

杜仲葉の血管機能低下抑制作用に関する研究

平成 30 年度

細尾 信悟

略語集

- ACh : acetylcholine, アセチルコリン
- ANP : atrial natriuretic peptide, 心房性ナトリウム利尿ペプチド
- ASP : asperuloside, アスペルロシド
- cAMP : cyclic adenosine monophosphate, 環状アデノシン一リン酸
- cGMP : cyclic guanosine monophosphate, 環状グアノシン一リン酸
- CHA : chlorogenic acid, クロロゲン酸
- EA : Exendin (9-39), エキセンジン (9-39)
- EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor, 内皮細胞由来過分極因子
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸
- EL : Eucommia leaf, 杜仲葉
- ELE : Eucommia leaf extract, 杜仲葉エキス
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 酵素結合免疫吸着アッセイ
- eNOS : endothelial nitric oxide synthase, 内皮型 NO 合成酵素
- Epac2 : exchange protein directly activated by cAMP, cAMP で直接活性化される
交換タンパク質
- EtOH : ethanol, エタノール
- GC : guanylate cyclase, グアニル酸シクラーゼ
- GEA : geniposidic acid, ゲニポシド酸
- GLP-1 : Glucagon-like peptide 1, グルカゴン様ペプチド-1
- GLP-1R : Glucagon-like peptide 1 receptor, グルカゴン様ペプチド-1 受容体
- GTP : guanosine triphosphate, グアノシン三リン酸
- hANP : human atrial natriuretic peptide, ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド
- HbA1c : Hemoglobin A1c, ヘモグロビン A1c
- HFD : high-fat diets, 高脂肪食
- iNOS : inducible nitric oxide synthase, 誘導型 NO 合成酵素
- LDCV : large dense core vesicle, 有芯小胞

MF : moderate fat diet, 通常飼料

NADPH : reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 還元型ニコチンアミ
ドアデニンジヌクレオチドリン酸

NEFA : non-esterified fatty acid, 遊離脂肪酸

ND : normal diets, 普通食

NO : nitric oxide, 一酸化窒素

NPR-A : natriuretic peptide receptor A, A型ナトリウム利尿ペプチド受容体

NPR-C : natriuretic peptide receptor C, C型ナトリウム利尿ペプチド受容体

PE : phenylephrine, フェニレフリン

PGI₂ : prostaglandin I₂, プロスタサイクリン

PV : papaverine, パパベリン

SBP : systolic blood pressure, 収縮期血圧

SD : Sprague-Dawley, スプラーグドローリー

SE : standard error, 標準誤差

sGC : soluble guanylate cyclase, 可溶性グアニル酸シクラーゼ

SHR : spontaneously hypertensive rat, 高血圧自然発症ラット

SMA : α -smooth muscle actin, 平滑筋アクチン

SNP : sodium nitroprusside, ニトロプルシドナトリウム

TC : total cholesterol, 総コレステロール

TG : triglyceride, 中性脂肪

VSMC : vascular smooth muscle cell, 血管平滑筋細胞

WAT : white adipose tissue, 白色脂肪組織

WKY : Wistar Kyoto rat, ウィスター京都ラット

The inhibitory effects of *Eucommia ulmoides* leaf extract on decreased vascular function

Atherosclerosis, one of the major causes of cardiovascular disease, significantly contributes to the rising cost of healthcare. In atherosclerosis, dysfunction of the vascular endothelium occurs at an early stage, resulting in the production of nitric oxide (NO) that is known to have both vasodilatory and anti-atherosclerotic effects. Lifestyle-related conditions such as hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia caused by smoking, lack of exercise, and excessive salt intake, are risk factors for vascular endothelial dysfunction. Therefore, inhibiting vascular endothelial dysfunction may be an effective measure to prevent atherosclerosis.

Obesity is a lifestyle-related condition that leads to the development of metabolic syndromes, which are major risk factors for cardiovascular disease. One cause of obesity-induced atherosclerosis is the abnormal secretion of adipocytokines from the fat cells. Adiponectin is a type of adipocytokine that is anti-atherosclerotic, improves insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, and reduces the risk for cardiovascular disease. Hypoadiponectinemia is a condition in which adiponectin levels decrease due to an accumulation of visceral fat. It is a risk factor for type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. Therefore, reversing obesity before the onset of lifestyle-related diseases—caused by decreased adiponectin secretion—would reduce the risk for atherosclerosis.

Eucommia ulmoides Oliv., classified as *Eucommiales Eucommiaceae*, is a deciduous tree that can grow up to 20 m in height. The bark of the *Eucommia* tree has been listed in the Chinese pharmaceutical book “Shennong Ben Cao Jing,” from around 300 AD, and is classified as an “upper herb” that can be taken long term with no side effects. The Chinese pharmaceutical book “Compendium of Materia Medica,” published in the late 16th century, also mentions its effect and usage, and that it was used for lowering blood pressure, as a diuretic, for tonicity, and for its analgesic effects. In addition, Western Chinese folklore states that *Eucommia* leaves (ELs) were used for preparing tea and porridge by minorities such as the Qiang people. In the 1970s in Japan, *Eucommia* tea, termed Tochu-cha in Japanese, was developed from roasted ELs and is categorized as a healthy tea. The blood pressure-lowering, diuretic, anti-stress, improved insulin resistance, anti-hyperlipemia, and anti-obesity-promoting properties of the EL extract (ELE) have been previously reported. The ability of EL to lower blood pressure was demonstrated using a general pharmacological test in which an aqueous fraction of ELE was intravenously injected into rats. Its ability to reduce obesity was demonstrated in rats treated with ELE. ELE improved abnormalities in adipocytokine secretion and increased blood adiponectin in rats with metabolic syndrome induced by a high-fat diet (HFD). The ability of EL to lower blood pressure was also studied in humans. Subsequently, the labeling of ELE blended food that is targeted “for high blood pressure” as a FOSHU (food for specified health use) was authorized.

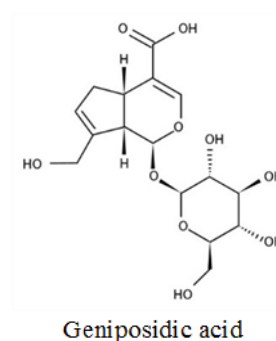
ELE may improve blood pressure control functions inherent in blood vessels by increasing the relaxation of vascular smooth muscles, inhibiting vascular endothelial dysfunction, and reducing the risk for

atherosclerosis, all of which are risk factors for cardiovascular disease. Moreover, ELE may also reduce the risk of atherosclerosis by increasing blood adiponectin levels in obese individuals before the onset of lifestyle-related diseases. In this study, we gathered data from human intake and the efficacy of EL, and hypothesized that ELE decreases vascular dysfunction and reduces the risk for atherosclerosis. We conducted the following studies in order to test and propose a new application of EL.

In Chapter 1, spontaneously hypertensive rats (SHRs), with decreased vascular endothelial function due to aging, were continuously administered ELE and vascular function, including vasodilatory response, was evaluated. The effect on vascular medial thickening, a morphological change normally observed during the early stages of atherosclerosis, was investigated. We confirmed that continuous administration of ELE inhibits the decrease in endothelium-dependent vasodilatory function. We observed a response to acetylcholine in the aorta of SHRs, increased blood NO concentration, and inhibition of vascular medial thickening.

In Chapter 2, Wistar-Kyoto (WKY) rats with early-stage obesity due to an HFD, were continuously administered ELE, and the effects on body weight, visceral fat, blood pressure, blood adipocytokine concentration, and vascular medial thickening, were investigated. As a result, continuous administration of ELE decreased the body weight, amount of visceral fat, blood pressure, and vascular medial thickening; and increased the blood adiponectin concentration and adiponectin-to-leptin ratio in WKY rats.

In Chapter 3, to determine the mechanism in which ELE decreased vascular function, geniposidic acid (GEA), which is the main component of ELE known to lower blood pressure levels, was orally administered to SHRs. We used a glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonist, to investigate the effect of GEA on the secretion of atrial natriuretic peptide (ANP). Oral administration of GEA caused systolic blood pressure to decrease dose-dependently, and GEA (100 mg/kg) significantly lowered blood pressure levels in SHRs. In addition, 6 hours after the administration, a time point in which blood pressure levels significantly decreased, blood ANP concentrations also increased in SHRs. We found no significant difference in the blood concentration of GLP-1, known to promote ANP secretion, between the control and GEA treated groups. Therefore, our data suggests that GEA, not GLP-1, acted as a GLP-1R agonist on atrial cells to increase ANP secretion.



In this study, we found that oral administration of GEA, an ingredient found in natural food, acted as a GLP-1R agonist and increased ANP secretion. ANP has various physiological properties such as vasodilation, diuretic properties, improvement of vascular endothelial function, inhibition of vascular smooth muscle growth, and the promotion of adiponectin secretion. Therefore, we hypothesize that ELE inhibits vascular dysfunction by increasing ANP secretion, and, therefore, may reduce the development of vascular medial thickening, and the risk for developing atherosclerosis. From these findings, we propose the use of ELs with abundant GEA to maintain vascular health.

目次

序論	1
第 1 章 高血圧自然発症ラットにおける杜仲葉エキスの血管機能低下抑制作用	6
第 1 節 背景	6
第 2 節 実験方法	7
(1) 実験材料	7
(2) 使用薬物	7
(3) 実験動物	7
(4) 投与方法	8
(5) 血圧，体重，摂餌量および摂水量の測定	8
(6) 血管等尺性張力試験 (マグヌス試験)	8
(7) 血中 NO 濃度の測定	9
(8) 血管平滑筋アクチンの免疫組織化学染色と中膜肥厚の評価	9
(9) 統計処理	10
第 3 節 結果	10
(1) 体重，摂餌量，摂水量および血圧	10
(2) 血管等尺性張力試験 (マグヌス試験)	12
(3) 血中 NO 濃度	15
(4) 血管中膜の厚さ	15
第 4 節 考察	17
第 2 章 高脂肪食負荷ラットにおける杜仲葉エキスの抗動脈硬化作用	21
第 1 節 背景	21

第 2 節	実験方法	22
(1)	実験材料	22
(2)	使用薬物	22
(3)	実験動物	22
(4)	投与方法	22
(5)	体重, 摂餌量, 摂水量および内臓脂肪量の測定	22
(6)	血圧の測定	23
(7)	血管平滑筋アクチンの免疫組織化学染色と中膜肥厚の評価	23
(8)	血液生化学検査	23
(9)	統計処理	23
第 3 節	結果	23
(1)	体重, 摂餌量, 摂水量および内臓脂肪量	23
(2)	血圧	25
(3)	血管中膜の厚さ	26
(4)	血液生化学検査	27
第 4 節	考察	30
第 3 章	杜仲葉エキスの血管機能低下抑制作用の機序	33
第 1 節	背景	33
第 2 節	実験方法	37
(1)	実験材料	37
(2)	使用薬物	37
(3)	実験動物	37
(4)	投与方法	37
(5)	血圧および心拍数の測定	37
(6)	血中 GEA 濃度の測定	38

(7) 血中 ANP 濃度の測定	38
(8) 血中 GLP-1 濃度の測定	39
(9) 統計処理	39
第 3 節 結果	40
(1) ゲニポシド酸の単回経口投与試験	40
(2) ゲニポシド酸の血中 ANP 濃度に与える影響	42
第 4 節 考察	44
総括	49
謝辞	51
引用文献	52

学位論文の基礎となる報文

Hosoo S., Koyama M., Kato M., Hirata T., Yamaguchi Y., Yamasaki H., Wada A., Wada K., Nishibe S., Nakamura K., The restorative effects of *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract on vascular function in spontaneously hypertensive rats, *Molecules*, **20**, 21971-21981 (2015).

Hosoo S., Koyama M., Watanabe A., Ishida R., Hirata T., Yamaguchi Y., Yamasaki H., Wada K., Higashi Y., Nakamura K., Preventive effect of *Eucommia* leaf extract on aortic media hypertrophy in Wistar-Kyoto rats fed a high-fat diet, *Hypertension Research*, **40**, 546-551 (2017).

Nakamura K., Hosoo S., Yamaguchi S., Koyama M., Yamazaki R., Hirata T., Yamaguchi Y., Yamasaki H., Minamino N., Wada K., Nishibe S., Geniposidic acid upregulates atrial natriuretic peptide secretion and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Journal of Functional Foods*, **40**, 634-638 (2018).

序 論

我が国の心疾患および脳血管疾患を合わせた死亡率は、平成 28 年人口動態統計（確定数）の概況によると 23.5%で、悪性新生物の 28.5%に次いで多い。¹⁾ また、平成 27 年度国民医療費の概況（厚生労働省）によると、医科診療医療費は、循環器系の疾患が 5 兆 9,818 億円（構成割合 19.9%）で最も多く、新生物の 4 兆 1,257 億円（同 13.7%）の約 1.5 倍にも及ぶ。²⁾ 平成 25 年度から開始された厚生労働省策定の健康日本 21（第 2 次）では、「健康寿命の延伸」が目標の 1 つにあげられ、「主要な生活習慣病の発症予防と重症化予防の徹底」の基本方針の中で、循環器疾患が対策を推進する分野の 1 つに選ばれている。³⁾

循環器疾患の多くは、高血圧、糖尿病、脂質異常症、肥満などの生活習慣病や加齢に起因する動脈硬化の進展により発症する。よって、生活習慣病の発症リスクを軽減し、動脈硬化の発症を予防することは、増加する国民医療費を抑制する対策の 1 つとして非常に重要である。循環器疾患の危険因子の 1 つである高血圧は、脳血管疾患、虚血性心疾患、慢性心不全などあらゆる循環器疾患の危険因子であり、日本人の循環器疾患の発症および死亡に対して大きな人口寄与危険割合を示す。³⁾ 健康日本 21（第 2 次）では、40～89 歳の収縮期血圧の平均値を 4 mmHg 低下させる目標が設定され、生活習慣と危険因子の関連および危険因子と循環器疾患との関連について、国民の理解を深めることの必要性が示されている。

血管は、最内層にある血管内皮細胞を含む内膜、血管平滑筋を含む中膜、その外側にある外膜の三層構造からなる。血管内皮細胞は、一酸化窒素 (NO)、プロスタグランジン I₂ (PGI₂)、内皮細胞由来過分極因子 (EDHF) などの血管拡張因子およびエンドセリン、アンジオテンシン I などの血管収縮因子を産生・分泌し、血管の拡張と収縮を調整している。⁴⁻⁶⁾ NO は、特に重

要な血管調節因子であり、血管内外の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが知られている。NOはL-arginineを基質とし、内皮型NO合成酵素(eNOS)によって、L-citrullineと共に産生される。血管内皮細胞で産生されたNOは、隣接する血管平滑筋細胞の可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)を活性化し、細胞内の環状グアノシンーリン酸(cGMP)を増加させることで血管を拡張させる。⁷⁾ また、血管内皮細胞から血中に拡散したNOは、血小板の凝集および白血球の血管壁への侵入を抑制する。さらに、NOは血管平滑筋細胞の増殖を抑制し、動脈硬化の進展を抑制する。⁴⁻⁶⁾ 動脈硬化の初期段階では、NOを産生する血管内皮機能の障害が観察され、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病や喫煙、運動不足、塩分過剰摂取などの生活習慣および加齢により、血管内皮機能障害はさらに進展する。^{4,6,8)} よって、血管内皮機能の低下を抑制することは、生活習慣病のリスク低減および動脈硬化の予防において有効な手段となり得る。

一方、平成27年の国民健康・栄養調査では、成人男性の29.5%、成人女性の19.2%が肥満であることが報告されている。⁹⁾ 生活習慣病を誘発する肥満は、内臓脂肪の蓄積を引き起こし、心血管疾患の危険因子が集積した状態を示すメタボリックシンドロームの主たる構成因子である。^{10,11)} 肥満により引き起こされる動脈硬化の要因の一つとして、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの分泌異常があげられる。アディポサイトカインの一つであるアディポネクチンは、抗動脈硬化作用、インスリン抵抗性や2型糖尿病の改善作用、心血管保護作用などの機能を有する。¹²⁾ 内臓脂肪の蓄積により、アディポネクチンの分泌量が低下した状態である低アディポネクチン血症は、2型糖尿病や冠動脈疾患の危険因子であることが示されている。^{12,13)} よって、アディポネクチンの分泌減少により生活習慣病を発症する前の早い段階で肥満を改善することは、動脈硬化のリスク低減につながる。

杜仲(トチュウ, *Eucommia ulmoides* Oliv.) は、トチュウ目トチュウ科の落

葉性高木で、その高さは 20 m にも達する (Fig. 1) . 杜仲の樹皮は、紀元 300 年頃の中国薬物書である「神農本草経 (しんのうほんぞうきょう)」に収載され、副作用がなく長期に服用が可能な「上品」の漢薬に分類されている。16 世紀末に記された中国の薬学書「本草綱目 (ほんぞうこうもく)」にも、その効能や用法が記載されており、古くから降圧、利尿、強壯、鎮痛などを目的に利用されている。¹⁴⁾ 日本でも、杜仲の樹皮は生薬として様々な医薬品に使用されている。一方、杜仲の葉は、中国西部の民俗学調査によると、チャン族などの少数民族によって古くから茶や粥として食べられてきたことが知られている。¹⁵⁾ 日本では、1970 年代に杜仲の葉を焙煎した「杜仲茶」が考案され、健康茶カテゴリーの一つとして広く飲用されている。

杜仲葉の含有成分には、イリドイド類、フラボノイド類、フェノール類、トリテルペノイド類などの化合物が同定されている。¹⁶⁻¹⁸⁾ 杜仲葉の有効性については、血圧降下作用、¹⁹⁾ 利尿作用、²⁰⁾ 抗ストレス作用、²¹⁾ インスリン抵抗性の改善作用、²²⁾ 抗高脂血作用、^{23,24)} 抗肥満作用^{25,26)} などの報告がある。血圧降下作用については、ラットに杜仲葉エキス (ELE) の水性分画物を静脈注射した一般薬理試験により、その作用と機序が報告されている。^{19,27)} また、抗肥満作用については、高脂肪食 (HFD) の負荷によりメタボリックシンドロームを発症させたラットにおいて、ELE がアディポサイトカインの分泌異常を改善し、血中アディポネクチンを増加させることが報告されている。²⁵⁾ さらに、ヒト試験により血圧降圧作用が確認され、ELE 配合食品が「血圧が高めの方」を対象とした特定保健用食品として、表示許可をされている。

ELE は、血管平滑筋の弛緩性を高めることにより血管が本来もっている血圧調節機能を改善することから、血管内皮機能の低下を抑制し、循環器疾患の原因となる動脈硬化の発症リスクを低減する可能性が考えられる。さらに、ELE は生活習慣病を発症する前の初期段階の肥満に対しても、血中アディポ

ネクチンを増加させることにより、動脈硬化の発症リスクを低減する可能性が考えられる。本研究では、杜仲葉の食経験と有効性に関するデータから、杜仲葉が血管機能低下を抑制し、動脈硬化の発症リスクを低下させるとの仮説を立て、杜仲葉の機能性素材としての新しい用途を開発することを目的として、次の試験を行った。

第 1 章では、加齢に伴い血管内皮機能が低下する高血圧自然発症ラット (SHR) に ELE を継続摂取させ、血管拡張反応を含めた血管機能を評価し、さらに動脈硬化の初期に見られる形態変化である血管中膜肥厚に与える影響を検討した。

第 2 章では、HFD 負荷により初期段階の肥満を呈したウイスター京都ラット (WKY) に ELE を継続摂取させ、体重、内臓脂肪量、血圧、血中アディポサイトカイン濃度および中膜肥厚に与える影響を検討した。

第 3 章では、ELE の血管機能低下抑制の作用機序を明らかにすることを目的として、ELE の主要成分であり降圧作用の関与成分であることが知られているゲニポシド酸 (GEA) を SHR に単回投与し、血管機能低下抑制作用の検討を行った。



mature tree



leaf

Fig. 1. *Eucommia ulmoides* Oliv.

第 1 章 高血圧自然発症ラットにおける杜仲葉エキスの血管機能低下抑制作用

第 1 節 背景

1970 年代以降，中国の上海やその周辺地域では，ELE が降圧剤および健康食品として利用されており，臨床的評価も行われている。^{14,28)} Namba らはウイスター系雄性ラットを用いて ELE の薬理評価を行い，その降圧降下がムスカリン様アセチルコリン受容体を介した作用であることを報告した。¹⁹⁾ また，Kwan らは，スプラグドローリー (SD) ラットの摘出血管を用いた試験を行い，ELE の降圧作用に血管内皮依存性の血管拡張作用が関与していることを報告した。²⁹⁾ また，SHR に ELE を経口投与した試験において，ELE は濃度依存的に降圧作用を示すこと，および杜仲葉配糖体である GEA が降圧作用の関与成分であることが報告されている。^{15,27)} さらにヒト試験では，正常高値血圧者および軽症高血圧者を対象とした二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験において，GEA を 85mg 含む ELE 配合食品の降圧作用が確認されている。³⁰⁾

高血圧は動脈硬化の主要な原因の 1 つであるが，動脈硬化を発症する前には，概ね血管内皮機能が低下していることが知られている。³¹⁾ よって，NO の産生低下を含めた血管機能低下を防ぐことは動脈硬化の予防において有効な手段となり得る。ELE は血管平滑筋の弛緩性を高め血管抵抗を低減させることにより，降圧作用を示すことが報告されている。^{18,27)} しかし，ELE の継続摂取が血管機能低下に与える影響については，これまで報告されていない。本研究では，加齢に伴い血管内皮機能が低下し，高血圧を発症する SHR に ELE を継続摂取させ，血管拡張反応を含めた血管機能を評価し，その影響を検討した。さらに，ELE の継続摂取が動脈硬化の発症に与える影響を検討するために，動脈硬化の初期に見られる形態変化である血管中膜肥厚を調べた。

第 2 節 実験方法

(1) 実験材料

中国四川省産の杜仲から採取した生葉を用いた。生葉を蒸気温度 100～110℃で蒸熱処理し、熱風により水分量を 10%以下に乾燥後、130℃で 20～30 分間焙煎した 2,000 kg の杜仲葉を 90 ℃の熱水 10,000 kL で 1 時間抽出し、それをろ過、濃縮、静置、冷却した後、さらにろ過、再濃縮、真空乾燥して ELE を得た (収率 : 18%) .

(2) 使用薬物

各試薬は次のものを使用した。塩化アセチルコリン, L(-)フェニレフリン (PE) 塩酸塩, パパベリン (PV) 塩酸塩, ペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム二水和物, クエン酸一水和物 (関東化学), 混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) (岡谷酸素), EDTA-2K, アジ化ナトリウム, 30%過酸化水素水, 20%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業), α -smooth muscle actin (SMA) 染色一次抗体, SMA 染色二次抗体, 正常ロバ血清 (アブカム), 3,3 ジアミノベンチジン 4 塩酸塩 (同仁化学研究所)。マイヤーヘマトキシリン染色液 (メルク), マウントクイック (コスモバイオ) .

(3) 実験動物

5 週齢のウイスター京都ラット (WKY/Izm, 7 匹) と同週齢の SHR (SHR/Izm, 21 匹) を日本エスエルシーから購入した。飼育は温度 23 ± 1.0℃, 相対湿度 50 ± 5%, 明暗サイクル 12 時間の条件下で行い, 1 週間の予備飼育後, 実験に使用した。SHR は予備飼育後, 血圧および体重を測定し各群 7 匹の収縮期血圧 (SBP) および体重の平均値が等しくなるように群分けした。ラットには, 固形の通常飼料 (MF) (オリエンタル酵母工業) またはこれに ELE を 5% 混合した飼料および水道水を 24 時間自由摂取させた。

(4) 投与方法

SHR における試験では 1 週間予備飼育した後, MF 飼料または ELE を 5% 混合した MF 飼料を 6 週齢から 7 週間自由摂取させた. WKY における試験でも 1 週間予備飼育した後, MF 飼料を 6 週齢から 7 週間自由摂取させた.

(5) 血圧, 体重, 摂餌量および摂水量の測定

SBP は, 無麻酔下で非観血的自動血圧測定装置 (Softron BP-98A : ソフトロン) を用いてテールカフ法により毎週 1 回測定した. 体重はラットを保定袋に入れ重量を測定後, 保定袋の重量を風袋引きして算出した. 摂餌量および摂水量は, 給餌および給水時の重量から測定時の重量を差し引いて算出した.

(6) 血管等尺性張力試験 (マグヌス試験)

投与期間終了後, ラットをエーテル麻酔下で開腹, 放血死させ, 速やかに胸部大動脈を摘出した. 摘出した大動脈を 4°C に保冷したクレブス溶液 (119 mM NaCl/4.7 mM KCl/1.1 mM KH₂PO₄/1.2 mM MgSO₄/25 mM NaHCO₃, pH 7.4) に浸し, 血液をよく洗い流した後, 血管に付着した結合組織および脂肪組織を除去し, 幅約 2~3 mm のリング標本を作製した. 内皮除去は, 血管リング標本をろ紙に軽く擦りつけて行った. リング標本は混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) を通気したクレブス溶液 (37°C) を満たした血管等尺性張力測定装置のオーガンバス内のフックに取り付けた. 1.5 g の至適静止張力を負荷し約 60 分間リング標本を安定させた. 血管張力は, UFER UM-203 トランスデューサー (いわしや岸本医科産業) により計測した. オーガンバス内に血管収縮剤である PE (最終濃度 0.30 μM) を添加し, リング標本を収縮させた. 収縮させたリング標本に内皮依存性血管拡張剤であるアセチ

ルコリン (ACh) (最終濃度 100 μM) を添加し、血管拡張作用の有無により血管内皮の有無を判断した。その後、薬剤を除去するため Krebs 溶液でリング標本を洗浄し、再び PE (最終濃度 0.30 μM) により収縮させ、収縮が最大に達したことを確認した。血管収縮が安定したところで、ACh または NO 供与体であるニトロプルシドナトリウム (SNP) を添加して、血管拡張反応 (張力変化) を測定しレコーダーで記録した。ACh を投与した内皮依存性の血管拡張試験では ACh を最終濃度で 10^{-9} - 10^{-4} M になるよう、SNP を投与した内皮非依存性の血管拡張試験では血管内皮除去標本を用いて、SNP を最終濃度で 10^{-10} - 10^{-5} M となるように累積添加した。測定の最後に血管弛緩剤である PV (最終濃度 0.1 mM) を添加し、リング標本を完全に弛緩させた。血管弛緩率 (%) は、PE で血管を収縮させた場合の最大収縮を弛緩率 0%、PV で完全に弛緩させた場合のベースラインを弛緩率 100% とした相対値で表した。

(7) 血中 NO 濃度の測定

投与期間終了後、エーテル麻酔下でラットを開腹し、下腹部大静脈から採血した。血液を 10% EDTA-2K 溶液が入った遠沈管 (全血 1 mL に対し 10 ~ 17.5 μL) に移し、遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) を行い、血漿を得た。血漿は別容器に移し替えた後、試験まで -80°C 以下で保存した。測定直前に解凍した血漿を遠心分離 (7,000 g, 4°C , 20 分間) を行い、上清を血漿サンプルとして測定まで -80°C 以下で冷凍保存した。血中 NO 濃度は、Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Co.) を用いて測定した。

(8) 血管平滑筋アクチンの免疫組織化学染色と中膜肥厚の評価

0.85% 塩化ナトリウム含有 0.01M リン酸緩衝液で洗浄した 10 mm の胸部大動脈標本を 20% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包理を行

い、2-3 mm の薄切切片にしてプレパラートに固定した。パラフィン切片を脱パラフィンした後、内因性ペルオキシダーゼを阻止するためにクエンチング溶液（メタノール 112.5 mL, 30%過酸化水素水 1.5 mL, 純水 36 mL を混合）で処理し、室温で 30 分間反応させた。一次抗体溶液（ α -SMA マウスモノクローナル抗体を 1,000 倍希釈）で一晩反応させた後、二次抗体溶液（二次抗体を 500 倍希釈）で一晩反応させた。その後、3,3 ジアミノベンチジン溶液で発色させ、マウントクイックを用いて封入剤で切片を覆った。ヘマトキシリン溶液を用いて核染色を行った血管中膜は顕微鏡写真を撮影し、専用ソフト（AxioVision LE : Carl Zeiss）で中膜の厚さを計測した。

(9) 統計処理

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差（SE）で表した。有意差検定は、Dunnett's test により行った。有意差水準は、危険率 5%未満 ($p<0.05$) を有意差ありとした。

第 3 節 結果

(1) 体重，摂餌量，摂水量および血圧

ELE 投与 7 週間における体重，摂餌量，摂水量および SBP の変化を Table 1 に示す。すべての群の体重，摂餌量，摂水量において，有意な差は認められなかった。SBP は，投与開始時からの SBP の変化量を Δ SBP として示した。摂取 3 週間後および 7 週間後，SHR コントロール群の Δ SBP は，WKY 群と比較して有意に高かった (Fig. 2)。また，摂取 3 週間後および 7 週間後の SHR-ELE 群の Δ SBP は，SHR コントロール群と比較して有意に低く，ELE の摂取により SHR の血圧上昇が抑制されていることが示唆された。

Table 1. Body weight, food and water intake, and the change in systolic blood pressure (SBP) during the seven-week study

	Body weight (g)			Food intake (g/day)	Water intake (mL/day)	Δ SBP (mmHg)	
	Day -1	Week 7	Gain			Week 3	Week 7
WKY	125.7 \pm 2.2	347.5 \pm 1.9	221.9 \pm 3.5	18.4 \pm 0.5	29.9 \pm 0.8	3.6 \pm 1.8**	16.4 \pm 4.7**
SHR-control	136.1 \pm 1.2	331.6 \pm 7.7	195.5 \pm 6.8	19.8 \pm 0.4	33.2 \pm 1.1	35.6 \pm 0.7	72.9 \pm 2.4
SHR-ELE	136.7 \pm 0.4	321.5 \pm 3.8	184.8 \pm 3.7	19.2 \pm 0.8	35.6 \pm 1.4	17.8 \pm 2.5**	67.1 \pm 2.3**

Δ SBP is the SBP at the indicated time-point minus the SBP on day-1. All values represent the means \pm SE. (n=7). ** p <0.01, as compared with the spontaneously hypertensive rat (SHR)-control group by Dunnett's test. WKY, Wistar Kyoto rat; ELE, Eucommia leaf extract.

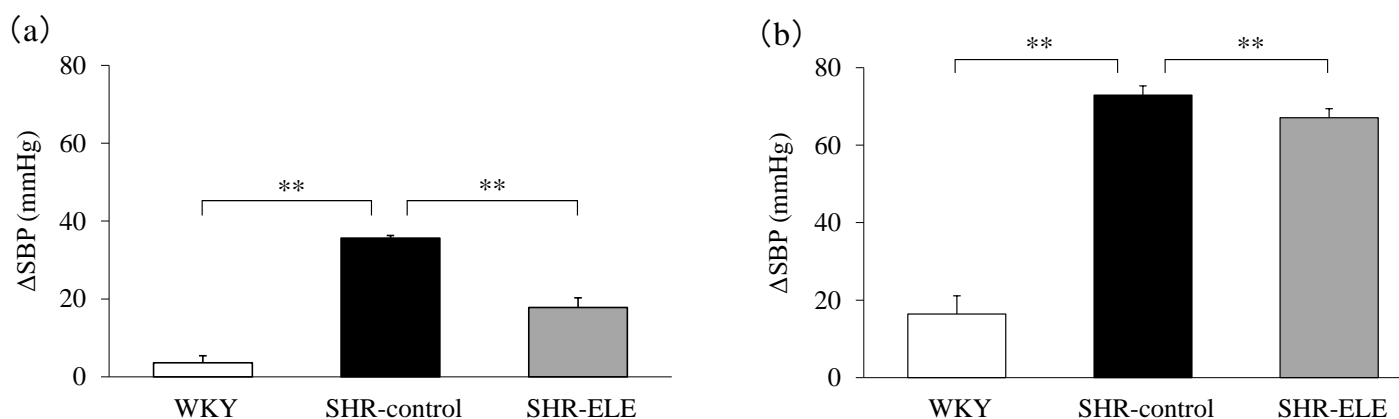


Fig. 2. Changes in systolic blood pressure (SBP) between the SBP on day-1 and the SBP measured (a) three or (b) seven weeks after the beginning of the experiment

The values represent the means \pm SE. (n=7). ** p <0.01, as compared with the spontaneously hypertensive rat (SHR)-control group by Dunnett's test. WKY, Wistar Kyoto rat; ELE, Eucommia leaf extract.

(2) 血管等尺性張力試験 (マグヌス試験)

血管内皮依存性の血管拡張反応を調べるため、オーガンバス内に PE (0.30 μM) を添加して予め収縮させた大動脈に、血管内皮依存的に血管を拡張させる ACh (10^{-9} - 10^{-4} M) を累積的に添加した。各群の血管拡張反応のプロファイルを Fig. 3 (a, b, c) に示した。また、各群 7 匹の血管拡張率の平均値をプロットした血管拡張曲線を Fig. 4 (a) に示した。ACh が 10^{-7} - 10^{-4} M の濃度範囲において、SHR コントロール群の血管拡張反応は、WKY 群よりも有意に低かった。SHR-ELE 群の血管拡張率は、ACh が $10^{-7.5}$ - 10^{-4} M の濃度範囲において、SHR コントロール群よりも有意に高かった。

また、血管内皮非依存的の血管拡張反応を調べるため、NO を供与して血管を拡張させる SNP をオーガンバスに累積的に添加した。各群の血管拡張反応のプロファイルを Fig. 3 (d, e, f) に示した。また、各群 7 匹の血管拡張率の平均値をプロットした血管拡張曲線を Fig. 4 (b) に示した。SNP が 10^{-10} - 10^{-5} M の濃度範囲において、各群間の血管拡張率に有意な差は見られなかった。

以上のことから、NO に反応して血管を拡張させる血管平滑筋の機能は、SHR 群と WKY 群で差がないこと、および ACh に反応して血管を拡張させる血管内皮機能は、WKY 群と比較して、SHR 群で有意に低下していることが認められた。

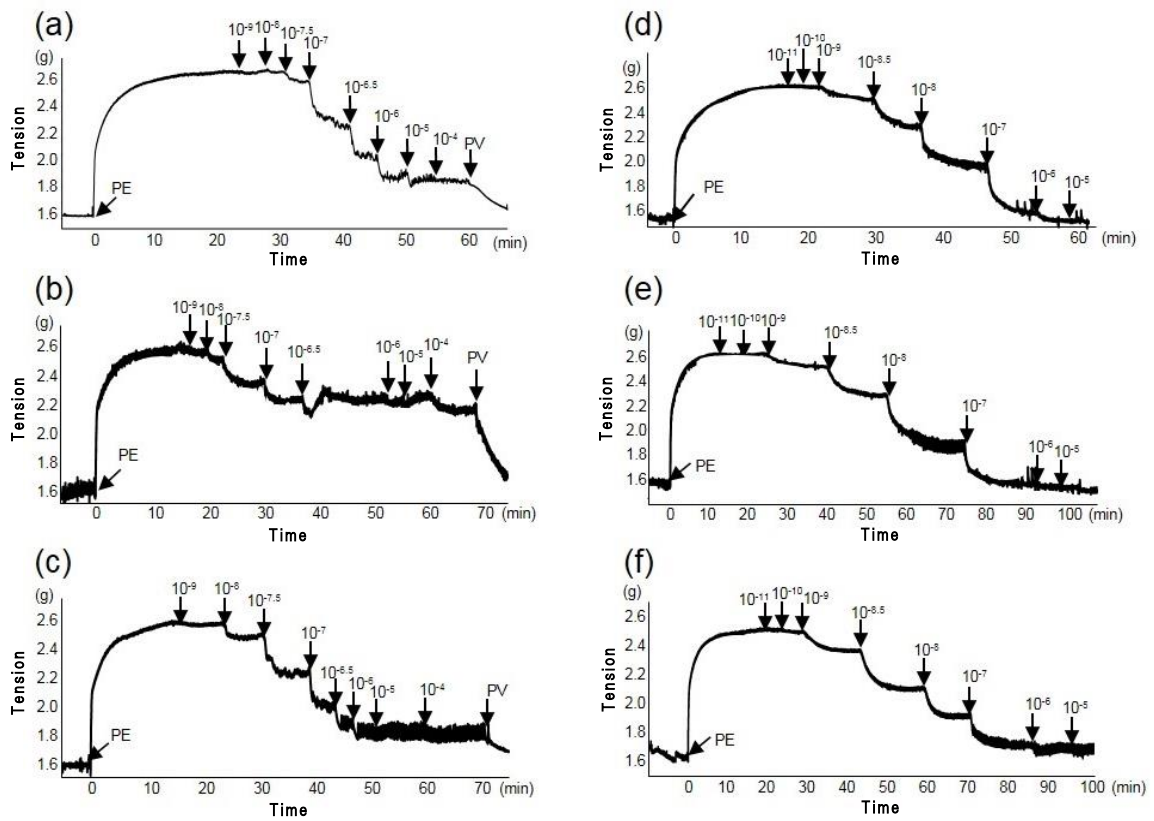


Fig. 3. Representative acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) relaxation profiles of thoracic aorta rings from the test animals

(a) ACh-Wister Kyoto rat (WKY) group; (b) ACh-spontaneously hypertensive rat (SHR)-control group; (c) ACh-SHR-Eucommia leaf extract (ELE) group; (d) SNP-WKY group; (e) SNP-SHR-control group; and (f) SNP-SHR-ELE group. ACh and SNP were added cumulatively at concentrations of 10^{-9} - 10^{-4} M and 10^{-10} - 10^{-5} M, respectively, to $0.3 \mu\text{M}$ Phenylephrine (PE)-contracted thoracic aorta rings. PV, papaverine.

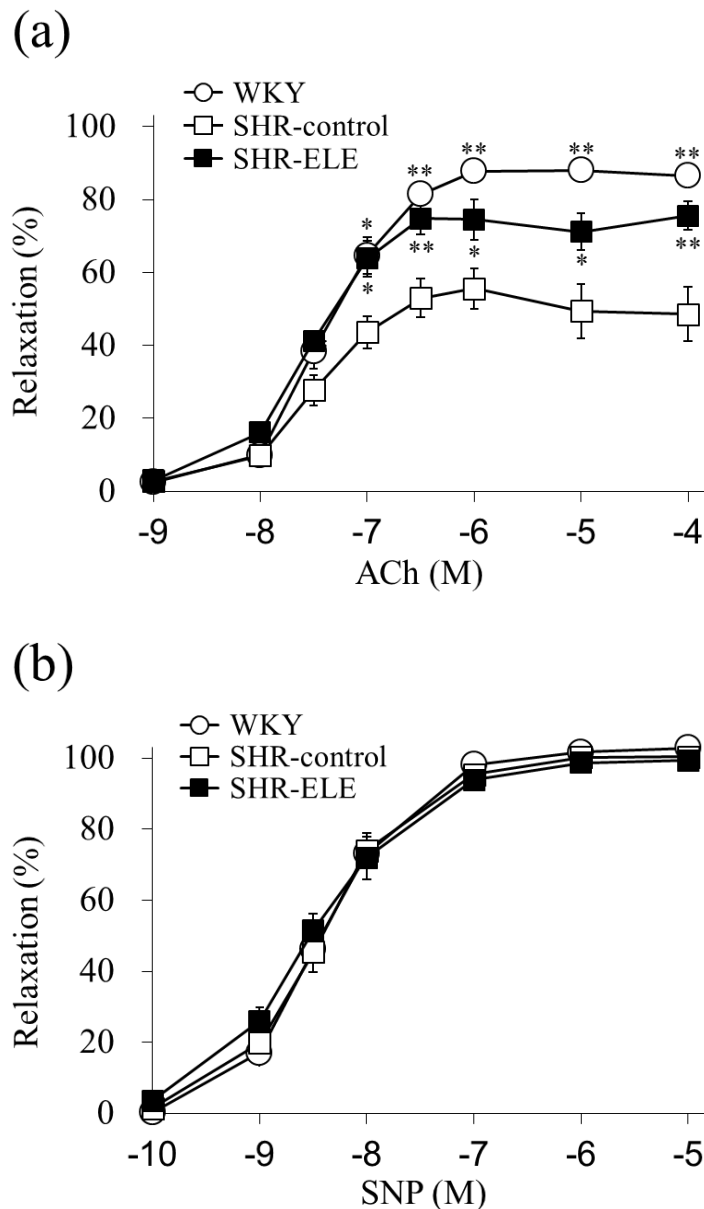


Fig. 4. (a) Endothelium-dependent relaxation curve induced by acetylcholine (ACh) and (b) endothelium-independent relaxation curve induced by sodium nitroprusside (SNP) in thoracic aortic rings from the indicated treatment groups

The values represent the means \pm SE. (n=7). * p <0.05, ** p <0.01, as compared with the spontaneously hypertensive rat (SHR)-control group by Dunnett's test. WKY, Wister Kyoto rat; ELE, Eucommia leaf extract.

(3) 血中 NO 濃度

NOは血管内皮細胞のeNOSによって産生されることから、ELE投与後の血中NO濃度を測定することで血管内皮機能を評価した (Fig. 5)。血中NO濃度は、WKY群と比較してSHRコントロール群で有意な増加が見られた(それぞれ、 $3.49 \pm 0.22 \mu\text{M}$, $6.37 \pm 0.59 \mu\text{M}$)。また、SHR-ELE群 ($11.75 \pm 1.95 \mu\text{M}$) では、SHRコントロール群よりも有意な増加が認められた。

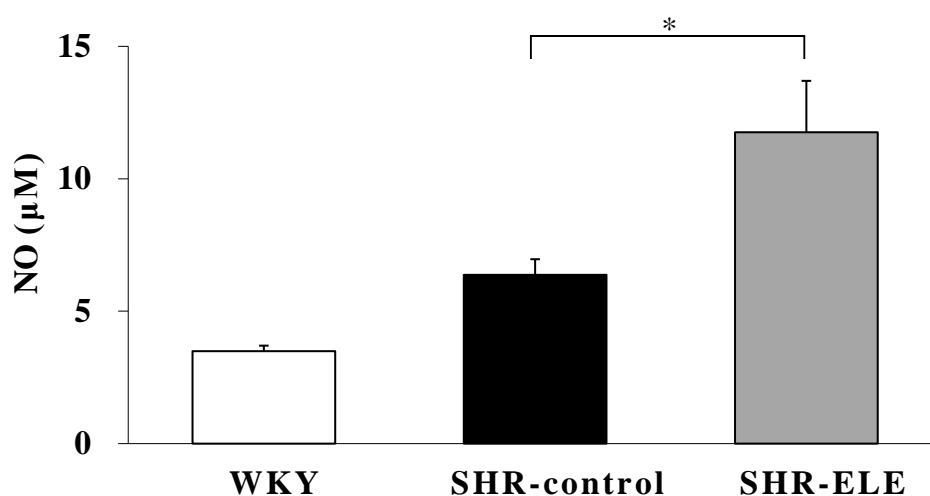


Fig. 5. Plasma nitric oxide (NO) levels in the indicated treatment groups

The values represent the means \pm SE. (n=7). * $p < 0.05$, as compared with the spontaneously hypertensive rat (SHR)-control group by Dunnett's test. WKY, Wister Kyoto rat; ELE, Eucommia leaf extract.

(4) 血管中膜の厚さ

ELEの継続摂取が血管の形態変化に与える影響を評価した。胸部大動脈の血管中膜の厚さを血管平滑筋SMAの免疫組織化学染色により形態計測した結果をFig. 6およびFig. 7に示す。WKY群の血管壁では、血管平滑筋細胞(VSMC)が規則正しく配列していたが、SHRコントロール群では血管壁が変形し、VSMCが肥大化していた (Fig. 6)。SHRコントロール群の血

管中膜の厚さ ($124.7 \pm 5.9 \mu\text{m}$) は、WKY 群 ($90.4 \pm 3.6 \mu\text{m}$) と比較して有意な増大が認められた ($p < 0.05$)。一方、SHR-ELE 群の血管中膜の厚さ ($101.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$) は、SHR コントロール群と比較して有意に低値であり ($p < 0.05$)、ELE の継続摂取により血管中膜の肥厚が抑制されることが示唆された。

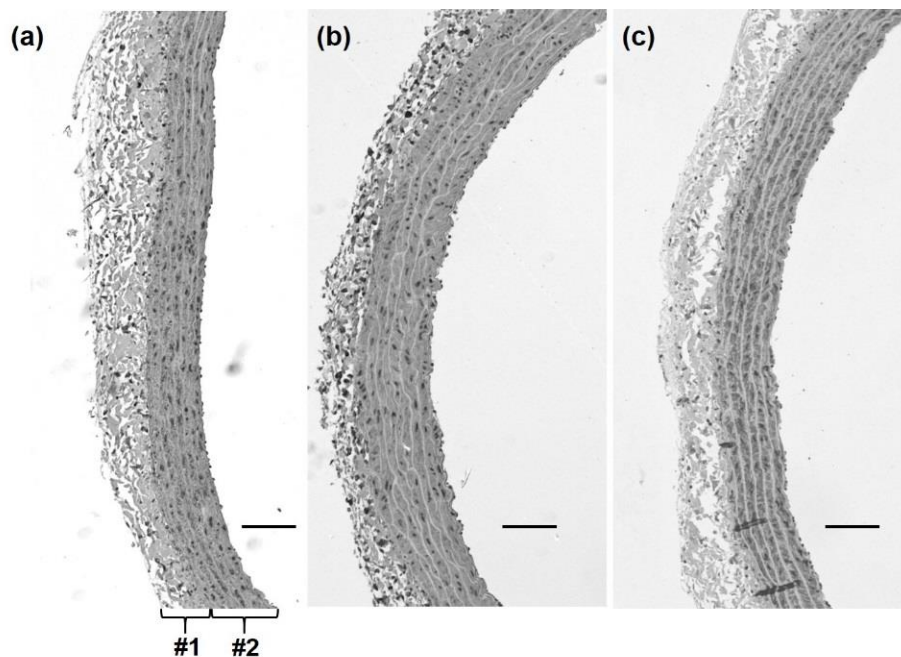


Fig. 6. Representative histological alpha smooth muscle actin-stained images of the thoracic aorta of rats in the (a) Wister Kyoto rat (WKY); (b) spontaneously hypertensive rat (SHR)-control; and (c) SHR-Eucommia leaf extract (ELE) groups

#1: arterial wall; #2: arterial media; scale bars = 100 μm .

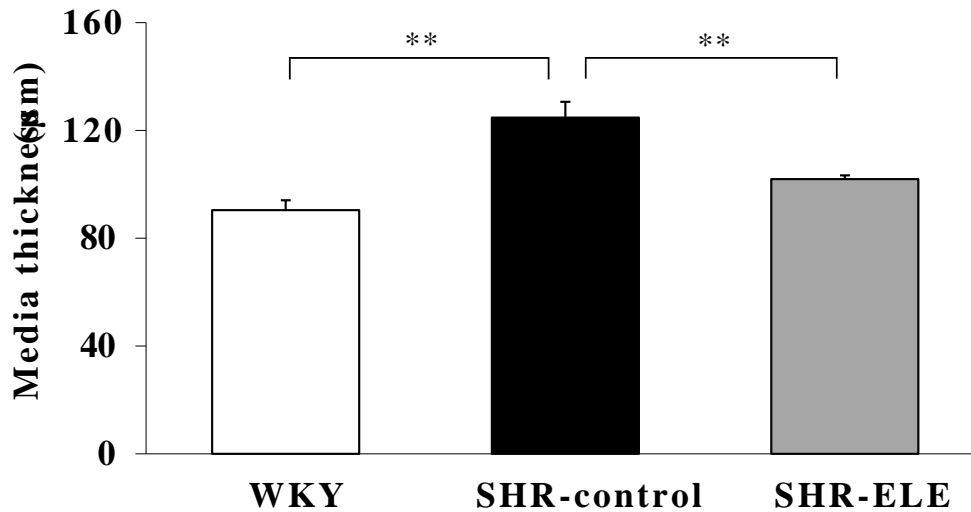


Fig. 7. Thoracic aorta ring media thickness in the indicated treatment groups
 The values represent the means \pm SE. (n=7). ** $p < 0.01$, as compared with the spontaneously hypertensive rat (SHR)-control group by Dunnett's test. WKY, Wister Kyoto rat; ELE, Eucommia leaf extract.

第4節 考察

本研究では、6週齢 SHR に ELE を7週間継続摂取させ、血管機能の低下に与える影響について検討した。SHR における ELE の降圧作用については、ELE を3%または5%混餌し自由摂取させた試験において確認されていることから、^{15,27)} 本試験では ELE を5%混餌し、ELE の評価を行った。SHR コントロール群では、ACh による血管拡張が、WKY 群と比較して有意に低下していた。一方、SNP による血管拡張は、各群間で差が見られなかった。以上の結果から、SHR の大動脈では、NO 供与体である SNP に反応した血管拡張反応を担う血管平滑筋の機能は低下していないが、ACh に反応した血管拡張反応を担う血管内皮の機能は低下していることが確認された。SHR の大動脈では、eNOS の活性および遺伝子発現が低下しており、³²⁾ さらに ACh による血管拡張が減弱していることが報告されている。³³⁾ 本研

究でも、SHR が血管内皮機能の低下抑制効果を評価するために適したモデル動物であることを確認できた。SHR-ELE 群の ACh による血管拡張は、SHR コントロール群よりも有意に高値であるため、ELE の継続摂取によって血管機能低下が抑制されることが示唆された。さらに SHR-ELE 群の血中 NO 濃度は、SHR コントロール群よりも有意に高かったことから、ELE によって血管内皮細胞における NO 産生が増加することが明らかとなった。大血管とより大きな細動脈では、NO が特に重要な血管調節因子であり、抵抗血管では、NO、PGI₂ および EDHF が、血管機能の調節に関与していることが報告されている。³⁴⁾ よって、ELE の継続摂取により、SHR の血管内皮機能が改善し NO 産生が増加したことにより、大血管および抵抗血管の弛緩作用が改善し、血圧が低下したと考えられる。

SHR では、誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) の遺伝子発現が増加し、³⁵⁾ 酸化ストレスの亢進による iNOS の活性化が報告されている。³²⁾ 本研究で SHR コントロール群の血中 NO 濃度が WKY 群よりも高値であったことは、これらの報告と一致している。SHR の血管内皮細胞では NAD(P)H オキシダーゼが活性化し、酸化ストレスが増大することで iNOS の発現が誘導され、³⁶⁾ さらに NO のバイオアベイラビリティが低下する。³⁷⁾ 一方、eNOS 活性の増加と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼ活性の低下は、SHR における血管内皮機能の改善と相関しており、³⁸⁾ eNOS の発現および活性の増加は、SHR の血中 NO 濃度を上昇させることが報告されている。³⁹⁾ 従って、SHR-ELE 群で血中 NO 濃度が増加したことは、ELE によって血管内皮機能が改善された結果であると考えられる。本試験では iNOS と eNOS の遺伝子発現および活性を直接測定していないため、これらの変動と血中 NO 濃度の関係が不明であり、さらなる研究が必要である。

本研究では、ELE の継続摂取により SHR の血管中膜肥厚が抑制されることを確認した。NO は血管拡張作用に加えて、VSMC の異常増殖を抑制する作用を有する。⁴⁰⁾ SHR の VSMC では NADPH オキシダーゼの遺伝子発現が増加し、NO 産生および NO のバイオアベイラビリティが低下しているため、⁴¹⁾ SHR コントロール群で血管中膜の肥厚が認められたと考えられる。一方、SHR-ELE 群では、血管内皮の NO 産生および NO のバイオアベイラビリティが改善し、VSMC の異常増殖が抑制されたことから血管中膜の肥厚が抑制されたと考えられた。

杜仲葉には GEA やアスペルロシド (ASP) を含むイリドイド配糖体、クロロゲン酸 (CHA) を含むフェノール類、ケルセチンやルチンを含むフラボノイド類が含まれている。それらの含有量は、GHA (5.47%)、ASP (1.75%)、CHA (0.35%)、ケルセチン (0.22%)、ルチン (0.02%) であった。

¹⁸⁾ GEA の降圧作用については、SHR における ELE の降圧作用が GEA に起因し、杜仲葉の主要な活性成分は GEA であること、^{15,27)} SHR における GEA 単回摂取試験 (140 mg/kg) で血圧が有意に低下したことが報告されている。⁴²⁾ また、GEA および ASP については、直接的な抗酸化活性は報告されていないが、GEA がマウスにおいて生体内の抗酸化システムを高めることが報告されている。⁴³⁾ 一方、CHA は *in vitro* 試験において抗酸化活性を有することが確認され、⁴⁴⁾ SHR に 300 mg/kg/day で 8 週間経口投与した試験では、活性酸素種の過剰生成を抑制することにより NO のバイオアベイラビリティを改善させ、高血上昇を抑制することが確認されている。⁴⁵⁾ しかし、ELE における CHA の含有量は、降圧作用を示す 300 mg/kg/day よりも明らかに少ないため、今回の ELE の降圧作用は CHA に起因するものではないことが推測される。また、ケルセチンやルチンについても、*in vitro* 試験で抗酸化活性を有することが確認されているが、⁴⁴⁾ ELE における含量は低いいため、ELE の降圧作用には寄与していないことが推測される。以

上のことから、SHRにおけるELEの血圧上昇抑制作用および血管機能低下抑制作用は、GEAに起因することが考えられる。また、GEAを静脈注射した時の降圧作用がWKYでは見られず、SHRで顕著に認められたことから、正常ラットではGEAが降圧作用を示さないことが報告されている。¹⁵⁾ ELEまたはELEを含む食品について、毒性や有害事象はこれまで報告されておらず、SHR-ELE群の各ラットが計算上60.5 mg/kg/dayのGEAを7週間摂取していた本試験においても、毒性の事象は全く見られなかった。

本試験では、ELEの継続摂取がSHR大動脈において、AChに反応した内皮依存性の血管拡張機能の低下を抑制し、血中NO濃度を増加させ、血管中膜肥厚を抑制することを初めて確認した。よって、ELEは血管機能低下を抑制し、血管の健康維持に役立つ機能性素材として利用できる可能性が示唆された。

第 2 章 高脂肪食負荷ラットにおける杜仲葉エキスの抗動脈硬化作用

第 1 節 背景

循環器疾患の多くは、高血圧、糖尿病、脂質異常症、肥満などの生活習慣病や加齢に起因する動脈硬化の進展により発症することから、第 1 章では、加齢に伴い血管内皮機能が低下し、高血圧を発症する SHR において、ELE の抗動脈硬化作用を確認した。近年、内臓脂肪の蓄積を伴う肥満は、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病を誘発し、心血管疾患の危険因子が集積した状態を示すメタボリックシンドロームの主たる構成因子となることが報告されている。^{9,10)} 肥満は、アディポサイトカインの分泌異常を引き起こし、インスリン抵抗性や動脈硬化の発症および進展に関与している。^{46,47)} アディポサイトカインの 1 つであるアディポネクチンは、脂肪細胞から特異的に分泌される蛋白質で、抗動脈硬化作用、インスリン抵抗性や 2 型糖尿病の改善作用、心血管保護作用などの機能を有する。内臓脂肪の蓄積により、アディポネクチンの分泌量が低下した状態である低アディポネクチン血症は、2 型糖尿病や冠動脈疾患の危険因子である。¹²⁾ よって、アディポネクチンの分泌減少による生活習慣病を発症する前の早い段階で肥満を改善することは、動脈硬化のリスク低減につながる。

ELE は、HFD を 3 ヶ月摂取させメタボリックシンドロームを発症させた SD ラットにおいて、体重、白色脂肪組織 (WAT) 重量、血糖値、血中インスリン値、中性脂肪値およびコレステロール値を低下させ、さらにアディポサイトカインの分泌異常を改善させた。²⁵⁾ しかし、生活習慣病を発症する前の初期段階の肥満に対して、ELE がアディポサイトカインの分泌および動脈硬化の発症リスクの変化に与える影響は不明である。そこで、本研究では、30% (w/w) ラードを含有する HFD を与え、初期段階の肥満を呈した WKY において、ELE の継続摂取が体重、WAT 重量、血圧に与える影響を調べた。さらに、血圧および動脈硬化の発症に影響を与えることが知られているアデ

ィポサイトカインであるアディポネクチンおよびレプチンの血中濃度の変化を調べた。また、ELE の継続摂取が動脈硬化の発症に与える影響を検討するために、第 1 章と同様に、血管中膜肥厚を調べた。

第 2 節 実験方法

(1) 実験材料

被験物質の ELE は第 1 章第 2 節 (1) に準じた。

(2) 使用薬物

第 1 章第 2 節 (2) に準じた。

(3) 実験動物

6 週齢の WKY (24 匹) を日本エスエルシーから購入した。飼育は、温度 $23 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12 時間の条件下で行い、1 週間の予備飼育後、血圧及び体重を測定し、各群 8 匹の SBP および体重の平均値が等しくなるように群分けした。

(4) 投与方法

1 週間の予備飼育後、各群 8 匹ずつに分けた 7 週齢 WKY にそれぞれ、普通食 (ND) , ND に 30% (W/W) ラードを含む HFD および HFD に 5.0% ELE を含む HFD-ELE を 10 週間自由摂取させた。

(5) 体重、摂餌量、摂水量および内臓脂肪量の測定

体重は、試験動物を保定袋に入れて重量を測定した後、保定袋の重量を風袋引きして算出した。摂餌量および摂水量は、給餌・給水時の重量から測定時の重量を差し引いて算出した。体重、摂餌量および摂水量は毎週 2 回測定

した．内臓脂肪量（腸間膜脂肪，右腎臓周囲脂肪）は，投与期間終了後，エーテル麻酔下で放血死させた後，測定した．

(6) 血圧の測定

第 1 章第 2 節 (5) に準じた．

(7) 血管平滑筋アクチンの免疫組織化学染色と中膜肥厚の評価

第 1 章第 2 節 (8) に準じた．

(8) 血液生化学検査

投与期間終了後，第 1 章第 2 節 (7) と同様の方法で血漿サンプルを得て，測定まで -80°C 以下で冷凍保存した．血中インスリンは超高感度ラットインスリン測定キット（森永生科学研究所），アディポネクチンはマウス/ラットアディポネクチン酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）キット（大塚製薬），レプチン，グルコース，ヘモグロビン A1c (HbA1c)，遊離脂肪酸（NEFA），中性脂肪（TG）および総コレステロール（TC）は自動アナライザー（Hitachi7180：日立）を用いて測定した．

(9) 統計処理

全てのデータは平均値 \pm SE で表した．有意差検定は，Dunnett's test により行った．有意差水準は，危険率 5%未満 ($p<0.05$) を有意差ありとした．

第 3 節 結果

(1) 体重，摂餌量，摂水量および内臓脂肪量

各群の 10 週間における体重，摂餌量，摂水量および内臓脂肪量の変化を Table 2 に示す．HFD コントロール群および HFD-ELE 群の 1 日平均摂餌量

は、ND 群と比較して有意に低かった。しかし、HFD コントロール群と HFD-ELE 群では、1 日平均摂餌量に有意な差は見られなかった。1 日平均摂水量は、摂餌量と同様に HFD コントロール群および HFD-ELE 群は ND 群と比較して有意に低かったが、HFD コントロール群と HFD-ELE 群では有意な差が見られなかった。各群の摂餌量から 1 日平均摂取カロリーを算出し、各群で比較を行った結果、HFD コントロール群は ND 群よりも有意に高かったが、HFD コントロール群と HFD-ELE 群では有意な差が見られなかった。ND 群、HFD コントロール群および HFD-ELE 群で摂取開始時の平均体重に有意な差はなかったが (それぞれ、 196.4 ± 2.3 , 202.4 ± 3.2 , 204.6 ± 3.0 g), 投与期間終了後の体重および体重増加量において、HFD コントロール群は ND 群および HFD-ELE 群と比較して有意に増加していた。また、HFD コントロール群の腸間膜および腎臓周囲の内臓脂肪量は、ND 群よりも有意に高かった。しかし、HFD-ELE 群の内臓脂肪量は HFD コントロール群よりも有意に低かった。

Table 2. Rat body weight, white adipose tissue (WAT) weight and food intake during the 10-week study

Variables	ND	HFD-control	HFD-ELE
Food intake (g/day)	$18.5 \pm 0.5^{**}$	14.8 ± 0.4	13.9 ± 0.3
Water intake (ml/day)	$31.5 \pm 2.1^{**}$	24.5 ± 1.5	22.5 ± 0.7
Calorie intake (kcal/day)	$66.4 \pm 2.0^*$	75.0 ± 2.2	69.9 ± 1.6
Final body weight (g)	$391.3 \pm 10.2^{**}$	443.8 ± 8.2	$381.1 \pm 4.3^{**}$
Body weight gain (g)	$194.9 \pm 10.3^{**}$	241.4 ± 7.0	$176.6 \pm 3.0^{**}$
WAT (g/rat)			
Mesenteric vascular bed	$2.77 \pm 0.23^{**}$	5.09 ± 0.20	$3.60 \pm 0.20^{**}$
Perirenal	$0.41 \pm 0.03^{**}$	0.64 ± 0.05	$0.50 \pm 0.03^*$

All values represent the means \pm SE. (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as compared with the high-fat diet (HFD)-control group by Dunnett's test. ND, normal diet; ELE, Eucommia leaf extract.

(2) 血圧

各群の10週間におけるSBPの変化をFig. 8に示す。投与開始時、3群間のSBPに差は見られなかったが、HFDコントロール群のSBPが、試験開始2週間後の9週齢にはND群に対して有意に増加し、試験終了時の17週齢まで有意に高い状態が続いた。よって、HFD負荷によりWKYにおいて血圧の上昇が引き起こされ、軽度の高血圧を発症していることが認められた。一方、HFD-ELE群のSBPは、10週齢から17週齢の期間でHFDコントロール群に対して有意に低く、ND群に対しては摂取期間中で有意な差は認められなかった。

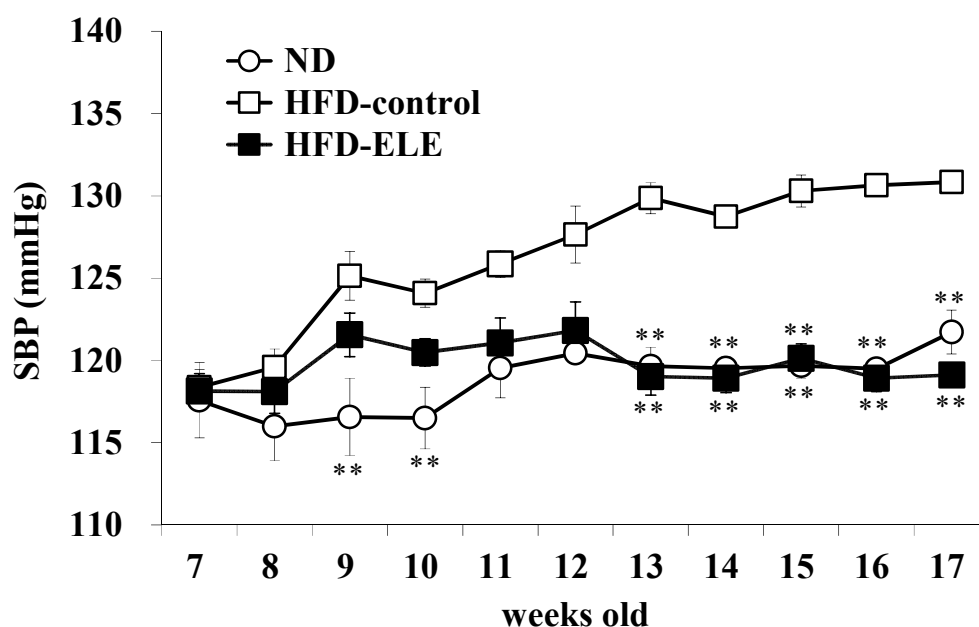


Fig. 8. Systolic blood pressure (SBP) in rats receiving a normal diet (ND), a high-fat diet (HFD) (HFD-control) or a HFD containing Eucommia leaf extract (HFD-ELE) over the 10-week study period, when the animals were 7-17 weeks old

All values represent the means \pm SE. (n=8). ** p <0.01, as compared with the HFD-control group by Dunnett's test.

(3) 血管中膜の厚さ

ELE の継続摂取が肥満状態の血管形態変化に与える影響を評価するために、胸部大動脈の血管中膜の厚さを血管平滑筋 SMA の免疫組織化学染色により形態計測した。血管中膜の厚さを血管平滑筋 SMA の免疫組織化学染色により形態計測した結果を Fig. 9 および Fig. 10 に示す。ND 群および HFD-ELE 群の VSMC は整列した状態であったが、HFD コントロール群の VSMC は不規則に整列しており、中膜肥厚が認められた (Fig. 9, #2)。血管中膜の厚さを測定した結果、HFD コントロール群は、ND 群および HFD-ELE 群よりも有意に高かった (それぞれ、 114.4 ± 4.0 , 82.6 ± 3.3 および $98.8 \pm 4.6 \mu\text{m}$)。また、HFD-ELE 群の血管中膜の厚さは、ND 群よりも有意に低かった。

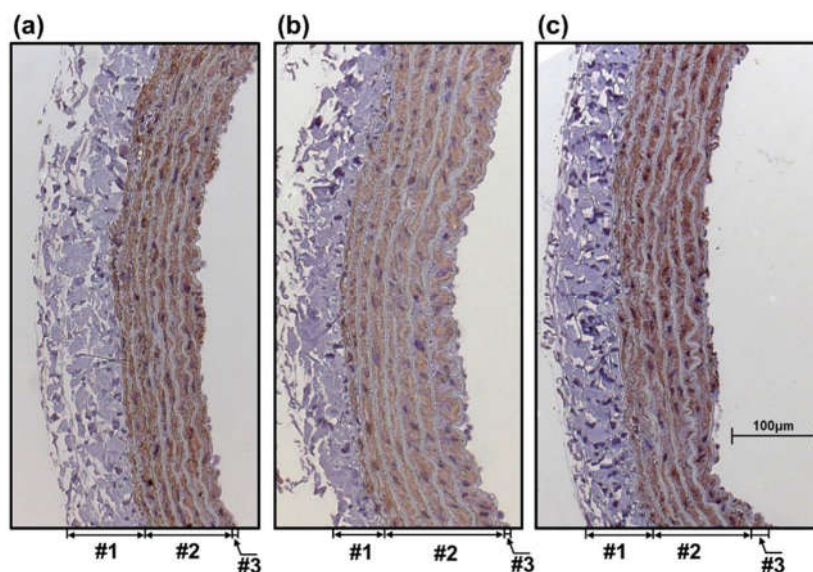


Fig. 9. Immunohistochemical visualization of the medial thickness of the thoracic aorta from rats that received (a) a normal diet (ND), (b) a high-fat diet (HFD) (HFD-control), or (c) a HFD with Eucommia leaf extract (HFD-ELE)

#1: adventitia; #2: media; #3: intima; scale bar = 100 μm .

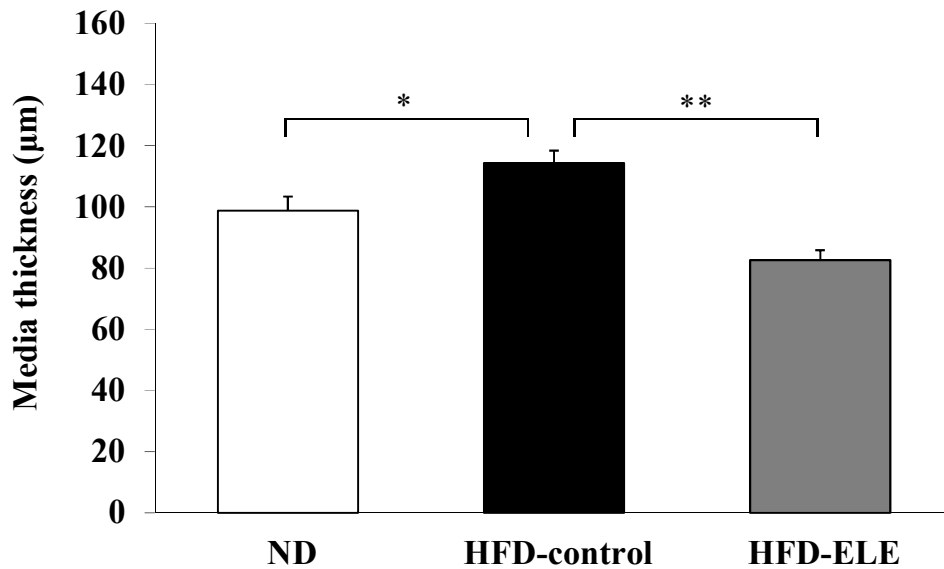


Fig. 10. Thoracic aortic ring medial thickness in rats that received a normal diet (ND), a high-fat diet (HFD) (HFD-control), or a HFD with Eucommia leaf extract (HFD-ELE)

The values represent the means \pm SE. (n=8). * p <0.05, ** p <0.01, as compared with the HFD-control group by Dunnett's test.

(4) 血液生化学検査

投与期間終了後，採血した血液の生化学的分析の結果を Table 3 に示す。糖代謝マーカーである血糖値，インスリンおよび HbA1c は，各群間で有意な差は見られなかった。血中の NEFA，TG および TC についても，同様に各群間で有意な差はなかった。アディポサイトカインの分析結果は，Fig. 11 にも示した。HFD-ELE 群のアディポネクチンは，ND 群および HFD コントロール群よりも有意に増加した（それぞれ， 4.8 ± 0.3 ， 3.5 ± 0.4 および 3.8 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ）。レプチンは，ND 群に対して HFD コントロール群および HFD-ELE 群で有意に増加した（それぞれ， 1.9 ± 0.4 ， 2.7 ± 0.6 ， 2.4 ± 0.4 ng/ml ）。アディポネクチン/レプチン比は，ND 群に対して HFD コントロール群で有意に低下し，HFD コントロール群に対して HFD-ELE 群で有意に増加した。

Table 3. Blood components in rats that received a normal diet (ND), a high-fat diet (HFD) (HFD-control), or a HFD-Eucommia leaf extract (HFD-ELE) at the end of the experimental period

Variables	ND	HFD-control	HFD-ELE
Glucose (mg/dL)	162.9±71.0	128.1±16.7	114.0±23.7
Insulin (ng/mL)	0.5±0.3	0.7±0.3	0.7±0.3
HbA1c (%)	4.2±0.2	4.1±0.1	4.1±0.2
NEFA (μEq/L)	667.3±308.5	710.1±274.1	741.4±157.5
TG (mg/dL)	29.1±9.6	38.4±7.7	36.0±12.5
TC (mg/dL)	119.3±9.8	116.1±7.4	114.3±8.5
Adiponectin (μg/mL)	3.5±0.4	3.8±0.2	4.8±0.3**
Leptin (ng/mL)	1.9±0.4**	2.7±0.6	2.4±0.4
Adiponectin/leptin ratio	1.9±0.2	1.5±0.1	2.1±0.2*

All values represent the means ± SE. (n=8). * p <0.05, ** p <0.01, as compared with the HFD-control group by Dunnett's test.

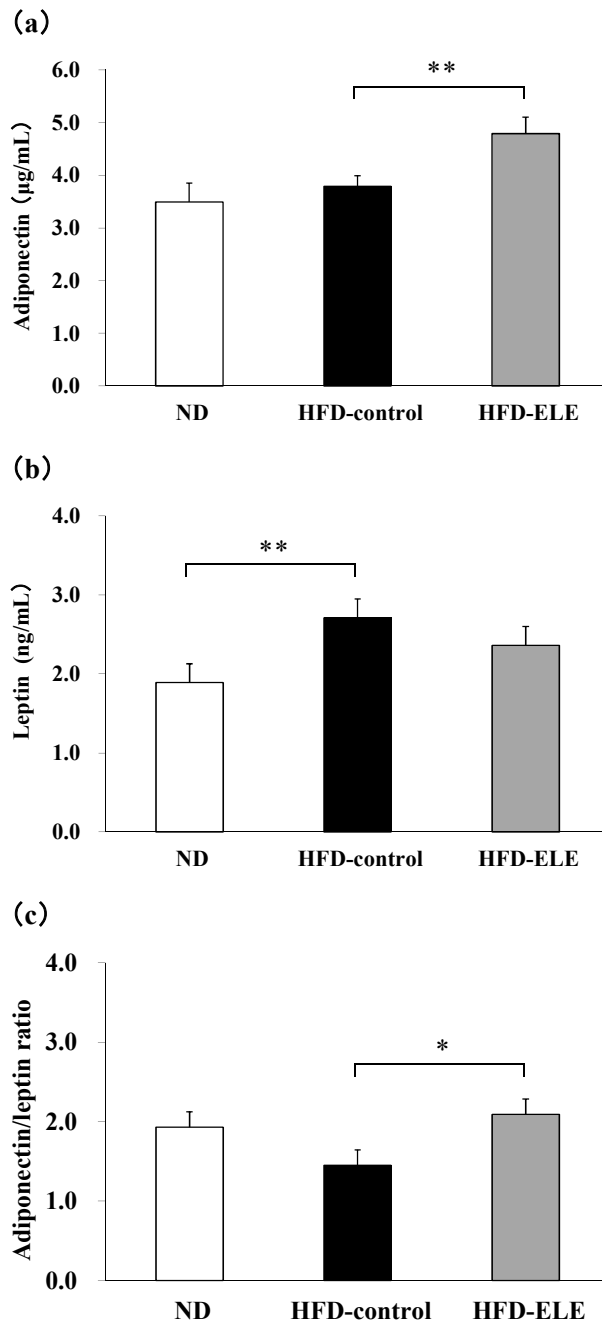


Fig. 11. Plasma levels of (a) adiponectin and (b) leptin, and (c) leptin/adiponectin ratio in rats that received a normal diet (ND), a high-fat diet (HFD)-control, and a HFD-Eucommia leaf extract (ELE) at the end of the experimental period

The values represent the means \pm SE. (n=8). * p <0.05, ** p <0.01, as compared with the HFD-control group by Dunnett's test.

第4節 考察

本研究では、HFD 負荷により初期段階の肥満を呈した WKY に ELE を継続摂取させ、体重、内臓脂肪量、血圧、血中アディポサイトカイン濃度および中膜肥厚に与える影響を検討した。HFD コントロール群の体重、内臓脂肪量および血圧は、ND 群と比較して有意に上昇した。一方、血中の糖代謝マーカーおよび血中脂質値については、2 群間で有意な差は見られなかったことから、HFD コントロール群は、インスリン抵抗性および脂質異常症を呈していない初期の肥満状態であると考えられる。ELE の抗肥満効果については、HFD を負荷し、メタボリックシンドロームを発症させたラットを用いた試験で既に確認されているが、^{25,26)} 初期の肥満状態を示したラットにおいても同様に抗肥満効果を示すことを確認した。

HFD コントロール群では、ND 群と比較して、血圧、血中レプチン濃度、血管中膜肥厚が有意に増加した。レプチンは、交感神経を活性化し、血圧を上昇させることから、^{48,49)} 血中レプチンの増加が、HFD コントロール群の SBP の上昇に影響している可能性がある。さらに、レプチンは VSMC の増殖、血管リモデリングおよび血管の肥大化を促進することから、⁵⁰⁾ HFD コントロール群で有意な中膜肥厚が認められたと考えられる。しかし、HFD-ELE 群では HFD コントロール群と同様にレプチン濃度が上昇しているにも関わらず、SBP および血管中膜肥厚が、HFD コントロール群と比較して有意に低下していた。これには、ELE の血管内皮依存性の血管拡張作用による降圧作用²⁹⁾ と、それに伴う血管への負荷の低減が関係している可能性も考えられるが、HFD-ELE 群の血中アディポネクチン濃度が HFD コントロール群に対して有意に増加したことも影響していると考えられる。

アディポネクチンは、レプチンと同様に脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインであり、脂肪酸の代謝、NO 依存性の血管拡張、平滑筋細胞の増殖抑制を促進する作用を有し、インスリン抵抗性や2型糖尿病の改善作用、

抗動脈硬化作用を示す。^{12,51,52)} よって、HFD-ELE 群では、血中アディポネクチン濃度が増加したことにより、HFD 負荷に起因する SBP の上昇および血管中膜肥厚が抑制されたことが推測される。さらに、HFD-ELE 群の血管中膜肥厚は ND 群よりも有意に低いことから、増加したアディポネクチンによって、加齢に伴う中膜肥厚も抑制されたと考えられる。本研究により、ELE が生活習慣病による動脈硬化の発症リスクを低減するだけでなく、加齢による動脈硬化の発症リスクも低減する可能性が考えられ、ELE の機能性食品としてのさらなる価値が示唆された。

アディポネクチンは動脈硬化のマーカーとして利用されており、⁵³⁾ 低値になると、動脈硬化のリスクが増加することが報告されている。⁴⁶⁾ レプチンは全身性の動脈硬化との相関が報告されており、⁵⁴⁾ 血中濃度が増加することで動脈硬化のリスクが増加する。それゆえ、アディポネクチンとレプチンの濃度比が、2 型糖尿病を伴う肥満患者においてアテローム性動脈硬化の指標となること、⁵⁵⁾ アディポネクチン/レプチン比が、将来の循環器疾患の予測マーカーになることが報告されている。⁵⁶⁾ 初期段階の肥満状態でも、動脈硬化は進展することが報告されており、⁵⁷⁾ 本試験の HFD 負荷ラットにおいても動脈硬化の進展を確認することができた。本試験では、初期段階の肥満状態でも ELE がアディポネクチンを増加させ、血管中膜肥厚を抑制することを確認できたことから、ELE の抗動脈硬化作用を示唆する。

本試験では、ELE の継続摂取が、インスリン抵抗性や脂質異常症を伴わない初期段階の肥満を呈した WKY に対して、降圧作用、抗肥満作用、中膜肥厚抑制作用、血中アディポネクチン濃度およびアディポネクチン/レプチン比の増加作用を示すことを初めて確認した。初期段階の肥満であっても、自覚症状がないまま動脈硬化は進展する。そのため、ELE の継続摂取により、初期の肥満状態の改善に加えて、動脈硬化の発症リスクの低減が図れることは非常に有益であると考えられる。以上の結果から、疾病に罹患する前から

ELE を継続摂取しておくことで，初期の肥満を改善し，血中アディポネクチンを増加させ，動脈硬化の発症リスクを低減できる可能性が示唆された．

第3章 杜仲葉エキスの血管機能低下抑制作用の機序

第1節 背景

第1章では、ELEの継続摂取がSHR大動脈において、AChに反応した内皮依存性の血管拡張機能の低下を抑制し、血中NO濃度を増加させ、血管中膜肥厚を抑制することを確認した。

第2章では、ELEの継続摂取が、インスリン抵抗性や脂質異常症を伴わない初期段階の肥満を呈したWKYに対して、降圧作用、抗肥満作用、中膜肥厚抑制作用、血中アディポネクチン濃度およびアディポネクチン/レプチン比の増加作用を示すことを確認した。

本研究では、ELEの血管機能低下抑制作用および抗動脈硬化作用の機序を明らかにするために、ELEの主要成分であり降圧作用の関与成分であることが知られているGEA (Fig. 12) の作用を検討した。GEAは、SHRに静脈注射した時の降圧作用が確認され、その降圧作用は、正常ラットであるWKYでは見られず、SHRで顕著に認められることが報告されている。¹⁵⁾ また、ヒト試験では、正常高値血圧者および軽症高血圧者を対象とした二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験において、GEAを85mg含むELE配合食品の降圧作用が確認されている。³⁰⁾ このGEAの作用を調べることで、ELEの作用機序を検討することとした。

クチナシ (*Gardenia jasminoides* J.Ellis) の乾燥果実であるサンシシ (山梔子) およびオオバコ (*Plantago asiatica* L.) の花期の全草を乾燥したシャゼンソウ (車前草) は、生薬として利用されており、主要成分としてGEAを含有している。⁶⁰⁾ クチナシの果実は、降圧作用および脳での抗血栓作用を有することが報告されており、オオバコハーブは、環状アデノシンーリン酸 (cAMP) ホスホジエ

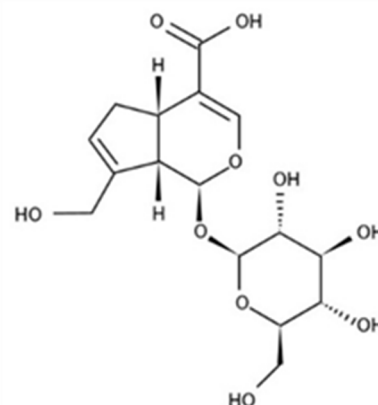


Fig. 12. Geniposidic acid

ステラーゼを阻害することによる降圧作用，抗菌作用，抗炎症性作用および抗アレルギー作用および鎮痛作用が報告されている。⁶¹⁾ しかし，これらの生薬に含まれる GEA の有効性については，*in vitro* 試験による報告が多い。HFD 負荷によりアテローム性動脈硬化を発症させたウサギに GEA の反復投与を行った試験では，血管内膜に浸潤した泡沫細胞数の減少，平滑筋細胞の増殖抑制，アテローム性動脈硬化の改善が認められ，GEA の抗炎症作用および血管保護作用が報告されている。⁶²⁾ しかし，GEA の血管に対する有効性については，十分に解明されていない。

伝統的な薬用植物には，作用が緩やかで副作用が少ないものが多くあり，それらは生体調節物質の分泌に間接的に影響を与えている可能性が考えられる。生体調節物質の 1 つである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は，Kangawa らによって初めて単離同定された 28 個のアミノ酸よりなるペプチドホルモンである。⁶³⁾ ANP は主に心房細胞から分泌され，身体の様々な臓器に発現している A 型ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR-A) に結合し，環状グアノシンーリン酸 (cGMP) をセカンドメッセンジャーとした血管拡張作用，利尿作用，血管平滑筋の増殖抑制作用，アディポネクチン分泌促進作用，心肥大抑制作用，交感神経抑制作用など様々な生理作用を示す。⁶⁴⁻⁶⁶⁾ 心臓前負荷が著しく増加する急性心不全では，血中 ANP 濃度が顕著に増加するが，これは ANP の血管拡張作用および利尿作用により，心臓の負荷を低下させようとする生体反応であると考えられている。日本では，ANP がヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (hANP) 製剤として臨床応用され，1995 年に急性心不全治療薬として承認されている。⁶⁵⁾

ANP は心房細胞の顆粒に貯留されており，体液量の上昇などに伴う心房筋の伸展刺激に応答して分泌される。一方，その分泌機序とは別に，Kim らはグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体 (GLP-1R) のアゴニストによっても，ANP が分泌されることを報告した (Fig. 13)。⁶⁷⁾ GLP-1R アゴニストは，

GLP-1R を介して降圧効果や抗肥満効果を示すことが報告されている。それらの効果に心房細胞の GLP-1R を介して分泌された ANP が関与していることが、初めて明らかにされた。GLP-1R は、膵臓、心臓、血管、脳、肺、肝臓、胃など様々な臓器で発現しており、^{68,69)} GLP-1R を介した生理作用が近年盛んに研究されている。その 1 つとして、ラット脊髄の GLP-1R がホルマリンにより誘導した慢性疼痛の軽減に関与しており、その GLP-1R の活性化評価試験において、GEA を含むゲニポシド類縁体が GLP-1R に作用することが報告された。⁷⁰⁾ これまで ELE で報告されている降圧作用、¹⁹⁾ 利尿作用、²⁰⁾ 中膜肥厚抑制、⁵⁸⁾ などの循環器への作用は、上述の ANP の作用と類似している点が多い。そこで、本研究では GEA が GLP-1R アゴニストとして作用し、ANP の分泌に関与している仮説を立てた。本研究では、SHR において GEA の単回経口投与が SBP に与える影響を検討し、最も降圧作用が見られる投与量および投与後の時間を調べた。さらに、その投与量で GEA の単回経口投与を行った場合の SBP、心拍数 (HR)、血中 ANP 濃度および血中 GLP-1 濃度の変化を調べ、GEA の血管に対する作用機序を検討した。

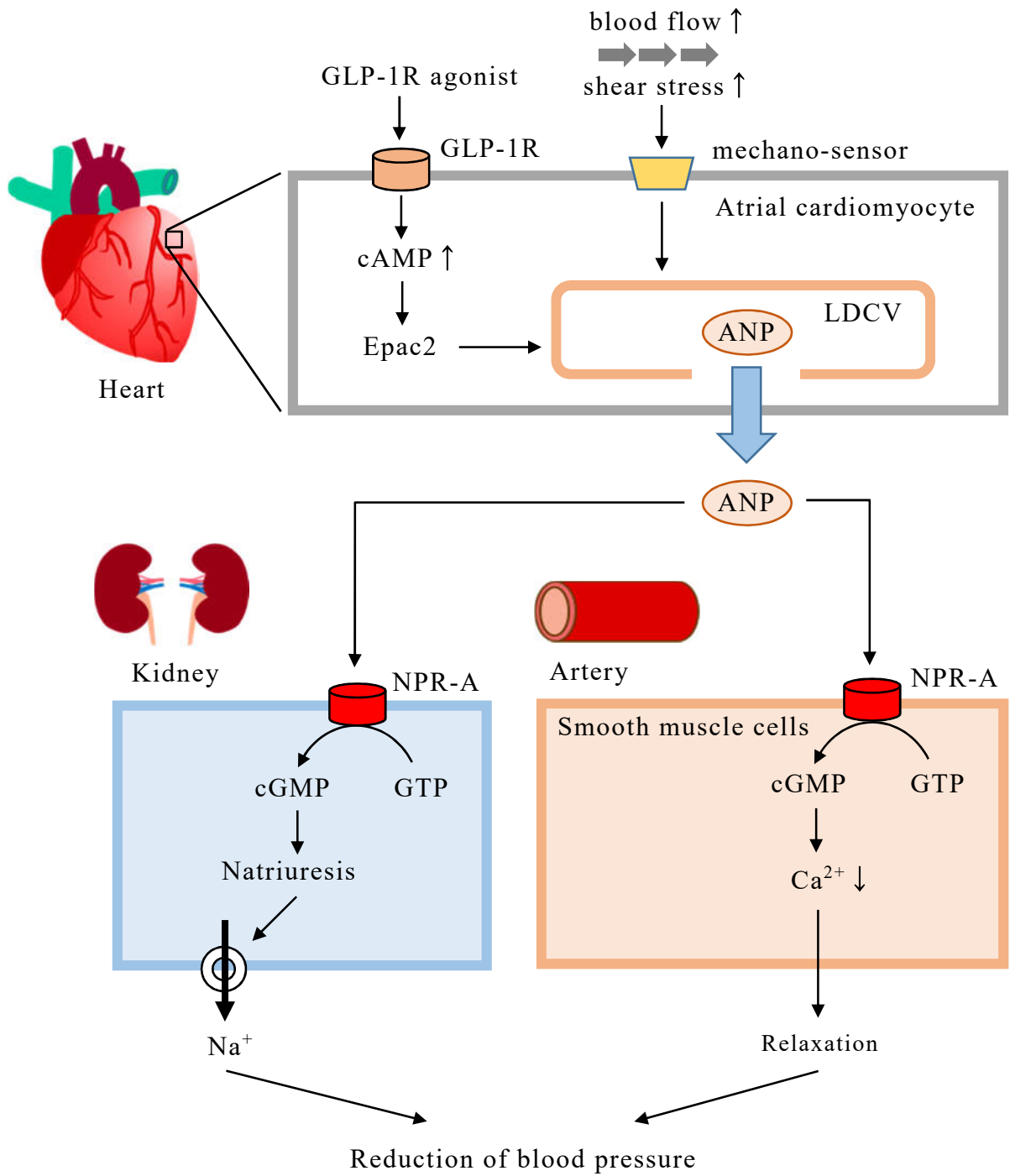


Fig. 13. Mechanism of atrial natriuretic peptide (ANP) secretion from the atrium

(引用文献 67 より作図)

第 2 節 実験方法

(1) 実験材料

杜仲葉を熱水抽出し、製したエキスを Diaion HP20 にて分画された H₂O 画分の一部 (700 g) を MCI gel CHP 20P (H₂O, MeOH) に付し、Daisogel SP-120-40/60 ODS-B (50%MeOH) で精製し GEA (86.0 g, 純度 98.9%) を得た。

(2) 使用薬物

各試薬は次のものを使用した。イソフルラン、アプロチニン (和光純薬工業)。

(3) 実験動物

15 週齢の SHR (SHR/NCr1Cr1j, 24 匹) を日本チャールス・リバーから購入した。飼育は、温度 $23 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12 時間の条件下で行い、1 週間の予備飼育後、実験に使用した。

(4) 投与方法

GEA の至適投与量と ANP および GLP-1 の血中濃度の測定ポイントを検討するために、GEA の用量設定試験を行った。1 週間の予備飼育後、各群 6 匹ずつに分けた 16 週齢 SHR に、GEA の投与量がそれぞれ、10, 50 および 100 mg/kg 体重になるように、SHR の体重および精製した GEA の純度から算出した至適濃度の GEA 溶液を調製し経口投与した。コントロールは、純水のみを投与した。ANP および GLP-1 の血中濃度の測定は、最も降圧作用が見られた GEA 100 mg/kg の投与時に行い、GEA 投与による影響をコントロールと比較した。

(5) 血圧および心拍数の測定

SBP および HR は、第 1 章第 2 節 (5) と同様にテールカフ法により測定した。GEA の用量設定試験では、経口投与直前および投与 3, 6, 9 および 24 時間後に SBP を測定した。次に、最も降圧作用が見られた GEA 100 mg/kg の投与時には、投与 6 時間後に SBP および HR を測定した。

(6) 血中 GEA 濃度の測定

GEA (100 mg/kg) の経口投与 6 時間後に、SBP および HR を測定した後、ラットを 2% イソフルランで麻酔し、腹部大動脈から採血した。血液を 10% EDTA-2K 抗凝固剤およびアプロチニンを含むチューブに移し混和した後、遠心分離 (1,000g, 4°C, 15 分間) を行い、得られた上清を血漿サンプルとして、測定まで -80°C 以下で冷凍保存した。血漿 300 μ L とメタノール/アセトニトリル混合溶媒 (1:1) 900 μ L をマイクロチューブに添加し、30 秒間攪拌後、遠心分離 (12,000rpm, 4°C, 10 分) を行い、得られた上清を測定に用いた。血中 GEA 濃度は、LC-MS を用いて測定した。分析条件は、カラムが Chemcobond 5-ODS-W, 4.6 mm \times 300 mm (Chemco Plus Scientific Co., Ltd) を使用、移動相が (A) 0.01% ギ酸含有水 / (B) 0.01% ギ酸含有メタノール、グラジエントが 0% (0 \rightarrow 5 分), 0 \rightarrow 50% (B) (5 \rightarrow 35 分), カラム温度が 40°C, 流速が 0.5 mL/min, 検出波長が 245nm とした。MS でのイオン化・イオン検出は、ESI (+) の SIR モード, キャピラリー電圧は 3.5 kV, ソース温度は 120°C, デソルベーション温度は 350°C, N₂ ガス流量 (コーン) は 50 L/hr, N₂ ガス流量 (デソルベーション) は 600 L/hr, コーン電圧は 26 V とした。SIR モードでは、ナトリウム付加型分子に由来する m/z 397.06 を指定した。分析は標準添加法で行った。

(7) 血中 ANP 濃度の測定

血中 ANP 濃度の測定は、サンドイッチ化学発光酵素免疫測定法⁷⁹⁾により

行った．国立循環器病研究センターより供与された測定キット類および SpectraMax L ルミノメーター (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて，血漿中の ANP 濃度を測定した．一次抗体であるラット/マウス α -ANP ポリクローナル抗体が固相化されたマイクロプレートの各ウェルに，洗浄液 350 μ L を添加し，3 回洗浄を行った．内容物を除去した後，各ウェルに Assay Buffer 50 μ L を添加し，さらに検量線用の標準溶液および血漿サンプルを所定のウェルに 50 μ L 添加した．マイクロプレートをシールし，4°C で 24 時間，振盪しながら反応させた．次に内容物を除去し，各ウェルに洗浄液 350 μ L を添加し，3 回洗浄を行った．洗浄液を除去した後，各ウェルに二次抗体溶液 (アルカリホスファターゼ標識 Fab' 溶液) を 100 μ L ずつ添加し，マイクロプレートをシールして室温で 1 時間，振盪しながら反応させた．内容物を除去した後，各ウェルに洗浄液 350 μ L を添加し，4 回洗浄を行った．洗浄液を除去した後，各ウェルに発光基質溶液を 100 μ L ずつ添加し，室温で 20 分間静置し発光させた．最後に SpectraMax L ルミノメーターを用いて 527 nm の発光度を測定し，測定値から Blank 値を差し引き，標準試料を使用して作成した検量線より，血漿中の ANP 濃度を算出した．

(8) 血中 GLP-1 濃度の測定

血中 GLP-1 濃度は，ラット GLP-1 ELISA キット (和光純薬工業) を用いて測定した．血中 GLP-1 濃度は，血漿中の活性型 GLP-1 および不活性型 GLP-1 を含めた総 GLP-1 濃度として測定した．マルチプレートリーダー (SPARK 10M, テカン) を用いて，490 nm の発光度を測定し，測定値から Blank 値を差し引き，標準試料を使用して作成した検量線より，血漿中の GLP-1 濃度を算出した．

(9) 統計処理

全てのデータは平均値±SE で表した。有意差検定は、2 群間の比較を Student's t-test により行い、多重比較を Dunnett's test により行った。有意差水準は、危険率 5%未満 ($p<0.05$) を有意差ありとした。

第 3 節 結果

(1) ゲニポシド酸の単回経口投与試験

GEA の単回経口投与試験の結果を Fig. 14 に示す。GEA 投与前の SBP から経口投与 3, 6, 9 および 24 時間後の SBP の変化量を調べた結果、投与 6 時間後、コントロール群では SBP の変化が見られなかったが、GEA 50 および 100 mg/kg 群では SBP の変化量が、用量依存的にコントロール群と比較して有意に低下した。投与前の SBP は、コントロール群、GEA 50 および 100 mg/kg 群で、それぞれ、 196.3 ± 5.6 , 204.1 ± 6.4 , および 203.2 ± 2.0 mmHg であったが、投与 6 時間後には、GEA 50 および 100 mg/kg 体重群の SBP がコントロール群と比較して有意に低下した (それぞれ、 166.6 ± 2.6 , 153.0 ± 2.7 , および 183.6 ± 7.2 mmHg) 。

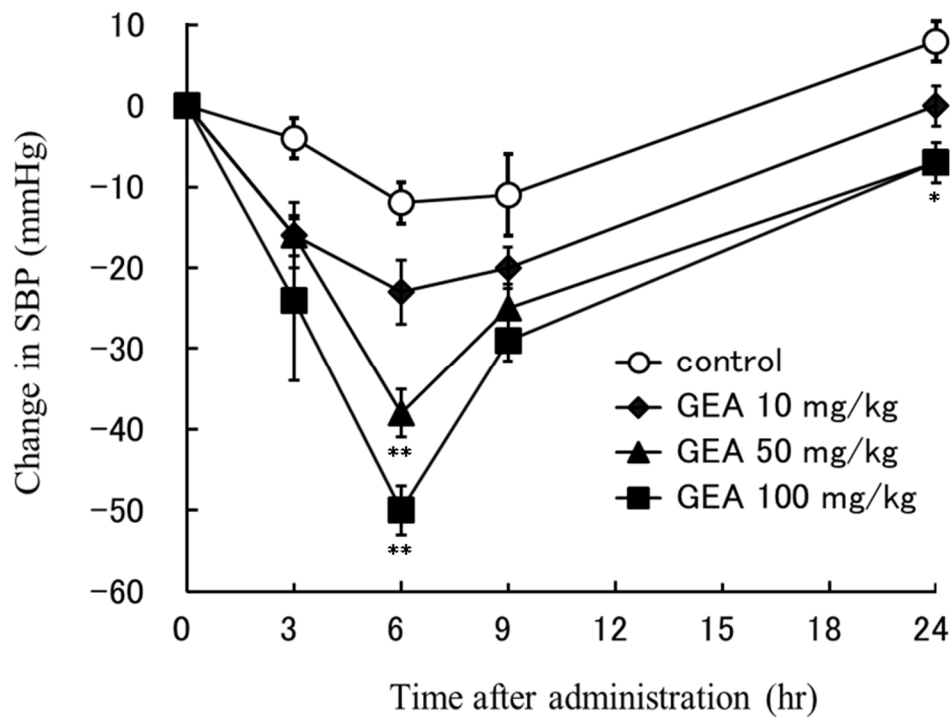


Fig. 14. Changes in the systolic blood pressure (SBP) of 16-week-old spontaneously hypertensive rats following a single oral administration of the indicated dose of geniposidic acid (GEA) or purified water (control)

The values represent the means \pm SE. (n=6). * p <0.05, ** p <0.01, compared with the control group by Dunnett's test.

(2) ゲニポシド酸の血中 ANP 濃度に与える影響

GEA の単回経口投与試験において、最も降圧作用が見られた 100 mg/kg の投与量で再度、GEA を経口投与し、投与 6 時間後の SBP, HR, 血中 GEA, ANP および GLP-1 濃度の変化を調べた (Fig. 15) . GEA 投与群の SBP は、コントロール群よりも有意に低下した (それぞれ, -26.0 ± 4.1 , -9.5 ± 3.1 mmHg) . HR についても同様に、GEA 投与群はコントロール群よりも有意に低下した (それぞれ, -16.1 ± 2.9 , -0.8 ± 4.6 mmHg) . GEA 投与群の血中 GEA 濃度は、 147.9 ± 16.4 nM であったが、コントロール群では血中 GEA は検出されなかった. 血中 ANP 濃度については、コントロール群と比較して、GEA 投与群で有意な増加が認められた (それぞれ, 46.2 ± 5.3 , 69.4 ± 5.2 pM) . 血中 GLP-1 濃度は、2 群間で有意な差はなかった.

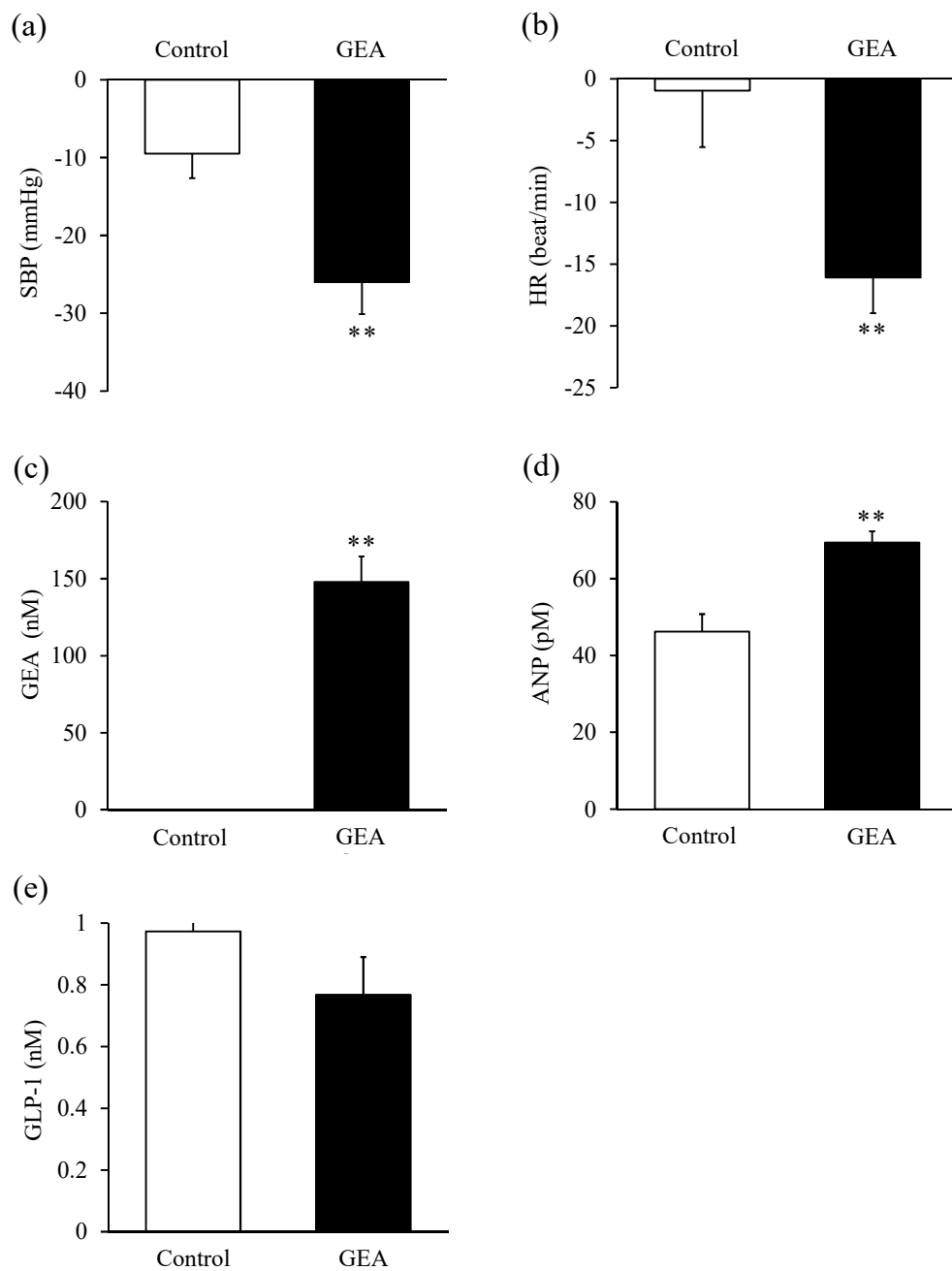


Fig. 15. (a) Systolic blood pressure (SBP), (b) heart rate (HR), and plasma levels of (c) geniposidic acid (GEA), (d) atrial natriuretic peptide (ANP) and (e) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) at 6h after GEA oral administration in spontaneously hypertensive rats (SHR)

The values represent the means \pm SE. (n=6). ** $p < 0.01$, as compared with the control group by Student's t-test.

第4節 考察

本研究では GEA が GLP-1R アゴニストとして作用し、ANP の分泌に関与している仮説を立て、SHR に GEA を単回経口投与した時の SBP, HR, 血中 ANP 濃度, 血中 GLP-1 濃度に与える影響について検討した。GEA をそれぞれ、10, 50 および 100 mg/kg 体重になるように経口投与し、投与後 3, 6, 9 および 24 時間後の血圧の変化を調べた。投与 6 時間後、コントロール群では SBP の変化が見られなかったが、GEA 50 mg/kg 群および 100 mg/kg 群では SBP の変化量が、用量依存的にコントロール群と比較して有意に低下した。GEA 100 mg/kg 群で最大の降圧作用を示したことから、GEA の至適投与量を 100 mg/kg とし、投与 6 時間後の SBP, HR, 血中 GEA, ANP および血中 GLP-1 濃度の変化を調べた。結果は、GEA 投与群で SBP および HR が有意に低下し、血中 ANP 濃度が有意に増加した。

ANP は血管平滑筋の NPR-A に作用し、cGMP を増加させ血管平滑筋を弛緩させることから、^{64,65)} 増加した ANP が GEA 摂取による血圧低下に関与していることが考えられた。SHR に 1 週間のうち 5 日間、1 時間の水泳をさせ、8 週間飼育後の血圧や血中 ANP 濃度を調べた研究が報告されている。⁷¹⁾ 水泳をしないコントロール SHR 群の血中 ANP 濃度が 120 pg/ml 程度であったのに対して、水泳をした SHR 群は 240 pg/ml 程度で有意に増加していた。また、水泳をした SHR 群の SBP は、コントロール SHR 群よりも有意に低下していた。一方、今回の試験では、GEA 単回経口投与時の血中 ANP 濃度がコントロール群で 46.2 pM (141.5 pg/ml) , GEA 投与群で 69.4 pM (212.5 pg/ml) で、GEA 群の SBP は、コントロール群よりも有意に低下していた。上述の水泳をした SHR と今回の試験で GEA を単回経口投与した SHR では、血中 ANP 濃度の増加が同程度で、どちらも降圧作用が見られることから、GEA による降圧作用には、血中 ANP 濃度の増加が関与していると考えられる。HR については、SHR および SD ラットに GEA を静脈注射し、15 分後の HR に

有意な変化がなかったことが報告されている。¹⁵⁾ 一方、本試験では、GEAの単回経口摂取の6時間後に、HRが低下していることが確認された。上述の2つの試験は、GEAの投与方法、投与量および投与後の測定時間が大きく異なることから、GEAの摂取がHRに与える影響については、今後も更なる検証が必要であると考えられる。

ラットにおいて GEA は薬物動態が分析され、経時的な血中濃度の変化が報告されている。^{72,73)} また、イリドイド配糖体は、アグリコンになると不安定で急速に青～紫色になることが報告されている。⁷⁴⁾ よって、GEA は経口投与後、吸収され安定した状態で血中に移行していると考えられる。本研究では、ANP の分泌が増加した時に、GEA が血中に存在していることを確認した。Gong らは、*in vitro* および *in vivo* 試験で、いくつかのイリドイド配糖体について GLP-1R に対する親和性を調べ、GLP-1R アゴニストである Exenatide および GLP-1R アンタゴニストである Exendin (9-39) (EA) を用いた試験との比較により、GEA が GLP-1R アゴニストとして作用する可能性を報告している。⁷⁰⁾ また、GEA はラットおよびヒト GLP-1R に対してアロステリック部位に結合する新規のアゴニストであり、EA と同じ結合部位に作用する可能性が示されている。GLP-1R アゴニストは降圧作用を示すことが知られていたが、その機序の詳細は不明であった。しかし、2013年に Kim らは、はじめて GLP-1 による血管平滑筋の弛緩に ANP が必要であることを証明した。⁶⁷⁾ Liraglutide のような GLP-1R アゴニストが心房細胞の GLP-1R に作用すると、cAMP が増加し、これにより Epac2 が有芯小胞 (LDCV) の膜へ移動し、LDCV から ANP が分泌させる (Fig. 16)。血中に放出された ANP は、血管平滑筋の受容体に作用すると、cGMP を介して血管平滑筋を弛緩させ、血圧を低下させる。本試験では、コントロール群と GEA 投与群の血中 GLP-1 濃度に差が認められなかったことから、GEA は Liraglutide のような GLP-1R アゴニストと同様に、GLP-1R に作用し ANP の分泌を増加させたこ

とが考えられる。GEA の GLP-1R アゴニスト作用を確認するために、5 週齢 SHR に GEA のみおよび GLP-1R アンタゴニストである EA を GEA と一緒に静脈注射した場合の血圧に与える影響を調べた。その結果、GEA 投与群では、投与 20 分後に血圧が有意に低下したが、EA を同時に投与した群 (EA 群) では血圧が低下せず、GEA による降圧作用が消失していた (unpublished)。また、GEA 投与群では、投与 10 分後に血中 ANP が有意に増加したが、EA 群ではその増加が見られなかった。以上の結果から、GEA は GLP-1R に作用し ANP の分泌を増加させることが示唆された。

ANP は、血管平滑筋の NPR-A に作用し降圧作用を示すが、血管内皮細胞の C 型ナトリウム利尿ペプチド受容体 (NPR-C) に作用し、eNOS を活性化することで NO 産生を増加させることが報告されている。⁷⁵⁾ よって、第 1 章の SHR において、ELE の継続摂取が血中 NO 濃度を増加させたことは、GEA により増加した ANP の作用が関与している可能性がある。また、ANP は血管平滑筋の増殖抑制作用を有するため^{66,76)}、第 1 章の SHR および第 2 章の HFD 負荷 WKY において確認された ELE 摂取による中膜肥厚抑制作用は、GEA により増加した ANP が関与していると考えられる。さらに、ANP は、アディポネクチン分泌促進作用を有することから⁶⁶⁾、HFD 負荷 WKY において確認された ELE 摂取による血中アディポネクチン濃度の増加は、同様に ANP の増加が関与していると考えられる。以上のことより、第 1 章の SHR および第 2 章の HFD 負荷 WKY において確認された ELE 摂取による血管機能低下抑制作用および抗動脈硬化作用は、ELE に含有される GEA により ANP の分泌が増加したことによる作用であると考えられる。

Liraglutide, Exenatide, Lixisenatide などの GLP-1R アゴニストは、2 型糖尿病の治療薬として開発されている。これらの GLP-1R アゴニストは、高血糖、高血圧、体重を改善する。^{77,78)} これらの医薬品はペプチドホルモンであるため経口摂取には適さないため、何れも注射薬として使用されている。し

かし、日々の食生活の中で、GLP-1R アゴニストを天然食品や食品原料として経口摂取できれば、循環器疾患のリスクを低減する上で非常に有益である。

GEA は様々な *in vivo* 試験において、高い生理活性を示すことが少なかったため、薬用植物原料の中では、これまであまり注目はされていなかった。しかし、本研究により、長い食経験がありかつ特定保健用食品としても安全性が確認されている ELE の主要成分である GEA が、安全な GLP-1R アゴニストとして利用できることが示唆された。以上のことから、GEA を含む ELE は、血管機能低下を抑制し、血管中膜肥厚を含めた動脈硬化の発症リスクを低減することで、血管の健康維持に役立つ機能性素材として利用できることが示唆された。

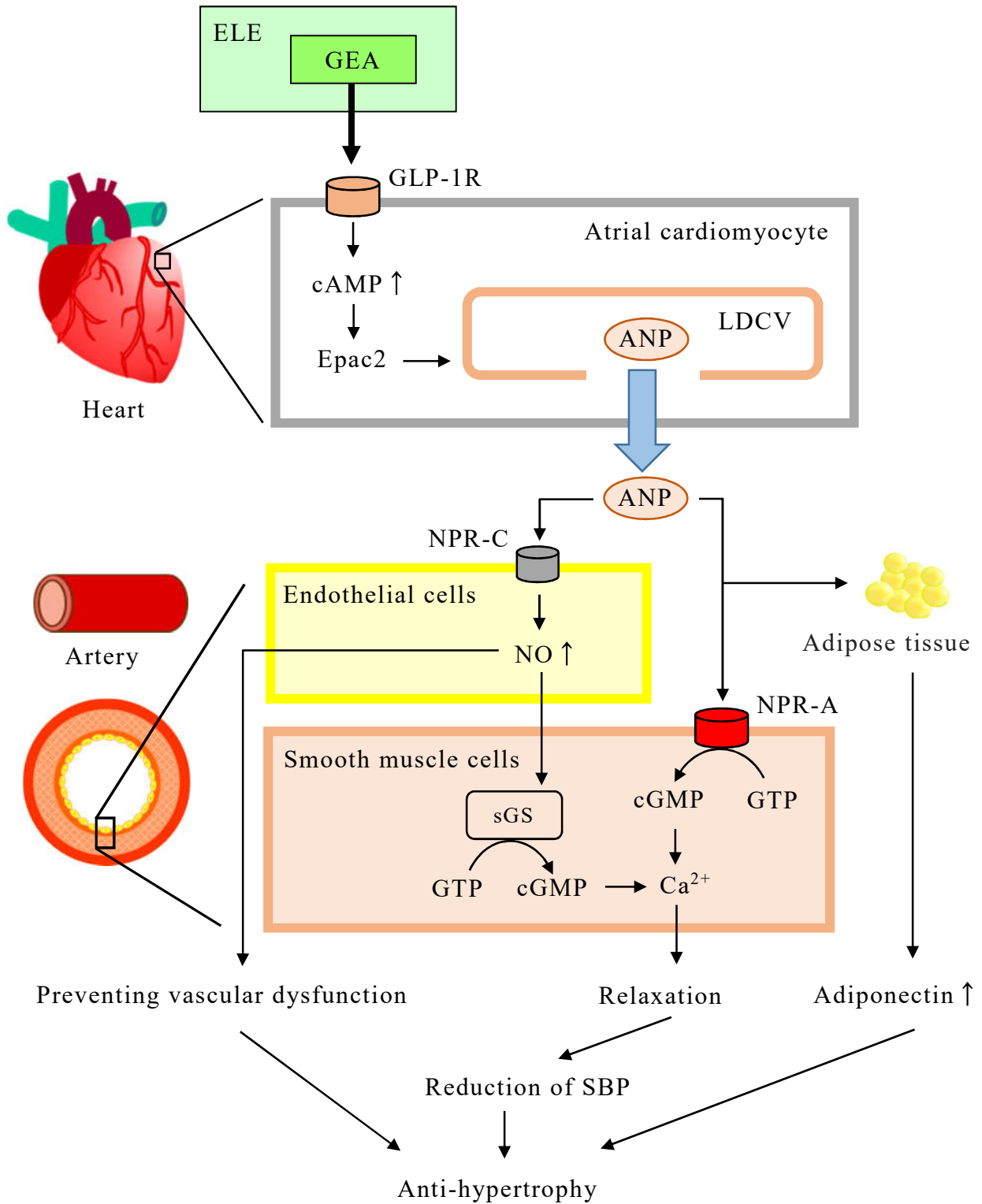


Fig. 16. Geniposidic acid (GEA) increases plasma atrial natriuretic peptide (ANP) by activating Glucagon-like peptide 1 receptors (GLP-1Rs), preventing vascular dysfunction and aortic media hypertrophy in rats

総 括

第 1 章では、加齢に伴い血管内皮機能が低下する SHR に ELE を継続摂取させ、血管拡張反応を含めた血管機能を評価し、その影響を検討した。さらに、ELE が動脈硬化の発症に与える影響を検討するために、動脈硬化の初期に見られる形態変化である血管中膜肥厚を調べた。その結果、ELE の継続摂取が SHR 大動脈において、ACh に反応した内皮依存性の血管拡張機能の低下を抑制し、血中 NO 濃度を増加させ、血管中膜肥厚を抑制することを初めて確認した。よって、ELE は血管機能低下を抑制し、血管の健康維持に役立つ機能性素材として利用できる可能性が示唆された。

第 2 章では、HFD 負荷により初期段階の肥満を呈した WKY において、ELE の継続摂取が体重、内臓脂肪量、血圧、血中アディポサイトカイン濃度に与える影響を検討した。さらに、ELE が動脈硬化の発症に与える影響を検討するために、第 1 章と同様に血管中膜肥厚を調べた。その結果、ELE の継続摂取が、初期段階の肥満を呈した WKY の体重、内臓脂肪量、血圧を減少させ、血中アディポネクチン濃度およびアディポネクチン/レプチン比を増加させることを確認した。これらの結果より、HFD 負荷 WKY の血管中膜肥厚が抑制され、抗動脈硬化作用を示すことが考えられた。よって、ELE は疾病に罹患する前の初期段階の肥満に対しても、降圧作用と抗肥満効果を示し、動脈硬化の発症リスクを低減することが明らかとなった。以上の結果から、杜仲葉を疾病に罹患する前から継続摂取しておくことで、初期の肥満を改善し、動脈硬化の発症リスクを低減できる可能性が示唆された。

第 3 章では、ELE の血管機能低下抑制および抗動脈硬化作用の作用機序を明らかにするために、ELE の主要成分であり降圧作用の関与成分であることが知られている GEA を SHR に単回経口投与し、GEA の ANP 分泌促進作用について検討した。GEA の単回経口投与は、濃度依存的に SBP を低下させ、

GEA (100 mg/kg) の投与時に最大の降圧作用を示した。次に、GEA の至適投与量を 100 mg/kg とし、投与 6 時間後の SBP, HR, 血中 GEA, ANP および血中 GLP-1 濃度の変化を調べた。結果は、GEA 投与群で SBP および HR が有意に低下し、血中 ANP 濃度が有意に増加した。また、GEA 投与群でのみ、血中から GEA が検出されたことから、GEA が経口投与後、吸収され体内を循環していることを確認した。ANP 分泌を引き起こす GLP-1 の血中濃度は、コントロール群と GEA 投与群の両群で差がなかった。よって、GEA が心房細胞上の GLP-1R にアゴニストとして作用し、ANP の分泌を増加させた可能性が示唆された。GEA の GLP-1R アゴニスト作用を確認するために、5 週齢 SHR に GEA のみおよび GLP-1R アンタゴニストである EA を GEA と一緒に静脈注射した場合の血圧に与える影響を調べた。その結果、GEA 投与群では、投与 20 分後に血圧が有意に低下したが、EA を同時に投与した群 (EA 群) では、血圧が低下せず、GEA による降圧作用が消失していた。また、GEA 投与群では、投与 10 分後に血中 ANP が有意に増加したが、EA 群ではその増加が見られなかった。以上の結果から、GEA は GLP-1R に作用し ANP の分泌を増加させることが示唆された。

本研究では、天然食品成分である GEA が、GLP-1R アゴニストとして、経口投与で ANP の分泌を増加させることを初めて発見した。ANP は血管拡張作用、血管内皮機能の改善作用、血管平滑筋の増殖抑制作用、アディポネクチン分泌促進作用など様々な生理作用を有する。よって、ELE は GEA による ANP 分泌増加作用により、血管機能低下抑制作用を示し、中膜肥厚を含めた動脈硬化の発症リスクを低減することが考えられた。GEA には、杜仲茶としての食経験や ELE を含有した特定保健用食品としての摂取実績があるため、その安全性は非常に高いと考えられる。本研究の知見により、杜仲葉が血管の健康維持を目的とした新たな機能性素材として利用されることが期待される。

謝 辞

終わりに臨み，杜仲茶の血管機能研究着手時からご指導を戴いた北海道医療大学 西部三省 名誉教授に心より感謝を申し上げます。

併せて，本論文を纏めるに際し，直接御指導，御鞭撻を賜りました北海道医療大学 薬学部 兼 大学院薬学研究科 和田啓爾 教授，北海道医療大学 薬学部 飯塚健治 教授，遠藤泰 教授，高上馬希重 准教授，小林大祐 准教授，北海道医療大学 島村佳一 名誉教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の計画・遂行に多大な御指導，御助言，御支援を戴きました信州大学大学院 農学研究科 中村浩蔵 准教授，薬理作用などで貴重な御指導，御助言を戴きました広島大学 原爆放射線医科学研究所 兼 広島大学病院 未来医療センター 東幸仁 教授，国立循環器病センター 創薬オミックス解析センター 南野直人 特任部長・センター長に厚く御礼申し上げます。

さらに，本研究で有益な御助言を戴きました日本杜仲研究会会長，大阪大学 小林昭雄 名誉教授，同会理事，元岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科，松山大学 薬学部 川崎博己 教授，共立女子大学 家政学部 上原誉志夫 教授，香川大学 農学部 片山健至 教授，鈴鹿医療科学大学 薬学部 藤川隆彦 教授，崇城大学 薬学部 池田剛 教授，同会監事 横浜薬科大学 漢方薬学科 飯塚徹 准教授に心より御礼申し上げます。さらに，本研究で多大な御協力を戴いた信州大学大学院卒業生 小山正浩 博士，信州大学農学部 食品分子工学研究室の学生の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり多大な御支援，御指導を戴きました小林製薬株式会社 辻野隆志 副社長，上田太郎 研究開発部長，和田篤敬 開発部長，山崎寛生 研究開発部長，山口康代 課長，平田哲也 担当課長に厚く御礼申し上げます。また，数々の御協力を戴きました中央研究所の坪井崇 氏，杉万直 氏，原田祐里 氏，大西篤子 氏，食品開発グループの皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 厚生労働省. 平成 28 年 (2016) 人口動態統計 (確定数) の概況
- 2) 厚生労働省. 平成 27 年度 国民医療費の概況
- 3) 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会, 健康日本 21 (第二次) の推進に関する参考資料 (平成 24 年 7 月)
- 4) Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y., Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases, *Circ J*, **73**, 411-418 (2009).
- 5) Sena CM., Pereira AM., Seiça R., Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 2216-2231 (2013).
- 6) Su JB., Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment, *World J Cardiology*, **7**, 719-741 (2015).
- 7) Zhao Y., Vanhoutte PM., Leung SW., Vascular nitric oxide: Beyond eNOS, *J Pharmacol Sci*, **129**, 83-94 (2015).
- 8) Vanhoutte PM., Shimokawa H., Tang EH., Feletou M., Endothelial dysfunction and vascular disease, *Acta Physiologica*, **196**, 193-222 (2009).
- 9) 厚生労働省. 平成 27 年国民健康・栄養調査報告.
- 10) Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S., Shimomura I., Adiponectin and Metabolic Syndrome, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 29-33 (2004).
- 11) Matsuzawa Y., The metabolic syndrome and adipocytokines, *FEBS Letters*, **580**, 2917-2921 (2006).
- 12) Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K., Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome, *J Clin Invest*, **116**, 1784-1792 (2006).
- 13) Kishida K., Kim KK., Funahashi T., Matsuzawa Y., Kang HC., Shimomura I., Relationships between circulating adiponectin levels and fat distribution in obese subjects, *J Atheroscler Thromb*, **18**, 592-595 (2011).
- 14) Chinese Materia Medica Dictionary Jiangsu, ed. by New Medical College, Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai, 1977, p. 1031.

- 15) Nakazawa Y., Studies on Functionality and Application of *Eucommia* Leaf to Preservation of Health, Ph.D. Thesis, Kyushu University, Fukuoka, Japan, (1998).
- 16) Nakamura T., Nakazawa Y., Onizuka S., Tanaka C., Yahara S., Nohara T., Studies on the constituents of *Eucommia ulmoides* iridoids from the leaves, *Nat. Med*, **51**, 275-277 (1997).
- 17) Nakamura T., Nakazawa Y., Onizuka S., Tanaka C., Yahara S., Nohara T., Twelve Phenolics from Leaves of *Eucommia ulmoides* (Natural Medicine Note), *Nat. Med*, **52**, 460 (1998).
- 18) Hirata T., Ikeda T., Fujikawa T., Nishibe S., “Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 41. The Chemistry and Bioactivity of *Eucommia ulmoides* Oliver Leaves,” ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 225-260.
- 19) Namba T., Hattori M., Yie J.N., Ma Y.H., Nomura Y., Kaneko S., Kitamura Y., Koizumi T., Katayama K., Lu W., Studies on Tu-Chung leaves (I) Pharmacological effects of the water extract in vivo, *Wakan. Iyaku. Gakkaishi*, **3**, 89-97 (1986).
- 20) Namba T., Physiological function and utilization of “TOCHU” leaves, *Food processing and ingredients*, **29**, 9-11 (1994).
- 21) Imai T., Kishi T., Inoue H., Saito H., Effects of iridoids on sex- and learning-behaviours in chronic stressed mice, *Yakugaku. Zasshi*, **108**, 572-575 (1988).
- 22) Jin X., Amitani K., Zamami Y., Takatori S., Hobara N., Kawamura N., Hirata T., Wada A., Kitamura Y., Kawasaki H., Ameliorative effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves extract (ELE) on insulin resistance and abnormal perivascular innervation in fructose-drinking rats, *J. Ethnopharmacol*, **128**, 672-678 (2010).
- 23) Metori K., Ohashi S., Takahashi S., Tamura T., Effects of du-zhong leaf extract on serum and hepatic lipids in rats fed a high-fat diet, *Biol Pharm Bull*, **17**, 917-920 (1994).
- 24) Park SA., Choi MS., Kim MJ., Jung UJ., Kim HJ., Park KK., Noh HJ., Park HM., Park YB., Lee JS., Lee MK., Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-db/db mice, *J. Met. Food*, **107**, 412-417 (2006).

- 25) Fujikawa T., Hirata T., Wada A., Kawamura N., Yamaguchi Y., Fujimura K., Ueda T., Yurugi Y., Soya H., Nishibe S., Chronic administration of *Eucommia* leaf stimulates metabolic function of rats across several organs, *Br. J. Nutr*, **104**, 1868-1877 (2010).
- 26) Hirata T., Kobayashi T., Wada A., Ueda T., Fujikawa T., Miyashita H., Ikeda T., Tsukamoto S., Nohara T., Anti-obesity compounds in green leaves of *Eucommia ulmoides*, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **21**, 1786-1791 (2011).
- 27) Kawasaki T., Uezono K., Nakazawa Y., Antihypertensive mechanism of Food for Specified Health Use: “*Eucommia* leaf glycoside” and its clinical application, *J. Health Sci*, **22**, 29-36 (2000).
- 28) Guizhou Province Institute for Drug Control and Guizhou Province Chinese Medicine Research Laboratories. A hypertensive clinical study on *Eucommia* leaves, *Chin Med Herbs Res*, **8**, 59-63 (1978).
- 29) Kwan C.Y., Chen C.X., Deyama T., Nishibe S., Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: Implications on their antihypertensive action. *Vasc. Pharmacol*, **40**, 229–235 (2003).
- 30) Kajimoto O., Ueda T., Yamaguchi Y., Tanabe K., Nakagawa S., Kajimoto Y., Hypotensive action and safety of drinks containing “*Eucommia* leaf glycoside” on high normal blood pressure and mild hypertensive subjects, *Health Sci.*, **21**, 198-211 (2005).
- 31) Sainani GS., Maru VG., Role of endothelial cell dysfunction in essential hypertension, *J. Assoc. Phys. India*, **52**, 966-969 (2004).
- 32) Chou TC., Yen MH., Li CY., Ding YA., Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats, *Hypertension*, **31**, 643-648 (1998).
- 33) Wu CC., Yen MH., Higher level of plasma nitric oxide in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Hypertens*, **12**, 476-482 (1999).
- 34) Shimokawa H., Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis, *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 23-37 (1999).

- 35) Wu CC., Hong HJ., Chou TC., Ding YA., Yen MH., Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 459-466 (1996).
- 36) Adcock IM., Brown CR., Kwon O., Barnes PJ., Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1518-1524 (1994).
- 37) Zalba G., Beaumont FJ., San José G., Fortuño A., Fortuño MA., Etayo JC., Díez J., Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, **35**, 1055-1061 (2000).
- 38) Sánchez M., Galisteo M., Vera R., Villar IC., Zarzuelo A., Tamargo J., Pérez-Vizcaíno F., Duarte J., Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.*, **24**, 75-84 (2006).
- 39) Xu L., Liu Y., Administration of telmisartan reduced systolic blood pressure and oxidative stress probably through the activation of PI3K/Akt/eNOS pathway and NO release in spontaneously hypertensive rats, *Physiol. Res*, **62**, 351-359 (2013).
- 40) Napoli C., de Nigris F., Williams-Ignarro S., Pignalosa O., Sica V., Ignarro LJ., Nitric oxide and atherosclerosis: An update, *Nitric. Oxide*, **15**, 265-279 (2006).
- 41) Rodríguez A., Gómez-Ambrosi J., Catalán V., Fortuño A., Frühbeck G., Leptin inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II through nitric oxide-dependent mechanisms, *Mediat. Inflamm*, **2010**, 105489 (2010).
- 42) Yamaguchi Y., Kawamura N., Tsuboi T., Yamaguchi Y., Hirata T., Ueda T., Tagawa C., Nakazawa Y., Onizuka S., Tagashira E., Nishibe S., Effect of the *Eucommia ulmoides* leaf extract on blood pressure, *Int. Symp. Eucommia Ulmoides*, **1**, 55-62 (2007).
- 43) Kim SJ., Kim KM., Park J., Kwak JH., Kim YS., Lee SM., Geniposidic acid protects against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic failure in mice, *J. Ethnopharmacol*, **146**, 271-277 (2013).

- 44) Jeszka-Skowron M., Krawczyk M., Zgola-Grzeskowiak A., Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals, *J. Food Compost. Anal*, **40**, 70-77 (2015).
- 45) Suzuki A., Yamamoto N., Jokura H., Yamamoto M., Fujii A., Tokimitsu I., Saito I., Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens*, **24**, 1065-1073 (2006).
- 46) Matsuzawa Y., Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease, *Atheroscler. Suppl*, **6**, 7-14 (2005).
- 47) Dorresteyn JA., Visseren FL., Spiering W., Mechanisms linking obesity to hypertension, *Obes. Rev*, **13**, 17-26 (2012).
- 48) Bravo PE., Morse S., Borne DM., Aguilar EA., Reisin E., Leptin and hypertension in obesity, *Vasc. Health. Risk. Manag*, **2**, 163-169 (2006).
- 49) Simonds SE., Cowley MA., Hypertension in obesity: is leptin the culprit?, *Trends. Neurosci*, **36**, 121-132 (2013).
- 50) Ghantous CM., Azrak Z., Hanache S., Abou-Kheir W., Zeidan A., Differential role of leptin and adiponectin in cardiovascular system, *Int. J. Endocrinol*, **2015**, 534320 (2015).
- 51) Wang ZV., Scherer PE., Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension, *Hypertension*, **51**, 8-14 (2008).
- 52) Balsan GA., Vieira JL., Oliveira AM., Portal VL., Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev. Assoc. Med. Bras*, **61**, 72-80 (2015).
- 53) Ebrahimi-Mamaeghani M., Mohammadi S., Arefhosseini SR., Fallah P., Bazi Z., Adiponectin as a potential biomarker of vascular disease, *Vasc. Health. Risk. Manag*, **11**, 55-70 (2015).
- 54) Beltowski J., Leptin and atherosclerosis, *Atherosclerosis*, **189**, 47-60 (2006).
- 55) Satoh N., Naruse M., Usui T., Tagami T., Suganami T., Yamada K., Kuzuya H., Shimatsu A., Ogawa Y., Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients, *Diabetes. Care*, **27**, 2488-2490 (2004).

- 56) Kappelle PJ., Dullaart RP., van Beek AP., Hillege HL., Wolffenbuttel BH., The plasma leptin/adiponectin ratio predicts first cardiovascular event in men: a prospective nested case-control study. *Eur. J. Intern. Med.*, **23**, 755-759 (2012).
- 57) Ferder L., Inserra F., Martínez-Maldonado M., Inflammation and the metabolic syndrome: role of angiotensin II and oxidative stress, *Curr. Hypertens. Rep*, **8**, 191-198 (2006).
- 58) Hosoo S., Koyama M., Kato M., Hirata T., Yamaguchi Y., Yamasaki H., Wada A., Wada K., Nishibe S., Nakamura K., The restorative effects of *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract on vascular function in spontaneously hypertensive rats, *Molecules*, **20**, 21971-21981 (2015).
- 59) Hosoo S., Koyama M., Watanabe A., Ishida R., Hirata T., Yamaguchi Y., Yamasaki H., Wada K., Higashi Y., Nakamura K., Preventive effect of *Eucommia* leaf extract on aortic media hypertrophy in Wistar-Kyoto rats fed a high-fat diet, *Hypertens Res*, **40**, 546-551 (2017).
- 60) He M.L., Cheng XW., Chen JK., Zhou TS., Simultaneous determination of five major biologically active ingredients in different parts of *Gardenia jasminoides* fruits by HPLC with diode-array detection, *Chromatographia*, **64**, 713-717 (2006).
- 61) Nishibe S., The plant origins of herbal medicines and their quality evaluation, *Yakugaku Zasshi*, **122**, 363-379 (2002).
- 62) Gao Y., Chen ZY., Liang X., Xie C., Chen YF., Anti-atherosclerotic effect of geniposidic acid in a rabbit model and related cellular mechanisms, *Pharm Biol*, **53**, 280-285 (2015).
- 63) Kangawa K., Matsuo H., Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP), *Biochem Biophys Res Commun*, **118**, 131-139 (1984).
- 64) Zhang YH., Youm JB., Earm YE., Stretch-activated non-selective cation channel: a causal link between mechanical stretch and atrial natriuretic peptide secretion, *Prog Biophys Mol Biol*, **98**, 1-9 (2008).
- 65) Saito Y., Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use, *J Cardiol*, **56**, 262-270 (2010).

- 66) Kerkelä R., Ulvila J., Magga J., Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events, *J Am Heart Assoc*, **27**, e002423 (2015).
- 67) Kim M., Platt MJ., Shibasaki T., Quaggin SE., Backx PH., Seino S., Simpson J.A., Drucker D.J., GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure, *Nature Medicine*, **19**, 567-575 (2013).
- 68) Mayo KE., Miller LJ., Bataille D., Dalle S., Göke B., Thorens B., Drucker DJ., International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family, *Pharmacol Rev*, **55**, 167-194 (2003).
- 69) Ban K., Noyan-Ashraf MH., Hoefer J., Bolz SS., Drucker DJ., Husain M., Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways, *Circulation*, **117**, 2340-2350 (2008).
- 70) Gong N., Fan H., Ma AN., Xiao Q., Wang YX., Geniposide and its iridoid analogs exhibit antinociception by acting at the spinal GLP-1 receptors, *Neuropharmacology*, **84**, 31-45 (2014).
- 71) Endlich PW., Firmes LB., Gonçalves WL., Gouvea SA., Moysés MR., Bissoli NS., Reis AM., Abreu GR., Involvement of the atrial natriuretic peptide in the reduction of arterial pressure induced by swimming but not by running training in hypertensive rats, *Peptides*, **32**, 1706-1712 (2011).
- 72) Zhang L., Ma YL., Liu Y., Zu YG., Development and validation of high liquid performance chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of geniposidic acid and aucubin in rat plasma for pharmacokinetic study after oral administration of Du-zhong tea extract, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **963**, 62-69 (2014).
- 73) Li Y., Gong Z., Cao X., Wang Y., Wang A., Zheng L., Huang Y., Lan Y., A UPLC-MS Method for Simultaneous Determination of Geniposidic Acid, Two Lignans and Phenolics in Rat Plasma and its Application to Pharmacokinetic Studies of *Eucommia ulmoides* Extract in Rats, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **41**, 595-603 (2016).

- 74) 植物化学, 第4版第6刷, 医菌薬出版株式会社, 1980, p. 117.
- 75) Elesgaray R., Caniffi C., Ierace DR., Jaime MF., Fellet A., Arranz C., Costa MA., Signaling cascade that mediates endothelial nitric oxide synthase activation induced by atrial natriuretic peptide, *Regul Pept*, **151**, 130-134 (2008).
- 76) Itoh H., Pratt RE., Dzau VJ., Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells, *J Clin Invest*, **86**, 1690-1697 (1990).
- 77) Ussher JR., Drucker DJ., Cardiovascular Actions of Incretin-Based Therapies, *Circ Res*, **114**, 1788-1803 (2014).
- 78) Unger JR., Parkin CG., Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists: Differentiating the new medications, *Diabetes Ther*, **2**, 29-39 (2011).