) または Arg (◆) 投与後の血漿 Arg 濃度変化

(C) 血漿 Arg 濃度変化の AUC<sub>0-12</sub> : ## P < 0.01 vs Arg group.

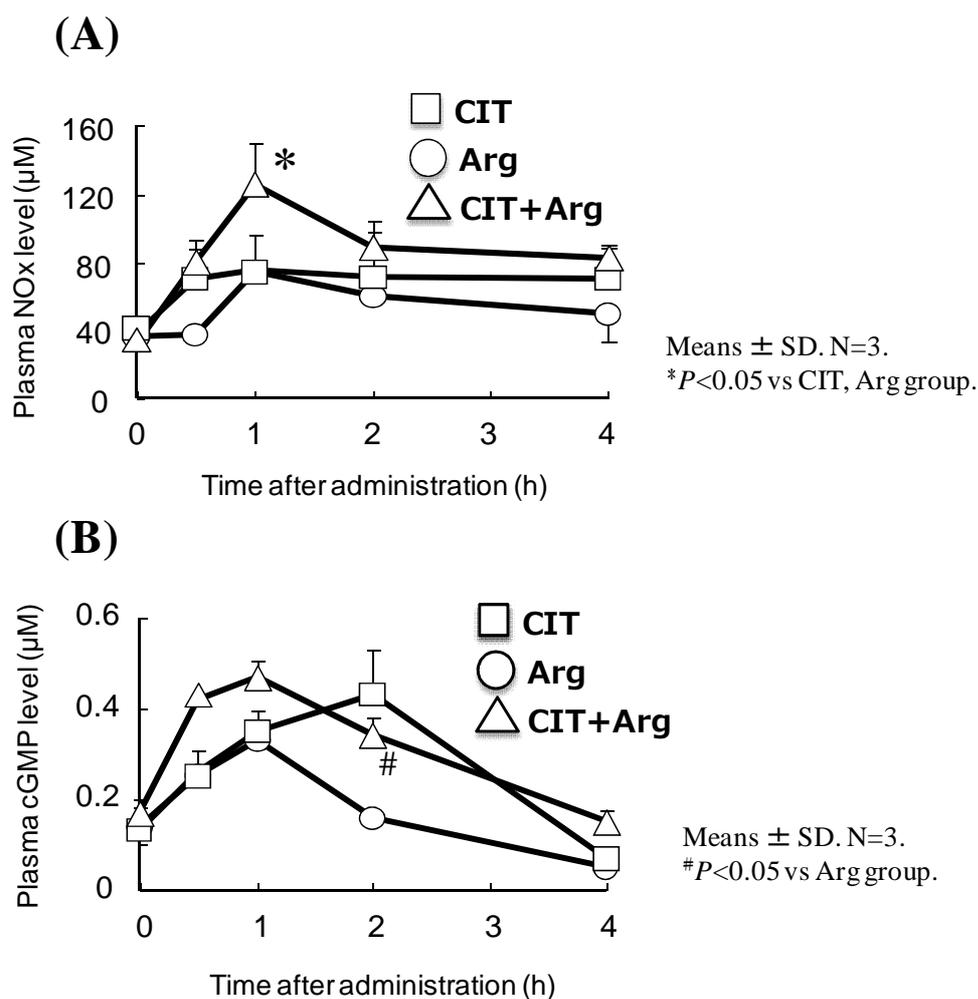
各値は Means ± SD を表す (N=5)。CIT : L-Citrulline, Arg : L-Arginine, AUC : areas under the plasma concentration-time curve.



**Fig. 5** L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与が循環血中 L-Arginine レベルに及ぼす影響

L-Citrulline (2.85 mmol/kg)、L-Arginine (2.85 mmol/kg) または L-Citrulline と L-Arginine の半量組合せ (各々 1.43 mmol/kg) をウサギ (A) およびラット (B) に単回経口投与した。投与前、および投与 0.5, 1, 2, 4 時間後にウサギは耳介静脈から、ラットは頸静脈カテーテルから採血し、循環血中 L-Arginine 濃度変化を解析した。

各値は Means  $\pm$  SD を表す (ウサギ: N=3, ラット: N=5)。\*  $P < 0.05$  vs CIT group. †  $P < 0.05$  vs Arg, CIT group. CIT : L-Citrulline, Arg : L-Arginine.



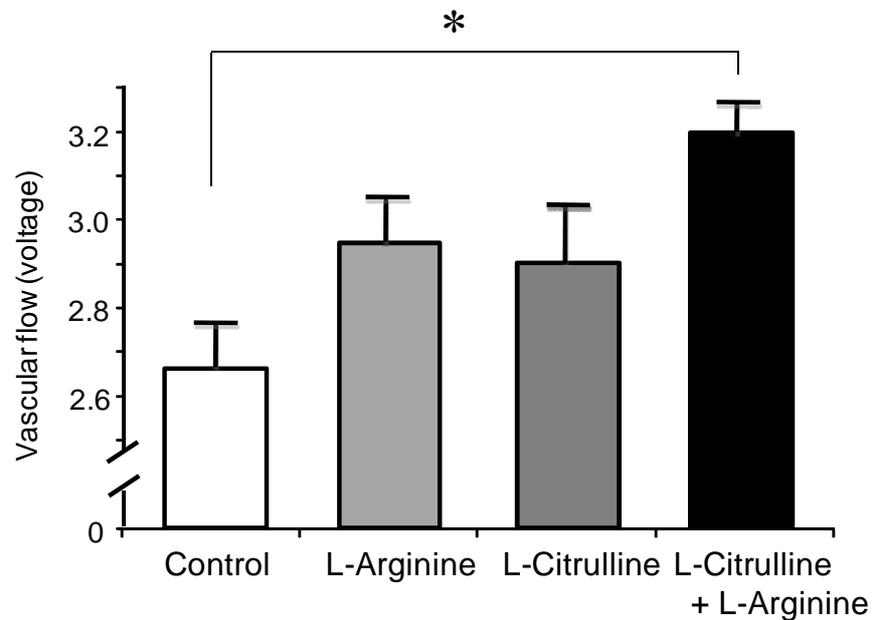
**Fig. 6 L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与が循環血中 NOx および cGMP レベルに及ぼす影響**

L-Citrulline (2.85 mmol/kg)、L-Arginine (2.85 mmol/kg) または L-Citrulline と L-Arginine の半量組合せ (各々 1.43 mmol/kg) をウサギに単回経口投与した後、投与前、および投与 0.5, 1, 2, 4 時間後に耳介静脈から採血し、循環血中 NOx、cGMP レベルの経時変化を解析した。

(A) 血漿 NOx レベルの経時変化：\* $P < 0.05$  vs CIT, Arg group.

(B) 血漿 cGMP レベルの経時変化：# $P < 0.05$  vs Arg group.

各値は Means ± SD を表す (N=3)。CIT : L-Citrulline, Arg : L-Arginine, NOx : nitrite:  $\text{NO}^{2-}$  + nitrate:  $\text{NO}^{3-}$ .

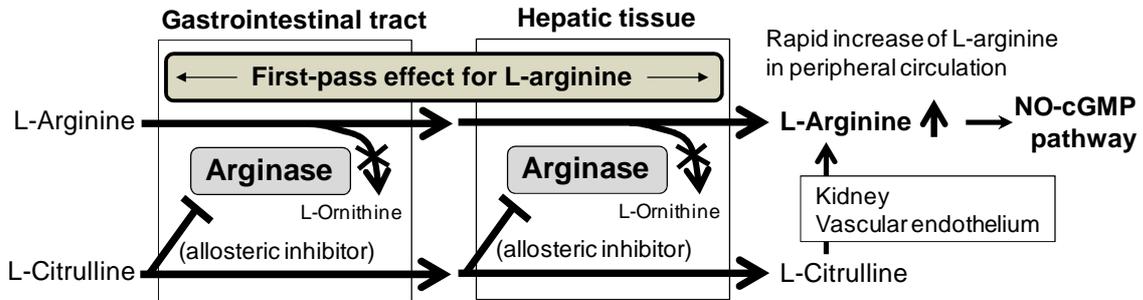


Means  $\pm$  SD. N=3.  
 \*  $P < 0.05$  vs Control.

**Fig. 7 L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与によるウサギ耳介中心動脈における血流量の変化**

L-Citrulline (2.85 mmol/kg)、L-Arginine (2.85 mmol/kg) または L-Citrulline と L-Arginine の半量組合せ (各々1.43 mmol/kg) をウサギに単回経口投与した。投与 40 分後にレーザードップラー血流イメージング装置を用いて耳介中心動脈の血流量を評価した。なお、イオン交換水のみを同量投与したラットの耳介中心動脈の血流量を測定し、対照値 (Control) とした。

各値は Means  $\pm$  SD を表す (N=3)。\*  $P < 0.05$  vs Control group.



**Fig. 8** L-Citrulline と L-Arginine の半量同時投与による即効的な L-Arginine レベルの上昇、および NO-cGMP pathway 活性化における想定メカニズム

L-Citrulline はアロステリックインヒビターとして Arginase の活性を抑制する。L-Arginine 自体は腸管や肝臓での Arginase により強力な代謝分解を受けるが、L-Citrulline が腸管、肝臓の初回通過の段階で共存することで、Arginase による L-Arginine の代謝を抑え、末梢循環への L-Arginine 移行レベルを上昇させた可能性が示唆される。L-Citrulline 由来の L-Arginine レベルの上昇も相まって、末梢血管組織での L-Arginine 生体利用能が増加し、NO 産生促進に続いて cGMP レベルの上昇に寄与した機構が推定される。

#### 1-4 考察とまとめ

本章では経口的に L-Citrulline または L-Arginine を摂取した際の L-Arginine 全身循環に及ぼす影響を血中動態から解析した。L-Arginine 投与は、投与 2 時間までの時間帯において一過的に血漿 L-Arginine 濃度を上昇させたが、その後血中レベルは低下に転じた。興味深いことに、L-Citrulline 投与では L-Arginine 群と比べ、持続的に循環血中 L-Arginine 濃度を高め、投与 12 時間後まで高値を維持した。この両者の代謝差異の機序に関しては、摂取した L-Arginine は約 40% が腸管で、残りが肝臓で Arginase により迅速に代謝されるが [17,32]、L-Citrulline は吸収から体循環に入る過程で他のアミノ酸へ代謝される絶対量が少なく、大部分が末梢循環へ移行可能なためと考えられる。L-Citrulline の代謝特性については、腎臓において ASL、ASS の働きにより L-Arginine へと変換されるため [18]、L-Citrulline 摂取後、末梢循環中で上昇した L-Citrulline が腎臓において効率的に L-Arginine へと代謝変換され、循環血液中へ移行したものと推察された。

Wijnands ら [21] によると、エンドトキシンで組織の炎症を惹起したマウスにおいても、L-Citrulline 投与は L-Arginine 投与と比較し、空腸中の L-Arginine 濃度を上昇させ、NO の生理作用を反映する組織の微小循環レベルを著明に改善したことが報告されている。即ち、これまでの研究により、NO 産生を促し血管組織の柔軟性を改善する目的で L-Arginine の介入が行われていたが、当実験により、全身への L-Arginine 供給源としては、L-Arginine そのものよりも L-Citrulline を摂取した方が効率的に L-Arginine の生物学的利用能を促進できる可能性が示され、L-Arginine 前駆体としての L-Citrulline の有益性が見出された。このことは、AUC<sub>0-12</sub> の解析値において L-Citrulline 群は L-Arginine 群よりも有意に高値であったことから裏付けされた。

さらに本章では、NO 産生の基盤を担う L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway に着目し、その構成代謝中間体である L-Citrulline、L-Arginine の同時投与により NO サイクルが活性化し得るかを実験的に検討した。その結果、L-Citrulline、L-Arginine の半量併用投与は各単独群と比べ、相乗的に、投与 1 時間以内の短期に血漿 L-Arginine レベルを速やかに増大させるという T<sub>max</sub> の短縮が認められ、その下流にある NO-cGMP pathway を亢進する可能性が見出された。この時、L-Citrulline、L-Arginine の半用量併用投与により血漿 NO<sub>x</sub> レベルは投与 1 時間後にピークに達したが、血漿 cGMP レベルは投与 30 分後から著明に上昇した。ここで NO について、実験的に検出しているのは、nitrite: NO<sup>2-</sup> + nitrate: NO<sup>3-</sup> の NO 代謝物であるため、生物活性を有するガス状物質としての NO はリアルタイムで検出できておらず、この点で時間差が生

じた可能性が推察された。

In vitro および in vivo 先行研究において、L-Citrulline はアロステリックな阻害作用を有し Arginase の活性を抑制すること [33]、ならびに I 型糖尿病モデル動物において Arginase の抑制を介し、NO 産生を賦活化することで降圧作用を示すことが最近報告された [34]。このことは通常、摂取した L-Arginine 自体は腸管や肝臓での Arginase による強力な代謝分解を受けるが [17,32]、L-Citrulline が腸管、肝臓での吸収後の代謝段階で共存することで、Arginase による L-Arginine の代謝を抑え、末梢循環への L-Arginine 移行レベルを上昇させた可能性が示唆される。結果として、L-Citrulline 由来の L-Arginine レベルの上昇も相まって、血管組織での L-Arginine 生体利用能が増加し、NO 産生促進に続いて cGMP レベルの上昇に繋がった機構が考えられる (Fig. 8)。

さらに、L-Citrulline は主に腎臓で代謝され L-Arginine の前駆体となるが、末梢血管組織において中性アミノ酸輸送体である system N transporter 1 (SN1) [35] により直接内皮細胞に取り込まれる経路も存在することから、L-Citrulline と L-Arginine が同時に「L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway」に流入し構成基質が供給されることで、NO サイクル活性化に寄与したことも示唆された。事実、当実験結果より L-Citrulline、L-Arginine の同時投与によってウサギ耳介動脈血流が促進された。血中代謝物レベルのみでなく、生理機能として優位性を実証できた点は意義深い新規知見と考えられる。

以上、本章の検討において、L-Citrulline 投与は L-Arginine 投与と比べ、L-Arginine の生物学的利用能を持続的に向上すること、および L-Citrulline と L-Arginine 併用投与は投与後 1 時間以内の短期動態において、相乗的に循環血中 L-Arginine 濃度を高め、NO-cGMP pathway を亢進することが示され、L-Citrulline が有する L-Arginine 全身循環における代謝上の有用性を明らかにした。

## 第 2 章

### ストレス誘発末梢循環低下モデルの構築および L-Citrulline による

#### 体温調節作用の検討

##### 2-1 目的

末梢毛細血管は、身体の血管網の約 90 % を占め、血液循環を介した生体の機能維持に重要な役割を担っている。末梢への血液が滞る末梢循環障害の代表には、糖尿病、脳血管障害、動脈硬化など、血管の器質的変化を伴い医学的な治療の対象になるものもあるが、基礎疾患を伴わず、さまざまな要因により血流が障害される愁訴も指摘されている [36]。これらには下肢のむくみ、のぼせ症状等が挙げられるが、特に身体末端の冷えは頻度が高く、現代社会においては男女ともに経験する不定愁訴である。

基礎疾患を伴わない末梢循環不全においては、肉体的および精神的ストレスに起因する自律神経の不調が背景因子であることが多数報告され、交感神経系の緊張亢進により末梢の血管が収縮し、血液循環が滞った状態と考えられている [37]。その結果、血行障害を起こし冷え症が惹起され得る。このため、血流改善作用を有するサプリメントを用い、体温調節作用を標的とした臨床研究も近年、盛んに行われている [38]。

このように、末端の冷えの原因の 1 つに、身体ストレスによる慢性的な末梢血流循環の悪化が提唱されるが、身体ストレスに起因する血行障害と末梢皮膚温の変動については十分なデータが得られていない。そこで本章では、ストレス誘発性末梢循環低下モデルを構築し、ストレスによる末梢毛細血管の収縮を皮膚温として検知するとともに、これまで冷えに対する明確な効果が解明されていない NO の寄与を調べた。さらに、NO 産生促進に基づく循環改善を作用メカニズムの標的とし、L-Citrulline 投与が“ストレス誘発性冷え症”の症状改善に与える生理的影響を評価した。

##### 2-2 実験材料および方法

本実験に係る手順、方法、動物福祉への配慮は協和発酵バイオ (株) 動物実験倫理委員会ならびに北里大学動物実験委員会の指針を遵守し行われた。

実験動物には 5 週齢 ddY 雄性マウス (日本エスエルシー(株)) を用いた。順化期間

中、マウスに標準食 (CE-2, 日本クレア(株)) および上水を自由摂取させ、室温  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル環境下で飼育した。

### ワイヤレス温度センサーの埋め込みによる深部体温、および末梢体温の計測

3 日間馴化飼育したマウスに、深部体温を経時的に測定するためワイヤレスセンサー (Electronic ID Transponder and DAS-5001 handheld Reader Systems; Bio Medic Data Systems, Inc., Seaford DE, USA) の埋め込みを行った。ペントバルビタール Na により麻酔後 (50 mg/kg, i.p.)、腹膜を正中切開してセンサーを挿入し、縫合と同時に腹膜下にセンサーを固定した。施術後、最低 3 日間の回復期間を与えた。

末梢体温の計測にはデジタルサーモグラフィカメラ (MobIR M3; IRSYSTEM CO., LTD, Tokyo, Japan) を用い、マウス尾根部温度を計測した。撮影画像はソフトウェア (Launch Guide Ir Analyser) により解析した。

### ストレス誘発性冷え評価系の確立

ワイヤレスセンサー埋め込み後、3 日間回復させたマウスに 18 時間の絶食ストレスを与えた。深部体温および末梢体温を測定後、個別拘束ケージ ((株)夏目製作所) に入れ首より下部に水浸ストレス ( $1$  時間,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) を負荷し、続いて強制水泳 ( $15$  分,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) により低温負荷した。強制水泳はあらかじめ透明の円筒型ケージ (高さ  $22 \times$  直径  $25$  cm) に  $5$  L の水道水を張り、水温を一定に管理した条件で実施した。低温負荷後、直ちにマウスの体表面の水分を拭き取り、深部体温および末梢体温を  $90$  分間計測した。さらに拘束水浸ストレス有無の条件で、体温に与える影響を検討した。

### ストレス誘発性冷えからの回復における NO の作用の薬理的解析

上述の方法に準じ、ストレス誘発性冷えの惹起手順においてマウスを 4 群に分け ( $N=5\sim 6$ )、強制水泳負荷の 1 時間前に、非選択的 NOS 阻害剤である NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME, Wako chemicals) を  $0, 50, 100, 200$  mg/kg で投与 (i.p.) した。なお、本検討は冷えからの回復における NO の作用を実証する目的であり、L-NAME の投与用量を複数設定したことから、実験上の投与スケジュールを考慮し拘束水浸負荷なしの条件で評価した。L-NAME 投与前、強制水泳直前および直後から  $90$  分間、同様に深部体温の変化を計測し、体温回復期における NO の寄与を検証した。

## L-Citrulline による体温調節作用の検討

投与試料には協和発酵バイオ (株) 製の L-Citrulline を用い、標準粉末食 (CE-2, 日本クレア(株)) に 1% (w/w) で L-Citrulline を混合後、ペレット状に調製した特殊配合食を準備した。コントロール食にはコーンスターチ 1% (w/w) を同様に配合した。

あらかじめワイヤレス温度センサーを施術によって固定したマウスを 2 群に分け (N=12)、L-Citrulline 1% (w/w) 混餌食、またはコントロール食を 20 日間自由摂取させた。投与 20 日にこれまでと同様の条件により、絶食ストレス、拘束水浸ストレスを負荷し、強制水泳を行って低温負荷した後、深部体温および末梢体温の変化を 90 分間計測した。この際、強制水泳後に自発運動量には差がないことを自発運動測定装置 passive infrared sensor detection system (SUPERMEX CompACT AMS; Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) により確認した。

また、L-Citrulline 投与による血漿アミノ酸濃度、ならびに強制水泳ストレス負荷後の NO レベルの動態を評価するため、同様の実験を 1 回繰り返した (N=6~8)。即ち、強制水泳前および強制水泳 0, 15, 30, 60 分後に腹下大静脈から EDTA-2Na 採血チューブ (CJ-NA, テルモ(株)) に採血し、12,000G×15 分遠心することで血漿を分取し以後のアミノ酸、NO<sub>x</sub> の分析に供した。この際、18 時間の絶食、非絶食条件において血液をサンプリングした。

## 血漿アミノ酸、NO<sub>x</sub> レベルの測定

アミノ酸分析には上述の手順で得た EDTA 血漿を用い、既報 [27] に準拠して行った。即ち、血漿に等量の 3% (w/v) スルホサリチル酸 (Wako chemicals) 水溶液を添加し混和後、氷上に 1 時間静置した。続いて 11,000G×15 分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、全自動アミノ酸アナライザー (JLC-500/V, JEOL) を用いて分析した。

NO<sub>x</sub> 分析には上述の手順で得た EDTA 血漿を用い、既報 [30] に準拠して行った。即ち、血漿に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に 15 分間静置した。続いて 11,000G×10 分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、酸化窒素 (NO<sub>x</sub>) 分析システム (ENO-20, Eicom) を用いて分析した。

## 統計解析

結果は平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。独立 2 群間データの有意差は、unpaired *t*-test を用いて検定した。多群間の平均値の比較には Non-Repeated Analysis of Variance (ANOVA) で比較した後、Bonferroni correction for multiple tests または Scheffe's test for

multiple comparisons により投与群間の有意差を検定した。有意水準は危険率 5 % 未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

### 2-3 実験結果および図表

#### 絶食・拘束水浸ストレス負荷および強制水泳による低温負荷後の体温変化 (Fig. 9)

ストレス誘発性末梢循環低下モデルを構築するため、18 時間の絶食、拘束水浸ストレス (1 時間,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) に続き、強制水泳 (15 分,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) により低温負荷した後の体温の時間変化を Fig. 9 (A, B) に示した。深部体温において、拘束水浸前の約  $35^\circ\text{C}$  から、強制水泳により劇的に体温が低下したが、特に拘束水浸ありの条件では約  $24^\circ\text{C}$  程度まで低下し、60 分かけて通常の体温まで回復した。一方、拘束水浸なしの条件においては、強制水泳により体温の低下は認められるものの、約 30 分で正常値まで回復し両者の差異は有意であった。末梢体温においても強制水泳により著明に体温が低下したが、拘束水浸ありの条件の方が拘束水浸なしの条件に比べ、体温の回復は有意に遅延し、ストレス負荷による末梢循環の低下が示唆された。よって、これをストレス誘発性末梢循環低下による冷えモデルとし、L-Citrulline の評価は拘束水浸ありの条件で進めることとした。

#### ストレス誘発性冷えモデルの体温回復期における NOS 阻害剤の影響 (Fig. 10)

ストレス誘発性冷えからの回復期における NO の関与を検討するため、強制水泳負荷の 1 時間前に、非選択的 NOS 阻害剤である L-NAME を投与 (i.p.) し、NO が体温回復に及ぼす作用を調べた。なお、本検討は冷えからの回復における NO の作用を実証する目的であり、L-NAME の投与用量を複数設定したことから、実験上の投与スケジュールを考慮し拘束水浸負荷なしの条件で評価した。強制水泳後、Control 群では徐々に深部体温が上昇に転じるのに対し、L-NAME 投与下で体温の回復は有意に抑制された (Fig. 10)。特に強制水泳 45 分後までの体温回復期において L-NAME による阻害効果は顕著であり、ストレス誘発性冷えモデルの体温上昇における NO の重要性が示された。

#### ストレス誘発性冷えモデルにおける L-Citrulline 投与後の深部体温、末梢体温および血漿 NO 濃度の変化 (Fig. 11)

続いて、L-Citrulline 投与が“ストレス誘発性冷え症”の症状改善に与える影響を評価した。L-Citrulline 1% (w/w) 混餌食、またはコントロール食を 20 日間自由摂取させ

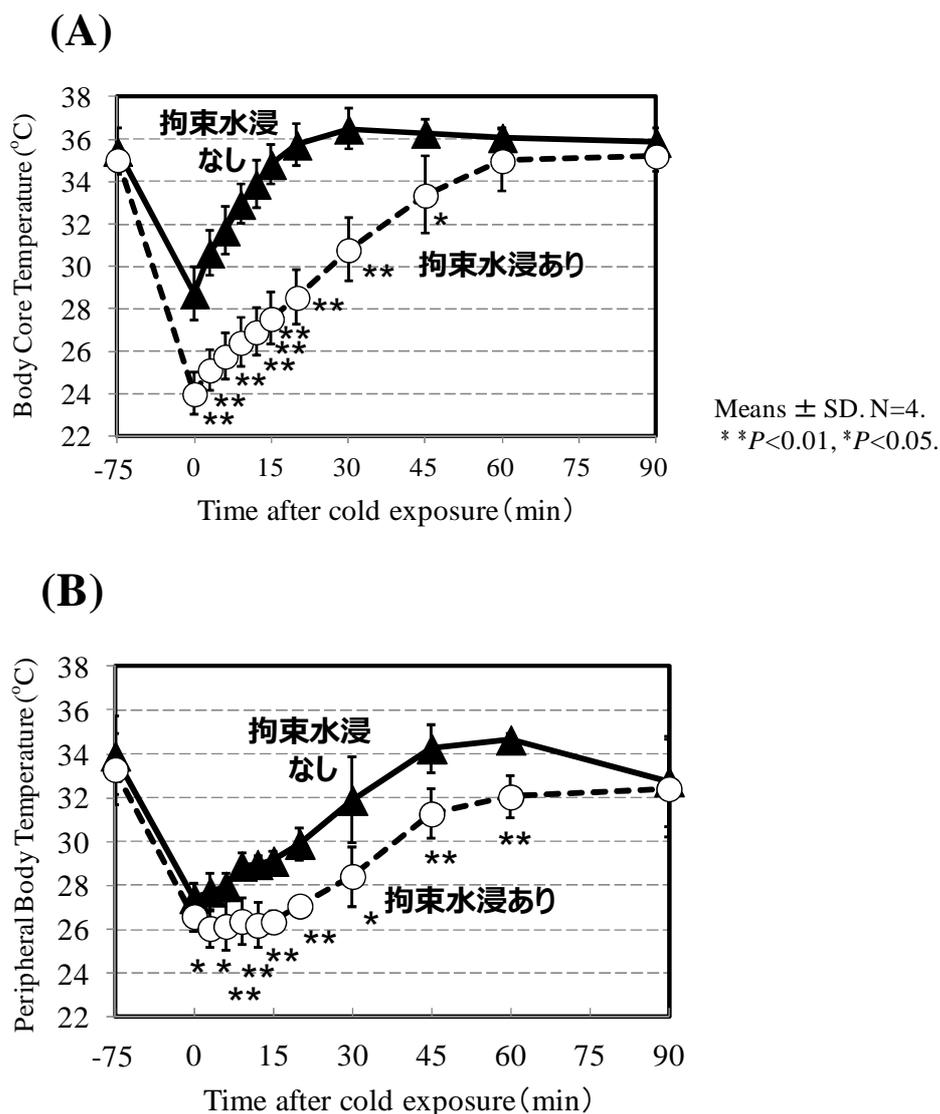
た後、18時間の絶食ストレス、拘束水浸ストレス (1時間,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) に続き、強制水泳 (15分,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) により低温負荷した。強制水泳による低温負荷後の体温変化は、Control群に対しL-Citrulline群で有意に速く、特に深部体温においてL-Citrulline群では強制水泳後60分まで有意な体温の上昇が観察された (Fig. 11 (A))。さらに、L-Citrulline投与後の体温回復期において経時的に採血し血漿NOの動態を解析すると、Control群と比較しL-Citrulline群において、強制水泳による低温負荷後60分までのNOx濃度が高値であった (Fig. 11 (B))。

### **L-Citrulline投与後の体重、摂餌量、血漿アミノ酸濃度、自発運動量への影響**

#### **(Table. 1)**

また、L-Citrulline投与後の強制水泳直前の血漿アミノ酸濃度、ならびに強制水泳後の体温回復期における自発運動量をControl群と比較した。

L-Citrulline投与後の体重、摂餌量、自発運動量はControl群と差がなかったが、血漿L-Citrullineレベルは顕著に増加し、特に非絶食状態においてはControl群と比較し血漿L-Arginine、L-Citrullineレベルともに有意な上昇であった (Table. 1)。



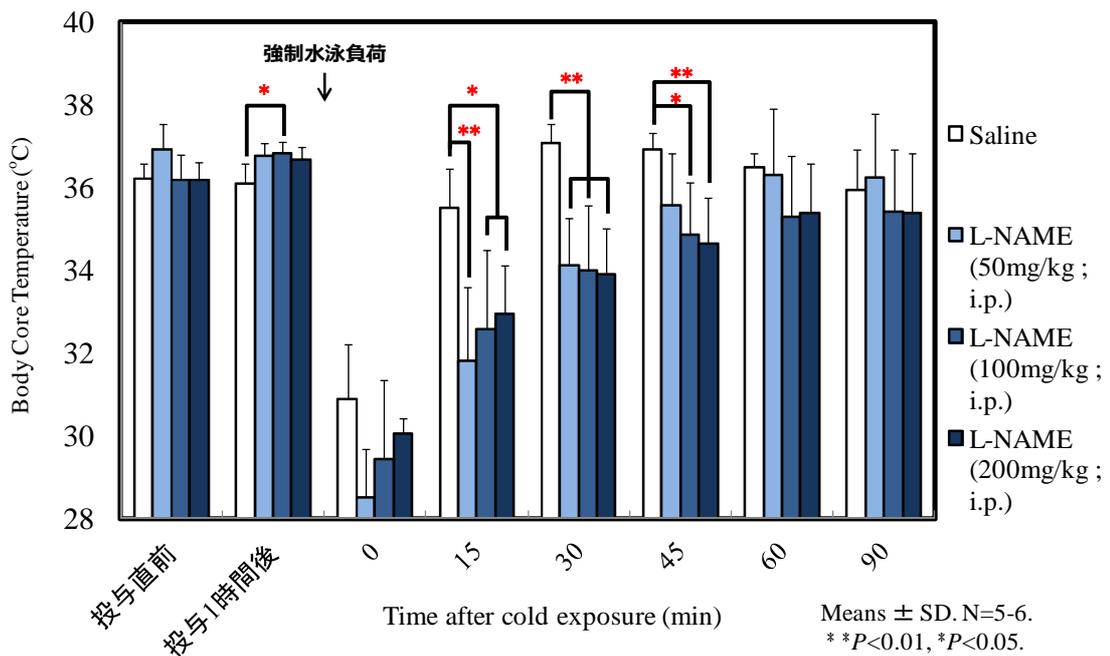
**Fig. 9** 絶食・拘束水浸ストレス負荷および強制水泳による低温負荷後の体温変化

マウスに 18 時間の絶食ストレス後、深部体温および末梢体温の初期値を計測した。続いて、拘束水浸ストレス (1 時間,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) を負荷し、強制水泳 (15 分,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) により低温負荷した。低温負荷後、直ちにマウスの体表面の水分を拭き取り、深部体温および末梢体温を 90 分間計測した。

(A) 拘束水浸なし (▲) またはあり (○) の条件における深部体温の変化

(B) 拘束水浸なし (▲) またはあり (○) の条件における末梢体温の変化

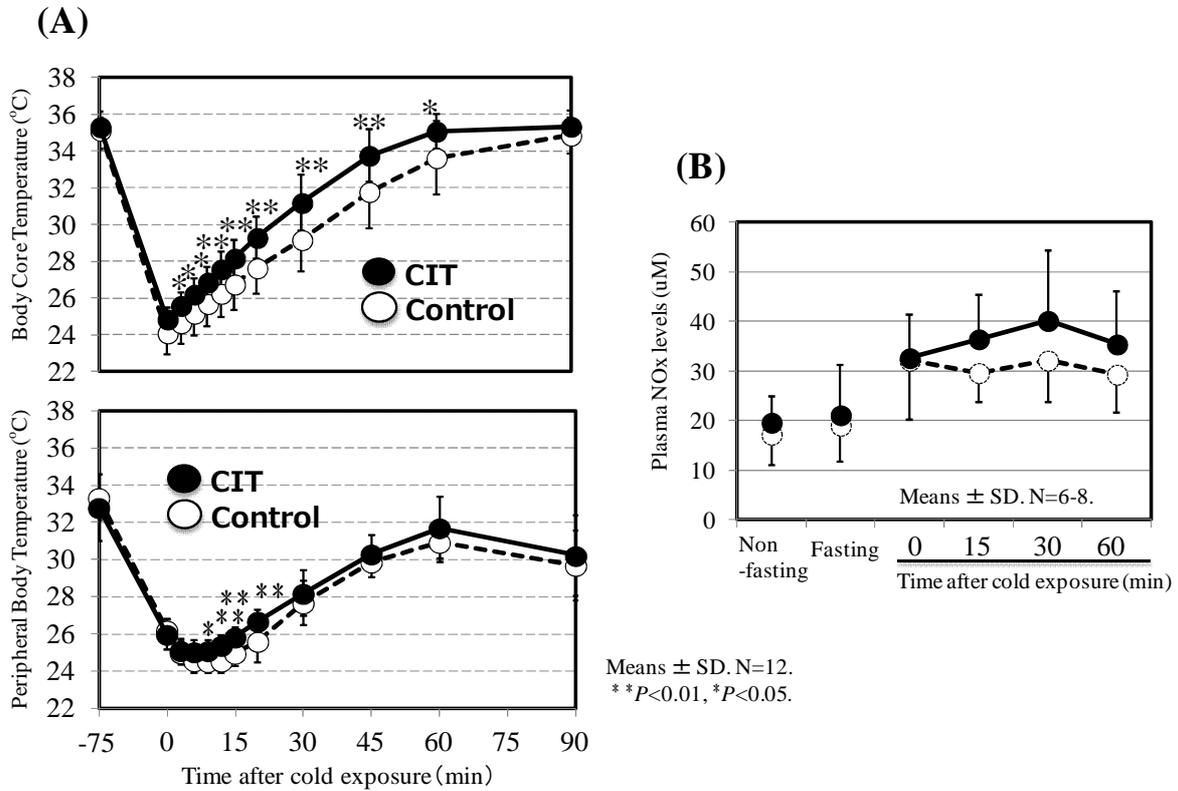
各値は Means  $\pm$  SD を表す (N=4)。\*\* $P$ <0.01, \* $P$ <0.05 vs 拘束水浸なし条件。



**Fig. 10** ストレス誘発性冷えモデルの体温回復期における NOS 阻害剤の影響

ストレス誘発性冷えモデルマウスを 4 群に分け、強制水泳負荷の 1 時間前に、非選択的 NOS 阻害剤である NG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) を 0, 50, 100, 200 mg/kg で投与 (i.p.) した。L-NAME 投与前、投与 1 時間後および強制水泳直後から 90 分間、深部体温の変化を計測した。本検討は拘束水浸負荷なしの条件で評価した。

各値は Means±SD を表す (N=5-6)。\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs Saline-control.



**Fig. 11** ストレス誘発性冷えモデルにおける L-Citrulline 投与後の深部体温、末梢体温および血漿 NO 濃度の変化

L-Citrulline 1% (w/w) 混餌食、またはコントロール食をマウスに 20 日間摂取させた。投与 20 日目に、絶食・拘束水浸ストレスを負荷し、強制水泳を行って低温負荷した後、深部体温および末梢体温の変化を 90 分間計測した。同様の実験を 1 回繰り返し、経時的に血漿を採取して NO 濃度を解析した。

(A) L-Citrulline 混餌食(●) またはコントロール食 (○) 投与後の深部体温および末梢体温の変化 : N=12.

(B) L-Citrulline 混餌食(●) またはコントロール食 (○) 投与後の血漿 NOx 濃度の変化 : N=6-8. 各値は Means±SD を表す。 \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs Control group. CIT : L-Citrulline.

**Table. 1 L-Citrulline 投与後の体重、摂餌量、血漿アミノ酸濃度、自発運動量への影響**

	Control-diet	Citrulline-diet	
Non-Fasting Body Weight (g)	38.6 ± 2.1	38.8 ± 2.2	
Fasting Body Weight (g)	33.9 ± 2.0	34.4 ± 1.9	
Calculated Daily Diet Intake (g/mouse)			
Day 7	4.9	4.4	
Day 14	4.9	4.8	
Day 20	6.0	6.0	
Non-Fasting Plasma Arginine (μM)	140.6 ± 17.8	230.6 ± 41.8	*
Fasting Plasma Arginine (μM)	88.6 ± 6.6	78.0 ± 14.0	
Non-Fasting Plasma Citrulline (μM)	144.4 ± 21.5	197.9 ± 57.4	*
Fasting Plasma Citrulline (μM)	68.5 ± 20.0	80.5 ± 19.0	
Spontaneous Motor Activities (Counts/60 min)	10504 ± 4007	8870 ± 3035	

各値は Means ± SD を表す。\**P* < 0.05 vs Control group.

## 2-4 考察とまとめ

皮膚の血管網は体内血液循環の最も末端にあたり、毛細血管の拡張と収縮による血流の調節により熱放熱量を制御している。この拡張と収縮は主に自律神経により支配されるが、肉体的および精神的ストレスにより自律神経系の不調が起きると、交感神経系の緊張亢進により末梢の血管が収縮し、血液循環が滞ることで冷えの症状が誘導されると考えられている [37]。

本章ではまず、末端の冷えの原因の1つに、身体ストレスによる慢性的な末梢血流循環の悪化があることに着目し、ストレスに起因する血行障害モデルの構築を試みた。絶食・拘束水浸ストレスおよび強制水泳による低温負荷により、深部体温、末梢体温ともに急激な低下をみたが、拘束水浸ストレスありの条件において、体温低下はより顕著であり、低温負荷を伴わない精神的、肉体的ストレスが末梢循環不全を助長することが示唆された。このことは、上述の通り、ヒトで報告されるストレスによる交感神経系の亢進による血管の収縮反応と同様の現象であることが推察された。

次に、血流の回復が末梢皮膚温の回復期に重要な役割を担うとの仮説を立て、NOの関与を調べた。その結果、NOSの非選択的阻害剤であるL-NAMEの前処理は、体温の回復を有意に遅延したことから、ストレス誘発性冷えの改善にはNOによる血管の動的变化、即ち皮膚血管の拡張反応が生理的に重要であることが示唆される。

さらに興味深いことに、L-Citrullineの20日間の混餌投与は、Control群と比べ、ストレス誘発性冷えからの回復を有意に速めることを明らかにした。また、この時の血漿NOレベルはControl群と比べL-Citrulline投与で高値傾向であった。Figuroaら [25]によると、L-Citrulline摂取はヒトにおいて、寒冷負荷後の急激な昇圧反応を緩和したという。本章の実験では血圧との関連は今後の検討事項であるが、これら先行報告はL-Citrullineが寒冷負荷ストレスによる血管の収縮反応を緩和することを示唆するもので、本結果で得られた作用とも一致する知見と考えられた。

以上、本章では、ストレス誘発性末梢循環低下モデルを構築し、ストレスによる末梢毛細血管の収縮を皮膚温として検知するとともに、体温の回復期にNOが必須の役割を演じることを明らかにした。さらに、L-Citrulline投与がストレス誘発性冷えの症状を有意に改善することを見出し、この機序としてNOによる皮膚血管の拡張反応の関与が示唆された。

ストレスと冷えは、現代社会において男女ともに経験する不定愁訴であり、L-Citrullineの補完がこれら症状の改善に有用である可能性が示された。

## 第3章

### 虚血性脳血管障害モデルにおける L-Citrulline の生理作用の基礎的検討

#### 3-1 目的

脳の神経活動を維持する脳血管は、他臓器に比較して分布量が多く、循環血液量の維持に極めて重要である。脳内の微小血管は脳血管周囲に存在する神経細胞、グリア細胞などと多様な相互作用を及ぼし合い、神経-血管ネットワークを形成している。加齢、糖尿病、高血圧などを背景とする様々な因子により、脳血管周辺では器質的、機能的変化が亢進し、脳機能を修飾する可能性が指摘されている [39]。

高齢社会を迎えた本邦、欧米各国では昨今、認知症患者が急激に増えている。認知症の主要因はアルツハイマー病、血管性認知症に大別されるが [39]、血管病変を基盤とした脳血管の老化に着目すると、細動脈硬化を原因とした慢性的な脳循環の虚血状態が脳白質病変を引き起こし、血管性認知症の要因となることが臨床で指摘されている [40]。

加齢は脳血管においても、血管内皮機能不全を促進することが見出されている。野生型マウスの脳底部動脈の内皮依存性拡張能は、若齢マウスに対し老齢個体において著明に低下していた [41]。また、加齢に伴う酸化ストレスが、脳血管の機能低下を惹起することも示唆される [42]。これにより、脳血管の閉塞といった事態を招き、患者自身の生活の質は低下し、身体的、精神的な損失も大きくなると考えられる。従って、脳血管を保護するための予防あるいは治療戦略の充実は急務の課題となっている。

本研究において、第1章では、L-Citrulline が動物個体レベルで NO-cGMP pathway を亢進し、血液循環を改善する可能性があること、第2章では身体的ストレス負荷による冷え惹起モデルにおいて L-Citrulline が末梢循環低下を改善する可能性を見出してきた。従って、次なる展開として、より臨床病態に近い脳血管障害モデルにおいて、L-Citrulline が血管病変に障害を来す症状の改善に、どのような効果を発揮するかは興味深い。

そこで本章では、脳血管障害に主眼をおいた食品からの新たな予防的介入を模索するため、L-Citrulline による脳血管性認知症への作用とその機序解明を目指した。

### 3-2 実験材料および方法

本実験に係る手順、方法、動物福祉への配慮は協和発酵バイオ(株)動物実験倫理委員会ならびに東北大学動物実験委員会の指針を遵守し行われた。

実験動物には 10 週齢 C57/BL6 雄性マウス (日本クレア(株)) を用いた。順化期間中、マウスに標準食 (CE-2, 日本クレア(株)) および上水を自由摂取させ、室温  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル環境下で飼育した。

#### 両総頸動脈閉塞 (bilateral common carotid artery occlusion; BCCAO) モデルの作製

マウス総頸動脈の閉塞は、Yamamoto ら [43] の報告に準拠し実施した。4% ハロタン吸入により麻酔を導入し、続いて 2% ハロタンで麻酔を維持し、 $37\sim 38^{\circ}\text{C}$  に保った温度コントローラ保温ブランケット上にマウスを安定させた。首部側面から切開して頸動脈を露出させ、直ちに両総頸動脈を結紮用クリップで一時的に 20 分間クランプすることで血管閉塞状態とした。その後、頸動脈虚血を解き皮膚切開部を再縫合した。偽手術群 (sham) は両側総頸動脈を露出し、再縫合するだけの操作を行った。

#### L-Citrulline 投与

投与試料は協和発酵バイオ (株) 製の L-Citrulline のフリー体を用いた。BCCAO モデルの作製から 24 時間回復させた後、精製水に溶解させた L-Citrulline (0, 50, 75, 100 mg/kg) を 1 mL/100 g 体重の投与量となるよう 1 日 1 回、10 日間連続で強制経口投与した。マウスの実験下ストレスおよび各測定操作間の干渉を最小にするため、記憶学習機能を評価する行動薬理解析と各免疫組織学的解析、ならびに脳内 NO 産生能の評価でそれぞれ BCCAO モデルを構築し、同様に L-Citrulline 投与後、個別に実験を行った。

#### 新規物体認識試験

L-Citrulline 投与 9 日目に、マウスは新規物体を認識すると「探索行動」を示す性質に基づく、新規物体認識試験を行った (N=6)。なお、マウスは個別にオープンフィールドボックス ( $35\times 25\times 35\text{ cm}$ ) において事前に 2 日間順化させた。獲得試行として、フィールド中央に同一形状の物体を対称に 2 つ設置し、マウスに 10 分間認識させた。1 時間の休止後、片方を異形状の物体に置換し、マウスの新規物体に対する探索行動に要した時間を 5 分間カウントして記憶力の保持を評価した。この際、用いる物体は嗅覚での認知を避けるために 70% エタノールで洗浄した。探索行動の定義は、対象

物体につかまり起立姿勢をとること、対象を嗅ぎ周ること、対象に 1 cm 以内に近接するか触れることとした。2 つの対象の総探索時間に対する新規対象探索時間の割合を新規物体認識率 (discrimination index (%)) として求めた。

### 受動回避試験

本評価は、マウスが一度経験した嫌悪刺激としての電気ショックに対して回避行動を取ることを指標とし、明室 (14×10×25 cm)、および電気刺激装置 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を連結した暗室 (25×25×25 cm) からなるステップスルー方式の受動回避装置により測定した (N=6)。まず順化として、測定前日にマウスを装置に入れ環境に馴れさせた。L-Citrulline 投与 10 日目に、獲得試行としてマウスを明室に入れ、マウスが暗室に入ったら直ちにドアを閉め、電気ショック (0.3 mA, 2 秒) を与えた後、30 秒間とどまらせてから取り出した。獲得試行の 24 時間後、保持試行としてマウスを再び明室に入れ、暗室に入るまでの時間の変化を計測した。データはマウスが明室から暗室に入るまでの反応潜時 (Latency (S)) として最大 300 秒まで測定した。

### 海馬神経の組織学的評価

神経細胞死の組織学的観察は Yamamoto ら [43] の既報に準拠し行った。10 日間の L-Citrulline 投与後、マウスをペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) による麻酔下で開腹し、横隔膜を開いたのちに正中切開して心室を露出させた。続いて、灌流針を心尖部より挿入し、Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) により心臓部から灌流した。出血が淡色化してきたのを確認した後、PBS に溶解した 4 % Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) 液に切り換え灌流固定を行った。灌流固定終了後に灌流針を抜き、脳を摘出した。取り出した脳は 4°C の 4 % Paraformaldehyde 液中で 24 時間保存した。脳組織はビブラトーム (Dosaka EM Co. Ltd., Kyoto Japan) を用いて、厚さ 50 µm の冠状スライス切片を作製し、スライドガラスに固定した。続いて、海馬領域の切片を PBS に溶解した 5 µmol/L Propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich) 溶液に浸漬して染色した。上記の手順で作製した海馬切片は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS Corporation, Tokyo, Japan) にて観察し、ブレグマから後部へ 1.4~1.8 mm の位置における CA1, CA3 および歯状回 (Dentate Gyrus) 領域の神経細胞および脱落神経細胞をカウントし、Control マウスの神経生細胞に対する細胞生存率 (%) として算出した。

### 蛍光免疫染色による CD31 (PECAM-1) の検出

免疫組織学的解析は、Shioda ら [44] の方法を参考にした。10 日間の L-Citrulline

投与後、既述の海馬神経の組織学的評価の方法に示すように、マウスをペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) による麻酔下で開腹し、心室を露出させた後、PBS, pH 7.4 により心臓部から灌流した。続いて同様に 4 % Paraformaldehyde 液で固定し、摘出脳はビブラトーム (Dosaka EM Co. Ltd., Kyoto Japan) を用いて、厚さ 50  $\mu$ m の冠状スライス切片とした。得られた切片は 0.01 % Triton X-100 を添加した PBS で 30 分、3 % Bovine serum albumin (BSA) を加えた PBS (blocking solution) で 1 時間インキュベーションし、続いて一次抗体を添加した Blocking solution に替え一晩浸漬した。抗体は CD31 に対するラットモノクローナル抗体 (Hycult Biotechnology., PBUden Netherlands) を用い、希釈倍率は 500 倍であった。切片を PBS で洗浄後、PBS (blocking solution) に Biotinylated donkey anti-rat IgG (500 倍希釈: Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) と HRP 標識ストレプトアビジン (500 倍希釈: Perkin-Elmer, Inc.) を混和した二次抗体反応液中で 3 時間インキュベーションした。次に、切片を TSA-Direct Kit (Perkin-Elmer, Inc.) を用い Methylrhodamine tyramide で 10 分染色し、数回 PBS で洗浄後、続いて PBS に溶解した 5  $\mu$ mol/L PI (Sigma-Aldrich) 溶液に浸漬して核染色した。なお、全ての操作は 4°C を保持して行った。免疫蛍光染色によるシグナル画像は共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, Tokyo, Japan) により取得し、ブregマから 1.4~1.8 mm の位置における海馬 CA1 領域の錐体細胞層における CD31 のシグナル強度を EZ-C1 viewer (Nikon, Tokyo, Japan) を用い解析した。

### ウエスタン解析

10 日間の L-Citrulline 投与後、斬首によりマウスから脳を摘出し、海馬 CA1 領域を採取した。海馬サンプルは液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。以後のウエスタン解析は Moriguchi ら [45] の既報に準拠して行った。海馬サンプルをホモジナイズバッファー中 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 % Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 40 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 100 nM calyculin A, 50  $\mu$ g/mL leupeptin, 25  $\mu$ g/mL pepstatin A, 50  $\mu$ g/mL trypsin inhibitor, 1 mM dithiothreitol) で均一かつ完全に破碎し、破碎液を 17,400G  $\times$  10 分間遠心することで上清を得た。次に、ブラッドフォード定法でタンパク質濃度を測定後、サンプルは Laemmli サンプルバッファーで一定濃度に混和し、3 分間 100°C で加熱させた。続いて一律にタンパク質濃度を揃えたサンプルを SDS-PAGE 用の泳動試料とし、SDS polyacrylamide gel のゲルトップにアプライして泳動展開した。泳動後、ゲル上のタンパク質は 70V  $\times$  2 時間の条件で Immobilon PVDF メンブレンにトランスファーし、TTBS 溶液中 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, 5 % 脱脂粉乳) で室温、1 時間ブロッッキングした。

次に、PDVF メンブレンは一次抗体を添加した TTBS 溶液に浸し 4°C で一晩振盪した。なお、各指標酵素の抗体には、anti-CaMK II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent proteinkinase II, 5,000 倍希釈)、anti-eNOS (1,000 倍希釈: BD science, San Jose, CA, USA)、anti-nNOS (1,000 倍希釈: Sigma, St-Louis, MO, USA)、anti-iNOS (1,000 倍希釈: Millipore, Billerica, MA, USA)、anti-β-tubulin (10,000 倍希釈: Sigma) を用いた。TTBS 溶液で数回洗浄後、PVDF メンブレンを TTBS 溶液で希釈した対応する二次抗体 (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody) 溶液中でインキュベーションすることで二次ラベルした。続いて、PVDF メンブレンを再度、洗浄後、ECL immunoblotting detection system (Amersham Biosciences, NJ, USA) でシグナルを可視発光させ、X 線フィルム (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて検出した。X 線フィルムに現像したシグナルはコンピュータに取り込み、Image Gauge Version 3.2 (Fuji Film) を用いて定量解析を行った。

#### マイクロダイアリシス法による脳内 NO 産生能の評価

マイクロダイアリシスプローブを用いた脳への L-Arginine 注入により、脳内 NO 産生能を評価した。10 日間の L-Citrulline 投与後、マウスをペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) による麻酔下で脳定位固定台 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA USA) に頭部を固定し、脳定位術によって頭頂部を正中切開して頭骨を露出させ、マイクロドリルを用い穿頭孔を開けた。次に穿頭孔から垂直にガイドカニューレ (AG-4; Eicom, Kyoto, Japan) を海馬組織へ挿入した。プローブ挿入位置は、ブレグマを基点として、後部方向に 1.5 mm、正中線より 1 mm、脳表面より深さ 1 mm とし、挿入されたカニューレは周囲の頭蓋骨にセメントで留置固定した。24 時間の回復期間後、マイクロダイアリシスプローブ (A-I-4-02, 2 mm long dialysis membrane; Eicom) をガイドカニューレより海馬 CA1 領域へ挿入し、フリームービングの状態において、マイクロポンプ (ESP-64; Eicom) に接続されたプローブから透析液を定速 1 μL/min で流して自動インジェクター (EAS-20; Eicom) のサンプルループへ 10 分おきに回収した。回収液は自動インジェクターから酸化窒素 (NO<sub>x</sub>) 分析システム (ENO-20; Eicom) へ注入され、自動分析された。なお、透析液には定法 Ringer's 液を用いた。続いて、プローブから L-Arginine を注入し NO 産生を強制誘導するため、マイクロポンプ (ESP-64; Eicom) に接続したマイクロダイアリシスプローブを通して L-Arginine (50, 200, 500 mM) を 1 μL/min で注入し、各濃度 20 分間の透析液を同様に回収した。さらに、L-Arginine 注入の 30 分前に NOS 阻害剤である L-NAME (10 mM, Wako chemicals) または 7-nitroindazole (7-NI, 10 mM; ALEXIS, San Diego, CA, USA) をマイクロポンプで投与し、既述の通り透析液の NO<sub>x</sub> 濃度を測定することで、L-Arginine 注入刺激による

NO 産生が NOS を介することを確認した。

### 統計解析

結果は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。対応 2 群間データの有意差は、Student's *t*-test を用いて検定した。多群間の平均値の比較には One-way Analysis of Variance (ANOVA) で比較した後、Dunnett's test for multigroup comparisons を用いて投与群間の有意差を求めた。有意水準は危険率 5 % 未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

### 3-3 実験結果および図表

#### 脳虚血による NOS タンパク質発現量の変化と L-Citrulline 投与の影響 (Fig. 12)

マウス両側総頸動脈を一過的に 20 分間閉塞 (BCCAO) して再灌流後、L-Citrulline を 10 日間経口投与し、海馬 CA1 領域のウエスタン解析により、L-Citrulline が虚血性脳血管障害時の NOS アイソフォームタンパク質発現量に及ぼす作用を解析した。BCCAO により、eNOS 発現レベルは有意に低下し、逆に nNOS 発現レベルは有意に上昇した。これに対し L-Citrulline は BCCAO control と比べ、投与濃度依存的に eNOS 発現量を有意に回復させ、これに伴い nNOS 発現量は正常レベルへ是正され得ることが分かった。この時、iNOS への影響は認められなかった。

#### 脳虚血による海馬 CD31 (PECAM-1) の発現変化と L-Citrulline 投与の影響 (Fig. 13)

そこで、脳虚血による血管内皮細胞障害と L-Citrulline による保護効果を評価するため、海馬において血管内皮細胞マーカー、CD31 (PECAM-1) の発現変化を免疫蛍光染色により調べた (Fig. 13)。その結果、BCCAO により CD31 発現レベルは顕著に低下したが、L-Citrulline 投与によって有意に CD31 の発現低下が抑制されることが明らかとなった。

#### マイクロダイアリシスによる L-Arginine 誘導 NO 産生刺激に対する L-Citrulline 投与の効果 (Fig. 14)

マイクロダイアリシス法による L-Arginine 直接注入により、海馬において NO 産生刺激を与え、L-Citrulline 経口投与が脳虚血後の脳内 NO 産生能の回復に及ぼす効果を評価した。L-Arginine 注入によって NO レベルの増大がみられたが、これは NOS 阻害剤である L-NAME および 7-Ni で有意に阻害された (Fig. 14 (A))。よって、本実験モデルは NOS を介する NO 産生を反映することが確認された。そこで L-Citrulline 投与

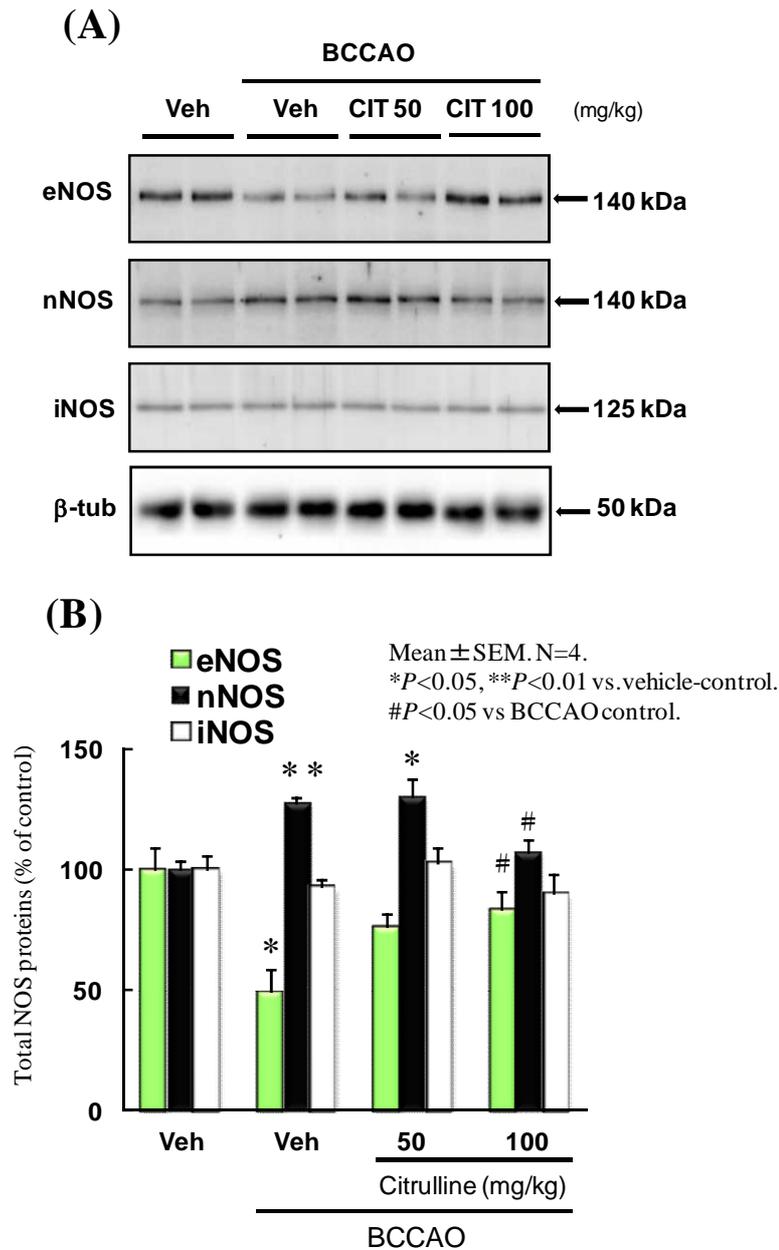
が虚血性脳血管障害時の海馬微小血管系の NOS 活性に及ぼす効果を検討した結果、マイクロダイアリシスプローブから L-Arginine を直接注入すると、注入後 30 分から 60 分にかけて Sham control では NO 産生が著明に誘導されたが、BCCAO により NO 産生反応は有意に減弱していた (Fig. 14 (B))。それに対し、L-Citrulline は投与濃度依存的に NO 産生能を改善させ、100 mg/kg において有意な増加が認められた (Fig. 14 (B, C))。

### **L-Citrulline 投与が脳虚血後の海馬 CA1 領域における CaMK II 発現量および神経細胞障害に及ぼす効果 (Fig. 15)**

次に神経細胞への影響を解析する目的で、BCCAO に続き L-Citrulline 経口投与後、マウスから脳を摘出し、海馬 CA1 領域における記憶関連タンパク質、CaMK II 発現量および神経細胞障害の程度を検討した。海馬中 CaMK II レベルは BCCAO によって劇的に低値を示したが、L-Citrulline 投与は有意に発現レベルを回復させることが明らかとなった (Fig. 15 (A))。さらに、組織学的解析から BCCAO に続き海馬 CA1 領域においては、70~80 % の神経細胞が脱落したが、L-Citrulline により投与濃度依存的かつ有意な神経細胞生存率の改善が認められた (Fig. 15 (B))。

### **脳虚血による記憶認知障害に対する L-Citrulline 投与の効果 (Fig. 16)**

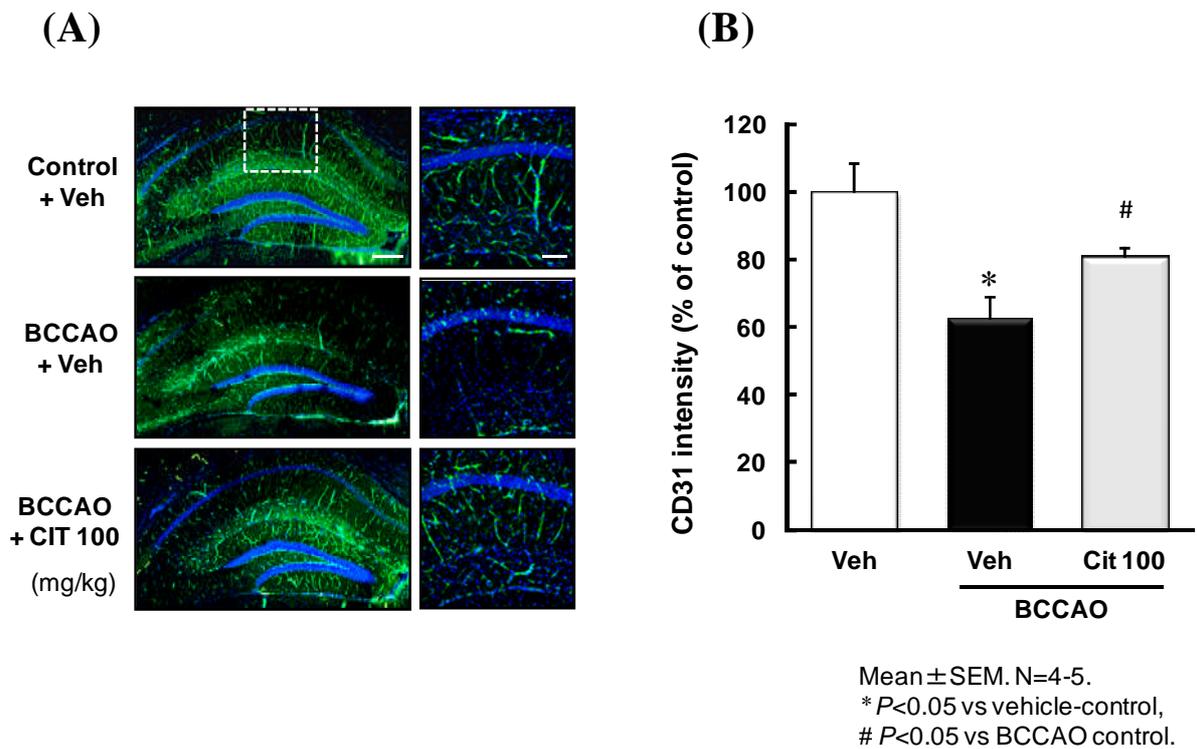
これら有意な変化を高次脳機能として検出するため、BCCAO に続き L-Citrulline 経口投与 9 日目に、新規物体認識試験およびステップスルー方式の受動回避試験により、記憶学習能を評価した。その結果、BCCAO はマウス記憶学習機能を著しく衰退させたが、L-Citrulline 投与は新規物体認識試験および受動回避試験ともに、脳虚血障害による記憶学習能の低下を有意に改善し、その作用は投与用量依存的であった (Fig. 16 (A, B))。



**Fig. 12** 脳虚血による NOS タンパク質発現量の変化と L-Citrulline 投与の影響

マウス両側総頸動脈を一過的に閉塞後、L-Citrulline (50, 100 mg/kg/day) を 10 日間経口投与した。続いてマウスから脳を摘出し、海馬 CA1 領域のウェスタン解析 (A) により、NOS 発現量の変化を定量した。データは Sham control (Veh) に対する各条件における NOS タンパク質発現量の相対変化 (%) として解析 (B) した。

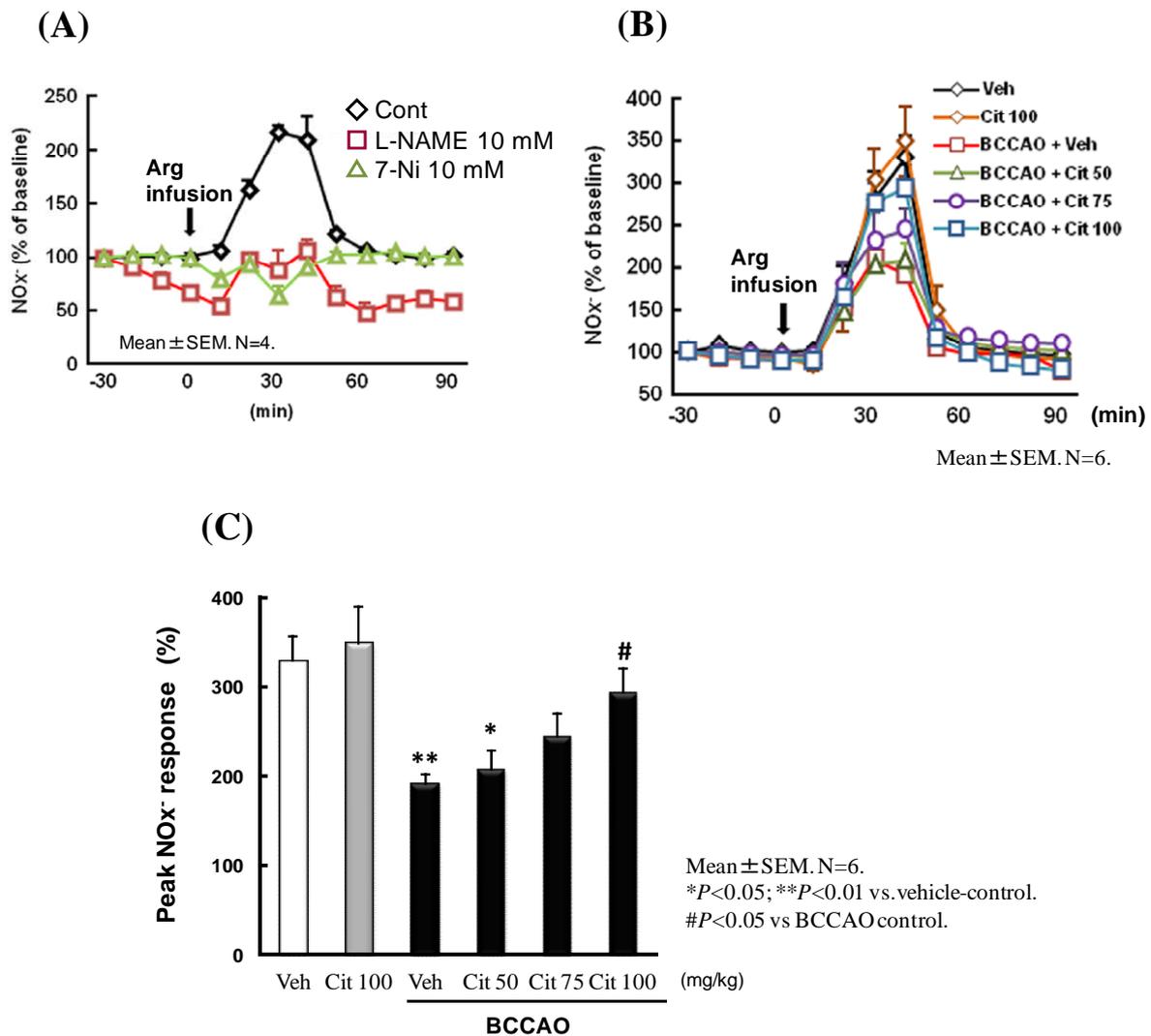
各値は Means ± SEM を表す (N=4)。\**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs. vehicle-control. #*P*<0.05 vs BCCAO control. BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion, CIT: L-Citrulline, Veh: vehicle, eNOS: endothelial NO synthase, iNOS: inducible NO synthase, nNOS: neuronal NO synthase.



**Fig. 13** 脳虚血による海馬 CD31 (PECAM-1) の発現変化と L-Citrulline 投与の影響

マウス両側総頸動脈を一過的に閉塞後、L-Citrulline (100 mg/kg/day) を 10 日間経口投与した。続いて、海馬 CA1 領域における免疫蛍光染色 (A) により、血管内皮細胞マーカー、CD31 のシグナルを検出した。シグナル強度は Sham control (Veh) に対する各条件における CD31 発現量の相対変化 (%) として解析 (B) した。スケールバー: 低倍率, 200  $\mu$ m; 高倍率, 100  $\mu$ m。

各値は Means  $\pm$  SEM を表す (N=4-5)。\* $P$ <0.05 vs vehicle-control. # $P$ <0.05 vs BCCAO control. BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion, CIT: L-Citrulline, Veh: vehicle, PECAM-1: platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1.



**Fig. 14** マイクロダイアリスによる L-Arginine 誘導 NO 産生刺激に対する L-Citrulline 投与の効果

マウス両側総頸動脈を一過的に閉塞後、L-Citrulline (50, 75, 100 mg/kg/day) を10日間経口投与した。続いて、マイクロダイアリスプローブを用いた海馬へのL-Arginine直接注入によりNO産生を刺激し、L-Citrulline投与が脳虚血後の脳内NO産生能の回復に与える効果を評価した。

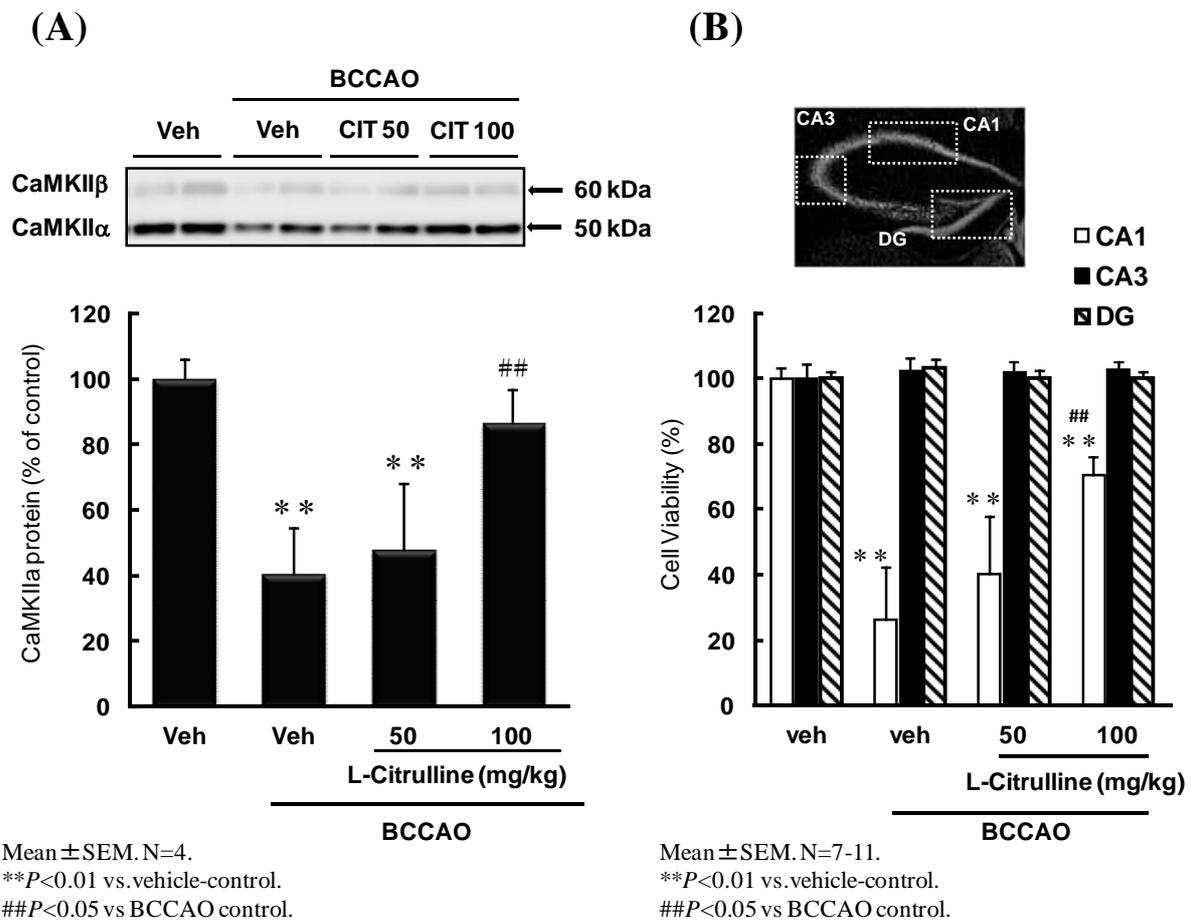
(A) L-Arginine (200 mM) 誘導 NO 産生刺激における NOS 阻害剤 (L-NAME, 7-Ni) の影響 : N=4.

(B) L-Arginine (500 mM) 誘導 NO 産生刺激における経時的 NOx 動態 : N=6.

(C) L-Arginine (500 mM) 誘導 NO 産生刺激における各群ピーク NOx レベル : N=6.

各値は Means  $\pm$  SEM を表す。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs vehicle-control. # $P$ <0.05 vs BCCAO control.

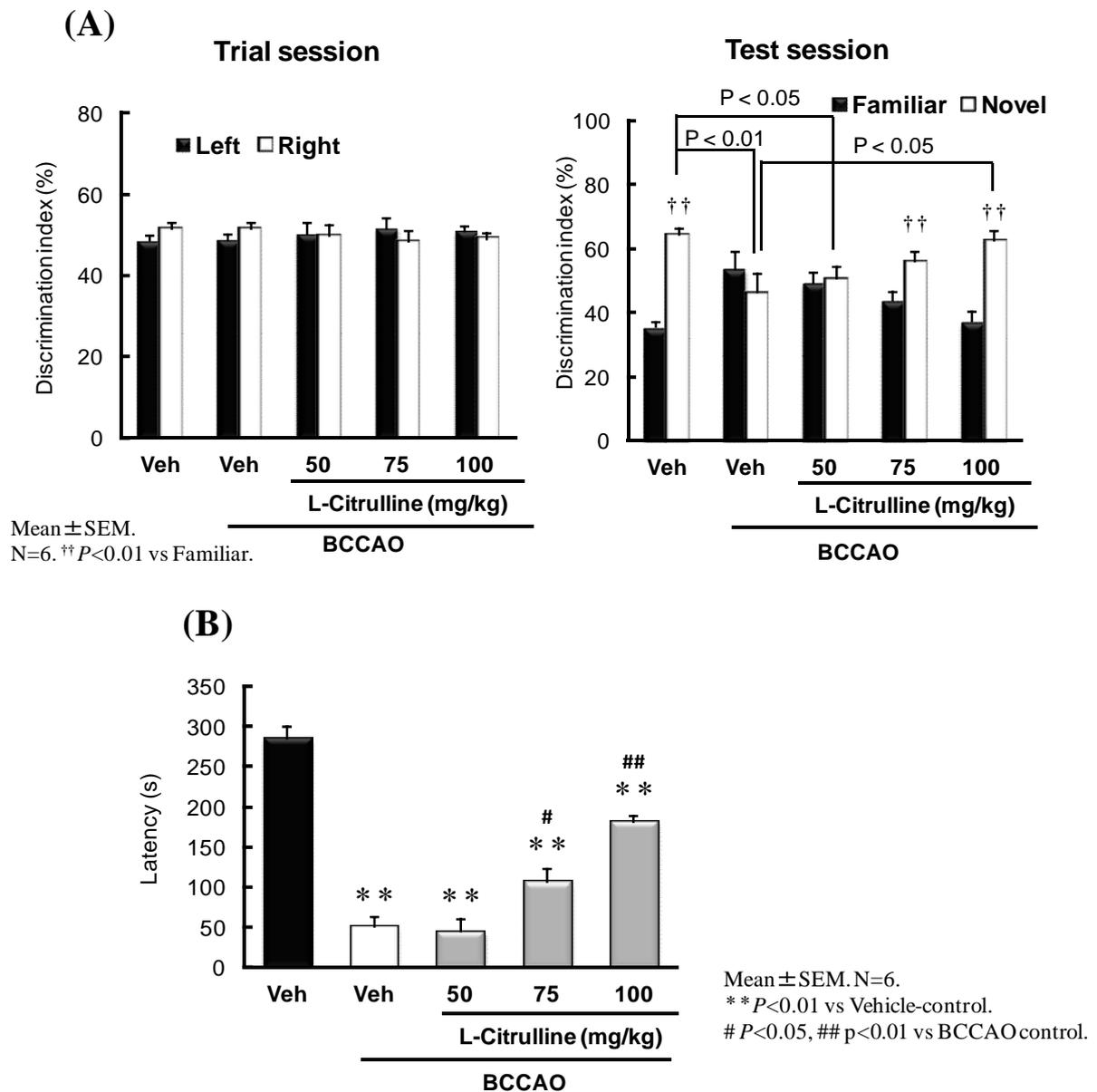
BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion, Arg: L-Arginine, Veh: vehicle, NOx: nitrite:  $\text{NO}^{2-}$  + nitrate:  $\text{NO}^{3-}$ , L-NAME: NG-nitro-L-arginine methylester, 7-Ni: 7-nitroindazole.



**Fig. 15 L-Citrulline 投与が脳虚血後の海馬 CA1 領域における CaMK II 発現量および神経細胞障害に及ぼす効果**

マウス両側総頸動脈を一過的に閉塞後、L-Citrulline (50, 100 mg/kg/day) を10日間経口投与した。続いてマウスから脳を摘出し、海馬 CA1 領域のウエスタン解析 (A) により、CaMK II 発現量を定量した (N=4)。また、海馬神経の組織学的評価を行い、CA1, CA3 および歯状回 (Dentate Gyrus: DG) 領域における虚血後の神経細胞生存率 (B) を測定した (N=7-11)。データは Sham control (Veh) に対する各条件における相対変化 (%) として解析した。

各値は Means  $\pm$  SEM を表す。 \*\* $P$ <0.01 vs vehicle-control. ## $P$ <0.01 vs BCCAO control. BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion, CaMK II: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent proteinkinase II, CIT: L-Citrulline, Veh: vehicle.



**Fig. 16** 脳虚血による記憶認知障害に対する L-Citrulline 投与の効果

マウス両側総頸動脈を一過的に閉塞した後、L-Citrulline (50, 75, 100 mg/kg/day) 経口投与9日目に、マウスは新規物体を認識すると「探索行動」を示す性質に基づく、新規物体認識試験 (A) を行った (N=6)。2つの対象の総探索時間に対する新規対象探索時間の割合を新規物体認識率 (discrimination index (%)) として求めた。また、ステップスルー方式の受動回避試験 (B) により記憶学習機能を測定した (N=6)。データは獲得試行後の保持試行において、マウスが明室から、電気ショックのある暗室に入るまでの反応潜時 (Latency (S)) として最大 300 秒まで測定した。各値は Means ± SEM を表す。††P<0.01 vs Familiar. \*\*P<0.01 vs vehicle-control. #P<0.05, ##P<0.01 vs BCCAO control. BCCAO: bilateral common carotid artery occlusion, CIT: L-Citrulline, Veh: vehicle.

### 3-4 考察とまとめ

本章では、総頸動脈の一過的虚血と再還流により、脳微小血管に障害を課した脳機能障害マウスに L-Citrulline を経口的に 10 日間投与し、記憶学習能に与える影響を神経・血管保護の観点から基礎的に評価した。これにより臨床病態に近い脳血管障害モデルにおいて、L-Citrulline が血管病変に障害を来す症状の改善に、どのような効果を発揮するかを検討した。

脳における血管の恒常性維持においても eNOS は必須の役割を持ち、eNOS ノックアウトマウスを用いた検討 [46] から、脳虚血障害後の細動脈の保護、或いは血管新生段階においても eNOS 由来の NO は重要な因子であることが報告されている。この時、脳虚血モデルにおいて NO ドナーを処置すると、血管密度の改善や神経保護作用がみられた [46,47]。つまり、脳虚血後に eNOS の発現レベルを回復させることが、脳血管系の回復に重要であることが推察される。また近年、NO の血管作動性作用と神経伝達物質としての作用、ならびに微小血管系と脳血管周囲に存在する神経細胞、グリア細胞との相互ネットワークやその病態への関与が注目され "Neurovascular Unit" という考え方が重要となっている [48]。本検討において、BCCAO により eNOS タンパク質発現が低下し、CD31 の免疫蛍光染色から血管内皮細胞間接着の脱落が観察されたが、L-Citrulline 投与は eNOS 発現レベルを有意に回復させ、血管内皮を障害から保護する効果が認められた。即ち、eNOS そのものの発現は脳虚血ダメージによる血管内皮障害によって減弱し得るが、L-Citrulline は eNOS 発現を維持し、NO による脳微小血管を介した栄養循環の回復を促すことで、内皮細胞の保護に働いたことが想像できる。このことは、マイクロダイアリシスを用いた海馬 CA1 領域における NO 産生能の解析においても、L-Citrulline は有意に NO 産生反応を改善することが実証されたことから、虚血障害後の血管恒常性維持に L-Citrulline による NO-cGMP pathway の活性化が寄与した可能性が考えられた。さらに、BCCAO により劇的に神経細胞の脱落が惹起されたが、恐らく L-Citrulline による脳微小循環の改善を通し、神経細胞死が著明に抑制されたことは、神経生理学的な面からも注目に値する。結果として、L-Citrulline 投与による神経細胞死の有意な抑制が記憶学習能の改善に、より直接的に関与したことが考えられる。

一方、本実験において nNOS は BCCAO により発現増加し、eNOS とは逆に L-Citrulline 投与により正常レベルに低下した。ここで nNOS の生理的意義について考えると、神経系に局在する nNOS 由来の NO はシナプス間の神経伝達物質として作用したり、末梢では消化管運動や血流の調節をも担う [11]。一方、脳虚血時には過剰に

nNOS が活性化され、神経細胞のアポトーシスを助長するとの新しい研究報告がなされた [47]。興味深いことに nNOS 選択的な阻害剤は脳虚血障害に伴う海馬神経細胞死を抑制したという [49]。本研究においても BCCAO により nNOS が誘導され、L-Citrulline 投与による eNOS 発現の増加に伴って nNOS 発現は正常レベルに是正された。以上の先行研究および本研究の結果を基に、従来構成的に発現していると考えられていた nNOS が、虚血時には誘導型の性質を持ち、脳神経障害の促進因子として影響することが示唆され、L-Citrulline は NOS アイソフォームの発現バランスの恒常性維持にも有用な作用を及ぼすことが明らかとなった。

本検討で認められた神経保護効果には、記憶関連タンパク質である CaMK II の関与も示唆される。CaMK II は主にニューロンで発現し、シナプスにおいて neurotransmitter 受容体の活性調節、神経突起の形態形成に関与するセリン・スレオニンキナーゼであり、海馬長期増強を基盤とした記憶形成に重要なタンパク質である [43,50]。先行研究において、CaMK II レベルの増加は、in vivo 記憶学習障害の改善に有益であったとの知見もある [43]。また、Giese らのグループは、CaMK II の point mutation が記憶形成を阻害することを報告している [51]。興味深いことに、本研究では L-Citrulline 投与により、海馬 CA1 において CaMK II タンパク質レベルの有意な回復が見出されたことから、新規物体認識試験および受動回避試験によって明らかになった記憶学習能の改善には CaMK II を介した神経系の可塑的变化が寄与した可能性が考えられた。

以上より、L-Citrulline 投与は血管障害で低下する eNOS の発現レベルを回復し、海馬の NO 産生能を有意に増強することが明らかとなった。これにより、血管内皮の脱落の抑制や、脳微小循環障害およびそれに伴う神経細胞死を抑制することで、高次脳機能の維持に寄与したと考えられる。また、そのメカニズムの 1 つに、CaMK II を介した神経保護作用、神経系の可塑的变化の関与が示唆された。

認知症の主原因は、アルツハイマー病と脳血管病変 (脳血管性認知症) に大別されるが [39]、今後、認知症患者数は益々増加の一途が見込まれ、この予防策は将来に向け重要な社会的課題となっている。L-Citrulline の脳血管、脳神経細胞の保護効果、ならびに記憶学習能の改善作用に関しては現在、動物実験レベルで明らかにした段階であるが、将来的には食品による脳機能保護の観点から、ヒトでの有効性を実証していくことが必要と思われる。近い将来、L-Citrulline が脳機能向上に資するアミノ酸として、機能性食品の研究が進むことが期待される。

## 第4章

### 健常成人における L-Citrulline 摂取後の血漿 L-Arginine と NO レベルの 相関解析、ならびに末梢循環動態に対する改善効果の検討

#### 4-1 目的

これまでに、第1章では L-Citrulline 摂取後の L-Arginine 代謝における有用性や NO サイクル賦活化作用を見出し、第2章では身体的ストレス負荷による冷えモデルにおいて、L-Citrulline 投与がストレス誘発性の症状を有意に緩和し、この機序として NO による皮膚血流促進作用の可能性を示した。さらに、第3章においては、総頸動脈の一過的閉塞により、脳微小血管に障害を課した脳機能障害マウスにおいて、L-Citrulline 投与が血管障害で低下した eNOS 発現を亢進し、マイクロダイアリシスによる解析から NO 産生能の改善を介して神経細胞死や高次脳機能の低下をも抑制する効果を明らかにしてきた。

これら検討結果は、L-Citrulline 投与が、NO-cGMP pathway 活性化のメカニズムを基盤として、血管機能不全に対して予防的、或いは抑制的に働くことを強く示唆するもので、臨床での応用が期待される。

しかしながら、現状は動物モデルでの検証データであり、サプリメントとして活用するためにはヒトへの影響を実証することが極めて重要である。また、実際に L-Citrulline をヒトに摂取させた際の血中 L-Arginine と NO レベルの変動に加え、NO の生物学的作用を反映する血流動態までを一貫して臨床的に評価した研究は乏しく、L-Citrulline の作用機作の根幹をヒトで証明する意義は大きい。従って、次なる課題として、動物モデルを基にした基礎データとヒトでの効果の整合性を明らかにし、基礎から臨床まで一貫した作用解明に繋げていくことが必要と思われた。

そこでこれまでの検討結果を踏まえ、本章では、L-Citrulline の臨床適用に向け、ヒトが摂取した際の L-Arginine 代謝と NO レベルの変動の相関性を解析するとともに、ヒトでの末梢血流評価モデルである冷水負荷試験 [52-54] を用いて血流への影響を明らかにすることを目的とし、ランダム化プラセボ対照クロスオーバー比較試験を行った。

## 4-2 実験材料および方法

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に従い、全ての被験者には研究目的、研究内容・方法、試験食品、資料の保管について十分な説明を行ったうえで文書による同意を得た。また、ハウト・シュリット倫理委員会の承認の基に行われた。

### 被験者

日常的に冷え症の自覚を有し、且つ生理周期が  $28 \pm 2$  日以内で安定している 20-37 歳の健常女性を対象に、Terasawa ら [55] による冷え症の診断基準の間診を行い、これに合致した 14 名を血行不良の体質として選抜した。医薬品、健康食品、サプリメント類を使用している者、アルコールを継続的に摂取している者、アレルギー発症の恐れがある者、糖尿病、脳機能障害、肝疾患、腎疾患、心疾患または末梢血管障害などの重篤な疾患のいずれかに該当する者、或いは既往歴を有する者、アミノ酸代謝異常のある者、貧血症状のある者、妊娠中あるいは試験期間中に妊娠、授乳の予定がある者、理学療法を行なっている者、10 週間以内に 400 mL 以上の採血を行った者、または 4 週間以内に 200 mL 以上の採血を行った者、過去 3 ヶ月以内に他の治験等に参加歴のある者は対象から除外した。

### 試験期間および被験者への制限事項

生理周期による血流動態の変化 [56] を考慮し、全ての試験手順は被験者が卵胞期から排卵期前までの間に実施した。被験者には試験期間を通して、暴飲暴食、過度の運動、睡眠不足は控えるよう指示し、測定前日よりカフェインおよびアルコールを含む飲食物を避け、午後 10 時以降の絶食を依頼した。測定日当日は、検査 2 時間前にのりつきの米飯 (昆布、おかか、サケのいずれか) を 2 個摂取させ、検査終了まで試験食品以外絶食とした。

### 試験プロトコル

本研究は二重遮蔽、プラセボ対照、クロスオーバー比較試験により実施した (Fig. 17)。なお、ウォッシュアウト期間は 3 週間とした。被験者に 1 日あたり L-Citrulline 3.2 g (協和発酵バイオ(株)製)、またはプラセボ (主成分はコーンスターチ) をハードカプセルにより、摂取 1~4 日目は就寝前に、5 日目は冷水負荷試験開始の 60 分前に摂取させた (N=14)。冷水負荷試験による末梢血流の測定は、試験食品の摂取前 (baseline) および摂取 5 日目に実施した。また、同様に試験食品の摂取前 (baseline) および 5 日目

の冷水負荷試験終了後に採血を行い、血漿アミノ酸と NOx レベルの分析に供した。

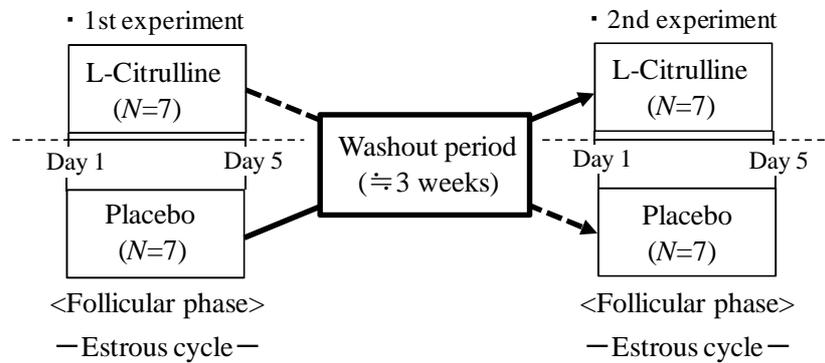


Fig. 17 プラセボ対照クロスオーバー比較試験の概要

### 血漿アミノ酸、NOx レベルの測定

既述のプロトコルに従い、採血後の血液は約 3 mL ずつヘパリン採血チューブ (VP-H050K, テルモ(株)), または 2 mL ずつ EDTA-2Na 採血チューブ (VP-NA052K, テルモ(株)) に採血し、4°C、3,000G×10 分遠心することで血漿を分取した。アミノ酸分析にはヘパリン血漿を用い、既報 [27] に準拠して行った。即ち、血漿に等量の 3% (w/v) スルホサリチル酸 (Wako chemicals) 水溶液を添加し混和後、氷上に 1 時間静置した。続いて 11,000G×15 分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、全自動アミノ酸アナライザー (JLC-500/V, JEOL) を用いて分析した。NOx 分析には上述の手順で得た EDTA 血漿を用い、既報 [30] に準拠して行った。即ち、血漿に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に 15 分間静置した。続いて 11,000G×10 分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、酸化窒素 (NOx) 分析システム (ENO-20, Eicom) を用いて定量分析した。

### 冷水負荷試験による末梢血流動態の測定

末梢血流の測定には、Laser speckle blood flow meter (OZ-1; OMEGAWAVE, INC., Tokyo, Japan) [57,58] を用い、手の甲部位における血流量の変化を計測した。冷水負荷試験として既報 [52-54] を一部最適化し、20°Cの水に 1 分間、手 (手首より先端) を浸漬させ、血管の収縮を惹起して血流の低下を誘導した。冷水負荷後、直ちに皮膚の水分を拭き取り、組織にレーザー光を照射し 14 分間、皮膚血流量の変動をモニターした。赤血球からの散乱光のスペックルパターンを基に、血流分布のピクセル上の血

$$I_{BF} = \sum_{C=0}^{C \max} A_c (1/I_{SD}(x, y))^C$$

流に相当する信号 ( $I_{BF}$ ) は次式から導かれた。

なお、測定は温度 (25 ~28 °C)、湿度 (50~60 %) を管理した恒温室で行い、測定開始前に 20 分間の馴化時間をおいた。

## 統計解析

結果は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。対応 2 群間データの有意差は、paired *t*-test を用いて検定した。連続変数の群間比較には Two-way Analysis of Variance (ANOVA) を用いた。多群間の平均値の比較には、Bonferroni correction for multiple tests を用いて投与群間の有意差を求めた。パラメータ間の相関性は Pearson's correlation coefficient test により解析した。有意水準は危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

## 4-3 実験結果および図表

### 被験者の背景因子 (Table. 2)

被験者の背景因子を Table. 2 に示した。本試験では冷え症の診断基準 [55] に基づき、年齢  $27.8 \pm 6$  歳の若年女性 14 名を選抜した。試験期間中、L-Citrulline 摂取時の 5 日目の拡張期血圧において、プラセボ摂取時と比較して有意な低下が認められた。その他の理学検査値に変化はみられなかった。

### L-Citrulline または Placebo 摂取後の血漿 L-Citrulline および L-Arginine レベルの変化 (Fig. 18)

二重遮蔽、プラセボ対照、クロスオーバー比較試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 3.2 g、またはプラセボを摂取 1~4 日目は就寝前に、5 日目は冷水負荷試験開始の 60 分前に摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline) および 5 日目の冷水負荷試験終了後に採血し、循環血中アミノ酸濃度を分析した。

被験者の Baseline における血漿 L-Citrulline 濃度は約 35  $\mu$ M であったが、L-Citrulline 摂取後に約 730  $\mu$ M まで有意に増加した (Fig. 18 (A))。また、血漿 L-Arginine 濃度の Baseline 値は約 100  $\mu$ M 前後であったのに対し、L-Citrulline 摂取により約 230  $\mu$ M まで増加し、有意な L-Arginine レベルの上昇がもたらされた (Fig. 18 (B))。一方、プラセボ摂取によって特段の影響は観察されなかった。

### L-Citrulline または Placebo 摂取後の血漿 NOx レベルの変動と血漿 L-Arginine レベルとの相関性 (Fig. 19)

次に、L-Citrulline またはプラセボ摂取が血漿 NOx レベルに与える影響を Fig. 19 (A, B) にまとめた。血漿 NOx レベルは比較的個人差が大きかったものの、L-Citrulline 摂取時のみ Baseline と比べ、NOx レベルが有意に上昇した。この時、プラセボ摂取によって変化は認められなかった。そこで L-Citrulline 摂取により上昇した L-Arginine レベルと NOx レベルの関連を相関解析した結果、興味深いことに両者の間に有意な正の相関があることを見出した (Fig. 19 (C))。

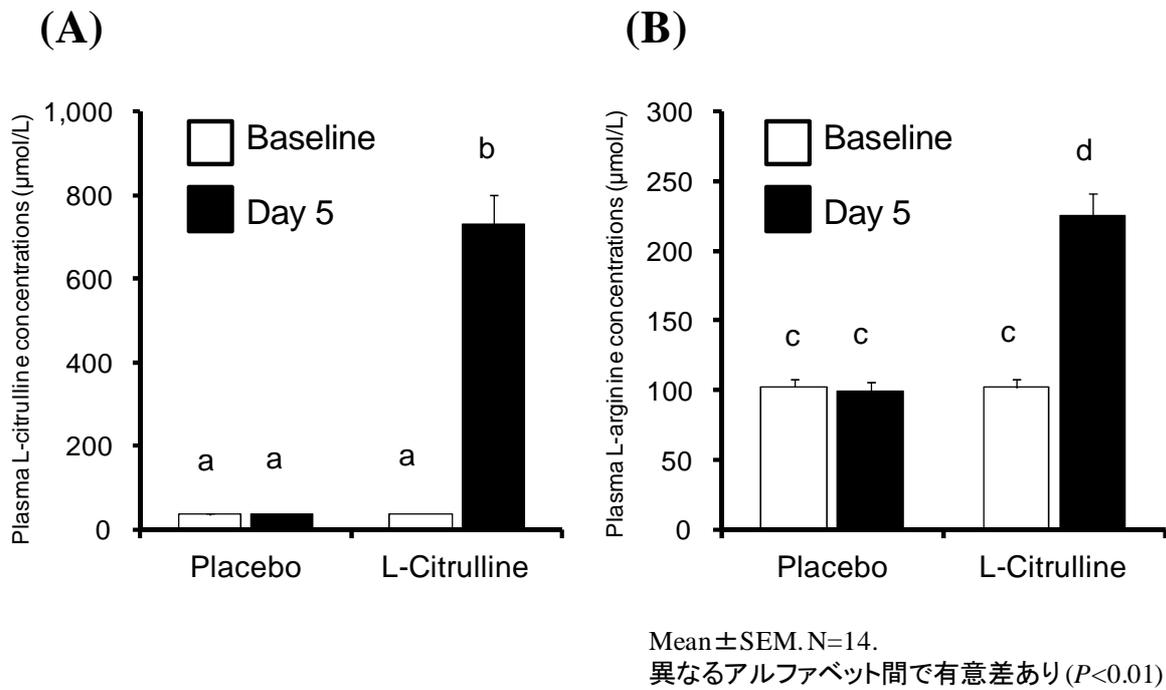
### 冷水負荷試験における末梢血流量の経時変化 (Fig. 20)

続いて、冷水負荷試験として既報 [52-54] を一部最適化し、冷水中に手甲を浸漬した後の末梢血流量の回復を評価した。20°C、1 分間の冷水負荷は有意な血流の低減を誘導し、一過的に血管収縮を惹起できる条件であることが分かった。この条件において、冷水負荷後 14 分間の血流の変動を計測すると、L-Citrulline 摂取時においては、Baseline の推移と比べ各タイムポイントにおいて血流量が高値を推移し、摂取 14 分後では有意な上昇が認められた (Fig. 20 (A))。一方、プラセボ摂取時では、Baseline、摂取後ともに類似した血流の回復パターンを示し、摂取による影響は認められなかった (Fig. 20 (B))。

**Table. 2** 被験者の背景因子

	<b>Experiment</b>	<b>Baseline</b>	<b>Day 5</b>
Age (years)	<b>L-Citrulline</b>	27.8 ± 6.0	—
	<b>Placebo</b>	27.8 ± 6.0	—
Weight (kg)	<b>L-Citrulline</b>	51.5 ± 1.6	52.3 ± 1.8
	<b>Placebo</b>	51.8 ± 1.7	51.7 ± 1.4
Body mass index (kg /m <sup>2</sup> )	<b>L-Citrulline</b>	20.0 ± 0.4	20.3 ± 0.5
	<b>Placebo</b>	20.1 ± 0.5	20.1 ± 0.5
Systolic blood pressure (mmHg)	<b>L-Citrulline</b>	110.6 ± 2.4	111.3 ± 1.4
	<b>Placebo</b>	110.5 ± 2.7	111.3 ± 3.0
Diastolic blood pressure (mmHg)	<b>L-Citrulline</b>	65.5 ± 2.5	61.5 ± 2.7*
	<b>Placebo</b>	65.3 ± 2.3	63.4 ± 2.9
Heart rate	<b>L-Citrulline</b>	67.4 ± 2.1	69.2 ± 2.7
	<b>Placebo</b>	71.3 ± 2.7	68.8 ± 2.5

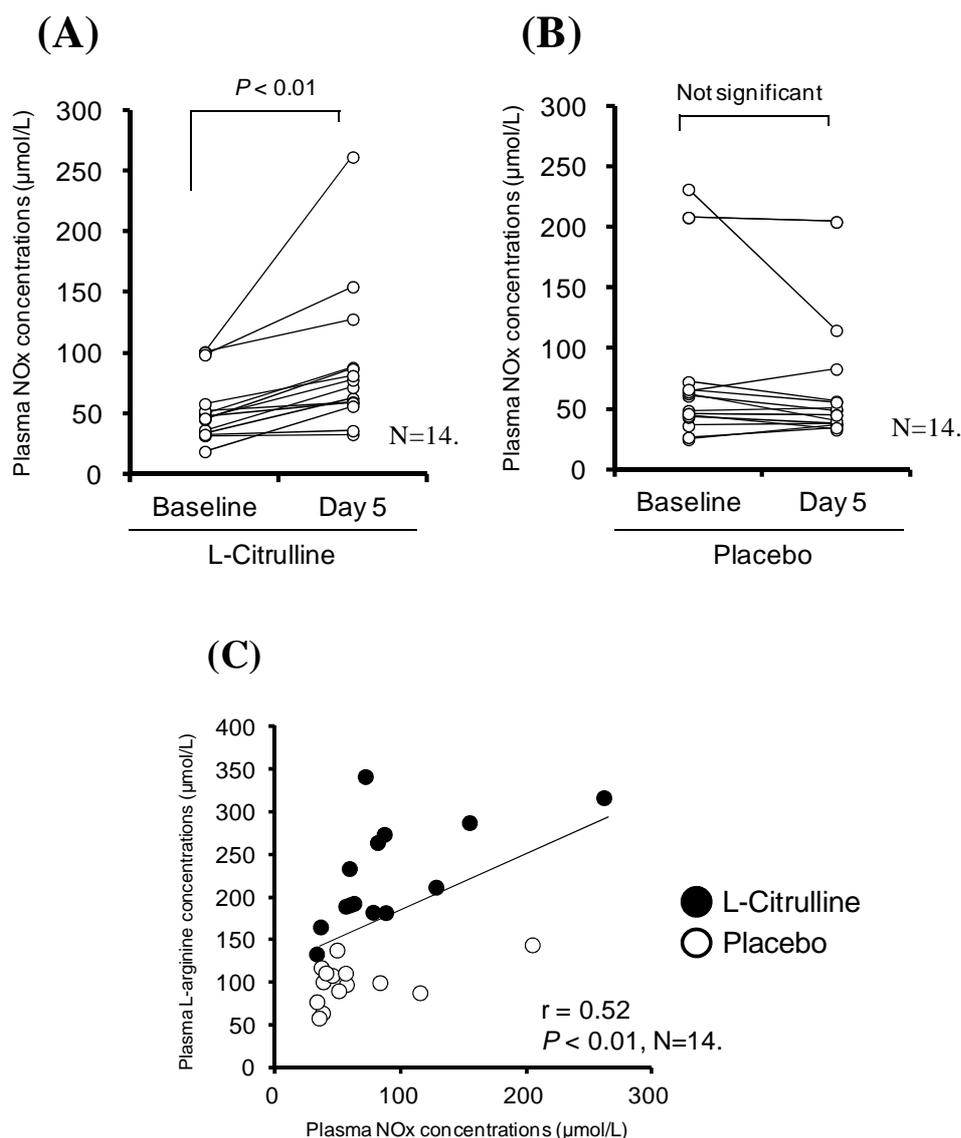
各値は Means ± SEM を表す (N=14)。\**P* < 0.05 vs Placebo group.



**Fig. 18 L-Citrulline または Placebo 摂取後の血漿 L-Citrulline および L-Arginine レベルの変化**

二重遮蔽、プラセボ対照、クロスオーバー比較試験により、被験者に1日あたり L-Citrulline 3.2 g、またはプラセボを摂取 1~4 日目は就寝前に、5 日目は冷水負荷試験開始の 60 分前に摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline) および 5 日目の冷水負荷試験終了後に採血を行い、血漿 L-Citrulline (A) および L-Arginine (B) レベルを定量した。

各値は Means ± SEM を表す (N=14)。異なるアルファベット間で有意差あり (P<0.01)。



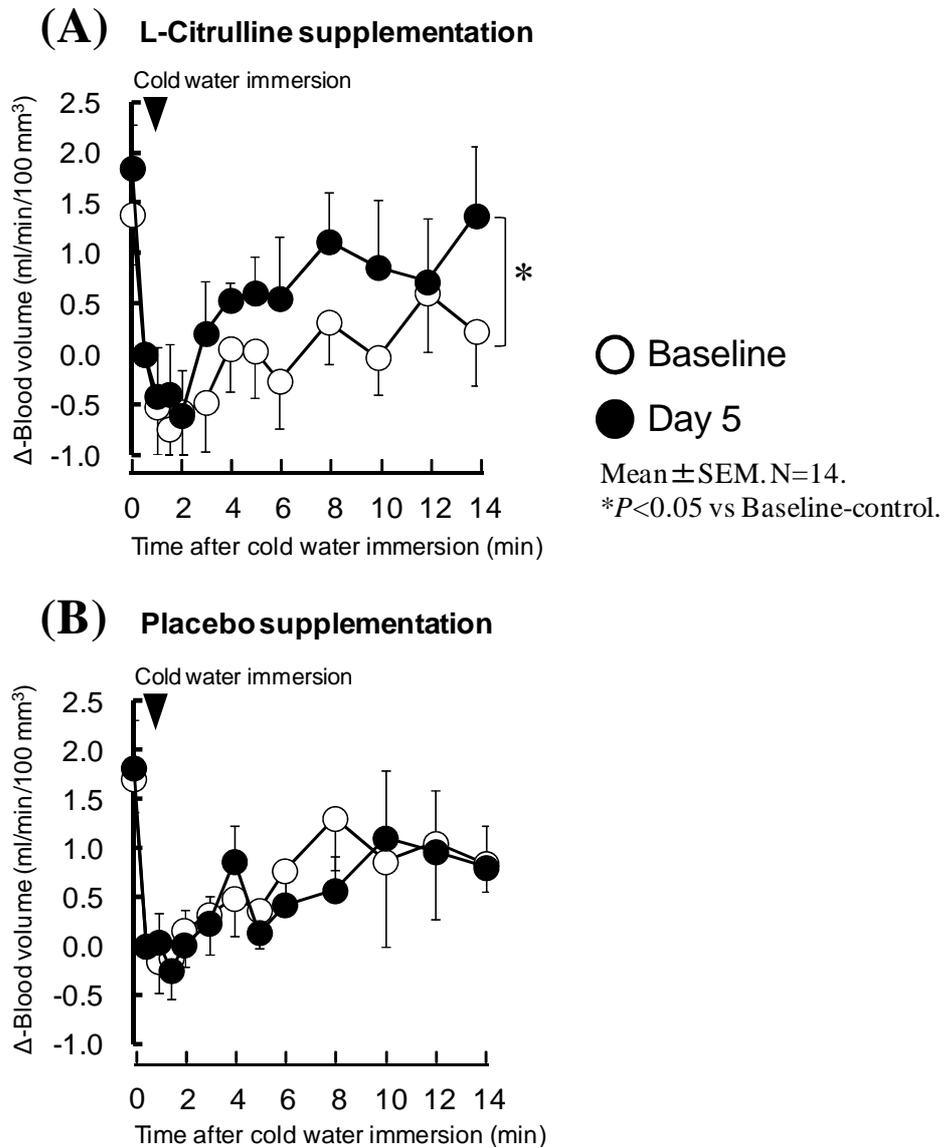
**Fig. 19 L-Citrulline または Placebo 摂取後の血漿 NOx レベルの変動と血漿 L-Arginine レベルとの相関性**

二重遮蔽、プラセボ対照、クロスオーバー比較試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 3.2 g、またはプラセボを 1~4 日目は就寝前に、5 日目は冷水負荷試験開始の 60 分前に摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline) および 5 日目の冷水負荷試験終了後に採血を行い、血漿 NOx レベルの分析に供した。

(A, B) L-Citrulline または Placebo 摂取後の血漿 NOx レベルの推移：N=14.

(C) L-Citrulline または Placebo 摂取後の血漿 NOx と L-Arginine レベルの相関性：N=14.

有意差の有無と P 値はグラフ中に記載した。NOx：nitrite:  $\text{NO}^{2-}$  + nitrate:  $\text{NO}^{3-}$ .



**Fig. 20** 冷水負荷試験における末梢血流量の経時変化

二重遮蔽、プラセボ対照、クロスオーバー比較試験により、被験者に1日あたり L-Citrulline 3.2 g (A)、またはプラセボ (B) を1~4日目は就寝前に、5日目は冷水負荷試験開始の60分前に摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline) および5日目に20°Cの水に1分間、手 (手首より先端) を浸漬させ、血管の収縮を惹起して血流の低下を誘導し、その後14分間の皮膚血流量の回復の推移を解析した。データは冷水負荷直後からの血流変化量 ( $\Delta$ -value) として示した。

各値は Means ± SEM を表す (N=14)。\**P*<0.05 vs Baseline control.

#### 4-4 考察とまとめ

本章では、L-Citrulline をヒトに摂取させた際の血中 L-Arginine と NO レベルの変動、さらには末梢血流への影響を一貫して評価すべく、ランダム化プラセボ対照クロスオーバー比較試験を行った。その結果、5 日間の L-Citrulline 摂取は血漿 L-Arginine 濃度と NO<sub>x</sub> 濃度を有意に上昇させ、これら両パラメーターの間には統計的に有意な正の相関があることが明らかとなった。続いて、NO 産生を血流変化として検知するため、冷水負荷により低下させた末梢血流の回復を経時的に評価した結果、L-Citrulline 摂取によって冷水負荷からの血流の回復が顕著に促進することを見出した。

L-Citrulline は腎臓で L-Arginine へと効率的に変換されるため [18]、ヒトでの L-Citrulline 摂取による血漿 L-Arginine レベルの上昇は第 1 章のラットにおける実験結果と一致した。一方、NOS は、通常の細胞内 L-Arginine 濃度において酵素反応の理論上、飽和レベルに達しており [19,59]、基質濃度としての L-Arginine が十分量存在していることから、血中で上昇した L-Arginine が NO 産生に有益に働くという本研究の理論と矛盾する。しかし、実際には L-Arginine 投与の研究からも血中 L-Arginine 濃度の増大は NO による生体反応を惹起する [12,13]。これはアルギニンパラドックスと呼ばれ [60]、eNOS や NO サイクルに関わる酵素は細胞膜構造カベオラに局在するため、サイトゾル中の L-Arginine は eNOS の反応に利用されにくく、細胞外からのアミノ酸の取り込みが eNOS の酵素反応に特に重要であると考えられている。最近、Shin らのグループ [61] は、血管内皮培養細胞を用いて詳細な検討を進め、血管内皮における NO 産生の規定因子は、細胞内ではなく、細胞外由来 L-Arginine であることを報告した。本試験では、L-Citrulline 摂取後の血漿 L-Arginine と NO レベルの上昇の間に有意な正の相関が認められたことから、血中の L-Arginine が Cationic amino acid transporter 1 (CAT-1) などの L-Arginine 輸送体により細胞内へ取り込まれ、より直接的に NO 産生を活性化したことが想定される。

また、L-Citrulline 摂取により血漿 L-Citrulline 濃度の著明な増加が認められた。L-Citrulline そのものの細胞への取り込み機序として興味深い知見がある。L-Arginine 欠乏条件の *in vitro* 実験において、L-Citrulline 投与は中性アミノ酸トランスポーターである SN1 により取り込まれ、eNOS 活性を維持し、NO 産生促進作用を示したという [19,35]。さらに、L-Citrulline から L-Arginine への変換を担う ASS、ASL はカベオラの eNOS 近傍に発現していることが報告されている [62]。このことから、L-Citrulline 摂取後に上昇した血漿 L-Arginine だけでなく、L-Citrulline 自体が直接細胞内へ取り込まれ NO 産生場で ASS、ASL を介して L-Arginine を供給し、eNOS の活性に有益な

作用を及ぼした機構も示唆された。この経路を実証するには、SN1 や ASS などの L-Citrulline 輸送体や代謝酵素をノックダウンし、L-Citrulline の取り込みを制限した条件で解析することが今後有用と思われる。

以上の結果から、本章ではヒトでの L-Citrulline 摂取は血漿 L-Arginine レベルを上昇させ、NO 産生を高めること、また血漿 L-Arginine と NO レベル上昇の間には有意な正の相関があることを臨床的に初めて明らかにした。さらに、血管への作用として L-Citrulline 摂取は、冷水負荷で血管収縮を誘導した後の末梢血流の回復を有意に促進することを見出した。以上より、ヒトにおいても L-Citrulline 摂取は L-Arginine の生物学的利用能を上昇させ、NO サイクルを活性化し血管機能を強化し得る可能性が示された。

## 第5章

### 健常成人における L-Citrulline 摂取が動脈伸展性に

### 及ぼす作用の臨床的解析

#### 5-1 目的

動脈硬化予防の観点からは、心血管疾患に繋がる臨床症状が発現する前に、動脈の質的变化を検知し、自らの血管機能に注意を払うことが重要である。動脈硬化の進展度の評価として、侵襲的な方法として血管造影による狭窄度評価、血管内視鏡や血管内超音波による診断が行われている [63]。さらに近年、動脈壁の硬化を反映する国際的な測定指標として Pulse wave velocity (PWV) が広く普及するようになった。PWV の算出は、心臓から駆出された血液の衝撃により生じた動脈の脈動が、脈波として末梢へ伝搬する速度論に基づいている [64]。従って、血管の伸展性が保たれている場合は、脈動の伝搬は遅くなるが、動脈が硬く血管壁が厚くなるに従い、PWV が速くなる。これまでの研究により、PWV は血管壁硬化の指標として臨床で多くのデータが集積され [65]、動脈伸展性の有用な指標として認識されている [66]。

著者によるこれまでの研究から、L-Citrulline は生体における L-Arginine の生物学的利用能を増進し、血管内皮において eNOS 発現を上昇させ、NO 産生系を賦活化する有用な作用を見出してきた。NO 産生系の低下は血管スティフネスを著明に悪化させることが報告されており [67]、L-Citrulline による NO-cGMP pathway の活性化を介し、動脈伸展性の改善が示せれば、動脈硬化性心血管疾患に対する予防素材として L-Citrulline が人々の健康に貢献できる可能性がある。

そこで本研究では、動脈壁硬化に係る血管スティフネスの指標として PWV を採用し、L-Citrulline 摂取が血管壁の硬化に如何にして影響するか、さらに、L-Arginine の生体利用能上昇と血管硬化度との関連性の機序をあわせて明らかにするため、ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験により検討した。

#### 5-2 実験材料および方法

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に従い、全ての被験者には研究目的、

研究内容・方法、試験食品、資料の保管について十分な説明を行ったうえで文書による同意を得た。また、日本橋循環器科クリニック試験委員会の承認の基に行われた。

## 被験者

45-64歳の健常男性100名の中から、Brachial-ankle PWV (baPWV) が心血管疾患リスクレベルのカットオフ値である  $> 1,400$  cm/s [68] であり、かつ腹囲  $> 85$  cm に該当する方として、15名を対象者とした。スクリーニング時のbaPWVの測定は、別日に2回測定し基準を満たし、かつ変動の少ない者を選抜した。医薬品、健康食品、サプリメント類を使用している者、糖尿病、肝疾患、腎疾患または心血管疾患のいずれかに該当する者、あるいは既往歴がある者、貧血症状のある者、心房細動等不整脈と診断された者、喫煙習慣を有する者、アミノ酸代謝異常のある者、過去3ヶ月以内に他の治験等に参加歴のある者は対象から除外した。また、動脈閉塞の評価基準 [66] とされる足関節/上腕血圧比 (ABI: ankle/brachial index) が $< 0.95$ の方は除外した。

## 試験期間および被験者への制限事項

被験者には試験期間を通して、暴飲暴食、過度の運動、睡眠不足を控えるよう指示し、生活習慣を大きく変えないこととした。測定前日よりカフェイン、アルコールを含む飲食物を避け、午後10時以降の絶食を依頼した。測定日当日は、検査2時間前にのりつきの米飯を2個摂取させ、検査終了まで試験食品以外絶食とした。

## 試験プロトコル

本研究は二重遮蔽、プラセボ対照、並行群間比較試験により実施した。被験者をランダムに2群に分け、1日あたりL-Citrulline 5.6 g (N=8) (協和発酵バイオ(株)製)、またはプラセボ (N=7) (主成分はコーンスターチ) をハードカプセルにより7日間摂取させた。なお、摂取1、7日目は測定60分前に、摂取2~7日目は朝食前 (2.4 g) と就寝前 (3.2 g) の2回に分け摂取させた。baPWVの測定は、試験食品の摂取前 (Baseline)、1日目の摂取60分後、ならびに7日目に実施し、各baPWV測定直後に採血を行った。また試験期間を通じ、測定時間は午前9時から正午の間であり、各被験者の測定時間は同一とした。

## Brachial-ankle PWV (baPWV) の測定

baPWVの測定は既報 [69] に準じ、Automatic waveform analyzer, Form PWV/ABI (BP-203RPEII, Colin Co., Komaki, Japan) を用いて測定した。baPWV測定時の留意点と

して下肢血流不全が存在すると、脈波の立ち上がりが遅延するため、動脈閉塞の評価基準 [66] とされる足関節/上腕血圧比 (ABI) が< 0.95の方は除外した。測定は24-26°Cに保たれた測定室でベッド上に仰向けになり、10分間の休息を取ってから実施した。まず心電図電極を両手首に付け、心音図センサーを左胸部へ装着した後、オシロメトリック自動血圧測定システムに繋がったプレチスモグラフィを内蔵した血圧計のカフを両上腕と両足首に巻いた。その後、心臓の収縮に伴う血液の駆出により生じた脈波を5分間集積し、脈動の伝搬速度を解析した。その際、5Hzのパスフィルターを使用してノイズを除去してから波形を集積した。PWVの計算は、 $PWV = \text{Distance (D: 上腕動脈-足首動脈間距離)} \div \text{Time delay } (\Delta T: \text{上腕-足首間の脈動の時間差}) \text{ m/sec}$  の原理に基づいた。

### 血漿アミノ酸、NO<sub>x</sub>、Asymmetric dimethylarginine (ADMA) の測定

既述のプロトコルに従い、採血後の血液は約 3 mL ずつ血清用真空採血チューブ (VP-P073K, テルモ(株))、および 2 mL ずつ EDTA-2Na 採血チューブ (VP-NA052K, テルモ(株)) に採血し、4°C、3,000G×10分遠心することで上清を分取した。アミノ酸分析には EDTA 血漿を用い、既報 [27] に準拠して行った。即ち、血漿に等量の 3% (w/v) スルホサリチル酸 (Wako chemicals) 水溶液を添加し混和後、氷上に 1 時間静置した。続いて 11,000G×15分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、全自動アミノ酸アナライザー (JLC-500/V, JEOL) を用いて分析した。NO<sub>x</sub> 分析には上述の手順で得た血清を用い、既報 [30] に準拠して行った。即ち、血漿に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に 15 分間静置した。続いて 11,000G×10分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を 0.45 μm のフィルターに通した後、酸化窒素 (NO<sub>x</sub>) 分析システム (ENO-10, Eicom) を用いて定量分析した。内因性 NOS 阻害物質である Asymmetric dimethylarginine (ADMA) の定量は、血清に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に 15 分間静置し既述の通り除タンパク質を行った。続いて、上清を 0.45 μm のフィルターに通し Vallance ら [70] の方法を参考に HPLC により検出した。

### 統計解析

結果は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。対応連続データ間の有意差は、paired *t*-test を用いて検定した。独立 2 群間の群間比較には unpaired Student's *t*-test を用いた。パラメータ間の相関性は Spearman's correlation test により解析した。有意水準は危険率 5% 未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

### 5-3 実験結果および図表

#### 被験者の背景因子 (Table. 3)

被験者の背景因子を Table. 3 に示した。本試験では、動脈壁硬化度をあらかず baPWV が心血管疾患リスクレベルのカットオフ値である  $> 1,400$  cm/s [68] であり、かつ腹囲長  $> 85$  cm に該当する方、15 名を対象とした。被験者の年齢は平均 58 歳、BMI 25 前後の肥満型であり、これら基準で選抜することにより正常高値血圧の方が集まった。被験者の baPWV の初期値は平均 1,600 cm/s であり、上述の baPWV カットオフ基準から、心血管疾患リスクに該当する集団であった。なお、初期値において各パラメータで群間差はなかった。

#### L-Citrulline または Placebo 摂取後の血清 NOx および血漿 L-Arginine レベルの変化 (Fig. 21)

二重遮蔽、プラセボ対照、並行群間比較試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 5.6 g、またはプラセボを 7 日間摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline)、1 日目の摂取 60 分後、ならびに 7 日目に実施した baPWV 測定直後に採血し、血清 NOx、血漿 L-Arginine 濃度を定量した。その結果、試験期間を通じ、プラセボ群では血清 NOx 濃度に変動は認められなかったが、L-Citrulline 群では Baseline と比較し摂取 7 日目に有意な血清 NOx 濃度の上昇がみられた (Fig. 21 (A))。また、血漿 L-Arginine レベルは、7 日間の摂取後においてプラセボ群に対し、L-Citrulline 群で有意に高値であった (Fig. 21 (B))。

#### L-Citrulline または Placebo 摂取後の baPWV の推移 (Fig. 22)

続いて、本章の主要評価項目である動脈壁硬化の推移を調べるため、試験食品の摂取前 (baseline)、1 日目の摂取 60 分後、ならびに 7 日目に、心臓の収縮に伴う血液の駆出により生じた脈波を 5 分間集積し、脈動の伝搬速度として baPWV を計測した。1 日目の摂取 60 分後においてはプラセボ群に対し、L-Citrulline 群で改善傾向を示したが、有意差はみられなかった。一方、摂取 7 日目の測定において、プラセボ群と比較し L-Citrulline 群では有意な baPWV の改善が認められた (Fig. 22 (A))。この時、Baseline との比較においても L-Citrulline 群では有意に baPWV が低下していた。さらに、個人別の変動を解析すると、L-Citrulline 群では全例で摂取後に baPWV が改善したが、プラセボ群では著明な影響は観察されなかった (Fig. 22 (B))。

### **L-Citrulline または Placebo 摂取後の baPWV 変化における血圧の影響 (Fig. 23)**

baPWV は血圧による圧負荷によっても血管壁張力が増大し、値が上昇するため、L-Citrulline 群において有意な baPWV の改善が認められた摂取7日目データについて、baPWV の変化における血圧の影響を相関解析した。その結果、本試験でみられた baPWV の変動と血圧変化との間に相関性は存在せず、baPWV の改善は血圧非依存的であることが分かった (Fig. 23)。

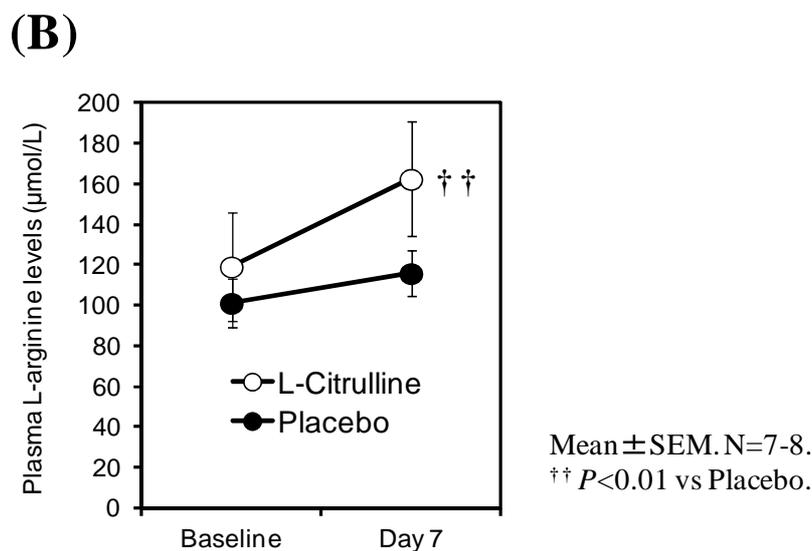
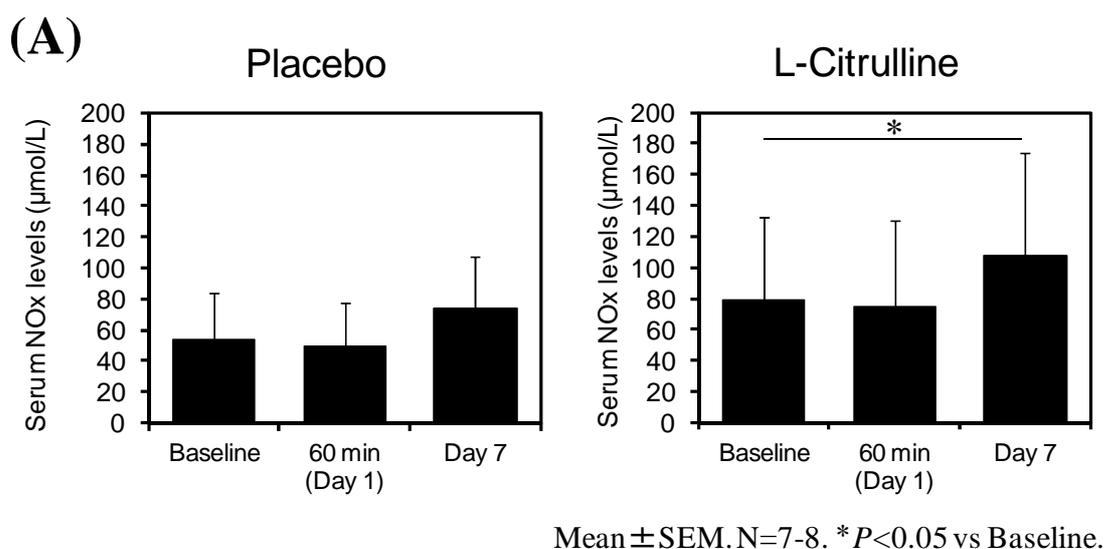
### **L-Citrulline または Placebo 摂取後の血中 L-Arginine/ADMA 比、および血漿 L-Arginine レベルと baPWV 変化の相関性 (Fig. 24)**

そこで、L-Citrulline による baPWV の低下が NO を介した機能的な血管スティフネスの改善であることを検討するため、内因性 NO 産生マーカーである血中 L-Arginine/ADMA 比を解析した。その結果、L-Citrulline 摂取はプラセボ群と比較し、有意に血中 L-Arginine/ADMA 比の増大をもたらした (Fig. 24 (A))。さらに、摂取7日目データについて、血漿 L-Arginine レベルと baPWV 変化の関連性を相関解析したところ、両者の間に有意な負の相関が認められ、L-Citrulline 摂取による血漿 L-Arginine レベルの増加に伴って baPWV が低下したことが明らかとなった (Fig. 24 (B))。

**Table. 3** 被験者の背景因子

Characteristics	Placebo	L-Citrulline	P-value
	N = 7	N = 8	
Age (year)	58±3.9	58.5±5.0	0.834
Height (cm)	167.1±5.5	172.5±5.0	0.068
Weight (kg)	69.6±7.8	75±8.9	0.235
BMI	24.9±2.2	25.2±2.4	0.840
Waist circumference (cm)	91.8±5.1	93.4±5.2	0.550
Systolic BP (mm Hg)	130.9±9.3	135.5±13.3	0.454
Diastolic BP (mm Hg)	84.6±6.8	82.4±7.5	0.578
Heart rate (beats/min)	71.9±10.8	64.8±10.0	0.208
baPWV (cm/sec)	1,600.8±99.5	1,577.8±77.7	0.623

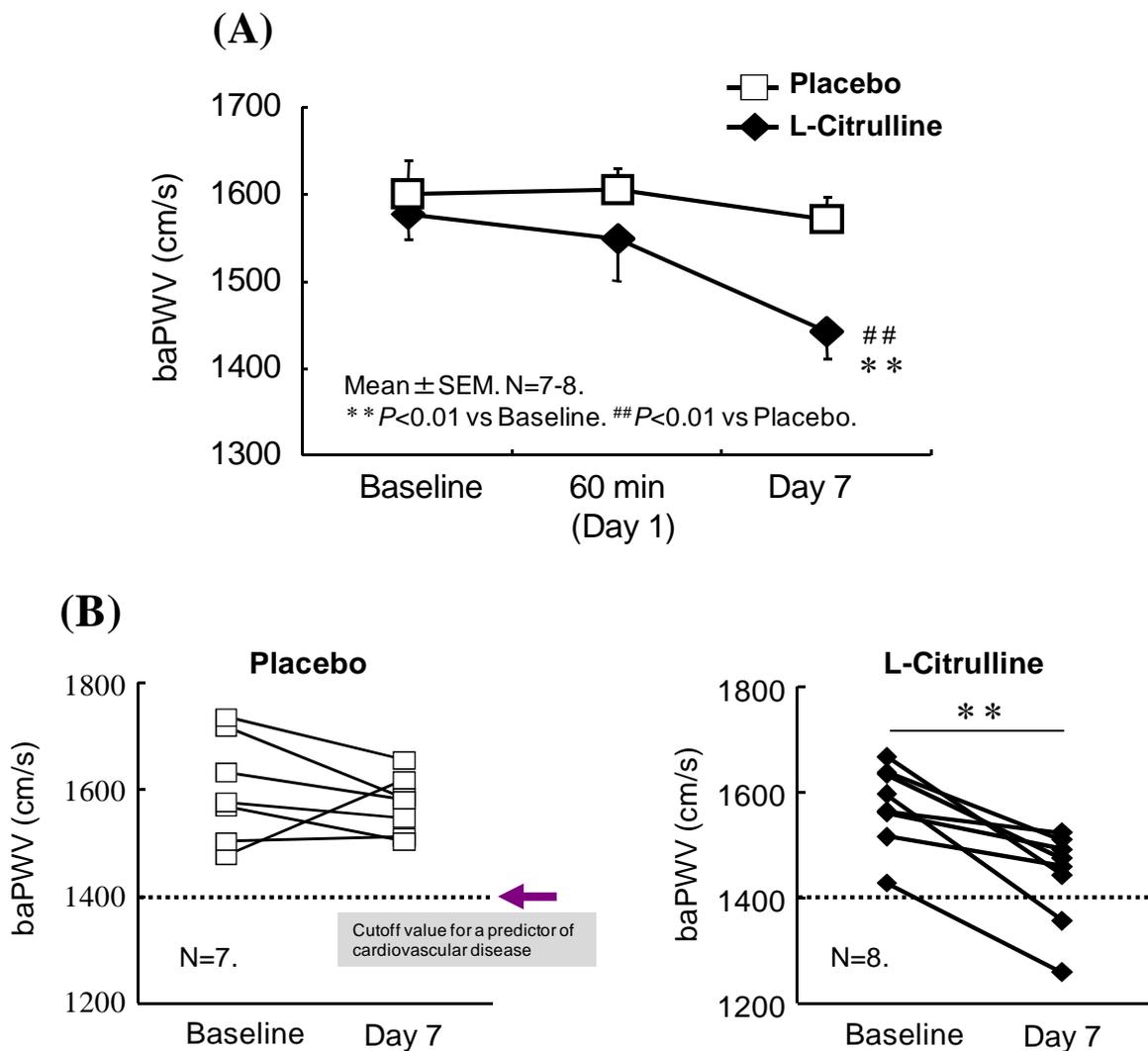
各値は Means ± SEM を表す (N=7~8)。BMI: body mass index, BP: blood pressure.



**Fig. 21 L-Citrulline または Placebo 摂取後の血清 NOx および血漿 L-Arginine レベルの変化**

二重遮蔽、プラセボ対照、並行群間比較試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 5.6 g、またはプラセボを 7 日間摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline)、1 日目の摂取 60 分後、ならびに 7 日目に実施した baPWV 測定直後に採血し、血清 NOx (A)、血漿 L-Arginine (B) レベルの分析に供した。

各値は Means ± SEM を表す (N=7-8)。\* $P < 0.05$  vs Baseline. <sup>††</sup> $P < 0.01$  vs Placebo. NOx : nitrite: NO<sup>2-</sup> + nitrate: NO<sup>3-</sup>.



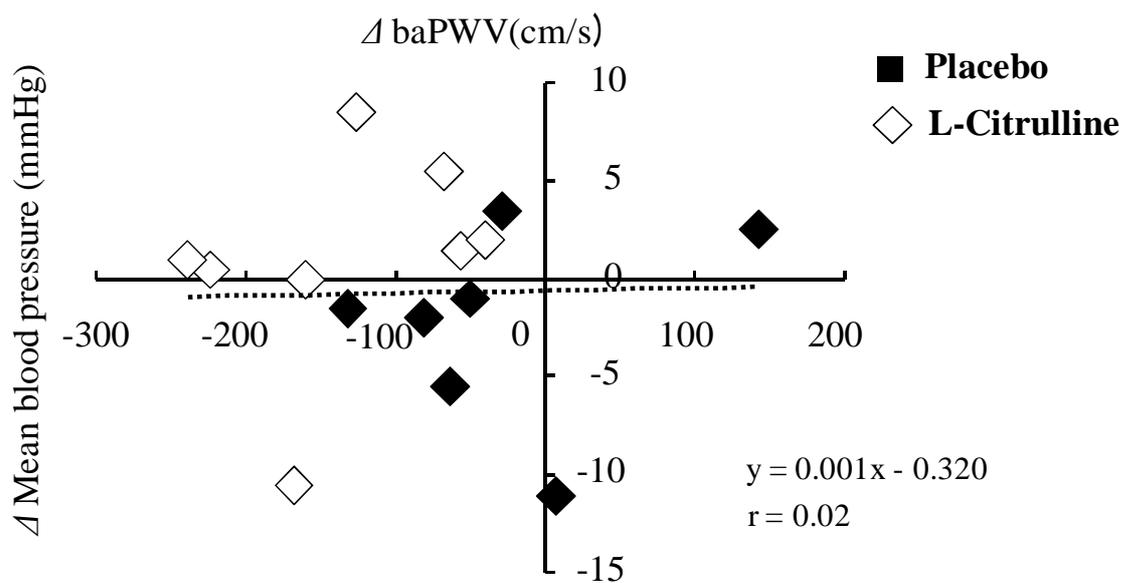
**Fig. 22 L-Citrulline または Placebo 摂取後の baPWV の推移**

二重遮蔽、プラセボ対照、並行群間比較試験により、被験者に1日あたり L-Citrulline 5.6 g、またはプラセボを7日間摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline)、1日目の摂取60分後、ならびに7日目に、心臓の収縮に伴う血液の駆出により生じた脈波を5分間集積し、脈動の伝搬速度として baPWV を解析した。血管の柔軟性が保たれている場合は、脈動の伝搬は遅くなるが、動脈が硬く血管壁の伸展性が失われると、PWV は速くなる。

(A) baPWV 平均値の推移：N=7-8.

(B) baPWV 各個人値の推移：N=7-8.

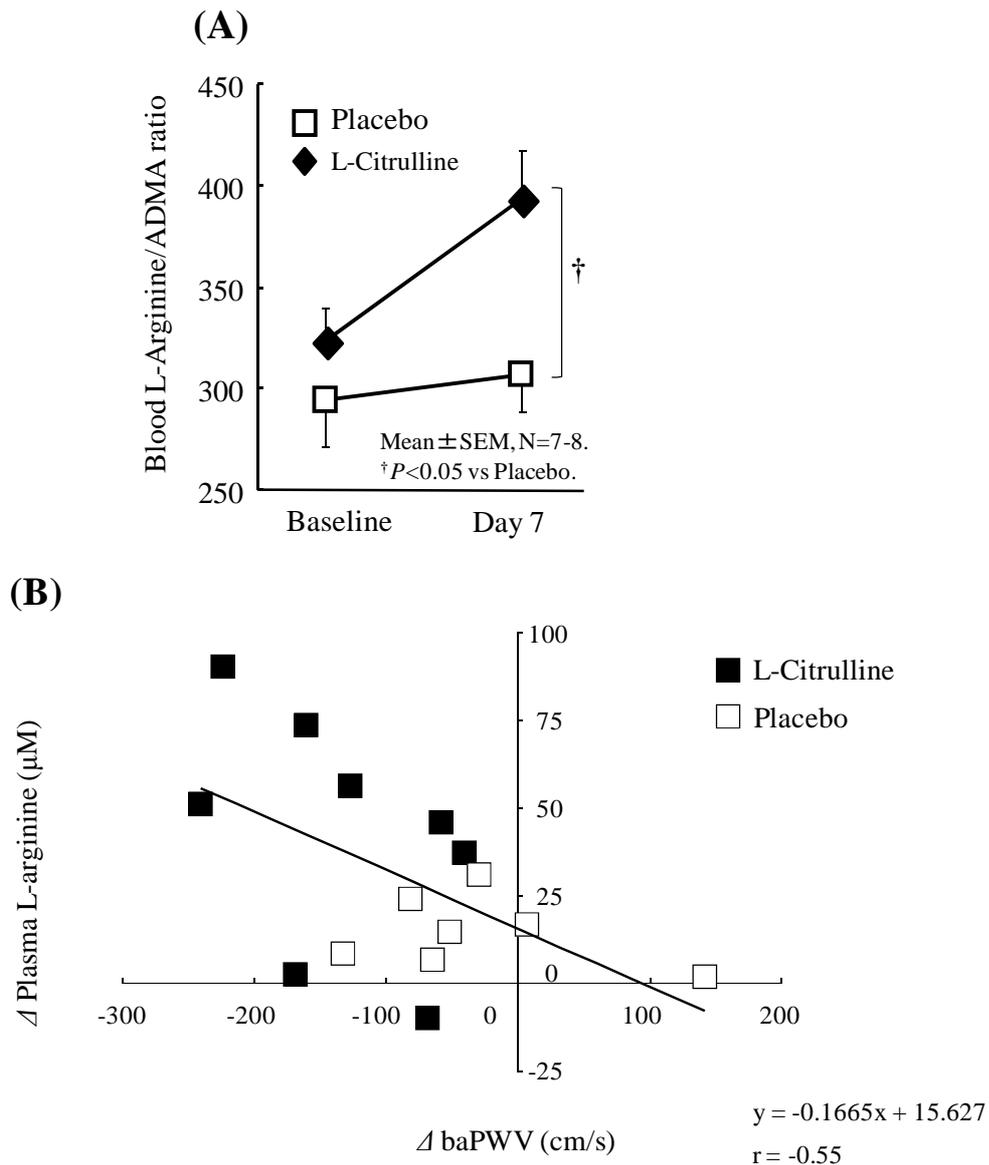
各値は Means ± SEM を表す。\*\*P<0.01 vs Baseline. ##P<0.01 vs Placebo. baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity.



**Fig. 23 L-Citrulline または Placebo 摂取後の baPWV 変化における血圧の影響**

二重遮蔽、プラセボ対照、並行群間比較試験により、被験者に1日あたり L-Citrulline 5.6 g、またはプラセボを7日間摂取させた。L-Citrulline 群において有意な baPWV の改善が認められた摂取7日目データについて、baPWV の改善における血圧の影響を相関解析した。

N=15. baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity.  $r = 0.02$  で相関は認められず。



**Fig. 24 L-Citrulline または Placebo 摂取後の血中 L-Arginine/ADMA 比、および血漿 L-Arginine レベルと baPWV 変化の相関性**

二重遮蔽、プラセボ対照、並行群間比較試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 5.6 g、またはプラセボを 7 日間摂取させた。

(A) 摂取前 (baseline)、ならびに 7 日目に実施した baPWV 測定直後に採血し、内因性 NO 産生マーカーである血中 L-Arginine/ADMA 比を解析した。各値は Means  $\pm$  SEM を表す (N=7-8)。 $\dagger P < 0.05$  vs Placebo. ADMA: asymmetric dimethylarginine.

(B) L-Citrulline 群において有意な baPWV の改善が認められた摂取 7 日目データについて、血漿 L-Arginine レベルと baPWV の変化の関連性を相関解析した。N=15. baPWV: brachial-ankle pulse wave velocity.  $r = -0.55$  で有意な負の相関あり。

## 5-4 考察とまとめ

PWV の上昇、即ち血管壁硬化の亢進は、心血管イベントや脳卒中などの独立した強力なリスク因子となることが報告されている [64]。血管スティフネスは、加齢、喫煙、糖尿病、閉経、高血圧、脂質異常症など多くの要因によって悪化し得るが、医学的に血管スティフネス亢進に対する予防の重要性が認識され、血管伸張性を正常かつ柔軟に保つことが、将来の心血管疾患の発症を未然に防ぐうえで極めて重要であると考えられる [63]。そこで本章では L-Citrulline の臨床上的有用性を明らかにするため、血管伸展性への影響を主要評価として、baPWV のリスクカットオフ値である  $>1,400$  cm/s の中高年男性を選抜し、ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。その結果、プラセボ群と比べ、L-Citrulline 摂取によって baPWV の値が有意に低下し、血管弾性の改善が認められた。

PWV は血圧の影響を受け、昇圧時ほど血管壁張力が悪化しコンプライアンスが低下するので PWV は速くなる [66]。従って、PWV で表される血管スティフネスは血圧による血管への圧負荷にも関連した数値であり、PWV は降圧作用によっても理論上改善される。一方、Fitch ら [67] は NOS 阻害剤を用いた *in vivo* 検討から、内因的な NO 産生系は血管機能の調節に必須であり、血圧非依存的に PWV、即ち血管の柔軟性に影響することを示している。本研究では baPWV と血圧の関連性を解析したところ、L-Citrulline 摂取による PWV の改善は血圧非依存的であったことから、NO 産生系を介した機能的改善であることが示唆される。実際に、内因的 NO 産生マーカーである血中 L-Arginine/ADMA 比は L-Citrulline 群でのみ有意に上昇し、この時、血漿 L-Arginine 濃度の上昇と baPWV 低下の間には、有意な逆相関が存在した。このことは、L-Citrulline が eNOS への L-Arginine の利用能を向上することで、血圧による血管コンプライアンスの変化とは非依存的に、血管スティフネスを改善したことを支持する結果と考えられる。

心血管疾患のリスク因子によって、第一に血管の形態学的変化よりも血管の伸展性、柔軟性の悪化がもたらされるが、これには血管内皮からの NO 産生の低下が関わることが知られている。NO の低下によって動脈の弾性が失われ、PWV が上昇する [67,71]。また NO ドナーであるアセチルコリン投与により、PWV が減少することも明らかにされている [72]。これらの成績は NO の生物学的活性を向上することが、動脈の伸展性改善に重要であることを意味し、本研究の結果とも一致するものである。

よって、平滑筋の血管内膜への遊走や血管繊維化、内膜肥厚といった血管のリモデリングが進む前に、より初期の段階から NO の生物学的利用能を向上する手段を講じ

ておくことは医学的に意義が大きい戦略と考えられる。

以上、本章ではランダム化プラセボ対照並行群間比較試験により、baPWV が $>1,400$  cm/s の中高年男性に L-Citrulline を 7 日間摂取させた結果、L-Citrulline 群ではプラセボ群と比べ血圧非依存的に baPWV を有意に低減することが明らかとなった。さらに、L-Citrulline 摂取による血漿 L-Arginine 濃度の上昇と baPWV 低下の間には有意な負の相関が認められたことから、L-Citrulline は eNOS への L-Arginine 利用能を促進し血管内皮細胞からの NO 産生を増加させることにより、血管弾性の機能的改善をもたらしたことが推察された。

本章では動脈伸展性および L-Arginine の生物学的利用能上昇と血管硬化度との関連性に着目し解析したが、今後は動脈硬化発症の第一段階として重要な位置を占める「血管内皮障害」における L-Citrulline の作用機序の深耕が極めて重要な研究課題になると考えられる。そこで次章では、血管内皮機能を基盤とした L-Citrulline の作用の全体像を明らかにすることを試みた。

## 第6章

### 血管内皮機能に及ぼす L-Citrulline 摂取の臨床的解析

#### — 冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験 —

##### 6-1 目的

動脈硬化の進展において、血管内皮の障害を第一段階とする血管の慢性炎症や血管トーンスの悪化は、心血管疾患合併症を助長する重要な因子である [4]。血管内皮は血管構造の最も内腔で血液と直接接する一層の細胞層であり、多くの生理活性物質を産生するが、特に eNOS 由来の NO は内皮を介した血管の拡張や活性酸素による炎症反応の制御に重要な役割を演じている。

実際に、血管内皮機能障害のレベルにより高血圧患者を3層に分け追跡したプロスペクティブ研究 [73] において、血管内皮障害が発現している群は心血管イベントの発症が3倍を超えたことから、血管内皮障害が心血管合併症を惹起する規定因子であることが見てとれる。同様に、血管内皮の障害が心血管イベントの発症を上方制御することは過去、多くの研究で報告されてきた [2,3,74]。

血管内皮障害に焦点を当てた予防戦略を立てるうえで、血管内皮障害の加速因子を理解することは重要である。内皮障害の過程では、血管平滑筋細胞の遊走・増殖、NOを不活性化するスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) の増加、血小板凝集、eNOSの補酵素であるBH<sub>4</sub>レベルの低下、血管内膜への炎症細胞の浸潤、NOSの内因性阻害物質であり循環器疾患で増大するADMAの生成など、数多くの要因が複合的に関わる。その中でも活性酸素種によって生成される酸化Low density lipoprotein (LDL) の増大は、血管内皮の質的变化とアテロームプラーク形成などの形態的变化の双方において、血管内皮の不安定化を助長する最大の因子の1つである [75,76]。血管内皮が障害されると、単球が内皮に接着し内皮下層に遊走した後、マクロファージへと分化・成熟する。マクロファージは、Lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) をはじめとするスカベンジャー受容体を介し、酸化変性LDLを細胞内へ取り込み、最終的に泡沫細胞へ変化し内膜下でプラークを形成する [77]。

これら事実に照らし、血管機能不全の予防および治療的観点で包括的な研究を進めるには、血管壁硬化度などの表現型のみならず、血管内皮機能ならびに酸化 LDL レ

ベルの制御といったその障害因子まで多角的に評価することが極めて重要と考えられる。

そこで本章では、強い血管内皮機能不全を有する冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験を行い、L-Citrulline 継続摂取が血管内皮機能に及ぼす有益性を臨床的に評価した。さらにその機序として、これまで L-Citrulline との関連が十分に検討されていなかった血管内皮の最大の障害因子の 1 つである LDL の酸化変性に与える影響も含め多角的に解析した。これにより、L-Citrulline の臨床適用に向け、作用機構の全容解明に迫った。

## 6-2 実験材料および方法

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に従い、全ての被験者には研究目的、研究内容・方法、試験食品、資料の保管について十分な説明を行ったうえで文書による同意を得た。また、築地ふたばクリニック臨床試験倫理委員会の承認の基に行われた。

### 被験者

41-64 歳の冠動脈攣縮性狭心症と診断された 34 名の中から、下記の選択基準および除外基準に合致する 25 名を選抜した。そのうち 3 名は、本試験と関連のない医学的事由から、医師の判断により除外した。従って、男性 7 名、女性 15 名、平均年齢 57 歳の冠動脈攣縮性狭心症患者 22 名を解析対象者とした。全ての被験者は、血管内皮機能をあわらず Flow-mediated dilation (FMD : 血流依存性血管拡張反応) の値が、血管内皮機能不全のカットオフ [78] とされる 5.5 % 以下であった。また、狭心症の症状がニトログリセリンで消失し、カテーテル検査及び CT 検査により有意な冠動脈狭窄が無い者を選抜した。試験期間を通し、被験者の医学的所見は医師により管理され、従来問診、治療は継続した。健康食品、サプリメント類を使用している者、糖尿病、肝疾患、または腎疾患のいずれかに該当する者、あるいは既往歴がある者、アミノ酸代謝異常のある者は対象から除外した。

### 試験期間および被験者への制限事項

被験者には試験期間を通して、暴飲暴食、過度の運動、睡眠不足は控えるよう指示し、生活習慣を大きく変えないこととした。測定 2 日前よりカフェイン、アルコールを含む飲食物を避け、測定当日は、医師より常用を指示されている医薬品以外、絶食

とした。なお、被験者の医学的症候等は、従来通り医師の問診により確認された。

## 試験プロトコル

本研究はオープンデザインにより実施した。被験者に1日あたり L-Citrulline 800 mg (協和発酵バイオ(株)製) をハードカプセルにより8週間、就寝前に摂取させた。測定、検査は摂取前 (Baseline)、摂取4, 8週目、および摂取終了4週間後 (12週目) にかけて経時的に4回実施し、FMDの測定後、採血を行い以後の分析に供した。試験期間を通し、測定時間は午前9時から正午の間に統一した。

### Flow-mediated dilation (FMD : 血流依存性血管拡張反応) の測定

FMD は、駆血状態から動脈を解放することに伴う反応性充血に基づき、駆血解放後に一過的に増大する血流の血管内皮への張り応力に応じた、主としてNOを介する血管内皮依存的な拡張能の測定方法である。ゴールドスタンダードな非侵襲的内皮機能診断法として臨床で広く用いられている。FMD測定は、室温を22~26°Cに設定した検査室で行い、10-MHzのプローブを併設したFMD測定システム (UNEXEF18G; UNEX Corporation, Nagoya, Japan) を用いて計測した。被験者は仰臥位で10分以上安静にした後、上腕動脈血管内腔径を超音波エコーで測定し、血圧を記録した。次に前腕上部をカフで収縮期血圧に50 mmHgの圧を加え5分間加圧することで駆血した。加圧を解放後、反応性充血に基づく上腕部血流増加による血管内腔径の変化を同様に2分間測定した。拡張率は  $FMD (\%) = ((\text{最大拡張血管径} - \text{安静時血管径}) \div \text{安静時血管径}) \times 100$  として算出した。最大拡張血管径は駆血解放後45~60秒後に観察された。

### 血漿アミノ酸、NOx、Asymmetric dimethylarginine (ADMA) 濃度の測定

採血後の血液は血清用真空採血チューブ (テルモ(株))、およびEDTA-2Na採血チューブ (テルモ(株)) に採血し、4°C、3,000G×10分遠心することで上清を分取した。アミノ酸分析にはEDTA血漿を用い、既報 [27] に準拠して行った。即ち、血漿に等量の3% (w/v) スルホサリチル酸 (Wako chemicals) 水溶液を添加し混和後、氷上に1時間静置した。続いて11,000G×15分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を0.45 μmのフィルターに通した後、全自動アミノ酸アナライザー (JLC-500/V, JEOL) を用いて分析した。NOx分析には上述の手順で得た血漿を用い、既報 [30] に準拠して行った。即ち、血漿に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に15分間静置した。続いて11,000G×10分遠心することでタンパク質画分を除去し、上清を0.45 μmのフィルターに通した後、酸化窒素 (NOx) 分析システム (ENO-10, Eicom) を用いて定量

分析した。内因性 NOS 阻害物質である ADMA の定量は、血清に等量のメタノールを添加し混和後、氷上に 15 分間静置し既述の通り除タンパク質を行った。続いて、上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターに通し、Vallance ら [70] の方法を参考に HPLC により検出した。

### 血清酸化 LDL、Lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) 関連マーカーの測定

Small dense LDL の測定は [79] に報告された定法に準拠し、電気泳動を用いた LDL の亜分画の分離と粒子径 255  $\text{\AA}$  以下の LDL 粒子を検出する 2 ステップからなる Lipoprint<sup>TM</sup> System のプロトコルに従って測定した。血清を 8 倍量の Sudan black b 色素の入ったローディング溶液と混和後、3 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、約 1 時間泳動した。続いて、ポリアクリルアミドゲルにより分離されたリポタンパク質の分子サイズを、陰極側から VLDL, MID, LDL, HDL として同定し、バンドの濃さをデジタル処理して粒子径 255  $\text{\AA}$  以下の LDL 亜分画の濃度を算出した。

血清酸化 LDL の測定は、抗 MDA 抗体を用いた Oxidized LDL サンドイッチ ELISA 測定キット (Cosmo Bio Co., LTD., Tokyo, Japan) を使い、プロトコル指示書に従って測定した。酸化 LDL 受容体の Lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) に結合活性を有する変性酸化 LDL である血清中 LOX-1 ligand containing ApoB (LAB) 濃度は、リコンビナント LOX-1 を固相化した High-sensitivity ELISA system (Biomarker Science Co. Ltd., Osaka Japan) [80] により定量した。即ち、ヒトリコンビナント LOX-1 が固相化されたプレートを 3 % BSA を加えた HEPES バッファー (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0) にてブロッキングし、PBS で 3 回洗浄後、血清サンプル 40  $\mu\text{L}$  をウェルに加え、室温で 2 時間インキュベーションした。なお、血清サンプルは、High-sensitivity ELISA system の 2 mmol/L EDTA, 5 % BSA-HEPES バッファー (pH 7.0) で 20 倍希釈した。続いて、2 mmol/L EDTA, 5 % BSA-HEPES バッファー (pH 7.0) に溶解した chicken monoclonal anti-ApoB antibody で 1 時間処理後、PBS で 3 回洗浄した。その後、2 mmol/L EDTA, 5 % BSA-HEPES バッファー (pH 7.0) に溶解した peroxidase-conjugated donkey antichicken IgY で 1 時間反応させ、PBS で 5 回洗浄した。得られた酵素標識 ApoB を peroxidase 活性に基づき発色させ、450 nm の吸光度を測定することにより強度を定量した。

血管内皮細胞やマクロファージに発現する LOX-1 レベルを近似する血清中 Soluble LOX-1 は anti-human LOX-1 antibody を固相化した High-sensitivity ELISA system (Biomarker Science Co. Ltd., Osaka Japan) [80] により定量した。即ち、anti-human LOX-1 antibody を固相化したプレートを 20 % Immuno Block (DS Pharma Biomedical, Osaka,

Japan) にてブロッキングし、PBS で3回洗浄後、血清サンプル 40  $\mu$ L をウェルに加え、室温で2時間インキュベーションした。なお、血清サンプルは、High-sensitivity ELISA system の1% BSA, 0.04% Tween20, 2 mmol/L EDTA を含む PBS で4倍希釈した。続いて、PBS で3回洗浄後、0.04% Tween20, 2 mmol/L EDTA を含む PBS に溶解した chicken monoclonal anti-human LOX-1 antibody で室温にて1時間処理し、PBS で3回洗浄した。その後、同様に peroxidase-conjugated donkey antichickens IgY を含む抗体溶液に置換し1時間反応させ、PBS で5回洗浄した。得られた酵素標識 Soluble LOX-1 を peroxidase 活性に基づき発色させ、450 nm の吸光度を測定することにより強度を定量した。

### LOX-1 index の算出

Inoue ら [80] の報告に基づき、「血清 LAB 濃度  $\times$  血清 Soluble LOX-1 濃度 = LOX-1 index」として計算した。

### 血液生化学、血液学検査

Table. 5 に示したその他の血液生化学検査項目（一般健診項目）は、本試験は患者対象試験であることから、三菱化学メディエンス株式会社中央総合ラボラトリーへ血液サンプルは送付され、臨床検査定法により一括測定された。

### 統計解析

結果は平均値  $\pm$  標準誤差 (SEM) で示した。Baseline と摂取後の対応2点間データの有意差は、paired *t*-test を用いて検定した。連続変数の群内比較には One-way Analysis of Variance (ANOVA) に続き、Bonferroni correction for multiple tests を用いて各測定点の有意差を求めた。有意水準は危険率5%未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとした。

## 6-3 実験結果および図表

### 被験者の背景因子 (Table. 4)

被験者の背景因子を Table. 4 に示した。本試験では、血管内皮機能をあわらず FMD の値が、血管内皮機能不全とされる5.5%以下である冠動脈攣縮性狭心症患者22名を対象とした。被験者の平均年齢は57歳、男性7名、女性15名であり、拡張期血圧、収縮期血圧ともに正常範囲の集団であった。

## 被験者の血液生化学検査値（一般健診項目）および血漿アミノ酸、NO<sub>x</sub> レベルの推移 (Table. 5)

FMD の値が、血管内皮機能不全とされる 5.5 % 以下である冠動脈攣縮性狭心症患者 22 名を対象とした介入試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 800 mg を 8 週間摂取させた際の各血液生化学検査値を Table. 5 に示した。L-Citrulline 摂取前後の血液臨床検査値（一般採血健診項目）は臨床的に有意な変動は認められず、8 週目で Baseline と比べ HDL コレステロールが有意に低下したが、正常範囲内の変化であった。血漿 L-Arginine 濃度は L-Citrulline 摂取 8 週目で有意に増大した。また、L-Citrulline 摂取後に血漿 NO<sub>x</sub> レベルは、Baseline の約 33 μM から、4 週目で約 54 μM、8 週目で約 47 μM まで上昇し、高値傾向を示した。

## L-Citrulline 摂取による血流依存性血管拡張反応 (Flow-mediated dilation: FMD) の推移 (Fig. 25)

そこで、試験食品の摂取前 (baseline)、摂取 4、8 週間後、ならびに 12 週後に FMD を測定し、NO に介在される血管内皮機能を評価した。今回、対象とした冠動脈攣縮性狭心症患者においては、血管内皮依存性血管拡張反応である FMD の初期値が約 3.2 % と強い血管内皮障害が観察されたが、L-Citrulline 摂取 4 週目から有意な改善が認められ、8 週目には約 4.1 % まで有意に向上した。また、摂取を止めた 4 週間後 (12 週目) においても効果が継続していた (Fig. 25)。

## L-Citrulline 摂取による血清中酸化 LDL 関連マーカーの変化 (Table. 6)

続いて、L-Citrulline 摂取による血管内皮の障害因子への影響を検討するため、血中酸化 LDL 濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。興味深いことに、血管内皮下においてアテローム性プラークの形成に関与する血清中酸化 LDL 濃度は、L-Citrulline 摂取後に有意に低下した。さらに、酸化 LDL の血管における動態を考慮した際、血管内膜へ取り込まれる特徴がより重要であるとの観点から、酸化 LDL 受容体 LOX-1 に結合活性を有する変性酸化 LDL である血清中 LAB 濃度を High-sensitivity ELISA 法により定量した結果、L-Citrulline 摂取後に有意な低下が認められた。冠動脈疾患のリスクファクターの LOX-1 index は、Baseline の約 3,540 から L-Citrulline 摂取後に約 2,890 まで低下する傾向がみられた (Table. 6)。

## L-Citrulline 摂取による血漿 ADMA 濃度、L-Arginine/ADMA 比の変化 (Fig. 26)

次に NOS の内因性阻害物質である血漿 ADMA 濃度、および内因性 NO 産生活性の

マーカーである L-Arginine/ADMA 比の変化を Fig.26 (A, B) に示した。血漿 ADMA 濃度は L-Citrulline 摂取 8 週目で有意に低下し、L-Arginine/ADMA 比は L-Citrulline 摂取 8 週後に有意に増加する作用が見出された。

**Table. 4** 被験者の背景因子

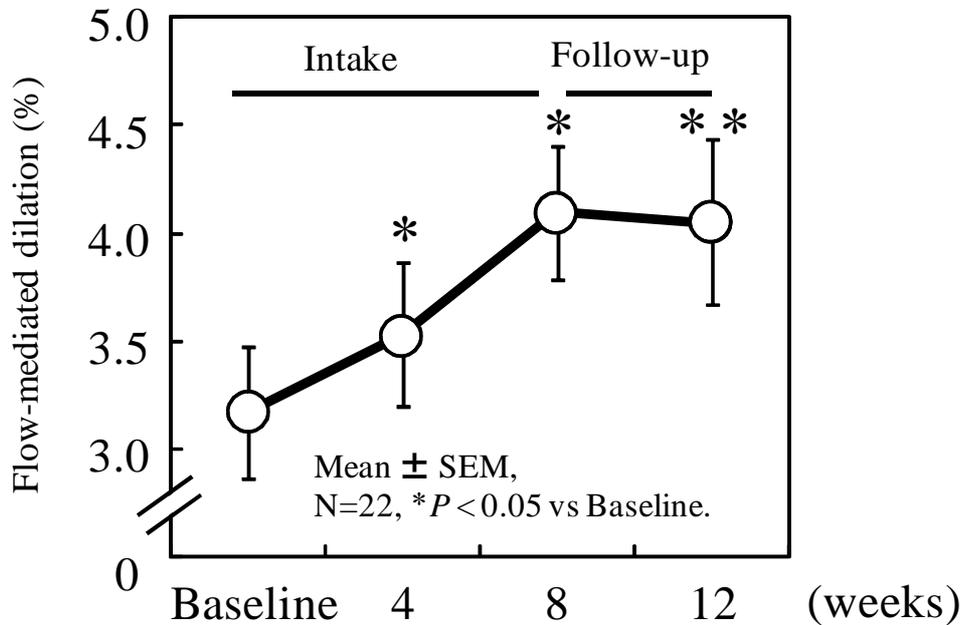
Study period (week)	Intake			Follow-up
	Baseline	4	8	12
Age (years)	57.0 ± 1.3	—	—	—
Sex (Male/Female)	7 M, 15 F			
Height (cm)	159.7 ± 1.7	—	—	—
Weight (kg)	57.2 ± 2.1	—	—	—
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.4 ± 0.7	—	—	—
Systolic blood pressure (mmHg)	117.0 ± 2.9	114.9 ± 2.6	117.9 ± 2.7	117.1 ± 2.8
Diastolic blood pressure (mmHg)	69.0 ± 1.8	68.2 ± 1.7	67.9 ± 1.6	66.1 ± 1.8
Heart rate	68.7 ± 2.7	65.6 ± 2.8	65.5 ± 2.7	65.9 ± 2.7

各値は Means ± SEM を表す (N=22)。

**Table. 5** 被験者の血液生化学検査値（一般健診項目）および血漿アミノ酸、NOx レベルの推移

Study period (week)	Intake			Follow-up
	Baseline	4	8	12
Glucose (mg/dl)	88.9 ± 2.7	88.2 ± 1.7	88.7 ± 2.4	88.3 ± 2.1
Total cholesterol (mg/dl)	199.6 ± 6.7	198.0 ± 6.0	195.5 ± 5.6	195.4 ± 6.1
Triglycerides (mg/dl)	109.8 ± 13.2	115.2 ± 12.9	115.0 ± 18.1	110.2 ± 11.4
LDL cholesterol (mg/dl)	109.5 ± 5.7	110.4 ± 5.4	108.7 ± 4.6	108.4 ± 5.1
HDL cholesterol (mg/dl)	63.4 ± 3.8	62.0 ± 3.5	59.8 ± 3.5 *	59.7 ± 3.4
AST (IU/l)	21.5 ± 1.1	21.5 ± 0.9	20.3 ± 0.9	21.6 ± 1.3
ALT (IU/l)	20.4 ± 2.5	20.6 ± 2.2	18.7 ± 2.0	20.5 ± 2.8
LDH (IU/l)	203.7 ± 7.5	201.4 ± 7.3	200.6 ± 7.0	208.4 ± 7.4
Total protein (g/dl)	7.6 ± 0.13	7.6 ± 0.12	7.6 ± 0.09	7.6 ± 0.08
Albumin (g/dl)	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1
γ-GTP (IU/l)	29.0 ± 3.3	30.5 ± 4.7	27.9 ± 2.7	26.9 ± 2.6
Creatinine (mg/dl)	0.7 ± 0.03	0.7 ± 0.03	0.7 ± 0.04	0.7 ± 0.04
ALP (IU/l)	233.2 ± 7.9	230.1 ± 6.9	228.2 ± 6.5	228.2 ± 8.3
Urea nitrogen (mg/dl)	13.1 ± 0.6	13.1 ± 0.6	13.2 ± 0.7	13.8 ± 0.7
Leukocytes (μl <sup>-1</sup> )	5618.2 ± 346.9	5822.7 ± 415.0	5377.3 ± 343.1	5623.8 ± 319.4
Erythrocytes (×10 <sup>4</sup> /μl)	450.6 ± 8.1	447.0 ± 7.4	445.1 ± 7.8	445.7 ± 7.6
Hb (g/dl)	13.7 ± 0.3	13.6 ± 0.3	13.6 ± 0.3	13.5 ± 0.3
Platelet (×10 <sup>4</sup> /μl)	26.2 ± 1.1	25.6 ± 1.1	26.3 ± 1.2	26.2 ± 1.4
L-Citrulline (μmol/l)	40.2 ± 1.3	40.4 ± 1.6	42.1 ± 2.0	42.1 ± 1.4
L-Arginine (μmol/l)	49.1 ± 2.6	52.8 ± 4.1	56.3 ± 3.7 *	48.4 ± 3.9
NOx (μmol/l)	33.0 ± 3.4	54.3 ± 14.1	46.5 ± 10.9	41.7 ± 6.8

各値は Means ± SEM を表す (N=22)。\**P*<0.05 vs Baseline. NOx: nitrite: NO<sup>2-</sup> + nitrate: NO<sup>3-</sup>, LDL: low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, LDH: lactate dehydrogenase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, ALP: alkaline phosphatase, Hb: hemoglobin.



**Fig. 25 L-Citrulline 摂取による血流依存性血管拡張反応 (Flow-mediated dilation: FMD) の推移**

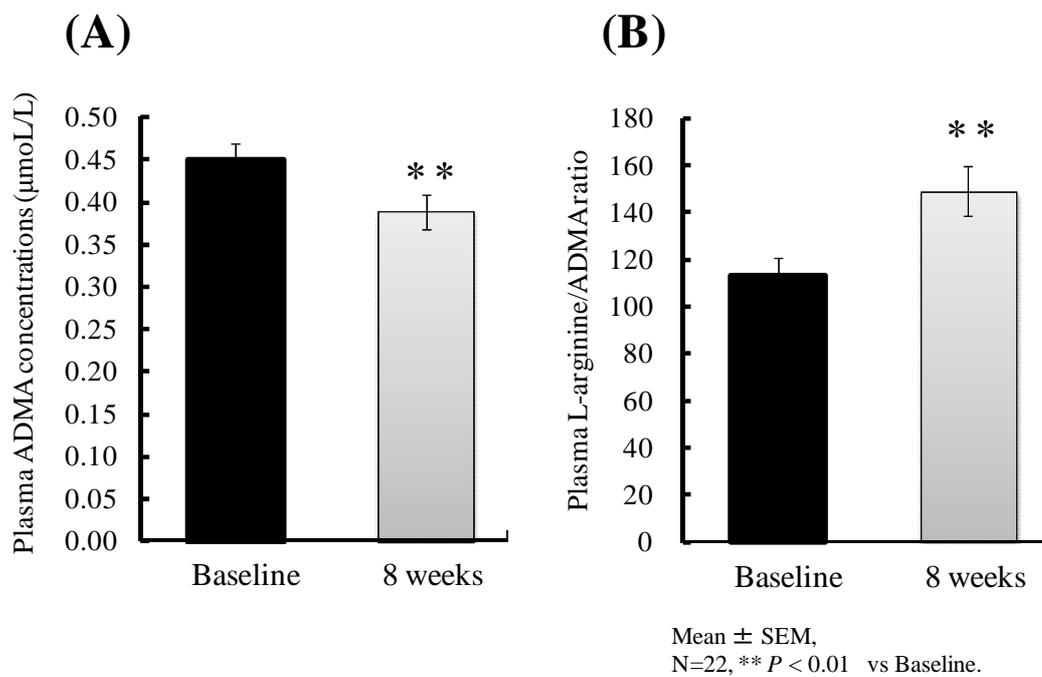
FMD の値が、血管内皮機能不全とされる 5.5 % 以下である冠動脈攣縮性狭心症患者 22 名を対象とした介入試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 800 mg を 8 週間摂取させた。また 4 週間の後観察期間を設定した。試験食品の摂取前 (baseline)、摂取 4, 8 週間後、ならびに 12 週間後に FMD を測定し、内皮依存性血管拡張反応を評価した。FMD は主として内皮から産生遊離された NO を介した血管拡張を血管径の変化として測定し、血管内皮機能が正常に保たれている場合は、拡張反応の割合 (%) は高くなる。

各値は Means  $\pm$  SEM を表す (N=22)。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs Baseline.

**Table. 6** L-Citrulline 摂取による血清中酸化 LDL 関連マーカーの変化

	Study Period	
	Baseline	8 weeks
Small dense LDL (mg/dl)	5.0 ± 1.8	4.8 ± 1.9
Oxidized LDL(U/l)	128.2 ± 9.0	113.7 ± 7.6 *
LAB (ng/ml)	3661.4 ± 311.3	3007.3 ± 206.7 *
Soluble LOX-1 (pg/ml)	1039.0 ± 180.5	989.9 ± 162.1
LOX-1 index	3544.1 ± 553.0	2890.6 ± 462.9

各値は Means ± SEM を表す (N=22)。\* $P < 0.05$  vs Baseline. LDL: low density lipoprotein, LOX-1: lectin-like oxidized LDL receptor 1, LAB: LOX-1 ligand containing apolipoprotein B.



**Fig. 26 L-Citrulline 摂取による血漿 ADMA 濃度、L-Arginine/ADMA 比の変化**

FMD の値が、血管内皮機能不全とされる 5.5 % 以下である冠動脈攣縮性狭心症患者 22 名を対象とした介入試験により、被験者に 1 日あたり L-Citrulline 800 mg を 8 週間摂取させた。試験食品の摂取前 (baseline) と摂取 8 週間後において、NOS の内因性阻害物質である血漿 ADMA 濃度 (A) および NO 産生活性のマーカーである L-Arginine/ADMA 比 (B) を解析した。

各値は Means ± SEM を表す (N=22)。\*\*P<0.01 vs Baseline. ADMA: asymmetric dimethylarginine, FMD: flow-mediated dilation.

## 6-4 考察とまとめ

本章では、動脈硬化発症の第一段階として重要な位置を占める「血管内皮機能障害」にスポットをあて、FMD の値が、血管内皮機能不全とされる 5.5 % 以下である冠動脈攣縮性狭心症患者 22 名を対象とした介入試験を行い、L-Citrulline 摂取による内皮依存性血管拡張反応の改善作用を評価した。さらに、変性 LDL による血管への酸化ストレス増大の関与を踏まえながら、L-Citrulline が LDL の酸化修飾へ及ぼす影響もあわせて検証した。その結果、L-Citrulline 継続摂取により、血清酸化 LDL レベルの有意な低減とあわせ、血漿 ADMA 濃度の低下、FMD の有意な改善といった血管内皮において有益な作用が認められた。興味深いことに、FMD の有意な改善は摂取終了 4 週後 (12 週目) まで維持されていた。このことは、L-Citrulline の長期摂取により低下した酸化 LDL や ADMA レベル、ならびに血管内皮における NO 産生能が摂取を止めても 4 週間程度は持続していた可能性がある。今後は摂取後の継続効果に関する研究も必要と思われる。実際に血漿 NO<sub>x</sub> 濃度は Baseline の約 33 μM に対し、12 週目において約 41.7 μM と高値傾向を示したことから、内皮依存的な血管拡張能の持続的な向上が示唆された。

心血管疾患においては血中 ADMA 濃度が増加し、これが eNOS による正常な NO 産生を阻害することで内皮機能を低下させる [81,82]。ADMA 濃度の増加は NO 依存性血管拡張反応の低下と強く負の相関を示すことから [83]、L-Citrulline による ADMA レベルの低下作用は、血管内皮における NO 産生の恒常性を維持し、FMD の改善に強く寄与したものと考えられる。また、NO 産生活性をあらかず血漿 L-Arginine/ADMA 比は L-Citrulline 摂取後に有意に向上したことから、L-Arginine 利用能の促進を介し、eNOS に対する ADMA の競合阻害を低減したものと推察された。

ADMA 自体は Protein arginine N-methyltransferases (PRMT) の触媒により、タンパク質の L-Arginine 残基のグアニジノ窒素がメチル化されて切り出されることで生成する。また、PRMT による ADMA 生成は酸化 LDL によって促進されることが報告されている [84]。よって、L-Citrulline による血漿 ADMA レベルの低下メカニズムは、酸化変性 LDL レベルの減少に基づくことが示唆される。

酸化ストレスに媒介される VCAM-1 などの接着因子の活性化とそれに続く単球の内皮下層への浸潤は、動脈硬化形成のキーとなるステップである [85]。内皮下へと遊走した単球はマクロファージへと分化し、変性 LDL を取りこんで泡沫化してコレステロールエステルを細胞内に蓄積する [77,85]。こうして形成された脂質プラークは、血管内皮を脆弱にするとともに、心血管イベントへと繋がる。そこで本章では、重要

なバイオマーカーである血清中の酸化 LDL 濃度の解析を行った。血清中酸化 LDL 濃度は、ベースラインに対し、L-Citrulline 摂取後に有意に低下し、さらに酸化 LDL 受容体の LOX-1 に結合活性を持つ変性 LDL である、血清 LAB 濃度においても、L-Citrulline 摂取は有意な低下効果を発揮した。この機序として、NO には抗酸化活性があり、O<sub>2</sub>アニオンなどの酸素ラジカルを不活性化することや、LDL の酸化修飾を抑制すること [10,86] が報告されており、NO シグナルを介した作用が示唆された。これらリポタンパク質の酸化抑制は L-Citrulline による血管内皮機能改善における作用機序として重要な位置を占めると考えられる。

また、酸化 LDL は血管内皮やマクロファージに発現するスカベンジャー受容体の LOX-1 によって細胞内へ取り込まれアテローム形成が進む [87]。近年、動脈硬化性疾患の発症を予測する有力なリスクファクターとして LOX-1 index [80] が注目されている。本章において、L-Citrulline 摂取は冠動脈攣縮性狭心症患者の LOX-1 index を顕著に低下させる傾向を示した。酸化 LDL レベルの低下効果と照らしあわせ、L-Citrulline は臨床的にも、アテロームプラークの成因を低減し得る可能性が示された。

冠動脈攣縮性狭心症患者では血管内皮機能の低下を発端とし、冠動脈のスパズムが生じることで心筋虚血に繋がり得る [88]。スパズムの直接的な主因は十分に解明されていないが、Kugiyama ら [89] は内皮由来 NO の生物学的活性の低下が、冠動脈の攣縮を引き起こすことを指摘している。さらに、これら血管内皮機能の低下は、冠動脈スパズムのリスクファクターであることも報告されている [90]。従って、本検討で見出された L-Citrulline による NO 依存性血管内皮機能の改善効果は、狭心症のような冠動脈疾患を予防、或いは改善するうえで、临床上も意義のある知見といえよう。

以上より、本章では冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験において、L-Citrulline 摂取により NO 依存性の血管内皮機能が有意に改善すること、その主たるメカニズムとして L-Citrulline は循環器疾患で上昇する内因性 NOS 阻害物質である ADMA レベルを抑制すること、血漿 L-Arginine/ADMA 比を上昇させ L-Arginine 利用能を促進すること、および血管内皮を強力に障害する LDL の酸化変性を有意に抑制することが明らかになった。特に FMD は、L-Citrulline の摂取期間依存的に改善し、摂取を終了した後観察期間 (12 週目) でも内皮機能が維持されていたことから、長期間継続的に摂ることが重要であると考えられた。

## 総括

本研究では、血管の恒常性維持と生体の血液循環に極めて重要な NO サイクルに着目し、その構成代謝物質である L-Citrulline 投与が血管機能に如何なる生理作用を及ぼすかを、基礎および臨床の両側面から検討した。これにより、L-Citrulline が有する生理機能と作用機序を包括的に解明し、今後益々増加が見込まれる心血管疾患の予防に資する機能性素材として、L-Citrulline を社会に供することを研究成果の最終出口とした。

以下に本研究のまとめとして、各章における実験結果の要点と意義、ならびに各章を通じて明らかとなった L-Citrulline の作用メカニズムの全容を概説したい。また、本研究で明らかとなった血管機能における L-Citrulline の主要な作用点と機序を Fig. 27 にまとめた。

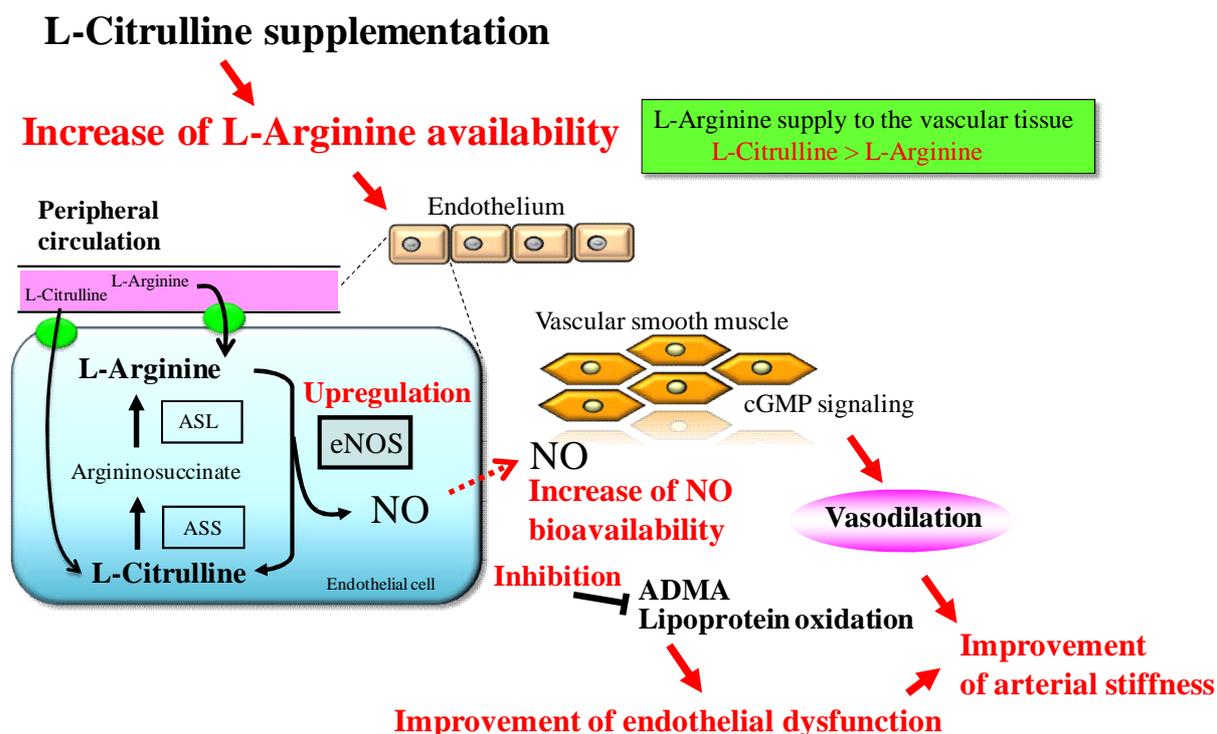


Fig. 27 本研究で明らかとなった L-Citrulline の血管に対する作用とメカニズム

eNOS: endothelial NO synthase, ASS: argininosuccinate synthase, ASL: argininosuccinate lyase,

ADMA: asymmetric dimethylarginine.

## 「第1章」

NO サイクルを賦活化し、血管組織に適切なレベルの NO を供給するには、NO を直接つくり出す L-Arginine の生体利用をいかに効率的に向上できるかが鍵である。そこで第1章では、経口的に L-Citrulline を投与した後の血中 L-Arginine 動態の見地から、L-Citrulline 経口投与が L-Arginine 全身循環に与える代謝上の有用性を、L-Arginine 投与との比較を含めて検討した。

その結果、L-Arginine 投与は、投与 2 時間までの時間帯において一過的に血漿 L-Arginine 濃度を上昇させたが、その後血中レベルは低下に転じるのに対し、L-Citrulline 投与では L-Arginine 群と比べ、持続的に循環血中 L-Arginine 濃度を高めることが明らかとなった。即ち、全身への L-Arginine 供給源としては、L-Arginine そのものよりも L-Citrulline を摂取した方が効率的に L-Arginine の生物学的利用能を促進できる可能性を示した。

さらに NO サイクルは L-Arginine と L-Citrulline 間の代謝変換を介するため“L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway”とも称され、eNOS への局所的な L-Arginine の供給に必須の代謝経路である。よって、効率的に eNOS への L-Arginine 供給量を増大させ、NO 産生系を活性化する方法が見出せれば、サプリメントの開発において画期的な提案に繋がることが期待される。そこで、その構成代謝中間体である L-Citrulline、L-Arginine の同時投与により NO サイクルが活性化し得るかを実験的に検討した。その結果、L-Citrulline、L-Arginine の半用量併用投与は各単独群と比べ、相乗的に、投与 1 時間以内の短期に血漿 L-Arginine レベルを速やかに増大させる効果が認められ、その下流にある NO-cGMP pathway を亢進する可能性が見出された。この L-Arginine 代謝上の有用性は、血中 NO、cGMP レベル、末梢血流レベルの有意な増加によっても実証された。

以上より、L-Citrulline が有する L-Arginine 全身循環における代謝上の有用性を明らかにした。

## 「第2章」

L-Citrulline による L-Arginine レベルの上昇を、NO を介する生理機能として明らかにすることを試みた。血流の改善が末梢皮膚温の回復期に重要な役割を担うとの仮説のもと、ストレス誘発性末梢循環低下モデルを構築した。本モデルでは、ストレスによる末梢毛細血管の収縮を皮膚温として検知するとともに、NOS 阻害剤を用いた検討から、ストレスによる冷えからの回復に NO による血管の動的变化、即ち皮膚血管の拡張反応が生理的に重要であることを示した。そこで、NO 産生促進に基づく循環改

善を作用メカニズムのターゲットとし、L-Citrulline 投与が“ストレス誘発性冷え症”の症状改善に与える生理的影響を評価した。その結果、L-Citrulline 投与がストレス誘発性冷えの症状を有意に改善することを見出し、この機序としてNOによる皮膚血管の拡張反応の関与が示唆された。

### 「第3章」

L-Citrulline による L-Arginine 代謝上の有用性や NO サイクル賦活化作用に注目し、より臨床病態に近いモデルで検討を進めることとした。ここでは、血管病変を基盤とした脳血管障害モデルを標的とし、L-Citrulline が血管病変に障害を来す症状の改善に、どのような効果を発揮するかを評価した。

総頸動脈の一過的閉塞により、脳微小血管に障害を課した脳機能障害マウスへの L-Citrulline 投与は、血管障害で低下する eNOS の発現レベルを回復し、海馬の NO 産生能を有意に増強することを明らかとした。さらに、血管内皮の脱落の抑制や、脳微小循環障害およびそれに伴う海馬神経細胞死を有意に抑制する作用も認められた。これら効果は、高次脳機能を行動薬理的に解析することで、記憶学習能の有意な改善によっても実証された。またその新規メカニズムに、CaMK II を介した神経保護作用、神経系の可塑的変化の関与が示唆された。

脳血管性認知症はアルツハイマー病と並び、重要な社会的課題となっており、L-Citrulline 投与による著明な改善作用を実証したことは、脳機能保護の観点から意義ある結果と考えられる。将来的には食品による脳機能保護の観点から、ヒトでの有効性を実証していくことが必要と思われる。近い将来、食品の面から L-Citrulline が脳機能向上に資するアミノ酸として研究が進むことが期待される。

### 「第4章」

前章までに、L-Citrulline 投与が、NO-cGMP pathway 活性化のメカニズムを基盤として、血管機能不全に対して予防的、或いは抑制的に働く可能性を示した。しかしながら、サプリメントとして活用するためにはヒトでの有効性を実証することが極めて重要である。そこで第4章では、実際に L-Citrulline をヒトに摂取させた際の血中 L-Arginine と NO レベルの変動に加え、NO の生物学的作用を反映する血流動態をランダム化プラセボ対照クロスオーバー比較試験により検証した。

その結果、5日間の L-Citrulline 摂取は血漿 L-Arginine 濃度と NOx 濃度を有意に上昇させ、これら両パラメーターの間には統計的に有意な正の相関があることを臨床的に初めて明らかにした。続いて、NO 産生を血流として検知するため、冷水負荷によ

り低下させた末梢血流の回復を経時的に評価した結果、L-Citrulline 摂取によって血流の回復が顕著に促進することを見出した。このことから、ヒトにおいても L-Citrulline 摂取は L-Arginine の生体利用能を上昇させ、NO サイクルを活性化し血管機能を強化し得る可能性が示された。

これら効果は L-Citrulline の作用機作の根幹を成すもので、ヒトで証明できた意義は大きい。

## 「第 5 章」

動脈硬化の予防の観点からは、心血管疾患に繋がる臨床症状が発現する前に、動脈の質的变化を検知し、より予防的に血管機能に注意を払うことが重要である。血管壁硬化の亢進は、心血管イベントや脳卒中などの独立した強力なリスクとなることから、血管伸張性を正常かつ柔軟に保つことが、将来の心血管疾患の発症を未然に防ぐうえで極めて重要である。

そこで第 5 章では L-Citrulline の臨床上の有用性を明らかにするため、動脈伸展性への影響を主要評価として、baPWV のリスクカットオフ値である  $> 1,400$  cm/s の中高年男性を選抜し、ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。その結果、プラセボ群と比べ、L-Citrulline 摂取によって baPWV の値が有意に低下し、プラセボと比較し血管スティフネスの有意な改善作用が認められた。さらに、L-Citrulline 摂取による血漿 L-Arginine 濃度の上昇と baPWV の低下には有意な負の相関が認められた。このことから、L-Citrulline は eNOS への L-Arginine 利用能を促進し、血管内皮細胞からの NO 産生を増加させることにより、血管弾性の機能的改善をもたらしたことが推察された。これら作用は、前章までに見出した L-Citrulline の NO 産生賦活作用を血管硬化度の改善として初めてヒトで捉えたものであり、動脈硬化予防の側面から、意義のある知見と考えられる。

## 「第 6 章」

動脈硬化は、血管内皮の障害を第一段階として進展することから、血管内皮機能不全は、心血管疾患合併症を助長する重要な規定因子である。言い換えれば、血管内皮を保護し、正常な内皮機能を保つことが血管機能を維持する本髄となる。従って、血管機能不全の予防および治療的観点で包括的な研究を進めるには、血管壁硬化などの表現形のみならず、血管内皮機能に及ぼす効果を検証することが極めて重要であると考えられる。

そこで第 6 章では、FMD の値が血管内皮機能不全とされる 5.5 % 以下である、血

管内皮機能不全を有する冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験を行い、L-Citrulline 継続摂取が血管内皮機能に及ぼす影響を臨床的に評価した。さらにその機序として、血管内皮の最大の障害因子の 1 つである LDL の酸化変性に与える影響も含め多角的に解析した。

その結果、L-Citrulline 摂取により、NO 依存性の血管内皮機能が有意に改善すること、その主たるメカニズムとして L-Citrulline は循環器疾患で上昇する内因性 NOS 阻害物質である ADMA レベルを抑制すること、血漿 L-Arginine/ADMA 比を上昇させ L-Arginine 利用能を促進すること、および血管内皮を強力に障害する LDL の酸化変性を有意に抑制することが明らかになった。L-Citrulline による L-Arginine および NO の生物学的利用能の上昇のみならず、LDL の酸化修飾の低減や、血漿 ADMA 濃度の低下など、血管内皮の主たる障害因子の抑制においても新規な作用を明らかにした。

以上より、本研究における L-Citrulline の血管に対する作用機構として、下記の点が推察され、アミノ酸代謝の特徴も交えながら多角的に論じたい。L-Citrulline は L-Arginine の eNOS に対する利用能を増進し、NO サイクルの亢進を介して NO 産生を増加させた。この時、L-Arginine の代謝運命を制御するのが Arginase の活性である [17]。L-Citrulline は L-Arginine の生体レベルを増加させるだけでなく、L-Arginine を強力に代謝する Arginase 阻害物質としての作用 [33] を発揮することが、NO 産生系における L-Arginine の利用能を亢進する鍵となっている可能性が高い。著者によるラットを用いた L-Citrulline、L-Arginine 投与時の初発吸収実験においても、経口投与された L-Arginine 自体は約 70 % が消化管と肝臓を通る段階で代謝されることを観察しており (著者未発表データ)、L-Arginine 前駆体として L-Citrulline は有用なアミノ酸であることが示唆される。また、L-Citrulline そのものがラジカル消去活性 [91] を有する点も、血管機能改善においては有益であると思われる。

こうして NO の生物学的作用が高まり、NO-cGMP pathway の賦活化を介して血管拡張能が上昇し、血流の促進さらには動脈伸展性の改善がもたらされる。心血管疾患においては、血管の形態学的変化が観察される前段階として血管伸展性の悪化が生じ、これには血管内皮からの NO 産生能の低下が関わることが知られている。よって、平滑筋の血管内膜への遊走や血管繊維化、血管壁肥厚といった器質的変化が進む前に、より初期の段階から NO の生物学的利用能を向上する手段を講じておくことは、医学

的に意義が大きい戦略である。NO の生物学的活性を向上することが、動脈硬化予防の観点から重要であることは想像に難しくなく、本研究の結果は血管内皮機能を健全に保ち、動脈硬化の予防に向けた一助となり得る知見と考えられる。

L-Citrulline の応用に向けては、臨床病態における L-Arginine との比較が課題であると考えられる。最近、El-Hattab ら [92] は、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes; MELAS) 患者への投与例を報告し、L-Citrulline 投与は L-Arginine 投与よりも *de novo* L-Arginine 合成活性を上昇させ、MELAS で低下する NO 放出活性を増加させたことを報告している。これらは臨床での応用の足掛かりとなるもので、将来的な活用の糸口がみえてきたと言える。

さらに、本研究において L-Citrulline は血管内皮の代表的障害因子である酸化 LDL や ADMA レベルを低下させた。酸化 LDL の増加は血管壁でのアテロームプラーク形成に繋がり、ADMA はより直接的に eNOS 活性を阻害することからも、これら血管障害の成因の低減は大きな生理的意義を持っていると考えられる。

ここであらためてアミノ酸代謝に着目すると、L-Arginine は腸管、肝臓で Arginase により L-Ornithine へ変換され、L-Ornithine から ornithine carbamoyltransferase によって L-Citrulline を生合成する経路が存在する (Fig. 1)。しかし、本研究において L-Arginine 経口投与により血漿 L-Citrulline 濃度は上昇しなかったことから、大部分は L-Arginine 代謝経路上の L-Ornithine として吸収されているものと推察される。事実、著者による未発表データにおいても、ラットにおける L-Arginine 経口投与後、生体 L-Ornithine 濃度の増加を認めており、L-Arginine の代謝運命の大部分は Arginase による L-Ornithine への一過的な変換である可能性が高い。一方、ヒトに L-Citrulline を経口摂取させ、血中アミノ酸動態を観察した臨床試験によると、L-Citrulline 摂取後に血中 L-Arginine 濃度の増加に続き、L-Ornithine 濃度の有意な増加も認められている [27]。このことは L-Citrulline から生じた L-Arginine の一部は、L-Ornithine へ代謝されることを示唆している。Fig. 1 に示すように L-Citrulline、L-Arginine、L-Ornithine はアミノ酸代謝経路上、相互変換されるように繋がっているが、それぞれ生理的条件に応じ独自の代謝を経る可能性があり、各アミノ酸代謝の包括的解明は、今後の重要な研究課題であると認識している。

本研究では、ヒトにおける L-Citrulline 摂取用量として 1 日あたり第 4 章で 3.2 g、第 5 章で 5.6 g、第 6 章では 800 mg に設定した。第 4 章、第 5 章においては臨床的に血流や血管壁硬化に与える影響をとらえるため、安全性および倫理的側面から摂取可能な上限に近い用量とした。一方で、第 6 章では、日常的に長期に摂取するサプリメントとしての出口を見据える観点から、800 mg に用量を減らし、より長期間の投与を行った。その結果、800 mg においても血管内皮機能を改善する作用が認められたことから、ヒトにおける有効用量は 1 g 前後と推定される。しかし被験者の条件、年齢、性別、基礎疾患ならびに血管機能障害の有無などの摂取対象者の背景因子によっても変わるため、更なる詳細な検討を進め、対象領域ごとのヒトでの有効用量を定量的に明らかにしていきたいと考えている。

本研究では、血管の恒常性維持における基幹システムである血管内皮と NO、更には動脈壁硬化という臨床的出口にも着目し、L-Citrulline の生理作用を基礎および臨床の両側面から検討した。これにより、L-Citrulline が有する効能と作用機序の一端を解明できたことは、アミノ酸研究の応用においても意義があると思われる。今後益々増加が見込まれる心血管疾患の予防に資する機能性素材として、L-Citrulline を社会に供することを旨したい。

## 参考文献

- [1] 野原隆司, Guidelines for Rehabilitation in Patients with Cardiovascular Disease, 2011 年度合同研究班報告. (2015)
- [2] J. Bauersachs, J.D. Widder, Endothelial dysfunction in heart failure, *Pharmacol Rep.* 60 (2008) 119-126.
- [3] R.A. Vogel, Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review, *Clin Cardiol.* 20 (1997) 426-432.
- [4] Y. Higashi, Endothelial Function and Atherosclerosis, *The Journal of Japanese College of Angiology.* 49 (2009) 385-390.
- [5] G. Gary H, Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: A new therapeutic target, *Am J Cardiol.* 79 (1997) 3-8.
- [6] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature.* 288 (1980) 373-376.
- [7] L.J. Ignarro, C. Napoli, Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis, *Current atherosclerosis reports.* 6 (2004) 281-287.
- [8] J.S. Krumenacker, K.A. Hanafy, F. Murad, Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase, *Brain research bulletin.* 62 (2004) 505-515.
- [9] L.J. Ignarro, G.M. Buga, L.H. Wei, et al., Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 4202-4208.
- [10] C. Napoli, E. Ackah, F. De Nigris, et al., Chronic treatment with nitric oxide-releasing aspirin reduces plasma low-density lipoprotein oxidation and oxidative stress, arterial oxidation-specific epitopes, and atherogenesis in hypercholesterolemic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 12467-12470.
- [11] 筒井正人, 上野晋, 豊平由美子, et al., 一酸化窒素合成酵素の構造と機能--とくに血管組織における動態と意義, *蛋白質核酸酵素.* 47 (2002) 2024-2031.
- [12] A. Lerman, J.C. Burnett, Jr., S.T. Higano, et al., Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans, *Circulation.* 97 (1998) 2123-2128.
- [13] G. Siasos, D. Tousoulis, C. Vlachopoulos, et al., Short-term treatment with L-arginine prevents the smoking-induced impairment of endothelial function and vascular elastic properties in young individuals, *Int J Cardiol.* 126 (2008) 394-399.
- [14] C.C. Lin, W.C. Tsai, J.Y. Chen, et al., Supplements of L-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress, *Int J Cardiol.* 127 (2008) 337-341.
- [15] S.P. Schulman, L.C. Becker, D.A. Kass, et al., L-arginine therapy in acute myocardial

- infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial, *JAMA*. 295 (2006) 58-64.
- [16] D. Susic, A. Francischetti, E.D. Frohlich, Prolonged L-arginine on cardiovascular mass and myocardial hemodynamics and collagen in aged spontaneously hypertensive rats and normal rats, *Hypertension*. 33 (1999) 451-455.
- [17] W. Durante, F.K. Johnson, R.A. Johnson, Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function, *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 34 (2007) 906-911.
- [18] C. Moinard, L. Cynober, Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis, *J Nutr*. 137 (2007) 1621S-1625S.
- [19] M.J. Romero, D.H. Platt, R.B. Caldwell, et al., Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease, *Cardiovasc Drug Rev*. 24 (2006) 275-290.
- [20] E. Schwedhelm, R. Maas, R. Freese, et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism, *Br J Clin Pharmacol*. 65 (2008) 51-59.
- [21] K.A. Wijnands, H. Vink, J.J. Briede, et al., Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia, *PLoS One*. 7 (2012) e37439.
- [22] J.J. Orozco-Gutierrez, L. Castillo-Martinez, A. Orea-Tejeda, et al., Effect of L-arginine or L-citrulline oral supplementation on blood pressure and right ventricular function in heart failure patients with preserved ejection fraction, *Cardiol J*. 17 (2010) 612-618.
- [23] P.Y. Chen, P.W. Sanders, L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats, *J Clin Invest*. 88 (1991) 1559-1567.
- [24] A. Shiota, Y. Hotta, T. Kataoka, et al., Oral L-citrulline supplementation improves erectile function in rats with acute arteriogenic erectile dysfunction, *The journal of sexual medicine*. 10 (2013) 2423-2429.
- [25] A. Figueroa, J.A. Trivino, M.A. Sanchez-Gonzalez, et al., Oral L-citrulline supplementation attenuates blood pressure response to cold pressor test in young men, *Am J Hypertens*. 23 (2010) 12-16.
- [26] G. Wu, J.K. Collins, P. Perkins-Veazie, et al., Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats, *J Nutr*. 137 (2007) 2680-2685.
- [27] C. Moinard, I. Nicolis, N. Neveux, et al., Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study, *Br J Nutr*. 99 (2008) 855-862.
- [28] M. Hecker, W.C. Sessa, H.J. Harris, et al., The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87 (1990) 8612-8616.

- [29] T. Hayashi, P.A. Juliet, H. Matsui-Hirai, et al., L-Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (2005) 13681-13686.
- [30] T. Hayashi, T. Esaki, E. Muto, et al., Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 20 (2000) 782-792.
- [31] K. Okano, S. Takahashi, K. Yasuda, et al., Using microparticle labeling and counting for attomole-level detection in heterogeneous immunoassay, *Analytical biochemistry*. 202 (1992) 120-125.
- [32] M.C. van de Poll, P.B. Soeters, N.E. Deutz, et al., Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange, *The American journal of clinical nutrition*. 79 (2004) 185-197.
- [33] M.J. Romero, D.H. Platt, H.E. Tawfik, et al., Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity, *Circ Res*. 102 (2008) 95-102.
- [34] H.M. El-Bassossy, R. El-Fawal, A. Fahmy, Arginase inhibition alleviates hypertension associated with diabetes: effect on endothelial dependent relaxation and NO production, *Vascular pharmacology*. 57 (2012) 194-200.
- [35] A. Simon, L. Plies, A. Habermeier, et al., Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells, *Circ Res*. 93 (2003) 813-820.
- [36] 磯部秀之, 冷え, のぼせ, 末梢循環障害, *Current Therapy*. 9 (1991) 1507-1511.
- [37] 後山尚久, 冷え症の病態の臨床的解析と対応——冷え症はいかなる病態か, そして治療できるのか, *医学のあゆみ*. 215 (2005) 925-929.
- [38] 山田典子, 吉村裕之, 若年女性の冷え症に対するローヤルゼリー摂取の改善効果, *日本栄養・食糧学会誌*. 63 (2010) 271-278.
- [39] 網谷英介, 小室一成, 血管の老化と脳の老化, *Anti-aging Science*. 5 (2013) 33-38.
- [40] G.C. Roman, T. Erkinjuntti, A. Wallin, et al., Subcortical ischaemic vascular dementia, *The Lancet. Neurology*. 1 (2002) 426-436.
- [41] K.A. Brown, S.P. Didion, J.J. Andresen, et al., Effect of aging, MnSOD deficiency, and genetic background on endothelial function: evidence for MnSOD haploinsufficiency, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 27 (2007) 1941-1946.
- [42] M.L. Modrick, S.P. Didion, C.D. Sigmund, et al., Role of oxidative stress and AT1 receptors in cerebral vascular dysfunction with aging, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 296 (2009) H1914-1919.
- [43] Y. Yamamoto, N. Shioda, F. Han, et al., Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation, *Brain research*. 1295 (2009) 218-229.
- [44] N. Shioda, Y. Yamamoto, M. Watanabe, et al., Heart-type fatty acid binding protein regulates

- dopamine D2 receptor function in mouse brain, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30 (2010) 3146-3155.
- [45] S. Moriguchi, Y. Yabuki, K. Fukunaga, Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice, *J Neurochem*. 120 (2012) 541-551.
- [46] X. Cui, M. Chopp, A. Zacharek, et al., Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice, *Neuroscience*. 159 (2009) 744-750.
- [47] D.H. Liu, F.G. Yuan, S.Q. Hu, et al., Endogenous nitric oxide induces activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 via S-nitrosylation in rat hippocampus during cerebral ischemia-reperfusion, *Neuroscience*. 229 (2013) 36-48.
- [48] C. Lecrux, E. Hamel, The neurovascular unit in brain function and disease, *Acta physiologica*. 203 (2011) 47-59.
- [49] M.J. O'Neill, T.K. Murray, D.R. McCarty, et al., ARL 17477, a selective nitric oxide synthase inhibitor, with neuroprotective effects in animal models of global and focal cerebral ischaemia, *Brain research*. 871 (2000) 234-244.
- [50] J. Kasahara, K. Fukunaga, E. Miyamoto, Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region, *The Journal of biological chemistry*. 276 (2001) 24044-24050.
- [51] K.P. Giese, N.B. Fedorov, R.K. Filipkowski, et al., Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning, *Science*. 279 (1998) 870-873.
- [52] M. Shikano, Peripheral circulation disturbance and thermography, *BIOMEDICAL THERMOLOGY*. 17 (1998) 111-113.
- [53] M.S. Laskar, N. Harada, Different conditions of cold water immersion test for diagnosing hand-arm vibration syndrome, *Environ Health Prev Med*. 10 (2005) 351-359.
- [54] K. Yoshitani, T. Minami, H. Takumi, et al., Effect of  $\alpha$ -Glucosylhesperidin on poor circulation in women, *J Jpn Soc Nutr Food Sci*. 61 (2008) 233-239.
- [55] K. Terasawa, On the Recognition and Treatment of "Hie-Sho" (Chilphobia) in the Traditional Kampoh Medicine [in Japanese], *Shoyakugaku Zasshi*. 41 (1987) 85-96.
- [56] T. Matsumoto, T. Ushiroyama, T. Hayashi, et al., Fluctuation of psychophysiological symptoms and autonomic nervous system activity during the menstrual cycle, *J Jp Soc Psychosom Obstet Gynecol*. 12 (2007) 433-443.
- [57] S. Kashima, S. Oka, J. Ishikawa, et al., Measurement of tissue blood volume in a model system and in the canine intestine by dynamic light scattering, *Lasers in the Life Sciences*. 6 (1994) 79-90.
- [58] T. Niioka, H. Ishii, H. Izumi, Regional differences in blood flow variation in rat masseter muscle, *Arch Oral Biol*. 54 (2009) 1022-1028.
- [59] J.S. Pollock, U. Forstermann, J.A. Mitchell, et al., Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine

- aortic endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 10480-10484.
- [60] T.A. Hardy, J.M. May, Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells, *Free radical biology & medicine.* 32 (2002) 122-131.
- [61] S. Shin, S. Mohan, H.L. Fung, Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: implications on the "L-arginine paradox", *Biochem Biophys Res Commun.* 414 (2011) 660-663.
- [62] B.R. Flam, P.J. Hartmann, M. Harrell-Booth, et al., Caveolar localization of arginine regeneration enzymes, argininosuccinate synthase, and lyase, with endothelial nitric oxide synthase, *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society.* 5 (2001) 187-197.
- [63] 日本動脈硬化学会, 動脈硬化性疾患予防ガイドライン, (2007)
- [64] F.U. Mattace-Raso, T.J. van der Cammen, A. Hofman, et al., Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study, *Circulation.* 113 (2006) 657-663.
- [65] S. Tsuchikura, T. Shoji, E. Kimoto, et al., Brachial-ankle pulse wave velocity as an index of central arterial stiffness, *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 17 (2010) 658-665.
- [66] 小澤利男, 新しい血圧測定と脈波解析マニュアル, MEDICAL VIEW. (2008)
- [67] R.M. Fitch, R. Vergona, M.E. Sullivan, et al., Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats, *Cardiovascular research.* 51 (2001) 351-358.
- [68] A. Yamashina, H. Tomiyama, T. Arai, et al., Brachial-ankle pulse wave velocity as a marker of atherosclerotic vascular damage and cardiovascular risk, *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension.* 26 (2003) 615-622.
- [69] A. Yamashina, H. Tomiyama, K. Takeda, et al., Validity, reproducibility, and clinical significance of noninvasive brachial-ankle pulse wave velocity measurement, *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension.* 25 (2002) 359-364.
- [70] P. Vallance, A. Leone, A. Calver, et al., Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure, *Lancet.* 339 (1992) 572-575.
- [71] S. Kinlay, M.A. Creager, M. Fukumoto, et al., Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo, *Hypertension.* 38 (2001) 1049-1053.
- [72] I.B. Wilkinson, A. Qasem, C.M. McEniery, et al., Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo, *Circulation.* 105 (2002) 213-217.
- [73] F. Perticone, R. Ceravolo, A. Pujia, et al., Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients, *Circulation.* 104 (2001) 191-196.
- [74] T. Neunteufl, R. Katzenschlager, A. Hassan, et al., Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease, *Atherosclerosis.* 129 (1997) 111-118.
- [75] T. Heitzer, T. Schlinzig, K. Krohn, et al., Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease, *Circulation.* 104 (2001)

2673-2678.

- [76] M. Chen, T. Masaki, T. Sawamura, LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis, *Pharmacology & therapeutics*. 95 (2002) 89-100.
- [77] T. Sawamura, N. Kume, T. Aoyama, et al., An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein, *Nature*. 386 (1997) 73-77.
- [78] R. Rossi, E. Chiurlia, A. Nuzzo, et al., Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women, *J Am Coll Cardiol*. 44 (2004) 1636-1640.
- [79] D.M. Hoefner, S.D. Hodel, J.F. O'Brien, et al., Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System, *Clin Chem*. 47 (2001) 266-274.
- [80] N. Inoue, T. Okamura, Y. Kokubo, et al., LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke, *Clin Chem*. 56 (2010) 550-558.
- [81] R.H. Boger, L.M. Sullivan, E. Schwedhelm, et al., Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community, *Circulation*. 119 (2009) 1592-1600.
- [82] C. Zoccali, F. Mallamaci, R. Maas, et al., Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients, *Kidney Int*. 62 (2002) 339-345.
- [83] S.M. Bode-Boger, J. Muke, A. Surdacki, et al., Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years, *Vasc Med*. 8 (2003) 77-81.
- [84] R.H. Boger, K. Sydow, J. Borlak, et al., LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases, *Circ Res*. 87 (2000) 99-105.
- [85] M.J. Davies, J.L. Gordon, A.J. Gearing, et al., The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis, *The Journal of pathology*. 171 (1993) 223-229.
- [86] N. Hogg, B. Kalyanaraman, J. Joseph, et al., Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis, *FEBS Lett*. 334 (1993) 170-174.
- [87] M. Honjo, K. Nakamura, K. Yamashiro, et al., Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (2003) 1274-1279.
- [88] A. Maseri, S. Chierchia, Coronary vasospasm in ischemic heart disease, *Chest*. 78 (1980) 210-215.
- [89] K. Kugiyama, H. Yasue, K. Okumura, et al., Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina, *Circulation*. 94 (1996) 266-271.
- [90] H. Teragawa, M. Kato, J. Kurokawa, et al., Endothelial dysfunction is an independent factor responsible for vasospastic angina, *Clin Sci (Lond)*. 101 (2001) 707-713.

- [91] K. Akashi, C. Miyake, A. Yokota, Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger, *FEBS Lett.* 508 (2001) 438-442.
- [92] A.W. El-Hattab, J.W. Hsu, L.T. Emrick, et al., Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation, *Mol Genet Metab.* 105 (2012) 607-614.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、博士取得の機会を与えてくださり、多くのご指導をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科・佐藤隆一郎教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究として多くの議論をさせていただき、多大なるご協力およびご助言をいただきました名古屋大学大学院医学系研究科・林登志雄教授、東北大学薬学研究科・福永浩司教授、北里大学薬学部・小林義典教授、所沢ハートセンター・桜田真己院長に深謝いたします。

博士取得にあたり日々背中を押していただき、温かく見守って下さった協和発酵バイオ株式会社・小泉聡司博士、原孝博様、落合将之様および諸先輩皆様に心から感謝いたします。

本研究は協和発酵バイオ株式会社皆様のご厚情をいただいたものであり、ここに謹んで御礼申し上げます。

最後に、会社業務との両立の中で本学位論文を完成できたのも、研究に理解を示していただき、支えてくれた家族のお陰です。叱咤激励いただいたことに心から感謝します。

## 論文 (業績) リスト

\* : 本学位論文の基礎となった論文

\* **Morita M**, Hayashi T, Ochiai M, Maeda M, Yamaguchi T, Ina K, Kuzuya M (2014) Oral supplementation with a combination of L-citrulline and L-arginine rapidly increases plasma L-arginine concentration and enhances NO bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun* **454**, 53-57.

\* **Morita M**, Sakurada M, Watanabe F, Yamasaki T, Doi H, Ezaki H, Morishita K and Miyake T (2013) Effects of Oral L-Citrulline Supplementation on Lipoprotein Oxidation and Endothelial Dysfunction in Humans with Vasospastic Angina. *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem* **13**, 214-220.

\* **Morita M**, Ochiai M, Watanabe F, Adachi K, Morishita K (2015) The relationship between plasma levels of L-arginine and NO after L-citrulline supplementation: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Jpn Pharmacol Ther* **43**, 969-975.

\* Ochiai M, Hayashi T, **Morita M**, Ina K, Maeda M, Watanabe F and Morishita K (2012) Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. *Int J Cardiol* **155**, 257-261.

\* Kobayashi Y, Narita K, Chiba K, Takemoto H, **Morita M**, Morishita K (2014) Effects of L-citrulline diet on stress-induced cold hypersensitivity in mice. *Pharmacognosy Res* **6**, 297-302.

\* Yabuki Y, Shioda N, Yamamoto Y, Shigano M, Kumagai K, **Morita M** and Fukunaga K (2013) Oral L-citrulline administration improves memory deficits following transient brain ischemia through cerebrovascular protection. *Brain research* **1520**, 157-167.

**Morita M**, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MC, Inze D, Rischer H, Goossens A, Oksman-Caldentey KM, Moriyama Y and Yazaki K (2009) Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2447-2452.

**Morita M**, Ochiai M, Watanabe F, Iizuka M, Yokoyama T, Kowatari Y and Morishita K (2013) An open-label safety trial of kinetics and metabolic effects of orally-administered L-ornithine hydrochloride in healthy volunteers: A study of its effects, particularly on plasma L-ornithine levels and retinal function. *Jpn Pharmacol Ther* **41**, 779-787.

Mori A, **Morita M**, Morishita K, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K (2015) L-Citrulline dilates rat retinal arterioles via nitric oxide- and prostaglandin-dependent pathways in vivo. *J Pharmacol Sci* **127**, 419-23.

Suzuki T, **Morita M**, Kobayashi Y, Kamimura A (2016) Oral L-citrulline supplementation enhances cycling time trial performance in healthy trained men: Double-blind randomized placebo-controlled 2-way crossover study. *J Int Soc Sports Nutr* **13**:6.

Ishikura F, Egawa M, Takano Y, Kumagai K, Suzuki T, **Morita M** (2015) Effects of Citrulline Combined with Tadalafil on Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats Compared with Arginine. *J Nov Physiother* **5**, 1-5.

McKinley-Barnard S, Andre T, **Morita M**, Willoughby DS (2015) Combined L-citrulline and glutathione supplementation increases the concentration of markers indicative of nitric oxide synthesis. *J Int Soc Sports Nutr* **12**:27.

森田匡彦, 小林義典, 飯塚宗秋, 近藤澄夫, 森下幸治 (2012) 若年女性におけるL-シトルリン経口摂取による下肢むくみの抑制効果. *薬理と治療* **40**, 787-794.

Sakamoto K, Mori A, Nakahara T, **Morita M**, Ishii K (2015) Effects of long-term treatment of L-ornithine on visual function and retinal histology in the rats. *Biol Pharm Bull* **38**, 139-143.

Hotta Y, Shiota A, Kataoka T, Motonari M, Maeda Y, **Morita M** and Kimura K (2013) Oral L-citrulline supplementation improves erectile function and penile structure in castrated rats. *International journal of urology* **21**, 608-612.

Shiota A, Hotta Y, Kataoka T, **Morita M**, Maeda Y and Kimura K (2013) Oral L-citrulline supplementation improves erectile function in rats with acute arteriogenic erectile dysfunction. *The journal of sexual medicine* **10**, 2423-2429.

Shitan N, Minami S, **Morita M**, Hayashida M, Ito S, Takanashi K, Omote H, Moriyama Y, Sugiyama A, Goossens A, Moriyasu M, Yazaki K (2014) Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. *PLoS One* **9**.

McGlade E, Locatelli A, Hardy J, Kamiya T, **Morita M**, Morishita K, Sugimura Y and Yurgelun-Todd D (2012) Improved Attentional Performance Following Citicoline Administration in Healthy Adult Women. *Food Nutr Sci* **3**, 769-773.

Kameda N, Okigawa T, Kimura T, Fujibayashi M, Asada T, Kinoshita R, Baba S, **Morita M**, Morishita K and Moritani T (2011) The effect of L-citrulline ingestion on ECG QT interval and autonomic nervous system activity. *J Physiol Anthropol* **30**, 41-45.

Takasaki K, Uchida K, Fujikawa R, Nogami A, Nakamura K, Kawasaki C, Yamaguchi K, **Morita M**, Morishita K, Kubota K, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M and Iwasaki K (2011) Neuroprotective effects of citidine-5-diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia. *Journal of pharmacological sciences* **116**, 232-237.

Takasaki K, Mishima K, **Morita M**, Morishita K, Nogami A, Sakamoto Y, Nagao M, Kubota K, Katsurabayashi S, Fujiwara M and Iwasaki K (2011) Citidine-5-diphosphocholine ameliorates the impairment of spatial memory induced by scopolamine. *J Health Sci* **57**, 432-435.