報 文

紅麴抽出物と γ -アミノ酪酸の高血圧自然発症ラット における血圧降下作用

辻 啓 介^{*1}, 市 川 富 夫^{*1}, 田 辺 伸 和^{*2},
阿 部 士 朗^{*2}, 樽 井 庄 一^{*2}, 中 川 靖 枝^{*3}

^{*1}国立健康・栄養研究所, ^{*2}グンゼ株式会社京都研究所, ^{*3}実践女子大学

Antihypertensive Activities of Beni-Koji Extracts and γ -Aminobutyric Acid in Spontaneously Hypertensive Rats

Keisuke Tsuji^{*1}, Tomio Ichikawa^{*1}, Nobukazu Tanabe^{*2}, Shirou Abe^{*2},
Shouichi Tarui^{*2} and Yasue Nakagawa^{*3}

^{*1}National Institute of Health and Nutrition ; ^{*2}Kyoto Research Institute of Gunze Ltd ;

^{*3}Jissen Women's University

Beni-koji was extracted with ethanol and fractionated with ethyl acetate, n-butanol or water, in order to elucidate its antihypertensive activity. These fractions were fed to spontaneously hypertensive rats (SHR) in 1% NaCl diets for 15 days. The blood pressure of the group fed water-extract lowered. In another line of experiment, SHR were fed diets supplemented with γ -aminobutyric acid (GABA), which is a hypotensive component of the water-extract of beni-koji (0.09 mg/100 g diet). Although the control diet raised the blood pressure of SHR by 10 mmHg, 0.1 mg GABA/100 g diet did not. However, addition of 1 mg GABA/100 g diet significantly repressed it similarly to the water-extract fraction. I.v. injection of water-extract fraction and 1mg GABA/rat induced the hypotensive effect in SHR.

These results indicate that GABA is one of the important antihypertensive substances in beni-koji and the others are soluble in water and ethanol.

Jpn. J. Nutr., 50 (5) 285~291 (1992)

結 言

脳卒中や心臓病などの高血圧性疾患は、年々増加の一途をたどっており、それに対する予防と治療が国民衛生上の重要な課題となっている。慢性的に進行する高血圧性疾患の予防には、日頃の食事や運動による対策が安全で効果的であるが、減塩を主体とする食事上の工夫は特に重要視されている。著者らは先に、麹菌に属する *Aspergillus oryzae* の黄麴と *Monascus pilosus* の紅麴を、高血圧自然発症ラット (SHR) に与えたところ、血圧が低下することを発見した。特に、紅麴には強い効果がみられた¹⁾。この麹は古くから、主に中国、台湾地方で紅酒や紅豆腐等の発酵食品に利用されただけでなく、“消食活血”、“健脾燥胃”の効能を有する漢薬の1種としても珍重されてきた²⁾。また、近年はコレステロール合成阻害作用や抗菌活性も明らかになっている³⁾。

紅麴の降圧効果の作用機序を解明するために、血圧に影響を与えるナトリウムを始めとする種々の陽イオンのバランスについて調べたが、糞や尿への排泄や血中レベルへの影響は認められなかった¹⁾。そこで、今回は

Key words : antihypertensive activity, beni-koji extract, γ -aminobutyric acid (GABA), water-extract
血圧降下作用, 紅麴抽出物, γ -アミノ酪酸, 水抽出物

紅麴の降圧成分の抽出分画を試み、更に既に紅麴にも含まれていることが知られている γ -アミノ酪酸 (GABA)⁴⁾との関係についても調べた。

実 験 方 法

1. 紅麴の調製

精白米を12時間水に浸漬した後、30分間水切りし、その浸漬米を250 g ずつ1,000 ml のフェルンバツハフラスコに入れ、121°Cで20分間オートクレーブにて蒸煮滅菌した。それに *Monascus pilosus* IFO4520 を植菌し、30°Cで2日、更に25°Cで6日、計8日間、好氣的に静置培養し、十分に菌を繁殖させた後、水分含有量が10% になるまで乾燥して米紅麴を得た。

2. 紅麴抽出物の調製方法

紅麴2 kg に特級エタノール20 l を加え、毎日1回攪拌しながら室温で1週間抽出した後、エタノール溶液と残渣を濾別した。残渣は、更に同様にして2回エタノール抽出し、エタノール抽出物40.4 g を得た。この抽出物のうち38.4 g を蒸留水2,000 ml に懸濁させ、分液ロートに移し、酢酸エチル溶液500 ml を加え、攪拌放置後、水層と酢酸エチル層とを分離した。この水層は更に酢酸エチルで4回抽出し、全酢酸エチル溶液を濃縮乾固し、酢酸エチル抽出物14.9 g を得た。次に、水層はn-ブタノールで500 ml ずつ5回抽出し、水溶液と全n-ブタノール溶液をそれぞれ濃縮乾固し、水抽出物15.5 g、n-ブタノール抽出物7.6 g を得た (Fig. 1)。なお、抽出に用いた試薬はすべて和光純薬工業(株)より特級試薬を購入した。

3. 実験動物及び飼育方法

動物の飼育及び保管等に関しては、総理府告示第6号 (昭和55年3月) の基準に沿って行った。SHR は雄を星野試験動物飼育所より購入し、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間おきに明暗に保たれた動物実験室にて飼育した。飼料は通常、固型飼料CE-2 (日本クレア社製) を用い、実験期間中は食塩を1% 含んだ基本粉末飼料 (Table 1) に各種サンプルを添加し (サンプル添加分はショ糖で調整)、蒸留水とともに自由摂取させた。実験Ⅰの摂食試験は14週齢 (平均体重349 g) のラットを用い1群5～6頭とし、実験Ⅱでは17週齢 (平均体重385 g) 1群5～6頭とした。実験Ⅲの静注試験では12週齢 (平均体重300 g) のものを用いた。 γ -アミノ酪酸 (GABA) は半井化学薬品(株)から特級試薬を購入・使用した。

4. 測定方法

摂食試験では、血圧を5日おきに尾動脈圧測定装置PS-100 (理研開発社製) を用いて測定した。静注試験では、サンプルを生理食塩水または20%エタノール生理食塩水に溶解あるいは懸濁させ、尾静脈に

Fig.1 Extraction procedure from beni-koji
EtOH: ethyl alcohol AcOEt: ethyl acetate

0.5ml/rat注射し、1時間後に血圧を測定した。紅麴中のGABA含量は、5gの麴より75%エタノール20mlで80°C20分間の加熱抽出を3回行い、エーテルで脂溶成分を分離した後、自動アミノ酸分析計(JLC-200A, 日本電子社製)にて定量した。

5. 統計処理

各群の平均値±標準誤差で示した。2群間の有意差はt検定を行い、 $p < 0.05$ で判定した。

実験結果

1. 各種溶媒による抽出分画物の血圧降下作用：実験I

予備実験により、紅麴の降圧成分はすべてエタノールにより抽出されることが分かった。そこで、まずエタノールで室温抽出した後、その抽出物を水に懸濁させ、酢酸エチルとn-ブタノールで抽出分画し、3種の抽出物を得た (Fig. 1)。紅麴からの収率は、酢酸エチル抽出物 0.784%, n-ブタノール抽出物 0.400%, 水抽出物 0.816%であった。

得られた各抽出物及び残渣を、それぞれ紅麴に換算して0.3%になるように基本飼料に添加し (Table 2), SHRに15日間摂取させた。全試験期間を通じて、飼料摂取量と体重増加量には各群に差はなかった。血圧変動の結果をFig. 2に示した。基本飼料は食塩を1%含んでいるため、対照群の血圧は徐々に上昇し、15日間で18 mmHg増加した。酢酸エチル抽出物群、n-ブタノール抽出物群、残渣群では対照群とほとんど同じ血圧上昇がみられ、全く有意差が認められなかった。

水抽出物群では全く血圧が上昇せず、逆に5日目では10 mmHg低い値となり、それ以後、水抽出物飼料を与えている間はほぼ一定であった。しかし、市販飼料であるCE-2に切り替えたところ、図には示さなかったが、血圧は上昇し、5日後には対照群と有意差はなくなっていた。

以上の結果は、紅麴の降圧成分のほとんどが水抽出物に含まれていることを示している。よって有効成分は、水、エタノールに可溶、n-ブタノール、酢酸エチルに不溶性の低分子量物質であると考えられる。

Kohamaら⁹⁾は、紅麴より降圧物質としてGABAとアセチルコリンを単離している。このうちアセチルコリンは極めて不安定な物質であり、作用が一過性であることから、アセチルコリンが紅麴の降圧作用に重要な働きをしているとは考えにくい。一方、GABAに人への血圧降下作用があることはよく知られており¹⁰⁾、その生理的性質が本実験で得られたデータとよく一致する。そこで次に、GABAのSHRでの血圧降下作用を調べた。

Table 1 Composition of basal diet

Constituents	%
Casein	22
Lard	10
Mineral mixture *1	3.5
Vitamin mixture *1	1.2
Choline Cl	0.15
Cellulose *2	3
NaCl	1
Sucrose	59.15

*1 AIN-76™

*2 PC-200 (Pfizer Co. Ltd)

Fig. 2 Changes of blood pressure in SHR fed 1% NaCl diets supplemented beni-koji extracts (Exp. I)

Dietary level of each extract is shown in Table 2. Values in each period not followed by the same alphabetical letter are significant different ($p < 0.05$). Vertical bars represent the mean $\pm$ SE for 5-6 rats.

2. GABAの血圧降下作用：実験Ⅱ

紅麴に含まれるGABA量を調べたところ、0.3 mg/gであった。実験Ⅰでは、水抽出物の飼料への添加量は紅麴に換算して0.3%であった。このことから、飼料中にはGABAが0.09 mg/100 g含まれていたと考えられる。そこで、紅麴の降圧作用を

GABAによりどの程度説明できるかを調べるために、基本飼料100 gに対しGABAを0.1 mgまたは1.0 mg添加し、SHRに10日間摂食させた。その間の血圧変動をFig. 3に示した。対照群では10 mmHgの血圧上昇がみられたのに対し、GABA 0.1 mg/100 g群ではほぼ一定の血圧を維持し、1.0 mg/100 g群では5日目には10 mmHg下降し、10日目では対照群よりも20 mmHg低い血圧値であった。実験Ⅰでは、水抽出物群が対照群に比べ、10日目で20 mmHg低い血圧値であったことから、紅麴水抽出物の飼料添加量2.445 mg/100 gとGABAの1.0 mg/100 gはほぼ同じ降圧効果を有するものと推定される。このことと、水抽出物飼料中のGABA含量が0.09 mg/100 gであることから、紅麴の有効成分はGABAだけではないと考えられる。しかし、0.1 mg/100 g群においても1.0 mg/100 g群の約半分程度の血圧降下がみられたことから、紅麴の作用の一部はGABAによることは明らかである。

3. 静脈注射による紅麴抽出物とGABAの血圧降下作用：実験Ⅲ

各抽出物とGABAを静注し、1時間後血圧がどのように変化するかを調べた。その結果をTable 3に示した。抽出物では、摂食試験と同様に、水抽出物にのみ降圧効果が認められた。GABAにも効果がみられ、500 μ g/ratの投与で血圧が18.4 mmHg下がった。しかし、50 μ g/ratでは明確な作用はみられなかった。

考 察

SHRに対し、経口的に与えることにより血圧の上昇抑制または降下作用を有する食品成分には、アルギン酸カリウム⁶⁾、茶カテキン⁷⁾、魚たん白加水分解物⁹⁾、嫌気処理茶⁹⁾など数多くある。このうちアルギン酸塩の作用機序は、腸管内でのナトリウムとカリウムのイオン交換反応によるナトリウム吸収阻害であり、茶カテキンと魚たん白加水分解物はアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）の阻害による。一方、嫌気処理茶はGABAを1.5 mg/g以上もの大量を含有する¹⁰⁾。

GABAは、生物界に広く分布している非たん白性アミノ酸であるが、高等動物においては重要な神経伝達物質の1つであり、脳血管障害などの薬としても使用されている。GABAの腹腔あるいは静脈内注入による血圧降下作用は知られており⁵⁾、また臨床医学的にも経口的に効果が証明されている¹¹⁾。村越らは、高血圧予

Table 2 Yield and dietary level of each extract or residue added to the basal diet

Extracts	Yield (%)	0.3% Beni-koji equiv. (mg/100 g diet)
Water ext.	0.816	2.445
Butanol ext.	0.400	1.200
Ethyl acetate ext.	0.784	2.352
Residue	97.98	293.94

Fig.3 Changes of blood pressure in SHR fed semi-synthetic diets containing 1% NaCl with GABA (Exp. II)

Values in each period not followed by the same alphabetical letter are significant different ($p < 0.05$). Vertical bars represent the mean $\pm$ SE for 5~6 rats.

防剤として民間で用いられているシュロの花穂の有効成分として GABA を定量し、34～37 mg/100 g と報告している¹²⁾。

紅麴も GABA が有効成分の1つと推定される。実験Ⅱにおいて、GABA を 0.1 mg/100 g 飼料に添加した群では、1.0 mg/100 g 添加群の約半分程度の軽度の血圧低下がみられた。また、これまでの紅麴摂取実験において、麴そのものを飼料

Table 3 Effects of intravenous administration of beni-koji extracts or GABA on blood pressure in SHR

Test substance	Dose (μ g/rat)	n	Change of blood pressure* (mmHg $\pm$ SE)
Saline		4	-3.5 $\pm$ 3.2
Saline + EtOH		4	+2.3 $\pm$ 3.3
Water ext.	500	5	-23.8 $\pm$ 2.8
n-Butanol ext.	500	7	+1.7 $\pm$ 2.7
n-Butanol ext. + EtOH	500	5	+5.6 $\pm$ 3.4
Ethyl acetate ext.	500	9	-3.6 $\pm$ 2.1
Ethyl acetate ext. + EtOH	500	7	+4.6 $\pm$ 2.1
GABA	500	5	-18.4 $\pm$ 3.6
GABA	50	5	-4.8 $\pm$ 1.3
GABA	5	5	-1.8 $\pm$ 0.8
GABA	1	4	-2.0 $\pm$ 0.7

* Blood pressure was measured at 1 hr after intravenous of 0.5 ml solution (Saline with or without 20% EtOH) of sample to an animal. EtOH : ethyl alcohol.

に対し10% (GABA 含量 3 mg/100 g diet) もの大量を与えても、30 mmHg 程度の血圧低下しか確認できていない¹⁾。このことは、同一条件下ではある量以上の紅麴を SHR に摂食させても血圧低下は 30 mmHg ほどにとどまることを示し、GABA でも同様の現象が観察されたことになる。この現象は正常値を更に低下させないことを示唆し、血圧調節の点から意義が深い。

従って、紅麴の有効成分は GABA だけではないことは明らかであるが、かなりのウエイトを占めている可能性は残されている。実験Ⅱでは、GABA をわずか 0.001% (1 mg/100 g) 含む飼料を10日間自由摂取させることにより明確な効果が認められており、SHR において初めて経口的に血圧低下作用が見出された。更に静注実験においては、紅麴抽出物では水抽出物のみに血圧低下が認められ、また GABA でも 0.5 mg/rat というほぼ経口投与量 (1 mg/100 g diet は 1 日に 20 g 食餌を摂取するとして 0.2 mg/rat, すなわち 0.66 mg/kg BW) に匹敵する量で血圧低下効果が顕著になっており、摂食実験とはほぼ類似した成績が得られている。

三村ら¹³⁾は、脳卒中後遺症における GABA 投与で、1 mg/kg の1回皮下注射で10人中最高血圧が低下した者 6 人、最低血圧が低下した者 9 人の成績を得ている。また、1日 2.25～3 g の 7～56 日の連続経口投与では、最高血圧、最低血圧はそれぞれ平均 30.1 mmHg 及び 17.5 mmHg 低下している。また、その降下状態は一般に緩徐であり、低血圧の出現をきたさないとしており、今回の SHR の実験結果と非常に類似したものであった。

糸状菌の生産する降圧物質としては、*Aspergillus niger* のイソフラボン類¹⁴⁾や *Fusarium* sp. のフザリニン酸¹⁵⁾などが知られている。しかし今回の実験により、紅麴の有効成分は、水、エタノールに可溶、n-ブタノール、酢酸エチルに不溶であることが分かった。よって、脂溶性であるイソフラボン類やフザリニン酸が関与しているとは考えにくい。また、ACE 阻害活性を有する食材が多くあることから¹⁶⁾、紅麴のエタノール抽出物について Cushman らの方法¹⁷⁾に従い阻害活性を測定したが、ほとんど認められなかった。従って、作用機序、作用物質の解明は今後更に検討を要する。

今回得た水抽出物では、飼料に対してわずか 0.0024% 添加するだけで、明確に血圧は下降した。これは、紅

麴そのものに換算して飼料中0.3%量であることから、紅麴自体を摂取したとしても現実的に摂取可能な量であると考えられる。また、作用物質がエタノール、水に可溶であることは、我が国の食文化の1つの原点である醸造食品はもちろん、飲料としても紅麴の有効成分を摂取できることになり、これらの食品により高血圧予防の可能性が示された。

要 約

紅麴の血圧降下作用を解明するために、各種溶媒による抽出分画物の効果を調べた。エタノールで室温抽出後、酢酸エチル、*n*-ブタノール、水で分画を行い、それぞれの抽出物を紅麴に換算して0.3%になるように、1%食塩含有飼料に添加し、高血圧自然発症ラット（SHR）に15日間自由摂取させた。その結果、降圧効果は水抽出物のみに認められたことから、紅麴の有効成分は水、エタノールに可溶、*n*-ブタノール、酢酸エチルに不溶性であることが明らかになった。一方、紅麴に含まれる降圧物質の1つである γ -アミノ酪酸をSHRに10日間与えた。飼料への添加量は、水抽出物飼料中の含量とほぼ同じ0.1 mg/100 gと、その10倍量の1.0 mg/100 gとした。1.0 mg/100 gの摂取では水抽出物と同程度の血圧降下がみられ、0.1 mg/100 gでも低下傾向が認められた。

以上のことから、紅麴降圧物質の1つはGABAであり、その他にも水溶性の何らかの有効成分があることが示唆された。

文 献

- 1) 辻 啓介, 市川富夫, 田辺伸和, 阿部士朗, 榎井庄一, 中川靖枝: 麴が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響, 農化, **66**, 1241~1246 (1992)
- 2) 李 時珍: 本草綱目, 第3分冊, p.1547 (1979) 人民衛生出版社, 北京
- 3) 遠藤 章: 紅麴と紅麴菌をめぐる歴史と最近の動向, 発酵と工業, **43**, 544~552 (1985)
- 4) Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A. and Nakanishi, T.: Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2484~2489 (1987)
- 5) Stanton, H. C.: Mode of action of gammaamino cardiovascular system, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**, 195~204 (1963)
- 6) 辻 啓介, 辻 悦子, 中川靖枝, 鈴木慎次郎: 食物繊維のナトリウム吸着能が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響, 家政誌, **39**, 187~195 (1988)
- 7) 原 征彦, 外岡史子: 茶カテキンのラット血圧上昇に及ぼす抑制効果, 栄食誌, **43**, 345~348 (1990)
- 8) 杉山圭吉, 高田康二, 江川 真, 山本郁雄, 恩塚 博, 大場健吉: 魚タンパク加水分解物の高血圧抑制作用, 農化, **65**, 35~43 (1991)
- 9) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口 満: 嫌気処理緑茶（ギャバロン茶）による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用, 農化, **61**, 1449~1451 (1987)
- 10) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子: γ -アミノ酪酸を蓄積させた茶の製造とその特徴, 農化, **61**, 817~822 (1987)
- 11) 塚田裕三: 脳の生理化学と臨床応用, 日医誌, **42**, 571~579 (1959)
- 12) 村越 勇, 池上文雄, 浜 武, 西野和美: シュロの花穂中のアミノ酸組成について, 生薬学雑誌, **38**, 355~358 (1984)
- 13) 三村悟郎, 大塚健次郎, 河崎照雄, 原口義邦, 山道 徹, 大城新蔵, 陣内富男: γ -アミノ酪酸の脳卒中後遺症に於ける使用経験, 老年病, **6**, 238~243 (1962)
- 14) Umezawa, H., Tobe, H., Shibamoto, N., Nakamura, F., Nakamura, K., Matsuzaki, M. and Takeuchi, T.:

Isolation of isoflavones inhibiting dopa decarboxylase from fungi and streptomyces, *J. Antibiol.*, **28**, 947~952 (1975)

- 15) Hidaka, H., Nagatsu, T., Takeya, K., Takeuchi, T., Suda, H., Kojiri, K., Matsuzaki, M. and Umezawa, H. : Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi, *J. Antibiol.*, **22**, 228~230 (1969)
- 16) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒 熙: 食品中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害について, *農化*, **57**, 1143~1146 (1983)
- 17) Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637~1648 (1971)

(受付: 平成4年3月8日)