

羅布麻の機能性食品としての

有効性とその開発研究

平成 25 年度

香川 珠実

## 略語集

- ACE : angiotensin-converting enzyme, アンギオテンシン変換酵素
- ACh : acetylcholine, アセチルコリン
- A/G : albumin-globulin ratio, アルブミン・グロブリン比
- Alb : albumin, アルブミン
- ALP : alkaline phosphatase, アルカリホスファターゼ
- ALT : alanine aminotransferase, アラニンアミノトランスフェラーゼ
- APTT : activated partial thromboplastin time, 活性化部分トロンボプラスチン時間
- AST : aspartate aminotransferase, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
- AUC : area under the blood concentration time curve, 血中濃度曲線下面積
- BASO : basophil, 好塩基球
- BIL : bilirubin, ビリルビン
- BMI : body mass index, 肥満指数
- BSA : bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
- BUN : blood urea nitrogen, 尿素窒素
- Ca : calcium, カルシウム
- ChE : cholinesterase, コリンエステラーゼ
- Cl : chloride, 塩素
- Cmax : maximum drug concentration, 最高血中濃度
- CMC : sodium carboxymethyl cellulose, カルボキシメチルセルロースナトリウム
- Crea : creatinine, クレアチニン
- DAB : 3,3'-diaminobenzidine, 3,3'-ジアミノベンジジン
- EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor, 内皮由来過分極因子
- EDTA : ethylenediamine-tetraacetic acid, エチレンジアミン四酸
- eNOS : endothelial NO synthase, 内皮一酸化窒素合成酵素
- EOSIN : eosinophil, 好酸球
- Glb : globulin, グロブリン

Glu : glucose, グルコース

$\gamma$ -GTP :  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase,  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ

HCT : hematocrit, ヘマトクリット

Hgb : hemoglobin, ヘモグロビン

HP : hyperoside, ハイペロサイド

HPLC : high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー

*i.d.* : intraduodenal, 十二指腸内

*i.p.* : intraperitoneal, 腹腔内

IP : inorganic phosphorus, 無機リン

*i.v.* : intravenous, 静脈内

IQ : isoquercitrin, イソクエルシトリン

K : potassium, カリウム

KET : ketone body, ケトン体

K-U : urine K, 尿カリウム

LC/MS/MS : liquid chromatography-tandem mass spectrometry, 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法

LLE : Luobuma leaf extract, 羅布麻茶葉エキス

L-NAME : N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, N<sup>G</sup>-ニトロアルギニンメチルエステル

LPH : lactase phlorizin hydrolase, ラクターゼフロリジン分解酵素

LYMPH : lymphocyte, リンパ球

MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration, 平均赤血球色素濃度

MCV : mean corpuscular volume, 平均赤血球容積

MCH : mean corpuscular hemoglobin, 平均赤血球色素量

MONO : monocyte, 単核白血球

Na : sodium, ナトリウム

NA : *dl*-noradrenaline, ノルアドレナリン

Na-U : urine Na, 尿ナトリウム

NO : nitric oxide, 一酸化窒素

OB : occult blood, 潜血

PBS : phosphate buffer, リン酸緩衝液

PLT : platelets, 血小板

PRO : protein, 蛋白

PT : prothrombin time, プロトロンビン時間

RBC : red blood cells, 赤血球数

RET : reticulocytes, 網状赤血球

*Rf* : retention factor, 相対移動距離

SD : sodium deoxycholate, デオキシコール酸ナトリウム

SEG : segmented neutrophil, 分葉核好中球

SGLT-1 : sodium-dependent glucose transporter, グルコーストランスポーター

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

SMA : smooth muscle actin, 抗ヒト平滑筋アクチン

STAB : stab cell, 桿状核白血球

T-Bil : total bilirubin, 総ビリルビン

T-Cho : total cholesterol, 総コレステロール

TEA : tetraethylammonium, テトラエチルアンモニウム

TG : triglyceride, トリグリセライド

TLC : thin-layer chromatography, 薄層クロマトグラフィー

Tmax : maximum drug concentration time, 最高血中濃度到達時間

TP : total protein, 総蛋白

URO : urobilinogen, ウロビリノーゲン

WBC : white blood cells, 白血球数

WKY : Wistar Kyoto rat, ウィスター京都ラット

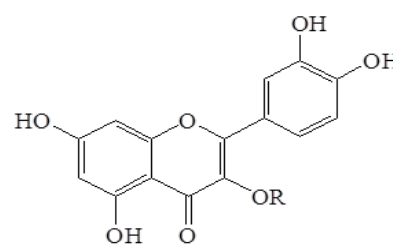
## Abstract

Studies on the effectiveness and development of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) as a functional food

Tamami Kagawa

*Apocynum venetum* L., commonly known as Luobuma in China, is a traditional and popular Chinese herb with a long history of use as a medicine and tea. Some studies have reported an antihypertensive effect of *A. venetum* leaves, but the detailed mechanism underlying its action is unclear. To evaluate the therapeutic effect of *A. venetum* leaf extract (LLE) as a functional food against hypertension, the author evaluated its cardiovascular effects, toxicological safety in rats, and hypotensive properties in humans.

1. Thin layer chromatography on an RP-18 plate using water-acetic acid-methanol (6:2:1) as a solvent system was employed for chemical differentiation of authentic Luobuma (*A. venetum* L.) from *Poacynum hendersonii* (Hook f.) Woodson, which is mistakenly distributed as Luobuma in some Chinese markets. High-performance liquid chromatography on a Navi C18-5 column using acetonitrile-water-acetic acid (50:350:20) as the solvent system was used for quantitative analysis of the major flavonoids, hyperoside (HP) and isoquercitrin (IQ) (Fig. 1), in raw materials, LLE, and tea made from Luobuma as the quality control.



hyperoside : R = galactosyl  
isoquercitrin : R = glucosyl

Fig. 1 The structure of flavonoids

2. The effect of LLE on blood pressure and its mechanism were examined using LLE that was chronically administered orally to unanesthetized spontaneously hypertensive rats (SHR) and to normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats. Administration of LLE caused a decrease in blood pressure only in SHR in a dose-dependent manner. Next, under anesthesia, LLE was intraduodenally administered to SHR or Sprague Dawley rats (SDR). In this experiment, LLE did not have an effect on either noradrenaline-induced increase or acetylcholine-induced decrease in blood pressure in SHR. LLE did not show any effect on angiotensin I-induced increase in blood pressure in SDR.

The vasodilator effect of LLE on the rat mesenteric vascular bed was also tested. In a perfused mesenteric vascular bed with active tone and intact endothelium, perfusion of LLE (100 pg/ml to 100 mg/ml for 15 min) caused dose-dependent vasodilation, which was attenuated by chemical ablation of the endothelial layer. The author also performed experiments with an inhibitor of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in a blood vessel relaxation reaction. The results suggested that the vasodilation induced by LLE was endothelium dependent and mediated by the EDHF pathway, which involves the activation of  $K^+$  channels. Higher concentrations of LLE may enhance nitric oxide (NO) production/release and thereby cause vasodilation.

3. HP (20 mg/kg body weight), IQ (20 mg/kg body weight), or their equivalent mixture [HP + IQ] (40 mg/kg body

weight) was chronically administered orally to unanesthetized SHR. A significant antihypertensive effect was observed in the [HP + IQ] group but not in the other two groups. In addition, after a 7-week administration of [HP + IQ], the thickness of the media layer decreased, whereas the endothelial NO synthase activity in the coronary artery and NO concentration in plasma significantly increased. [HP + IQ] improved endothelial function, and the antihypertensive effect of [HP + IQ] was exerted on NO-mediated endothelium-dependent vasodilation.

Furthermore, the concentration of quercetin metabolites in plasma was measured for 24 h using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after enzymatic hydrolysis. During administration of [HP + IQ], the concentration of quercetin metabolites in plasma did not change significantly and was mostly constant for 24 h compared with that during the single administration of HP or IQ. Therefore, it is suggested that the antihypertensive effect of [HP + IQ] results from the differences in the plasma concentration of the metabolites HP and IQ between combined and single administrations.

4. To evaluate the toxicological safety of LLE, repeated doses were administered to male and female rats for 90 days. The 90-day administration of repeated doses of LLE at 1,000 mg/kg/day or 2,000 mg/kg/day to Wistar rats caused no abnormalities in external appearance or behavior. No significant toxic effects were observed in hematological, biochemical, and urine tests. No changes were observed in either absolute or relative weight of organs, in macroscopic findings, or in histological findings at the end of the treatment period. Consequently, oral administration of LLE at 2,000 mg/kg/day to both male and female rats did not produce any toxicologically significant effects, showing a high safety level.

5. Hypotensive properties and safety of a beverage containing LLE were examined in humans in a randomized, double-blind, placebo-controlled, and parallel-group study. The subjects were adult males and females with high normal blood pressure or mild hypertension who were not taking any hypotensive medication. The test beverage or placebo was given once a day for 12 weeks. The results revealed that the systolic and diastolic blood pressures were significantly lowered after 8 weeks of dietary supplementation in the test group, but not in the placebo group. Thus, these results demonstrated the benefits of the beverage containing LLE in subjects with high normal blood pressure or mild hypertension.

## 目 次

諸言	1
第 1 章 羅布麻の基原植物	4
第 1 節 羅布麻葉の確認試験	4
第 1 項 背景	4
第 2 項 実験方法	5
(1) 羅布麻茶葉及び羅布麻茶葉エキスの調製	5
(2) 実験材料	5
(3) 薄層クロマトグラフ法	5
(4) 羅布麻葉 ( <i>A. venetum</i> を基原) の確認試験	6
(5) <i>P. hendersonii</i> (白麻) を基原とする場合	6
第 3 項 結果	6
(1) 確認試験	6
第 4 項 考察	7
第 2 節 hyperoside と isoquercitrin の定量	9
第 1 項 背景	9
第 2 項 実験方法	9
(1) 実験材料	9
(2) 羅布麻葉	9
(3) 羅布麻茶液	10
(4) 液体クロマトグラフ法の測定条件	10
第 3 項 結果	10
第 4 項 考察	10
第 2 章 羅布麻茶葉エキスの降圧作用とそのメカニズム	12
第 1 節 ラットを用いた羅布麻茶葉エキス経口投与試験	12

第1項	背景	12
第2項	実験方法	12
	(1) 実験材料 (羅布麻茶葉エキスの調整)	12
	(2) 実験動物	13
	(3) 投与方法	13
	(4) 測定方法	13
	(5) 統計処理	13
第3項	結果	14
	(1) 高血圧自然発症ラットにおける血圧への影響	14
	(2) 高血圧自然発症ラットにおける体重及び摂餌量への影響	14
	(3) ウィスター京都ラットにおける血圧への影響	15
	(4) ウィスター京都ラットにおける体重への影響	16
第4項	考察	17
第2節	ラットを用いた羅布麻茶葉エキス十二指腸内投与試験	18
第1項	背景	18
第2項	実験方法	18
	(1) 実験材料	18
	(2) 使用薬物	18
	(3) 実験動物	18
	(4) 測定方法	19
	(5) 投与方法	19
	i) 十二指腸内単回投与時の降圧と用量反応性 (高血圧自然発症ラットにおける検討)	19
	ii) ノルアドレナリンによる昇圧及びアセチルコリンによる降圧作用に対する影響 (高血圧自然発症ラットにおける検討)	19
	iii) angiotensin I の昇圧作用に対する影響 (Sprague Dawley ラットにおける検討)	20
	(6) 統計処理	20
第3項	結果	20



(1) 十二指腸内単回投与時の降圧と用量反応性 (高血圧自然発症ラット における検討) . . . . .	20
(2) ノルアドレナリンによる昇圧及びアセチルコリンによる降圧作用に 対する影響 (高血圧自然発症ラットにおける検討) . . . . .	21
(3) angiotensin I の昇圧作用に対する影響 (Sprague Dawley ラットにおけ る検討) . . . . .	23
第 4 項 考察 . . . . .	24
第 3 節 ラット腸間膜動脈を用いた羅布麻茶葉エキス灌流試験 . . . . .	26
第 1 項 背景 . . . . .	26
第 2 項 実験方法 . . . . .	26
(1) 実験材料 . . . . .	26
(2) 使用薬物 . . . . .	26
(3) 実験動物 . . . . .	27
(4) 摘出腸間膜動脈血管床標本の灌流 . . . . .	27
(5) 血管内皮細胞の化学的除去 . . . . .	27
(6) 実験プロトコール . . . . .	28
(7) 統計処理 . . . . .	29
第 3 項 結果 . . . . .	29
(1) 羅布麻茶葉エキスの内皮保持標本及び内皮除去標本における血管 弛緩作用 . . . . .	29
(2) 羅布麻茶葉エキス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 . . . . .	30
(3) 羅布麻茶葉エキスの血管弛緩作用に及ぼす抗ムスカリン薬の影 響 . . . . .	34
第 4 項 考察 . . . . .	35
第 3 章 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの降圧作用と血管機能改善効 果 . . . . .	37
第 1 節 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの降圧作用 . . . . .	37

第1項	背景	37
第2項	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	38
	(5) 血圧, 体重及び摂餌量の測定及び一般症状の観察	38
	(6) 統計処理	38
第3項	結果	38
	(1) 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの高血圧自然発症ラットにおける血圧への影響	38
	(2) 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの高血圧自然発症ラットにおける体重及び摂餌量への影響	39
第4項	考察	42
第2節	羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの血管機能改善効果	43
第1項	背景	43
第2項	実験方法	43
	(1) 実験材料	43
	(2) 使用薬物	43
	(3) 実験動物	44
	(4) 採血及び心臓摘出	44
	(5) 血管平滑筋アクチン及び内皮一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学染色と形態計測	44
	(6) 血中一酸化窒素濃度測定	45
	(7) 統計処理	45
第3項	結果	45
	(1) 血管中膜の厚さ	45
	(2) 内皮一酸化窒素合成酵素の活性	47
	(3) 血中一酸化窒素濃度	47

第4項	考察	48
第3節	羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドのバイオアベイラビリティ	51
第1項	背景	51
第2項	実験方法	53
(1)	実験材料	53
(2)	使用薬物	53
(3)	実験動物	53
(4)	投与方法	53
(5)	血漿サンプル	53
(6)	血中ケルセチン代謝物濃度測定	54
(7)	統計処理	55
第3項	結果	55
第4項	考察	59
第4章	羅布麻茶葉エキスの反復投与毒性試験	62
第1項	背景	62
第2項	実験方法	62
(1)	実験材料	62
(2)	実験動物	62
(3)	投与方法	62
(4)	一般症状の観察及び体重及び摂餌量の測定	63
(5)	血液学的検査	63
(6)	血液化学的検査	63
(7)	病理学的検査	64
(8)	尿検査	64
(9)	統計処理	65
第3項	結果	65
(1)	一般症状の観察及び体重及び摂餌量の測定	65
(2)	血液学的検査	66

(3) 血液化学的検査	67
(4) 病理学的検査	68
(5) 尿検査	70
第4項 考察	70
第5章 羅布麻茶葉エキスのヒト試験での降圧効果	72
第1項 背景	72
第2項 実験方法	73
(1) 試験食	73
(2) 対象者	74
(3) 投与方法	75
(4) 試験スケジュール	75
(5) 検査方法	76
(6) 統計処理	77
第3項 結果	77
(1) 血圧及び脈拍数	77
(2) 体重及び肥満指数	80
第4項 考察	81
総括	84
謝辞	86
引用文献	87

学位論文の基礎となる報文

香川珠実, 中澤慶久, 高橋豊, 鬼塚重則, 西部三省, 羅布麻葉の確認試験とフラボノイド成分の定量について, *Natural Medicines*, **58**, 295-298 (2004).

香川珠実, 中澤慶久, 田頭栄治郎, 高橋豊, 鬼塚重則, 西部三省, 羅布麻 (紅麻: *Apocynum venetum* L.) 葉エキスの降圧作用に関する研究 (1), *Natural Medicines*, **58**, 109-112 (2004).

香川珠実, 中澤慶久, 田頭栄治郎, 高橋豊, 鬼塚重則, 西部三省, 羅布麻 (紅麻: *Apocynum venetum* L.) 葉エキスの降圧作用に関する研究 (2), *Natural Medicines*, **58**, 299-302 (2004).

田川智恵, 香川珠実, 中澤慶久, 鬼塚重則, 西部三省, 川崎博己, 羅布麻 (紅麻: *Apocynum venetum* L.) 葉エキスの降圧作用に関する研究 (3), *YAKUGAKU ZASSHI*, **124**, 851-856 (2004).

梶本修身, 中澤慶久, 鬼塚重則, 高橋豊, 香川珠実, 西部三省, 藪根光晴, 梶本佳孝, 燕龍茶フラボノイド含有飲料の正常高値血圧者および軽症高血圧者に対する降圧効果, *Health Sciences*, **21**, 115-129 (2005).

香川珠実, 田川智恵, 金澤浩司, 中澤慶久, 西部三省, 賀来亨, 羅布麻 (紅麻: *Apocynum venetum* L.) 葉エキスの降圧作用に関する研究 (4) ~*In Vivo* ハイペロサイドとイソクエルシトリンの降圧作用と血管機能改善~, *Health Sciences*, **23**, 191-199 (2007).

香川珠実, 田川智恵, 金澤浩司, 中澤慶久, 西部三省, 羅布麻 (紅麻: *Apocynum venetum* L.) 葉エキスの降圧作用に関する研究 (5) ~ハイペロサイドとイソク

エルシトリンの体内吸収と血中代謝物濃度～, *Health Sciences*, **23**, 200-209 (2007).

Kagawa T., Nishibe S., Wada K., A repeated dose 90-day oral toxicity study of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract in rats, *Health Sciences*, **29**, 85-92 (2013).

## 諸 言

高血圧は、別名サイレント・キラーとも呼ばれ、自覚症状が無いままに脳卒中や心筋梗塞等の合併症を引き起こすため、日本人の死因上位を占めるこれら疾病の大きなリスクファクターとなっている。さらに、血圧はメタボリックシンドロームの診断基準のひとつにもなっている。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に高血糖・高血圧・脂質異常症が複合的に発症した状態と定義され、<sup>1)</sup> その概念は、不適切な生活習慣から生じる過栄養を基盤に近年増加してきた心血管病の予防や対策に効果的である。メタボリックシンドロームの病態は動脈硬化を促進させ、血管変化の進行を促すことで、糖尿病合併症や脳卒中、心疾患等のリスクを高める。危険因子の重積により心血管病のリスクが高まるため、高血圧を予防することは動脈硬化の予防、ひいては心血管病の予防につながると期待される。

厚生労働省の2010年国民健康・栄養調査によると、日本高血圧学会の基準に基づく高血圧者は56.1%と約6,000万人と推定され、収縮期血圧140-159 mmHg, 拡張期血圧90-99 mmHgの軽症高血圧者が39.7%, 収縮期血圧160-179 mmHg, 拡張期血圧100-109 mmHgの中等症高血圧者が9.8%, 収縮期血圧180 mmHg以上, 拡張期血圧110 mmHg以上の重症高血圧者が2.2%である(日本高血圧学会の基準(2000年)による名称を使用)。一方、収縮期血圧130-139 mmHg, 拡張期血圧85-89 mmHgの正常高値血圧者の割合は23.1%であり、軽症高血圧者と合わせた60%以上が重篤な高血圧症には至っていない状況にあるといえる。これらの人々については、薬物治療以外の効果的な予防対策が必要であり、その予防対策を実施することは国民の健康維持・改善に大きく寄与すると考えられる。

厚生労働省の2010年国民医療費の概況によると、65歳以上の高齢者医療費の32.6%を占めているのが高血圧性疾患(高血圧・虚血性心疾患・脳血管疾患等)である。日本人に占める高齢者の割合は、今後ますます増加すると予想されている中、高齢者の医療費削減は大きな課題である。しかし、発症した疾病や障害を検診等により早期に発見、治療や保健指導等の対策を行い、その重症化を防ぐ二次予防だけでは限界があり、生活習慣の改善により健康増進を図ること

で高血圧のリスクを減らす一次予防の重要性はさらに高まると考えられる。

従来、食品の価値の評価は栄養と美味しさという面で論じられてきた。しかし、1984-1986年に実施された文部省特定研究「食品機能の系統的解析と展開」において、健康増進に寄与する食品の働きという新たな概念が生まれた。この研究の中で、食品の一次機能（栄養機能）、二次機能（嗜好・感覚機能）、及び三次機能（生体調節機能）が提唱され、研究が進められた。2001年には食品の機能性を強化した食品が保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能食品）として制度化され、疾患の一次予防に対する機能性食品の活用が期待されている。

羅布麻（*Luobuma: Apocynum venetum* L.）はキョウチクトウ科アポシナム属の宿根性多年生草本で、中国では別名、紅麻、野麻、野茶とも呼ばれている。<sup>2)</sup> 中国の黄河流域を中心に、西北、華北、華東、東北及びヨーロッパ、アジアの温帯地区、また、アルカリ性土質の荒地や砂漠、河岸等に生育し、高さ1-3mになり全草に乳汁を含む。<sup>2-3)</sup> 枝は通常対生で無毛、紫紅色または淡紅色で葉は対生、夏に円錐花房をつけ、紫紅色の小さい花を開く（Fig. 1）。<sup>2,3)</sup> 同じアポシナム属では、変種のバシクルモン（*A. venetum* L. var. *basikurumon*）が北海道に分布<sup>4)</sup> し、*A. cannabinum* 及び *A. androsaemifolium* が北米に分布する。<sup>5)</sup>

羅布麻は、中国の薬事古書において「澤漆」「澤漆麻」と記載され、古くは紀元前32-24年から飲用に関する記載が見られる。<sup>6,7)</sup> 明代の朱庸著「救荒本草」（1424年）には“若葉を茶として飲むのも良い”と記され、李時珍著「本草綱目」（1596年）では、“その若芽は無毒で食べられる”と記されている。<sup>7)</sup> また、内蒙古では羅布麻の若い葉を利用し、バーガスンチャイ（*bargasun chai*）という民族名の茶として飲用していたことが報告されている。<sup>8)</sup> さらに羅布麻葉は、中華人民共和国薬典に1977年に収載されて以降、現代に至るまで“解熱利尿、肝臓を鎮め精神を安らかにさせ、高血圧・目眩・動悸・不眠に用いる”<sup>7,9)</sup> とされており、古くからお茶や民間薬として利用されてきた。<sup>10)</sup> 日本でも、羅布麻茶は1985年頃から輸入され、現在も羅布麻茶や燕龍茶の商品名で販売されている。また、アメリカやカナダにおいても羅布麻茶のティーバッグ及びエキス錠剤が販売されている。

羅布麻葉の効能として、脂質過酸化抑制作用、<sup>11-13)</sup> 低比重リポ蛋白酸化抑制



作用,<sup>13,14)</sup> 総コレステロール低下作用,<sup>15)</sup> 抗酸化作用,<sup>16)</sup> 肝臓保護作用,<sup>17)</sup> 抗うつ作用<sup>18)</sup>が報告されている. さらに降圧作用に関しては, Kim D.W. らが高血圧モデルラットに羅布麻葉エキスを経口投与し, 有意な降圧作用を認めたことを報告しているが,<sup>19)</sup> その詳細なメカニズムは不明である. 今回, 高血圧の予防に役立つ機能性食品としての羅布麻葉の有効性を検討するため, 以下の研究を行った.



(from “Chinese Materia Medica Dictionary”)<sup>2)</sup>

**Fig. 1. Luobuma : *Apocynum venetum* L.**

## 第1章 羅布麻の基原植物

### 第1節 羅布麻葉の確認試験

#### 第1項 背景

緒言で述べたように、羅布麻 (*A. venetum*) は中国から中央アジアにかけて広く分布し、<sup>2,3)</sup> その葉部を乾燥して製した生薬“羅布麻葉”は、日本、中国、アメリカ等でお茶製品やエキス製剤等に加工され広く健康食品として用いられている。しかし、中国における羅布麻葉の基原の中には *A. venetum* の葉部に代わり、繊維採取用の原料植物であった近縁植物 *Poacynum hendersonii* (Hook f.) Woodson (白麻)<sup>20)</sup> の葉部が流通しており、羅布麻葉製品の製造にあたってはあらかじめその基原を明らかにしておく必要がある。

Nishibeらは *A. venetum* と *P. hendersonii* の葉部の外部形態ならびに内部形態の研究から、その形態学的な鑑別は可能であることを報告している。<sup>21)</sup> しかし両者の葉部の外部形態は酷似しており、茎部の外部形態等の全体の比較も行わない限り、葉部の外部形態のみから一見して両者を鑑別するのはきわめて困難と思われる。

これまでの成分研究から *A. venetum* と *P. hendersonii* のフラボノイド成分に相違のあることが明らかになっており、<sup>22)</sup> 本章では、その指標成分 hyperoside (HP), isoquercitrin (IQ), quercetin-3-*O*-sophoroside に基づいた簡便な薄層クロマトグラフ法 (thin-layer chromatography: TLC) による *A. venetum* と *P. hendersonii* の確認試験の検討を行った (Fig. 2)。

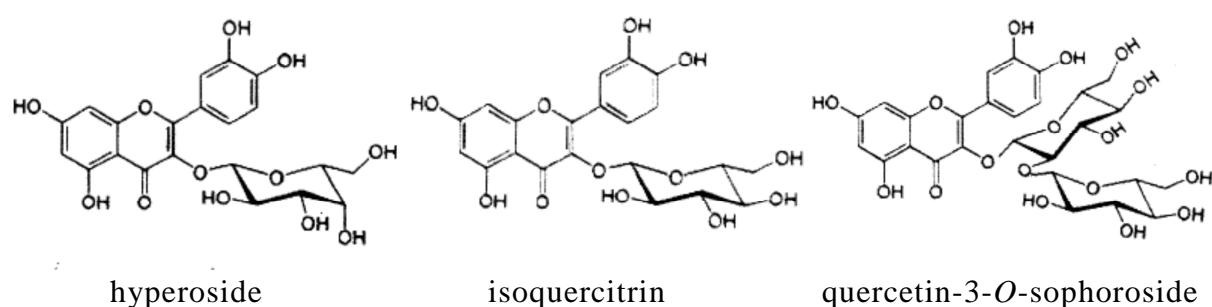


Fig. 2. Structures of Flavonoids

## 第 2 項 実験方法

### (1) 羅布麻茶葉及び羅布麻茶葉エキスの調製

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), 以下の方法で羅布麻茶葉及び羅布麻茶葉エキス (LLE : Luobuma leaf extract) 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葉とした. この茶葉 100g に対し, 95-100℃の湯で 1,000 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℃で噴霧乾燥後, 粉碎して調製した粉末を LLE とした.

### (2) 実験材料

*A. venetum* (羅布麻) を基原とするもの : 羅布麻茶葉,<sup>23)</sup> LLE,<sup>23)</sup> 羅布麻葉 a (2003 年 8 月中国新疆, 石河子の薬局で購入), 羅布麻葉 b (2003 年 8 月中国天津の薬局で購入), 羅布麻葉 c (1999 年 7 月中国上海の薬局で購入), 野生品 a (2003 年 8 月中国山東省, 川口区で採集), 野生品 b (2003 年 8 月中国山東省, 川口区で採集), 野生品 c (2003 年 8 月中国新疆, 石河子で採集), 野生品 d (2003 年 8 月中国新疆, 尉犁で採集), バシクルモン栽培品 a (2003 年 8 月北海道医療大学薬学部), バシクルモン栽培品 b (2003 年 8 月千葉大学薬学部).

*P. hendersonii* (白麻) を基原とするもの : 羅布麻茶 a (2003 年 8 月新疆, コルラで購入), 羅布麻茶 b (2003 年 8 月新疆, コルラで購入), 野生品 (2003 年 8 月新疆, 尉犁で採集).

標準品 : HP (常磐植物化学研究所から購入), IQ (フナコシから購入), quercetin-3-O-sophoroside (*P. hendersonii* から単離<sup>22)</sup>).

### (3) 薄層クロマトグラフ法

TLC は RP-18 (Merck) を用い, 第 14 改正日本薬局方の一般試験法“薄層クロ

マトグラフ法”の規定に準じて行った。

#### (4) 羅布麻葉 (*A. venetum* を基原) の確認試験

材料葉の粉末 1,000 mg (LLE は 200 mg) にメタノール 10 ml を加え、水浴上で 3 分間加温し、冷却後、ろ過し、ろ液を試料溶液とした。この液につき、TLC 法により試験を行った。試料溶液 10  $\mu$ l を TLC 用 RP-18 にスポットした。次に水/酢酸/メタノール混液 (6 : 2 : 1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾した。これに塩化鉄 (III) 試液を噴霧し、相対移動距離 (retention factor :  $R_f$ ) 値 0.3 付近の暗青色の主スポット (HP と IQ) を確認した。

#### (5) *P. hendersonii* (白麻) を基原とする場合

羅布麻葉の TLC による確認試験において、 $R_f$  値 0.3 付近の暗青色のスポット (IQ) に加え、 $R_f$  値 0.5 付近の暗青色のスポット (quercetin-3-*O*-sophoroside) を確認した。

### 第 3 項 結果

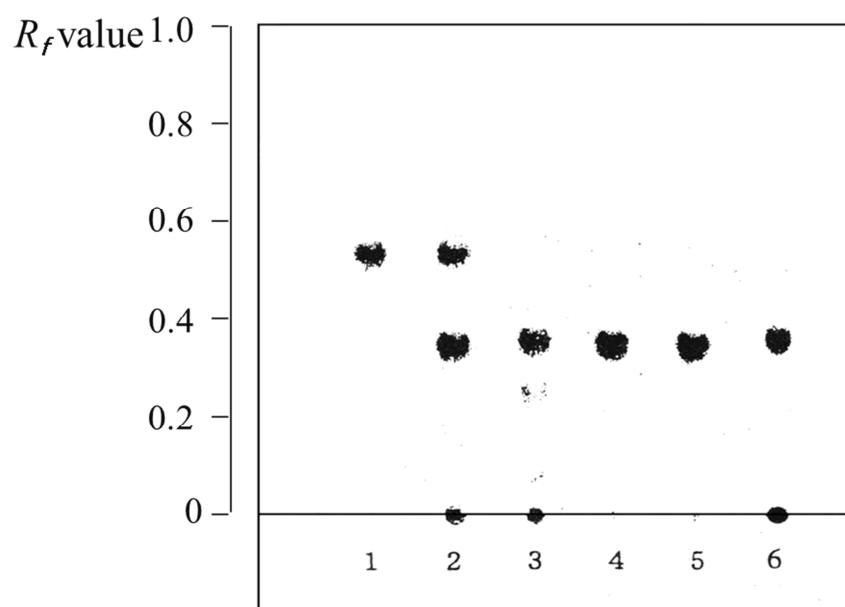
#### (1) 確認試験

羅布麻葉の確認試験で、薄層板に Silica gel 60 (Merck) を用いた TLC [展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水/酢酸 (10 : 3 : 2 : 5)] の場合は、*A. venetum* の指標成分 HP と IQ のスポットは重なりワンスポットとして認められた。さらに、*A. venetum* に含まれるクロロゲン酸のスポットの  $R_f$  値が *P. hendersonii* の指標成分 quercetin-3-*O*-sophoroside のスポットの  $R_f$  値と非常に接近した。

RP-18 による TLC パターンを Fig. 3 に示す。RP-18 も *A. venetum* の HP と IQ のスポットは重なり、 $R_f$  値 0.3 付近にワンスポットとして認められた。*P. hendersonii* では、 $R_f$  値 0.3 付近のスポットに加え、 $R_f$  値 0.5 付近の quercetin-3-*O*-sophoroside のスポットが確認された (Fig. 3)。これらフラボノイド成分はいずれのスポットも塩化鉄 (III) 試液噴霧による検出が 50 ng/ml の濃度まで確実であった。

基原の明らかな各種実験材料では、*A. venetum* を基原とするもの及び日本で

の栽培品 *A. venetum* var. *basikurumon* の葉部はすべて Fig. 3 の **3** に, *P. hendersonii* を基原とするものは **2** に示す TLC パターンとなった (Fig. 3). また, 羅布麻茶葉は **6** に示す TLC パターンとなった (Fig. 3).



**Fig. 3. TLC Chromatogram of Luobuma**

Samples: **1.** quercetin-3-*O*-sophoroside (1 mg in 2 ml MeOH) **2.** origin of *Poacynum hendersonii* **3.** origin of *Apocynum venetum* **4.** HP (1 mg in 2 ml methanol) **5.** IQ (1 mg in 2 ml methanol) **6.** Luobuma tea leaf

Plate : RP-18 (Merck), Solvent: water - acetic acid - methanol (6 : 2 : 1),

Detection: spraying the plate with FeCl<sub>3</sub> soln.

#### 第4項 考察

薄層板に Silica gel 60 (Merck) を用いた TLC [展開溶媒 : クロロホルム/メタノール/水/酢酸 (10 : 3 : 2 : 5)] の場合は, *A. venetum* と *P. hendersonii* の TLC パターンはそれぞれのスポットの位置が接近していたことから, フラボノイドの標品との比較を行わない限り *A. venetum* と *P. hendersonii* との鑑別は困難

であった。

一方, RP-18 も *A. venetum* の HP と IQ はワンスポットとして認められたが, もう 1 つの指標成分 *P. hendersonii* からの quercetin-3-*O*-sophoroside のスポット  $R_f$  値 0.5 付近には *A. venetum* では全くスポットが認められなかった (Fig. 3). このことは, HP と IQ のスポットが重なっても quercetin-3-*O*-sophoroside の有無が両者の相違点になることを示したことになる. よって  $R_f$  値 0.3 付近にのみスポットを認めたものは *A. venetum* を基原とするもの,  $R_f$  値 0.3 付近に加えて  $R_f$  値 0.5 付近にスポットを認めたものは *P. hendersonii* を基原とするものと, 両者の基原の確認は可能となった.

次に基原の明らかな各種実験材料について確認試験の適用を試みた. その結果, 羅布麻葉で *A. venetum* を基原とするもの及び日本での栽培品 *A. venetum* var. *basikurumon* の葉部はすべて Fig. 3 の **3** に, *P. hendersonii* を基原とするものは **2** に示す TLC パターンとなり, どの実験材料においても基原の確認が可能であった (Fig. 3). 羅布麻茶葉の TLC も  $R_f$  値 0.3 にのみスポットを認め,  $R_f$  値 0.5 にはスポットを認めず *A. venetum* を基原とすることが確認できた (Fig. 3).

## 第2節 hyperoside と isoquercitrin の定量

### 第1項 背景

羅布麻葉のフラボノイド主成分である HP と IQ について, Taubert らはブタの冠動脈を用いた試験で一酸化窒素 (nitric oxide : NO) による血管内皮依存性弛緩作用<sup>24)</sup>を, Schussler らは心筋活性作用<sup>25)</sup>を報告している. これらフラボノイド成分は羅布麻葉の血圧に関与する成分の1つと考えられる.

Nishibe らはすでに液体クロマトグラフ法 (high performance liquid chromatography : HPLC) による羅布麻葉中のこれらフラボノイド成分の定量を報告している.<sup>12)</sup> 今回はエキスを原料とするお茶製品の製造過程で, お茶製品のみならず, その原料エキス, エキス原料の羅布麻葉いずれについても同一条件でフラボノイド成分の含量測定ができる方法を検討した.

### 第2項 実験方法

#### (1) 実験材料

第1節の確認試験で用いた *A. venetum* を基原とする試料, 及び LLE 0.44% を含有するよう調製した羅布麻茶液を使用した.

#### (2) 羅布麻葉

材料葉の粉末約 400 mg (LLE は 100 mg) を精密に量り, 水で希釈したメタノール (1→2) 20 ml を加え, 還流冷却器を付けて水浴上で30分間加熱し, 冷却後, ろ過した. 残留物は, 薄めたメタノール (1→2) 20 ml を加え, 同様に操作した. 全ろ液を合わせ, 薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 50 ml とし, 試料溶液とした. 別に HP 及び IQ をそれぞれ約 2 mg を精密に量り, メタノール 50 ml に溶かし, 水を加えて正確に 100 ml とし, 標準溶液とした. 試料溶液及び標準溶液 30 µl ずつを正確にとり定量を行った. HP 及び IQ の検量線はいずれも標準溶液の調製法により標準溶液 10-120 µg/ml で調製し, 既報<sup>12)</sup>と同じく良好な直線性と相関係数を得た.

### (3) 羅布麻茶液

試料溶液 30  $\mu$ l を正確にとり定量を行った。検量線は前項で作成したものを  
用いた。

### (4) 液体クロマトグラフ法の測定条件

第 14 改正日本薬局方の一般試験法“液体クロマトグラフ法”の規定に準じ、  
絶対検量線法により行った。

装置：Jasco PU-980, Jasco CO-965, カラム：Navi C18-5 (4.6 mm $\times$ 250 mm) (和  
光純薬工業), カラム温度:45 $^{\circ}$ C, 移動相:メタノール/水/酢酸 (100 : 300 : 20,  
v/v), 検出器:紫外吸光光度計 (Jasco UV - 975), 測定波長:330 nm, 流量:1.0 ml/  
分

## 第 3 項 結果

HPLC による定量結果を Table 1 に示す。A. *venetum* を基原とする試料及び羅  
布麻茶液の全材料において HP と IQ の含有が認められ、羅布麻茶葉及び羅布麻  
葉における含有量は、HP が 0.10-0.42%, IQ が 0.13-0.38%であった。また、羅布麻  
茶葉、及びこれを原料として作製した LLE 及び羅布麻茶液における HP と IQ は  
ほぼ 1 : 1 の割合で含有していた。

## 第 4 項 考察

HPLC を用いたフラボノイド成分の定量は、A. *venetum* を基原とするお茶製  
品、製造過程でのお茶製品の原料エキス、エキス原料の羅布麻葉のいずれにも  
それぞれ同一の HP 及び IQ の標準溶液を用いることができ、羅布麻製品の品質  
を管理する上で簡便性を与えることができたと考える。



**Table 1. Content of Flavonoids in Luobuma (%)**

	HP	IQ
Luobuma leaf tea leaf	0.24	0.22
LLE	0.66	0.66
Luobuma tea (liquid)	$2.8 \times 10^{-3}$ (w/v)	$2.9 \times 10^{-3}$ (w/v)
Luobuma a	0.23	0.24
Luobuma b	0.28	0.26
Luobuma c	0.28	0.27
Wild plant a	0.23	0.38
Wild plant b	0.32	0.24
Wild plant c	0.22	0.24
Wild plant d	0.10	0.13
Cultivated a	0.42	0.28
Cultivated b	0.35	0.32

## 第2章 羅布麻茶葉エキスの降圧作用とそのメカニズム

### 第1節 ラットを用いた羅布麻茶葉エキス経口投与試験

#### 第1項 背景

羅布麻葉の高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats: SHR) に及ぼす影響については報告されているが,<sup>19)</sup> LLE の SHR と正常ラットの血圧あるいは摂餌量, 体重に及ぼす影響について述べた報告はない。

そこで今回は SHR と, 正常血圧ラットの遺伝的対照として広く用いられているウィスター京都ラット (WKY) を用い, それぞれに LLE の混合飼料を自由摂取させ, SHR の血圧, 摂餌量及び体重に及ぼす影響, 及び WKY の血圧及び体重に及ぼす影響について検討した。

#### 第2項 実験方法

##### (1) 実験材料 (羅布麻茶葉エキスの調製)

LLE は第2章第1節第2項に準じ調製した。指標フラボノイド成分 HP 及び IQ を HPLC により定量し,<sup>26)</sup> 各 6 mg/g 含むことで品質の確認を行った。

LLE の栄養学的評価を Table 2 に示す。<sup>23)</sup> Mg が多く含まれ, カフェインは含まれなかった。

**Table 2. General Components in LLE**

Constituents	Unit		Analytical methods
Water	g/100g	5.8	The normal pressure heat-drying
Protein	"	4.7	Kjeldahl
Lipid	"	0.5	Acid digestion
Ash	mg/100g	18.2	Direct burning
Na	"	580	Atomic absorption method
K	"	3800	"
Ca	"	1100	"
Mg	"	800	"
Caffeine	"	N.D.	HPLC

N.D., non detection

## (2) 実験動物

4週齢の雄性SHR及び正常ラットとして同週齢のWKY(船橋農場)を購入後、温度 $22.5\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ の条件下の動物室にて飼育した。2週間の予備飼育後、血圧及び体重を測定し、各群6-7匹の収縮期血圧の平均値が等しくなるように群分けした。飼料は船橋農場のSP粉末飼料(SHR用普通飼料)及び水道水を24時間自由摂取させた。

本研究は「実験動物の飼育及び保育等に関する基準」(昭和55年3月総理府告示第6号)を遵守して行った。

## (3) 投与方法

SHRにおける試験では、予備飼育後、LLEを1.25%(低用量)、2.5%(中用量)、5%(高用量)混合した粉末飼料を6週齢から7週間自由摂取させ、8週目より正常飼料に置き換えた。また、WKYにおける試験では、予備飼育後、LLEを5%混合した飼料を6週間自由摂取させた。

## (4) 測定方法

収縮期血圧の測定は $39^{\circ}\text{C}$ 前後の保湿器の中に、ラットを約3分入れた後、無麻酔状態でテールカフ法(ソフトロン)により測定した。LLE適用期間中は、1週間または2週間毎に血圧、体重及び摂餌量を測定した。摂餌量は1ケージ(3-4匹)毎に測定したものを1匹あたりの摂餌量に換算した。LLE摂取量は、摂餌量と飼料へのLLE混合率から求め、1匹あたりに換算した。

## (5) 統計処理

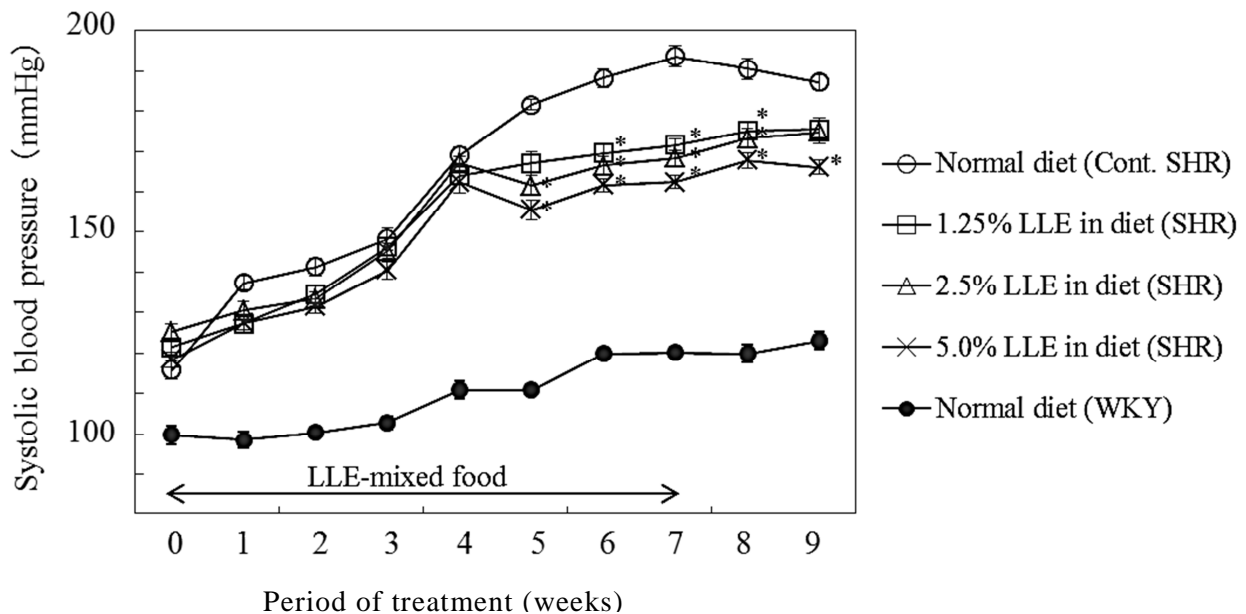
各試験群の測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。F検定により分散分析を行った後、Scheffe's post-hoc procedure testを用いて有意差検定を行った(有意差水準は5%未満)。

### 第3項 結果

#### (1) 高血圧自然発症ラットにおける血圧への影響

試験期間中の血圧の変化を Fig. 4 に示す. LLE 投与 5 週目から, 2.5% 及び 5% 混入した群は非投与群に比べて有意な降圧作用を示した. LLE 投与 6 週目からはいずれの群も有意な降圧作用が見られ, 安定した昇圧の抑制作用とその用量反応性が認められた.

LLE の混餌を 7 週間適用後 2 週間休止したが, 降圧効果はこの間ほぼ持続し LLE 摂取中止によるリバウンド現象は見られなかった.



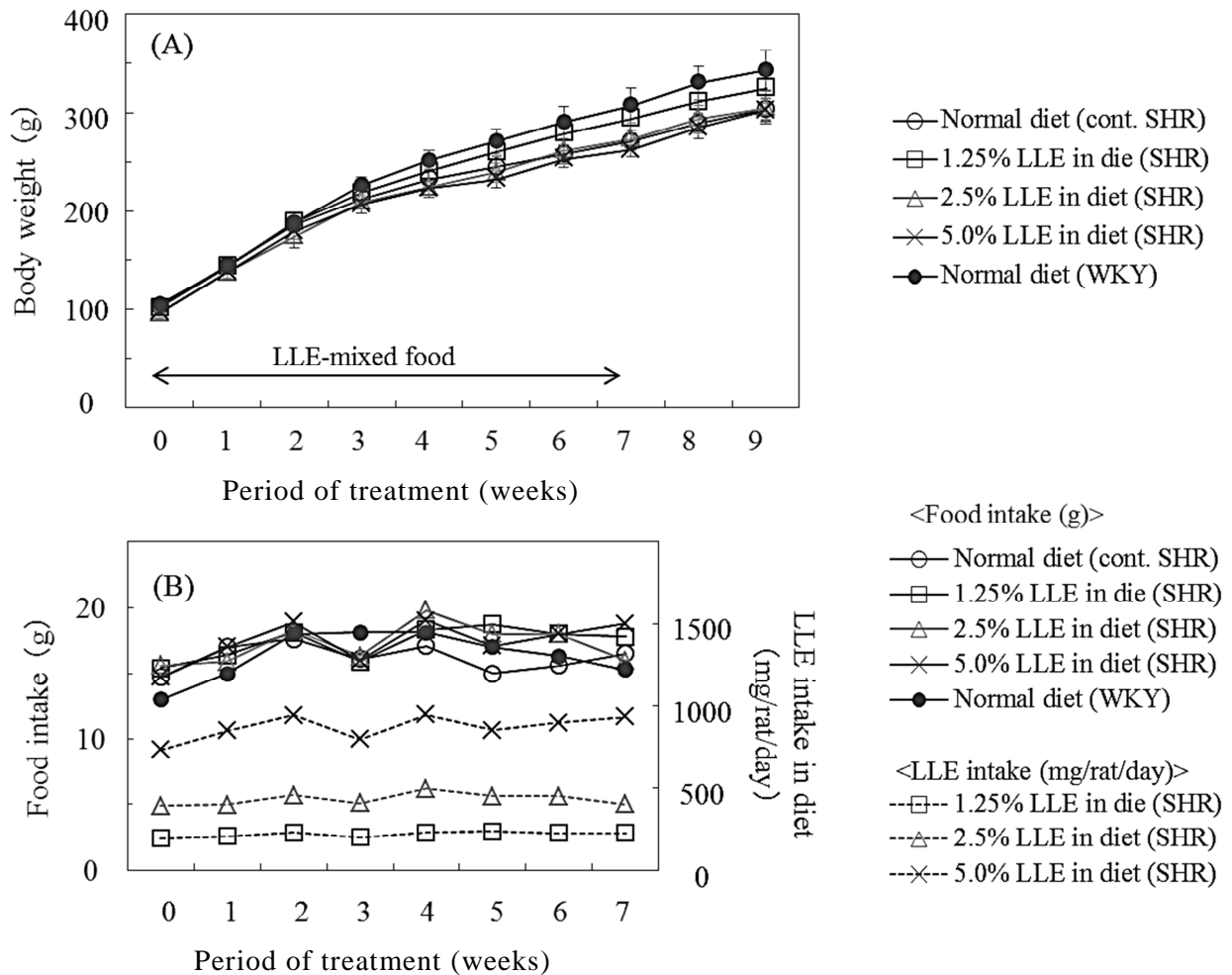
**Fig. 4. Effect of LLE on Blood Pressure**

Each value represents the mean±S.E.M. ( $n=7$  or  $6$ ). After 3 weeks, the 1 of 7 SHR in 2.5% LLE group was neglected because of its poor growth. \*  $p<0.05$  vs control group (Scheffe's post-hoc procedure test)

#### (2) 高血圧自然発症ラットにおける体重及び摂餌量への影響

LLE を混合した飼料摂取期間中の体重及び摂餌量の経日変化を Fig. 5 に示す. 対照群と LLE を 1.25-5% 混入した群を比較したとき, いずれの群においても

体重及び摂餌量に差は認められなかった。



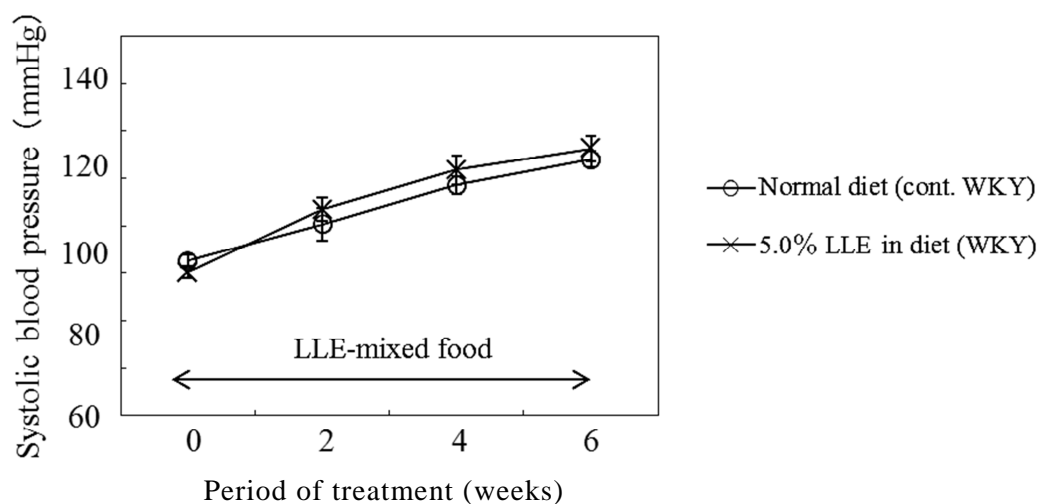
**Fig. 5. Effect of LLE on Body Weight (A) and Food Intake & LLE (B)**

(A) Each value represents the mean±S.E.M. ( $n=7$  or  $6$ ). After 3 weeks, 1 of 7 SHR in 2.5% LLE group was neglected because of its poor growth.

(B) Each value represents the average amount of a cage of 3-4 animals.

### (3) ウィスター京都ラットにおける血圧への影響

試験期間中のWKYの血圧の変化をFig. 6に示す。正常飼料の摂取群及びLLE摂取群共に、実験前の血圧が約90 mmHg, 6週間目で約120 mmHgであり加齢による軽度な血圧の上昇が見られたが、LLE摂取による血圧への影響は見られなかった。

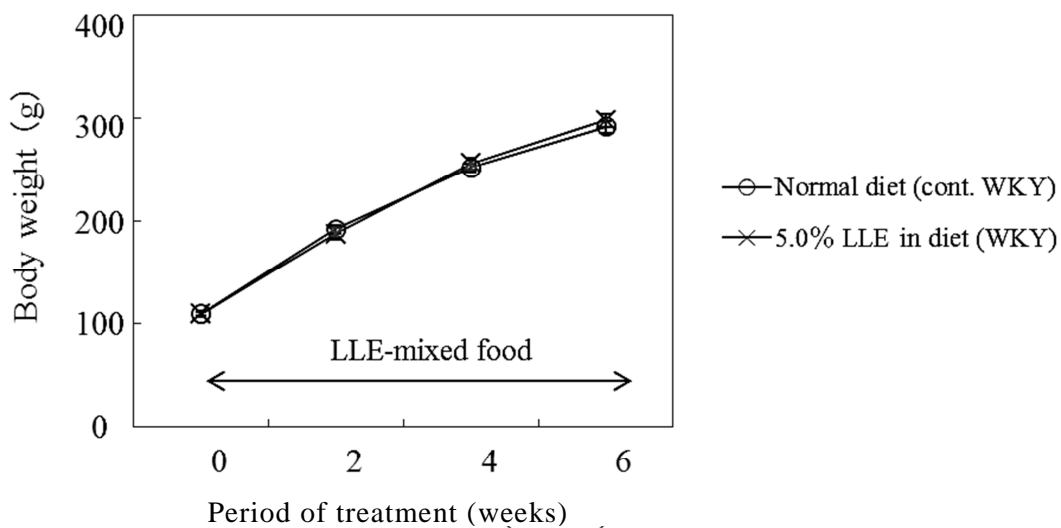


**Fig. 6. Effect of LLE on Blood Pressure in WKY**

Each value represents the mean±S.E.M. ( $n=6$ ).

#### (4) ウィスター京都ラットにおける体重への影響

試験期間中のWKYの体重の経日変化をFig. 7に示す。正常飼料摂取群とLLE摂取群を比較したとき、差は認められなかった。



**Fig. 7. Effect of LLE on Body Weight in WKY**

Each value represents the mean±S.E.M. ( $n=6$ ).

#### 第4項 考察

LLE 1.25%, 2.5% 及び 5.0% 混入した飼料を SHR に給餌した結果, 5 週目から降圧効果が発現し, また用量に依存した降圧が見られた. 7 週間適用後, 2 週間混餌を休止したが降圧効果は持続し, 急激な昇圧はきたさなかった. 今回の血圧の経日変化の結果から, いずれの用量の群においても安定した降圧効果が見られるようになるのは投与 6 週間後頃と考えられた.

次に, WKY に LLE 5.0% 混入した飼料を給餌した結果, 降圧作用は見られなかった. つまり, LLE は SHR に対しては降圧作用を示すが, 正常ラットである WKY の血圧には影響しなかった. このことから, LLE は交感神経活動の亢進しているといわれている SHR の血圧にのみ作用し, ホメオタシスを維持している WKY の血圧には影響しないことが考えられる.

また, 以上の結果から, 今回用いた LLE の用量では, 体重, 摂餌量等一般症状には, いずれも影響しないと推察される.

## 第2節 ラットを用いた羅布麻茶葉エキス十二指腸内投与試験

### 第1項 背景

第2章第1節の結果より、無麻酔状態下では、LLEを正常ラットであるWKYに慢性経口投与しても血圧には影響が認められないが、SHRでの慢性経口投与では6週目から有意な降圧作用を認めたことを述べた。<sup>23)</sup>

そこで本項ではSHRを用い、麻酔下でのLLEの十二指腸内 (intraduodenal: *i.d.*) 投与による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はラク トトリペプチド、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を有効成分とし、その降圧作用はアンギオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme: 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。<sup>27)</sup> LLEによる降圧作用がACEの阻害によるものか否かを検討するために、LLEを麻酔したSprague Dawley系ラットに*i.d.*投与した。

### 第2項 実験方法

#### (1) 実験材料

LLEの調製及び品質の確認は第2章第1節第2項に準じ行った。

#### (2) 使用薬物

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

#### (3) 実験動物

体重360-420gの雄性SHR(船橋農場)及び雄性Sprague Dawley系ラットを購入後、温度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 20\%$ 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(船橋農場))及び水道水を24時間自由摂取させた。



本研究は「実験動物の飼育及び保育等に関する基準」（昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号）を遵守して行った。

#### (4) 測定方法

実験は、20% Urethane 500 mg/kg 及び 2%  $\alpha$ -chloralase 50 mg/kg の混合液（腹腔内投与, intraperitoneal : *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。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。*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して行った。

#### (5) 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 (intravenous : *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 500  $\mu$ l/100g (体重), *i.v.*用には 50-100  $\mu$ l/100g (体重) とした。

##### i) 十二指腸内単回投与時の降圧と用量反応性 (高血圧自然発症ラットにおける検討)

実験 ii, iii を行うにあたり麻酔した SHR に LLE 30, 100, 300, 1,000 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見た。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 分以上の間隔をあけ, 次の LLE を投与した。

##### ii) ノルアドレナリンによる昇圧及びアセチルコリンによる降圧作用に対する影響 (高血圧自然発症ラットにおける検討)

麻酔した SHR において, LLE (*i.d.*) 投与が NA 及び ACh による作用に及ぼす

影響について検討した。実験 i 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 1,000 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、NA を 3 または 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (*i.v.*), 及び ACh を 1 または 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (*i.v.*) 投与した。

### iii) angiotensin I の昇圧作用に対する影響 (Sprague Dawley ラットにおける検討)

Sprague Dawley 系ラットに LLE (*i.d.*) 投与後、10、30 及び 50 分後に angiotensin I を 300 ng/kg (*i.v.*) 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 i の用量反応性に関する結果から 300 及び 1,000 mg/kg とした。

## (6) 統計処理

各実験群の測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。有意差検定については、実験 i 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 ii では、分散分析後、対応のある *t*-test により LLE投与前後の比較を行った。実験 iii 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。

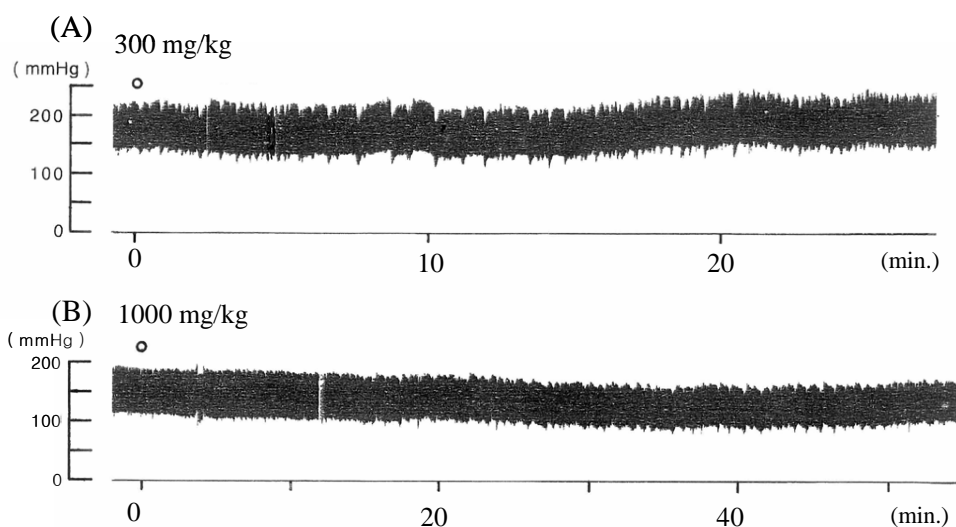
## 第 3 項 結果

### (1) 十二指腸内単回投与時の降圧と用量反応性 (高血圧自然発症ラットにおける検討)

LLE 投与により、投与量に依存して有意な血圧低下が認められた。標準的な降圧パターンを Fig. 8 に示す。LLE 投与後、10 分前後から緩徐な降圧作用が見られ始め、最大降圧は投与後約 30-40 分後であった。収縮期血圧の最大降圧値については、30 mg/kg から 300 mg/kg においては 9 mmHg から 21 mmHg と降圧は増大したが、それ以上の用量 (1,000 mg/kg) では降圧の増大は見られなかった (Table 3)。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。



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

**Fig. 8. Standard Pattern of Decrease in Blood Pressure by LLE**

**Table 3. Dose-response Curve of Hypotensive Effect of LLE**

Dose of LLE ( mg/kg, <i>i.d.</i> )	<i>n</i>	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

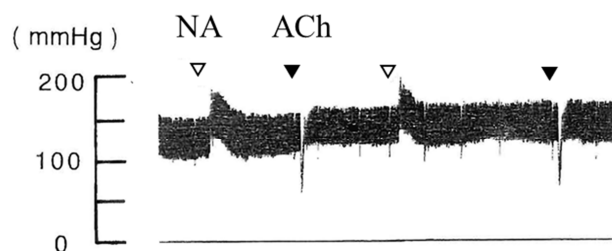
B.P. : blood pressure. Each value represents the mean±S.E.M. (*n*=3-9).

**(2) ノルアドレナリンによる昇圧及びアセチルコリンによる降圧作用に対する影響 (高血圧自然発症ラットにおける検討)**

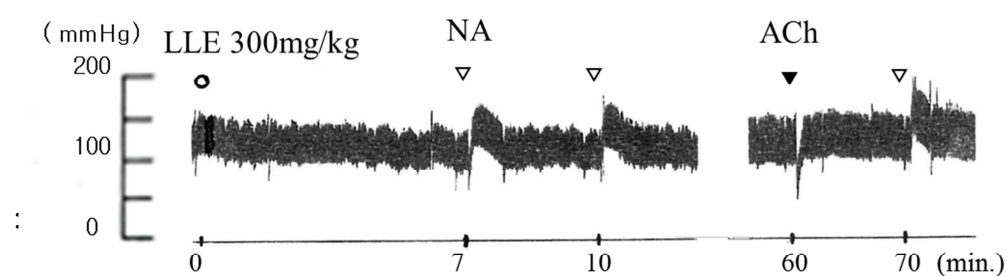
LLE の低用量及び高用量処置はいずれも、NA による昇圧及び ACh による降

圧作用に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 9, Table 4, 5).

**A: Precontrol (Before Administration of LLE)**



**B: After Administration of LLE**



Before administration of 300 mg/kg LLE (*i. d.*), NA and ACh (*i. v.*) were administered as precontrol.  
 ○: LLE, ▽: NA, ▼: ACh

**Fig. 9. Effect of Pretreatment with LLE on NA-induced Increase and ACh-induced Decrease in Blood Pressure in SHR**

**Table 4. Effect of Pretreatment with LLE on NA-induced Increase in Blood Pressure of SHR**

Dose of LLE (mg/kg, <i>i.d.</i> )	<i>n</i>	Treatment	Max. increase in B.P. by NA (3-5 $\mu$ g/kg) (mmHg)
Low dose (30 or 100)	4	before	31.9 $\pm$ 1.56
	4	after	38.5 $\pm$ 6.65
High dose (30 or 1000)	3	before	46.8 $\pm$ 8.57
	3	after	41.7 $\pm$ 8.33

B.P. : blood pressure. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. (*n*=3 or 4).

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

**Table 5. Effect of Pretreatment with LLE on ACh-induced Decrease in Blood Pressure of SHR**

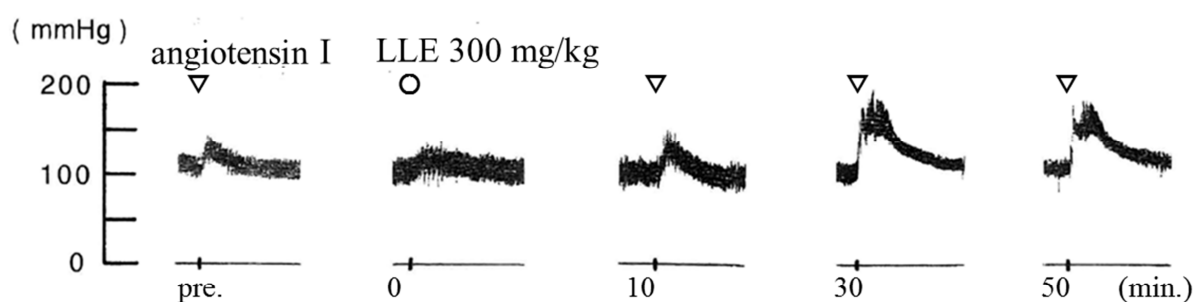
Dose of LLE (mg/kg, <i>i.d.</i> )	<i>n</i>	Treatment	Max. decrease in B.P. by ACh (1-2 µg/kg) (mmHg)
Low dose (30 or 100)	6	before	59.8 ± 1.45
	6	after	57.5 ± 4.08
High dose (300 or 1000)	4	before	51.9 ± 3.13
	4	after	46.9 ± 3.73

B.P. : blood pressure. Each value represents the mean±S.E.M. (*n*=6 or 4).

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

**(3) angiotensin I の昇圧作用に対する影響 (Sprague Dawley ラットにおける検討)**

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 LLE 投与前と比較して有意な昇圧の抑制は認められなかった (Fig. 10, Table 6). 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見られなかった. なお LLE 前処置はいずれの量においても Sprague Dawley 系ラットの血圧に影響を及ぼさなかった. 生理食塩水のみでの *i.v.*投与も血圧に影響を及ぼさなかった.



Before and after administration of 300 mg/kg LLE (*i. d.*), angiotensin I (*i. v.*) were administered. ○: LLE, ▽: angiotensin I

**Fig. 10. Effect of Pretreatment with LLE on Angiotensin I -induced Increase in Blood Pressure in Sprague Dawley Rats**

**Table 6. Effect of Pretreatment with LLE on Angiotensin I -induced Increase in Blood Pressure of Sprague Dawley Rats**

Dose of LLE (mg/kg, <i>i.d.</i> )	<i>n</i>	Time after LLE administration (min.)	Max. increase in B.P. by angiotensin I (300 ng/kg, <i>i.v.</i> )(mmHg)
300	6	Pre.	32.5 ± 4.23
	6	10	38.3 ± 5.73
	6	30	48.0 ± 8.08
	6	50	44.2 ± 5.97
1000	4	Pre.	48.8 ± 8.26
	4	10	53.8 ± 7.47
	4	30	57.5 ± 7.77
	4	50	57.5 ± 5.95

B.P. : blood pressure. Each value represents the mean±S.E.M. (*n*=6 or 4).

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

#### 第 4 項 考察

麻酔した SHR を用いた本実験では、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見られるが、300 mg/kg 以上に用量を増大しても最大降圧は増加しなかった (Table 3)。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可能性や作用部位での反応の天井効果が考えられる。また、降圧の持続時間は 300 mg/kg ではおよそ 10 分、1,000 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. 8) 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。

本実験で LLE は、SHR への単回投与で有意な降圧作用を示したが、本章第 1 節の慢性経口投与では、LLE は SHR に対し 5 または 6 週目から有意な降圧作用を示し (Fig. 4),<sup>23)</sup> 効果の発現までの時間に差が認められた。これは、前者では LLE 投与時の SHR 血圧が約 150mmHg だったのに対し、後者では LLE 投与開始時の SHR は 6 週齢 (血圧約 120mmHg) であったため、すぐに降圧は見られず、徐々に血圧が上がった 5 週間目頃から降圧作用が認められたと考えられる。ま

た、前者は麻酔下、後者は無麻酔下であったため、後者はより交感神経が働いていると考えられ、このことも降圧発現時期の差に影響している可能性が考えられる。

また LLE の *i.d.*投与は NA や ACh の血圧反応に影響しなかった (Fig. 9, Table 4, 5). 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見られないことが示唆された。

LLE の *i.d.*投与後の NA による昇圧作用には影響がなかった (Fig.9, Table 4) ことから、 $\alpha$  受容体や  $\beta$  受容体遮断に基づく降圧ではないと考えられる。また、麻酔した Sprague Dawley ラットにおける angiotensin I から angiotensin II に代謝された後昇圧する作用に対して、LLE は抑制しなかった (Fig. 10, Table 6) 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。

### 第3節 ラット腸間膜動脈を用いた羅布麻茶葉エキス灌流試験

#### 第1項 背景

第2章第1節及び第2節の結果より、LLEは、無麻酔状態でも麻酔状態でもSHRでは有意な降圧作用を有し、<sup>23,28)</sup> その降圧作用は、少なくとも麻酔したSprague DawleyラットではACE阻害によるものではないことが確認された。<sup>28)</sup>

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、抵抗血管では内皮由来過分極因子 (endothelium-deprived hyperpolarizing factor : EDHF) が重要な役割を果たしていることが示唆されている。<sup>29)</sup> Kwanらは羅布麻葉エキスをラットの摘出冠動脈に投与し、内皮由来弛緩因子であるNOによる内皮依存性の血管弛緩作用を有することを報告している。<sup>30)</sup> 本項では、さらに血管へのLLEの作用を調べることを目的に、血圧調節の主要部位である抵抗血管の細動脈を含む腸間膜動脈血管床の摘出標本を用いてLLEの血管拡張作用とその発現機序について検討した。

#### 第2項 実験方法

##### (1) 実験材料

LLEの調製及び品質の確認は第2章第1節第2項に準じ行った。

##### (2) 使用薬物

各種試薬は次のものを使用した。ACh (第一製薬), methoxamine hydrochloride (日本新薬), papaverine (大日本製薬), sodium deoxycholate (SD, Sigma), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigama), indomethacin (和光純薬工業), KCl (和光純薬工業), tetraethylammonium (TEA, Sigma), atropine sulfate (和光純薬)。

indomethacin 及び SD を除く全ての試薬は蒸留水に溶解させ、2-7  $\mu$ M methoxamine を含む Krebs-Ringer bicarbonate 液 (以下 Krebs 液と称する。組成 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaCl 120.0 mM, KCl 5.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)-2Na 27 nM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, glucose (Glu)



1.0 mM (pH 7.4))で調製した. indomethacin は 98% エタノールに溶かし, 7  $\mu$ M 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.

### (3) 実験動物

9-11 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 280-350g) は 清水実験材料より購入し, 室温  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $45\pm 5\%$ , 照明時間(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) 及び水道水を 24 時間自由に摂取させた.

### (4) 摘出腸間膜動脈血管床標本の灌流

ラットに pentobarbital-Na を *i.p.*投与して麻酔下にて開腹し, Kawasaki らの方法<sup>31)</sup> でラット腸間膜動脈血管床を摘出して灌流標本とした. 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 液を注入して血管床内の血液を除去した後, 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/分) で灌流した. また, 標本の乾燥を防ぐため, Krebs 液 (0.5 ml/分) で標本の表面を灌流した. Krebs 液はあらかじめ 95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$  の混合ガスを飽和させ,  $37^{\circ}\text{C}$ 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, Krebs 液と共に 5 ml/分で SD (1.8 mg/ml) を 30 秒間灌流して行った.<sup>32,33)</sup> 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  $\mu$ M) を含む Krebs 液での細動脈血管平滑筋の収縮により灌流圧

を上昇させ、ACh (1 nM) 注入によって生じる内皮依存性の平滑筋弛緩反応による灌流圧低下が消失することで、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。

1) 内皮保持標本 ; 腸間膜動脈標本に Krebs 液を 5 ml/分で灌流し、弛緩反応を観察するために methoxamine (7  $\mu$ 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。灌流圧が安定した後、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  $\mu$ M methoxamine を含む Krebs 液で各濃度 (100 pg/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) に調製し、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、LLE 作用間隔時間は LLE の作用が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  $\mu$ 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内皮細胞のムスカリン受容体への作用について検討した。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  $\mu$ M, indomethacin 1  $\mu$ M, KCl 60 mM, TEA 5 mM, atropine 1  $\mu$ M) を添加して灌流圧を安定させ、さらに methoxamine (2-7  $\mu$ M) を含む Krebs 液に各薬物を添加して標本を灌流した。灌流圧を一定レベルまで上昇させた後、ACh (100 pmol) を注入して各薬物の内皮弛緩への作用を観察後、この Krebs 液で各濃度の LLE を調製し、灌流することで各薬物の LLE 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。

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) 統計処理

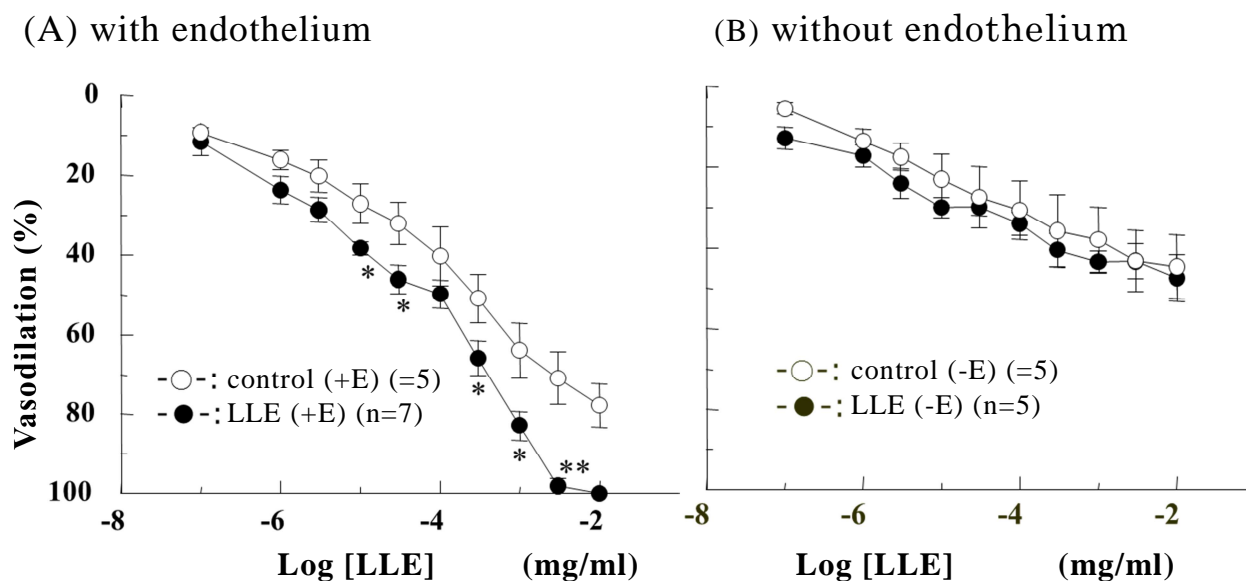
得られた実験値は平均値±標準誤差で表した。統計学的解析では 2 群間の比較を対応のない Student's *t*-test を用いた(有意差水準は 5%未満)。

## 第 3 項 結果

### (1) 羅布麻茶葉エキスの内皮保持標本及び内皮除去標本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  $\mu$ M) 含有 Krebs 液で血管を収縮させて灌流圧を上昇させ, 2 時間半の灌流で灌流圧は徐々に低下し, 当初の 20%の圧まで低下した (Fig. 11(A) コントロール). 内皮除去標本ではこの低下は軽微であった(Fig. 11(B)).

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. 11 に示す. 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. 一方, 内皮除去標本では, LLEによる弛緩は内皮保持標本と比べて顕著に抑制され, 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る LLE の血管弛緩作用には内皮依存性弛緩機序が関与することが明らかになった.



**Fig. 11. Concentration-dependent Vasodilation by LLE in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) or without Endothelium (-E) in the Presense of Active Tone Produced by Methoxamine (7 or 2  $\mu$ M)**

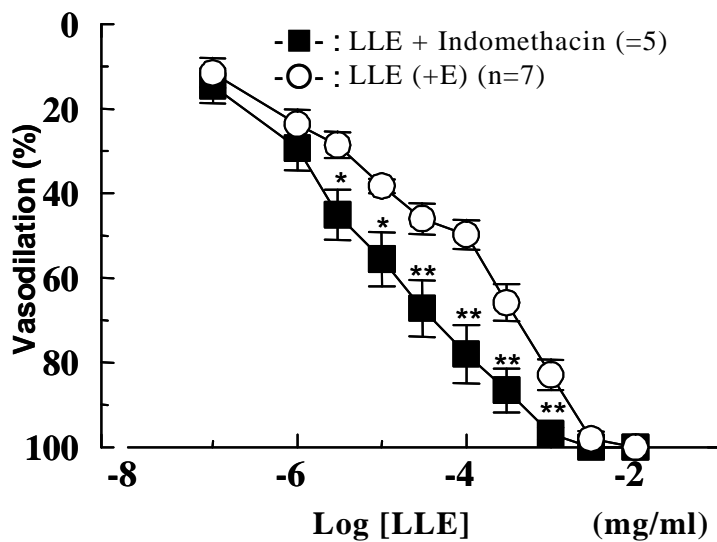
Krebs' solution containing methoxamine (7  $\mu$ M) which does not contain LLE was used as control. The vasodilation is expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100  $\mu$ M papaverine at the end of the experiment. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs responses in control.

**(2) 羅布麻茶葉エキス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による血管弛緩に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 Fig. 12 及び 13 に示す. 高 KCl を添加した 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 EDHF 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等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.<sup>34)</sup> 従って, 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

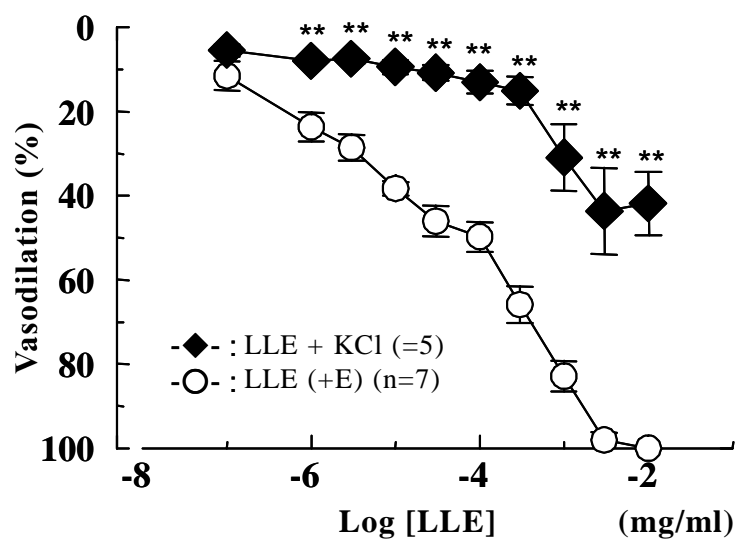
一ゼ阻害薬の indomethacin 添加では, LLE の血管弛緩作用は強くなったことから, プロスタノイド類が LLE による弛緩作用を阻害している可能性が示唆された.

さらに, LLE に L-NAME と高 KCl の両方を添加したときの血管弛緩反応を Fig. 14 に示す. 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.



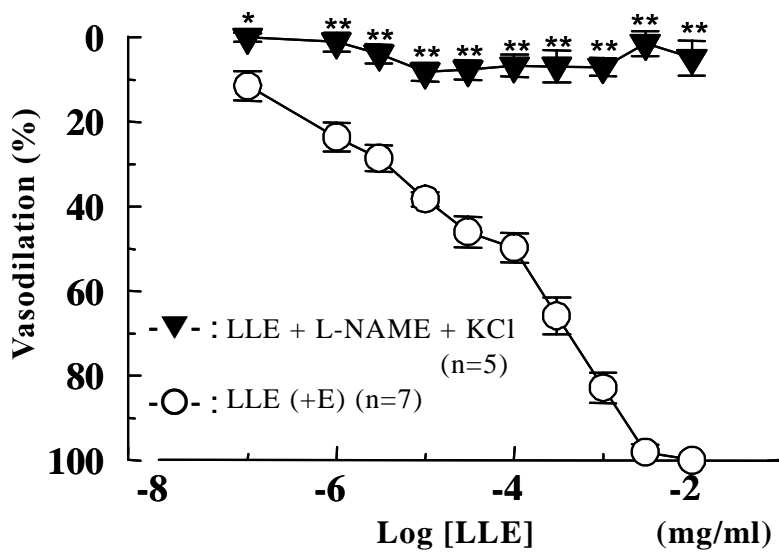
**Fig. 12. Effect of 1  $\mu$ M Indomethacin on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E)**

The vasodilation is expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100  $\mu$ M papaverine at the end of the experiment. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs responses in LLE (+E).



**Fig. 13. Effect of 60 mM KCl Containing Krebs Solution on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E)**

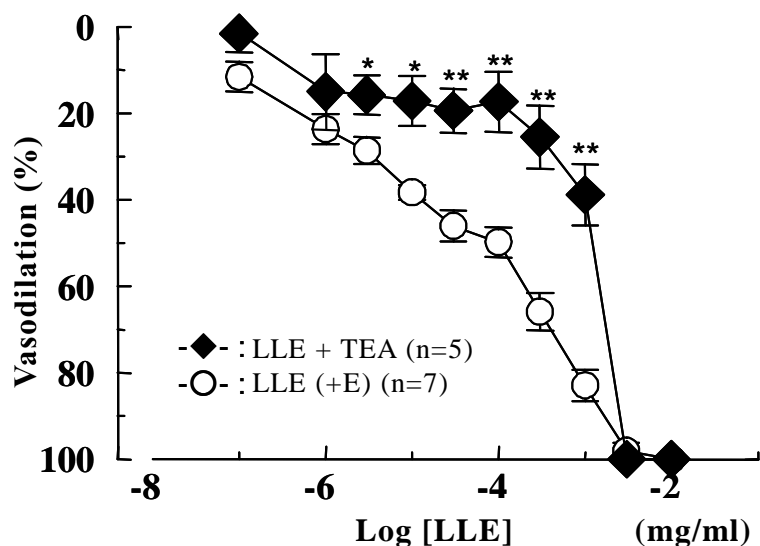
The vasodilation is expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100  $\mu$ M papaverine at the end of the experiment. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0.01$  vs responses in LLE (+E)



**Fig. 14. Effect of the Combination of 100  $\mu$ M L-NAME and 60 mM KCl Containing Krebs Solution on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesentric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E)**

The vasodilation is expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100  $\mu$ M papaverine at the end of the experiment. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs responses in LLE (+E)

ラット腸間膜動脈ではまだ EDHF の本体についてわかっていないが、その作用発現に  $K^+$ チャンネル<sup>35)</sup> 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  $K^+$ チャンネル阻害薬について検討した。Ca 依存性  $K^+$ チャンネル阻害薬である TEA を添加したときの LLE の弛緩作用を Fig. 15 に示す。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。TEA により LLE 高濃度の弛緩反応が全く抑制されなかったことは、TEA で遮断できない過分極由来の弛緩と NO による弛緩が考えられるが、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。



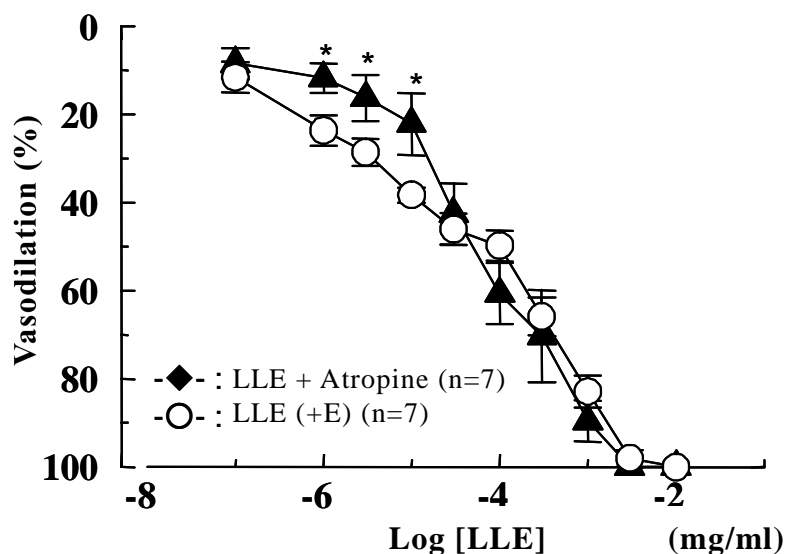
**Fig. 15 Effect of 5 mM TEA on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) (n=5)**

The vasodilation is expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100  $\mu$ M papaverine at the end of the experiment. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs responses in LLE (+E)

### (3) 羅布麻茶葉エキスの血管弛緩作用に及ぼす抗ムスカリン薬の影響

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. 16). LLE に atropine を加えて同時灌流しても LLE による弛緩作用に殆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.





**Fig. 16. Effect of 1  $\mu$ M Atropine on LLE-induced Vasodilation in Rat Perfused Mesenteric Vascular Beds with Intact Endothelium (+E) ( $n=7$ )**

The vasodilation is expressed as a percentage of the maximum relaxation induced by 100  $\mu$ mol/l papaverine at the end of the experiment. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. \* $p<0.05$  vs responses in LLE (+E)

#### 第4項 考察

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。<sup>24)</sup> 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。従って、LLEは平滑筋を過分極させ、弛緩作用を起こすと考えられた。さらに $K^+$ チャンネル阻害薬であるTEAによりLLE濃度100  $\mu$ g/ml以上を除いて有意に抑制されたことから、LLEは $K^+$ チャン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  $\mu$ 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。従って、LLEは高濃度ではNO産生を促進する作用があると考えられた。

NOは不対電子を持つラジカルであり,<sup>36)</sup> スーパーオキシドはNOと反応してNOの血管弛緩因子としての作用を消滅させる。高濃度LLEによるNO産生の促進は、LLEの抗酸化作用<sup>16)</sup>によりスーパーオキシドが消去されたことで、NO活性が上昇したことに起因すると考えられる。

以上より、血圧維持に重要な役割を担う抵抗血管について検討した本実験の結果、LLEはラット腸間膜動脈において、低濃度ではK<sup>+</sup>チャンネルを介したEDHFで、高濃度になるとEDHF及びNOによる血管弛緩作用が関与することが判明した。<sup>37)</sup>

これまでに、Kwanらは羅布麻葉エキスをラット摘出冠動脈に用い、NOによる内皮依存性の血管弛緩作用を有することを報告している。<sup>30)</sup> 従って、ラットにおけるLLEの内皮由来弛緩作用は、冠動脈血管では主にNO、抵抗血管である腸間膜血管では主にNOとEDHFによることが示唆された。

### 第3章 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの降圧作用と血管機能改善効果

#### 第1節 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの降圧作用

##### 第1項 背景

第2章第1項の結果より, LLEはSHRに対し有意な降圧作用を有することが明らかとなった.<sup>23,28)</sup>

羅布麻葉中の主フラボノイド成分はHPとIQであり, これら2成分は羅布麻茶葉から作製したLLE中にも主フラボノイド成分として含有され, その比率はほぼ1:1である.<sup>26)</sup> HPとIQのアグリコンであるquercetinには降圧作用に関する報告があるが, HPとIQに関する詳細な報告がない. 本項では, LLEの降圧作用機序のさらなる解明のため, SHRへHP, IQ及び両成分等量混合物(「HP+IQ」)を経口投与し, 血圧へ及ぼす影響について検討した.

##### 第2項 実験方法

###### (1) 実験材料

被験物質は次のものを使用した. HP (95%, アルプス薬品工業), IQ (95%, アルプス薬品工業).

###### (2) 使用薬物

試薬は次のものを使用した. カルボキシメチルセルロースナトリウム (sodium carboxymethyl cellulose : CMC, 和光純薬工業).

###### (3) 実験動物

体重 60-100g, 4週齢雄性SHR/Izm系ラットを購入(船橋農場)し, 室温 22±2°C, 湿度 55±20%の条件下で2週間の予備飼育後試験に供した. 動物は各群間の平均体重及び収縮期血圧がほぼ等しくなるよう7群(n=7)に分けた. ラットにはSP固形飼料(船橋農場)及び水道水を24時間自由摂取させた.

また, 体重 280-330g, 11週齢雄性WKYを購入(船橋農場)し, 3日間予備飼育後試験に供した. 予備飼育期間中はSHRと同様に飼育した.

本研究は「実験動物の飼育及び保育等に関する基準」(昭和55年3月総理府

告示第 6 号) を遵守して行った。

#### (4) 投与方法

被験物質 HP, IQ, 「HP+IQ」はいずれも 0.5% CMC に懸濁し, 1 ml/100g 体重に調製した。「HP+IQ」は HP 及び IQ を 1:1 に混合して用いた。投与用量は, HP 及び IQ はそれぞれ 20, 40 mg/kg, 「HP+IQ」は 40 mg/kg, 対照群には 0.5%CMC を投与した。被験物質の投与は 6 週齢から開始し, 毎日, 胃内強制経口投与により行い, 投与期間は 7 週間とした。

#### (5) 血圧, 体重及び摂餌量の測定及び一般症状の観察

血圧 (収縮期血圧) は, 無麻酔下で非観血的自動血圧測定装置 (ソフトロン BP-98A) を用いてテールカフ法により 3-7 回測定し, 心拍数が安定した時の測定値の平均値を採用した。血圧の測定は当日の被験物質投与前 (前日投与の 17-18 時間後) とし, 毎週測定した。体重及び摂餌量の測定は血圧測定後に実施した。一般症状は毎日の被験物質投与時に観察した。

#### (6) 統計処理

得られた実験値は平均値±標準偏差で表した。有意差検定は, 一元配置分散分析後, Fisher PLSD または Sheffe により行った (有意差水準は 5%未満)。

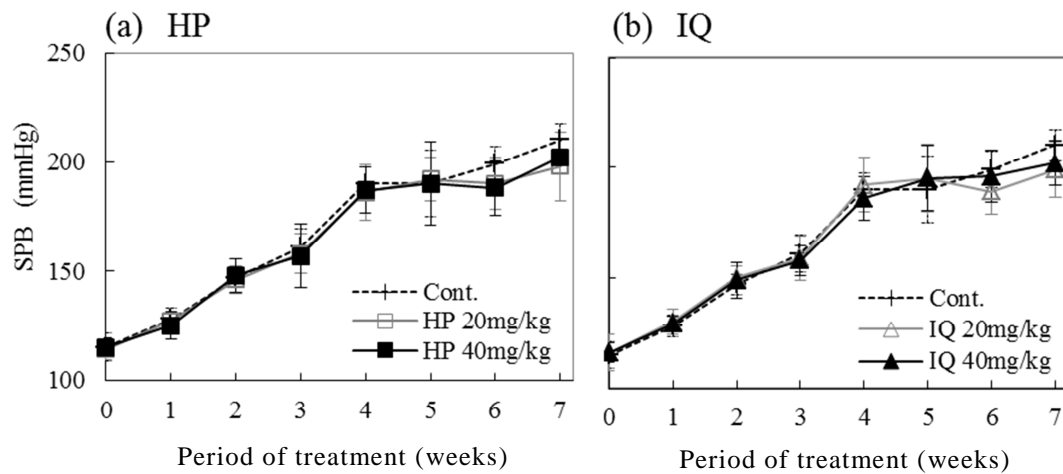
### 第 3 項 結果

#### (1) 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの高血圧自然発症ラットにおける血圧への影響

HP 及び IQ の投与 7 週間における収縮期血圧の経時変化を Fig. 17 に示す。対照群と比較して HP 20, 40 mg/kg 投与群及び IQ 20, 40 mg/kg 投与群では有意な降圧作用は認められなかった。

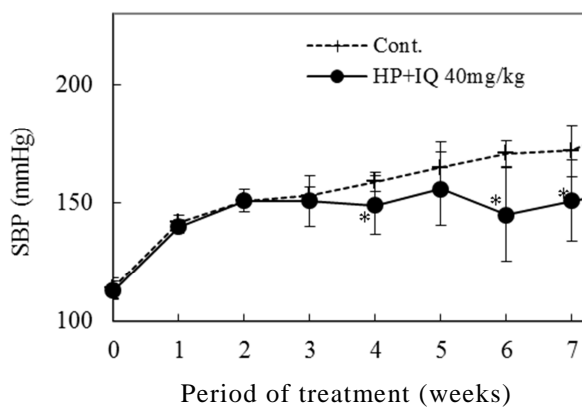
実際の LLE には, HP 及び IQ は単独ではなく混合して存在することから, 両者の等量混合物「HP+IQ」40 mg/kg を 7 週間投与した。その結果, 対照群と比較して「HP+IQ」投与 4, 6, 7 週間後に有意な降圧作用が認められ, 「HP+IQ」40 mg/kg

投与による降圧効果の持続性が確認された (Fig. 18).



**Fig. 17. Effect of HP or IQ on Systolic Blood Pressure (SPB) in SHR**

HP or IQ were orally administered for 7 weeks, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$ ).



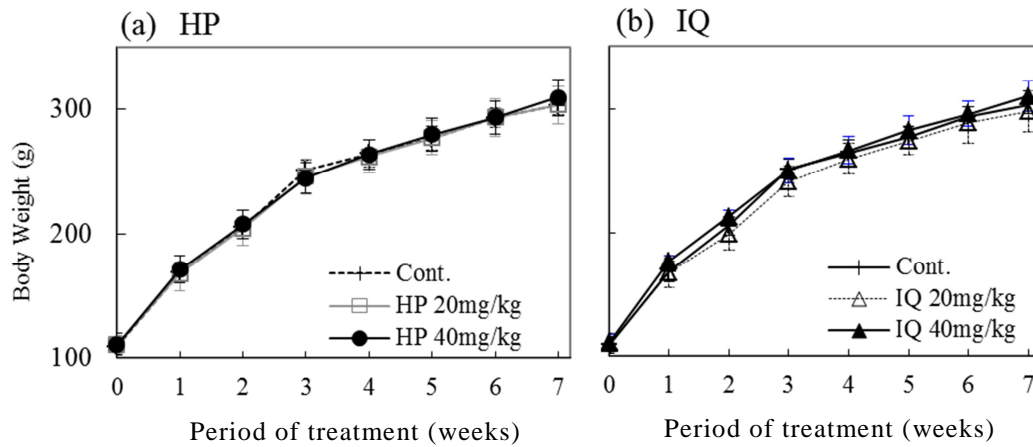
**Fig. 18. Effect of Mixture [HP+IQ] on Systolic Blood Pressure (SPB) in SHR**

[HP+IQ] was orally administered for 7 weeks. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$ ).

## (2) 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの高血圧自然発症ラットにおける体重及び摂餌量への影響

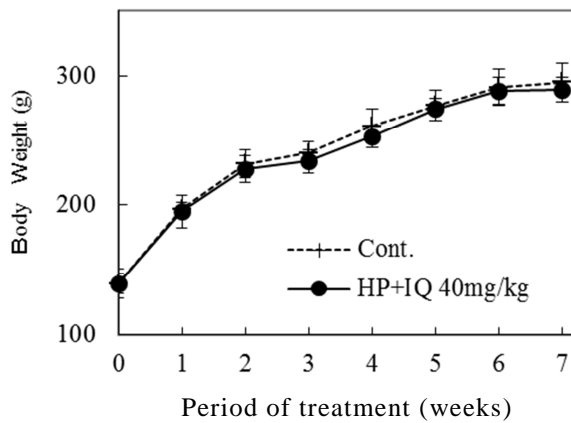
HP, IQ 及び「HP+IQ」投与 7 週間における体重及び摂餌量の経時変化を、それぞれ Fig. 19, 20, 21, 22 に示す. 対照群と比較し, HP 及び IQ 単独投与, さらに同時投与による体重及び摂餌量への影響は認められず, 一般症状にも異常は認

められなかった。



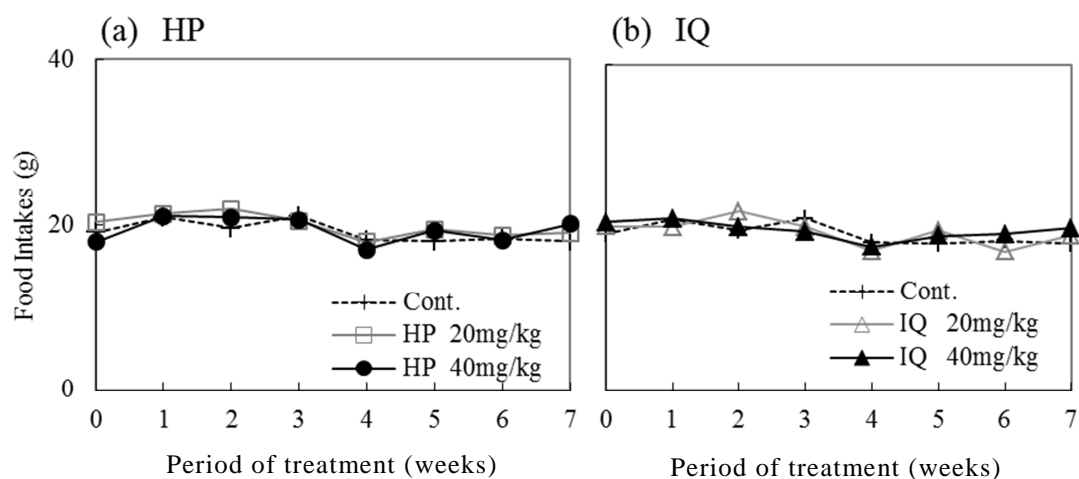
**Fig. 19. Effect of HP or IQ on Body Weight in SHR**

HP or IQ were orally administered for 7 weeks, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=7$ ).



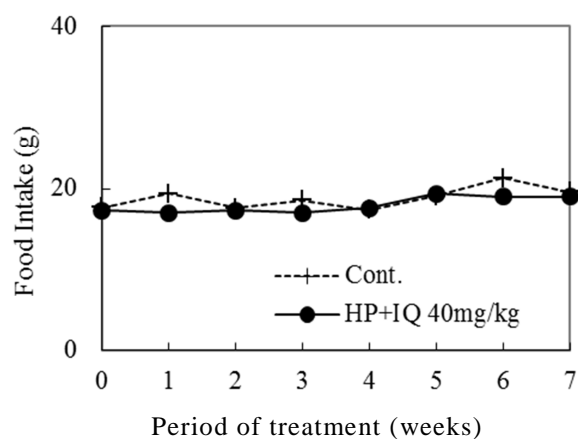
**Fig. 20. Effect of Mixture [HP+IQ] on Body Weight in SHR**

[HP+IQ] was orally administered for 7 weeks. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=7$ ).



**Fig. 21. Effect of HP or IQ on Food Intake in SHR**

HP or IQ were orally administered for 7 weeks, respectively. Each value represents the the mean ( $n=7$ ).



**Fig. 22. Effect of Mixture [HP+IQ] on Food Intake in SHR**

[HP+IQ] was orally administered for 7 weeks. Each value represents the the mean ( $n=7$ ).

#### 第4項 考察

HP と IQ が血圧へ及ぼす影響について、Hoki らは SHR へ IQ 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 4, 40  $\text{mg}/\text{kg}$  の経口投与では降圧作用を認めず、羅布麻葉から抽出した HP 及び IQ 混合物 40  $\text{mg}/\text{kg}$  で投与 6 週目に有意な降圧作用を認めたことを報告している (「HP+IQ」における HP 及び IQ の含有量はそれぞれ 41.7 及び 57.5%, IQ/HP=1.4).<sup>38)</sup> 本研究において、IQ は降圧作用を示さず「HP+IQ」に降圧作用が認められたことは (IQ/HP=1), Hoki らの結果と一致した (Fig. 17, 18). さらに、本研究では HP が降圧作用を示さないことをはじめて明らかにした (Fig. 17).

よって、HP 及び IQ は単独では降圧作用を示さず、両成分は共存下において降圧作用を有することを明らかにした。すなわち、LLE の降圧作用には HP と IQ が共に関与していることが示された。



## 第2節 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドの血管機能改善効果

### 第1項 背景

第2章の結果より, LLEの降圧作用には内皮細胞が関与し, その機序は, ラット抵抗血管(腸間膜動脈)ではNO及びEDHFによる血管弛緩作用によることが示された.<sup>37)</sup> さらに第3章第1節の結果より, LLEの主フラボノイド成分であるHPとIQは, 単独では降圧作用を示さないが, 共存下において降圧作用を有することを明らかにした.<sup>39)</sup>

2002年, Taubertらは, ブタ冠動脈にポリフェノールを用いた灌流実験を行い, HP及びIQはNO合成能の活性を高めたこと, さらにNOによる内皮依存性の血管弛緩作用を示しことを報告している.<sup>24)</sup>

そこで本項では, LLEの主フラボノイド成分が血管機能へ及ぼす影響について調べるため, 「HP+IQ」の経口投与により降圧効果が認められたSHRを用い, 「HP+IQ」が血管に及ぼす影響について*in vivo*試験にて検討した.

### 第2項 実験方法

#### (1) 実験材料

被験物質のHP及びIQは第3章第1節第1項に準じた.

#### (2) 使用薬物

各試薬は次のものを使用した. CMC(和光純薬工業), 10%中性緩衝ホルマリン溶液(和光純薬工業), ヘマトキシリン液(武藤化学), エオジン液(武藤化学), 抗ヒト平滑筋アクチン(Smooth muscle actin: SMA)・マウスモノクローナル抗体(DakoA/S社, Denmark), 抗内皮NO合成酵素(endothelial NO synthase: eNOS)・マウスモノクローナル抗体(BD Biosciences Pharmingen社, USA), リン酸緩衝液(PBS, pH 7.2に調製), Dako EnVisonキット+ポリマー試薬(labeled polymer HRP anti-rabbit (K4002, Dako社), 3'3-diaminobenzidine (DAB, トリス錠 No.4065-1, 武藤化学), マイヤー・ヘマトキシリン溶液(武藤化学), EDTA-2Na溶液(関東化学), bovine serum albumin (BSA, Sigma).

### (3) 実験動物

実験動物は、第3章第1節において0.5% CMCまたは「HP+IQ」を7週間経口投与したSHR及び0.5% CMCを7週間経口投与したWKYを用いた。

本研究は「実験動物の飼育及び保育等に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）を遵守して行った。

### (4) 採血及び心臓摘出

投与期間終了後、腹部大静脈から採血を行い、冷却下で遠心分離（3,500 rpm × 20分間）後、スピッツ管に血漿を採取した。採取した血漿は、血中NO濃度の分析に使用するまで-80℃にて保管した。心臓は摘出後、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定、保管し、血管中膜の厚さの測定及びeNOS活性の検討に用いた。

### (5) 血管平滑筋アクチン及び内皮一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学染色と形態計測

摘出した心臓を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法に従いパラフィン包埋を行い、約3µmの薄切切片にして冠動脈組織標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色ならびに免疫染色用の標本とした。作成した標本は、常法に従いパラフィン切片を脱パラフィンの後、内因性ペルオキシダーゼを阻止するため3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>メタノールにて処理後、1次抗体を37℃で60分反応させた。1次抗体として、中膜染色には抗SMA・マウスモノクローナル抗体（1：100）、eNOS染色には抗eNOS・マウスモノクローナル抗体（1：500）を用いた。作成した標本の1次抗体反応後、PBSで5分間3回洗浄し、2次抗体として2次抗体ポリマー試薬で室温にて30分間反応させた。さらに、PBSで3回洗浄後、DABにて2分間発色（茶褐色）させ、蒸留水でDABの反応を停止させてBioleit封入を行い鏡検した。血管中膜は染色後の鏡検（Nikon Eclipse E600）下、NIH-imageで中膜の厚さを形態計測した。また、核染色にはマイヤー・ヘマトキシリン溶液を用いた。

なお、eNOSの免疫組織化学染色は、抗原性の賦活化のためにオートクレーブ

処理 (1mM EDTA-2Na 溶液, pH 8.0, 3 分間) を行った.

陰性対照としては 1 次抗体のモノクロナール抗体の代わりに 2% BSA を使用した.

## (6) 血中一酸化窒素濃度測定

血中 NO 濃度は, グリース法に従い血漿中の亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) 及び硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) を HPLC にて測定した.<sup>40)</sup>

## (7) 統計処理

得られた実験値は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した. 有意差検定は, 一元配置分散分析後, Fisher PLSD または Sheffe により行った (有意差水準は 5%未満).

## 第 3 項 結果

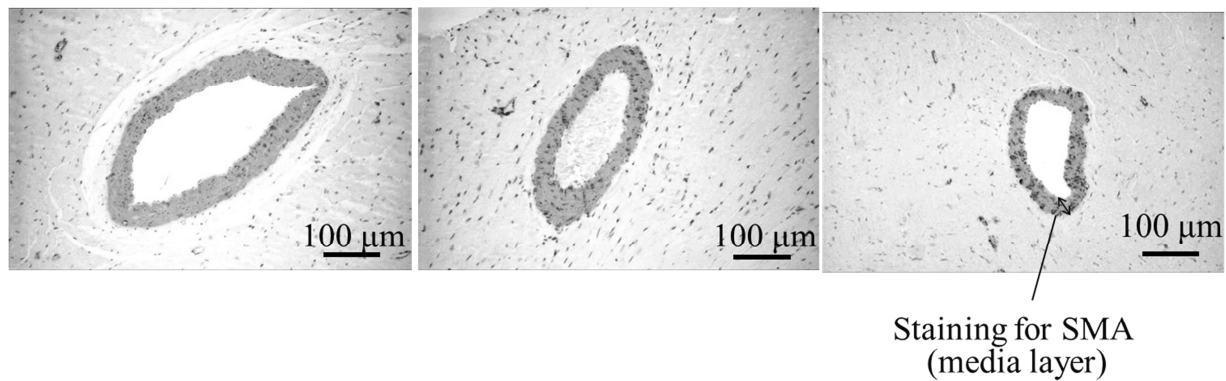
### (1) 血管中膜の厚さ

冠動脈中膜の厚さを SMA 免疫組織化学染色により形態計測した結果を Fig. 23 及び Fig. 24 に示す. 各群とも, 冠動脈の中膜 (平滑筋) において SMA 免疫染色の強い発色が認められた. 血管中膜の厚さは, 正常対照群 (WKY) では  $27.9\pm 5.8 \mu\text{m}$ , 対照群 (SHR) では  $69.5\pm 26.2 \mu\text{m}$  であり, 正常対照群 (WKY) と比較して有意な増大が認められた. 「HP+IQ」40 mg/kg 投与群では  $53.6\pm 15.5 \mu\text{m}$  であり, 「HP+IQ」40 mg/kg の 7 週間投与により血管中膜の肥厚が抑制される傾向が示された.

a) SHR : Cont.

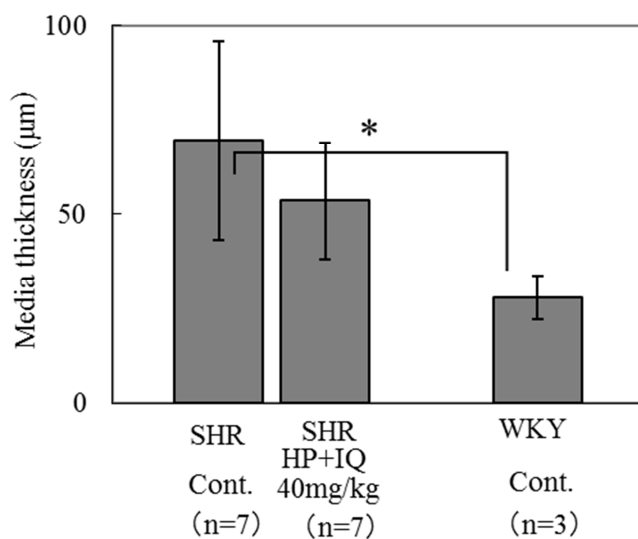
(b) SHR : HP+IQ 40 mg/kg

(c) WKY : Cont.



**Fig. 23. Effect of Mixture [HP+IQ] on the Medial (Smooth Muscle) Layer of Coronary Artery from SHR or WKY : Immunohistochemical Staining for Smooth Muscle Actin (SMA) of Coronary Artery**

Intense staining for SMA was observed in the media of coronary artery.



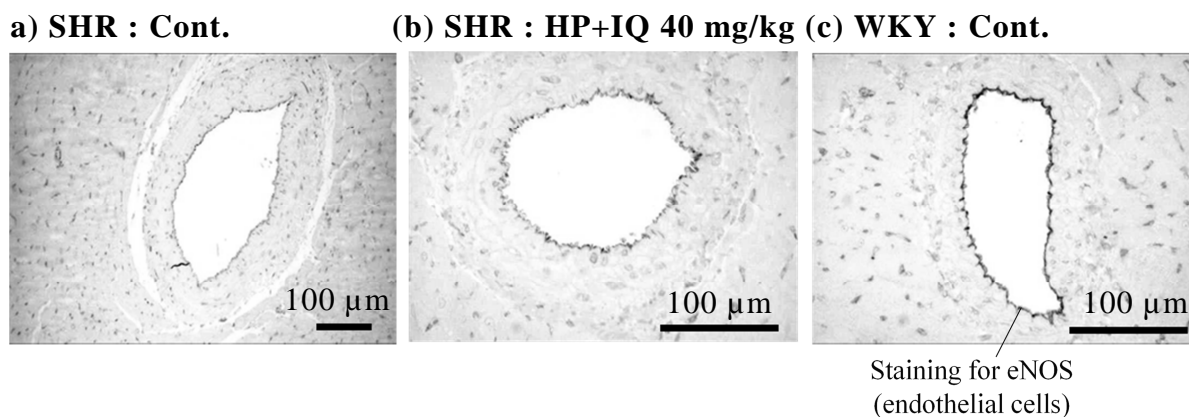
**Fig. 24. Effect of Mixture [HP+IQ] on the Medial (Smooth Muscle) Layer of Coronary Artery from SHR or WKY : Media Thickness of Coronary Artery**

[HP+IQ] was orally administered for 7 weeks. Each value represents the mean  $\pm$  S.D.

\*  $p < 0.05$  (one-way ANOVA, Fisher PLSD)

## (2) 内皮一酸化窒素合成酵素の活性

冠動脈 eNOS 活性の免疫組織化学染色の結果を Fig. 25 に示す。正常対照群 (WKY) と比較して対照群 (SHR) では eNOS の染色性が弱まり活性の低下が認められたが、「HP+IQ」40 mg/kg の7週間投与により eNOS 活性の上昇が観察された。

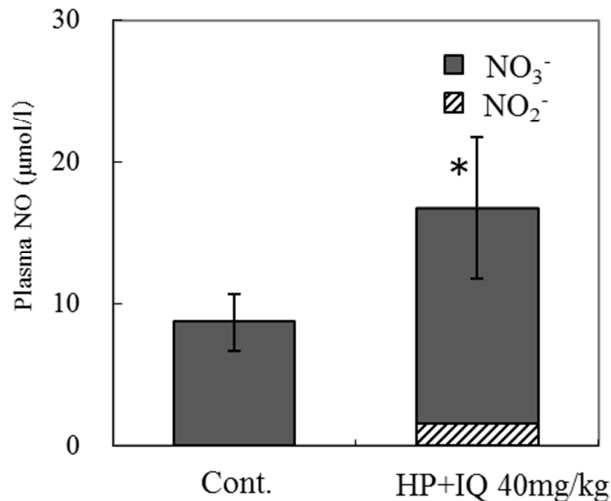


**Fig. 25. Effect of Mixture [HP+IQ] on eNOS Activity of Coronary Artery from SHR or WKY**

Immunohistochemical staining for eNOS of coronary artery. Endothelial cells of coronary artery from WKY, [HP+IQ] administrated SHR and SHR were strongly, moderately and weakly positive for eNOS, respectively.

## (3) 血中一酸化窒素濃度

投与7週間後の血中 NO 濃度の測定結果を Fig. 26 に示す。対照群の血中 NO 濃度は  $8.7 \pm 2.1 \mu\text{mol/l}$ 、「HP+IQ」40 mg/kg 投与群では  $16.7 \pm 4.2 \mu\text{mol/l}$  であり、「HP+IQ」40 mg/kg の7週間投与により血中 NO 濃度の有意な上昇が認められた。



**Fig. 26. Effect of Mixture [HP+IQ] on NO Concentration in the Plasma from SHR**  
 [HP+IQ] was orally administered for 7 weeks. Each value represents the mean±S.D.  
 (n=7). \**p*<0.05 (one-way ANOVA, Fisher PLSD)

#### 第4項 考察

最近, HP と IQ の体内への吸収について, ラットへ IQ 経口投与後では血中に代謝物が検出され, HP 投与後では検出されなかった<sup>41)</sup>ことが報告されているが, HP と IQ 共存下の場合については知られていない. 共存下での体内動態が降圧作用と関係していることが考えられ, この点について次項で述べる.

血管中膜に存在する血管平滑筋細胞は血管の収縮・弛緩を制御している. また, 血管内膜の表面にある血管内皮細胞は種々の因子を産生し,<sup>42)</sup> 血管平滑筋と相互に作用して血管トーンスの調節に寄与しており, 平滑筋細胞と共に血管機能の維持に重要な役割を果たしている. 血管内皮細胞が産生する血管弛緩因子の1つである NO は, 血管弛緩作用の他にも平滑筋増殖抑制作用<sup>43)</sup> 及び抗動脈硬化作用等<sup>44)</sup> を有する. 血圧が上昇すると血管中膜 (平滑筋) の厚さが増すが, 「HP+IQ」投与により SHR での血管中膜の肥厚が抑制された (Fig. 23, 24). 一方, SHR で低下した冠動脈 eNOS 活性の上昇が観察され, 血中 NO 濃度の有意な上昇が認められたことから (Fig. 25, 26), 「HP+IQ」投与により血管内皮機能が改善したことが示された. また, 「HP+IQ」投与で認められた血管中膜の

肥厚抑制は、「HP+IQ」投与により、血管内での濃度が上昇した NO の平滑筋増殖抑制作用によるものと考えられた。

HP 及び IQ はアグリコンの quercetin に糖が結合したケルセチン配糖体で、ケルセチン配糖体は腸管で加水分解を受けてアグリコンの quercetin として吸収された後、<sup>45-51)</sup> メチル化体、グルクロン酸や硫酸の抱合体に代謝され血中を循環する<sup>52)</sup> (詳しくは次項で述べる)。

グルクロン酸抱合体が内皮細胞内で取り込まれるためにはアグリコンに加水分解されることが重要と考えられる。<sup>52)</sup> SHR の血管組織では炎症性マーカーの遺伝子発現やマクロファージ炎症等が正常ラットより上昇していると報告されており、<sup>53,54)</sup> SHR の血管には炎症が起こっていることが示唆されている。

血管の炎症部位では  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性の上昇によるグルクロン酸抱合体の脱抱合が報告されている。<sup>55,56)</sup> さらに、グルクロン酸抱合体の降圧作用は  $\beta$ -グルクロニダーゼの阻害により消失したことから、 $\beta$ -グルクロニダーゼにより脱抱合して生じたアグリコンが効果の発現には必要とも報告されている。<sup>57)</sup> つまり、血管の炎症部位では  $\beta$ -グルクロニダーゼにより脱抱合が起こり、血中のケルセチングルクロン酸抱合体は quercetin として血管内皮細胞に取りこまれて eNOS を活性化し血管弛緩作用等を示すことが考えられる。

eNOS の活性化は、ケルセチン抱合体から脱抱合したケルセチンによる eNOS のアデノシン-1-リン酸活性化プロテインキナーゼのリン酸化 (活性化) を経て、セリンとスレオニンのリン酸化の状態を変化させることによると推測される。<sup>58,59)</sup>

これまでに、*in vitro* にて HP と IQ の抗酸化作用によってスーパーオキシドによる NO の減少を抑制し、NO 活性の上昇による内皮依存性の血管弛緩作用が報告されていた。<sup>24)</sup> さらに、本項では *in vivo* にて、SHR での「HP+IQ」の降圧作用機序は、血管内皮における eNOS の活性上昇により NO 合成量が高まり、NO を介した血管平滑筋弛緩作用によることが明らかとなった。

内皮由来弛緩因子の血管平滑筋弛緩について、冠動脈等の太い血管では主に NO、末梢血管等の細い血管では主に NO と EDHF により弛緩することが報告されている。<sup>35,42)</sup> LLE においては、*in vitro* で冠動脈では NO、<sup>30)</sup> 腸間膜動脈抵抗血管

では NO と EDHF を介した血管弛緩作用が認められた。<sup>30,37)</sup> LLE の主なフラボノイド成分「HP+IQ」については、本研究で *in vivo* にて NO が関与することが証明された。全身の血管においても *in vivo* と同じく「HP+IQ」は冠動脈では NO、腸間膜動脈抵抗血管では NO と EDHF を介した血管平滑筋弛緩により降圧作用を発現していると考えられる。すなわち、「HP+IQ」は血管機能の改善効果と降圧作用を有することが明らかとなり、降圧作用機序は血管内皮由来弛緩因子 NO を介した平滑筋弛緩によると考えられた。



### 第3節 羅布麻茶葉エキス含有フラボノイドのバイオアベイラビリティ

#### 第1項 背景

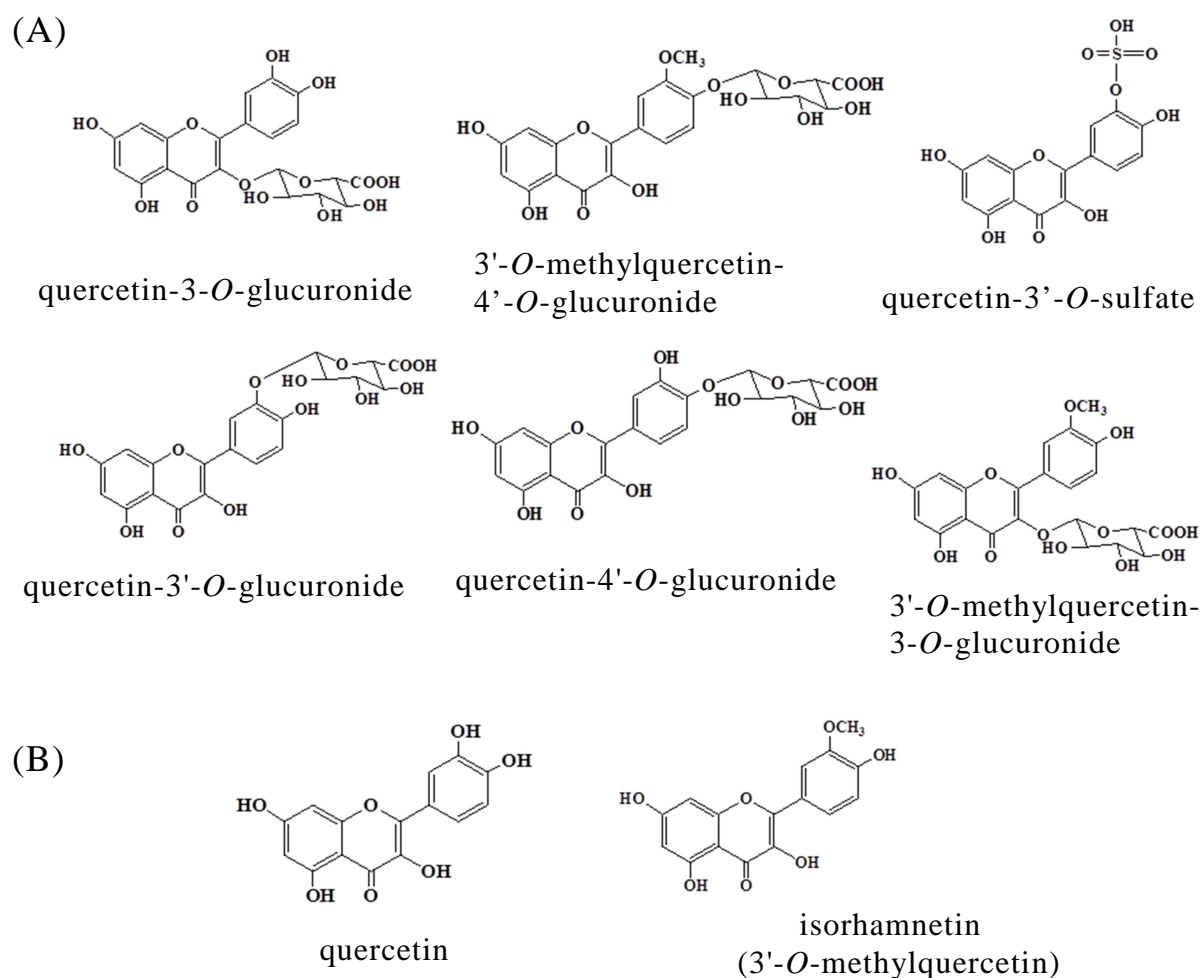
LLEには、主フラボノイド成分としてHPとIQが含有されている。<sup>26)</sup> フラボノイドは、我々が日常的に摂取している野菜、果物、茶等に含まれ、その多くは配糖体として存在している。LLEに含有されるHPとIQは、アグリコンのquercetinに糖が結合したケルセチン配糖体である (Fig. 2)。quercetin及びその配糖体は腸管で吸収されるが、<sup>45-47,60)</sup> これまでの研究で糖残基が腸管での吸収に影響していることが明らかとなってきた。ヒト、ブタまたはラットへの経口投与において、ケルセチンモノグルコシドの方がquercetinよりもよく吸収され、rutin (quercetin-3-O-β-D-glucorhamnoside) はケルセチンアグリコンやそのモノグルコシドよりも吸収量が低いことが報告されている。<sup>45,47,48,61)</sup> 一方、ケルセチン配糖体は食品中では数種が混在しているが、これまで数種の配糖体を同時に投与した場合の吸収動態に関する報告はない。

第3章第1項及び第2項において、SHRへの経口投与の結果よりHP及びIQはそれぞれ単独では降圧作用を示さないが、両成分の共存下では有意な降圧作用を示し、LLEの降圧作用には両成分が関与していることを述べた。<sup>39)</sup> HPとIQの腸管吸収に関し、IQは小腸で吸収されることがこれまでに明らかとなっている。<sup>45-47)</sup> HPについては、Chang Q.らの、ラットへのIQ経口投与で血中に代謝物が検出されたが、HP投与では検出されなかったという報告が知られているにすぎない。<sup>41)</sup> HPとIQの腸管吸収には相違があることが推測され、両成分における降圧作用<sup>39)</sup>には吸収動態が関係している可能性が示唆された。

本項では、SHRへHP、IQ及び「HP+IQ」経口投与後の血中代謝物濃度から、糖残基のみ異なるHPとIQの腸管吸収における相違、及び両成分の同時投与が吸収動態に及ぼす影響について検討した。

なお、第2節で前述したように、ケルセチン配糖体は、腸管で加水分解を受けてアグリコンのquercetinとして吸収される。<sup>45-51)</sup> 吸収後は腸管粘膜細胞で代謝を受けるので、<sup>62,63)</sup> 血中には遊離のquercetinまたはその配糖体としてはほとんど存在せず、quercetinのグルクロン酸抱合体のほか、硫酸抱合体、メチル化体等の代謝物として存在することが明らかとなっている<sup>64-67)</sup> (Fig. 27<sup>60)</sup>).

また、血中ケルセチン代謝物濃度として、従来の報告は血漿を抱合体加水分解酵素で加水分解して代謝物のアグリコンを測定しており、本報でも、同様の処理によりアグリコンとした quercetin と isorhamnetin (3'-*O*-methylquercetin) の測定を行い、血中代謝物濃度を調べた。



**Fig. 27. Structures of the Quercetin Metabolites (A) and the Metabolites after Enzymatic Hydrolysis (=Aglycons) (B)** <sup>60)</sup>

## 第2項 実験方法

### (1) 実験材料

被験物質の HP 及び IQ は第3章第1節第1項に準じた。

### (2) 使用薬物

各試薬は次のものを使用した。quercetin dehydrate (98%, Sigma), isorhamnetin (99%, フナコシ), fisetin (99%, Sigma), H-1 sulfatase (sulfatase from *Helix pomatia*, Sigma-Aldrich, Inc.), CMC (和光純薬工業)。メタノール, アセトニトリル, アスコルビン酸は HPLC 用, エタノール, 酢酸ナトリウム, ギ酸, 酢酸エチル, 酢酸, PBS 緩衝溶液, 200  $\mu\text{mol/l}$  EDTA は特級または分析用を和光純薬工業より購入し, 使用した。

### (3) 実験動物

体重 260-310g, 11 週齢雄性 SHR/Izm 系ラットを購入 (船橋農場) し, 室温  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 20\%$  の条件下で1週間前後の予備飼育後試験に供した。ラットには SP 固形飼料 (船橋農場) と水を自由摂取させた。

本研究は「実験動物の飼育及び保育等に関する基準」(昭和55年3月総理府告示第6号)を遵守して行った。

### (4) 投与方法

被験物質 HP, IQ, 「HP+IQ」はいずれも 0.5% CMC に懸濁し, 1 ml/100g (体重) に調製した。投与用量は HP 20 mg/kg, IQ 20 mg/kg, 「HP+IQ」40 mg/kg (HP 及び IQ 各 20 mg/kg) とし, 対照群には 0.5% CMC を投与した (各群  $n=6$ )。被験物質は胃内強制経口投与し, 投与前日 17:00 から当日 10:00 にかけて絶食させて投与を開始した。

### (5) 血漿サンプル

採血は, 被験物質投与 0.5, 1, 2, 6, 12 及び 24 時間後に行った。ラットを保温器内 ( $38-39^\circ\text{C}$ ) で 3-4 分間保定し, 尾部の左静脈または右静脈を軽く切開し, へ

パリン充填した 1 ml 注射器 (テルモ) を用いて 400-500  $\mu$ l 採血した. 即時採血した血液を遠心分離 (4°C 以下, 3,500 rpm  $\times$  10 分間) 後, 上層の血漿をエッペンドルフチューブに採取し, 測定まで冷凍保管 (-80°C) した.

## (6) 血中ケルセチン代謝物濃度測定

### i) 測定試料の前処理方法

エッペンドルフチューブからラット血漿 10  $\mu$ l をマイクロチューブに分取し, メタノール 5  $\mu$ l 及び 1  $\mu$ g/ml, fisetin 溶液 5  $\mu$ l (内部標準物質として), H-1 sulfatase (約 2.6 mg/ml (2 unit) ) 52  $\mu$ l, 60 mM アスコルビン酸 10  $\mu$ l を順次添加した. 血漿混合溶液を攪拌 (10 秒間), インキュベーション (37°C, 1 時間) した後, 酢酸ナトリウム 1 ml を添加し, さらに攪拌 (30 秒間), 超音波 (30 秒間), 攪拌 (30 秒間) 後, 遠心分離 (4°C, 12, 900 rpm  $\times$  5 分間) をした. 上層を採取し, 窒素ガスで蒸発乾固 (40°C) 後, 0.5% ギ酸水溶液/0.5% ギ酸アセトニトリル (50:50, v/v) 0.2 ml を添加, 攪拌 (30 秒間), 遠心分離 (4°C, 10, 000 rpm  $\times$  2 分間) をした. 上層をフィルターろ過 (Ultrafree-MC, 0.22  $\mu$ m) 後, 血中ケルセチン代謝物のアグリコンである quercetin 及び isorhamnetin を liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) で測定した.

### ii) 測定条件

HPLC : 装置 ; Alliance 2795 (Waters), カラム ; Symmetry Shield RP18, 150 $\times$ 2.1 mm *i.d.*, 3.5  $\mu$ m, Waters), カラム温度 ; 40°C, 移動相 ; 0.5% ギ酸水溶液/0.5% ギ酸アセトニトリル (50 : 50, v/v), 流速 ; 0.2 ml/分.

MS/MS : 装置 ; API3000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX), イオン化 ; Turbo Ionspray (ESI), モニターイオン ; quercetin  $m/z$  301.2 $\rightarrow$  $m/z$  150.8, isorhamnetin  $m/z$  315.1 $\rightarrow$  $m/z$  299.9, fisetin  $m/z$  285.0 $\rightarrow$  $m/z$  134.7 (MS/MS の Multiple reaction monitoring モードにより各フラグメント化したイオン ( $m/z$  150.8,  $m/z$  299.9,  $m/z$  134.7) を測定することで, 各モニターイオンを特異的に検出した).

添加検量線は 2 ng/ml - 8  $\mu$ g/ml の範囲で良好な直線性を示し, 定量下限値は quercetin では 22.3 ng/ml (70 nM), isorhamnetin では 5.0 ng/ml (20 nM) であった.

## (7) 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表した。有意差検定は、一元配置分散分析後、Dunnett 多重比較検定法により行った (有意水準は 5%未満)。

## 第 3 項 結果

SHR へ HP 20 mg/kg, IQ 20 mg/kg, 「HP+IQ」 40mg/kg を投与後の血中ケルセチン代謝物濃度として、血漿を抱合体加水分解酵素処理し、代謝物アグリコンである quercetin 及び isorhamnetin を LC/MS/MS により測定した。

各群における投与後の代謝物濃度について、Fig. 28 に quercetin, isorhamnetin それぞれの濃度推移、Table 7 に最高血中濃度到達時間 (maximum drug concentration time : Tmax) 及び最高血中濃度 (maximum drug concentration : Cmax) を示す。

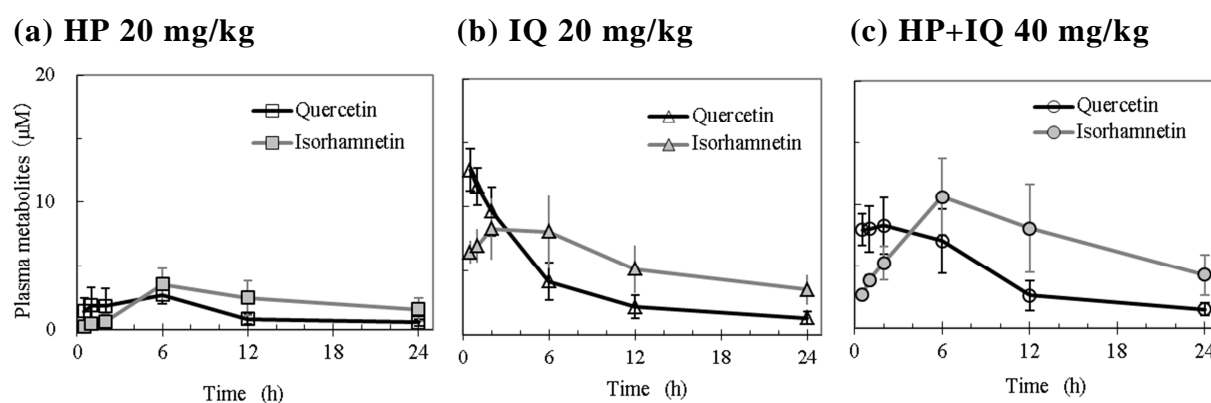
quercetin と isorhamnetin 濃度推移を比較すると、HP 投与ではほぼ同じ推移を示した。IQ または「HP+IQ」投与では quercetin よりも isorhamnetin の方が遅れて高い濃度を示したが (Fig. 28), これは肝臓でメチル化を受けたためと考えられる。

Tmax は HP 投与では約 6 時間 (quercetin : 5.2 時間, isorhamnetin : 6.0 時間), IQ 投与では約 1-3 時間 (quercetin : 0.8 時間, isorhamnetin : 3.5 時間) であり, HP と IQ の血中動態には相違が認められた (Table 7)。対照群の血中代謝物濃度は、投与後 0.5-24 時間において、quercetin 濃度では半数, isorhamnetin 濃度ではほとんどが定量下限値 (quercetin 70 nM, isorhamnetin 20 nM) 以下であった。Fig. 29 に、SHR 血漿サンプルの LC/MS/MS クロマトグラムについて、各群の Tmax 及び Cmax の代表例を示す。

**Table 7. Tmax and Cmax of Quercetin or Isorhamnetin Concentration in the Plasma of SHR after Oral Administration of HP, IQ or Mixture [HP+IQ]**

	HP 20 mg/kg		IQ 20 mg/kg		HP+IQ 40mg/kg	
	Tmax (h)	Cmax ( $\mu\text{M}$ )	Tmax (h)	Cmax ( $\mu\text{M}$ )	Tmax (h)	Cmax ( $\mu\text{M}$ )
Quercetin	5.2 $\pm$ 2.0	3.06 $\pm$ 0.86	0.8 $\pm$ 0.3	13.44 $\pm$ 1.15	3.1 $\pm$ 2.3	9.86 $\pm$ 1.00
Isorhamnetin	6.0 $\pm$ 0.0	3.51 $\pm$ 1.26	3.5 $\pm$ 2.8	8.63 $\pm$ 2.34	6.0 $\pm$ 0.0	10.62 $\pm$ 3.12

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=6$ ).



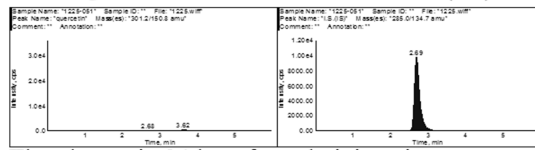
**Fig. 28. Quercetin or Isorhamnetin Concentration in the Plasma of SHR after Oral Administration of HP, IQ or Mixture [HP+IQ]**

Quercetin or isofhamnetin concentration were measured by LC-MS after enzymatic hydrolysis. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n=6$ ).

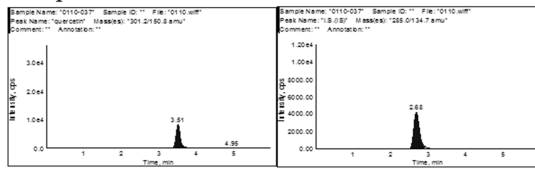
**(A) Quercein Analysis**

**(a) Cont.**  
**(0.5% CMC)**

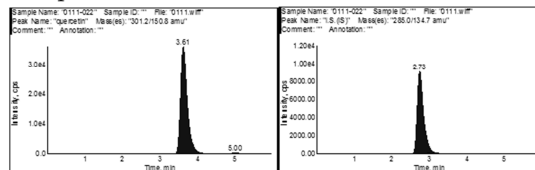
**Quercetin**                      **Fisetin (IS)**



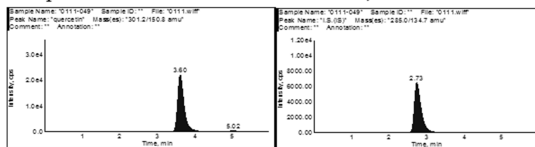
**(b) HP**  
**20mg/kg**



**(c) IQ**  
**20mg/kg**



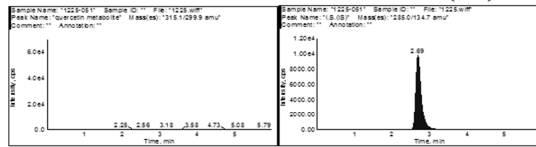
**(d) HP+IQ**  
**40mg/kg**



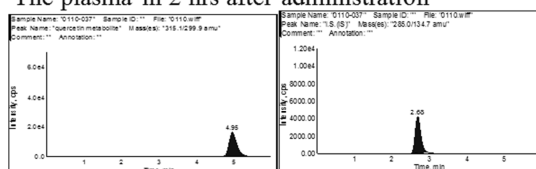
**(B) Isorhamnetin Analysis**

**(a) Cont.**  
**(0.5% CMC)**

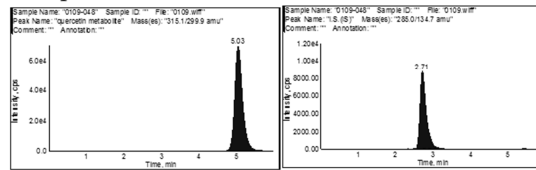
**Isorhamntein**                      **Fisetin (IS)**



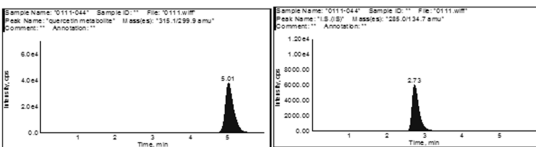
**(b) HP**  
**20mg/kg**



**(c) IQ**  
**20mg/kg**



**(d) HP+IQ**  
**40mg/kg**

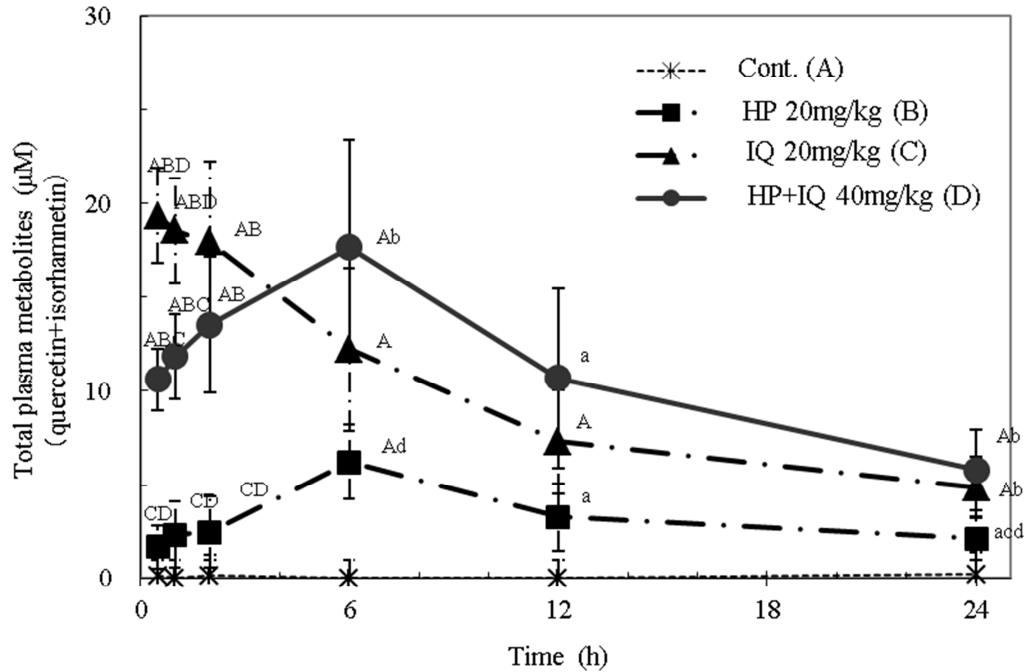


**Fig. 29. Typical LC/MS/MS Chromatogram of SHR Plasma after Oral Administration of HP, IQ or Mixture [HP+IQ].**

Fig. 30 に対照群, HP 20 mg/kg, IQ 20 mg/kg 及び「HP+IQ」40 mg/kg 投与群の全血中ケルセチン代謝物 (quercetin + isorhamnetin) 濃度推移を示す. HP 投与と IQ 投与の代謝物濃度を比較すると, 投与後ほぼ 24 時間を通して IQ の方が HP よりも有意に高い濃度推移を示した (投与後 0.5-2 時間 :  $p < 0.01$ , 投与後 24 時間  $p < 0.05$ ). 「HP+IQ」投与と HP, IQ 単独投与の比較では, 投与後ほぼ 24 時間を通して「HP+IQ」の方が HP よりも有意に高い濃度推移を示した (投与後 0.5-6 時間 :  $p < 0.01$ , 投与後 24 時間 :  $p < 0.05$ ). また, 投与後 0.5-1 時間では「HP+IQ」の方が IQ よりも有意に低い推移を示し ( $p < 0.01$ ), その後 2-24 時間後では IQ の代謝物濃度との有意な差は認められず, 特に 6-24 時間後では HP 及び IQ 単独の代謝物濃度をほぼ合わせた推移を示した.

Fig. 31 に各投与群の血中代謝物濃度曲線下面積 (area under the blood concentration time curve : AUC) を示す. HP と IQ の AUC を比較すると, HP よりも IQ 投与の方が有意に高い値を示した (quercetin, isorhamnetin の AUC とともに  $p < 0.01$ ). 「HP+IQ」投与と HP, IQ 単独投与の AUC を比較すると, HP よりも「HP+IQ」投与の方が有意に高い値を示したが (quercetin, isorhamnetin の AUC とともに  $p < 0.01$ ), IQ の AUC との有意な差は認められず, HP 及び IQ 単独投与の AUC のほぼ合計値であった.





**Fig. 30. Total Metabolites (Quercetin plus Isorhamnetin) Concentration in the Plasma of SHR after Oral Administration of HP, IQ or Mixture[HP+IQ]**

Quercetin or isorhamnetin concentration were measured by LC-MS after enzymatic hydrolysis. Each value represents the mean± S.D.(n=6).

Alphabets, ABCD or abcd etc. indicate significant differences between each of the groups, ABCD:  $p < 0.01$ , abcd :  $p < 0.05$ . Group A ; Cont, B ; HP 20mg/kg, C ; IQ 20mg/kg, D: HP+IQ 40mg/kg (one-way ANOVA, Dunnet multiple comparison)

#### 第 4 項 考察

HP, IQ は共にケルセチン配糖体であり, HP はフラボノイド骨格の C 環 3 位に galactose, IQ は同位に Glu が結合し, 両成分はよく似た構造の化合物である. HP について投与後 24 時間の血中動態を調べたものは本研究がはじめてであり, HP と IQ の吸収動態に相違が認められることを明らかにした.

quercetin の 3 位, 4' 位, 7 位のモノグルコシドは, 腸管吸収過程で小腸上皮細胞に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼやラクターゼフロリジン分解酵素 (lactase phlorizin hydrolase : LPH) により加水分解されるか, グルコーストランスポーター (sodium-dependent glucose transporter : SGLT-1) を介して吸収されることが

知られている。<sup>45-47,52)</sup> しかし、糖部が Glu-rhamnose のような 2 糖類のケルセチングルコラムノシドである rutin は、無菌ラットでは吸収されず、そのまま排泄されることが報告されている。<sup>68)</sup> rutin は主に大腸で腸内細菌の  $\beta$ -グルコシダーゼ等により加水分解されて吸収されることが明らかとなっており、<sup>45,48,69,70)</sup> 小腸での吸収が主である quercetin やケルセチングルコシドよりも遅れて吸収ピークが見られる。一方、小腸・盲腸間でケルセチン配糖体を循環させた *in site* 小腸還流モデル実験で血中代謝物を測定した結果、IQ からの代謝物は検出されたが HP からの代謝物は検出されなかったことが報告されている。<sup>46)</sup> この結果は小腸で quercetin のグルコシドは吸収されるが、ガラクトシドは吸収されないことを示唆している。

本研究の結果、SHR における血中ケルセチン代謝物の Tmax は、HP 投与では約 6 時間、IQ 投与では約 1-3 時間であった (Table 7)。これまでの報告から<sup>45-47,52,60)</sup> IQ は主に小腸で吸収されると考えられた。HP については、消化管内の移動速度及びこれまでの HP に関する報告から、<sup>41,46)</sup> ルチノシドと同様腸内細菌が有する  $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解されてから吸収されたと考えられた。つまり、本研究で IQ は主に小腸、HP は主に大腸で吸収されることを明らかにした。

「HP+IQ」40 mg/kg 同時投与の全血中ケルセチン代謝物濃度は、投与後 0.5-1 時間では IQ 20 mg/kg 単独投与よりも有意に低い値を示したことから ( $p < 0.01$ ) (Fig. 30)、HP と IQ を同時投与した場合、小腸で HP が LPH または SGLT-1 と相互に影響し、IQ の吸収を抑制した可能性が考えられた。「HP+IQ」同時投与の全血中代謝物濃度は、IQ 単独投与で見られたような急激な上昇は示さず、投与後 6 時間をかけて徐々に上昇し、その後穏やかに下降する推移を示した (Fig. 30)。

前章で著者は、SHR への経口投与において、HP と IQ は LLE の降圧作用に関与する成分であり、HP と IQ は単独では降圧作用を示さないが、共存下 (「HP+IQ」) で降圧作用を示すことを述べた。<sup>39)</sup> 「HP+IQ」同時投与の場合、HP 単独投与と比較すると血中代謝物濃度及び AUC はともに有意に高く、IQ 単独投与と比較すると、代謝物濃度は消化管での初期吸収時 (投与後 0.5-1 時間) には有意に低い推移を示し、その後有意な差はなく、AUC においても有意な差は

認められなかった。すなわち、HPとIQを同時投与した場合には単独投与の場合より、投与後24時間における血中のケルセチン代謝物濃度は上下変動が少なく、一定濃度が持続して推移し、代謝物の全体吸収量（AUC）よりも一定濃度の持続が降圧作用発現に関係することが示唆された。従って、HPとIQ同時投与のように、腸管での吸収部位（小腸または大腸）が異なるケルセチン配糖体が共存することで、降圧作用発現における至適濃度のケルセチン代謝物が血中に継続して存在し、両成分は共存下においてのみ降圧作用を発現したと考えられた。

食品中では数種のケルセチン配糖体が混在しているにも関わらず、複数のケルセチン配糖体の同時投与における血中代謝物濃度推移を報告したのは今回が初めてである。本章において、HPとIQの共存下における降圧作用には吸収動態の関与が示唆され、今後、吸収部位の異なるケルセチン配糖体が共存した場合の吸収動態と作用についてさらなる研究が必要と考える。

本章では、HP、IQ及び「HP+IQ」をSHRへ経口投与し、血中ケルセチン代謝物濃度を測定した結果、HPは主に大腸、IQは主に小腸で吸収されることが示され、HPとIQの腸管吸収には相違が認められた。HP、IQ単独と同時投与を比較すると、同時投与した場合には血中のケルセチン代謝物は一定濃度が持続して推移する傾向が認められ、このような代謝物濃度の持続が降圧作用の発現に関与していると考察された。

## 第4章 羅布麻茶葉エキスの反復投与毒性試験

### 第1項 背景

序論でも述べたように、羅布麻茶は中国や日本、アメリカ、カナダにおいてティーバッグ及びエキス錠剤として販売されている。第2章及び第3章より、LLEの降圧作用とその作用機序が明らかになり、<sup>23,28,37,39)</sup> LLEの機能性食品への応用が期待される。しかし近年、健康食品における健康被害が報告され、健康食品の安全性と効果における科学的根拠が持つ重要性は高まっている。

そこで本章では、雌雄WKYを用いた90日間の反復投与毒性試験を行い、LLEの毒性について検討した。

### 第2項 実験方法

#### (1) 実験材料

LLEの調製及び品質の確認は第2章第1節第2項に準じ行った。

#### (2) 実験動物

5週齢の雌雄Wistar系ラット（雌110-112g、雄90-102g、日本エスエルシー（株））を購入後、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 20\%$ 、換気回数17回/時間、照明時間12時間（6:00-18:00）の条件下の動物室にて飼育した。試験実施期間中は1ケージに2匹を収容し、6日間の予備飼育後、雌雄各群10匹の平均体重が等しくなるよう群分けし、実験に供した。ラットにはMF固形飼料（オリエンタル酵母工業）及び水道水を24時間自由摂取させた。

投与期間終了後、全動物をpentobarbital-Naによる麻酔下で放血殺し、採血後剖検を行った。

本研究は「実験動物の飼育及び保育等に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）を遵守して行った。

#### (3) 投与方法

LLEは乳鉢を用いて精製水に懸濁し、1ml/100g体重に調製した。投与用量は低用量群で1,000mg/kg、高容量群で2,000mg/kgとし、対照群には精製水を1

ml/100g 体重 投与した。被験物質の投与は毎日、胃内強制経口投与により行い、投与期間は 90 日間とした。

#### (4) 一般症状の観察及び体重及び摂餌量の測定

一般症状は毎日 1 回、外観及び行動等の異常の有無、さらに 1 日 2 回瀕死の状態及び死亡の有無について観察した。体重は投与 1 ヶ月後まで毎週 2 回、その後は毎週 1 回測定を実施した。摂餌量は、全ケージについて毎週 1 回測定を実施した。

#### (5) 血液学的検査

投与終了後、全動物を pentobarbital-Na 麻酔下で開腹し、腹部大動脈より EDAT-2K を充填した注射器を用いて採血した。得られた血液を用いて、赤血球数 (red blood cells : RBC) , ヘモグロビン(hemoglobin : Hgb), ヘマトクリット (hematocrit : HCT), 平均赤血球容積 (mean corpuscular volume : MCV), 平均赤血球色素量 (mean corpuscular hemoglobin : MCH), 平均赤血球色素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration : MCHC), 血小板数 (platelets : PLT), 白血球数 (white blood cells : WBC) を多項目自動赤血球計数装置 (Sysmex K-4500, 東亜医用電子) を用いて測定した。また、網状赤血球 (reticulocytes : RET) を鏡検した。プロトロンビン時間 (prothrombin time : PT), 活性化部分トロンボ (activated partial thromboplastin time : APTT) を自動血液凝固測定装置 (ロシユ・ダイアグノスティックス) で測定した。また、桿状核白血球 (stab cell : STAB) , 分葉核好中球 (segmented neutrophil : SEG), リンパ球 (lymphocyte : LYMPH), 単核白血球 (monocyte : MONO), 好塩基球 (basophile : BASO) 及び好酸球 (Eosinophil : EOSIN) について測定した。

#### (6) 血液化学的検査

血清分離は採血後、室温に約 30-60 分放置し、凝固を確認後に遠心分離 (3,000 rpm × 10 分間) にて行った。得られた血清を用いて、総ビリルビン (total bilirubin : T-Bil), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate

aminotransferase : AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase : ALT),  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase :  $\gamma$ -GTP), コリンエステラーゼ (cholinesterase : ChE), アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase : ALP), 総蛋白 (total protein : TP), アルブミン-グロブリン比 (albumin-globulin ratio : A/G), アルブミン(albumin : Alb), グロブリン (globulin : Glb), 総コレステロール (total cholesterol : T-Cho), トリグリセライド (triglyceride : TG), Glu, 尿素窒素 (blood urea nitrogen : BUN), クレアチニン (creatinine : Crea), ナトリウム (sodium : Na), カリウム (potassium : K), 塩素 (chloride : Cl), カルシウム (calcium : Ca), 無機リン (inorganic phosphorus : IP) を自動分析装置 (AU 400: オリンパス光学) を用いて測定した。

## (7) 病理学的検査

投与期間終了後、採血に続いて放血後、致死させ、病理学的検査を行った。剖検において、外観、頭蓋腔、胸腔、腹腔、リンパ節の肉眼的検査を行った。脳、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、肝臓、精巣 (雄)、精巣上体 (雄)、前立腺 (雄)、精囊 (雄)、卵巣 (雌)、子宮 (雌)、唾液腺及び甲状腺を秤量 (絶対重量) し、屠殺日の体重をもとに対体重比 (相対重量) を算出した。なお、腎臓、副腎、精巣または卵巣については左右を一括して秤量した。

病理組織学的検査は、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、血管、精巣 (雄)、精巣上体 (雄)、前立腺 (雄)、精囊 (雄)、卵巣 (雌)、子宮 (雌)、膣 (雌)、脳、下垂体、皮膚、乳腺 (雌)、腸間膜リンパ節、唾液腺、骨及び骨髄 (胸骨、大腿骨)、胸腺、気管、肺及び気管支、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、脾臓、膀胱、脊髄、眼球及びその付随器について行った。摘出した全臓器は10%の中性緩衝ホルマリン液にて固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検し、全動物について病変の評価を行い記録した。

## (8) 尿検査

尿は、投与期間の 84, 85, 88, 89 日目に強制排尿により採取し、色調 (color :

COL) を肉眼で判定し、ウロビリノーゲン(urobilinogen : URO), 蛋白 (PRO), pH, 潜血 (occult blood : OB), ケトン体 (ketone body : KET), ビリルビン (bilirubin : BIL), Glu をマルティスティックス (バイエルメディカル) を用いて検査した。また、尿比重を測定した。尿のナトリウム (Urine Na : Na-U) 及びカリウム (urine K : K-U) は自動分析装置 (AU 400 : オリンパス光学) で測定した。

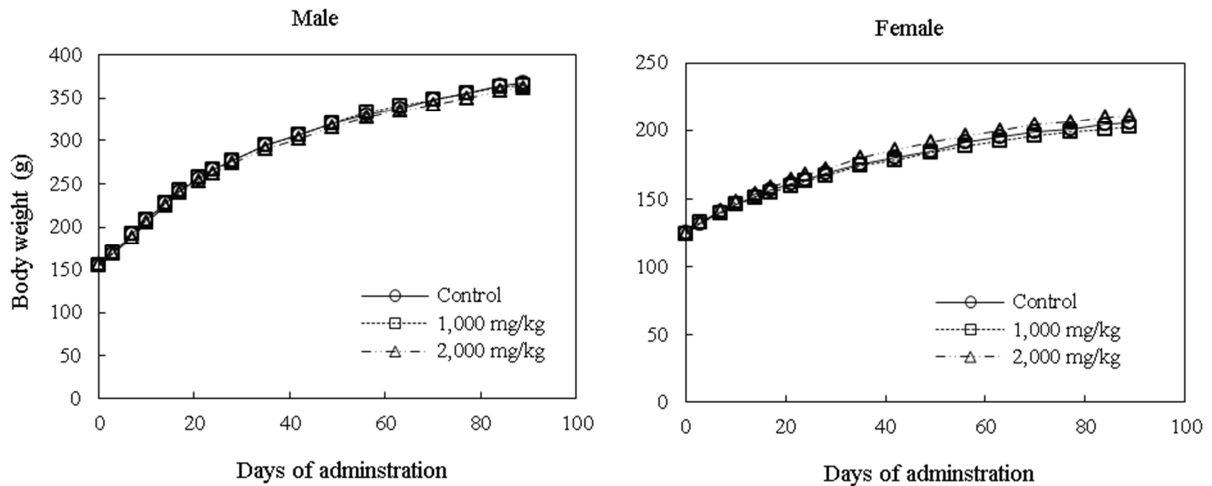
## (9) 統計処理

全ての測定値は、平均値±標準偏差で示した。各検査値は Bartlett の分散検定を実施し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較検定を行った。不等分散の場合は、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、有意差が認められた場合は nonpara Dunnett タイプ (Steel の多重比較検定)を行った。2 群間検定において、等分散の場合は Student's *t*-test を、不等分散の場合は Aspin-Welch の *t*-test を行った。いずれの検定においても有意水準は 5%未満とした。

## 第 3 項 結果

### (1) 一般症状の観察及び体重及び摂餌量の測定

投与期間中、いずれの群においても死亡例は観察されず、臨床症状の観察においても異常は見られなかった。また、いずれの群においても体重は対照群と同様に増加推移を示し、摂餌量は対照群と同様であった (Fig. 31, Table 8)。



**Fig. 31. Changes in Body Weight of Rats during Oral Administration of LLE for 90 Days**

Each value represents the mean ( $n=10$ /each group).

**Table 8. Changes of Food Consumption in Rats during Oral Administration of LLE for 90 Days**

Day	Males			Females		
	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg
1	15.4 ± 1.3	14.8 ± 1.3	14.0 ± 2.5	10.2 ± 0.8	9.6 ± 0.9	10.4 ± 2.5
7	18.2 ± 0.8	18.0 ± 1.6	17.2 ± 0.8	11.6 ± 1.7	12.0 ± 2.5	10.8 ± 0.4
14	18.6 ± 3.5	17.0 ± 0.7	17.8 ± 1.1	12.6 ± 0.9	11.8 ± 0.8	12.2 ± 0.4
21	18.0 ± 2.9	17.6 ± 0.9	18.8 ± 0.4	11.8 ± 1.1	12.0 ± 1.2	12.8 ± 0.8
28	16.2 ± 0.8	17.0 ± 1.2	17.2 ± 1.1	11.0 ± 1.2	10.2 ± 0.8	10.6 ± 0.5
35	17.8 ± 2.4	17.8 ± 0.8	18.2 ± 1.3	10.4 ± 1.1	9.4 ± 1.5	10.6 ± 0.9
42	16.4 ± 0.9	15.4 ± 3.1	16.4 ± 1.7	10.8 ± 1.1	10.0 ± 1.2	11.4 ± 0.9
49	17.8 ± 1.6	17.8 ± 1.5	17.4 ± 1.1	11.4 ± 0.5	11.6 ± 1.5	11.8 ± 0.8
56	17.0 ± 1.2	17.0 ± 1.2	17.0 ± 0.7	12.0 ± 1.2	11.4 ± 1.1	12.0 ± 0.7
63	16.4 ± 1.5	15.6 ± 1.5	16.2 ± 0.8	11.2 ± 1.3	11.2 ± 0.8	11.0 ± 0.7
70	16.6 ± 1.1	16.6 ± 1.1	16.0 ± 1.0	11.4 ± 1.5	11.4 ± 1.7	12.4 ± 1.1
77	16.6 ± 0.9	17.2 ± 1.1	16.8 ± 0.8	10.0 ± 1.2	10.0 ± 1.2	10.8 ± 1.3
84	16.6 ± 0.9	17.0 ± 1.2	17.0 ± 1.2	11.0 ± 1.2	10.2 ± 1.3	11.6 ± 0.9
89	15.0 ± 2.0	15.6 ± 1.9	14.8 ± 0.8	10.8 ± 1.3	10.8 ± 0.8	11.8 ± 1.5

Each value represents the mean ± S.D. ( $n=5$  cages/each group, 2 rats/each cage).

## (2) 血液学的検査

MCHC の高値が LLE 高用量群の雄において見られた ( $p<0.05$ ) (Table 9). しかし、背景値内のわずかな変化であり、生理的変動 (32.70-35.30) の範囲内と考えられた。



**Table 9. Hematological Findings in Rats after 90 Days Oral Administration of LLE**

	Males			Females		
	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg
RBC (x10 <sup>4</sup> /μl)	975.2 ± 29.3	967.4 ± 47.5	942.2 ± 41.6	800.1 ± 47.3	806.5 ± 41.6	782.0 ± 40.2
Hgb (g/dl)	17.53 ± 0.38	17.51 ± 0.59	17.22 ± 0.65	15.75 ± 0.62	15.97 ± 0.66	15.64 ± 0.54
HCT (%)	50.99 ± 1.38	50.53 ± 2.14	49.05 ± 2.45	43.27 ± 2.58	43.59 ± 2.31	42.32 ± 2.06
MCV (fl)	52.29 ± 0.68	52.26 ± 0.49	52.07 ± 0.70	54.08 ± 0.51	54.05 ± 0.49	54.12 ± 0.37
MCH (pg)	17.97 ± 0.35	18.11 ± 0.43	18.27 ± 0.32	19.71 ± 0.47	19.82 ± 0.36	20.02 ± 0.42
MCHC (%)	34.38 ± 0.44	34.65 ± 0.65	35.12 ± 0.64 *	36.45 ± 0.85	36.66 ± 0.58	36.98 ± 0.60
PLT(x10 <sup>4</sup> /μl)	92.89 ± 4.33	90.74 ± 6.24	93.08 ± 7.79	87.38 ± 7.36	88.87 ± 6.56	87.98 ± 6.56
WBC (x10 <sup>3</sup> /μl)	48.5 ± 10.1	41.2 ± 7.3	45.1 ± 12.7	44.3 ± 9.0	49.3 ± 8.1	46.4 ± 8.3
RET (‰)	19.5 ± 3.3	18.9 ± 3.7	20.3 ± 3.0	18.6 ± 3.4	21.3 ± 2.7	19.3 ± 3.5
PT (sec)	16.31 ± 1.79	16.54 ± 0.79	16.08 ± 0.76	14.85 ± 1.06	14.86 ± 0.73	14.70 ± 0.92
APTT (sec)	17.04 ± 2.19	17.94 ± 2.53	17.63 ± 1.99	14.37 ± 1.28	15.57 ± 0.62	14.72 ± 1.52
STAB (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
SEG (%)	27.0 ± 10.1	31.3 ± 6.0	30.6 ± 7.8	18.7 ± 5.3	22.5 ± 6.1	19.5 ± 5.0
LYMPH (%)	72.3 ± 10.1	67.8 ± 5.4	68.5 ± 7.8	80.7 ± 6.0	76.9 ± 6.1	80.1 ± 4.6
MONO (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
BASO (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
EOSIN (%)	0.7 ± 0.9	0.9 ± 1.1	0.9 ± 1.1	0.6 ± 1.3	0.6 ± 1.1	0.4 ± 0.5

Each value represents the mean ± S.D.(n=10/each group). \* $p < 0.05$  vs control group (Dunnett's test)

### (3) 血液化学的検査

ナトリウムの高値が LLE 高用量群の雌 ( $p < 0.05$ ), カルシウムの高値が LLE 低用量群の雌及び高用量群の雌で見られた ( $p < 0.01$ ) (Table 10).

**Table 10. Blood Biochemical Findings in Rats after 90 Days Oral Administration of LLE**

	Males						Females						
	Control		1,000 mg/kg		2,000 mg/kg		Control		1,000 mg/kg		2,000 mg/kg		
T-Bil (mg/dl)	0.065 ± 0.018	0.075 ± 0.020	0.081 ± 0.021	0.067 ± 0.018	0.074 ± 0.019	0.080 ± 0.021	92.5 ± 10.2	90.1 ± 8.4	89.9 ± 9.3	68.4 ± 5.6	70.1 ± 7.9	72.7 ± 7.3	
AST (IU/l)	74.0 ± 12.7	67.6 ± 9.9	68.6 ± 9.8	43.6 ± 7.2	48.0 ± 9.9	52.1 ± 17.9	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.5	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.5	
ALT (IU/l)	125.2 ± 19.9	125.4 ± 18.8	138.6 ± 22.5	981.1 ± 156.9	1165.1 ± 134.5	1098.5 ± 210.0	ChE (IU/l)	292.9 ± 26.1	276.1 ± 18.4	265.9 ± 31.7	148.4 ± 23.4	163.1 ± 20.7	155.6 ± 22.2
γ-GTP (IU/l)	6.56 ± 0.18	6.54 ± 0.37	6.65 ± 0.25	5.86 ± 0.23	6.08 ± 0.35	5.95 ± 0.35	ALP (IU/l)	1.362 ± 0.058	1.322 ± 0.072	1.335 ± 0.062	1.403 ± 0.046	1.440 ± 0.100	1.339 ± 0.101
ChE (IU/l)	3.78 ± 0.08	3.72 ± 0.19	3.80 ± 0.15	3.42 ± 0.15	3.58 ± 0.17	3.40 ± 0.20	TP (g/dl)	2.78 ± 0.13	2.82 ± 0.21	2.85 ± 0.14	2.44 ± 0.10	2.50 ± 0.22	2.55 ± 0.22
Alb (g/dl)	2.78 ± 0.13	2.82 ± 0.21	2.85 ± 0.14	2.44 ± 0.10	2.50 ± 0.22	2.55 ± 0.22	A/G	61.1 ± 6.5	60.2 ± 7.2	64.6 ± 9.1	93.7 ± 8.3	99.1 ± 12.1	95.1 ± 13.7
Glb (g/dl)	103.4 ± 31.4	92.6 ± 26.7	109.9 ± 40.2	53.6 ± 22.0	52.9 ± 23.0	38.9 ± 9.8	Alb (g/dl)	172.8 ± 18.4	174.5 ± 25.4	172.7 ± 18.4	159.0 ± 14.9	156.5 ± 16.3	169.8 ± 17.8
T-Cho (mg/dl)	103.4 ± 31.4	92.6 ± 26.7	109.9 ± 40.2	53.6 ± 22.0	52.9 ± 23.0	38.9 ± 9.8	T-Cho (mg/dl)	29.22 ± 4.16	26.35 ± 2.71	26.89 ± 2.55	21.01 ± 1.92	23.00 ± 2.70	21.59 ± 2.64
TG (mg/dl)	172.8 ± 18.4	174.5 ± 25.4	172.7 ± 18.4	159.0 ± 14.9	156.5 ± 16.3	169.8 ± 17.8	Crea (mg/dl)	0.45 ± 0.10	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.08	0.42 ± 0.06	0.43 ± 0.05	0.38 ± 0.04
Glu (mg/dl)	29.22 ± 4.16	26.35 ± 2.71	26.89 ± 2.55	21.01 ± 1.92	23.00 ± 2.70	21.59 ± 2.64	Na (mmol/l)	142.5 ± 0.8	142.8 ± 1.1	142.9 ± 0.6	142.2 ± 0.8	142.5 ± 0.8	143.3 ± 0.8 *
BUN (mg/dl)	0.45 ± 0.10	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.08	0.42 ± 0.06	0.43 ± 0.05	0.38 ± 0.04	K (mmol/l)	4.39 ± 0.31	4.58 ± 0.29	4.56 ± 0.36	4.23 ± 0.25	4.17 ± 0.20	4.18 ± 0.17
Crea (mg/dl)	142.5 ± 0.8	142.8 ± 1.1	142.9 ± 0.6	142.2 ± 0.8	142.5 ± 0.8	143.3 ± 0.8 *	Cl (mmol/l)	104.5 ± 1.3	140.7 ± 1.1	104.3 ± 1.5	105.6 ± 0.5	104.8 ± 1.0	105.4 ± 0.7
Na (mmol/l)	4.39 ± 0.31	4.58 ± 0.29	4.56 ± 0.36	4.23 ± 0.25	4.17 ± 0.20	4.18 ± 0.17	Ca (mmol/l)	11.06 ± 0.21	10.95 ± 0.27	10.88 ± 0.21	9.96 ± 0.14	11.36 ± 0.73 ##	11.44 ± 0.25 ##
K (mmol/l)	104.5 ± 1.3	140.7 ± 1.1	104.3 ± 1.5	105.6 ± 0.5	104.8 ± 1.0	105.4 ± 0.7	IP (mg/dl)	6.50 ± 1.14	6.16 ± 0.62	6.02 ± 0.67	5.71 ± 0.39	5.85 ± 0.91	5.54 ± 0.49
Cl (mmol/l)	11.06 ± 0.21	10.95 ± 0.27	10.88 ± 0.21	9.96 ± 0.14	11.36 ± 0.73 ##	11.44 ± 0.25 ##							
Ca (mmol/l)	6.50 ± 1.14	6.16 ± 0.62	6.02 ± 0.67	5.71 ± 0.39	5.85 ± 0.91	5.54 ± 0.49							

Each value represents the mean ± S.D. (n=10/each group). \**p*<0.05, compared with control group (Dunnett's test), ##*p*<0.01 vs control group (nonparametric Dunnett's test)

#### (4) 病理学的検査

剖検時の肉眼的観察では、いずれの群においても LLE 投与に起因すると考えられる変化は見られなかった (data not shown).

脳の絶対重量の低値が LLE 低用量群の雌で見られ、脾臓の絶対重量の低値が高用量群の雄で見られた (Table 11, 12). いずれも背景値内のわずかな変化であり、組織学的検査に異常は認められなかったことから、LLE 投与に起因するとは考えられなかった.

病理組織学的検査では、肝臓の小肉芽巢 (+) が低用量群の雄及び高用量群の雄で、腎臓の近位尿細管上皮内の好酸性小体 (+) が低用量群及び高用量群の雄、好塩基性尿細管 (+) が高用量群の雄で認められた. しかし、いずれも自然発生的に散見されるものであり、対照群と比べて発生頻度及び程度に差はなく、LLE による影響とは考えられなかった. その他器官において病理組織学的な変化は認められなかった.

**Table 11. Absolute Organ Weights in Rats after 90 Days Oral Administration of LLE**

	Males			Females		
	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg
Brain (g)	2.048 ± 0.050	2.027 ± 0.060	1.997 ± 0.063	1.811 ± 0.044	1.772 ± 0.020 *	1.789 ± 0.033
Heart (g)	0.926 ± 0.066	0.949 ± 0.056	0.953 ± 0.041	0.587 ± 0.037	0.582 ± 0.023	0.596 ± 0.048
Liver (g)	9.059 ± 0.587	8.707 ± 0.477	9.232 ± 0.637	4.782 ± 0.283	4.753 ± 0.271	4.903 ± 0.403
Kidney (g)	2.233 ± 0.125	2.211 ± 0.116	2.230 ± 0.095	1.297 ± 0.064	1.304 ± 0.066	1.358 ± 0.073
Thymus (g)	0.221 ± 0.016	0.202 ± 0.019	0.200 ± 0.027	0.183 ± 0.024	0.180 ± 0.025	0.175 ± 0.032
Spleen (g)	0.657 ± 0.055	0.615 ± 0.045	0.606 ± 0.031 *	0.438 ± 0.057	0.428 ± 0.033	0.431 ± 0.045
Adrenal gland (mg)	51.5 ± 6.4	50.9 ± 3.3	49.4 ± 4.3	48.4 ± 3.9	50.7 ± 3.8	50.2 ± 5.7
Lung (g)	1.023 ± 0.048	0.989 ± 0.046	1.000 ± 0.042	0.739 ± 0.066	0.748 ± 0.069	0.720 ± 0.046
Testis (g)	3.054 ± 0.112	2.953 ± 0.103	2.967 ± 0.126	—	—	—
Epididymis (g)	0.945 ± 0.032	0.913 ± 0.034	0.911 ± 0.035	—	—	—
Prostate (g)	0.859 ± 0.123	0.894 ± 0.116	0.872 ± 0.075	—	—	—
Seminal vesicle (g)	1.287 ± 0.103	1.216 ± 0.095	1.168 ± 0.124	—	—	—
Ovary (mg)	—	—	—	53.4 ± 5.1	58.6 ± 7.4	57.8 ± 6.2
Uterus (g)	—	—	—	0.462 ± 0.165	0.439 ± 0.163	0.418 ± 0.096
Salivary gland (g)	0.519 ± 0.040	0.521 ± 0.035	0.495 ± 0.034	0.332 ± 0.019	0.334 ± 0.018	0.333 ± 0.019
Thyroid (mg)	17.22 ± 2.27	19.12 ± 2.30	17.76 ± 1.05	11.98 ± 2.10	11.37 ± 1.20	13.61 ± 3.12

Each value represents the mean ± S.D. (n=10/each group). \**p*<0.05 vs control group (Dunnett's test)

**Table 12. Relative Organ Weights in Rats after 90 Days Oral Administration of LLE**

Day	Males			Females		
	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg
Body weight (g)#	348.8 ± 15.5	347.1 ± 17.9	339.1 ± 10.5	193.6 ± 13.5	188.7 ± 9.3	198.5 ± 14.9
Brain (g%)	0.590 ± 0.029	0.586 ± 0.033	0.590 ± 0.023	0.939 ± 0.053	0.941 ± 0.045	0.906 ± 0.064
Heart (g%)	0.264 ± 0.012	0.273 ± 0.018	0.282 ± 0.018	0.304 ± 0.017	0.309 ± 0.019	0.299 ± 0.013
Liver (g%)	2.596 ± 0.072	2.514 ± 0.145	2.727 ± 0.236	2.475 ± 0.127	2.521 ± 0.130	2.471 ± 0.105
Kidney (g%)	0.640 ± 0.027	0.637 ± 0.039	0.658 ± 0.030	0.672 ± 0.039	0.693 ± 0.035	0.686 ± 0.039
Thymus (g%)	0.064 ± 0.005	0.060 ± 0.077	0.060 ± 0.008	0.094 ± 0.008	0.094 ± 0.012	0.087 ± 0.012
Spleen (g%)	0.189 ± 0.015	0.177 ± 0.009	0.179 ± 0.009	0.227 ± 0.021	0.228 ± 0.024	0.217 ± 0.016
Adrenal gland (mg%)	14.8 ± 1.7	14.6 ± 1.2	14.6 ± 1.1	25.1 ± 1.9	26.9 ± 2.6	25.4 ± 2.6
Lung (g%)	0.293 ± 0.018	0.285 ± 0.014	0.296 ± 0.014	0.383 ± 0.045	0.398 ± 0.047	0.364 ± 0.029
Testis (g%)	0.876 ± 0.044	0.853 ± 0.044	0.876 ± 0.038	—	—	—
Epididymis (g%)	0.270 ± 0.011	0.265 ± 0.013	0.269 ± 0.014	—	—	—
Prostate (g%)	0.246 ± 0.030	0.258 ± 0.039	0.258 ± 0.024	—	—	—
Seminal vesicle (g%)	0.367 ± 0.032	0.351 ± 0.032	0.346 ± 0.040	—	—	—
Ovary (mg%)	—	—	—	27.7 ± 1.4	31.0 ± 4.1	29.0 ± 1.9
Uterus (g%)	—	—	—	0.237 ± 0.080	0.235 ± 0.096	0.210 ± 0.044
Salivary gland (g%)	0.148 ± 0.009	0.152 ± 0.012	0.146 ± 0.013	0.171 ± 0.007	0.178 ± 0.016	0.169 ± 0.011
Thyroid (mg%)	4.95 ± 0.76	5.51 ± 0.61	5.23 ± 0.32	6.22 ± 1.23	6.03 ± 0.67	6.81 ± 1.19

Body weight (g)# : Terminal body weight. Each value represents the mean ± S.D. (n=10/each group).

## (5) 尿検査

尿検査では、ナトリウムの高値が LLE 低用量群の雄 ( $p<0.01$ ) 及び高用量群の雌雄 ( $p<0.01$ ) で見られ、カリウムの高値が低用量群の雄 ( $p<0.01$ ) 及び雌 ( $p<0.05$ )、高用量群の雌雄 ( $p<0.01$ ) で見られた (Table 13). その他の検査項目に有意な差は見られなかった.

血液生化学検査でナトリウム及びカルシウムの高値が、尿検査でナトリウム及びカリウムの高値が見られたが、これらの変化は LLE にナトリウム、カリウム、カルシウムの含有量が高く、血中及び尿のほぼ用量に依存した増加はこれらイオンの消化管吸収と腎からの排泄のバランスを示すものであり、他の検査項目及び病理組織学的検査にこれらイオン増加の影響は見られず、毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった.

**Table 13. Urinalysis in Rats after 90 Days Oral Administration of LLE**

	Males			Females		
	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	Control	1,000 mg/kg	2,000 mg/kg
Na-U (mmol/l)	23.0 ± 5.8	43.9 ± 5.9 **	60.9 ± 4.6 **	27.5 ± 21.2	48.2 ± 28.4	61.6 ± 26.0 *
K-U (mmol/l)	64.8 ± 21.9	187.8 ± 42.9 **	304.2 ± 47.3 **	57.0 ± 30.0	128.3 ± 25.9 #	307.3 ± 88.1 ##

Each value represents the mean ± S.D. ( $n=10$ /each group). \* $p<0.05$ , compared with control group (Dunnett's test), # $p<0.05$ , ## $p<0.01$  vs control group (non-parametric Dunnett test)

## 第 4 項 考察

これまでに Yu Y.らは、羅布麻葉の濃縮茶液の安全性に関し問題はないとの評価を報告している.<sup>71)</sup> Wang H.らは羅布麻葉の濃縮茶液の急性毒性における致死量 ( $LD_{50}$ ) は 10 g/kg 以上と報告している.<sup>72)</sup>

また、うつ病患者に 50 mg の羅布麻葉エキスを毎日、2 週間から 3.5 年摂取させた結果、何ら副作用は認められなかったという臨床報告がある.<sup>73)</sup> Zheng M.らは、羅布麻葉エキスが PC12 細胞におけるコルチコステロン誘導性の神経毒性に及ぼす影響を検討し、羅布麻葉エキスは PC12 細胞に毒性を示さず、保護作用を示したと報告している.<sup>74)</sup>

今回、Wistar 系ラットを用い、LLE の 90 日間反復投与毒性試験を 1,000mg/kg

(低用量群), 2,000mg/kg (高用量群) と対照群 (精製水) の3群で行った。その結果, いずれの群においても死亡例はなく, 一般状態, 体重及び摂餌量に異常は見られなかった。また, 血液学, 血液生化学及び尿検査において毒性学的に意義のある影響は認められなかった。投与終了後の器官の絶対重量及び相対重量ともに何ら変化は認められず, 肉眼検査における組織学的な変化は認められなかった。

以上の結果から, LLE の経口投与により, 雌雄ラット共に 2,000 mg/kg/日で悪影響はないものと判断した。従って, LLE に毒性は認められないことが示され, 安全性に問題ないと評価した。

## 第5章 羅布麻茶葉エキスのヒト試験での降圧効果

### 第1項 背景

厚生労働省の2010年国民健康・栄養調査によると、高血圧は加齢とともに増加し高率に認められ、今後高齢化が進むに従い高血圧者の比率は益々増加すると考えられている。高血圧は徐々に進行するため、正常高値血圧者についてもその予備軍として無視できない存在となってきた。一般に、高血圧者にはACE阻害剤等の医薬品が使用される場合が多いが、肝機能障害や空咳等の副作用を生じることがあり、必ずしも長期服用において安全性が確立されているとは言い難い。このような背景から、近年、血圧を含めた生活習慣病の改善は、日頃からのプライマリーケアが重要であるとの認識から、特定保健用食品が数多く開発されている。<sup>75-77)</sup>

第2章及び第3章で、LLEはSHRに対し降圧作用を有し、その作用は主成分である「HP+IQ」の両成分が太い冠動脈血管ではNO、細い抵抗血管ではNOとEDHFを介して血管平滑筋弛緩を起こすことを述べた。<sup>23,28,37,39)</sup> 一方で、正常ラット(WKY)に投与しても血圧に変動を認めず、<sup>23)</sup> 正常血圧には影響がないことが示唆された。さらに、中国におけるヒト臨床学的評価では、1日に羅布麻葉を5-15g(茶葉重量)、<sup>78)</sup> あるいは1日に羅布麻茶エキス500-750mg<sup>79)</sup>を摂取することで降圧効果があると報告されている。また、正常血圧者の血圧への影響や大きな副作用は認められなかったことが報告されている。<sup>79)</sup>

今回、「LLE含有飲料」を開発するに当たり、LLE及び「HP+IQ」としての投与量は、SHRへの投与量及び中国におけるヒト臨床報告の投与量、<sup>23,39,78,79)</sup> さらに食品としての香味を考慮しLLE 2,200mg(「HP+IQ」30mg含有)/60kg/日と設定した(Table 14)。このとき、ラットの感受性をヒトの50倍として算出した。この「LLE含有飲料」に含まれるフラボノイド(HP及びIQ)については、羅布麻葉、羅布麻茶葉及びLLEそれぞれに含まれるHP及びIQと同一・同等であることを確認している。<sup>23)</sup>

本章では、LLE 2,200mgより製した「LLE含有飲料」(「HP+IQ」30mg含有、1本500ml)を12週間連続摂取させた際の降圧作用を検討するため、WHO/ISHの血圧の定義・分類(1999年)で正常高値血圧(収縮期血圧130-139mmHg、拡張

期血圧 85-89 mmHg) 及び軽症高血圧 (収縮期血圧 140-159 mmHg, 拡張期血圧 90-99 mmHg) に該当する高血圧症者を対象として, プラセボ食を用いた 2 重盲検並行 2 群間試験を実施した.

**Table 14. Dose of LLE and Mixture [HP+IQ] for Rats or Humans in References**

Subject	Test	Methods for administration / intake of sample	Converted to dose of LLE and mixture [HP+IQ] for rat (kg body weight )	Converted to dose of LLE and mixture [HP+IQ] for (60 kg body weight)	Reference No.
SHR	oral administration of 7 weeks (free intake LLE- mixed food)	LLE 1.25, 2.5, 5.0%- mixed foods	LLE about 900, 1800, 3200 mg [HP+IQ] about 11, 22, 40 mg	LLE about 1,000-3,800 mg [HP+IQ] about 12.5-50 mg	23
SHR	oral administration of 7 weeks (by gavage)	HP+IQ 20, 40 mg/kg/rat	[HP+IQ] about 20, 40 mg	[HP+IQ] about 24-50 mg	39
Humans (Chinese)	intake of Luobuma dry leaf for tea	Luobuma dry leaf 5-15g	LLE about 16-50 mg [HP+IQ] about 200-600 ng	LLE about 1,000-3,000 mg [HP+IQ] about 12-36 mg	78
Humans (Chinese)	intake of Luobuma leaf extract for 2-3 months	Luobuma leaf extract 500-750 mg /day	LLE about 8-12.5 mg [HP+IQ] about 100-150 ng	LLE about 500-750 mg [HP+IQ] about 12-36 mg	79

## 第 2 項 実験方法

### (1) 試験食

試験食は, 1 本 500 ml からなる「LLE 含有飲料」(以下, 被験食) あるいは「LLE を含有していない飲料」(以下, プラセボ食) とした. LLE の調製及び品質の確認は第 2 章第 1 節第 2 項に準じ行った.

被験食は, LLE 2,200 mg (乾燥重量) /500 ml の濃度になるよう, LLE を水で希釈して作製し, 500 ml あたり「HP+IQ」が 30 mg (HP 15 mg, IQ 15 mg) 含有するよう調製した. また, プラセボ食は, カラメル色素, チャフレーバー, 重曹を用いており, 被験食と比較して, 味, におい, 性状において被験食と区別がつかないように作製した. 各試験食の栄養組成表を Table 15 に示す.

**Table 15. Nutrient Composition of the Test Food and Pabebo (per 100 ml)**

	Test Food	Placebo
HP+IQ (mg)	30	0
( HP/IQ ) (mg)	15/15	0
Energy (kcal)	1	0
Protein (g)	0	0
Lipid (g)	0	0
Carbohydrates (g)	0	0
Na (mg)	11	4
K (mg)	33	0

**(2) 対象者**

対象となる被験者は、治験実施先である総合医科学研究所が公募した有償ボランティアである。対象の選定にあたっては、総合医科学研究所の「未治療被験者データベース」に登録された一般成人の中から、試験開始までの2ヶ月間以上、定期的に総医研クリニック（院長 宮塚健）で診察を受け、WHO/ISH 高血圧症の定義・分類（1999年）並びに日本高血圧学会の高血圧治療ガイドライン（2000年）による分類の正常高値血圧（収縮期血圧 130-139 mmHg, 拡張期血圧 85-89 mmHg）及び軽症高血圧（収縮期血圧 140-159 mmHg, 拡張期血圧 90-99 mmHg）を満たしていることを条件とした。ただし、二次性高血圧症の者、試験食に対しアレルギー症状を示す恐れのある者、医師により緊急的に降圧剤の投与が必要と判断された者、アルコール中毒者、重度の貧血のある者、重篤な疾患に罹患中の者は除外した。さらに、なんらかの内服薬を定期的に服用している者及び血圧に影響を与える可能性のあるサプリメントの常飲者は除外した。その結果、血圧の条件を満たし、かつ試験担当医師が認めた者93名をエントリーした。この93名を試験に直接参加しない医師（平田 洋 元岡山大学第3内科助教授）が、収縮期血圧、拡張期血圧、年齢等において差がないよう2群に分けた。しかし、個人的理由で最後まで試験に参加しなかった者2名を除外した結果、最終的に検討の対象となった被験者数は91名（平均年齢 55.6±8.3, 男性29名, 女性62名）であった。91名の内訳をTable 16に示す。年齢、血圧、脈



拍数，身長，体重，肥満指数において，両群間で有意差は認められなかった．なお，個人的な理由で脱落した 2 名については，その理由がいずれも試験に無関係であることを担当医師により確認した．

試験の実施に際しては，総合医科学研究所及び総医研クリニック合同審査委員会（委員長 井上昌治弁護士）の承認のもとに行われ，ヘルシンキ宣言（1964 年採択，'75，'83，'89，'96，2000 年修正）の主旨に従い，被験者に対しては研究内容，方法等について医師より十分な説明を行い，文書による同意を得て実施した．

**Table 16. Characteristics of the Two Groups**

	Test Food Group	Placebo Group
Number of subjects ( male / female)	47 (16/31)	44 (13/31)
Number of subjects at high normal blood pressure ( male / female)	23 (10/13)	23 (9/14)
Number of subjects at mild hypertension ( male / female)	24 (6/18)	21 (4/17)
Age	55.6 ± 8.0	55.5 ± 8.7
Body Weight (kg)	61.1 ± 11.3	62.7 ± 8.9
Stature (cm)	158.7 ± 8.0	158.9 ± 8.4
BMI	24.1 ± 3.0	24.8 ± 3.0
Systolic blood pressure (mmHg)	141.4 ± 8.3	140.8 ± 8.1
Diastolic blood pressure (mmHg)	85.1 ± 6.3	85.3 ± 6.8
Pulse rate (beats/min)	70.8 ± 8.2	70.6 ± 7.1

Values are the mean±S.D. (n=47 or 44)

### (3) 投与方法

被験者には，被験食あるいはプラセボ食 1 本 (500 ml) を毎朝食前に摂取させた．

### (4) 試験スケジュール

試験は二重盲検法を採用し，2 種の飲料の並行群間比較試験とした．試験は，

前観察（非摂取）期間2週間，摂取期間12週間，後観察（非摂取）期間4週間の合計18週間（2004年1月17日-5月22日）とした。

なお，被験者には試験食を毎日定時に摂取することを除いて，それまでの食生活，喫煙量及び運動等の日常生活を変えることのないように指示した。

## **(5) 検査方法**

血圧，脈拍数，体重及び身長測定は，すべて総医研クリニックで実施した。また，全被験者を数グループに分け，各回の検査は同一時間及び同一検者にて実施した。検査日においては，被験者を空腹状態で来院させた。ただし，摂取期間中の検査日（摂取2週間後，4週間後，6週間後，8週間後，10週間後，12週間後の計6回）においては，被験食またはプラセボ食のみを来院の2-3時間前に摂取させ，それ以外の摂取を禁止した。なお，すべての検査を医師の管理のもとに実施した。

### **1) 血圧・脈拍数**

血圧及び脈拍数は，前観察期間（摂取2週間前，1週間前），摂取開始日，摂取2週間後，4週間後，6週間後，8週間後，10週間後，12週間後，摂取終了2週間後，4週間後の計11回測定した。血圧の測定は，来院後10分以上安静させた後，坐位・着衣の状態です腕肘部を測定部位として1分間の間隔を空けて実施した。なお，測定に際しては，水銀血圧計を用いて同一看護師により3回測定し，その平均値をその日の血圧値とした。脈拍数については，1回測定とした。

### **2) 体重・身長**

体重は摂取2週間前，摂取開始日，摂取4週間後，8週間後，12週間後，摂取終了4週間後の計6回測定した。身長は摂取1週間前のみ測定を行い，肥満指数（body mass index : BMI）を算出した。

## (6) 統計処理

全ての測定値は、平均値±標準偏差で示した。摂取期間における血圧、脈拍数の変動については、二元配置分散分析 (two-way repeated-measures ANOVA) を行い、試験食及び摂取期間の交互作用について解析した。また、摂取開始日と摂取前及び摂取後の血圧、脈拍数、体重、BMI の比較については Bonferroni 多重比較検定を行い、試験食群間の比較については対応のない *t*-test を行った。血液・尿定量検査の被験者内での変動については対応のある *t*-test を、試験食群間については対応のない *t*-test を採用した。尿定性検査結果については、検定を実施しなかった。なお、統計ソフトは株式会社 SPSS 製 SPSS Ver.10 を使用した。いずれの検定においても有意水準は両側検定で 5%未満とした。

## 第 3 項 結果

### (1) 血圧及び脈拍数

正常高値及び軽症高血圧者の収縮期血圧、拡張期血圧及び脈拍数の推移を Table 17 に示す。

収縮期血圧においては、二元配置分散分析の結果、2 つの試験食と摂取した 12 週間の間には、交互作用が存在し、試験食を摂取し続けると効果に違いが出ていることが明らかとなった ( $p=0.001$ )。プラセボ食群においては、有意な変動が認められなかったのに対し、被験食群では、摂取 8 週間後に摂取開始日と比して有意な降下が認められ、摂取終了 2 週間後まで継続して降下した (Bonferroni による多重比較検定)。また、摂取 8, 10, 12 週間後において試験食群間で有意な差が認められた (*t*-test)。拡張期血圧においても、二元配置分散分析の結果、2 つの試験食と摂取した 12 週間の間には、交互作用が存在し、試験食を摂取し続けると効果に違いが出ていることが明らかとなった ( $p=0.007$ )。プラセボ食群においては、有意な変動が認められなかったのに対し、被験食群では、摂取 8, 10, 12 週間後に摂取開始日と比して有意な降下を示した (Bonferroni による多重比較検定)。また、摂取 8, 10, 12 週間後において、被験食群ではプラセボ食群と比して有意な降圧が認められた (*t*-test)。脈拍数については、二元配置分散分析の結果、2 つの試験食と摂取した 12 週間の間には、交互作用が存在し、

試験食を摂取し続けると効果に違いが出ていることが明らかとなった ( $p=0.045$ ). しかし、試験期間中、試験食群間で有意な差は認められず、各試験食群とも摂取期間中の有意な変動も認められなかった。

次に、正常高値血圧者と軽症高血圧者を層別解析した際の収縮期血圧及び拡張期血圧の推移を Fig. 32, Fig. 33 に示す。

**Table 17. Effect of LLE on Blood Pressure in High Normotensive and Mild Hypertensive Adult Male and Female Subjects**

Treatment	Before intake		Start of intake	Intake period		
	Before 2 weeks	Before 1 weeks		2 weeks	4 weeks	
SPB (mmHg)	Test Food	141.4 ± 8.3	141.4 ± 8.3	141.1 ± 9.6	140.1 ± 9.7	138.4 ± 10.7
	Placebo	140.8 ± 8.1	140.4 ± 8.5	140.3 ± 9.3	139.7 ± 9.0	139.4 ± 8.8
DPB (mmHg)	Test Food	85.1 ± 6.3	85.0 ± 7.4	85.7 ± 7.3	83.1 ± 9.2	82.9 ± 6.9
	Placebo	85.3 ± 6.8	84.9 ± 7.5	84.9 ± 7.0	84.8 ± 8.3	84.7 ± 6.7
Pulse rate (beats/min)	Test Food	70.8 ± 8.2	70.7 ± 8.9	68.6 ± 7.1	71.4 ± 7.9	70.1 ± 8.1
	Placebo	70.6 ± 7.1	68.7 ± 6.9	68.4 ± 6.4	68.4 ± 7.5	70.6 ± 7.7

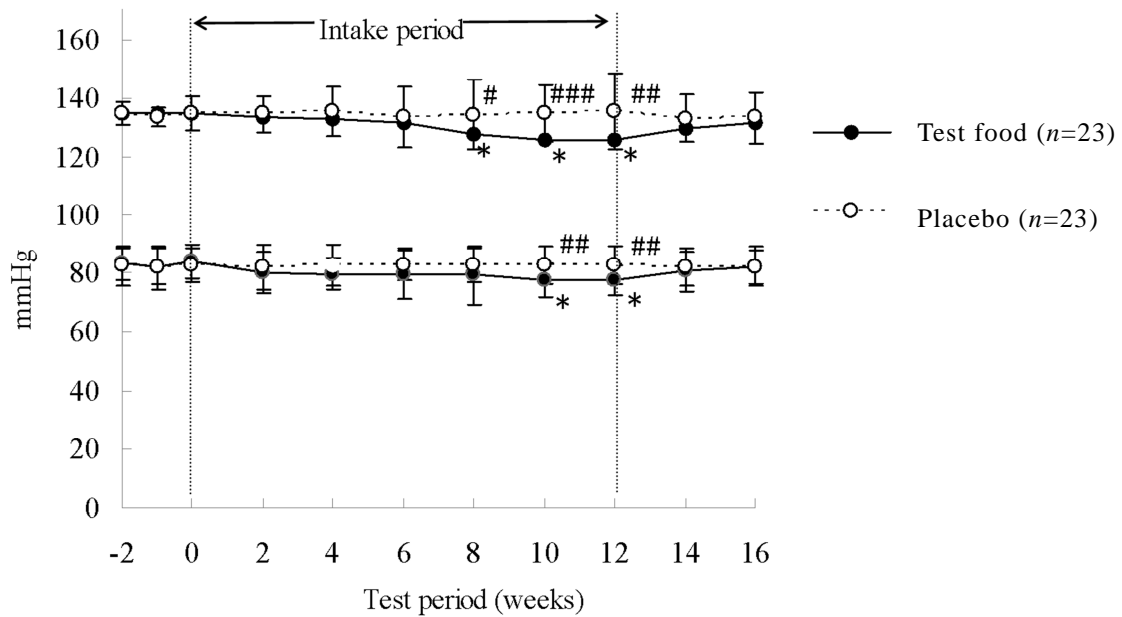
  

		Intake period			
		6 weeks	8 weeks	10 weeks	12 weeks
SPB (mmHg)	Test Food	136.6 ± 9.5	133.0 ± 9.2 ***	131.8 ± 9.5 ***	132.0 ± 10.7 ***
	Placebo	138.8 ± 10.6	139.0 ± 11.1	139.8 ± 10.2	139.9 ± 11.8
DPB (mmHg)	Test Food	82.0 ± 7.4	81.1 ± 9.3 *	79.6 ± 6.3 ***	79.5 ± 6.1 ***
	Placebo	84.7 ± 5.5	84.3 ± 5.5	84.3 ± 6.6	84.6 ± 6.1
Pulse rate (beats/min)	Test Food	68.5 ± 6.5	72.7 ± 8.7	71.3 ± 8.4	69.4 ± 8.6
	Placebo	70.9 ± 9.2	70.7 ± 7.3	70.0 ± 7.9	68.5 ± 6.1

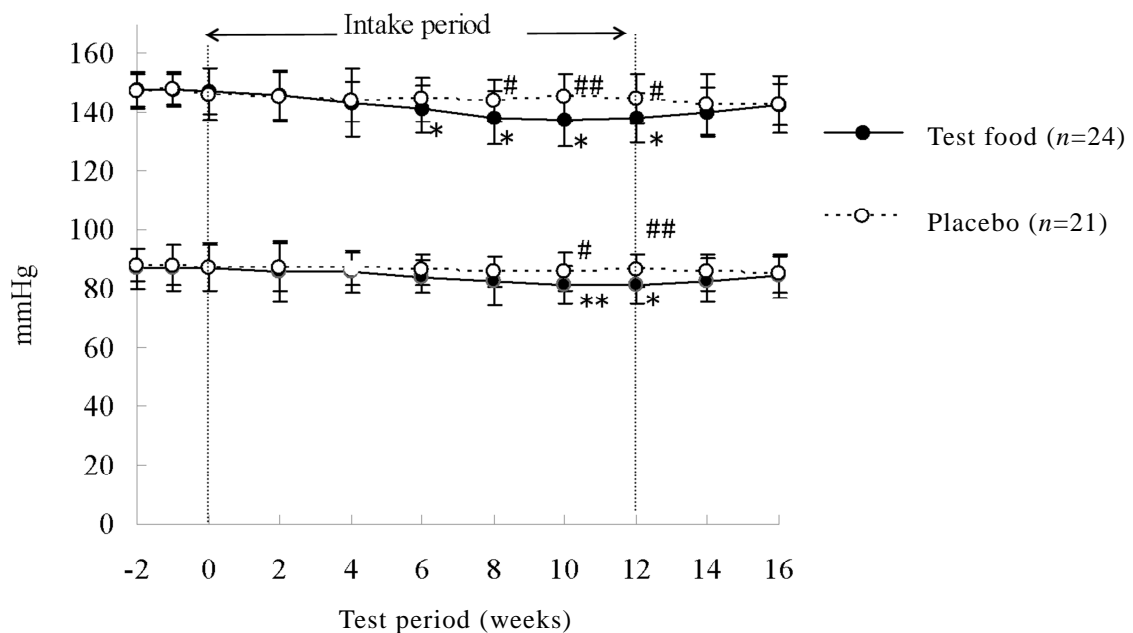
		After intake		Two-way Repeated-Measures ANOVA (※)
		After 2 weeks	After 4 weeks	
SPB (mmHg)	Test Food	135.3 ± 9.2 **	137.4 ± 9.6	0.001
	Placebo	137.7 ± 10.6	137.9 ± 10.3	
DPB (mmHg)	Test Food	81.8 ± 7.2	83.3 ± 6.5	0.007
	Placebo	83.7 ± 6.5	83.7 ± 6.4	
Pulse rate (beats/min)	Test Food	71.4 ± 8.1	71.4 ± 6.3	0.045
	Placebo	68.6 ± 7.6	70.9 ± 7.9	

SPB : systolic blood pressure, DBP : diastolic blood pressure. Each value represents the mean ± S.D. (test food :  $n=47$ , placebo :  $n=44$ ). # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$  vs placebo group (unpaired  $t$ -test), \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs start of intake (Bonferroni test)



**Fig. 32 Effect of LLE on Blood Pressure in High Normotensive Adult Male and Female Subjects**

# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs placebo group (*t*-test), \* $p < 0.05$  vs start of intake (Bonferroni test)



**Fig. 33. Effect of LLE on Blood Pressure in Mild Hypertensive Adult Male and Female Subjects**

#,  $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs placebo group (*t*-test), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs start of intake (Bonferroni test)

正常高値血圧者では、二元配置分散分析の結果、2つの試験食と摂取した12週間の間には交互作用が存在し、試験食を摂取し続けると効果に違いが出ていくことが明らかとなった ( $p=0.002$ )。プラセボ食群においては、有意な変動が認められなかったのに対し、収縮期血圧においては、被験食群で摂取8週間後から摂取12週間後まで有意な降下を示した (Bonferroniによる多重比較検定)。また、摂取8週間後から12週間後において、被験食群ではプラセボ食群と比して有意な降圧が認められた ( $t$ -test)。拡張期血圧においては、二元配置分散分析の結果、2つの試験食と摂取した12週間の間には、交互作用は存在せず ( $p=0.104$ )、試験食を摂取し続けても効果に違いが出てこないことが明らかとなったが、被験食群では、摂取開始日と比して摂取10, 12週間後に有意な降下を示した (Bonferroniによる多重比較検定)。プラセボ食群では有意な変動は認められなかった。また、摂取10, 12週間後において試験食群間で有意な差が認められた ( $t$ -test)。

軽症高血圧者では、二元配置分散分析の結果、収縮期血圧において、2つの試験食と摂取した12週間の間には、交互作用が存在し、試験食を摂取し続けると効果に違いが出ていることが明らかとなった ( $p=0.007$ )。プラセボ食群においては、有意な変動が認められなかったのに対し、被験食群においては、摂取6週間後から摂取12週間後まで有意な降下が認められた (Bonferroniによる多重比較検定)。また、摂取8, 10, 12週間後において試験食群間で有意な差が認められた ( $t$ -test)。拡張期血圧においては、二元配置の分散分析の結果、2つの試験食と摂取した12週間の間には、交互作用は存在せず ( $p=0.193$ )、試験食を摂取し続けても効果に違いが出てこないことが明らかとなったが、摂取開始日と比して、摂取10, 12週間後に有意な降下を示した。また、摂取10, 12週間後において試験食群間で有意な差が認められた。

## (2) 体重及び肥満指数

被験食群において、体重及び肥満指数で摂取終了4週間後に有意な低下が認められたが、試験食群間では有意な差は認められなかった。

#### 第4項 考察

本試験では、LLE 含有飲料の 12 週間摂取に伴う有効性を確認するため、プラセボ食を対照とした二重盲検による 2 群間並行試験を実施した。その結果、正常高値血圧者及び軽症高血圧者に対し、収縮期血圧及び拡張期血圧において、それぞれ二元配置の分散分析の結果、交互作用が存在し、LLE 含有飲料を摂取することにより、降圧作用を有することが示された。また、正常高値血圧者、軽症高血圧者に層別解析した結果においても、同様の傾向を有することが示された。一方、脈拍数においても、正常高値血圧者及び軽症高血圧者に対して、二元配置の分散分析の結果、交互作用が存在したが、各群の摂取期間中の経時的変化を見ると、LLE 含有飲料の効果が期待できる変動ではないため、その意義については不明である。

LLE の SHR での降圧作用に関し、主成分である HP と IQ の 2 つのフラボノイドが関与し、その機序は NO あるいは EDHF を介した血管平滑筋弛緩であることを述べた。<sup>23,37,39)</sup> よって本被験食摂取による降圧効果もこの機序によるものであり、持続的な降圧作用は 2 つのフラボノイドが相互に作用して機能するものと考えられる。また、LLE 中の HP と IQ の存在比はほぼ同程度であり、<sup>26)</sup> その比率が持続的な降圧に重要である可能性が示唆された。本試験で用いた LLE 量 (フラボノイド量) の設定については、SHR 等を用いた動物実験、<sup>23)</sup> ヒト食文化調査、<sup>6)</sup> 中国におけるヒト臨床報告<sup>78,79)</sup> 等の結果をもとに設定を行っており、その基準値は茶葉 5-15g 相当であるが、食品としての香味等を考慮して LLE 2,200 mg/500 ml/日 (=「HP+IQ」30mg/日) と設定した本試験でも十分に降圧効果を認めることができた。

一方、HP 及び IQ のアグリコンである quercetin もヒトにおいて降圧作用を示すことが報告され、<sup>80,81)</sup> その機序は NO を介した平滑筋弛緩によることが示唆されている。<sup>24,82)</sup> Edwards R.L.ら(2007 年)は、高血圧前症 (収縮期血圧 120-139 mmHg, 拡張期血圧 80-89 mmHg), 軽症高血圧(収縮期血圧 140-159 mmHg, 拡張期血圧 90-99 mmHg)の男女に quercetin 365 mg のサプリメントを毎日 2 回(計 730 mg), 28 日間連続摂取させた結果、高血圧前症者には変化は認められず、軽症高血圧者に対してのみ有意な降圧作用を認めたことを報告している。<sup>80)</sup> さら

に、Egert S.ら (2009 年) は、メタボリックシンドローム該当男女に quercetin 150 mg のサプリメントを毎日 6 週間摂取させた結果、収縮期血圧  $130.3 \pm 16.4$  mmHg (平均値±標準誤差) が摂取後に  $127.1 \pm 12.9$  mmHg (平均値±標準誤差) と、摂取前に比べて有意に下がったことを報告している。<sup>81)</sup> しかし、前述の 2 つの試験における quercetin 用量は 730 mg 及び 150 mg/日で、本試験における「HP+IQ」の有効量 30 mg/日に比べて高い用量設定<sup>39,80,81)</sup> が必要とされている。これは quercetin と「HP+IQ」の腸管での吸収効率の違いによると考えられる。これまでに、quercetin よりも IQ の方が吸収 (AUC) が高いことが動物試験における血中代謝物濃度の結果から明らかにされ、<sup>47)</sup> ヒト試験の結果からも、配糖体の中でもグルコース配糖体は他の配糖体やアグリコンである quercetin より吸収されやすいことが報告されている。<sup>83,84)</sup> IQ は、小腸で SGLT-1 を介して選択的に細胞内に取り込まれる経路 (その後、小腸粘膜上皮細胞中の  $\beta$ -グルコシダーゼによりアグリコンとなって血中へ吸収される<sup>85)</sup>) と、取り込まれる前に上皮細胞表面のラクターゼ・フロリジン分解酵素でアグリコンに加水分解され、疎水性が高まることにより受動的に吸収される経路の 2 経路により吸収される。<sup>60)</sup> quercetin の場合は小腸で受動的に吸収される経路のみであり、<sup>60)</sup> このことが quercetin と IQ の吸収に影響していると考えられる。さらに LLE の主フラボノイド成分「HP+IQ」は、quercetin よりも吸収量 (AUC) が高く Tmax も早い IQ と、IQ より遅れて主に大腸で吸収される HP の混合物であるため、吸収量の高さと一定濃度の持続という 2 つの点から、quercetin 単体よりも少ない量で血圧に対して効果を示す可能性が高いことが示唆された。

なお、本試験の対象者は WHO/ISH の血圧の定義・分類 (1999 年) で正常高値血圧 (収縮期血圧 130-139 mmHg, 拡張期血圧 85-89 mmHg) 及び軽症高血圧 (収縮期血圧 140-159 mmHg, 拡張期血圧 90-99 mmHg) であり、重篤な高血圧症には至っていない人々といえる。今回 LLE は、このような“血圧が高めの方”に対し有意な降圧作用を示した。しかし中国では羅布麻葉は重度の高血圧症の人々には効果を示さなかったとも報告されており、<sup>78)</sup> 血管内皮の損傷が進み、血管内皮機能が働かなくなった人では効果を示さないことが示唆されている。

また、本試験の安全性においては、被験食を毎日摂取しても収縮期血圧が



正常高値血圧者で摂取 8 週目，軽症高血圧者で摂取 6 週目に有意な降圧が認められているため，摂取後すぐの急激な降圧はないと考えられる．さらに収縮期血圧においては，摂取を終了してから 2 週間後（摂取終了 2 週間後）においても有意な降圧が認められているが，摂取 12 週間後の値よりも昇圧を示し，摂取終了 4 週間後には有意な差が認められなくなっていることから，蓄積効果もないと推察される．

従って，本試験に用いた「LLE 含有飲料」は正常高値及び軽症高血圧者に対し，有意に顕著な降圧作用を示すことが明らかとなった．よって，「LLE 含有飲料」は血圧が高めの方に適した機能性食品としての有用性は非常に高いという知見を得た．<sup>\*)</sup>

---

\*) LLE 含有飲料である「燕龍茶レベルケア」（ダイドードリンコ）は，血圧への関与成分をフラボノイドとする初めての特定保健用食品として，厚生労働省から許可を受けた．（2007 年 8 月）

## 総 括

高血圧は、脳卒中や心筋梗塞等の大きなリスクファクターであり、加齢とともに進行する。高齢化が進むに従い高血圧者の比率は益々増加すると考えられ、高血圧の予防は国民の健康維持・増進に大きく寄与するものである。

羅布麻 (Luobuma: *Apocynum venetum* L.) の葉は、中国では古くから飲用され、現在の中華人民共和国薬典に“解熱利尿，肝臓を鎮め精神を安らかにさせ，高血圧・目眩・動悸・不眠に用いる”と収載され，日本やアメリカ，カナダにおいても羅布麻茶のティーバッグ及びエキス錠剤が販売されている。羅布麻葉の効能として，脂質過酸化抑制作用，抗酸化作用，肝臓保護作用，抗うつ作用が報告されている。さらに降圧作用に関しては，Dong-W.K.らが高血圧モデルラットに羅布麻葉エキスを経口投与し，有意な降圧作用を認めたことを報告しているが，その詳細なメカニズムは不明である。

本研究では，血圧が高めの方に役立つ機能性食品としての羅布麻葉の有効性を探るため，羅布麻葉エキスの降圧作用とメカニズム，さらに反復投与毒性とヒトでの有効性について検討した。

第1章では，羅布麻葉と，中国で羅布麻として流通している *P. hendersonii* の葉について，指標成分 HP, IQ, quercetin-3-O-sophoroside に基づいた簡便な TLC 法による基原の確認を可能とした。さらに，*A. venetum* を基原とする製品や原料のどの段階においても，同一の HP 及び IQ の標準溶液を用いた HPLC 法を確立し，羅布麻製品の品質を管理する上で簡便性を与えることができた。

第2章では，LLE のラットへの経口投与及び *i.d.*投与により，LLE は SHR へ有意な降圧作用を有し，その降圧作用は ACE 阻害によるものではないことを明らかにした。また，これまでの報告において Kwan らは羅布麻葉エキスをラット冠動脈に用い，NO による内皮依存性の血管弛緩作用を有することを報告している。さらに，本章で LLE をラット腸間膜動脈に用い，低濃度では K<sup>+</sup>チャンネルを介した EDHF，高濃度になると EDHF 及び NO による血管弛緩作用を示すことを明らかにした。従って，ラットにおける LLE の内皮依存性弛緩作用は，抵抗血管である腸間膜血管では主に NO と EDHF によることを示した。

第3章では、LLEの主フラボノイド成分HPとIQのSHRへの経口投与により、LLEの降圧作用には両成分の同時投与が必要であることを明らかにした。また、「HP+IQ」は血管機能の改善効果と降圧作用を有し、その降圧作用機序は血管内皮由来弛緩因子NOを介した平滑筋弛緩によることを明らかにした。さらに、それらの血中代謝物濃度の比較により、HPは主に大腸、IQは主に小腸で吸収されることを明らかにした。さらに両成分を同時投与した場合では、血中のケルセチン代謝物は一定濃度が持続して推移する傾向を認めたことから、このような代謝物濃度の持続が降圧作用の発現に関与している可能性を示した。

第4章では、LLEのラットへの90日間反復投与毒性試験を行い、LLEの経口投与により雌雄ラット共に2,000 mg/kg/日で無影響あり、LLEの安全性が高いことを明らかにした。

第5章では、LLE 2,200 mgより製した「LLE含有飲料」（「HP+IQ」30mg含有、1本500 ml）を正常高値血圧者及び軽症高血圧者へ12週間摂取させる二重盲検並行2群間試験を実施した。その結果、「LLE含有飲料」はヒトに対して有意で緩徐な降圧効果を有することを明らかにした。これに対し、HP及びIQのアグリコンであるquercetinもヒトにおいて降圧作用を示し、その機序はNOを介した平滑筋弛緩によると報告されている。しかし、これまでの報告で高血圧に有効とされたquercetin用量は730 mg/日（365 mg×2回）及び150 mg/日で、本試験における「HP+IQ」の有効量30mg/日に比べて高い用量設定が必要とされている。これはquercetinと「HP+IQ」の腸管での吸収形態の違いによると考えられる。すなわち、LLEの主成分であるケルセチン配糖体「HP+IQ」は、quercetinよりも吸収量（AUC）が高く、さらにTmaxも早いIQとIQより遅れて主に大腸で吸収されるHPの混合物であるため、吸収量の高さと一定濃度の持続という2つの点から、quercetin単体よりも少ない量で血圧に対して効果を示す可能性が示唆された。

従って、「LLE含有飲料」は1日1回の摂取、且つその有効成分であるフラボノイド成分「HP+IQ」は30 mgという少ない用量で降圧効果を示すことから、高血圧の予防のための手軽さと有効性を備えた機能性食品として有用性は非常に高いという知見を得た。

## 謝 辞

学位論文をまとめるにあたり、始終懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野 和田啓爾教授，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。

本論文の審査過程において数々のご助言とご指導を賜りました薬学研究科創薬化学分野 小田和明教授，薬学研究科薬理学分野 島村佳一教授，薬学研究科分子生命科学分野 岡崎克則教授に深謝申し上げます。

本研究を進めるにあたりひとかたならぬご指導，ご助言を頂きました大阪大学大学院工学研究科 中澤慶久教授，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 川崎博己教授，北海道医療大学 賀来亨名誉教授に深く感謝申し上げます。

また，本研究で有益なるご指導，ご支援を頂きました（有）ファルマ開発研究所 田頭栄治郎博士，（株）総医研ホールディングス 梶本修身博士，ダイドードリンコ（株） 田川智恵氏に厚くお礼申し上げます。

最後に，本研究においてご支援を頂きました大同薬品工業（株） 高橋豊氏，ダイドードリンコ（株） 鬼塚重則氏，中川誠氏，金澤浩二氏，さらに学位論文をまとめるにあたり終始温かいサポートを頂きました同 館内和康氏，三田村守氏，牧田崇氏に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) The Examination Committee of Criteria for Metabolic Syndrome, The definition and criteria of metabolic syndrome. *J. Jpn. Soc. Intern. Med.*, **94**, 794-809 (2005).
- 2) Jiangsu New Medical College, ed., “Chinese Materia Medica Dictionary (中藥大辭典), ” Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai, 1978, pp.1355-1356.
- 3) Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, “The illustrated flora of higher plants of China”, Beijing Science Press, 1974, pp.443-444.
- 4) Makino T., “New Makino's illustrated flora of Japan”, Hokuryukan, Tokyo 1970, pp.498.
- 5) Charles F. Millspaugh, “American Medicinal Plants”, Dover Publications, Inc., New York, 1974, pp.527-533.
- 6) Jianming W., Progress in the story on the medical effects of *Apocynum venetum* (*A. lancifolium*), *J. Tradit. Chin. Med.*, **8**, 34-36 (1988).
- 7) Qian X., Zhang W., Chen Z., 羅布麻的民族植物学与資源开发利用, *The Chinese Academic Medical Magazine of Organisms*, 2002, pp.268-275.
- 8) Khasbagan, Huai H., Pei S.J., Wild plants in the diet of arhorchin Mongol herdsmen in inner Mongolia, *Econ. Bot.* **54**, 528-536 (2000).
- 9) Chinese Pharmacopeia Committee of Ministry of Public Health of the People’s Republic of China, “The Chinese Pharmacopeia (中華人民共和國藥典), Vol. 1, ” Chemical and Technical Press, Beijing, 2005, pp.170.
- 10) 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.
- 11) Yokozawa T., Dong E., Kashiwagi H., *In vitro* and *in vivo* studies on anti-lipid peroxidation effect of extract from Luobuma leaves. *Nat. Med.* **51**, 325-330 (1997).
- 12) Nishibe S., Murai M., Chinen S., Kawamura T., Noro Y., Flavonoid content in *Apocynum venetum* and *Poacynum venetum* leaves and Lipid-Peroxidation-

- Inhibiting Effect of Flavonoids, *Nat. Med.*, **48**, 323-323 (1994).
- 13) Kim D.W., Yokozawa T., Hattori M., Kadota S., Namba T., Inhibitory effects of an aqueous extract of *Apocynum venetum* leaves and its constituents on Cu<sup>2+</sup>-induced oxidative modification of low density lipoprotein, *Phytother. Res.*, **14**, 501-504 (2000).
  - 14) Kim D.W., Yokozawa T., Hattori M., Kadota S., Namba T., Luobuma leaf inhibits oxidation of low-density lipoprotein in cholesterol-fed rats, *J. Trad. Med.*, **15**, 40-44 (1998).
  - 15) Kim D.W., Yokozawa T., Hattori M., Effects of aqueous extracts of *Apocynum venetum* leaves on hypercholesterlaemic rats, *Phytother. Res.*, **12**, 46-48 (1998).
  - 16) Yokozawa T., Kashiwada Y., Hattori M., Chung H.Y., Study on the components of Luobuma with peroxy-nitrite-scavenging activity, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 748-752 (2002).
  - 17) Xiong Q., Fan W., Tezuka Y., Adnyana I.K., Stampoulis P., Hattori M., Namba T., Kadota S., Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents, *Planta Med.*, **66**, 127-133 (2000).
  - 18) Butterweck V., Nishibe S., Sasaki T., Uchida M., Antidepressant effects of *Apocynum venetum* leaves in a forced swimming test, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 848-851 (2001).
  - 19) Kim D.W., Yokozawa T., Hattori M., Kadota S., Namba T., Effects of aqueous extracts of *Apocynum venetum* leaves on spontaneously hypertensive, renal hypertensive and NaCl-fed-hypertensive rats., *J. Ethnopharmacol.*, **72**, 53-59 (2000).
  - 20) Wang S. et al ed., "Notebook on Utilization of Chinese Plant Resources (中国資源植物手冊)", Chinese Science and Technical Press, Beijing, 1989, pp.69-72.
  - 21) Tanaka T., Sakai E., Yoshimi S., Nishibe S., Takemura H., Pharmacognostical studies of *Apocynum* (2) Comparative anatomy of the leaves of *Apocynum* and *Poacynum spp.*, *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 388-395 (1993).
  - 22) Nishibe S., Takemura H., Fujimoto T., Sasahara M., Tanaka T., Studies on the

- constituents of Chinese medicine “Luobumaye” ( I ) On Flavonoid glycosides of Genera *Apocynum* and *Poacynum* leaves and their application to method for identification of origin of Luobumaye products, *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 27-33 (1993).
- 23) Kagawa T., Nakazawa Y., Tagashira E., Takahashi Y., Onizuka S., Nishibe S., Studies on antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract (1), *Nat. Med.*, **58**, 109-112 (2004).
- 24) Taubert D., Berkels R., Klaus W., Roesen R., Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols : Essential Structural Features, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **40**, 701-713 (2002).
- 25) Schussler M., Holzl J., Fricke U., Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species, *Arzneimittel-Forsch.*, **45**, 842-845 (1995).
- 26) Kagawa T., Nakazawa Y., Takahashi Y., Onizuka S., Nishibe S., On chemical identification of Luobuma and quantitative analysis of flavonoids in Luobuma., *Nat. Med.*, **58**, 295-298 (2004).
- 27) Kawazoe S., Ohcho A., Honma H., Hashimoto K., Hojo Y., A study on effectiveness of health foods materials in human Health foods materials for lifestyle-related diseases, *Bull. Soc. Med.*, **27**, 45-56 (2009).
- 28) Kagawa T., Nakazawa Y., Tagashira E., Takahashi Y., Onizuka S., Nishibe S., Studies on antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract (2), *Nat. Med.*, **58**, 299-302 (2004).
- 29) Kemp B.K., Cocks T.M., Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries, *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 757-762 (1997).
- 30) Kwan C.Y., Zhang W.B., Nishibe S., Seo S., A novel *in vitro* endothelium-dependent vascular relaxant effect of *Apocynum venetum* extract, *Clin. Exp. Pharmacol. P.*, **32**, 789-795 (2005).
- 31) Kawasaki H., Takasaki K., Saito S., Goto K., Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat,

- Nature*, **335**, 164-167 (1988).
- 32) Ralevic V., Burnstock G., Effects of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed, *Circ. Res.*, **69**, 1583-1590 (1991).
- 33) Byfield R.A., Swayne G.T.G., Warner T.J., A method for the study of endothelial derived relaxing factor (EDRF) in the isolated perfused rat mesentery, *Br. J. Pharmacol.*, **88**, 438 (1986).
- 34) Shimokawa H., Ysutake H., Fujii K., Owada M.K., Nakaike R., Tagayanagi T., Nagoya T., Egashira K., Fujishima M., Takeshita A., The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**, 703-711 (1996).
- 35) Hwa J.J., Ghibaudi L., Williams P., Chatterjee M., Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **266**, H952-H958 (1994).
- 36) Tsutsui M., Ueno S., Toyohira Y., Yanagihara N., Structure and function of nitric oxide synthases, *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **47**, 2024-2031 (2002).
- 37) Tagawa C., Kagawa T., Nakazawa Y., Onizuka S., Nishibe S., Kawasaki H., Studies on antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract (3), *YAKUGAKU ZASSHI*, **124**, 851-856 (2004).
- 38) Hoki S., Kimura T., Nagasawa N., Kozaki K., Terashima N., Antihypertensive effect of the principal flavonoids of YAN LONG tea in spontaneously hypertensive rats, *Nat. Med.*, **58**, 113-116 (2003).
- 39) Kagawa T., Tagawa C., Kanazawa K., Nakazawa Y., Nishibe S., Kaku T., Studies on antihypertensive effect of Luobuma (*Apocynum venetum* L.) leaf extract (4) ~ *In vivo* antihypertensive effect and improvement of vasvular function by hyperoside and isoquercitrin~, *Health Sciences*, **23**, 191-199 (2007).
- 40) Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138 (1982).



- 41) Chang Q., Zuo Z., Chow M.S.S., Ho W.K.K., Difference in absorption of two structurally similar flavonoid glycoside, hyperoside and isoquercitrin, in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **59**, 549-555 (2005).
- 42) Sunano S., Sekiguthi F., Endothelium-derived factors in hypertensive blood vessels, especially nitric oxide and hypertension, *YAKUGAKU ZASSHI*, **123**, 495-515 (2003).
- 43) Nakaki T., Nakayama M., Kato R., Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **189**, 347-353 (1990).
- 44) Yang Z., Ming X.F., Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis, *Clin. Med. Res.*, **4**, 53-65 (2006).
- 45) Hollman P.C.H., Bijlsman M.N.C.P., van Gameren V., Cnossen E.P.J., de Vries J.H.M., Katan M.B., The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man, *Free Radic. Res.*, **31**, 569-573 (1999).
- 46) Arts I.C.W., Sesink A.L.A., Faassen-P.M., Hollman P.C.H., The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides, *Br. J. Nutr.*, **91**, 841-847 (2004).
- 47) Morand C., Manach C., Crespy V., Remesy C., Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma, *Free Radic. Res.*, **33**, 667-676 (2000).
- 48) Manach C., Morand C., Demigne C., Texoer O., Regeat F., Remesy C., Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS Lett.*, **409**, 12-16 (1997).
- 49) Day A.J., DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J.C., Morgan M.R.A., Williamson G., Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity, *FEBS Lett.*, **436**, 71-75 (1998).
- 50) Day A.J., Canada F.J., Diaz J.C., Kroon P.A., Mclauchlan R., Faulds C.B., Plumb G.W., Morgan M.R.A., Williamson G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase, *FEBS*

- Lett.*, **468**, 166-170 (2000).
- 51) Crespy V., Morand C., Manach C., Besson C., Demigne C., Remesy C., Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen, *Am. J. Physiol.*, **277**, 120-126 (1999).
- 52) Shimoi K., Circulating conjugated Flavonoids and the sites of their metabolic activation, *Environ. Mutagen Res.*, **26**, 241-246 (2004).
- 53) Sullivan J.C., Semprun-Pieto L., Boesen E.I., Pollock D.M., Pollock J.S., Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, 1573-1579 (2007).
- 54) Li L., Yi-Ming W., Li Z.Z., Zhao L., Boesen E.I., Yu Y.S., Li D.-J., Xia C.Y., Liu J.-G., Su D.-F., Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats, *Pharmacol. Res.*, **28**, 196-201 (2008).
- 55) Q'Leary K.A., Day A.J., Needs P.W., Sly W.S., O'Brien N.M., Williamson G., Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase., *FEBS Lett.*, **503**, 103-106 (2001).
- 56) Shimoi K., Deglucronidation of a flavonoid. Luteolin monoglucuronide during inflammation, *DMD*, **29**, 1521-1524 (2001).
- 57) Galindo P., Rodriguez-Gomez I., Gonzalez-Manzano S., Duenas M., Jimenez R., Menendez C., Vargas F., Tamargo J., Santos- Buelga C., Perez-Bizcaino F., Duarte J., Glucuronidated Quercetin Lowers Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats via Deconjugation, *PLoS ONE*, **7**, e32673, 1-8 (2012).
- 58) Shen Y., Croft K.D., Hodgson J.M. Kyle R., Lee I-L.E., Wang Y., Stocker R., Ward N.C., Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK, *Biochem. Pharmacol.*, **84**, 1036-1044 (2012).
- 59) Li P.G., Sun L., Han X., Ling S., Gan W.T., Xu J.W., Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and

- PKA-dependent mechanism. *Pharmacology*, **89**, 220-228 (2012).
- 60) Terao J., Quercetin glycosides : their absorption, metabolism and antioxidant activity, *Vitamins (Japan)*, **79**, 3-11 (2005).
- 61) Cermak R., Landgraf S., Wolfram S., The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors, *J. Nutr.*, **133**, 2802-2807 (2003).
- 62) Piskula M.K., Terao J., Accumulation of (-)epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues, *J. Nutr.*, **128**, 1172-1178 (1998).
- 63) Murota K., Shimizu S., Chujo H., Moon J.H., Terao J., Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line caco-2, *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 391- 397 (2000).
- 64) Day A.J., Mellon F., Barron D., Sarrazin G., Morgan M.R.A., Williamson G., Human metabolism of dietary flavonoids : Identification of plasma metabolites of quercetin, *Free Radic. Res.*, **35**, 941-952 (2001).
- 65) Graf B.A., Mullen W., Caldwell S.T., Hartley R.C., Duthie G.G., Lean M.E.J., Crozier A., Edwards C.A., Disposition and metabolism of [2-<sup>14</sup>C]quercetin-4'-glucoside in rats, *DMD*, **33**, 1036-43 (2005).
- 66) Moon J.-H., Tsushida T., Nakahara K., Terao J., Identification of quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin, *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 1274-1285 (2001).
- 67) Manach C., Morand C., Texier O., Favier M.L., Agullo G., Demigne C., Regeat F., Remesy C., Quercetin metabolite in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin, *J. Nutr.*, **125**, 1911-1922 (1995).
- 68) Scallbert A., Williamson G., Dietary intake and bioavailability, *J. Nutr.*, **130**, 2073S-2085S (2000)
- 69) Bokkenheuser V.D., Shackleton C.H.L., Winter J., Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans, *Biochem. J.*, **248**, 953-956 (1987).

- 70) Tamura G., Gold C., Ferro-L.A., Ames B.N., Fecalase : A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4961-4965 (1980).
- 71) Yu Y.Y, Wang H.M., Tang X.Q, Ying.G., Safety assessment on Luobuma tea, *J. Toxicol.*, **20**, 134 (2006).
- 72) Wang H., Chen X., Tang X., et al., Food safety assessment on concentrated tea of healthful *Apocynum venetum* leaf, *Food Sci.*, **28**, 326-329 (2007).
- 73) Xie W., Zhang X., Wang T., Hu J., Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Apocynum venetum* L. (Luobuma) : A review, *J. Ethnopharmacol.*, **141**, 1-8 (2012).
- 74) Zheng M., Liu C., Pan F., Shi D., Ma F., Zhang Y., Zhang Y., Protective effects of flavonoid extract from *Apocynum venetum* leaves against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **31**, 421-428 (2011).
- 75) Kawasaki T., Fukushima Y., Chen J.J., Kegai K., Seki E., Osajima K., Itoh K., Matsui T., Matsumoto K., Antihypertensive effect of drink with peptides derived from sardine protein hydrolysates on mild hypertensive and normal blood pressure subjects, *J. Nutr. Food*, **5**, 35-47 (2002).
- 76) Sekiya S., Kobayashi Y., Kita E., Imamura Y., Toyama S., Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **45**, 513-517 (1992).
- 77) Kajimoto S., Nakamura Y., Yada Y., Moriguchi M., Hirata H., Takahashi T., Hypotensive Effects of sour milk in subjects with mild or moderate hypertension, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **54**, 347-354 (2001).
- 78) Northwest Institute of Botany, 羅布麻叶治疗高血压臨床观察, *Zhong Cao Yao*, **4**, 12-14 (1972).
- 79) Ma Y., Yang Z., zhu Y., Chou Z., Xu S., Zhu H., 羅布麻茶抗衰老, 高血压及高血脂作用的观察, *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, **9**, 335-337 (1989).
- 80) Edwards R.L., Lyon T., Litwin S.E., Rabovsky A., Symons J.D., Jalili T., Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects, *J. Nutr.*, **137**, 2405-

2411 (2007).

- 81) Egert S., Bosy-Westphal A., Seiberl J, Kürbitz C., Settler U., Plachta- Danielzik S., Wagner A.E., Frank. J, Schrezenmeir J., Rimbach G., Wolffram S., Müller M.J., Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study, *Br. J. Nutr.*, **102**, 1065-1074 (2009).
- 82) Sánchez M., Galisteo M., Vera R., Villar I.C., 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).
- 83) Olthof M.R., Hollman P.C.H., Vree T.B., Katan M.B., Bioavailability of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans, *J. Nutr.*, **130**, 1200-1203 (2000).
- 84) Hollman P.C.H., Baag M., Mengelers M.J.B., van Trijp J.M.P., Van der Vliet A., Katan M.B., Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1276-1282 (1995).
- 85) Murota K, Terao J., Antioxidative flavonoid quercetin : implication of its intestinal absorption and metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **417**, 12-17 (2003).