

トウキ由来特有成分の特徴づけに関する研究

Characterization of specific components contained in *Angelica acutiloba*

大野 正博*、原 如乃*
OHNO Masahiro*, HARA Yukino*

要旨

トウキ (*Angelica acutiloba*) はセリ科の植物で、根を乾燥させたものは古くから生薬として用いられてきた。トウキの根には高血圧抑制活性の指標とされるアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性があると報告されている¹⁾。大野らは、従来使用されずに廃棄されていた葉部や茎部分にも ACE 阻害活性が存在することをすでに報告した²⁾。しかし、トウキに含まれている ACE 阻害活性がどのような物質に由来するかは不明である。そこで本研究では、山口県産トウキ葉部中の ACE 阻害活性に関与している物質を明らかにすることを目的として成分分析を行った。その結果、山口県産トウキ葉部中の ACE 阻害活性物質はニコチアナミンであると考えられる。

キーワード：トウキ、高血圧、ACE 阻害活性、山口県産

Abstract

Angelica acutiloba is a plant of the *Umbelliferae* family, and its dried roots are used as crude drugs. It has been reported that its roots has Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity, which is an index of high blood pressure inhibitory activity¹⁾. Ohno *et al.* have already reported that ACE inhibitory activity is also present in the leaves and stems that were previously unused and discarded²⁾. However, it is unclear what kind of substance the ACE inhibitory activity contained in *Angelica acutiloba* is derived from. Therefore, in this study, component analysis was performed for the purpose of clarifying the substances involved in ACE inhibitory activity from the leaves of *Angelica acutiloba* produced in Yamaguchi prefecture. As a result, we consider that the ACE inhibitory active substance in the leaves of *Angelica acutiloba* produced there is nicotianamine.

Key words : *Angelica acutiloba*, high blood pressure, ACE inhibitory activity, Yamaguchi prefecture product

序論

高血圧とは安静時の血圧が持続的に高い状態を指し、脳卒中や心筋梗塞、心疾患、慢性腎臓病の罹患率を高くさせるリスクファクターである。平成29年度³⁾の患者調査によると、高血圧性疾患の患者数は、993万7千人にも上っている³⁾。

高血圧の治療方法には生活指導や食事療法、また薬物療法がある。薬物療法では降圧薬としてカルシウム拮抗薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬、利尿薬、

β 遮断薬等が用いられている。

これらの中で ACE 阻害薬の作用機作については、次のように説明される。まず、血圧が低下すると腎臓からレニンが分泌され、肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲンに作用し、アンジオテンシン I が生成される。アンジオテンシン I はポリペプチドの一種で活性は持っていないが、肺から分泌される ACE によってアンジオテンシン II に変換される。アンジオテンシン II もポリペプチドの一種であり、血管を収縮させる作用と副腎皮質からアルドステロンの分泌

*山口県立大学看護栄養学部栄養学科

を促進させる作用を持っている。副腎皮質から分泌されたアルドステロンは、腎臓での塩分と水分の再吸収を促進して尿量を減少することによって血流量を増加させ、血圧が上昇する。ACE 阻害薬は、この肺から分泌されるACEを阻害することで血圧の上昇を抑制している。このACE 阻害薬と同様な活性を持つ植物体やそれら植物を用いた生薬も存在しており、その一例としてトウキがある。

トウキはセリ科に属し、セロリに似た強い香りを持つ植物であり、生薬として用いられている。山口県においては平成27年度からトウキの栽培が行われているが、トウキの根を乾燥させたものについてACE 阻害活性の存在が報告されており¹⁾、医薬品医療機器等法によりトウキの根を食用に用いることは規制されている。しかし、葉の部分については食用が可能である。また、従来廃棄をされていた葉や茎の部分にも ACE 阻害活性があることが大野らによって報告されている²⁾。しかし現時点では、トウキに含まれている ACE 阻害活性物質は特定されていない。

一部の野菜類に含有されている ACE 阻害活性物質はニコチアナミンであることが報告されている^{4,5)}。ニコチアナミンは熱安定性が高く、加熱処理をしても分解されない非たんぱく質性のアミノ酸である⁵⁾。醤油から精製されたニコチアナミンでは、78.9 $\mu\text{g/L}$ で ACE の活性を 50% 阻害できることが報告されている⁶⁾。このニコチアナミンを高血圧モデルラットに経口投与すると、投与直後から顕著な血圧降下を示し、8 時間に及んで持続的に血圧降下を示したことが報告されている⁶⁾。また、ハヤトウリから抽出・精製されたニコチアナミンをつくば高血圧マウスに胃内投与した研究においても、投与 6 時間後まで有意な血圧降下を示したことが報告されている⁷⁾。

本研究では、食用に利用可能であるトウキの葉について、ACE 阻害活性に関与している物質を明らかにすることを目的として ACE 阻害活性の測定と成分分析を行った。また、分析結果を他のセリ科植物と比較検討した。

方法

1. トウキ葉の処理方法

2017 年に山口県阿武町内の圃場で栽培されたトウキを使用した。収穫したトウキの葉を温風下 40 - 50°C の条件下で約 8 時間通風乾燥させ、粉末状にした物を試料として用いた。試料は 4°C で保存し、適宜使用した。

2. トウキ葉抽出試料原液の調製

トウキ粉末を蒸留水で 50 mg/mL に懸濁し、40°C のウォーターバス内で 30 分間振とうを行った。その後、遠心分離 (3,000 \times g、10 分間) を行い、上澄みを得る作業を3回繰り返し、抽出試料原液として用いた。

3. トウキ葉抽出試料原液の精製

逆相系カートリッジ (ADVANTEC 社、DISPO COLUMN C18H050) をメタノール 10 mL と蒸留水 10 mL でコンディショニングを行い、抽出試料原液を通液して脂溶性成分を吸着除去して精製した。

4. ACE 阻害活性の測定

抽出試料原液、精製した抽出試料の ACE 阻害活性を ACE Kit-WST (同人化学研究所社) を用いて測定した。

抽出試料を蒸留水で段階的 (5倍、5²倍、5³倍、5⁴倍、5⁵倍、5⁶倍) に希釈し、試料溶液を調製した。なお、この作業によって各抽出試料の濃度は、10 mg/mL、2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.08 mg/mL、0.016 mg/mL、0.0032 mg/mLとなる。96 ウェルプレートに試料溶液もしくは蒸留水 (それぞれ blank 1、blank 2 とする) を 20 μL ずつ加えた。各試料溶液に表 1 のとおりに溶液を加え、37°C で 60 分間インキュベートした。その後、各ウェルに Indicator working solution を 200 μL ずつ加え、室温で 10 分間インキュベートした。プレートリーダー (BioTek 社、SynergyTM MX) で 450 nm の吸光度を測定し、以下の計算式で ACE 阻害活性値 (阻害率 %) を求めた。

$$\text{ACE 阻害活性値 (阻害率 \%)} = (\text{blank 1} - \text{試料溶液}) \times 100 / (\text{blank 1} - \text{blank 2})$$

また、ACE の活性を 50% 阻害するのに必要なトウキの濃度を IC₅₀ 値とし、算出した。

5. 成分分析

精製した抽出試料を成分分析に使用した。1.5 mL マイクロチューブに 50 μL の精製した抽出試料を入れ、1.0 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を 100 μL 、1.0 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した 50 mM EDTA-2Na 溶液を 100 μL 加えた。これにアセトニトリルで溶解した 50 mM FMOC-Cl を 50 μL 添加した。この溶液を 60 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加熱し、ギ酸溶液を 100 μL 加えた後、15,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離を行い、この上澄みを用いて HPLC (島津製作所、Prominence) で分析を行った。カラムには Luna 5u C18 (2) (Phenomenex 社) を使用し、移動相には 0.5 % ギ酸溶液 (A 液) とアセトニトリル (B 液) を用いた。分析開始時は A 液 80%、B 液 20% とし、15 分後から 20 分後にかけて徐々に直線的に濃度を変化させ、20 分後に A 液 0%、B 液 100% にした。検出は励起波長 266 nm、蛍光波長 305 nm の条件で行った。

検量線の作成には 0.6 mg/mL、1.2 mg/mL、6 mg/mL、12 mg/mL の 4 種類のニコチアミン標準物質の水溶液を調製し使用した。また、精製した抽出試料はそれぞれ希釈なし、2 倍希釈、10 倍希釈の 3 種類で成分分析を行った。

結果および考察

1. ACE 阻害活性

各試料の ACE 阻害活性値を表 1 に示した。また、各試料の各サンプル濃度での ACE 阻害活性値をプロットして阻害曲線を描いた。得られた阻害曲線は図 1 のとおりとなった。描かれた阻害曲線から近似直線を作成し、得られた近似式から IC_{50} 値を算出した。

算出された、トウキの抽出試料の ACE 阻害活性値は 80.0%、 IC_{50} 値は 1.65 mg/mL であった。同じセリ科のシシウドでは 82.8%、ミツバは 85.5%、セリは 86.9% と報告されている⁴⁾ため、本研究で分析した山口県産トウキの葉は他のセリ科植物と同程度の ACE 阻害活性を持っていると考えられる。

精製した抽出試料では ACE 阻害活性値は 93.0%、 IC_{50} 値は 2.46 mg/mL であった。抽出試料を精製する前後で IC_{50} 値に有意差は見られなかった。

これらの結果から、トウキから脂溶性成分を除去しても ACE 阻害活性が残存しており、また IC_{50} 値に有意な変化が見られないと言えるため、トウキ中の ACE 阻害活性物質は脂溶性成分ではないことが示唆された。

表 1 精製した抽出試料の ACE 阻害活性値 (%)

濃度 (mg/mL)	測定 1 回目	測定 2 回目	測定 3 回目
50	94.2	95.0	95.9
10	73.2	68.5	72.2
2	19.7	32.6	26.7
0.4	23.8	2.6	32.0
0.08	22.4	16.2	9.2
0.016	13.1	3.5	12.2
0.0032	9.1	10.5	10.1

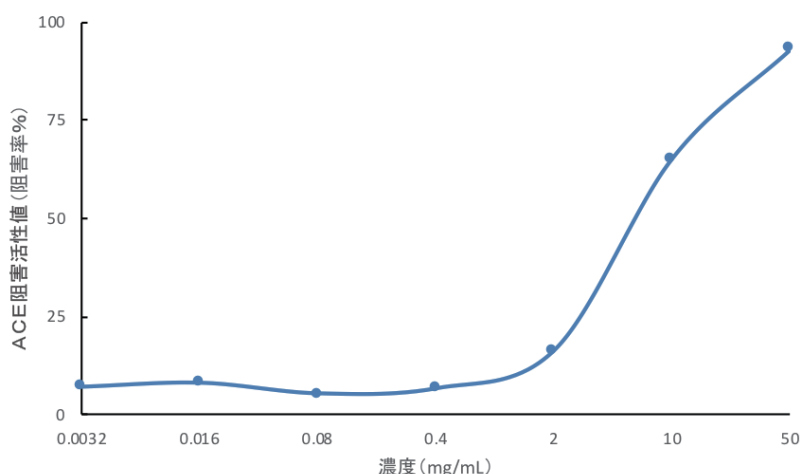


図 1 精製した抽出試料の ACE 阻害曲線

2. 成分分析

大野らにより、トウキの ACE 阻害活性物質は熱に対して安定であることが報告されており²⁸⁾、これはニコチアナミンの性質と一致している。また、セリやミツバ、シシウド等、トウキと同じセリ科の植物には、ACE阻害活性率が高く、ニコチアナミンを多く含有しているものがあることが報告されている⁴⁾。以上のことから、トウキに含まれる ACE 阻害活性物質はニコチアナミンである可能性が高い。

ニコチアナミン標準物質から得られた HPLC のクロマトグラムを図 2 に、精製した抽出試料の HPLC クロマトグラムを図 3 に示す。これらクロマトグラムから得られた検量線を基にトウキ葉中のニコチアナミン含有量を求めた結果、23.6 mg/100 g 含まれていた。同程度の ACE 阻害活性を持って

いる他のセリ科植物のニコチアナミン含有量は、セリで 7.5 mg/100g、ミツバでは 8.8 mg/100 g と報告されており⁴⁾、その値を大幅に上回っている。しかし、アシタバのニコチアナミン含有量については、31.4 mg/100 g と報告されており⁴⁾、今回分析したトウキ葉のほうが含有量が低かった。

以上の結果から、山口県産トウキ葉はセリ科植物の中でも一定レベル以上のニコチアナミンを含有していることが明らかとなり、ニコチアナミンが ACE 阻害活性に関与している可能性が示唆された。伊澤らの研究では、ニコチアナミンを 5 mg/100 g 以上含むものでは 60% 以上の強い ACE 阻害活性を示すと報告されており⁴⁾、今回調べた山口県産トウキの葉もその条件を満たす結果を示した。

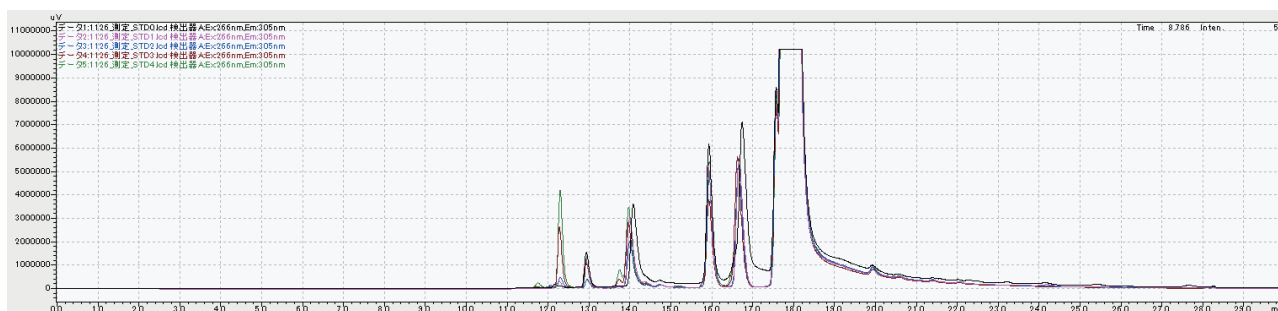


図 2 ニコチアナミン標準物質の HPLC クロマトグラム

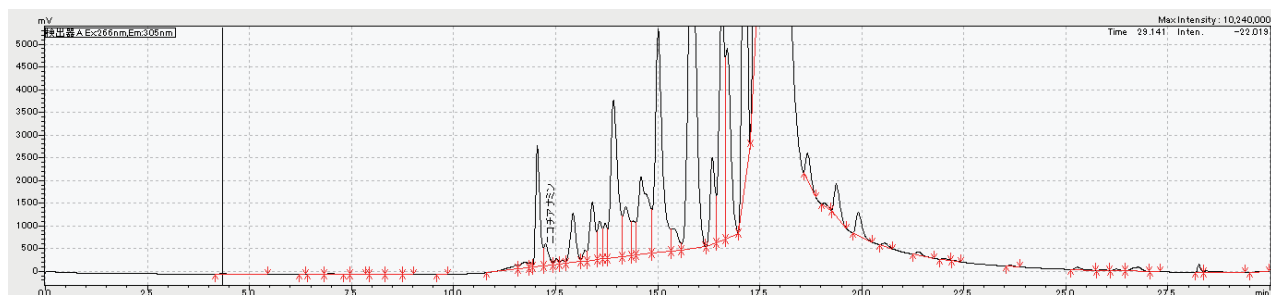


図 3 精製した抽出試料の HPLC クロマトグラム

3. ACE阻害活性物質の推定

本研究により、トウキの ACE 阻害活性物質としてニコチアナミンが含まれていることが推測された。しかし、ニコチアナミンの含有量と ACE 阻害活性率は必ずしも比例するとは限らないことが報告されている⁴⁾。また、本研究では、トウキ中のニコチアナミンの単離を行なった後にその単離成物が ACE 阻害活性を示すのか確認できていない。

そのため、ACE 阻害活性に関与している物質がニコチアナミン以外の水溶性物質であることや、ニ

コチアナミン以外の物質が ACE 阻害活性に複合的に関与している可能性も考えられる。

トウキに含まれている他の ACE 阻害活性物質としてピラジン類である可能性を考える。ピラジン類は揮発性の成分であり、浅尾ら¹⁾の研究からトウキの根を湯揉み、風乾、熟成するにつれて含有量が増加していくことがわかっている。また、これらの操作を行うことで、ACE 阻害活性も高まっていくことが報告されている¹⁾。今回、試料として用いた試料は粉末状にする際に湯揉み、風乾を行っている。

また、ピラジン類は水溶性物質であるため、もし実際に含有していた場合には、逆相系カートリッジに通液して精製を行った際に、ニコチアナミンと同様にカートリッジを通液している可能性があると考えられる。しかし、本研究ではピラジン類の測定を行っていないため、断定はできない。

今後の課題として、ニコチアナミンを単離しそのACE阻害活性を測定することや、ニコチアナミンを除去した後の抽出試料のACE阻害活性を測定すること、加えて、ピラジン類の成分分析を行うことでトウキのACE阻害活性に関与している物質をより詳しく同定することができると考える。

引用文献

- 1) 浅尾浩史・間島いつか・奥田まみ子・鷺田和人・小村啓・野本享資, ヤマトトウキの調製過程におけるアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性と品質特性の変化, 近畿中国四国農業研究(2010).
- 2) 大野正博・村地早織, トウキ由来成分におけるACE阻害活性の加熱による変化, 日本栄養改善学会第13回中国支部学術総会(2017).
- 3) 厚生労働省, 平成29年度患者調査の概況
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/dl/05.pdf> (2019年12月23日閲覧)
- 4) 伊澤華子・青柳康夫, 植物性食品のニコチアナミン含量とアンジオテンシンI変換酵素阻害活性, 日本食品科学工学会誌(2012).
- 5) 高田晃, カボチャでアルツハイマー病改善-ニコチアナミンによる記憶改善とその作用解明-, 浦上財団研究報告書18巻(2011).
- 6) 木下恵美子・山越純・菊池護, 醤油中の血圧降下物質について, 醸協(1994).
- 7) 林あつみ・中山知子・村上和雄・青柳康夫・木元幸一, つくば高血圧マウスの血圧に及ぼすニコチアナミンの影響, 日本栄養・食糧学会誌(2005).
- 8) 大野正博・光田英莉子・村地早織, トウキの葉が持つACE阻害活性に着目した加熱加工食品の検討, 日本栄養改善学会第6回関東・甲信越支部学術総会(2019).