

キクニガナ及びスギナより得られたカフェー酸エステルの血管平滑筋弛緩作用

桜井信子, 飯塚 徹,* 中山繁樹, 船山浩子, 野口万里子, 永井正博

Vasorelaxant Activity of Caffeic Acid Derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*

Nobuko SAKURAI, Tohru IIZUKA,* Shigeki NAKAYAMA, Hiroko FUNAYAMA, Mariko NOGUCHI, and Masahiro NAGAI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received January 6, 2003; Accepted April 11, 2003)

The vasorelaxant activities of chicoric acid (Compound 1) from *Cichorium intybus* and dicaffeoyl-*meso*-tartaric acid (Compound 2) from *Equisetum arvense* L. in isolated rat aorta strips were studied. Compound 1 is a diester composed of (*S,S*)-tartaric acid and caffeic acid, and 2 is composed of its *meso* type. Both 1 and 2 showed slow relaxation activity against norepinephrine (NE)-induced contraction of rat aorta with/without endothelium. These compounds did not affect contraction induced by a high concentration of potassium (60 mM K⁺), while they inhibited NE-induced vasoconstriction in the presence of nicardipine. These results show that the inhibition by 1 and 2 of NE-induced vasoconstriction is due to a decrease in calcium influx from the extracellular space caused by NE. In addition, dicaffeoyl tartaric acids showed vasorelaxant activity, regardless of their stereochemistry.

Key words—chicoric acid; *Cichorium intybus*; dicaffeoyl-*meso*-tartaric acid; *Equisetum arvense*; vasorelaxant activity; structure-activity relationships

緒 言

我々は、血管弛緩作用を持つ天然物に関する研究を行い、いくつかのフェノールカルボン酸類を活性物質として明らかにしてきた。^{1,2)}特に升麻（キンポウゲ科 *Cimicifuga spp.* の根茎）の含有成分である fukinolic acid 及び関連化合物については詳細な検討を行い、その構造活性相関について検討した。³⁾その結果、化合物の構造中にカフェー酸を持つものに血管平滑筋弛緩作用を見出し、fukinolic acid を始めとする数種のカフェー酸誘導体の作用を明らかにした。これらの知見から、特にカフェー酸エステルの血管作用に興味を持たれた。そこで、chicoric acid (Comp. 1) 及びその光学異性体である dicaffeoyl-*meso*-tartaric acid (Comp. 2) について検討したので報告する (Fig. 1)。

Comp. 1 はキク科植物キクニガナ *Cichorium intybus* L. に含まれる。^{4,5)}キクニガナは中国で菊苣と

いう生薬として全草を用いる。菊苣は肝を清め、胆を利す効能があり、黄疸型肝炎の治療に用いられる。⁶⁾また、その萌葉はチコリと称し、食用とされ

Comp.1 chicoric acid

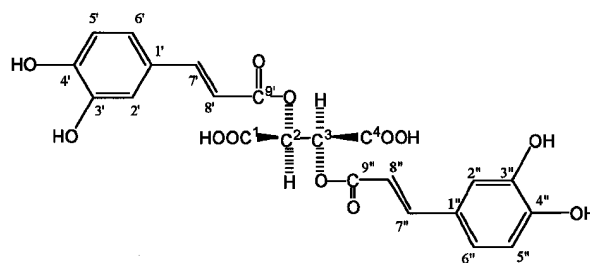
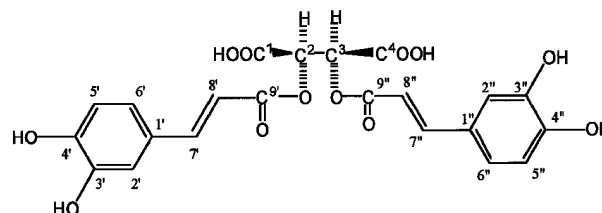
Comp.2 dicaffeoyl-*meso*-tartaric acid

Fig. 1. Structures of Comp. 1 and Comp. 2

る。Comp. 2 はスギナに含まれていることが報告されている。^{8,9)} スギナは、トクサ科植物 *Equisetum arvense* L. の栄養茎の全草である。利尿、咳止め、解熱、止血などの作用がある。その孢子茎(ツクシ)は食用とされるが、栄養茎も食用とされることがある。⁷⁾

今回の研究では、Comp. 1 及び Comp. 2 をそれぞれの植物から単離・精製し、その血管弛緩作用を探るべく試験に供した。それぞれの血管に対する作用は、ラット大動脈を用いて試験した。

試料と方法

1. 材料 キクニガナは東京都薬用植物園より御恵与いただいた。スギナは、神奈川県鎌倉市大船にて採集したものを使用した。

2. 試薬 各種溶媒及び試薬は次のものを使用した。

MeOH, ethyl acetate, EtOH, KH_2PO_4 , HCl, NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , glucose (和光純薬), norepinephrine, acetylcholine, EGTA (ethylene glycol-bis (β -aminoethylether) *N, N, N', N'*-tetraacetic acid), nicardipine \cdot HCl (SIGMA)

3. 使用機器 融点は柳本マイクロ融点測定装置で測定した。UV スペクトルは島津自動分光 UV-250 型、旋光度は日本分光 JASCO DIP-181 型で測定した。Negative FAB-MS は、日本電子 JMS-102 型で測定し、マトリックスとしてジエタノールアミンを用いた。NMR スペクトルは日本電子 JMN GX-270 型、JMN GX-500 型で測定し、内標準物質として tetramethylsilane (TMS) を用いた。カラムクロマトグラフィーの担体は Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech), Silica Gel ODS Q-3 (和光純薬工業株式会社) を用いた。TLC は Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), RP-18 WF_{254S} (Merck) を用いた。

4. キクニガナからの Comp. 1 の単離 抽出は Hasegawa らの方法⁹⁾ に準じて行った。すなわち Comp. 1 の単離は、キクニガナの地上部 (580 g) を室温でメタノール抽出し、溶媒を減圧留去後得られたエキスを水に溶かして可溶部を取り、2 M 塩酸で pH 1.0 に調整しエーテル抽出を行った。エーテル抽出部を Sephadex LH-20 で数回カラムクロマトグラフィーを行い、Comp. 1 を 30.4 mg 単離した。

5. スギナからの Comp. 2 の単離 Comp. 1 の抽出法に準じ次の通り操作した。生のスギナ (2.5 kg) を室温でメタノール抽出し、溶媒を減圧濃縮後得られたエキスに 60% MeOH を加えて振盪した。60% MeOH 可溶部をとり、それからメタノールを留去後、 NaHCO_3 で pH 6 に調整した。得られた水溶液を分液ロート中でエーテルで洗浄し、水層を HCl にて pH 1.0 に調整した後、再びエーテル抽出した。エーテル層に抽出された物質を Sephadex LH-20, ODSQ-3 カラムにより精製し Comp. 2 を 84.5 mg 得た。

6. ラット大動脈の摘出 血管に対する作用は、前報³⁾ に準じて試験した。すなわち、実験動物として Wistar 系雄性ラット (体重 250—400 g) を使用した。張力測定装置は等尺性張力装置を用い、反応を等尺的に記録した。

ラットをエーテル麻酔後瀉血し、胸部大動脈を摘出した。大動脈は長さ約 20 mm、幅約 2 mm の螺旋標本とした。標本を 10 ml の modified Kreb's—Henseleit 溶液 (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, glucose 11.1 mM) で満たしたバス内に懸垂し、37°C で保温し 95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した。標本に 1.0 g の負荷をかけ、1 時間のインキュベート (設置してから 20 分、40 分、55 分後に各 1 回洗浄) してから実験を行った。Norepinephrine (NE) を 10^{-7} M 投与した後、血管収縮が平行状態に達したところで acetylcholine (ACh) 10^{-5} M を投与し、NE による収縮に対し 80% 以上の弛緩を示したものを内皮保護標本、血管条片の内皮細胞をろ紙で軽くこすり、NE 収縮に対し ACh による弛緩反応が 5% 未満のものを内皮細胞剥離標本とした。

7. 血管反応の測定 血管内皮保護標本に対し、NE を 10^{-7} M 投与した後、血管収縮が平行状態に達したときに Comp. 1 の 3×10^{-6} M, Comp. 2 の 10^{-4} M をそれぞれ投与して張力変化をみた。

試料存在時の NE 収縮を試験するときは血管条片を設置したバス中にあらかじめ試料を投与し、1 時間のインキュベーションの後 NE を投与した。

脱分極した血管に対し Ca^{2+} が誘起する収縮作用は次のように試験した。血管条片は通常の modified Kreb's—Henseleit 溶液中で 40 分間のインキュ

ベート (20分, 40分後に1回洗浄) の後, Ca^{2+} -free で 0.01 mM の EGTA を含む modified Kreb's-Henseleit 溶液 (NaCl 119.8 mM, KCl 4.7 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, glucose 11.1 mM) に置換した。さらに 15 分間のインキュベートの後, 等張の高濃度 K^+ , Ca^{2+} -free の modified Kreb's-Henseleit 溶液 (KCl 124.5 mM, KHCO_3 25.0 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, glucose 11.1 mM) の当量 (3.8 ml) と置換し, バス内 K^+ 濃度を 60 mM とした。この状態で, Ca^{2+} (CaCl_2) を 10^{-5} M— 10^{-3} M を累積的に投与してコントロールとした。 Ca^{2+} -free の modified Kreb's-Henseleit 溶液でバス内を洗浄後, 再び高濃度 K^+ , Ca^{2+} -free の modified Kreb's-Henseleit 溶液の当量と置換しバス内 K^+ 濃度を 60 mM とした。ここで試料を加え 60 分間のインキュベートの後, 先と同様に Ca^{2+} を 10^{-5} M— 10^{-3} M を累積的に投与してコントロールと比較した。

NE 存在下の血管に対し, Ca^{2+} が誘起する収縮作用は次のように試験した。血管条片は通常の modified Kreb's-Henseleit 溶液中で 40 分間のインキュベート (20分, 40分後に1回洗浄) の後, Ca^{2+} -free で 0.01 mM の EGTA を含む modified Kreb's-Henseleit 溶液に全置換した。15 分間のインキュベートの後, nicardipine 10^{-6} M, 続いて NE 10^{-6} M を投与した。この溶液中で NE がもたらす速効性の収縮は静止レベルにまで低下させられている。さらに 15 分間のインキュベートの後, Ca^{2+} (CaCl_2) を 10^{-5} M— 10^{-3} M を累積的に投与してコントロールとした。 Ca^{2+} -free の modified Kreb's-Henseleit 溶液でバス内を洗浄後, 試料を加え 60 分間のインキュベートの後, 先と同様に nicardipine 10^{-6} M, 続いて NE 10^{-6} M を投与した。15 分間のインキュベートの後, Ca^{2+} を 10^{-5} M— 10^{-3} M を累積的に投与してコントロールと比較した。

なお, すべての試薬試料の濃度は, オルガンバス投与時の最終濃度である。

8. 統計処理 すべての結果は平均値 \pm SE で示した。データの統計的評価は, F 検定による等分散を確認した上で, 対応のない *t* 検定による。 $p < 0.05$ のとき有意差ありと判断した。

結 果

1. Comp. 1 の同定 Comp. 1, mp 206—207°C (*lit.* 206°C⁴), $[\alpha]_D + 343$ (c, 0.1032 in MeOH, *lit.* $[\alpha]_D + 383.5^4$), negative FAB-MS m/z 473 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), UV λ_{max} (log ϵ), 217 nm (4.3), 233 nm (4.2), 297 nm (4.1), 327 nm (4.2).

MS 及び NMR (^1H および ^{13}C) の値は, 文献値⁸ と一致した。

2. Comp. 2 の同定 Comp. 2, $[\alpha]_D \pm 0$ (MeOH), negative FAB-MS m/z 473 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), UV λ_{max} (log ϵ), 217 nm (4.3), 245 nm (4.2), 298 nm (4.3), 329 nm (4.5).

MS 及び ^1H -NMR の値は文献値⁸ と一致した。

3. Comp. 1, 2 後投与による NE 収縮に対する作用 血管内皮保護標本及び内皮剥離標本に対し, NE を 10^{-7} M 投与した後, 血管収縮が平行状態に達したときに Comp. 1 の 3×10^{-6} M, Comp. 2 の 10^{-4} M をそれぞれ投与して張力変化をみた。このとき, Comp. 1, 2 はいずれの血管標本に対してもゆっくりとした弛緩作用を示した (data not shown)。

4. Comp. 1, 2 前投与による NE 収縮に対する作用 NE が誘起する収縮に対する Comp. 1, 2 の反応を調べた。Comp. 1 を 3×10^{-6} M, Comp. 2 を 10^{-4} M, 投与して 60 分後 NE を 10^{-7} M 投与して血管を収縮させた。このとき, Comp. 1 は phasic 相の収縮を若干抑制したが tonic 相の収縮を著明に抑制した。Comp. 2 は phasic 相の収縮を抑制せず tonic 相の収縮を著明に抑制した (Fig. 2(a), (b))。さらに Comp. 1 を 3×10^{-6} M— 10^{-5} M, Comp. 2 を 3×10^{-4} M— 10^{-4} M, 投与して 60 分後 NE を 10^{-9} M— 10^{-7} M 累積投与して段階的に収縮させた。NE が誘起する収縮は, Comp. 1 の 3×10^{-6} M, Comp. 2 の 3×10^{-4} M 投与で抑制された (Fig. 3(a), (b))。

5. 電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDC) に対する作用 Ca^{2+} は, Ca^{2+} -free で等張の高濃度 K^+ (60 mM) 栄養液 (NaCl 119.8 mM, KCl 4.7 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, glucose 11.1 mM) 中に懸垂した血管条片に対し濃度依存的な収縮を起こした。この収縮に対し, Comp. 1 の 3×10^{-6} M 及び Comp. 2 の 10^{-4} M は影響を示さなかった (Fig. 4)。なお,

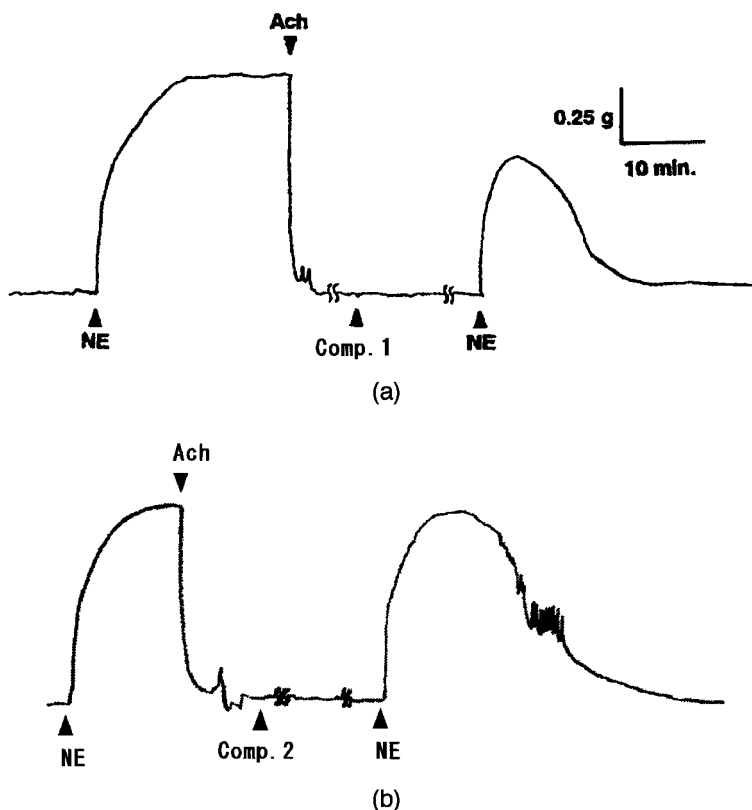


Fig. 2. Effects of a) 3×10^{-6} M Comp. 1 and b) 10^{-4} M Comp. 2 on 10^{-7} M Norepinephrine (NE)-Induced Contraction of Rat Aortic Strips and Relaxation Response to 10^{-5} M Acetylcholine (Ach) in NE-Precontracted Aortic Strips with Endothelium

この収縮は nicardipine の 10^{-6} M で完全に抑制された³⁾ (data not shown).

6. 受容体作動性 Ca^{2+} チャンネル (ROC) に対する作用 Ca^{2+} -free で nicardipine 10^{-6} M 及び NE 10^{-6} M を投与した栄養液中に懸垂した血管条片に対し、 Ca^{2+} (10^{-5} M— 10^{-3} M) は濃度依存的な収縮を起した。この収縮に対し、Comp. 1 の 3×10^{-6} M 及び Comp. 2 の 10^{-4} M は抑制を示した (Fig. 5)。

考 察

1. Comp. 1, 2 による NE が誘起する血管収縮に対する抑制機構 Comp. 1, 2 はラット大動脈条片に対しゆっくりとした弛緩作用を示した。この弛緩反応は、内皮細胞を剥離した標本に対しても同様であった (data not shown)。これはこの作用が内皮細胞に依存しないことを示している。また、Fig. 2(a), (b) に示す通り、Comp. 1, 2 を前投与して NE が誘起する収縮をみると、これらの化合物は phasic 相の収縮にほとんど影響せず tonic 相の収縮を著明に抑制しており、tonic 相に特異性を持つと

いう特徴を示した。また、これらの作用は用量依存的であった。さらに Comp. 1, 2 は nicardipine 及び EGTA 存在下で NE 前投与した際の Ca^{2+} が誘起する収縮を抑制した。これは Comp. 1, 2 が受容体作動性 Ca^{2+} チャンネルに対する抑制作用を持つことを示している。一方で Comp. 1, 2 は、高濃度 K^{+} (60 mM) で脱分極した血管条片に対する Ca^{2+} 誘起の収縮を抑制しなかった。これは Comp. 1, 2 が電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに対する抑制作用を持たないことを示している。以上のことから、Comp. 1, 2 による NE 収縮の抑制は、その効果の一部に受容体依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害が関与すると考えられた。

我々は既に、升麻由来のフェノールカルボン酸の血管弛緩反応から、次に示す仮説を提示している。³⁾ すなわち、Fig. 6 に示す構造において (1) benzyltartaric acid 部分に *p*-coumaric acid がエステル結合したものは血管収縮作用、caffeic acid がエステル結合したものは血管弛緩作用を持ち、そして (2) benzyltartaric acid 部分が fukiic acid ($\text{R}_1=\text{OH}$,

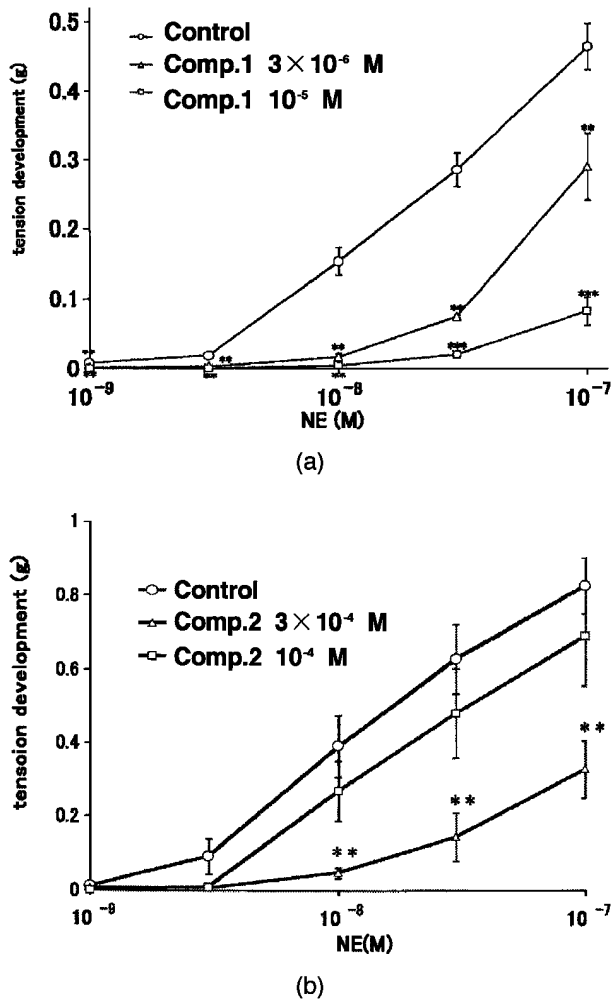


Fig. 3. Effects of a) Comp. 1 and b) Comp. 2 on Concentration-Response Relationships for NE-Induced Contraction of Rat Aortic Strips
 Symbols: a) \circ : control, \triangle : Comp. 1 3×10^{-6} M, \square : Comp. 1 10^{-5} M, b) \circ : control, \triangle : Comp. 2 3×10^{-4} M, \square : Comp. 2 10^{-4} M.
 Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. $**p < 0.01$

$R_2=H$) と piscidic acid ($R_1=R_2=H$) どちらであっても血管に対する作用には関係しないと言うものである。

今回の実験では、Comp. 1 及び Comp. 2 も血管弛緩作用を示している。両化合物は tartaric acid と caffeic acid のエステル化合物である。先の仮説との比較をしてみると benzyltartaric acid 部分のベンゼン環部分は血管弛緩作用には関与していないとした上記 (2) の推定の正しさを支持する結果になっている。また、両化合物の比較から、tartaric acid 部分の立体構造は (S, S) 体であっても、メソ体であっても血管弛緩作用が発現することが分かった。以上の結果から、カフェー酸エステル構造が血管弛

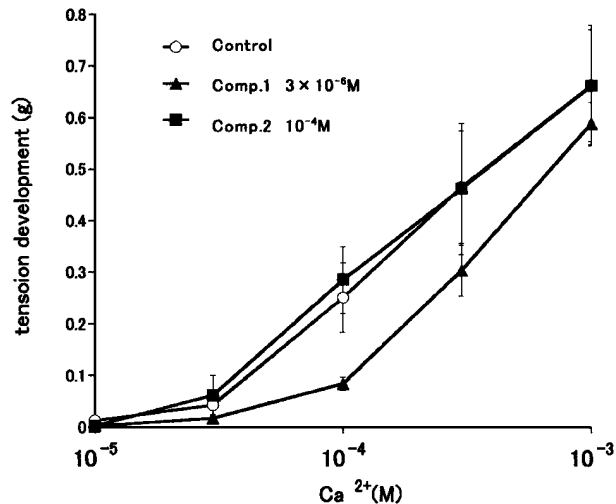


Fig. 4. Concentration-Response Relationships for Contractile Responses of the Aortic Strips to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with High Potassium (60 mM)
 Symbols: \circ : control, \triangle : Comp. 1 3×10^{-6} M, \square : Comp. 2 10^{-4} M.
 Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. $**p < 0.01$

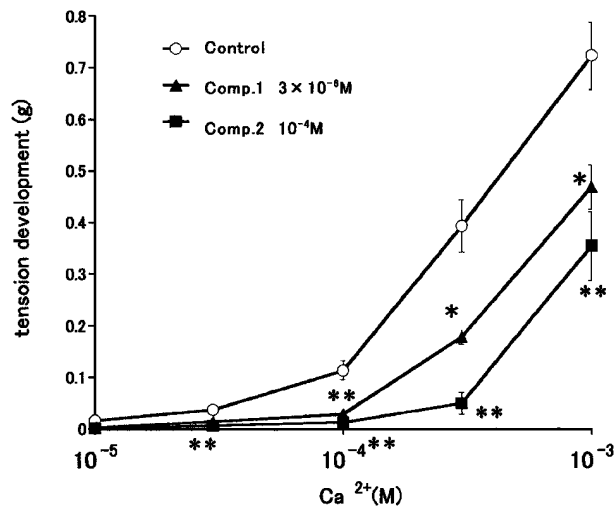


Fig. 5. Concentration Response Relationships for Contractile Responses of Aortic Strips to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with NE (10^{-6} M) and Nicardipines (10^{-6} M)
 Symbols: a) \circ : control, \triangle : Comp. 1 3×10^{-6} M, \square : Comp. 2 10^{-4} M.
 Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$

緩作用発現に重要な影響を持つことが考えられた。

結 論

今回の実験により、(S, S)-酒石酸とカフェー酸のジエステル化合物である Comp. 1 及びメソ-酒石酸とカフェー酸のジエステル化合物である Comp. 2 に血管弛緩作用がみられた。この結果から、血管弛緩作用の発現には酒石酸の立体構造は (S, S) 体

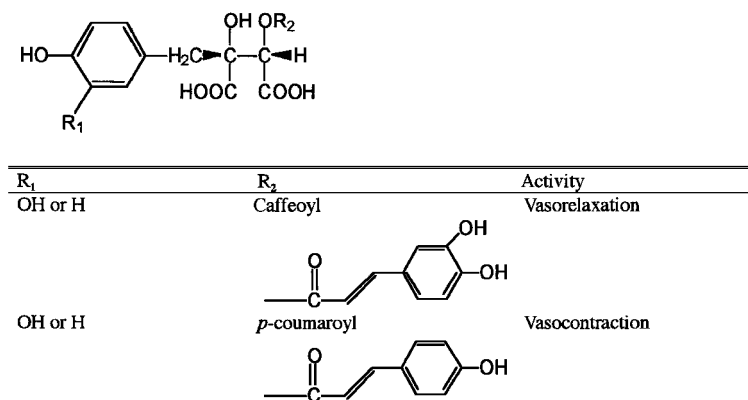


Fig. 6. Structure-Activity Relationships of Caffeic Acid Derivatives

であってもメソ体であってもよいことが分かった。したがって、血管弛緩作用を現すには、その分子構造中にカフェー酸エステル構造を持つことが重要と考えられた。さらに、これらの化合物による NE 収縮の抑制は、その効果の一部に受容体依存性 Ca²⁺チャンネルの阻害が関与すると考えられた。

カルシウムチャンネル阻害薬は高血圧、不整脈、狭心症の治療に広く用いられている。ニフェジピンなどのジヒドロピリジン系化合物やジルチアゼム、ベラパミルは L 型 VDC の阻害薬として知られる。また、ジルチアゼムやベラパミル、及び K チャンネル開口薬として知られるニコランジルは ROC 阻害作用も併せ持つ。^{10,11)} 選択的な ROC 阻害作用を持つものとして、SK & F96365 が知られるが、¹²⁾ これは試験研究に用いられる。治療薬としての ROC 阻害作用薬は、未だ研究の途上である。

前述の通り、既に我々はカフェー酸誘導体とその血管弛緩作用の構造活性相関に関する仮説を呈示している。今回の結果は、その結果をさらに支持するものであった。また、今回得られた化合物の作用は、受容体依存性カルシウムチャンネル阻害の関与が考えられた。したがって、先の仮説を元に種々のカフェー酸誘導体の作用を検討していけば、ジヒドロピリジン系化合物などの既存のカルシウムチャンネル阻害薬とは異なるタイプの心血管系疾患治療薬の開発が期待できると考えられる。今後のカフェー酸誘導体の研究の進展が待たれる。

REFERENCES

- 1) Kamata K., Iizuka T., Nagai M., Kasuya Y., *Gen. Pharmac.*, **24**, 977-981 (1993).
- 2) Nagai M., Noguchi M., Iizuka T., Otani K., Kamata K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 228-232 (1996).
- 3) Noguchi M., Nagai M., Koeda M., Nakayama S., Sakurai N., Takahira M., Kusano G., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1163-1168 (1998).
- 4) Scarpati M. L., Oriente G., *Tetrahedron*, **4**, 43-48 (1958).
- 5) Hasegawa M., Taneyama M., *Bot. Mag. Tokyo*, **86**, 315-317 (1973).
- 6) Chinese Medical Dictionary, Shanghai Min. Publ. Co., Shanghai, 1977, p. 2008.
- 7) Chinese Medical Dictionary, Shanghai Min. Publ. Co., Shanghai, 1977, pp. 945-946.
- 8) Veit M., Strack D., Czygan F. C., Wray V., Witte L., *Phytochemistry*, **30**, 527-529 (1991).
- 9) Veit M., Weidner C., Strack D., Wray V., Witte L., Czygan F. C., *Phytochemistry*, **31**, 3483-3485 (1992).
- 10) Muramatsu I., Fujiwara M., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **87**, 199-207 (1986).
- 11) Flaim S. F., Craven R. A., *Pharmacology*, **22**, 286-293 (1981).
- 12) Merrit J. E., Armstrong W. P., Benham C. D., Hallam T. J., Jacob R., Jaxachamiec A., Leigh B. K., McCarthy S. A., Moores K. E., Rink T. J., *Biochem J.*, **271**, 515-522 (1990).