

羅布麻(紅麻:*Apocynum venetum* L.)葉エキスの 降圧作用に関する研究(2)

香川 珠実^{*,a}, 中澤 慶久^b, 田頭 栄治郎^c, 高橋 豊^a,
鬼塚 重則^b, 西部 三省^d

^a ダイードリンコ株式会社, ^b 日立造船株式会社, ^c 有限会社ファルマ開発研究所
^d 北海道医療大学薬学部

Studies on Antihypertensive Effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) Leaf Extract (2)

Tamami KAGAWA, ^{*,a} Yoshihisa NAKAZAWA, ^b Eijiro TAGASHIRA, ^c
Yutaka TAKAHASHI, ^a Shigenori ONIZUKA ^b and Sansei NISHIBE ^d

^a DyDo DRINCO, INC., 6F-2-8-3, Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan

^b Hitachi Zosen Corporation, 1-2264, Habu-cho, Innoshima, Hiroshima 722-2393, Japan

^c Pharma Development Laboratories, 295, Fukuda, Namegawa-machi,
Hiki-gun, Saitama 355-0803, Japan

^d Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido,
Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

(received, June 2, 2004)

In order to clarify the antihypertensive mechanism of Luobuma Leaf extract (LLE), the effects on blood pressure were examined by intraduodenal (i.d.) administration of LLE to Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) and Sprague Dawley (S.D.) rats.

LLE did not give the effect on either noradrenaline-induced increase or acetylcholine-induced decrease in blood pressure in SHR, suggesting that the antihypertensive effect of LLE might be not due to suppression to the sympathetic system. Also LLE did not give the effect on angiotensin I-induced increase in blood pressure in S.D. rats, suggesting that the antihypertensive effect of LLE might be not due to angiotensin-converting enzyme (ACE) changed ACE inhibition.

Keywords: Luobuma; *Apocynum venetum* L.; leaf extract; intraduodenal administration; antihypertensive effect; suppression to sympathetic system; ACE inhibition

緒 言

羅布麻(Luobuma, *Apocynum venetum* L. (Apocynaceae))の葉は中華人民共和国薬典¹⁾に記載され、心臓病、不眠症、高血圧、腎炎、浮腫などに用いるとされている^{1, 2)}。中国では生薬としてそのまま用いるだけでなく、エキス製剤としても広く用いられている³⁾。そして日本では羅布麻葉から作られたお茶製品などが市場に流通している。

前報⁴⁾で著者らは、羅布麻葉エキス(LLE: Luobuma Leaf Extract)を正常ラットである Wistar 系ラット(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))では、6週間目から有意な降圧作用を認めたことを報告した。

本報では SHR を用い、LLE(十二指腸内(i.d.)投与)の交感神

経系あるいは副交感神経系薬物による血圧反応への影響について検討した。

さらに現在、「血圧が高めの方に適する食品」とされている主な製品の関与成分は、ラクトリペプチド、かつお節オリゴペプチド、いわしペプチド等のオリゴペプチドで、その降圧作用は angiotensin 変換酵素(ACE)の阻害であると考えられている。これらの製品は長期摂取することにより、まれに咳が出ることがあり、注意が必要といわれている。LLEによる降圧作用が ACE の阻害によるものか否かを、LLE を Sprague Dawley (S.D.) 系ラットに i.d. 投与し検討した。

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(株)にて保存), 以下の方法で LLE を調製した.

採取した羅布麻葉を 220~280℃ の釜入機で殺青処理した後, 釜茶方式により約 150℃ 約6分で焙煎・乾燥させ, 半加工製品とした. その後, 約 130℃ 15 分で一次焙煎, 約 150℃ 45 分で二次焙煎を行い羅布麻茶とした. この茶葉 100g に対し, 95~100℃ の湯で 1000ml, 次に 800ml でそれぞれ 60 分, 二回抽出した. 抽出後濃縮し, 遠心分離機で不溶物を分離したる液を 230℃ 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 は前報⁴⁾ と同じ LLE で, 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 含まれることにより品質の確認を行った.

2. 使用薬物

dl-noradrenaline (Nad, 三共(株)), acetylcholine (Ach, 第一製薬(株)), angiotensin I (ヒト由来, 和光純薬工業(株)), heparin sodium (Sigma).

3. 投与方法

LLE はテフロンホモジナイザーを用いて精製水に懸濁し, i.d. 投与に用いた. また薬物は, 静脈内(i.v.)投与では生理食塩水に溶解して用いた. 投与用量は i.d. 用には 0.5 ml/100g(体重), i.v. 用には 0.05~0.1 ml/100g(体重)とした.

4. 実験動物

体重 360~420 g の雄性 SHR ((株)船橋農場)及び雄性 S.D. 系ラットを購入後, 温度 22±2℃, 湿度 55±20% の動物室にて1週間以上予備飼育し, 実験に供した. ラットには SP 固形飼料 (SHR 用普通飼料((株)船橋農場))を, 給餌器で 24 時間自由摂取させた.

5. 測定方法

実験は, 20% Urethane 500 mg/kg 及び 2% α -chloralase 50 mg/kg の混合液(i.p.)を用いた麻酔下で行った. 全身血圧は右大腿動脈に挿入したカニューレから圧トランスジューサー(日本光電, 血圧モニタリング用ライフキット)を介し, ひずみ圧力用プリアンプ(日本光電, AP-621G)により測定した. i.v.投与は左大腿静脈に薬物注入用のカニューレを留置して行った. i.d. 投与は腹部中央線で開腹した後, 胃壁を一部切開し, 胃内から十二指腸起始部にカニューレを挿入, 固定して行った. 心拍数は体部血圧の収縮期をトリガーとして瞬時心拍数用プリアンプ(日本光電, AT-601G)により測定した.

6. 統計処理

各実験群の測定値は平均値±標準誤差で示した. 有意差検定については, 実験1では, 二元配置分散分析後, Scheffe post-hoc testにより, LLE投与前後の比較を行った. 実験2では, 分散分析後, Paired *t*-test によりLLE投与前後の比較を行った. 実験3では, 一元配置分散分析後, Fisher's PLSD post-hoc testにより LLE投与の影響について検討した.

実 験

1. i.d. 単回投与時の降圧と用量反応性

実験 2, 3を行うにあたり SHR に LLE 30, 100, 300, 1000 mg/kg をそれぞれ単回 i.d. 投与し, 降圧作用とその用量反応性をみた. 投与間隔は, 先に投与した LLE による血圧への影響が消失する 40~60 分以上の間隔をあげ, 次の LLE を投与した.

2. Nad による昇圧及び Ach による降圧作用に対する影響

SHR における LLE(i.d.)投与が, Nad 及び Ach による作用に及ぼす影響について検討した. 実験1により降圧が確認された LLE の用量について低用量群(30 または 100 mg/kg)及び高用量群(300 または 1000 mg/kg)を設定し, 明らかな降圧を確認して LLE を投与した. 次に LLE 投与前の時点と LLE 投与後の降圧効果が持続している時点で, Nad 3 または 5 μ g/kg, (i.v.)及び Ach 1 または 2 μ g/kg(i.v.)を投与した.

3. angiotensin I の昇圧作用に対する影響

S.D. 系ラットに LLE(i.d.)投与後, 10, 30 及び 50 分後に angiotensin I 0.3 μ g/kg(i.v.)を投与して LLE 投与前の angiotensin I による昇圧の程度と比較した. LLE の用量は, 実験1の用量反応性に関する結果から 300 および 1000 mg/kg とした.

結 果

1. i.d. 単回投与時の降圧と用量反応性

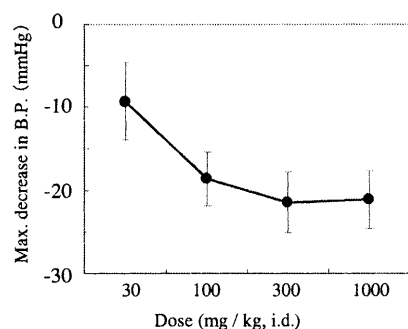
LLE 投与により, 投与前と比較して有意な降圧効果が認められた. LLE 投与後, 10 分前後から降圧作用がみられ始め, 最大降圧がみられた時点は投与後約 30~40 分後であり, 緩徐な降圧曲線であった. 最大降圧値については, 30 mg/kg から 300 mg/kg においては 9mmHg から 21 mmHg と降圧は増大したが, それ以上の用量(1000 mg/kg)では降圧の増大はみられなかった(Table 1, Fig. 1). 標準的な降圧パターンを Fig. 2 に示した. いずれの用量においても緩徐に降圧し, LLE 投与前と比較し有意な降圧作用を示した. 心拍数には影響が認められなかった.

なお、溶媒(精製水)のみの投与は血圧、心拍数のいずれにも影響を及ぼさなかった。

Table 1. Dose-response Curve of hypotensive Effect of LLE.

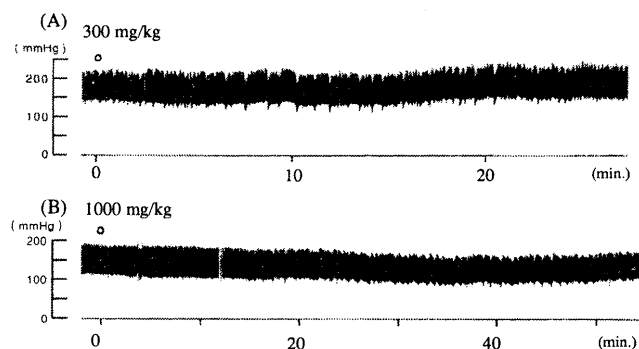
Dose of LLE (mg / kg, i.d.)	N	Max. decrease in B.P. (mmHg)
30	3	9.3 ± 4.70
100	7	18.6 ± 3.22
300	9	21.4 ± 3.69
1000	8	21.1 ± 3.51

Each value represents the mean ± S.E. of 3~9 animals.



Each value represents the mean ± S.E. of 3~9 animals.
The number of animals are represented in Table 1.

Fig. 1 Dose-response Curve of Hypotensive Effect of LLE.



300 mg/kg LLE (A) and 1000mg / kg (B) are administrated (i.d.).

Fig. 2. Standard Pattern of Decrease in Blood Pressure by LLE

2. Nad による昇圧及び Ach による降圧作用に対する影響

LLE の低用量及び高用量処置はいずれも、Nad による昇圧及び Ach による降圧作用に有意な影響を及ぼさなかった (Table 2, Table 3, Fig. 3) .

Table 2. Effect of Pretreatment with LLE on Noradrenaline-induced Increase in Blood Pressure in SHR

Dose of LLE (mg / kg, i.d.)	N	Treatment	Max. increase in B.P. (mmHg)
Low dose (30 or 100)	4	before	31.9 ± 1.56
	4	after	38.5 ± 6.65
High dose (300 or 1000)	3	before	46.8 ± 8.57
	3	after	41.7 ± 8.33

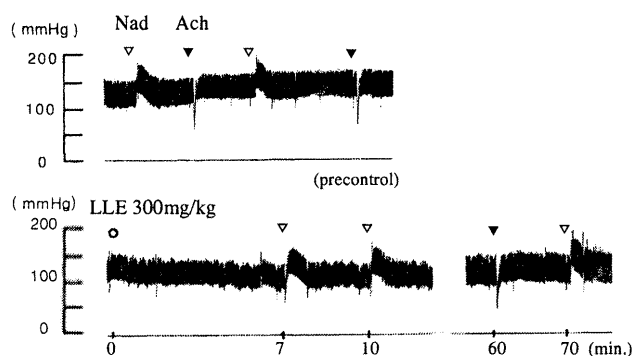
Each value represents as the mean ± S.E. of 3 or 4 animals.
Differences of effect between before and after treatment : not significant.

Table 3. Effect of Pretreatment with LLE on Acetylcholine-induced Decrease in Blood Pressure in SHR

Dose of LLE (mg / kg, i.d.)	N	Treatment	Max. decrease in B.P. (mmHg)
Low dose (30 or 100)	6	before	59.8 ± 1.45
	6	after	57.5 ± 4.08
High dose (300 or 1000)	4	before	51.9 ± 3.13
	4	after	46.9 ± 3.73

Each value represents as the mean ± S.E. of 6 or 4 animals.

Differences of effect between before and after treatment : not significant.



Before administration of 300 mg/kg LLE (i.d.), Nad and Ach were administered as precontrol.

○: LLE, ▽: Nad, ▼: Ach

Fig. 3. Effect of Pretreatment with LLE on Noradrenaline-induced increase and Acetylcholine-induced decrease in Blood Pressure in SHR

3. angiotensin I の昇圧作用に対する影響

LLE 前処置したときの angiotensin I の昇圧作用に対する経時変化においては、いずれの時点においても有意な昇圧の抑制は認められなかった (Table 4, Fig. 4). すなわち、angiotensin I から angiotensin II への代謝に関与する ACE の阻害に基づく昇圧の抑制作用はみられなかった。なお LLE 前処置はいずれの量においても S.D.系ラットの血圧に影響を及ぼさなかった。生理食塩水のみの i.v.投与も血圧に影響を及ぼさなかった。

Table 4. Effect of Pretreatment with LLE on Angiotensin I-induced Increase in Blood Pressure in S.D. rats

Dose of LLE (mg / kg, i.d.)	N	Time after LLE administration (min.)	Max. increase in B.P. (mmHg)
300	6	10	38.3 ± 5.73
	6	30	48.0 ± 8.08
	6	50	44.2 ± 5.97
1000	4	10	53.8 ± 7.47
	4	30	57.5 ± 7.77
	4	50	57.5 ± 5.95

Each value represents as the mean ± S.E. of 6 or 4 animals.

Differences of effect between time courses after LLE administration : not significant.

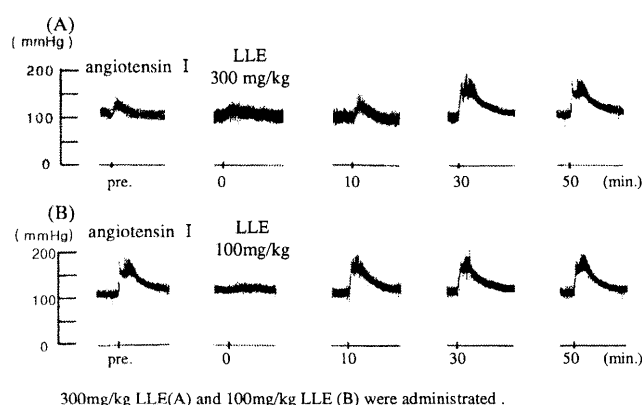


Fig. 4. Effect of Pretreatment with LLE on Angiotensin I-induced Increase in Blood Pressure in S.D. rats

考 察

LLE 単回 i.d. 投与時の降圧において、100 mg/kg までは用量に依存した降圧がみられるが、300 mg/kg 以上に用量を増大しても最大降圧は横ばいであった (Table 1, Fig. 2). これは LLE が腸管から一度に吸収され、血中に移行する量には限界があることを示している。また、降圧の持続時間は 300 mg/kg ではおよそ 10 分、1000 mg/kg ではおよそ 30 分と高用量で長くなる傾向があった (Fig. 3) ことから、i.d. 投与時 LLE はゆっくり吸収され、緩徐に降圧すると考えられる。

また LLE の i.d. 投与は Nad あるいは Ach の血圧反応に影響しなかった (Table 2, Table 3, Fig. 3). 従って LLE 摂取後に交感神経系あるいは副交感神経系に作用する薬物、食物あるいは飲料水と同時に摂取しても相互作用はみられないことが示唆された。

LLE の i.d. 投与後の Nad による昇圧作用には影響がなかった (Table 2, Fig. 3) ことから、交感神経系の抑制に基づく降圧ではないと考えられる。また angiotensin I から angiotensin II に代謝された後昇圧する作用に対して、LLE は影響しなかった (Table 4, Fig. 4) ことから、LLE の降圧作用は ACE 阻害作用に基づくものではないと考えられる。

羅布麻葉の含有成分として、これまでに hyperoside, isoquercitrin, quercetin, rutin, (±)-catechin 及び procyanidins などのポリフェノール化合物が報告されている⁵⁻⁷⁾。これらのうち羅布麻葉主成分 hyperoside と isoquercitrin との混合物については、SHR 経口投与による降圧作用が報告されている⁸⁾。また植物性フェノール化合物である oligomeric procyanidins, hyperoside, isoquercitrin などは、ブタの冠状動脈において、血管の内皮依存性弛緩を引き起こす一酸化窒素合成能の活性を高めることが報告されている⁹⁾。

従って、LLE の降圧作用機序としては一酸化窒素による血管の内皮依存性弛緩が考えられる。

現在、LLE の内皮依存性弛緩因子による作用機序などについて詳細な検討を行っているところであり、改めて報告する¹⁰⁾。

謝 辞: 本研究を遂行するにあたり終始ご支援頂きましたグライドードリンコ株式会社マーケティング部 中川誠氏、金澤浩司氏に厚くお礼申し上げます。

また、材料についてご尽力頂きましたヤンロン株式会社 大塚和一氏、羅布麻に関する資料をご提供頂きました有限会社 オーパ 山本水絵氏に深く感謝いたします。

REFERENCES AND NOTE

1. Chinese Pharmacopeia Committee of Ministry of Public Health of the People's Republic of China, "The Chinese Pharmacopeia (中華人民共和国薬典), Vol. 1," Chemical and Technical Press, Beijing, 2000, p. 170.
2. Jiangsu New Medical College, ed., "Chinese Materia Medical Dictionary (中藥大辭典)," Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai, 1978, pp. 1355-1356.
3. Compilation of Luobuma Utilization Edited Group, ed., "Total Utilization of Luobuma (羅布麻的綜合利用)," Science Press, Beijing, 1978, pp. 57-92.
4. Kagawa T., Nakazawa Y., Tagashira E., Takahashi Y., Onizuka S., Nishibe S., *Natural Medicines*, **58**, 109-112 (2004).
5. Nishibe S., Takemura H., Fujimoto T., Sasahara M., Tanaka T., *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 27-33 (1993).
6. Xiong Q., Fan W., Tezuka Y., Adnyana I., Stampoulis P., Hattori M., Namba T., Kadota S., *Planta Med.*, **66**, 127-133 (2000).
7. Yokozawa T., Kashiwada Y., Hattori M., Chung H. Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 748-752 (2002).
8. Hoki S., Kimura T., Nagasawa M., Kozaki K., Terashima N., *Natural Medicines*, **58**, 113-116 (2004).
9. Taubert D., Berkels R., Klaus W., Roesen R., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **40**, 701-713 (2002).
10. Private communication from Prof. C. Y. Kwan of MacMaster Univ., Canada: In preliminary experiment, Apocynum extract can relax rat aortic rings precontracted with phenylephrine in a concentration- and an endothelium-dependent manner with a ED₅₀ of about 2 μM. This relaxation could be totally inhibited by L-NA-ME or removal of endothelium. It does not relax KCl-induced contraction.