

高血圧自然発症ラットに対する野菜抽出物の 血圧降下作用について

高橋 ルミ子*, 出海 みどり*, 木元 幸一**

(平成12年10月5日受理)

Antihypertensive Effects of Extracts from Vegetables in Spontaneously Hypertensive Rat

Rumiko TAKAHASHI, Midori IZUMI and Koichi KIMOTO

(Received on October 5, 2000)

キーワード：血圧降下作用, 野菜抽出物, クレソン, 高血圧自然発症ラット

Key words: antihypertensive effect, vegetable extracts, watercress, SHR

緒言

高血圧症は、高脂血症、糖尿病、肥満と並び循環器系疾患の重大なリスクファクターであり、いわゆる生活習慣病の代表である。現在、日本人の高血圧症患者は境界域高血圧を含めるとおよそ3千万人を越すといわれている。高血圧は原因からみると腎臓、甲状腺や心血管など病気の症状として血圧が高くなる二次性高血圧と、原因が特定できない本態性高血圧に分類される。

近年の研究により降圧薬の進歩はめざましく、次々と有効な新しい薬が開発されている。しかし薬剤による治療は生涯に渡り続くと考えたほうがよい。よって、薬物治療以外に食事、生活習慣（飲酒、喫煙）の規正、運動など日常生活の見直しが高血圧の予防と治療につながる。その中でも食生活の改善は高血圧の療法で最も重要な位置を占める。それゆえ、メディアでも毎日のように、体調を調節する機能を持つ食品等について取り上げられ、人々の関心を呼んでいる。このような中で、我々が食品として摂る天然物（動植物や微生物）に含まれる血圧降下物質に関する研究が盛んに行われており、アミノ酸や蛋白質分解産物、野菜、海藻ら¹⁾によりイワシ筋肉由来ペプチドや、家森ら²⁾によってカゼインのトリプシン分解物中に、ACEの阻害活性を有する血圧降下作用を持つ物

質が見出されており、それらは、in vivoにおいても高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧上昇を抑制することが確認されている。また清水ら³⁾は野菜のあしたばより、ACE阻害物質を精製し、SHRの血圧上昇を抑制することを見出している。

前報⁴⁾で報告したように、我々は小動物を用いて血圧を測定する方法として、ポリエチレンチューブを動脈内に挿入し、圧トランスデューサを介して直接動脈圧を測定する手法（直接法）を習得した。直接法は血圧を長時間連続して測定することができるという利点があり、薬理学的には、血圧反応を観察することによって薬の作用様式や生体内動態を知ることができる。また試料は少量で済み、微量有効成分の降圧作用を調べるには大変都合が良い。そこで今回、我々は直接法を利用することにより、野菜抽出物の降圧作用のスクリーニング検査を試みACE阻害活性との関連について検討し、新たな生理機能成分を持つ野菜を見出すことを目的として実験を行った。

実験方法

1. 材料

実験には、身近で購入できるもの、栽培可能なものを選んだ。あるいは小売店で販売し始めた目新しい野菜も加えて実験に用いた。天芽 (Chekur Manis)、豆腐 (Tomyo)、調理菊 (Chrysanthemum morifolium)、塌菜 (Tacai)、なば菜 (Nabana) は市販品を購入した。クレソン (Watercress) は群馬県榛名湖で自生していた

* 栄養科 栄養学第一研究室

** 栄養学科 栄養生化学研究室

ものを、春菊 (Garland chrysanthemum), チンゲン菜 (Pakchoi) は埼玉県の畑地で栽培されたものを使用した。

2. 野菜抽出液の調整

Fig.1 に野菜抽出物の調整方法を示した。野菜は凍結

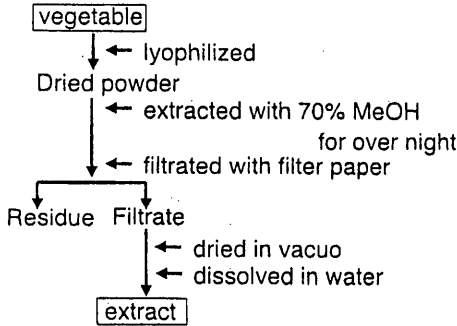


Fig.1 preparation of extracts from vegetables.

乾燥し粉碎したものをを用いた。粉末試料 1g に対し 20 倍量の 70%メタノールを加え、一晚攪拌することにより抽出した。その抽出液はろ紙 (東洋濾紙No.2; 東京) でろ過し、エバポレーターにより減圧濃縮乾固した後、再び蒸留水を加えて溶解したものを、Fig.2 に示すように逆相系の樹脂を充填した Sep-pak C18 カートリッジ (以降 Sep-pak C18) (Waters, Milford, Massachusetts U.S.A) に注入し、得た溶出液とそして次に水で洗浄したる液と合わせて凍結乾燥し抽出物を得た。さらに 90%メタノールで Sep-pak 吸着物質を溶出し、蒸発乾固した。画分はそれぞれ前者を水溶出画分、後者を 90%メタノール溶出画分とした。これらの画分は生理食塩水で溶解した後、0.45 μm のフィルター (DISMIC-13HP, 東洋濾紙) でろ過し、静脈内投与 (以降静注) 用試料と

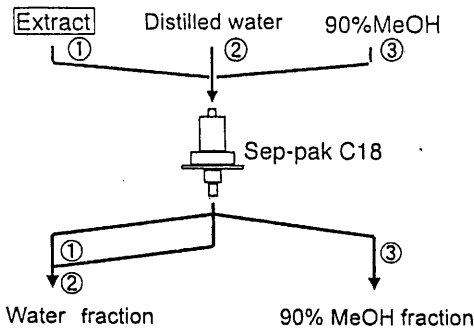


Fig.2 Fractionation of extracts from vegetables by Sep-pak C18.

した。また、この試料を ACE 阻害活性測定に用いた。

3. 降圧効果の検定法

3. 1 直接動脈圧測定法 (直接法) による血圧測定

日本チャールスリバーより購入した雄性的の SHR を用いて、野菜抽出画分の静注による降圧作用を調べた。試料の静注および直接法のための手術は前報で述べたように行った。すなわち、ウレタン麻酔 (1g/kg 体重) を施したラットの頸静脈に投与のためのポリエチレンチューブを挿入し、圧トランスデューサー (D-312, 日本光電, 東京) に接続し、血圧測定アンプ (AT-601G, 日本光電) を介して測定した。また結果はレコーダー (RTA4100, 日本光電) を用いて波形記録を行った。試料はラットの体重 100g あたり 100 μl を静注した。

3. 2 単回経口投与による血圧測定

SHR (雄性, 42 週齢) に体重 100g あたり凍結乾燥粉末として 200mg および 400mg にあたる, Sep-pak C18 による 90%メタノール溶出画分を蒸留水に溶解し、0.45 μm のフィルターに通した試料を単回経口投与し、経時的に血圧を測定した。血圧測定はソフトロン (東京) の非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A) による Tail-cuff 法により行った。

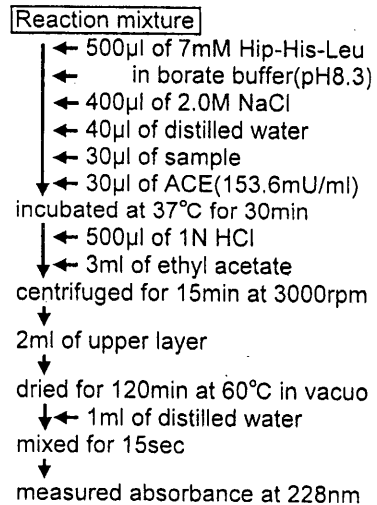


Fig. 3 Assay method of ACE inhibitory activity.

4. ACE 阻害活性測定法

Sep-pak C18 による分画によって得た画分の ACE 阻害活性の測定は Cushman & Cheung⁵⁾ の測定法を改良した国府ら⁶⁾ の方法に準じて Fig.3 のように測定した。ホウ酸緩衝液 (pH8.3) に 7mM とするように溶解した基質

Hip-His-Leu (ペプチド研究所, 大阪) に食塩, 水, 試料と共に, ACE (ウサギ肺由来の凍結乾燥品, Sigma, St.Louis) を加え 37°C, 30 分間反応させ, ACE により生成した馬尿酸を酢酸エチルで抽出し活性を測定した. 阻害活性は試料の代わりに水を加えたときの吸光度を Control(C), 反応後に ACE を加えたときの吸光度を Blank(B), 試料と ACE を反応させたときの吸光度を Sample(S) とした. 酢酸エチルへの馬尿酸の回収率(C-B) を 100% として, ACE の残存活性(%) = $(S-B/C-B) \times 100$ を求め, 阻害活性(%) は $100\% - \text{残存活性}(\%)$ から求めた.

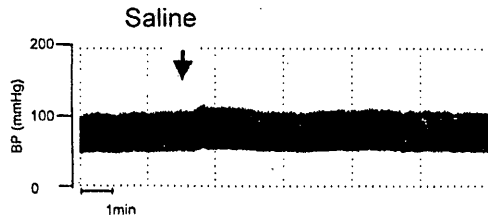


Fig.4 Changes of blood pressure after intravenous administration of saline in SHR.

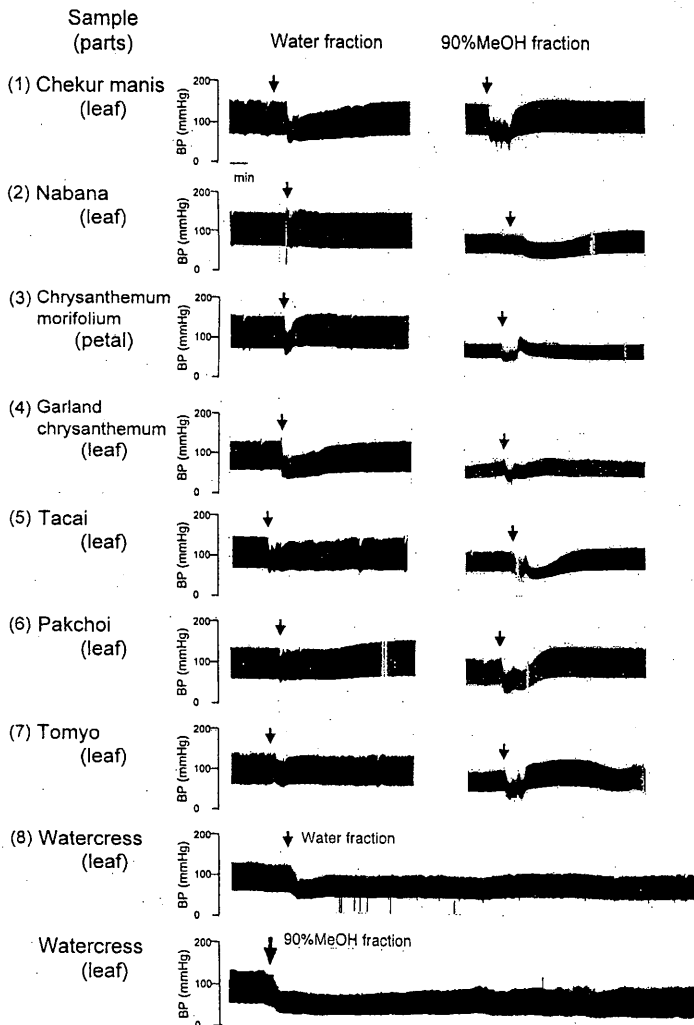


Fig. 5 Changes of blood pressure in SHR while intravenous administration fractions by filtration with Sep-pakC18 of extracts from vegetables.

結果

まず始めに、生理食塩水を静注した時の血圧の変化を確かめた。Fig.4 に示したように、生理食塩水を静注した場合、血圧に変化は生じなかった。

次に、野菜抽出物の Sep-pak C18 による水溶出画分および 90%メタノール溶出画分を静注したときの血圧の変化を Fig.5 に示した。天芽(1)のそれぞれの画分を静注した結果、水溶出画分では直後に強い血圧降下(53mmHg)を示し、およそ5分間持続的に低下傾向を示した。90%メタノール溶出画分では直後に血圧降下を示したものの、血圧の上下動を生じ、また水溶出画分のような持続性もみられなかった。なば菜(2)は水溶出画分に血圧降下(25mmHg)が認められた。また、90%メタノール溶出画分でも、25mmHgの血圧降下が生じ、およそ3分間持続した。調理菊(3)では、両画分に1分程度の短時間の血圧降下がみられた。春菊(4)は、水溶出画分においておよそ3分間の血圧降下がみられたが、90%メタノール画分では30秒程度の短時間の血圧降下であった。塌菜(5)は水溶出画分では1分程度の血圧降下(32mmHg)であったが、90%メタノール溶出画分では最高45mmHgの強い血圧降下を示し、およそ3分間持続した。チンゲン菜(6)は水溶出画分では一過性のわずかな降下(22mmHg)にとどまったが、90%メタノール溶出画分では、強い血圧降下(40mmHg)を示しおよそ2分間持続した。豆苗(7)の水溶出画分の血圧降下(21mmHg)は1分程度の短時間の血圧降下であった。90%メタノール溶出画分では短時間の血圧降下がみられ

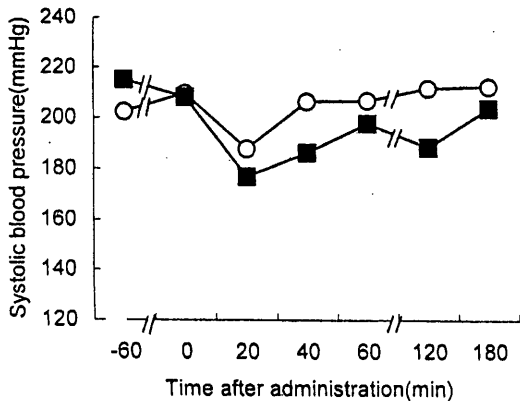


Fig. 6 Effect of blood pressure in SHR through oral administration with 90% MeOH fraction of extracts from watercress.

—○— 200mg/100g body weight,
—■— 400mg/100g body weight

Table.1 ACE inhibitory activity of fractions by filtration Sep-pak C18 of extracts from vegetables.

Sample (parts)	Water fraction	90%MeOH fraction
Chekur manis (leaf)	+	-
Nabana (leaf)	+	-
Chrysanthemum mor. (petal)	+	-
Garland chr. (leaf)	+	-
tacai (leaf)	+	-
Pakchoi (leaf)	+	-
Tomoyo (leaf)	+	-
Watercress (leaf)	+	-

たが、降下時に血圧の上下動が生じた。つぎにクレソン(8)の水溶出画分では、静注直後43mmHgの血圧降下を示し、その後、20分にわたり血圧降下が持続した。また、90%メタノール溶出画分を静注すると、59mmHgの強い血圧降下が生じ、他の野菜抽出物の画分ではみられなかった持続性も認められた。

次に Table.1 に、野菜抽出物の Sep-pak C18 による水溶出画分および 90%メタノール溶出画分の ACE 阻害活性を測定した結果を示した。天芽、なば菜、調理菊、春菊、塌菜、チンゲン菜、豆苗、クレソン、今回用いた8種の試料の水溶出画分に ACE の阻害活性があった。しかし、90%メタノール溶出画分ではすべての試料に ACE 阻害活性はみられなかった。

そこで、静注による直接圧の測定により、最も強く、持続性のある血圧降下作用を示したクレソン抽出物の Sep-pak C18 による 90%メタノール溶出画分の凍結乾燥粉末について、SHR への単回経口投与による降圧効果を調べたところ、Fig. 6 に示したように、投与後 20 分で 21mmHg(200mg/100g)の血圧降下が認められた。また、400mg/100g の投与では、投与後 20 分で 31mmHg の血圧降下が認められ、その降下が 3 時間後まで持続した。以上のように投与濃度依存的にさらに強い血圧降下が認められ、降下持続時間の延長もみられた。

考 察

前報⁴⁾で我々は、動脈圧直接測定法（直接法）を習得したことを報告した。本報では、その手法を利用することにより、新たに有効な血圧降下作用を有する野菜を見出すことを目的として、数種の野菜抽出物の降圧作用スクリーニング検査を試み、また ACE 阻害活性との関連について検討した。直接法によるスクリーニング検査の結果から明らかのように、今回用いたすべての試料に強弱の差はあるが血圧降下作用が観察された。また、すべての水溶出画分に ACE 阻害活性があった。結果には示していないが、今回実験を行った野菜のなかでもクレソン、天芽には、特に高い ACE 阻害活性があり、血圧降下も他の試料と比較して強く、持続性があった。1983年に鈴木ら⁷⁾は各種の食品について ACE 阻害能を検討し、その中で 30 種の野菜類のうち、26 種に ACE 阻害能があり、そのうち 10 種類は 50%以上の阻害を示したことを報告している。また、岡本ら⁸⁾は植物の熱水抽出物を SHR および SHR-SP に静注し、数種の野菜で血圧降下を認めたことを報告している。このように、多くの野菜が血圧降下に有効な成分を有することが報告されており、本実験で用いた 8 種の野菜についても同様に、血圧降下作用物質を有することが示唆された。

90%メタノール溶出画分の静注によりすべての野菜において血圧の降下が生じたが、注入後血圧が乱れが生じたり、注入前より血圧が上昇するなどの影響を示した。しかし、クレソン抽出物の 90%メタノール溶出画分では、他の試料にはみられなかった強く、持続性のある血圧降下作用が認められた。但し、90%メタノール溶出画分には、水抽出画分にあった ACE 阻害活性がなかった。このことからクレソンは ACE 阻害活性物質だけでなく、ACE 阻害以外に血圧を降下させる有効な物質が存在する可能性が示唆された。現在、降圧機序が確認されている食品の中でも、ACE 阻害以外の作用による降圧は、ほとんど研究されていないが、難波ら⁹⁾は杜仲葉水抽出画分の血圧降下の作用機序は、ムスカリン受容体を介する副交感神経の刺激によることを示唆している。また、大森ら¹⁰⁾はギャバロン茶に大量に含まれる GABA は ACE 阻害以外の作用が予測されることを報告しているが、その機序は現段階では不明である。

クレソン抽出物の Sep-pak C18 からの 90%メタノール溶出画分の SHR への単回経口投与を試みた結果、持続性のある血圧降下が認められた。このように、クレ

ソン抽出物の 90%メタノール溶出画分は、心臓を介してただちに循環器系へ至る(代謝系を経ない)静注による血圧降下のみならず、肝臓の代謝を経て全身に行き渡る系、すなわち経口的な胃内投与によっても血圧降下が認められた。

これらの結果から、日常的に摂取している野菜中に高血圧を改善する作用を有する物質の存在が示唆され、その中でもクレソンは有効な高血圧予防因子を含む野菜として、今後の研究に期待される。

加えて、野菜には食物繊維も多く含まれており、食物繊維はエネルギーを有する成分の吸収量を抑制し、食塩の排泄促進、腸内環境の改善などから血圧を下げる効果があるといわれている。よって、いくつかの有効成分が相乗的に働くことによって血圧を降下させることが考えられる。今後さらにクレソンの降圧物質の検索を行い、その有効性を明らかにしたい。

まとめ

本研究では、8 種の野菜(天芽、豆苗、調理菊、揚菜、なば菜、春菊、ちんげん菜、クレソン)の 70%メタノール抽出物の SHR における降圧作用について調べた。

野菜抽出物は Sep-pak C18 を用い、水溶出画分、90%メタノール溶出画分に分画した。水溶出画分は 8 種すべての野菜について、静注後血圧の降下がみられ、またすべての野菜で ACE 阻害活性がみられた。その中でも、クレソンでより強く、持続性のある血圧降下が生じた。

90%メタノール溶出画分はすべての野菜で ACE 阻害活性がみられなかった。しかし、静注後、すべての野菜で血圧の降下がみられた。そのなかでも、クレソンは他の野菜と比べて強く、しかも持続性のある血圧の降下を示した。

クレソン抽出物の 90%メタノール溶出画分を SHR に経口投与すると血圧の下降が生じた。また濃度に依存した血圧の下降が生じ、持続時間も延長した。

以上の結果より、クレソンの降圧作用は ACE 阻害因子による血圧降下作用のみならず、ACE 阻害をしない因子の関与が示唆された。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、実験にご協力いただきました平成 9 年度栄養学科栄養学専攻卒業の三井淳子さんに深く感謝致します。

参考文献

- 1) 末綱邦男, 箴島克裕: 日本栄養食糧学会, **42**, 47-54 (1989)
- 2) 家森幸男, 奈良安雄, 池田克己, 菅井隆二, 村上梅司: 日本栄養食糧学会, **48**, 307-311(1995)
- 3) E.Shimizu, A.Hayashi, R.Takahashi, Y.Aoyagi, T.Murakami and K.kimoto: *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, **45**, 375-383(1999)
- 4) 高橋ルミ子, 出海みどり, 木元幸一: 東京家政大学研究紀要, **38**, 111-116 (1998)
- 5) D. W. Cushman and H. S. Cheung: *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637-1648 (1971)
- 6) 国府達郎, 山本研二郎: レニンと高血圧, メディカルトリビューン (1966)
- 7) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒 熙: 日本農芸化学会誌, **57** (11) 1143-1146 (1983)
- 8) 岡本耕造, 鈴木庸之, 三宅英夫, 飯塚義富, 村上哲男, 本田 進, 掛樋一晃: 近畿大学医学会誌, **4** (2) 捕冊, 83-88 (1979)
- 9) 難波恒雄, 服部征雄, 葉 加南, 馬 永華, 野村靖幸, 金子周司, 北村佳久, 小泉 保, 片山和憲, 盧煒: 和漢医薬学会誌, **3** (2), 89-97 (1986)
- 10) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口 満: 日本農芸化学会誌, **61**(11), 1449-1451 (1987)

Summary

The antihypertensive effects of 70% MeOH extracts from vegetables were examined in SHR. The extracts were fractionated by Sep-pak C18 water fractions and 90% MeOH fractions. Intravenous administration of both fractions caused a fall of blood pressure in SHR. Both fractions from watercress extract extremely caused a fall of blood pressure, and the duration was very long. While, all 90% MeOH fractions did not have ACE inhibitory activity. In SHR, single oral administration of 90% MeOH fraction from watercress extract (400mg/100g body weight) caused significant sustained a fall in blood pressure after 3hours. These results suggest that antihypertensive effects of watercress extracts was not due to the ACE inhibitory activity.