血管の収縮, 弛緩に作用する食品中の機能物質について

亀田 健治*, 高久 武司*, 村上 恵子**
松浦 幸永**, 奥田 拓道**, 立石 憲彦***
前田 信治***

愛媛大学医学部 *附属実験実習機器センター, ** 生化学第二, *** 生理学第二

Vasoactive Substances in Foods

Kenji KAMEDA,* Takeshi TAKAKU,* Keiko MURAKAMI,**
Yukinaga MATSUURA,** Hiromichi OKUDA,**
Norihiro TATEISHI*** and Nobuji MAEDA***

* Central Research Laboratory, ** 2nd Department of Medical Biochemistry,
and *** 2nd Department of Physiology, School of Medicine,
Ehime University, Shigenobu, Onsen-gun, Ehime 791-02

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 44, 487~492 (1991)

Norepinephrine-induced arteriole constriction was found to be inhibited by water extracts of prawn, salmon, flatfish, beef, pork, scallop, sea urchin and other species. On the other hand, water extracts of tomato, spinach, Japanese pepper, and sesame stimulated norepinephrine-induced arteriole constriction. Therefore, experiments were designed to identify the active principle in the extract of prawn. It was found that one of the active principles was AMP. It was postulated that AMP was absorbed by the intestine after converting it to adenosine. Adenosine was also found to inhibit norepinephrine-induced arteriole constriction. Based on these results, the physiological significance of biologically active substances in food was discussed.

Key Words norepinephrine-induced arteriole constriction, vasoactive substances, AMP, adenosine.

(Received June 3, 1991)

食品に含まれる機能物質を探索する場合, まず問題となるのは, どのような機能を目安にするかである。この機能の目安は, 簡便に測定でき, しかもその機能がヒトの健康に連なるものでなくてはならない。今回, われわれが取り上げた機能の目安は血管の収縮, 弛緩である。とくに細動脈のノルエピネフリンによる収縮を阻止する機能物質を中心に検討した。血管中の酸素や血糖は主として毛細血管を介して細胞へ運ばれるが, この毛細血管の血流の流れを調節するのが細動脈である。とくにストレスなどで細動脈の外膜に分布する交感神経からノルエピネフリンが分泌されると中膜平滑筋細胞が収縮し, 細動脈が縮むとともに, 毛細血管を流れる血液が減少する。このため細胞への酸素や血糖の供給が阻害されるとともに細胞を取りまく溶液(細胞間質液)のpHが低下する。これは, 細胞から出される炭酸ガスが, 毛細血管

に取り込まれ, 肺から呼吸として排出される過程が血流遮断のため阻害され, 炭酸ガスの蓄積が起こるためと思われる。細胞間質液pHは, 通常, 血液と同じく7.4前後であるが血流遮断によって7.0近くまで低下する^{1)~3)}。脂肪細胞や筋肉を取りまく細胞間質液のpHが7.0前後になるとインスリンによるグルコースの取込み促進作用が阻害されるようになる^{4)~6)}。したがって, 細動脈の収縮は細胞への酸素, 血糖, 細胞間質液pHの低下を介して細胞の代謝障害をもたらすのである。逆に, 細動脈の収縮を阻止する物質は, そのような代謝障害の出現を防ぐ働きをすると思われる。

そこで, われわれは, まずモルモットの大動脈を用いて身近な食品の水抽出物がノルエピネフリンによる収縮を阻止するか否かを調べ, 収縮阻止作用をもつ抽出物についてその本体を明らかにし, 最後にラット腸間膜細動脈のノルエピネフリンによる収縮を阻害するか否かを確認するという手法で細動脈の収縮を阻止する機能物質を

*,**,*** 〒791-02 愛媛県温泉郡重信町大字志津川

図1. マグヌス装置

ハートレイ系雄モルモットの太動脈らせん状片の縦方向の伸縮運動をトランスデューサーを介して測定する装置である。

図2. 微小循環における作用の測定装置

食品から単離することにした。

実験方法

1. 各食品のサンプル調製

野菜類は、トマト (学名: *Lycopersicon*)、ほうれん草 (*Spinacia*)、山椒 (*Zanthoxylum*)、ゴマ (*Sesamum*)、シメジ (*Lyophyllum*)、納豆、山芋、おくら (*Abelmoschus*) の全試料を生で、魚介類は、芝えび (*Metapenaeus*)、鮭 (*Oncorhynchus*)、平目 (*Paralichthys*)、タチウオ (*Trichiurus*)、アマギ、あこう鯛、まなかつお (*Pampus*)、ミスキカレイ、メッキアジ、糸より、鶏肉、牛肉、豚肉、はたて貝柱 (*Patinoecten*)、かき (*Ostracea*)、ハマグリ (*Meretrix*)、せと貝は可食部を約3分間ボイルし、また、うに (*Echinoidea*) は生の状態に2倍量の純水を加えてホモジナイズし、3,000 rpm, 10 min 遠心し、上清を得た。これを、各食品の水抽出液とした。

2. 血管平滑筋収縮作用の測定 (マグヌス法による)

ハートレイ系雄モルモット (体重 300 g 前後) の太動脈を摘出し、らせん条片を作製した。それを、図1のように、37°C のタイロッド液を満たしたマグヌス装置へ取り付けた。なお、マグヌス装置は、組織をタイロッド液中に吊し、下端を固定し上端を糸でヘーベルにつなぎ、

図3. 野菜類の血管収縮に対する作用

各食品の全試料 (生) に対し2倍量の純水を加えてホモジナイズし、3,000 rpm, 10 min 遠心して得た上清をサンプルとした。なお、各食品の検体数は食品名の下に示す。

組織の縦方向の伸縮運動をトランスデューサーを介して測定した。

まず、ノルエピネフリン (10^{-7} g/ml) 単独の血管平滑筋の収縮を測定した。次に、血管平滑筋をタイロッド液で十分洗浄し安定化させ、一定量の食品の水抽出液を加えた後、ノルエピネフリンを加え収縮を測定した。ノルエピネフリン単独の収縮を100%とし、各食品のノルエピネフリンに対する作用を求めた。

3. ラット腸間膜の細動脈径の測定

観察装置は、図2に示すように、倒立顕微鏡 (IMT-2, オリンパス: 東京) のステージ上に、ラットの腸間膜を顕微鏡で観察するためのラット固定台を自作し固定した。対物レンズは倍率が40倍の超長焦点レンズ (ULWD CDPlan40PL, オリンパス: 東京) を用いた。倒立顕微鏡の三眼目にビデオカメラ (DXC-101, SONY: 東京) を接続し、ビデオテープレコーダー (SL-HF705, SONY: 東京) で録画しながらビデオモニター (PVM-1371Q, SONY: 東京) で観察画像を表示した。腸間膜の観察は、ラット (Wistar 系, 雄性, 6~9週齢, 180~250 g) 腹腔内に、ウレタン・ α -クロラロース溶液 (1.5 mg/g 体重) を注射し麻酔を施したのち腹部を剃毛し、約2 cm 正中切開した。次に、切開部から腸間膜を体外に露出させた。ラットを恒温水を循環させた固定台の上に置き、腸間膜を固定台の中央に設けた透明円筒台 (直径 10 mm, 高さ 5 mm) 上に固定した。ビデオカメラから送られた映像をビデオモニターで観察しながら腸間膜上に等張のリン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解した薬物をマイクロピペットで局所添加し、腸間膜部分の中で適当な細動

図 6. HPLC パターン (1 回目)
TSKgel ODS-120T (4.6 mm×25 mm).
溶離液: A, 0.1% TFA; B, 50% CH₃CN in 0.1% TFA.
TFA: Trifluoroacetic acid, CH₃CN: Acetonitrile,
流速: 0.5 ml/min, 検出: 254 nm (—).

図 7. HPLC パターン (リクロマト)
条件は、図 6 と同じ。

と略す)であることがわかった。つまり、芝えび中に含まれる血管平滑筋収縮抑制物質の一つは、AMPであることがわかった。なお、この AMP が腸管から吸収される際、実際に生体に作用するのは、5'-ヌクレオチダーゼによって脱リン酸されたアデノシンであると考えられる。

また、芝えびと同様に血管平滑筋収縮を強く抑制する食品である鮭および平目についても、抑制物質の精製を試みたが、最も収縮を抑制する本体はいずれも AMP であることがわかった。

次に、芝えび中に含まれていた AMP とその他各種核酸関連物質について、種々の濃度におけるノルエビネフリンによる血管平滑筋収縮に対する作用について検討した。結果は、図 8 のように AMP とその関連物質であるアデノシン、ADP、ATP はノルエビネフリンによる収縮をいずれも濃度依存的に阻害した。たとえば、ノルエ

図 8. 血管収縮に対する各種核酸関連物質の作用
0.59 μ M ノルエビネフリンによる収縮を 100 とする。

ビネフリンの収縮において、 10^{-4} M の濃度において AMP は、約 40% 収縮を阻害し、アデノシンや ATP や ADP は、70~80% 収縮を阻害した。また、IMP や GMP は、ノルエビネフリンの収縮には影響を与えなかった。なお、ATP 関連物質の血管平滑筋収縮に対する作用は古くから知られているが¹⁰⁾、ノルエビネフリンの収縮をアデノシンが拮抗することはあまり知られていない。

次に、AMP が脱リン酸され、生体に作用すると思われるアデノシンのノルエビネフリンの収縮に対する作用を、ラット腸間膜細動脈を用いた *in vivo* の実験でみることにした。ラット腸間膜上を 2.5 ml/min の流速でタイロッド液 (pH 7.5) を灌流しながらインジェクターを用い薬物を局所添加した。図 9 に示すように、ノルエビネフリン (500 ng/ml) を添加すると細動脈の血管径が約 70% 収縮したが、アデノシン (50 μ g/ml) をノルエビネフリンと同時に添加するとほぼ 100% ノルエビネフリンの血管収縮を阻害することが明らかになった。これらの結果より *in vivo* においても、アデノシンがノルエビネフリンによる細動脈の収縮を阻止することが明らかになった。

考 察

本実験は血管の収縮、弛緩に影響する機能物質を身近な食品の中に見いだす試みを行ったものである。すでに述べたように血管、とくに細動脈の収縮に伴う末梢循環の不全は、細胞への酸素や血糖の供給不全、インスリンの作用低下等を介して細胞の代謝障害を引き起こすと考えられる。

しかし、細動脈の収縮、弛緩に関する実験は操作が複

図9. a) 薬物添加前の細動脈, b) ノルエピネフリン (500 ng/ml), 200 μ l を局所添加し, 40 秒後の細動脈, c) ノルエピネフリン (500 ng/ml) とアデノシン (50 μ g/ml), それぞれ 200 μ l を局所添加し, 40 秒後の細動脈

雑で食品からの機能物質の単離, 精製の際の目安に用いるには, 不便である。そこで, われわれは, 細動脈と同じ機序で収縮と思われるモルモット大動脈を用い, そのノルエピネフリンによる収縮を目安に機能物質を探索することにしたのである。まずモルモット大動脈の収縮, 弛緩を目安に食品からの粗抽出液についてスクリーニングし, その中で, ノルエピネフリンによる血管収縮を阻害する抽出液について, その本体を明らかにし, 最後にこの明らかにされた機能物質について, ラット腸間膜細動脈のノルエピネフリンによる収縮を阻害するか否

かを確認するという方法を用いたのである。

モルモット大動脈を用いた実験で, トマト, ほうれん草, 山椒, ゴマ, シメジ, 納豆などは, ノルエピネフリンによる血管収縮を促進することがわかった。一方, おくら, 芝えび, 鮭, 平目, タチウオ, アマガ, まながつお, ミスキカレイ, メッキアジ, 糸より, ほたて貝, かき, はまぐり, せと貝, うになどの水産物は血管収縮を抑制することが明らかになった。また牛肉, 豚肉は収縮抑制, 鶏肉は収縮を軽度上昇させた。われわれの目的は血管収縮を抑制する機能物質を単離することなので, まず, 芝えびについてノルエピネフリンによる血管収縮を抑制する物質を単離し, その構造を調べたところ AMP であることがわかった。この AMP は, ATP に由来するものと思われるが, 一般にリン酸が結合した核酸類は細胞膜を通過できないといわれている。そこで, ラットを用い, 空腸粘膜と肝臓と平目筋における 5'-スクレオチダーゼ活性を Widnell の方法¹¹⁾ により測定した結果, 腸管粘膜には他の組織と比較して, 高い 5'-スクレオチダーゼ活性 (空腸粘膜: 55.1, 肝臓: 1.4, 平目筋: 1.0 μ mol/mg protein/h) が存在することから, AMP が腸管から吸収される場合には腸管内で 5'-スクレオチダーゼの作用を受けたアデノシンの形で行われるものと思われる。アデノシンは, AMP よりも血管収縮阻害作用は強く, 10^{-4} M $\sim$ 70~80% 収縮を阻害する。一方, 鮭, 平目に含まれる血管収縮抑制物質の一つも, 芝えびと同様の方法で探索した結果, AMP であることがわかった。また, これら血管収縮を抑制した魚介類にはいずれも, AMP などのアデノシン関連物質が多く含まれていた (unpublished data)。このような成績から水産物に含まれる血管収縮抑制物質の多くが AMP, アデノシンなどの関連物質である可能性が高いので, 現在, このことについてさらに検討中である。

さて, われわれの目的は, 細動脈のノルエピネフリンによる収縮を阻害する機能物質を明らかにすることなので, 次に, 芝えび, 鮭, 平目に含まれていることが確認された AMP について, とくにその脱リン酸物質であるアデノシンについてラット腸間膜細動脈のノルエピネフリンによる収縮を阻害するか否かを検討したところ, 細動脈の収縮を著明に阻害することが明らかになった。このような成績は芝えび, 鮭, 平目由来のアデノシンが細動脈の収縮を阻止し, 末梢循環を改善し末梢細胞の代謝を活性化する可能性を示すものである。また, 血漿中アデノシン濃度は 12.0~49.9 pmol/ml といわれている¹²⁾。そして, 本実験で行ったラット腸間膜細動脈への局所添加において, アデノシン濃度が 18.7 nmol/ml 以上で細動脈のノルエピネフリンによる収縮を阻害することがわかった。今後, AMP 経口投与による血中アデノ

シン濃度の変化, また, アデノシンの血管内投与による細動脈の収縮に及ぼす影響も検討する必要があると思われる。

ところで, ノルエビネフリンによる細動脈の収縮は細胞外カルシウムの中膜平滑筋細胞への流入によって起こるとされている¹³⁾⁻¹⁵⁾。したがって, アデノシンの細動脈収縮抑制作用はカルシウムを介して行われる可能性もあるので, 今後, この点についても検討する予定である。

要 約

ノルエビネフリンによる血管平滑筋収縮に対する各種食品の作用を調べた。血管平滑筋収縮を増強する食品として, トマト, ほうれん草があった。とくに, ほうれん草は, 単独でも血管平滑筋収縮作用を示した。豚肉, 牛肉, 芝えび, 鮭, かき, はたて貝柱, はまぐりなど魚・肉類や貝類は, ノルエビネフリンによる血管平滑筋収縮を抑制した。ただし, わずかであるが, 鶏肉は, 血管平滑筋収縮促進作用を示した。

また, 芝えび, 鮭, 平目中に含まれる血管平滑筋収縮抑制物質の一つは, AMP であったが, 腸管から吸収された後に作用するのは, 脱リン酸されたアデノシンであると考えられる。さらに, アデノシンが *in vivo* においてラット腸管膜細動脈のノルエビネフリンによる収縮を抑

制することがわかった。

本研究は, 水産庁・水産物健康性機能有効利用開発研究から助成金をいただき行ったものである。

文 献

- 1) 奥田拓道: 生活医学, 1, 2 (1990)
- 2) 奥田拓道: 運動生化学, 2, 44 (1990)
- 3) 久保 周: 愛媛医学, 6, 70 (1987)
- 4) 久保 周: 愛媛医学, 6, 78 (1987)
- 5) 山内泰介: 愛媛医学, 7, 472 (1988)
- 6) Sekiya, K., Yamauchi, T., Kubo, M., Kimura, S. and Okuda, H.: *Biomed. Res.*, 10, 191 (1989)
- 7) 田村善蔵, 由岐英剛: 生化学分析法, 286 (1984) 南江堂 (東京)
- 8) 田村善蔵, 由岐英剛: 生化学分析法, 288 (1984) 南江堂 (東京)
- 9) 田村善蔵, 由岐英剛: 生化学分析法, 278 (1984) 南江堂 (東京)
- 10) Somlyo, A.P. and Somlyo A.V.: *Pharmacol. Rev.*, 22(2), 291 (1970)
- 11) Widnell, C.C.: *Methods Enzymol.*, 32, 368 (1974)
- 12) 久保野勝男, 高口聖民代, 坂本和夫, 米沢真佐子, 塚田 裕: 臨床化学, 20, 72 (1991)
- 13) Hirst, G.D.S., Silverbery, G.D. and Van Helden, D.F.: *J. Physiol.*, 371, 289 (1986)
- 14) Bean, B.P., Sturek, M., Puga, A. and Hermes-meyer, K.: *Circ. Res. Suppl.*, 61, I-10 (1987)
- 15) Inoue, R., Kitamura, K. and Kuriyama, H.: *Pflugers Arch.*, 405, 173 (1985)

(1991年6月3日受理)