

羅布麻（紅麻：*Apocynum venetum* L.）葉エキスの降圧作用に関する研究(3)

田川智恵,^{*,a} 香川珠実,^b 中澤慶久,^a 鬼塚重則,^a 西部三省,^c 川崎博己^d

Studies on Antihypertensive Effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) Leaf Extract (3)

Chie TAGAWA,^{*,a} Tamami KAGAWA,^b Yoshihisa NAKAZAWA,^a Shigenori ONIZUKA,^a
Sansei NISHIBE,^c and Hiromu KAWASAKI^d

Hitachizosen Corp.,^a 1-2264 Habu-cho, Innoshima City, Hiroshima 722-2393, Japan, Dydo DRINCO,
INC.,^b 6F-2-8-3 Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health
Sciences University of Hokkaido,^c Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan, and Department of
Clinical Pharmaceutical Science, Graduate School of Natural Science and Technology,
Okayama University,^d 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

(Received July 9, 2004; Accepted August 20, 2004; Published online August 26, 2004)

To clarify the mechanisms underlying the antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L. (Apocynaceae)) leaf extract (LLE), we investigated the vasodilator effect of LLE in the rat mesenteric vascular bed, which plays an important role in changes in peripheral resistance and thus the regulation of blood pressure. In the perfused mesenteric vascular bed with active tone and intact endothelium, perfusion of LLE (0.1 ng to 100 mg/ml for 15 min) caused dose-dependent vasodilation, which was abolished by chemical removal of the endothelial layer with perfusion of sodium deoxycholate, but not by N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), a competitive inhibitor of nitric oxide (NO), which instead increased the effect. The LLE-induced vasodilation was partially inhibited by high K⁺-containing Krebs solution and tetraethylammonium (a K⁺ channel blocker) and completely by the combination of L-NAME and high K⁺-Krebs solution. However, atropine (a muscarinic acetylcholine receptor antagonist) did not affect the vasodilation. These results suggest that the vasodilation induced by LLE is endothelium-dependent and mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor, which involves the activation of K⁺-channels. The higher concentrations of LLE may enhance NO production/release to cause vasodilation.

Key words—*Apocynum venetum* L.; Luobuma leaf extract; antihypertensive effect; endothelium-dependent relaxation; rat mesenteric vascular bed

緒 言

羅布麻葉（Luobuma）はキョウチクトウ科（Apocynaceae）の多年生草本である *Apocynum venetum* L.（紅麻）の葉部を乾燥した生薬である。¹⁾ 羅布麻葉は中華人民共和国薬典に収載され、心臓病、高血圧、不眠症、神経衰弱、腎炎、浮腫に用いるとされている。^{2,3)} また羅布麻は内モンゴル遊牧民の伝統的なお茶としても飲まれていたとの報告があり、⁴⁾ 高血圧に関しては、羅布麻葉を煎じてお茶の代わりに毎日服用することが中薬大辞典に記載

されている。¹⁾ 最近では日本、中国、アメリカなどでお茶製品（例えば燕龍茶）やエキス製剤などに加工して広く血圧が高めの人に向けた健康食品として用いられている。

これまでに羅布麻葉エキス（LLE: Luobuma Leaf Extract）の薬理作用で降圧作用は認められているが、⁵⁾ その作用機序についての報告はされていない。そこで筆者らは、LLE をラットに経口投与し、その降圧作用の確認と作用機序の検討を行った。その結果、正常血圧ラットである Wistar Kyoto ラット（WKY）に経口投与しても血圧には影響が認められないが、高血圧自然発症ラット（Spontaneously Hypertensive Rats (SHR)) への経口投与では、6 週間目から有意な降圧作用が起こることを前報⁵⁾ で報告した。さらに LLE による降圧

^{a)} 日立造船株式会社, ^{b)} ダイードリンク株式会社,
^{c)} 北海道医療大学薬学部, ^{d)} 岡山大学大学院自然科学研究科臨床薬学
e-mail: chie-t@hitachizosen.co.jp

作用は angiotensin I 変換酵素阻害によるものでないことも明らかにした。⁶⁾

LLE には主フラボノイド成分として hyperoside と isoquercitrin が含有されており,⁷⁾ 保木らはこの hyperoside と isoquercitrin の混合物を SHR ラットに経口投与し、降圧作用を認めている,⁸⁾ また Taubert らはブタの冠動脈を用いて hyperoside と isoquercitrin に一酸化窒素 (NO) を介する血管内皮依存性弛緩作用があることを報告している。⁹⁾ これらのことから LLE の降圧作用機序として内皮依存性の血管弛緩が関与し、この弛緩発現は内皮由来の NO によるものであることが示唆される。

血管内皮細胞は血管トーンス及び血圧の主要な調節組織である。太い冠動脈では、NO が主な血管トーンスの規定因子であり、抵抗血管ではむしろ内皮由来過分極因子 (EDHF; endothelium-derived hyperpolarizing factor) が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。¹⁰⁾ 血圧の調節には太い血管よりも抵抗血管が重要な働きをしていることが分かっていることから、本報では血管への LLE の作用を調べることを目的に抵抗血管であるラット腸間膜動脈血管床を用いて LLE の血管拡張作用とその発現機序について検討した。

材料と方法

1. 材料 供試材料の羅布麻葉は中国の全国羅布麻研究中心 王振勤氏の同定に基づき、中国山東省河口区に野生する羅布麻から採取し (標本 20020802-1, 日立造船㈱にて保存)、前報⁵⁾と同じ以下の方法で LLE を調製した。

採取した羅布麻葉を 220—280°C の釜入機で殺青処理したのち、釜茶方式により約 150°C 約 6 分で焙煎・乾燥させ、半加工製品とした。その後、約 130°C 15 分で一次焙煎、約 150°C 45 分で二次焙煎を行い、羅布麻茶とした。この茶葉 100 g に対し、95—100°C の湯で 1000 ml、次に 800 ml でそれぞれ 60 分、2 回抽出した。抽出後濃縮し、遠心分離機で不溶物を分離したろ液を 230°C で噴霧乾燥後、粉碎して粉末の LLE とした。

なお、本報の実験に用いた LLE の品質は指標フラボノイド成分 hyperoside 及び isoquercitrin を HPLC により定量し (各 6 mg/g 含有)、確認を行った。

2. 実験動物 9—11 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 280—350 g) は清水実験材料㈱より購入し、室温 23±2°C、湿度 45±5%、明暗周期 12 時間 (明期 8:00—20:00) の条件下で飼育した。固形飼料 (オリエンタル酵母工業㈱) 及び水は自由に与えた。

3. 実験試薬 各種試薬は次のものを使用した。Acetylcholine chloride (ACh; 第一製薬)、methoxamine hydrochloride (日本新薬)、papaverine (大日本製薬)、sodium deoxycholate (SD; SIGMA)、N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; SIGMA)、indomethacin (Wako)、KCl (Wako)、tetraethylammonium (TEA; SIGMA)、atropine sulfate (Wako)。

Indomethacin 及び SD を除くすべての試薬は蒸留水に溶解させ、2—7 μM methoxamine を含む Krebs 液で調製した。Indomethacin は 98% EtOH に溶かし、7 μM methoxamine を含む Krebs 液で希釈調製した。SD は 0.9% 生理食塩水に溶かした。ACh は内皮保持標本に注入する際、methoxamine を含む Krebs 液で調製した。

4. 摘出腸間膜動脈血管床標本の灌流 ラットを pentobarbital-Na で腹腔内投与により麻酔後開腹し、Kawasaki らの方法¹¹⁾でラット腸間膜動脈血管床を摘出し、灌流標本とした。上腸間膜動脈内へポリエチレン製カニューレを挿入し、Krebs-Ringer bicarbonate 液 (Krebs 液; KH₂PO₄ 1.2 mM, NaCl 120.0 mM, KCl 5.0 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, EDTA-2Na 0.027 mM, CaCl₂ 2.4 mM, glucose 11.0 mM (pH 7.4)) を注入して血管床内の血液を除去したのち、腸間膜動脈血管床を腸管ごと摘出した。摘出した血管床は 4 本の主動脈を残し、それ以外の動脈は結紮後切断し、4 本の主動脈から出る動脈分岐を腸管側の近くで切り離して、腸間膜動脈血管床の灌流標本とした。標本を灌流装置に設置後、Krebs 液を peristaltic pump (AC-2120, ATTO 製) で一定流量 (5 ml/min) 灌流した。また、標本の乾燥を防ぐため、Krebs 液 (0.5 ml/min) を標本外に表面灌流した。Krebs 液はあらかじめ 95% O₂, 5% CO₂ の混合ガスを飽和させ、37°C に保温したガラス製蛇管内を通過させた。標本とポンプの間に置いた圧トランジューサー (TP-200T, 日本光電製) にて灌流圧を測定し、灌流圧の変化を血管緊張度変化として、記録計 (model U-228, 日本電子化

学製)上に記録した。

5. 血管内皮細胞の化学的除去 血管内皮細胞の除去は静止緊張下に, SD (1.8 mg/ml) を30秒間灌流して行った。^{12,13} SDの灌流によって, 一過性の灌流圧上昇(20–30 mmHg)が見られた。その後, SDを含まないKrebs液で60分間標本を洗浄した後, methoxamine (2 μ M)を含むKrebs液で灌流圧を上昇させ, ACh (1 nM)注入によって生じる内皮依存性の弛緩反応が消失することで, 血管内皮細胞の除去を確認した。

6. 実験プロトコール LLEを内皮保持標本及び内皮除去標本に灌流した。

6-1. 内皮保持標本 静止緊張下の腸間膜動脈標本にKrebs液を灌流し, さらにmethoxamine (7 μ M)で血管を収縮させ灌流圧を一定レベルまで上昇させた。灌流圧が安定したのち, ACh (100 pmol)を注入し, 血管内皮細胞依存性の弛緩が起こることで, 正常内皮の存在を確認した。その後, LLEを7 μ M methoxamineを含むKrebs液で各濃度に調製したものを濃度毎(100 pg/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 10 μ g/ml) 15分間隔で標本内に灌流させ, 血管弛緩反応を観察した。なお, 灌流時間はLLEが内皮細胞から平滑筋へ移行して平衡に達する時間を考えて設定した。血管弛緩反応は, 実験の最後でpapaverine (100 μ M)を灌流して起こる最大弛緩を100%とし, これに対する弛緩率で評価した。

また, LLEの血管内皮由来弛緩因子の関与及びムスカリン受容体への作用について検討するため, 内皮保持標本を用いて, Krebs液のみを灌流後, Krebs液に各薬物(L-NAME, 100 μ M; indomethacin, 1 μ M; 高K⁺, 60 mM; TEA, 5 mM; atropine, 1 μ M)を添加して灌流圧を安定させ, さらにmethoxamine (2–7 μ M)を含むKrebs液に各薬物を添加して標本中に灌流した。灌流圧を一定レベルまで上昇させたのち, ACh (100 pmol)で各薬物の内皮弛緩作用を観察後, このKrebs液で各濃度のLLEを調製し, 灌流することでLLEの各薬物に対する作用について観察した。ただし, 1標本で検討した薬物は1種類である。

6-2. 内皮除去標本 内皮保持標本と同様にLLEの各濃度溶液を15分間隔で灌流し, 弛緩反応を観察した。

7. 統計学的解析 得られた実験値は平均±標準誤差(mean±S.E.)で表した。統計学的解析では2群間の比較を対応のないStudent's *t*-testを用い, 危険率5%以下を有意差ありと判定した。

結果及び考察

1. LLEの内皮保持標本(+E)及び内皮除去標本(-E)における血管弛緩作用 ラット腸間膜動脈灌流標本(内皮保持標本)の特徴として, methoxamine (7 μ M)含有Krebs液で血管を収縮させて灌流圧を上昇させ, そのまま放置しても灌流圧は徐々に低下し, 弛緩反応が確認された(Fig. 1コントロール)。これは, 血管内皮細胞が正常に機能しているため, 内皮由来弛緩因子を遊離し, 弛緩したと考えられる。

LLEを内皮保持標本及び内皮除去標本に灌流したときの血管弛緩反応をFig. 1に示した。内皮保持標本において, LLEの灌流により濃度依存的な灌流圧の低下, すなわち血管弛緩反応が観察され, コントロールと比較してその弛緩の程度は有意に大きかった。したがって, LLEには血管弛緩作用のある物質が含まれていることが示唆された。一方, 内皮除去標本では, LLEによる弛緩は顕著に抑制され, コントロールと比較して有意に小さかった。これらのことから, ラット腸間膜動脈血管床におけ

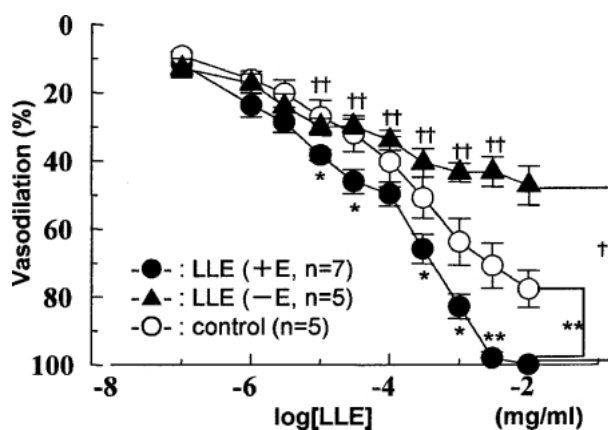


Fig. 1. Concentration Dependent Vasodilation of LLE Perfusion in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with (+E) or without (-E) Intact Endothelium and with Active Tone Produced by Methoxamine (7 or 2 μ M)

Krebs' solution containing methoxamine (7 μ M) which does not contain LLE was used as control. The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μ mol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean±S.E. **p*>0.05, ***p*>0.01 compared with responses in control. †*p*>0.05, ††*p*>0.01 compared with responses in +E.

る LLE の血管弛緩作用は内皮依存性であることが明らかになった。

2. LLE の血管弛緩作用に対する各種内皮由来弛緩因子阻害薬の影響 LLE による血管弛緩が内皮依存性であることから、関与する血管内皮由来弛緩因子について各種阻害薬を用いて検討した。LLE に NO 合成酵素阻害薬である L-NAME, シクロオキシゲナーゼ阻害薬である indomethacin, 過分極を阻止するために高 KCl を添加して同時灌流した実験結果を Figs. 2—4 に示した。LLE による血管弛緩反応は L-NAME の添加によりさらに大きくなった。一方、高 K⁺ Krebs 存在下では、LLE による弛緩反応は有意に抑制された。しかし、高濃度の LLE による弛緩反応は完全に抑制されなかった。このことから、LLE の内皮依存性血管弛緩作用には内皮由来過分極因子 (EDHF; Endothelium-derived hyperpolarizing factor) が関与していることが推察された。ラット腸間膜動脈血管などの抵抗血管では内皮依存性の弛緩反応のほとんどが EDHF を介した反応であることが報告されている。¹⁴⁾ したがって、LLE の弛緩反応は EDHF を介する弛緩であると考えられる。また、シクロオキシゲナーゼ阻害薬の indomethacin 添加では、LLE の血管弛緩作用は強くなったことから、プロスタノイド類が LLE による弛緩作用を阻害している可能性が示唆された。

さらに、LLE に L-NAME と高 KCl の両方を添加

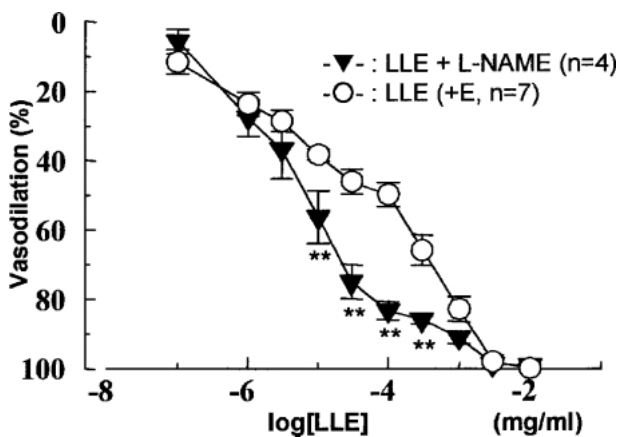


Fig. 2. The Effect of 100 μM L-NAME on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=7)
The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μmol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean ± S.E. **p>0.01 compared with responses in LLE (+E).

したときの血管弛緩反応を Fig. 5 に示した。LLE による弛緩反応は高 KCl と L-NAME を加えることにより LLE の弛緩作用は消失し、高濃度での反応も完全に抑制された。この結果から、LLE は高濃度になると NO を介した弛緩を起こすことが判明した。

ラット腸間膜動脈ではまだ EDHF の本体について分かっていないが、その作用発現に K⁺ チャネル¹⁵⁾の開口が重要であることは知られている。そこで LLE の弛緩作用に対する K⁺ チャネル阻害薬に

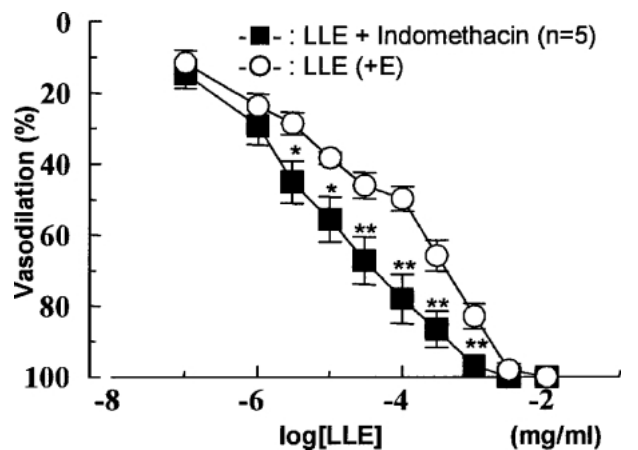


Fig. 3. The Effect of 1 μM Indomethacin on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=5)
The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μmol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean ± S.E. *p>0.05, **p>0.01 compared with responses in LLE (+E).

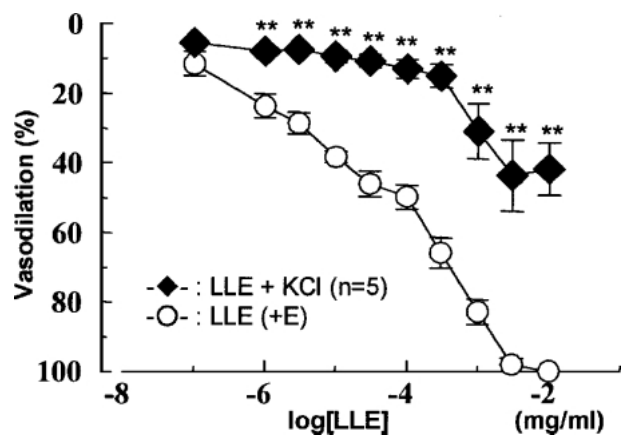


Fig. 4. The Effect of 60 mM High K Containing Krebs Solution on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=5)
The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μmol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean ± S.E. **p>0.01 compared with responses in LLE (+E).

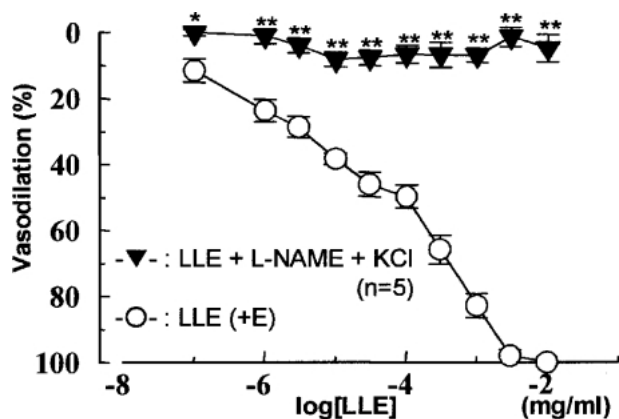


Fig. 5. The Effect of the Combination of 100 μ M L-NAME and 60 mM High K Solution on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=5)

The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μ mol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean \pm S.E. * p >0.05, ** p >0.01 compared with responses in LLE (+E).

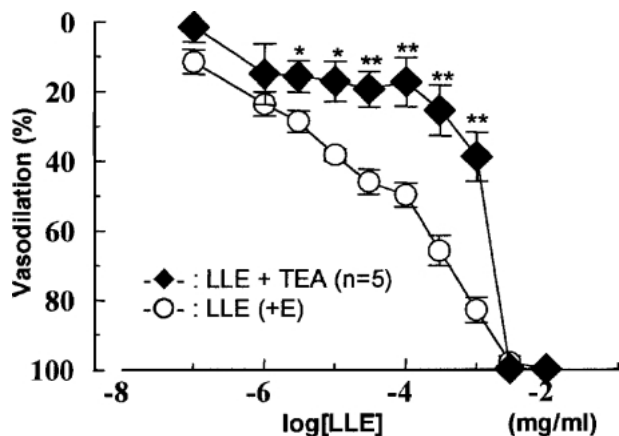


Fig. 6. The Effect of 5 mM TEA on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=5)

The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μ mol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean \pm S.E. * p >0.05, ** p >0.01 compared with responses in LLE (+E).

について検討した。Ca 依存性 K^+ チャネル阻害薬である TEA を添加したときの LLE の弛緩作用を Fig. 6 に示した。TEA は LLE による弛緩を顕著に抑制したが、LLE 高濃度における弛緩反応に対して全くその効果を示さなかった。LLE 高濃度では前述で記載したように NO が関与していると考えられることから、TEA によって抑制できなかったと考えられる。

3. LLE の血管弛緩作用に及ぼす抗ムスカリン

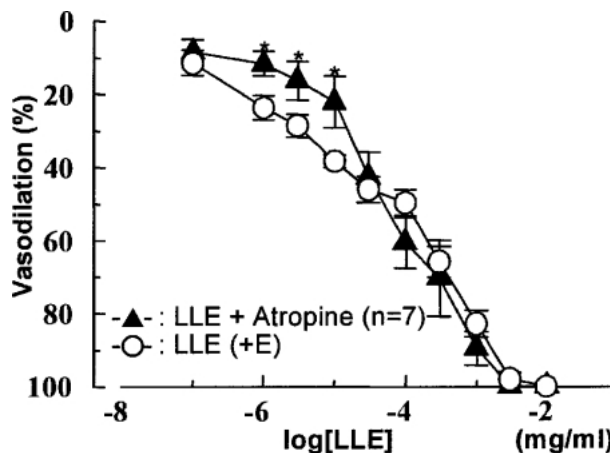


Fig. 7. The Effect of 1 μ M Atropine on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=7)

The vasodilation expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100 μ mol/l papaverine at the end of the experiment. Data indicate mean \pm S.E. * p >0.05, compared with responses in LLE (+E).

薬の影響 LLE 自身がムスカリン受容体に作用するかを検討するため、抗コリン薬である atropine を使用した (Fig. 7)。LLE に atropine を加えて同時灌流しても LLE による弛緩作用にほとんど変化が見られなかった。この結果から、LLE 中にはコリン作動薬のような働きをする物質は含まれていないと推察された。

結 論

今回、ラット腸間膜動脈抵抗血管における LLE の血管弛緩作用とその発現機序について検討した結果、LLE は濃度依存的な内皮依存性の血管弛緩作用を起こすことが判明した。この結果はブタの冠動脈を用いた実験と一致した。また、LLE による弛緩反応は L-NAME で NO 産生を抑制した状態でも出現し、高 K^+ で過分極を抑制した状態では著しくその弛緩が抑制された。したがって、LLE は平滑筋を過分極させ弛緩、すなわち EDHF を介した弛緩作用を起こすと考えられた。さらに K^+ チャネル阻害薬である TEA により LLE 濃度 100 μ g/ml 以上を除いて有意に抑制されたことから、LLE は K^+ チャネルを介して抵抗血管弛緩作用を生じると推察された。しかし、LLE 濃度 100 μ g/ml よりも高濃度になると高 K^+ 状態下でも完全に抑制されず、高 KCl に L-NAME を添加することで LLE による弛緩を完全に抑制した。したがって、LLE 高濃度では

NO 産生を促進する作用があると考えられた。前述したように、LLE の関与成分と考えられる 2 種のフラボノイド hyperoside と isoquercitrin には内皮依存性の NO 合成を促進する作用があることが報告されている。⁹⁾ また、この 2 種の関与成分は単独よりも混合物として存在することで強い降圧作用を示すことが確認されていることから、⁸⁾ これらの成分が LLE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より高濃度で強い血管弛緩作用を発揮する可能性が示唆された。

以上のことから、血圧維持に重要な役割をする抵抗血管について検討した本実験から、LLE の血管弛緩作用機序はラット腸間膜動脈において、低濃度では K^+ チャネルを介した EDHF で、高濃度になると EDHF 及び NO による血管弛緩作用であることが判明した。

謝辞 本研究に遂行するに当たり終始ご支援頂きましたダイドードリンコ(株)マーケティング部高橋豊氏、中川 誠氏、金澤浩司氏、大塚和一氏に厚くお礼申し上げます。

また、羅布麻に関する情報をご提供頂きました(有)オーパ山本水絵氏に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Jiangsu New Medical Collage, "Chinese Materia Medicine Dictionary," ed., Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai, 1978, pp. 1355-1356.
- 2) Chinese Pharmacopeia Committee of Ministry of Public Health of the People's Republic of China, "The Chinese Pharmacopeia, Vol. 1," Chemical and Technical Press, Beijing, 2000, p. 170.
- 3) Compilation of Luobuma Utilization Edited Group, "Total Utilization of Luobuma," ed., Science Press, Beijing, 1978, pp. 57-92.
- 4) Khasbagan., Huai Hu.-Yin., Pei Sheng-Ji., *Econ. Bot.*, **54**, 528-536 (2000).
- 5) Kagawa T., Nakazawa Y., Tagashira E., Takahashi Y., Onizuka S., Nishibe S., *Nat. Med.*, **58**, 109-112 (2004).
- 6) Kagawa T., Nakazawa Y., Tagashira E., Takahashi Y., Onizuka S., Nishibe S., *Nat. Med.*, **58**, inpress.
- 7) Nishibe S., Takemura H., Fujimoto T., Sasahara M., Tanaka T., *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 27-33 (1993).
- 8) Hoki S., Kimura T., Nagasawa M., Kozaki K., Terashima N., *Nat. Med.*, **58**, 113-114 (2004).
- 9) Taubert D., Berkels R., Klaus W., Roesen R., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **40**, 701-713 (2002).
- 10) Kemp B. K., Cocks T. M., *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 757-762 (1997).
- 11) Kawasaki H., Takasaki K., Saito S., Goto K., *Nature*, **335**, 164-167 (1988).
- 12) Ralevic V., Burnstock G., *Circ. Res.*, **69**, 1583-1590 (1991).
- 13) Byfield R. A., Swayne G. T. G., Warner T. J., *Br. J. Pharmacol.*, **88**, 438 (1986).
- 14) Shimokawa H., Ysutake H., Fujii K., Owada M. K., Nakaike R., Tagayanagi T., Nagoya T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**, 703-711 (1996).
- 15) Hwa J. J., Ghibaudi L., Williams P., Chatterjee M., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **266**, 952-958 (1994).