

クレソン抽出物の高血圧自然発症ラットにおける 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 13 年 10 月 4 日受理)

Antihypertensive Effects of Watercress Extract in Spontaneously Hypertensive Rat

Rumiko TAKAHASHI, Midori IZUMI and Koichi KIMOTO

(Received on October 4, 2001)

キーワード：クレソン, 血圧降下作用, 高血圧自然発症ラット

Key words: watercress, anti-hypertensive, SHR

緒 言

クレソン (*Rorippa nasturtium-aquaticum* L. Hayek) は、アブラナ科の水生多年草であり、原産はヨーロッパで、日本には明治時代の初めごろに渡ってきた。非常に繁殖力が強く、厳冬を除けば 1 年中採ることのできる野菜である。一般に親しまれているクレソンという呼び名はフランス語源であり、英語名は Watercress である。そして和名はオランダガラシ、ミズガラシというように特有の辛み成分が含まれている。栄養成分としてはカルシウムや鉄などの無機質、カロチン、ビタミン C を豊富に含んでいる。そして、ヨーロッパや中国ではクレソンが、消化、解熱、利尿を目的に民間薬として利用されている。しかし、活性本体の解明はほとんどされていない。

著者らは前報¹⁾で、8 種の野菜 (天芽、豆苗、調理菊、場菜、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 における血圧降下作用を直接法により検討し、その結果、すべての野菜で血圧降下が観察されたことを報告した。その中でも、クレソンは他の野菜と比較して、強く、持続性のある血圧降下が認められた。そこで、クレソン抽出物より血圧を降下することのできる画分を分離し、精製することを目的として、固

相抽出および高速液体クロマトグラフィーを行った。そして、得られたクレソン画分を、SHR の静脈内に注入 (以下静注) し、血圧におよぼす影響を直接法によって検討した。また薬物を静注し、クレソン画分の降圧作用と比較するとともに、クレソン画分に対する薬物の作用についても検討した。

実験方法

1. 材料

実験に用いたクレソンは、茨城県久慈郡大子町で収穫されたものを入手した。配送されたクレソンは水道水で洗浄し、蒸留水に浸した後、水気を良く取った。次にクレソンの葉のみを摘み取り、凍結乾燥した。乾燥試料はミキサーで粉碎することにより均質化し、使用までディープフリーザー (−30℃) に保存した。

2. 抽出液の調整

クレソン抽出液の調整は前報¹⁾に基づき、クレソン凍結乾燥物に 70% メタノールを加え、一晚、攪拌抽出した液をろ過後濃縮し、再び少量の蒸留水を加え溶解した。その液をメガボンドエルト C18 (ジールサイエンス) に注入し固相抽出を行った。固相に吸着された物質は、最初に 30% メタノールを用いて溶出し、続いて 60, 90% メタノールで順次溶出した。各画分は生理食塩水に溶解し (生理食塩水 1 ml 中、生葉に換算して 8.55 g となるように調整)、0.45 μm のフィルター (DISMIC-13HP, 東

* 栄養科 栄養学第 1 研究室

** 栄養学科 栄養生化学研究室

洋濾紙)で濾過し、静注試料および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分画用試料とした。

3. HPLC による精製

固相抽出により分画された画分を、さらに HPLC により精製を行った。カラムは Inertsil PREP-ODS ($\phi 20 \times 250$ mm, ジーエルサイエンス)を用いた。送液ポンプは Intelligent pump L-6200 および L-6000, 検出器は Detector L-4200UV-VIS, 記録は Chromato-integrator (すべて日立製作所)を用いて行った。分析条件は Fig. 2 に示した。試料は 500 μ l を注入した。

4. 使用薬物

注射用塩化アセチルコリン (オピソート®, 第一製薬), 硫酸アトロピン, 硫酸エゼリン (和光純薬), アンジオテンシン I (ペプチド研究所), カプトプリル (カプトプリル®, 三共)を用いた。薬物は蒸留水もしくは 50% エタノールに溶解し、用時、生理食塩水で希釈して用いた。

5. 血圧測定

血圧の測定は、既報²⁾のように、観血的に血圧を測定する直接法で行った。すなわち、ウレタン (1g/Kg) 麻酔下の雄性 SHR (体重 410~442g, 日本チャールスリバー) の大腿動脈に留置したポリエチレンチューブを圧トランスデューサ (D-312, 日本光電) 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。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。試料および薬物の投与量はラットの体重 100g あたり 100 μ l とし、頸静脈に留置したポリエチレンチューブより注入した。

結果および考察

1. クレソン降圧物質の精製

クレソンの 70% メタノール抽出物をメガボンドエルト C18 により固相抽出した。樹脂に吸着された物質を 30, 60, 90% メタノールで順次溶出し、得た画分を静注することにより、血圧への影響を調べた結果を Fig. 1 に示した。

30% メタノール溶出画分を静注すると、血圧は直後に下降 (最大降下 36mmHg) を始め、緩やかに持続し、およそ 20 分後、投与前の血圧に戻った。しかし、60%, 90% メタノール溶出画分では血圧降下は認められなかった。このようにクレソンの降圧物質は 30% メタノールによって溶出された画分に含まれることが確認された。さらにこの画分の HPLC による精製を試みた。HPLC を行った結果、Fig. 2 のようなクロマトグラムが得られ 220nm に吸収を持つ、多数の物質の存在が示唆された。そこで出現したピークをいくつかに分画し、それぞれの画分を集めて、減圧濃縮した後、生理食塩水に溶解して 1ml とし、静注を行った。その結果 F1 で示したリテンションタイム 20 分から 24 分を集めた画分に血圧降下 (最大降下 27mmHg) が認められた。この画分をさらに精製するために、2 回目の HPLC を行った。1 回目同様、ピークをいくつかに分画し静注した結果、F2 で示したリテン

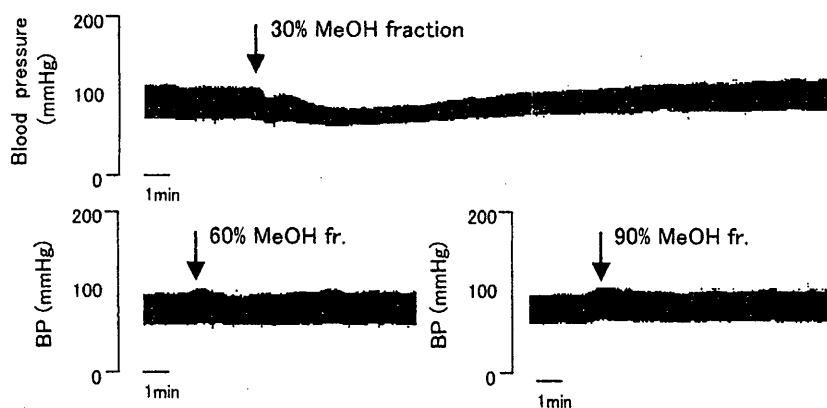


Fig.1 Effects of several fractions of extracts from watercress on arterial blood pressure in SHR.

The 70% methanol extracts of watercress were poured into Mega Bond Elut C18. The material held in the solid-phase was taken out in turn with 30%, 60%, 90% methanol. Several fractions dried under reduced pressure, and then it was dissolved in the physiological saline (as an amount of leaf, 8.55g/ 1m l). All fractions were given intravenously (100 μ l/100g body weight).

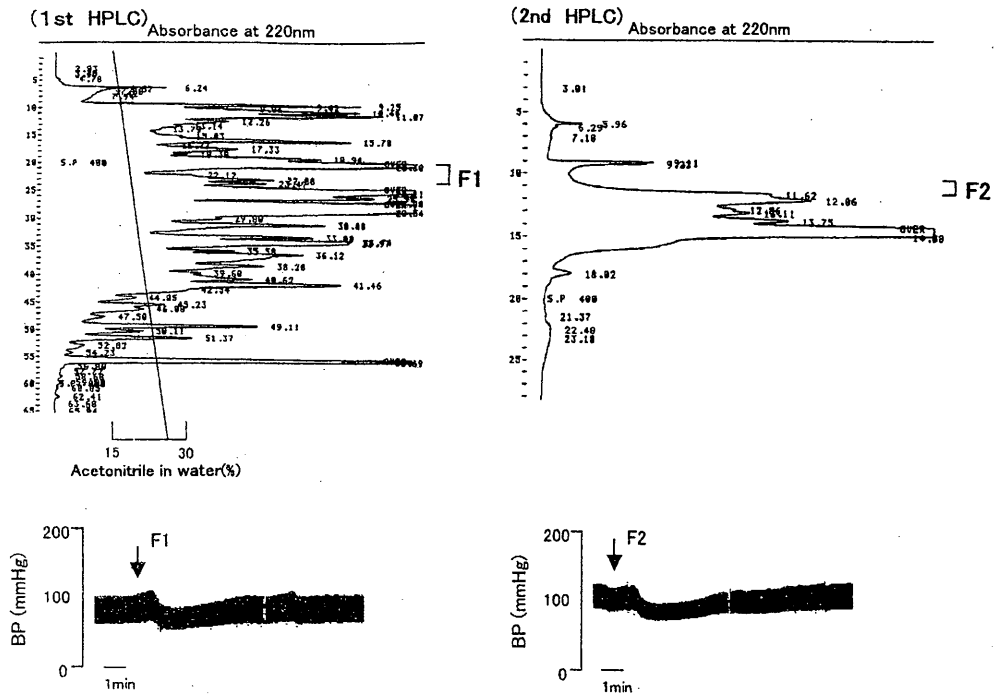


Fig.2 Purification of Anti-hypertensive material factor by HPLC.

A reverse-phase HPLC by Inertsil PREP-ODS column (20×250mm) of the fraction eluted from Mega Bond Elut C18 with 30% methanol was done. The column was eluted at a flow rate of 8.0ml/min by a linear gradient of acetonitrile (15 to 30% in 90min) containing water. The F1 with anti-hypertensive effect was indicated. The F1 was further purified by second reverse-phase HPLC by PREP-ODS column. The column was eluted at a flow rate of 8.0ml/min with 19% acetonitrile. The F2 with anti-hypertensive effect was indicated. The effects on the blood pressure of SHR when F1 and F2 were given intravenously were shown in the bottom.

ジョンタイム10.7分から11.8分を集めた画分に血圧降下(最大降下37mmHg)が認められた。よって、これより以降、2度のHPLCにより採取した降圧作用を有する画分F2(以下クレソンF2画分)を用いて実験を行った。

2. 麻酔下 SHR の血圧におよぼすクレソン F2 画分 および薬物の影響

麻酔下 SHR にクレソン F2 画分および薬物を静注した時の血圧におよぼす影響を Fig. 3 に示した。

(A-1) に示したように、アセチルコリン (Ach, 0.1 μ g/kg 体重) を静注すると血圧は急激に降下(最大降下29mmHg)し、その後速やかに上昇し、投与前の血圧に戻った。Ach は自律神経作用薬であり、その作用はムスカリン作用(副交感神経末端興奮作用)、ニコチン作用(自律神経節、運動神経節と筋接合部における興奮)に集約される³⁾。つまり、血圧降下はムスカリン作用に

よってもたらされたと考えられる。Ach はアセチルコリンエステラーゼにより加水分解されるので作用時間が短い³⁾ということがこの結果より見て取れる。よって、その血圧降下は Fig. 2 で、クレソン F2 画分が示した、強く、なおかつ持続性があった降下とは異なっていた。(A-2) に示したように、アトロピン (3mg/kg) を静注した直後に血圧が降下し、緩やかに持続した。Ach を静注すると、単独投与の時に生じた降下が認められなくなった。また、クレソン F2 画分を静注した場合も Fig. 2 に示した単独投与のときのような血圧降下はみられなかった。アトロピンはムスカリン性シナプスに対する副交感神経遮断薬として最も代表的なものである⁴⁾ことから、Ach の作用を阻害し、血圧降下が消失したと考えられる。同様にクレソン F2 画分の降圧作用も消失した。杜仲葉の研究を行っている難波ら⁵⁾は、報告の中で杜仲葉水抽出画分の降圧作用がムスカリン性アセチルコリン受

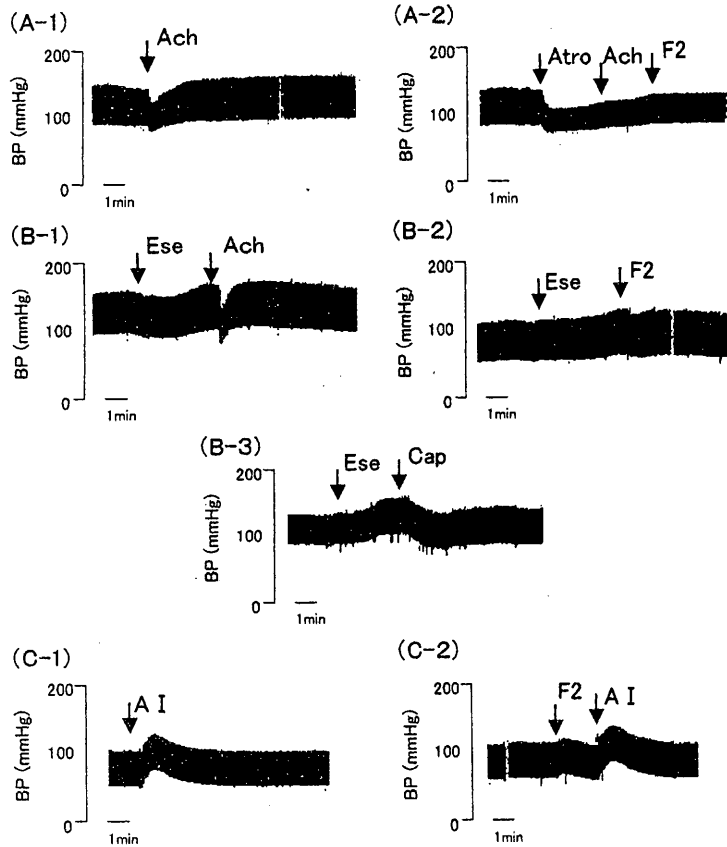


Fig.3 Effects of the F2 fraction and several drugs on arterial blood pressure in SHR.

The F2 was fraction with anti-hypertensive effect which separated by HPLC shown in fig.2. Several drugs was adjusted in the physiological saline, and then were given intravenously (100 μ l/100g body weight) in the following concentration: 0.1 μ g/kg acetylcholine (Ach) ; 3mg/kg atropin (Atro) ; 50 μ g/kg eselin(Ese) ; 0.5mg/kg A I ; 70 μ g/kg captopril (Cap).

容体を介する作用であると推察している。そこで、クレソン分画の降圧作用が Ach 同様にムスカリン作用であるのか、次の投与を行い、さらに検討してみた。

(B-1) に示したように、エゼリン (50 μ g/kg) を静注するとわずかに血圧が上昇し、3 分後に Ach を静注すると、Ach 単独投与の時よりも降下 (最大降下 41mmHg) が増強された。エゼリンはコリンエステラーゼ阻害薬である。先に示したように Ach はアセチルコリンエステラーゼによって加水分解を受け作用を失う。コリンエステラーゼ阻害薬はコリンエステラーゼと結合して、加水分解能を低下させることにより、結果として Ach の作用を増強させることになる³⁾。本実験においても、エゼリンによるアセチルコリンの血圧降下の増強が観察された。そこで (B-2) エゼリン静注後、クレソン画

分を静注したところ、単独投与で観察された血圧降下が消失し、Ach とは異なる結果となった。これらの結果より判断すると、クレソン F2 画分の血圧降下がムスカリン性作用による降圧とは別の作用であるかもしれない。A I はアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の作用を受け、A II になり、強い血管収縮を引き起こすこと⁶⁾が、明らかにされている。そこで、以下のように静注を行った。(C-1) に示したように、A I (0.5mg/kg) を静注すると直後に血圧が上昇し、その後速やかに下降した。既報²⁾で我々は、ACE 阻害降圧薬であるカプトプリルを静注し、血圧降下が生じている時点で A I を静注すると、A I の血圧上昇が抑制されることを確認し、報告している。そこで、A I とクレソン F2 画分の作用について検討したところ、(C-2) のように、クレソン F2 画分静注後に A I を

静注しても、単独投与のとき同様に AI による血圧の上昇が生じた。つまりクレソン F2 画分は AI 静注による血圧上昇を抑制しなかった。また、(B-3) に示したように、エゼリン静注後、カプトプリル ($70 \mu\text{g}/\text{kg}$) を静注すると、緩やかな血圧降下が生じ、クレソン画分とは異なる結果を示した。これらの結果より、クレソンの血圧降下作用は、カプトプリルのように ACE を阻害することで AII の産生を防ぎ、降圧をもたらす ACE 阻害薬とは異なる作用であることが示唆された。

以上より、クレソン F2 画分の降圧作用は Ach のようなムスカリン性の作用ではなく、また ACE 阻害による血圧降下でもないことが示唆された。

高血圧にならないということが理想ではあるが、日本にはおよそ 3 千万人を超える高血圧者がいると考えられている⁷⁾。そのため、近年、血圧をコントロールするための優れた降圧薬が開発されている。1998 年からは、ACE 阻害薬よりも副作用が少なく、AII が作用する受容体をブロックして働きを抑える、AII 受容体拮抗薬が使われ始めている⁷⁾。しかし、薬だけに頼るのではなく、まず、食事内容を改善し、定期的に軽い運動をするなど生活習慣を見直して降圧をめざし、そして、薬の使用はできるだけ少ない量にしたい。そこで、日常的に摂取する食物中に血圧をコントロールすることができる機能物質があれば、積極的に利用されることが望まれる。本実験で示したように、クレソンは静注で確認したところ、薬物と同様な薬理作用を示した。しかし、その降圧作用がどのようにもたらされるのかということは、現段階では明らかにできていない。本研究では検討していないが、クレソンには今回追跡した逆相系の固相に吸着された画分のみならず、吸着されなかった画分において、強い ACE 阻害活性を示すことを確認し、報告¹⁾している。このようにクレソンは、高血圧予防のための因子を含む野菜として、その有用性が示唆された。

現在、引き続きクレソンの降圧作用物質について、検討を行っており、作用機序についても明らかにしたい。また、クレソンの降圧作用が経口による摂取においても期待できるのか、SHR を用いた長期投与実験を行っている。

要 約

本研究では、クレソン抽出物の SHR における血圧降下作用について検討した。試料は頸静脈より注入し、大腿動脈の血圧を直接法により測定した。また、SHR に薬物を静注し、クレソンの降圧作用と比較した。

クレソンの 70%メタノール抽出物を Mega Bond Elut C18 により固相抽出した。吸着物質を 30%メタノールで溶出した画分に強い血圧降下が認められた。この画分を HPLC (逆相クロマトグラフィー) により精製した画分 (F2 画分) に強い血圧降下が認められた。

F2 画分の血圧降下作用は、アセチルコリンのように副交感神経の興奮によりもたらされる血圧降下作用とは異なることが示唆された。また、カプトプリルのように ACE を阻害することによりもたらされる血圧降下とも異なることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、クレソンをご提供いただいた茨城県久慈郡大子町の藤田健氏に深謝致します。また、卒業論文として実験に真剣に取り組まれた栄養学科栄養学専攻の鈴木美歩さん、末本真琴さん、管理栄養士専攻の苫米地のぞみさんに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 高橋ルミ子, 出海みどり, 木元幸一: 東京家政大学研究紀要, **41**, 39-44 (2001)
- 2) 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)
- 3) 津田喜典, 二宮一弥, 金戸 洋編著: 薬品科学 (改定第 6 版), 136, 146, 155 (1996) 南江堂
- 4) 田中千賀子, 加藤隆一編: NEW 薬理学 (改定第 3 版), 234-236 (1996) 南江堂
- 5) 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 燎: 和漢医薬学会誌, **3** (2), 89-97 (1986)
- 6) 深水昭吉, 村上和雄: 最新医学 (臨時増刊) **51**, 821-828
- 7) 猿田享男総監修: 別冊 NHK きょうの健康, 最新情報高血圧のすべて, 6-7, 86-87 (2000) 日本放送出版協会

Abstract

It was examined about the anti-hypertensive effects in SHR of watercress extracts. A sample poured it from the Jugular vein, and the blood pressure of the femoral artery in SHR was measured by direct measurements of blood pressure. Moreover, several drugs was poured into SHR and compared with anti-hypertensive effects of watercress. The extracts were fractionated by Mega Bond Elut C18, and it got 30% methanol fraction that had anti-hypertensive effects. The 30% methanol fraction was further refined with reverse-phase HPLC, and then it got the fraction (F2) that had anti-hypertensive effects. The anti-hypertensive effect of F2 was different from the anti-hypertensive effect of acetylcholine was suggested. The anti-hypertensive effect of F2 was different from the anti-hypertensive effect of captopril was suggested.