

信州大学審査学位論文

新規食品機能性成分アセチルコリンの抗高血圧作用メカニズム

令和4年3月

信州大学大学院  
総合医理工学研究科  
総合理工学専攻

山口 翔平

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 序論  | 1  |
| 1. 血圧と高血圧                                 | 1  |
| 2. 食品による高血圧予防                             | 2  |
| 3. 高血圧自然発症ラット                             | 3  |
| 4. アセチルコリン                                | 3  |
| 5. アセチルコリン高含有野菜ナスの食品機能性                   | 4  |
| 6. 本研究の目的                                 | 5  |
| 第一章 ナス粉末の経口投与による<br>高血圧自然発症ラットへの抗高血圧作用の検討 | 6  |
| 実験材料および方法                                 | 7  |
| 1. 試薬                                     | 7  |
| 2. 実験動物                                   | 7  |
| 3. ナス凍結乾燥粉末                               | 8  |
| 4. 血管等尺性張力測定試験によるナス由来アセチルコリンの生物活性評価       | 8  |
| 5. 高血圧自然発症ラットへのナス粉末反復経口投与試験               | 9  |
| 5-1. テイルカフ法による血圧測定試験                      | 9  |
| 5-2. 尿中カテコールアミン測定試験                       | 9  |
| 6. 統計分析                                   | 10 |
| 結果  | 11 |
| 1. ナス中の抗高血圧食品成分含量                         | 11 |

|   |    |
|---|----|
| 2. 血管等尺性張力測定試験によるナス由来アセチルコリンの生物活性評価                               | 11 |
| 3. 高血圧自然発症ラットへのナス粉末反復経口投与試験                                       | 13 |
| 3-1. テイルカフ法による血圧測定試験  | 13 |
| 3-2. 尿中カテコールアミン測定試験   | 14 |
| 考察  | 15 |
| 第二章 経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用メカニズム調査                                     | 17 |
| 試薬および方法   | 19 |
| 1. 試薬   | 19 |
| 2. 実験動物   | 19 |
| 3. テレメトリー法  | 20 |
| 4. テレメトリー法による経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの<br>血圧および交感神経活動に与える急性影響の評価    | 20 |
| 4-1. テレメトリーセンサ埋込手術  | 20 |
| 4-2. 血圧と交感神経活動の測定   | 20 |
| 5. 経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの<br>昇圧物質に与える急性影響の評価                     | 21 |
| 6. テレメトリー法によるアセチルコリンの反復経口投与が<br>高血圧自然発症ラットの血圧および交感神経活動に与える慢性影響の評価 | 21 |
| 7. アセチルコリンの反復経口投与が高血圧自然発症ラットの<br>昇圧物質に与える慢性影響の評価                  | 22 |
| 7-1. 尿中カテコールアミン測定   | 23 |
| 7-2. 血漿中アンジオテンシン II の測定   | 23 |
| 8. 迷走神経切断試験   | 23 |

|   |    |
|---|----|
| 9. M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害試験  | 24 |
| 10. 安定同位体標識アセチルコリン経口投与試験  | 24 |
| 11. 統計分析  | 25 |
| 結果  | 27 |
| 1. テレメトリー法による経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの<br>血圧および交感神経活動に与える急性影響の評価    | 27 |
| 1-1. 血圧と腰部交感神経活動  | 27 |
| 1-2. 血圧と腎交感神経活動   | 29 |
| 2. 経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの<br>昇圧物質に与える急性影響の評価                     | 31 |
| 3. テレメトリー法によるアセチルコリンの反復経口投与が<br>高血圧自然発症ラットの血圧および交感神経活動に与える慢性影響の評価 | 32 |
| 4. アセチルコリンの反復経口投与が高血圧自然発症ラットの<br>昇圧物質に与える慢性影響の評価                  | 34 |
| 5. M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害試験  | 35 |
| 6. 迷走神経切断試験   | 36 |
| 7. 安定同位体標識アセチルコリン経口投与試験   | 37 |
| 考察  | 38 |
| 第三章 異なる血圧状態におけるラット系統間の<br>経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用の差異の検討                | 43 |
| 試薬および方法   | 44 |

|  |    |
|--|----|
| 1. 試薬  | 44 |
| 2. 実験動物  | 44 |
| 3. 経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用の系統間差異                    | 44 |
| 4. アセチルコリン単回経口投与による                            |    |
| 尿中カテコールアミン変化の系統間差異                             | 44 |
| 5. 高血圧自然発症ラットとウィスター京都ラットにおける <i>Chga</i> 遺伝子比較 | 45 |
| 結果   | 46 |
| 1. 経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用の系統間差異                    | 46 |
| 2. アセチルコリン単回経口投与による                            |    |
| 尿中カテコールアミン変化の系統間差異                             | 48 |
| 3. 高血圧自然発症ラットとウィスター京都ラットにおける <i>Chga</i> 遺伝子比較 | 49 |
| 考察   | 50 |
| 総括   | 52 |
| 参考文献   | 54 |
| 謝辞   | 61 |
| サポーティングデータ                                     | 62 |

## 序論

### 1. 血圧と高血圧

血圧とは生体において心臓から拍出された血液が血管壁を押し圧力のことを指す。血圧は心拍出量と血管壁の抵抗の大きさにより規定され、循環血液量や心拍数増加による心拍出量の増加や血管の収縮異常などの機能的変化および動脈硬化などの器質的変化による血管抵抗性の増加により血圧が高い状態が持続する。診察室血圧において収縮期血圧 140 mmHg 以上かつ/または拡張期血圧 80 mmHg 以上の状態を高血圧と呼ぶ。高血圧は脳心血管疾患の主要な危険因子であることが複数の疫学研究で指摘されている[1]。脳心血管疾患は高い死亡率を示し、我が国でも令和2年における死因の脳血管疾患が占める割合は22.5%にも上る[2]。さらに、脳血管疾患は発症後に治療が遅れると後遺症が残る可能性が高く、令和3年の65歳以上の要介護者等における介護が必要となった理由の19.8%を占める[3]。要介護の状態は罹患者のQoLを著しく低下させるため、健康寿命の低下に大きく関わる。したがって、死亡率の低下および健康寿命延伸のために脳心血管疾患の発症を予防するうえで高血圧を治療または予防する社会的意義は極めて大きい。

令和元年度における日本人成人の高血圧有病者数は4,300万人と推定されている[4]。また、血圧は加齢に伴って上昇していくことから[5]、さらなる高齢化の加速が推測されている我が国では、健康維持のための指標としての血圧の重要性はますます高まることが予測される。「日本高血圧治療ガイドライン2019」では、高血圧の前段階として収縮期血圧130-139 mmHgかつ/または拡張期血圧80-89 mmHgの範囲が「高値血圧」として新規に分類された[4]。従来の高血圧の前段階の区分であった「正常高値血圧」は収縮期血圧が120-129 mmHgかつ拡張期血圧が80 mmHg未満と基準が引き下げられ、高血圧の予防の重要性が強調されている。血圧は上昇に伴う自覚症状がなく、他の生活習慣病である肥満や糖尿病などと相互に関連して動脈硬化の進展に寄与し、死亡率

の高い脳血管疾患を引き起こすため「サイレントキラー」と呼ばれている。そのため、日常的な血圧の確認や必要に応じた血圧改善のための行動が重要である。高血圧の診断を受けた患者に対しては降圧薬による治療が行われる一方で、高血圧の前段階における血圧の改善には食事や運動などの生活習慣の修正が重要であるとされている。

## 2. 食品による高血圧予防

ヒトの高血圧のうち90%は原因が不明な本態性高血圧症であり、その成因には遺伝的な要因に加え、環境的な要因である食事や運動不足、喫煙、飲酒といった生活習慣が複合的に寄与していると考えられる。生活習慣のうち、食事の改善による血圧改善の手段として特定保健指導が挙げられるが、医師による診断や指示を要する医療行為のため、高血圧の前段階での日常的な血圧管理には不向きである。セルフヘルスケアの手段として近年注目されているのが、食品のもつ三次機能である生体調節作用を有する機能性食品であり、その中でも機能性表示食品の利用が高まっている。機能性表示食品とは、事業者の責任において食品に含有される機能性関与成分について科学的根拠に基づいた健康表示（機能性表示）を付した食品のことであり、平成27年に施行された「機能性表示食品制度」に基づいて消費者庁に届出することで販売が許可される。機能性表示食品では、科学的根拠として機能性関与成分の介入により機能性を報告する既報の論文を対象にしたシステマティックレビューの結果を利用することができる。そのため、最終製品で臨床試験を実施する必要があった従来の特定保健用食品と比較して届出数が多く、その品目数は増え続けている。少子高齢化の進展を背景として国民の健康意欲は高まり、機能性表示食品の市場は今後も増大が続くことが予想される。食品による生体への作用は医薬品に比べると穏やかなため、機能性食品の利用は副作用などのリスクが小さく安全に利用可能である。日常生活における血圧管理のために、生活習慣の改善手段のひとつとして機能性食品の利用を拡大させることは、高血圧者の増加の抑制に繋がることが期待される。

### 3. 高血圧自然発症ラット

高血圧自然発症ラット (Spontaneously hypertensive rat : SHR) は、遺伝的に高血圧を発症するインブリード系統のラットである。1959年に京都大学医学部動物センターにて維持されていた Wistar 系統の中から、選抜された血圧の高い雄ラットと雌ラットの掛け合わせの繰り返しにより高血圧を自然発症する個体を得て、その兄妹交配により SHR が作出された[6]。その後、京都大学で維持されていた Wistar 系ラットの近交化により正常血圧系統である Wistar 京都 (WKY) ラットが作出された。ブリーダーによる違いはあるものの、SHR は8週齢で WKY ラットに対して有意に高い血圧値を示し、加齢とともに血圧が上昇し続け、14週齢時には 200 mmHg 以上の血圧値を示す[7]。SHR は本態性高血圧のモデルラットとして、高血圧の発症機序の解明を目的に用いられる。親元が同じ WKY ラットは SHR と遺伝的背景が近い系統として、血圧調節関連遺伝子について両系統で比較している報告があるなど、SHR の正常血圧対照として用いられる[8, 9]。SHR の高血圧発症機序として、生体の昇圧系である交感神経活動の異常亢進が報告されており[10]、これは本態性高血圧患者で報告されている特徴と類似している[11]。SHR は医薬品の薬理作用や食品機能性による高血圧の改善および予防の効果やその作用機序を明らかにする研究にも広く利用されている。

### 4. アセチルコリン

アセチルコリン (ACh) は第四級アンモニウムカチオンであるコリンと酢酸のエステル化合物である。ACh は1914年に Dale が発見し[12]、1926年に Loewi が迷走神経における化学伝達を ACh が担っていることを実証し[13]、現在では動物の神経伝達物質として広く知られている。ACh を神経伝達物質とするコリン作動性神経は、中枢神経系では記憶の形成や維持に関与し、末梢神経系では副交感神経として内臓の自律機能を調節するほか、体性神経として筋運動を調節するなど、全身で様々な生理機能を担っている。ACh は生体内ではコリンとアセチル CoA を原料にコリンアセチルトランスフェラーゼにより合成され、受容体に作用した後にコリンエステラーゼにより分解さ



れる。コリン作動系は消化管の粘膜細胞などに局所的に発現し機能していることが明らかとなり、AChによる神経系を介さない生理機能の調節機構の存在が示唆されている[14]。自然界におけるAChの分布を調査した報告では、AChが菌類や植物などの神経系を有しない生物にも存在しており、その中にはシイタケ (*Lentinus edodes*) やナス (*Solanum melongena*)、タケノコ (*Phyllostachys bambusoides*) などの日常的に摂取する食品も含まれている[15]。

所属研究室で開発されたソバスプラウト乳酸発酵食品は0.010 mg/kg 体重 (BW) の極低用量の経口摂取でSHRの血圧を低下させ、その有効成分としてAChを含むコリンエステル類が単離同定された[16, 17]。これは、AChが少量の経口摂取により抗高血圧作用を示す食品機能性成分であることを示唆している。その後、食品中に含まれるAChの含量を調査した結果、19種類の国産栽培作物の全てからAChが検出され、AChは我々が食生活において日常的に摂取している食品成分であることを確認した[18]。特にナスは他の栽培農作物に対し2,900倍ものAChを含有しており、AChの摂取源として有望であることが明らかとなった[19]。

## 5. アセチルコリン高含有野菜ナスの食品機能性

AChを豊富に含むナスの継続摂取による血圧および気分改善効果を、正常高値血圧またはI度高血圧に該当する血圧が高めの日本人成人男女100名を被験者とした二重盲検ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験により評価した[20]。プラセボ食(デキストリン含有カプセル)を摂取した対照群に対し、1日当たり2.3 mgのナス由来AChを含むナス乾燥粉末(生鮮ナス22 g相当)含有カプセルを摂取した被験群では、主要評価項目である来所時血圧変化の有意な低値が認められた。さらに、被験群では副次評価項目である起床時の家庭血圧変化にも有意な改善が認められた。これらの結果から、抗高血圧食品成分であるAChを含むナスの摂取による血圧改善効果が実証された。また、被験者を正常高値血圧およびI度高血圧者ごとにナス摂取による効果を比較した探索的解析では、正常高値血圧者で来所時拡張期血圧変化、起床および就寝

時家庭血圧変化で有意な低値が、I 度高血圧者で来所時血圧の有意な低値が認められ、血圧改善の程度は血圧がより高い I 度高血圧者で大きい傾向が見られた。ナスには既知の抗高血圧食品成分として、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) やクロロゲン酸が含まれていることが知られているが、本試験で用いたナスの摂取量ではそれらの化合物の有効用量が満たされないことから、本血圧改善作用の主要な関与成分は ACh であると考えられた。また、同試験では気分プロフィール検査 (POMS-2) によりナスの摂取によるネガティブおよびポジティブな気分状態の改善効果も認められた。これらの結果は、ナスが血圧や気分状態を改善する機能性野菜であること臨床試験により実証した初の事例であり、その関与成分が新規食品機能性成分 ACh であることが示された。

## 6. 本研究の目的

所属研究室のこれまでの研究成果により、ACh が抗高血圧作用を示す新規な食品機能性成分であることが明らかとなった。しかしながら、食品成分としての ACh の研究事例はこれまでになく、その作用の詳細は不明である。本研究では動物実験により、ACh の経口投与が生体の血圧に与える影響の評価とその作用メカニズムの解明を目的とした。抗高血圧作用メカニズムを調査するために、経口投与した ACh が SHR の血圧および高血圧の関連指標に与える影響を評価した。さらに高血圧モデルとして SHR を、正常血圧モデルとして WKY ラットを用いて、異なる血圧状態における経口投与 ACh の抗高血圧作用の特性を調査した。これらの結果をもとに新規な食品機能性成分としての ACh の有用性について考察した。

## 第一章 ナス粉末の経口投与による高血圧自然発症ラットへの抗高血圧作用の検討

[21]

所属研究室の先行研究では、AChを含むナス粉末の継続摂取が、ストレスを感じている血圧が高めの人の血圧を改善することを臨床試験により実証した[20]。ナス粉末摂取による血圧改善効果には神経系への影響が関与していると考察されたが、ナス摂取が神経活動に影響を与えることを示す客観的なデータはない。本研究では、ナス粉末の摂取が血圧に影響を与えるメカニズムを調査するために、本態性高血圧モデルラットである SHR を用いて研究を行った。SHR の高血圧の一因として、正常血圧系統の WKY ラットに比べ異常な亢進を示す交感神経活動により、交感神経性の昇圧物質であるカテコールアミンによる昇圧作用が高まっていることが考えられている[22]。本研究では、ナス粉末の経口投与による SHR の血圧への影響を、反復経口投与試験により評価した。さらに、ナス粉末の摂取が SHR の交感神経活動に与える影響を調査するために、ナス粉末の反復経口投与が昇圧性のカテコールアミンであるアドレナリン

(AD) およびノルアドレナリン (NAD) 排泄に与える影響を評価した。また、大動脈を用いた血管等尺性張力測定試験によりナスに含まれる ACh の生理活性を評価した。ナス粉末試料中の ACh および既知の抗高血圧食品成分である GABA およびクロロゲン酸の含有量は、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定し、ナス粉末の経口投与による抗高血圧作用に寄与する主要な化合物について考察した。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬

超純水は超純水製造装置 (sartorius arium611, Sartorius Co., ドイツ) から製造した。メタノール, アセトニトリル, ギ酸, 塩化ナトリウム (NaCl) はナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。DL-AD, 酒石酸水素 L-NAD 一水和物は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。5 mol/L 塩酸, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) はナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。リン酸二水素ナトリウム, リン酸水素二ナトリウムは富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。硫酸マグネシウム七水和物 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 塩化カリウム (KCl), リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), D (+) -グルコース, 塩化カルシウム二水和物 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 炭酸水素ナトリウム ( $\text{NaHCO}_3$ ), 塩化 ACh, フェニレフリンは関東化学株式会社 (東京) より購入した。1-オクタンスルホン酸ナトリウム (IPC-ALKS-8) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。10 mmol/L リン酸緩衝液はリン酸二水素ナトリウム (59.99 mg) とリン酸水素二ナトリウム (70.98 mg) を量り取り, 純水 (100 mL) に溶解し調製した。4-[(2,2-diphenylacetyl)oxy]-1,1-dimethyl-piperidinium, monoiodide (4-DAMP) は Enzo Life Sciences, Inc. (米国) より購入した。2-aminoethyl-trimethylammonium pivaloylamide (EN) は所属研究室にて合成されたものを使用した[18]。

### 2. 実験動物

試験には日本チャールスリバー株式会社 (神奈川) より購入した雄性 10 週齢の SHR/NCr1Cr1j を用いた。搬入から 1 週間の順化飼育後に試験に供した。個別のプラスチックゲージで飼育し, 室温は  $23 \pm 4^\circ\text{C}$ , 湿度は  $50 \pm 20\%$ , 明暗周期は 12 時間 (明期 5 時 30 分~17 時 30 分) に設定した。固形飼料 (MF; 日本チャールスリバー株式会社, 神奈川) および水道水は自由摂取とした。すべての動物試験は信州大学農学部動物実験指針に従って行った。

### 3. ナス凍結乾燥粉末

血管等尺性張力測定試験には大阪府産の泉州水ナス，反復経口投与試験には高知県産の土佐鷹を使用した．ナスのへたを切り落とし，水で洗い，1～2 cm 幅に包丁でスライスして凍結乾燥した．ナス乾燥物をミルミキサー（MNN-2001，株式会社東京ユニコム，東京）で粉碎し，ナス凍結乾燥粉末を作製した．ナス凍結乾燥粉末を純水に懸濁し，各試験に供した．ナス中の抗高血圧成分の定量方法はサポーティングデータ「ナス凍結乾燥粉末中のアセチルコリン， $\gamma$ -アミノ酪酸，クロロゲン酸の定量方法」に示した．

### 4. 血管等尺性張力測定試験によるナス由来アセチルコリンの生物活性評価

イソフルラン麻酔下でラットを開腹，腹部大動脈から放血死させ，速やかに胸部大動脈を摘出した．摘出した大動脈を，生理食塩水に浸し，血液をよく洗い流した後，Krebs-Henseleit 溶液中で血管に付着した結合組織および脂肪組織を除去し，幅約 2～3 mm のリング標本を作製した．リング標本は混合ガス（95% O<sub>2</sub>，5% CO<sub>2</sub>）を通気した Krebs-Henseleit 溶液（37°C）を灌流液として満たした等尺性張力測定試験装置（UFER UC-5A，いわしや岸本医科産業株式会社，京都）のオーガンバス内に懸垂し，その張力変化をトランスデューサーを用いて測定した．灌流液の組成（mmol/L）は NaCl 118，KCl 4.7，CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 2.5，MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1.2，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2，NaHCO<sub>3</sub> 25，グルコース 11.1 とした．始めに 1.5 g の至適静止張力を負荷し，60 分間リング標本を安定させた．この間 15 分間隔で新鮮な灌流液と交換した．その後，オーガンバス内に血管収縮剤であるフェニレフリン（0.30  $\mu$ mol/L）を添加し，安定したところで新鮮な灌流液と交換した．その 15 分後に再びフェニレフリン（0.30  $\mu$ mol/L）によって血管を収縮させ，サンプルを累積添加し，拡張反応を記録した．試験サンプルはナス（泉州水ナス）乾燥粉末および標準試料として塩化 ACh を Krebs-Henseleit 溶液に懸濁あるいは溶解したものを用い，オーガンバス内の ACh 濃度が 10<sup>-3</sup>，10<sup>-2</sup>，10<sup>-1</sup>，10<sup>-0.5</sup>

$\mu\text{mol/L}$  となるようにそれぞれを累積添加した。血管反応の結果は、フェニレフリンによる最大収縮力を拡張率 0%，収縮前のベースライン張力を拡張率 100%とした相対値で表し ACh 濃度ごとの拡張率 (%) を算出した。同様の試験をオーガンバス内に M3 ムスカリン性 ACh 受容体 (M3mAChR) アンタゴニストである 4-DAMP ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) が存在する条件下で実施し、ナス試料の血管への作用点の特定を試みた。各添加条件について  $n=6$  で試験を実施した。データの記録および解析には LabChart Pro (ADInstruments, オーストラリア) を使用した。得られた反応曲線から 50%効果濃度 ( $\text{EC}_{50}$ ) を算出した。

## 5. 高血圧自然発症ラットへのナス粉末反復経口投与試験

### 5-1. テイルカフ法による血圧測定試験

雄性 9 週齢の SHR を個別別に代謝ゲージで飼育し、室温は  $23 \pm 4^\circ\text{C}$ 、湿度は  $50 \pm 20\%$ 、明暗周期は 12 時間に設定した。固形飼料 (MF；日本チャールスリバー株式会社、神奈川県) および水道水は自由摂取とした。6 日間の順化飼育後、血圧測定を行い、群間の血圧が同等となるようにナス群および対照群に群分けし (各群  $n=6$ )、反復経口投与を開始した。ナス (土佐鷹) 凍結乾燥粉末の投与量はラット 1 匹 1 日あたり  $0.821 \text{ mg/kg BW}$  ( $\text{ACh } 10^{-8} \text{ mol/kg BW}$  相当) とした。対照群には純水を経口投与した。ステンレス製経口胃ゾンデを用いて 28 日間毎日反復経口投与を行った。試験期間中、摂餌量、摂水量を週に 2 回、体重を週に 1 回、尿量を毎日測定した。反復経口投与開始後、0 日目、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に血圧 (収縮期および拡張期) をテイルカフ法 (BP-98A, 株式会社ソフトロン, 東京) により測定した。

### 5-2. 尿中カテコールアミン測定試験

反復経口投与開始の前日から、24 時間分の尿サンプルの採取を開始した。蓄尿中のカテコールアミン類の分解を防ぐため、 $5 \text{ mol/L}$  塩酸  $1 \text{ mL}$  を加えた採尿容器により 1 日 1 回採尿を行い、排尿量を測定した後、得られた尿は測定まで  $-80^\circ\text{C}$  で冷凍保存した。血圧測定前日の尿中カテコールアミン量を次に示す方法で測定した。

解凍した尿サンプルを遠心分離 ( $1,000 \times g$ , 3 分間) し, 上清 200  $\mu\text{L}$  を前処理した. 前処理は固相抽出カートリッジ Monospin PBA を用いて次に示すプロトコルに従って行った. カラムに溶出溶媒 (1% [w/w] 酢酸水溶液) 400  $\mu\text{L}$  を添加し, 遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 1 分間) した. カラムに洗浄溶媒 (100 mmol/L HEPES-NaOH 緩衝液, pH 8.5) を添加し遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 1 分間) した. カラムに尿サンプル 200  $\mu\text{L}$  および結合溶媒 (1.5 mol/L HEPES-NaOH 緩衝液, pH 8.5) の混合溶液を添加し遠心分離 ( $5,000 \times g$ , 2 分間), カラムから落ちた溶液を回収し再び添加し, 遠心分離 ( $5,000 \times g$ , 2 分間). 洗浄溶媒 200  $\mu\text{L}$  を加えて遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 1 分間). 100  $\mu\text{L}$  の溶出溶媒を添加して遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 1 分間) した. 得られた溶出液を分析サンプルとして, 高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出器 (HPLC-ECD) を用いて分析した. 分析条件は以下のとおりである. 装置: Prominence (HPLC, 株式会社島津製作所, 京都), ED723 (ECD, ジーエルサイエンス株式会社, 東京), 移動相: 20 mmol/L 酢酸-クエン酸緩衝液 (酢酸ナトリウム 4.20 g/L, くえん酸一水和物 1.64 g/L, IPC-ALKS-8 1.0 g/L) およびアセトニトリルの混合溶媒 (100/16 [v/v]), カラム: Inertsil ODS-4 (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , ジーエルサイエンス株式会社, 東京), 分離温度: 35 $^{\circ}\text{C}$ , 注入量: 20  $\mu\text{L}$ , 流速: 0.80 mL/分, 作用電極: ダイヤモンド, 参照電極: Ag/AgCl, 電圧: 800 mV. 測定対象のカテコールアミンを溶出溶媒に溶解したものを標準溶液として検量線を作成し, 外部標準法により定量した.

## 6. 統計分析

全ての結果は平均値と標準誤差で示した. 群間の比較はスチューデントの  $t$  検定により統計処理を行い,  $p$  値が 0.05 未満の場合に有意差があると判断した.

## 結果

### 1. ナス中の抗高血圧食品成分含量

本研究で使用したナス中に含まれる ACh および既知の抗高血食品成分の定量値を表 1 に示した. 乾燥後重量を乾燥前の生鮮重量で除して算出した凍結乾燥収率は泉州水ナスが 6.08% (生鮮重量: 155.4 g, 乾燥重量: 9.45 g), 土佐鷹が 6.47% (生鮮重量: 84.12 g, 乾燥重量: 5.44 g) であった.

表 1. ナス中のアセチルコリン,  $\gamma$ -アミノ酪酸, クロロゲン酸の含量

|                         | Mizunasu<br>(mg/100 g Fresh Weight) | Tosataka<br>(mg/100 g Fresh Weight) |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Acetylcholine           | 13.7 $\pm$ 0.9                      | 11.5 $\pm$ 0.1                      |
| Gamma-aminobutyric acid | 42.6 $\pm$ 0.2                      | 37.8 $\pm$ 0.09                     |
| Chlorogenic acid        | 79.8 $\pm$ 1.4                      | 120.6 $\pm$ 1.3                     |

### 2. 血管等尺性張力測定試験によるナス由来アセチルコリンの生物活性評価

血管内皮細胞には M3mAChR が発現しており, ACh が作用することで一酸化窒素の産生による血管拡張が生じる. ナス粉末の懸濁液の添加による血管反応性を調査することで, ナス中の ACh による M3mAChR への作用を確認することができる. 塩化 ACh 溶液あるいはナス乾燥粉末懸濁液を血管内皮が保存された SHR の胸部大動脈に累積添加した結果を図 1 に示した. 塩化 ACh の添加は, ACh 濃度  $10^{-2}$   $\mu\text{mol/L}$   $\sim$   $10^{-0.5}$   $\mu\text{mol/L}$  の濃度で用量依存的な血管拡張作用を示し, この拡張反応は M3mAChR アンタゴニストである 4-DAMP の存在下で有意に減弱した. 同量の ACh を含むナス乾燥粉末懸濁液を累積添加した場合にも同等の拡張反応および 4-DAMP による拡張反応の消失が見られた. 拡張反応の  $EC_{50}$  は塩化 ACh が  $0.0369 \pm 0.005$   $\mu\text{mol/L}$ , ナス乾燥粉末懸濁液の ACh 相当濃度は  $0.0372 \pm 0.008$   $\mu\text{mol/L}$  で両者に有意差はなかった ( $p = 0.980$ ). これらのことから, ナスの血管拡張作用はナス中に含まれる ACh が M3mAChR に作用することによるものであること, ナス中の ACh は標準品と同等の生物活性を示すことを確認した.



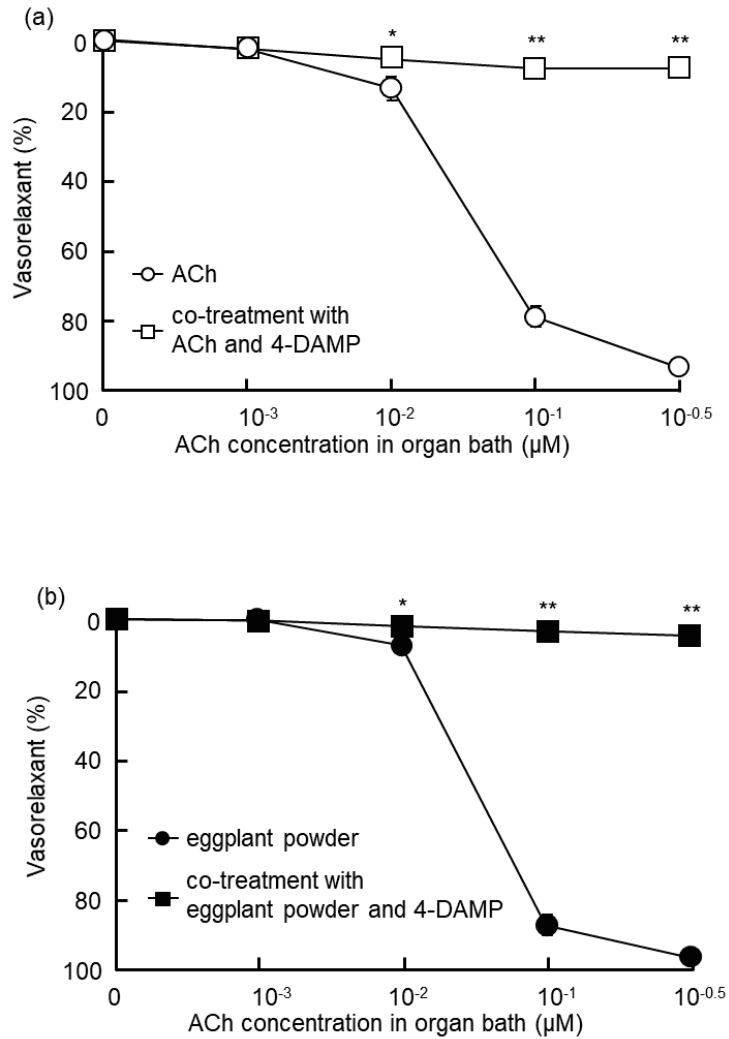


図 1. 血管等尺性張力測定試験によるナス乾燥粉末懸濁液および塩化アセチルコリン (ACh) 溶液の累積添加に対する血管反応性. 血管標本には高血圧自然発症ラットの胸部大動脈内皮保存リング標本を用いた. 横軸はオーガンバス内の ACh の最終濃度を示す. (a) 塩化 ACh 溶液累積添加, (b) ナス乾燥粉末懸濁液累積添加, ○, 塩化 ACh (n=6); □, 10 μmol/L 4-DAMP (4-[(2,2-diphenylacetyl)oxy]-1,1-dimethyl-piperidinium monoiodide, M3 ムスカリン性 ACh 受容体アンタゴニスト) 存在下における塩化 ACh 溶液の累積添加 (n=6); ●, ナス凍結乾燥粉末 (n=6); ■, 10 μmol/L 4-DAMP 存在下におけるナス乾燥粉末懸濁液の累積添加 (n=6). \**p*<0.05; \*\**p*<0.01.

### 3. 高血圧自然発症ラットへのナス粉末反復経口投与試験

#### 3-1. テイルカフ法による血圧測定試験

ナス凍結乾燥粉末 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW 相当) を 28 日間毎日反復経口投与した SHR の血圧変化を図 2 に示した. 対照群と比較してナス投与群では, 収縮期血圧では 14 日目から 28 日目, 拡張期血圧では 28 日目において有意な低値を示した.

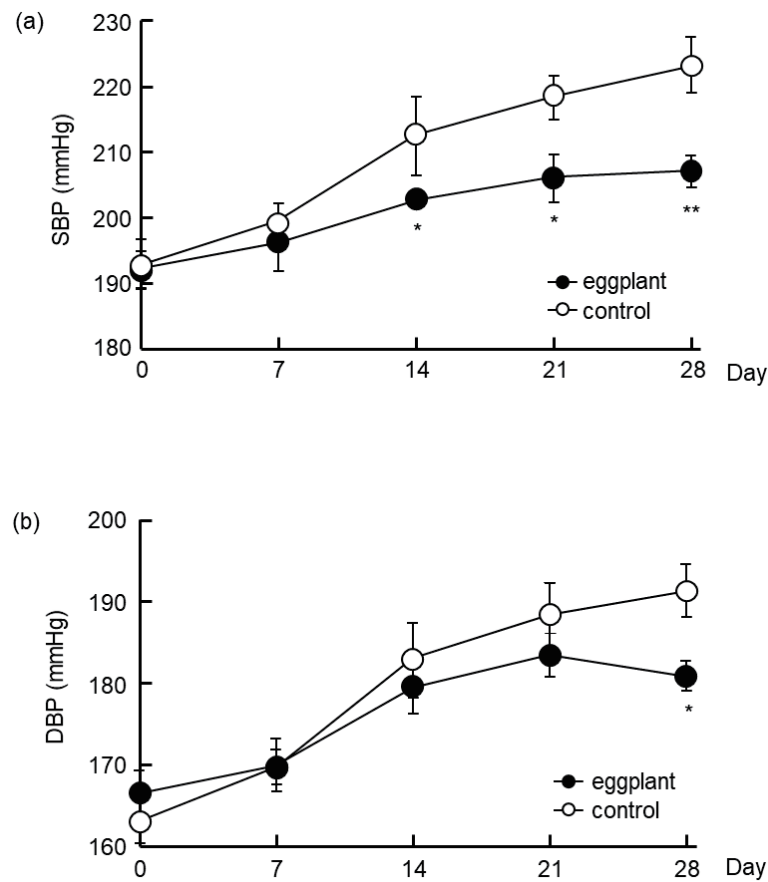


図 2. 高血圧自然発症ラットへのナス凍結乾燥粉末 28 日間反復経口投与による血圧の変化, (a) 収縮期血圧 (SBP), (b) 拡張期血圧 (DBP), ●, ナス群 (n=6); ○ 対照群 (n=6). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

ナス投与群にはナス凍結乾燥粉末の純水懸濁液 (アセチルコリン  $10^{-8}$  mol/kg 体重 相当) を, 対照群には純水を 28 日間毎日反復経口投与した.

### 3-2. 尿中カテコールアミン測定試験

ナス凍結乾燥粉末 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW 相当) の 28 日間反復経口投与による SHR の尿中カテコールアミン排泄量変化を図 3 に示した. AD は 20 日目, 27 日目, NAD は 6 日目と 27 日目に対照群と比較してナス群で有意な低値を示した.

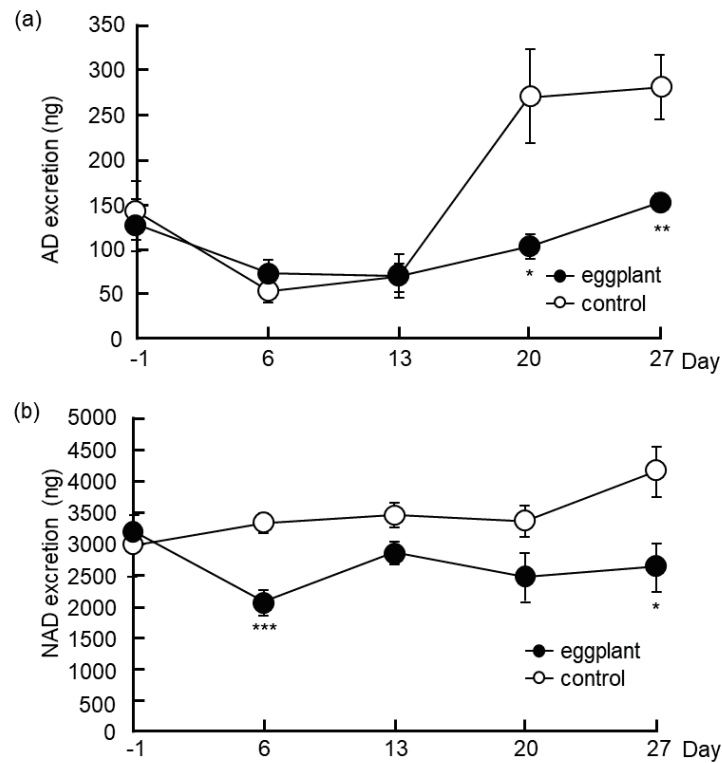


図 3. 高血圧自然発症ラットへのナス凍結乾燥粉末の 28 日間反復経口投与による尿中カテコールアミン排泄量の変化, (a)尿中アドレナリン (AD) 排泄量, (b)尿中ノルアドレナリン (NAD) 排泄量, ●, ナス群 (n=6); ○対照群 (n=6). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . ナス群にはナス乾燥粉末純水懸濁液 (アセチルコリン  $10^{-8}$  mol/kg 体重 相当) を, 対照群には純水を 28 日間毎日反復経口投与した.

## 考察

本研究では、ナス粉末の反復経口投与により、SHRの血圧および昇圧性のカテコールアミン排泄量が低下することを明らかにした。以下に説明するように、抗高血圧作用の関与成分となるナス粉末中の化合物はAChであると結論付けられた。

ナスに含まれるGABAおよびクロロゲン酸は既知の抗高血圧食品成分である。例えば、生コーヒー豆やトマトの単回および反復の経口投与はSHRの血圧を急性および慢性的に低下させることが報告されており、その関与成分が生コーヒー豆ではクロロゲン酸、トマトではGABAとされている[23, 24]。当該研究では、反復投与には、1%

(w/w)の生コーヒー抽出物(クロロゲン酸28%含有)を含む飼料と8%のトマト粉末(GABA 0.18%含有)を含む飼料がそれぞれ使用されており、生コーヒー豆抽出物とクロロゲン酸の有効量はそれぞれ一日当たり177 mg/kg BWおよび0.501 mmol/kg BW、トマト乾燥粉末とGABAの有効用量はそれぞれ一日当たり10.8 mg/kg BWおよび0.105 mmol/kg BWと推算される。また、これらの化合物の血圧低下効果は用量依存的であることが示されている。本研究で投与試料に使用したナスにもGABAとクロロゲン酸は含まれており、本試験でのナス粉末投与量から計算される各化合物の一日当たりの投与量は、それぞれ0.0465  $\mu\text{mol/kg BW}$  (GABA)と0.0432  $\mu\text{mol/kg BW}$  (クロロゲン酸)であった。これらの投与量は文献で報告されている有効用量に対して極めて低く、SHRの血圧に影響を与えなかったと推察される。したがって、GABAとクロロゲン酸は、本試験のSHRへのナス粉末の投与による抗高血圧作用に関与していないことが示唆された。

SHRの胸部大動脈リング標本を使用した血管等尺性張力測定試験では、塩化AChとナス粉末中に含まれるAChが同程度の血管拡張作用を示し、ナス中のAChは生体の受容体に対して標準品と同等の活性を有することを明らかにした。EC<sub>50</sub>に相当するナス乾燥粉末の濃度はわずか3.05  $\mu\text{g/ml}$ であったため、ACh以外の化合物による血管拡張作用の寄与は低いと推察される。ナス粉末による血管拡張作用は、M3mAChRアンタゴニストである4-DAMPの存在下で完全に阻害されたことから、作用点はM3mAChRに限定

される。M3mAChR は消化管組織にも発現しており [25]，経口投与されたナスに含まれる ACh が消化管組織に対して作用を示すことを示唆している。

SHR へのナス粉末の反復経口投与は交感神経系の昇圧物質である NAD および AD の排泄量を有意に減少させた。これらの化合物は，交感神経線維の終末から分泌され，再利用のために再取り込みされるものの，一部は血液中に移動し，最終的に尿中に排泄される。そのため，NAD および AD 排泄量の低下は，交感神経活動の低下を示唆しており，ナスの経口投与による抗高血圧作用のメカニズムには交感神経活動の抑制が関与している可能性がある。

抗高血圧作用を有する食品機能性成分の作用メカニズムの一つに，生体のレニン-アンジオテンシン系の昇圧物質であるアンジオテンシン II (Ang II) を産生するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を阻害するものがある。ACE 阻害活性を有するイワシ由来のペプチドを SHR に経口投与した報告では，イワシ由来 ACE 阻害画分が 10 mg/kg BW 用量の経口投与で血圧低下作用を示した [26]。本研究では，反復経口投与試験における SHR へのナス乾燥粉末の投与量は一日当たりわずか 0.821 mg/kg BW であり，体重 60 kg の成人の有効量は，Kleiber の法則 [27] に基づいて，ナス乾燥粉末 13.1 mg/日と推定される。我が国では，一人当たり年間平均 11.1 本の生鮮ナス (90 g/本として) を消費すると試算される [28]。1 日当たりの消費量としては生鮮ナス 2.7 g に相当する。本研究の乾燥収率からナス乾燥粉末量に換算すると 164~175 mg/日である。このことは日常の食生活においてナスの摂食による抗高血圧作用を享受している可能性を示す。

ACh は生体内ではコリンエステラーゼにより速やかに分解すると考えられており，経口投与による ACh の生理活性は調査されてこなかった。また，野菜類を含む植物体における ACh の研究は，植物細胞機能の調節など植物生理学的な観点からのみ行われてきた [29]。本研究結果は少量のナス粉末の経口投与が SHR に降圧効果をもたらすことを示し，その作用メカニズムは，経口摂取したナス中の ACh が交感神経活動を抑制することで交感神経系の昇圧物質であるカテコールアミンの放出を低下させるものであることを示唆している。

## 第二章 経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用メカニズム調査[30]

第一章では、ACh 高含有野菜であるナスの摂取による抗高血圧作用メカニズムを推定するために、SHR に  $10^{-8}$  mol/kg BW の ACh を含むナス乾燥粉末を反復経口投与し、血圧と交感神経系の昇圧物質であるカテコールアミン排泄量が低下することを明らかにした。この作用の関与成分は ACh であると推察され、ナス乾燥粉末中の ACh は標準試薬の ACh と同様に M3mAChR に対する活性を示した。よって、経口投与された ACh が、M3mAChR を介して交感神経活動を抑制し、抗高血圧作用を示す可能性がある。しかし、実際の交感神経活動の変化などの詳細は不明である。本研究では経口投与 ACh の生体への抗高血圧作用メカニズムの解明を目的とした。

ACh を経口投与した後の交感神経活動の動態を評価するには、生体の交感神経活動を直接測定する必要があり、本研究ではテレメトリー法を採用した。テレメトリー法では、意識のある自由行動下のラットの交感神経活動と血圧の継続的な測定が可能である。麻酔状態と意識状態での交感神経活動の動態は異なるため[31]、食品成分による交感神経活動への影響調査には意識のあるラットを用いることが望ましい。本研究では、経口投与 ACh による交感神経活動への影響を評価するために、SHR の腎交感神経活動と腰部交感神経活動を測定対象とした。交感神経活動の亢進は、神経終末からの NAD の分泌を、副腎髄質からの NAD および AD の分泌を促進し、血管や腎臓などの組織に作用することで血圧の上昇が引き起こされる。本研究では、交感神経活動の指標として NAD および AD の尿中排泄量も測定した。

経口投与 ACh の作用メカニズムを考察するためには、作用点および吸収動態も明らかにする必要がある。多くの食品機能性成分では、体内に吸収され全身循環に移行した後特定の組織で作用を発揮すると考えられている。一方で ACh は第四級アルキルアンモニウム構造によるイオン性により、吸収性が低いと予想される。本研究では、経口投与 ACh の吸収動態を正確に調査するため、安定同位体標識 ACh (d9-ACh, *N,N,N*-trimethyl-d9-acetylcholine) を門脈カニューレーション手術した SHR に経口投与し、

門脈血中の d9-ACh 濃度とその加水分解生成物である d9-コリン (*N,N,N*-trimethyl-d9-choline) 濃度を LC-MS/MS により測定した。また，経口投与 ACh の抗高血圧作用への M3mAChR の関与を調査するために，SHR への M3mAChR アンタゴニストと ACh の共投与による受容体阻害試験を，迷走神経系の関与を調査するために迷走神経を切断した SHR への ACh の経口投与試験を行った。これらの結果を統合し，経口投与 ACh の作用経路について考察した。

## 試薬および方法

### 1. 試薬

超純水は超純水製造装置 (sartorius arium611, Sartorius Co., ドイツ) により製造した。塩化 ACh は関東化学株式会社 (東京) より購入した。4-DAMP は Enzo Life Sciences Inc. (米国) より購入した。日本薬局方注射用ベンジルペニシリンカリウムは Meiji Seika ファルマ株式会社 (東京) より購入した。エスマールは株式会社中山技術研究所 (京都) より購入した。殺菌消毒剤 5 % ビビテン液は大日本住友製薬株式会社 (大阪) より購入した。軟組織接合用接着剤アロンアルファ「三共」は第一三共株式会社 (東京) より購入した。生理食塩液「ヒカリ」は光製薬株式会社 (東京) より購入した。外用消毒剤イソジンゲル 10% は塩野義製薬株式会社 (大阪) より購入した。ヘパリンナトリウムはエイワイファーマ株式会社 (東京) より購入した。シリコン接着剤 (Kwik-Cast) は株式会社フィジオテック (東京) より購入した。生体用接着剤アロンアルファ A は第一三共株式会社 (東京) より購入した。イソフルラン, ケトプロフェンは富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。ペントバルビタールナトリウム, メタノール, アセトニトリル, ギ酸, 5 mol/L 塩酸, 水酸化ナトリウム, 酢酸, HEPES, グリセリンはナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。DL-AD, 酒石酸水素 L-NAD 一水和物, イソプロテレノール塩酸塩は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。

### 2. 実験動物

試験には日本チャールスリバー株式会社 (神奈川) より購入した雄性 SHR/NCr1Cr1j を用いた。搬入後の SHR はプラスチックゲージで飼育し, 室温は  $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ , 湿度は  $50 \pm 20\%$ , 明暗周期は 12 時間 (明期 6 時 00 分 ~ 18 時 00 分) に設定した。固形飼料 (MF; 日本チャールスリバー株式会社, 神奈川) および水道水は自由摂取とした。すべての動物試験は信州大学農学部動物実験指針に従って行った。



### 3. テレメトリー法

テレメトリーシステムは動脈圧測定用圧力トランスデューサーおよび神経活動測定用電極付き送信機(TRM56SP, KAHA Sciences Ltd., ニュージーランド), スマートパッド受信器(TR180, Millar Inc., 米国), コンフィグレーター(TR190, Millar Inc., 米国), 受信シグナル解析装置 (PowerLab 16/35, ADInstruments, オーストラリア), 波形解析ソフト(LabChart Pro v8.0.5, ADInstruments, オーストラリア)により構成した。各センサにより測定された生体データは, 試験動物の腹腔内に留置した送信機を介してスマートパッド受信器に無線送信され, 受信シグナル解析装置を介してパソコン上にリアルタイムで記録される。

### 4. テレメトリー法による経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの血圧および交感神経活動に与える急性影響の評価

#### 4-1. テレメトリーセンサ埋込手術

SHR へのテレメトリーセンサ埋込手術は, イソフルランおよびペントバルビタール併用麻酔下で行った。イソフルラン濃度 3.5%で麻酔導入後, ペントバルビタールナトリウム溶液 15 mg/kg BW を腹腔内投与し, 手術中はイソフルラン濃度 1.0%により麻酔状態を維持した。開腹後, 血圧センサを右大腿動脈から腹部大動脈に挿入し, 糸で止血, 固定した。送信機本体は腹腔内に留置した。腎交感神経は, 左後腹膜切開後, 腎交感神経を剥離し, 測定用電極装着後シリコン接着剤で固定した。腰部交感神経は, 送信機本体留置前に腰部交感神経を剥離し, 測定用電極を装着後に同様に固定した。手術中は, 血圧および交感神経活動をモニタリングし, ヒートパッドを用いて体温を 36.5°C に維持した。術後はペニシリン 200,000 U/kg BW およびケトプロフェン 5.0 mg/kg BW を皮下注射した, 縫合部にはイソジンゲルを塗布した。なお, 腎交感神経活動および腰部交感神経活動の測定は異なる個体で実施した。

#### 4-2. 血圧と交感神経活動の測定

雄性 14~16 週齢の SHR に対してテレメトリーセンサ埋込手術を行い、プラスチックゲージで個別飼育し、1 日以上の回復期間を設け単回経口投与試験に供した。群構成は対照群（純水投与, n=6）、ACh 群（ $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=6）とした。投与は暗期（活動期）開始時である 18 時に投与試料溶液を入れた微量飲水量測定用給水瓶を用いて自発飲水させ、投与前 1 時間から投与後 12 時間の交感神経活動電位および動脈圧値をサンプリングレート 1,000 Hz で記録し解析に用いた。ただし、投与前後 15 分間は試験者の出入りによる影響や試料の飲水行動に伴う測定値の変動を考慮し解析から除外した。動脈圧波形および交感神経活動の解析には波形解析ソフト (LabChart Pro v8.0.5, ADInstruments, オーストラリア) を使用した。血圧は動脈圧波形のトップを収縮期血圧、ボトムを拡張期血圧として検出した。交感神経活動は 50 Hz のハイパスフィルターをかけ、20 ms の時定数積分を行った波形について、1 分毎に算出した曲線下面積値を解析に使用した。投与前 45 分間（17 時 00 分~17 時 45 分）の値を基準として投与後の変動値を算出した。送信機の通信障害等の影響による異常値はデータから除外した。

#### 5. 経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの昇圧物質に与える急性影響の評価

雄性 13 週齢の SHR を代謝ゲージで個別飼育し、1 週間の順化飼育後に試験に供した。群構成は対照群（純水投与, n=6）、ACh 投与群（ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=6）とした。投与は、活動期開始時に胃ゾンデを用いて行い、投与後 24 時間の尿を採取した。採尿時にはカテコールアミンの分解を防ぐため、あらかじめ採尿容器に 5 mol/L 塩酸 1 mL を添加した。得られた尿サンプルについて尿量を記録し、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

#### 6. テレメトリー法によるアセチルコリンの反復経口投与が高血圧自然発症ラットの血圧および交感神経活動に与える慢性影響の評価

雄性 11 週齢の SHR に血圧および腎交感神経活動を測定するためのテレメトリーセンサ埋込手術を行い、1 週間を回復期間とし、その後反復経口投与を開始した。試験群として対照群(純水投与, n=6), ACh 群(ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=6)を設定した。毎日 17 時に絶水し、18 時に投与試料溶液を入れた微量飲水測定用給水瓶を用いた自発飲水により 30 日間毎日反復経口投与を行った。この間、動脈圧および腎交感神経活動電位を無麻酔、無拘束下で 24 時間記録した。試験者の出入りや試料の飲水行動による生体データへの影響を除くために、投与前後 30 分のデータを除外した。動脈圧波形および腎交感神経活動の解析には波形解析ソフト(LabChart Pro v8.0.5, ADInstruments, オーストラリア)を使用した。血圧は単回経口投与試験と同様に収縮期血圧と拡張期血圧を検出した後、解析対象の 23 時間分の各平均値を 1 日の値として算出した。腎交感神経活動はスパイクとして検出する閾値を 5  $\mu$ V に設定し、解析対象の 23 時間分のデータについて均等に 8 分割した 2.9 時間ごとのスパイク数を算出し、この平均値を 1 日の値とした。

#### 7. アセチルコリンの反復経口投与が高血圧自然発症ラットの昇圧物質に与える慢性影響の評価

雄性 8 週齢の SHR を代謝ケージで個別飼育し、1 週間の順化飼育後、反復経口投与を開始した。試験群は対照群(純水投与, n=6)および ACh 群(ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=6)を設定した。投与は、毎日 18 時に胃ゾンデを用いて 30 日間の反復経口投与を行った。投与開始の前日および投与開始後 9, 19, 29 日目に 18 時から 24 時間分の尿を採取した。カテコールアミン類の分解を防ぐため、5 mol/L 塩酸 1 mL をあらかじめ加えた採尿容器により行い、尿量を測定後、カテコールアミン測定まで $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。30 日目にラットをイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。血液は BD Vacutainer K<sub>2</sub> EDTA 採血管(BD Biosciences, 米国)に回収し、転倒混和した後、直ちに遠心分離(1,500 $\times$ g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 分)を行い血漿を得た。血漿は成分測定まで $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

### 7-1. 尿中カテコールアミン測定

反復経口投与開始の前日および開始後 9, 19, 29 日目の 24 時間分の尿試料中に含まれる NAD および AD 量を LC-MS/MS (HPLC : Acquity UPLC, MS : Quattro Micro API, Waters Co., 米国) により測定した。尿試料を解凍した後, 遠心分離 (5,000×g, 4°C, 3分) し, RephiQuik Syringe Filter (13 mm, 0.45 μm, RephiLe Bioscience Ltd., 米国) によりろ過し, 分析サンプルとした。分離カラムには YMC-Triart PFP (5 μm, 4.6×250 mm, YMC CO., LTD., 京都) に Triart PFP ガードカラム (5 μm, 10×4.0 mm, YMC CO., LTD., 京都) を連結して用いた。移動相は 25 mmol/L ギ酸-15%(v/v)メタノール含有水を用いた。流速は 0.50 mL/min, 分離温度は 40°C, 注入量は 50 μL とした。MS でのイオン化およびイオン検出は, エレクトロスプレーイオン化法のポジティブモード (ESI (+)) および多重反応モニタリング (MRM) モードで行った。カテコールアミン (NAD, AD) を検出対象とし, 同時定量した。キャピラリー電圧は 3.5 kV, ソース温度は 120°C, デソルベーション温度は 350°C, N<sub>2</sub>ガス流量 (コーン) は 50 L/hr, N<sub>2</sub>ガス流量 (デソルベーション) は 600 L/hr, コーン電圧およびコリジョン電圧はそれぞれ, AD : 25 V, 20 eV, NAD : 25 V, 15 eV とした。検出イオンとして設定した *m/z* は, 以下の通りである。AD : *m/z* 166.04→56.79, NAD : *m/z* 152.00→106.86。測定対象の化合物の標準試料を溶出溶媒で溶解したものを標準溶液として分析し, 作成した検量線から外部標準法で定量した。

### 7-2. 血漿中アンジオテンシン II の測定

血漿中 Ang II 濃度は株式会社あすか製薬メディカル (神奈川) に委託し, ラジオイムノアッセイ法 (二抗体法) により測定した。

## 8. 迷走神経切断試験

雄性 9 週齢の SHR を使用し, 迷走神経切断手術と偽手術を行った。迷走神経切断手

術として、SHR をイソフルラン麻酔下で腹部を切開し、横隔膜から胃噴門部までの食道上の迷走神経線維を切断した後、切開部を縫合した。偽手術として、SHR をイソフルラン麻酔下で腹部を切開し、迷走神経の位置を確認後、迷走神経線維の切断は行わずに切開部を縫合した。縫合部にイソジンゲルを塗布し、術後はペニシリン 200,000 U/kg BW およびケトプロフェン 5.0 mg/kg BW を皮下注射した。術後 1 週間を回復期間とし、ACh の単回経口投与試験に供した。ACh 溶液を  $10^{-8}$  mol/kg BW の用量で、迷走神経切断手術 SHR（迷走神経切断群, n=3）および偽手術 SHR（偽手術群, n=3）に胃ゾンデを用いて単回経口投与した。投与直前および投与 3, 6, 9, 24 時間後の血圧（収縮期, 拡張期）をテイルカフ法（BP-98A, 株式会社ソフトロン, 東京）にて測定した。

#### 9. M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害試験

ACh 受容体阻害剤として、ムスカリン性 ACh 受容体の中でも M3 タイプの受容体を選択的に阻害する 4-DAMP を使用した。雄性 9 週齢の SHR を用いて、ACh 群 (n=6), 4-DAMP 群 (n=6), 共投与群 (n=6) の 3 群を設定した。ACh および 4-DAMP 投与量はラット 1 匹あたり  $10^{-8}$  mol/kg BW とした。各投与物は純水に溶解して胃ゾンデを用いて投与した。共投与群では ACh を投与する 10 分前に 4-DAMP を経口投与した。投与直前および経口投与後 3, 6, 9, 24 時間後の血圧（収縮期, 拡張期）をテイルカフ法（BP-98A, 株式会社ソフトロン, 東京）により測定した。

#### 10. 安定同位体標識アセチルコリン経口投与試験

雄性 12~13 週齢の SHR に門脈カニューレーション手術を行った。イソフルラン麻酔下で開腹後、門脈周囲の脂肪を除去し、24 ゲージ注射針で門脈を穿刺した。速やかに 25 cm 長のポリウレタン製カニューレーションチューブ（MRE025, Braintree Scientific, Inc., 米国）を挿入し、生体用接着剤を塗布して固定した。カニューレーションの採血口は皮下を通じて背部から露出させた。切開部を縫合し、縫合部にイソジンゲルを塗布した。術後はペニシリン 200,000 U/kg BW およびケトプロフェン 5.0 mg/kg BW を皮

下注射した。カテーテルの充填剤として、200 Uヘパリン含有グリセリン/生理食塩水混合溶液を使用し、血栓防止のために2日に一度フラッシングを実施した。1週間の回復期間の後、12時間絶食した後、安定同位体標識 ACh (d9-ACh) を  $10^{-6}$  mol/kg BW (n=5) の用量で胃ゾンデにより経口投与した。対照群 (n=6) には純水を経口投与した。投与前および投与 0.25, 1, 3, 6, および 9 時間後にカテーテルを通して門脈血を 400  $\mu$ L ずつ採取した。採血後、分解酵素の不活性化と除タンパクのために 400  $\mu$ L の 1.6%過塩素酸を直ちにに加え、混和し、遠心分離 (1,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 15 分) して上清を採取した。上清 600  $\mu$ L に内部標準 (EN) 溶液と 1.0 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を添加し中性にし、弱酸性陽イオン交換固相抽出カートリッジ (Inertsep CBA 100 mg/mL, ジーエルサイエンス株式会社, 東京) に添加した。純水で洗浄した後に、500  $\mu$ L の 1.0 mol/L 塩酸による溶出液を採取し、分析溶媒で 1.0 mL に定容し分析サンプルとした。LC-2040c3d および LCMS-8045 (株式会社島津製作所, 京都) で構成された LC-MS/MS を使用し、d9-ACh および d9-ACh の加水分解物である d9-コリンを定量した。分析条件は以下の通り。カラム : YMC-Triart PFP (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm, YMC CO., LTD., 京都)。移動相 : 0.010% (v/v) ギ酸-50% (v/v) メタノール ; 流速 : 0.50 mL/min ; 注入量 : 10  $\mu$ L ; 分離温度 : 40 $^{\circ}$ C ; イオン化モード : ESI (+) ; 分析モード : MRM ; 検出イオン ( $m/z$ ) : 155.2 $\rightarrow$ 69.20 (d9-ACh), 113.2 $\rightarrow$ 69.20 (d9-コリン), 187.3 $\rightarrow$ 128.15 (EN) ; Q1 Preload bias (V) : -11.0 (d9-ACh), -21.0 (d9-コリン), -13.0 (EN) ; コリジョンエネルギー (V) : -13.0 (d9-ACh), -22.0 (d9-コリン), -14.0 (EN) ; Q3 Preload bias (V) : -29.0 (d9-ACh), -27.0 (d9-コリン), -24.0 (EN)。各化合物は、既報[18]の手順と同様に標準添加法により定量し、定量値は内部標準物質 (EN) の回収率で補正した。

## 1.1. 統計分析

結果は平均 $\pm$ 標準誤差で表した。反復経口投与試験の腎交感神経活動、カテコールアミン排泄量、および血漿中 Ang II 濃度、単回経口投与試験でのカテコールアミン排

泄量，迷走神経切断試験での血圧変化，および血中 d9-ACh と d9-コリン濃度についての有意差検定は Welch の両側 t 検定により実施した．反復経口投与試験における血圧，腎交感神経活動およびカテコールアミン排泄量の統計分析は，投与期間による作用の変化を考察するためにデータポイントごとに実施した．単回経口投与試験では，Mann-Whitney の U 検定により，群間の血圧，腎交感神経活動および腰部交感神経活動の変化量を比較した．受容体阻害試験における血圧変化の多重比較は，一元配置分散分析後の Turkey の検定により評価した．全ての統計解析において  $p$  値が 0.05 未満の場合に統計的に有意差があると判定した．

## 結果

### 1. テレメトリー法による経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの血圧および交感神経活動に与える急性影響の評価

#### 1-1. 血圧と腰部交感神経活動

ACh ( $10^{-8}$  mol/kg BW) 単回経口投与後の SHR の血圧変化量および腰部交感神経活動変化量のデータを図 4 に示した。図の左側に示した、1 秒ごとに各測定項目の変化量の平均値を算出したチャートから、対照群に対して ACh 群での収縮期血圧、拡張期血圧および腰部交感神経活動の低下が認められた。各項目について投与開始時点から投与 12 時間後まで 3 時間ごとの平均値を個体別に算出し、群ごとに全ての値を用いて箱ひげ図を作成した。対照群と比較して、ACh 群では収縮期血圧変化量、拡張期血圧変化量および腰部交感神経活動変化量が有意な低値を示した。



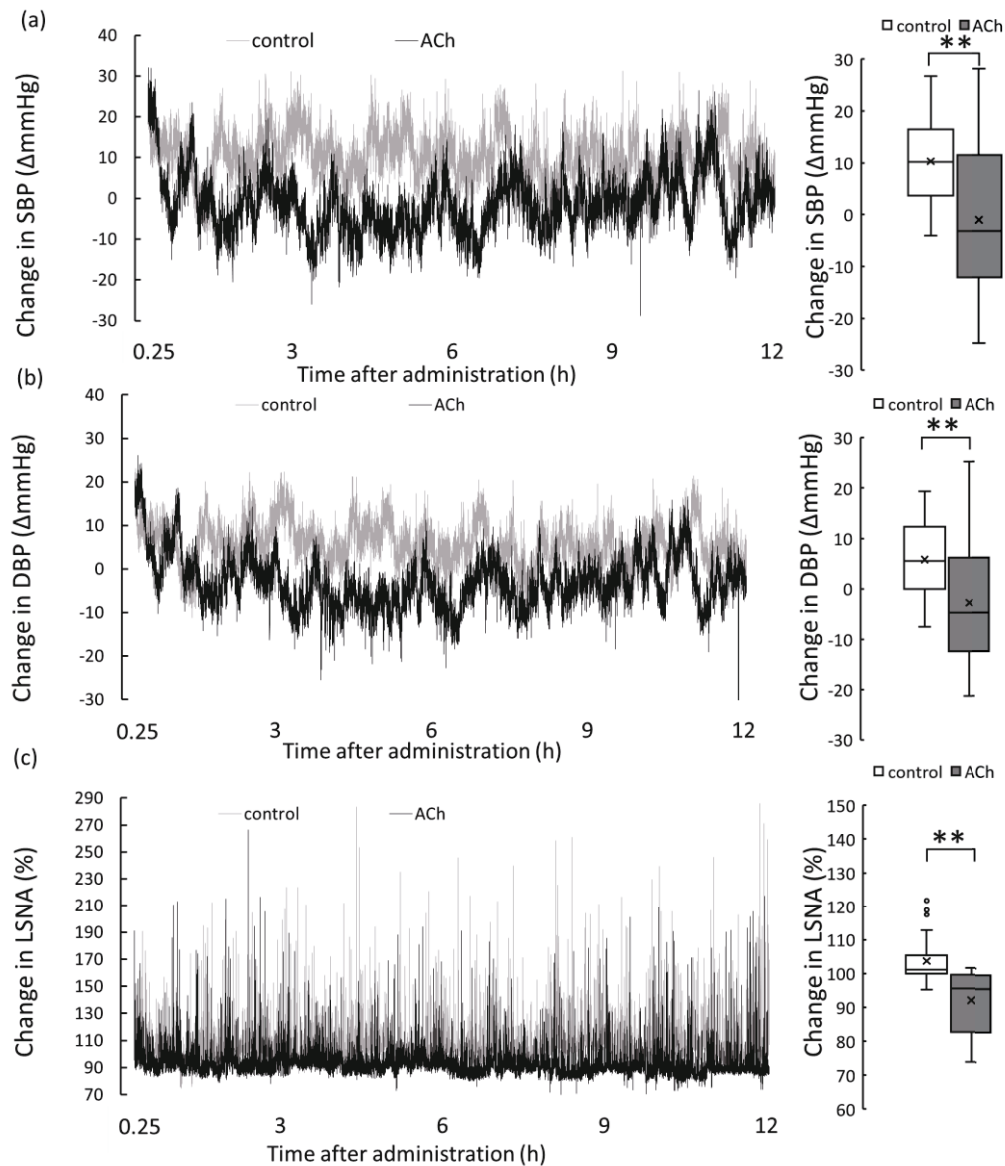


図4. 経口投与アセチルコリン (ACh) によるテレメトリーセンサ埋め込み高血圧自然発症ラットの血圧および腰部交感神経活動 (LSNA) の変化. (a)収縮期血圧 (SBP) 変化, (b)拡張期血圧 (DBP) 変化, (c)LSNA 変化. 灰色, 対照群 (純水投与, n=6); 黒色, ACh 群 (ACh $10^{-8}$  mol/kg 体重 投与, n=6); □, 対照群, ■, ACh 群. \*\* $p < 0.01$ .

## 1 - 2. 血圧と腎交感神経活動

ACh ( $10^{-8}$  mol/kg BW) 単回経口投与後の SHR の血圧変化量および腎交感神経活動変化量のデータを図 5 に示した。図の左側に示した、1 秒ごとに各測定項目の変化量の平均値を算出したチャートから、対照群に対して ACh 群での収縮期血圧、拡張期血圧の低下が認められた。各項目について投与開始時点から投与 12 時間後まで 3 時間ごとの平均値を個別別に算出し、群ごとに全ての値を用いて箱ひげ図を作成した。対照群と比較して、ACh 群では収縮期血圧変化量、拡張期血圧変化量が有意な低値を示した。しかし、腎交感神経活動に対照群と ACh 群の間で有意な差は見られなかった。

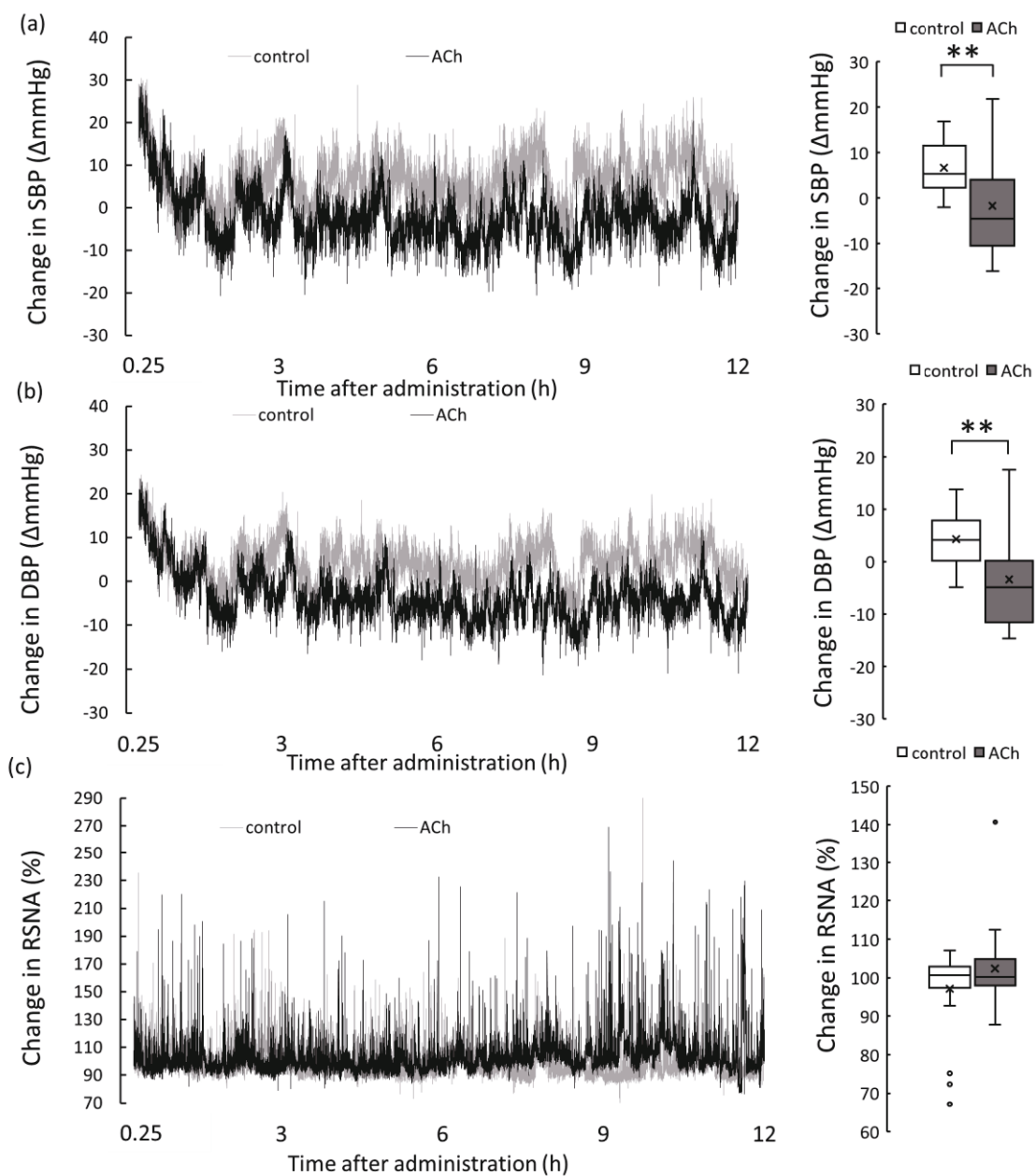


図 5. 経口投与アセチルコリン (ACh) によるテレメトリーセンサ埋め込み高血圧自然発症ラットの血圧および腎交感神経活動 (RSNA) の変化. (a)収縮期血圧 (SBP) 変化, (b)拡張期血圧 (DBP) 変化, (c)RSNA 変化. 灰色, 対照群 (純水投与, n=6); 黒色, ACh 群 (ACh $10^{-8}$  mol/kg 体重 投与, n=6); □, 対照群, ■, ACh 群. \*\* $p < 0.01$ .

## 2. 経口投与アセチルコリンが高血圧自然発症ラットの昇圧物質に与える急性影響の評価

代謝ケージで飼育した SHR に ACh ( $10^{-8}$  mol/kg BW) を単回経口投与した後の 24 時間分の尿試料についてカテコールアミン量を測定した結果を図 6 に示す。AD 量に群間の有意な差はなかったが、NAD 量は ACh 群で対照群よりも有意な低値を示した。

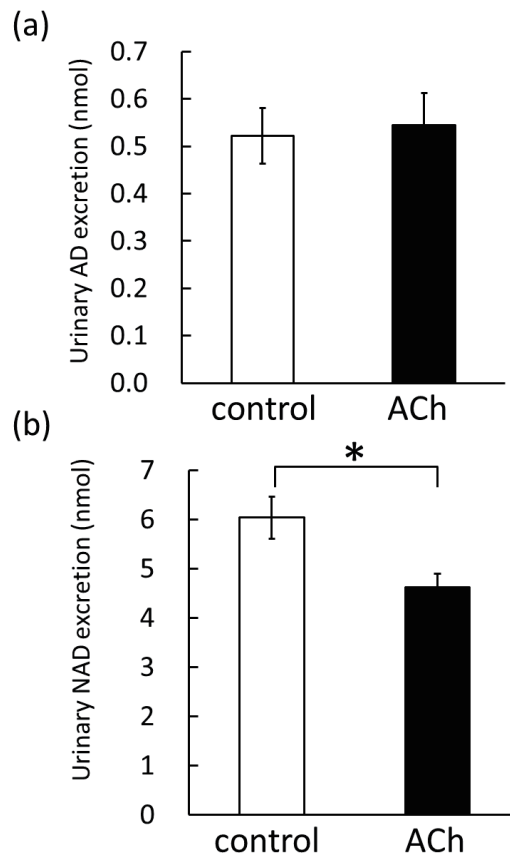


図 6. アセチルコリン (ACh) 単回経口投与による高血圧自然発症ラットの 24 時間尿中カテコールアミン排泄量の変化. (a) アドレナリン (AD) 排泄量, (b) ノルアドレナリン (NAD) 排泄量. □, 対照群 (純水投与, n=6); ■, ACh 群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg 体重投与, n=6). \* $p<0.05$ .

### 3. テレメトリー法によるアセチルコリンの反復経口投与が高血圧自然発症ラットの血圧および交感神経活動に与える慢性影響の評価

テレメトリーセンサを留置した SHR に ACh ( $10^{-8}$  mol/kg BW) を 30 日間毎日反復経口投与した血圧変化, 腎交感神経活動変化の結果を図 7 に示す. それぞれの変化は投与開始前日を基準とした. 収縮期血圧変化および拡張期血圧変化は, ACh 群で投与開始 7 日目から 30 日目まで対照群に対する有意な低値を継続的に示した. 腎交感神経活動は投与 7 日目までは群間に差がないものの, ACh 群では 8 日目以降から低下傾向を示し, 投与 11 日目以降から 30 日目まで対照群と比較して有意な低値を継続的に示した.

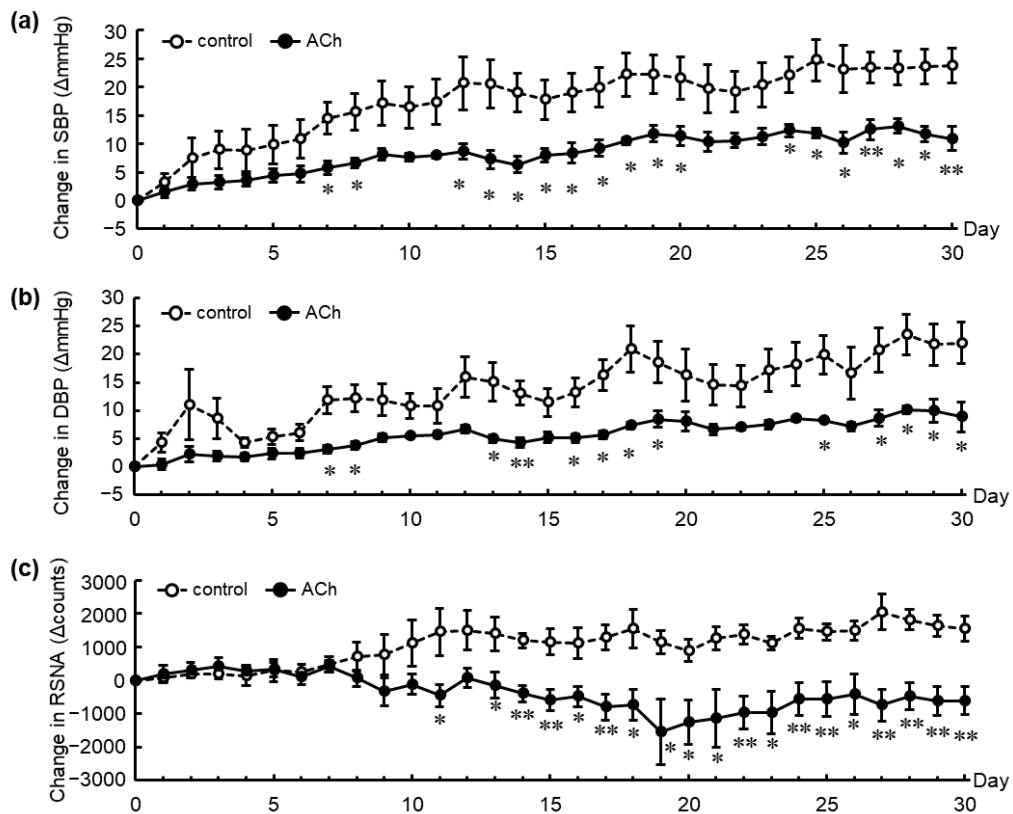


図7. アセチルコリン (ACh) の反復経口投与によるテレメトリーセンサ埋め込み高血圧自然発症ラットの血圧および腎交感神経活動 (RSNA) の変化. (a)収縮期血圧 (SBP) 変化, (b)拡張期血圧 (DBP) 変化, (c)RSNA 変化. ○, 対照群 (純水投与, n=6) ; ●, ACh 群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg 体重 投与, n=6). \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$ .

#### 4. アセチルコリンの反復経口投与が高血圧自然発症ラットの昇圧物質に与える慢性影響の評価

代謝ケージで飼育した SHR に ACh ( $10^{-8}$  mol/kg BW) を 30 日間毎日反復経口投与し、生体の昇圧物質を測定した結果を図 8 に示す。尿中カテコールアミン量は投与開始前日からの変動値を算出した。尿中の AD 排泄量は試験期間を通して群間に有意な差はなかった。NAD 排泄量は、投与開始後 19 日目および 29 日目に ACh 群で対照群に対して有意な低値を示した。試験終了時（投与 30 日目）に採取した血漿中の Ang II 濃度は、ACh 群で有意な低値を示した。

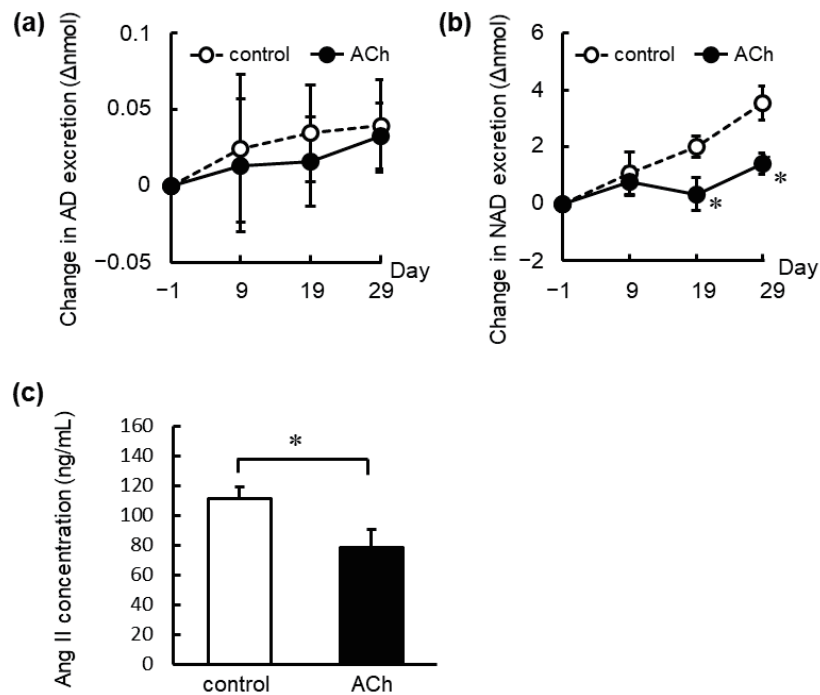


図 8. アセチルコリン (ACh) の反復経口投与が高血圧自然発症ラットの昇圧物質に与える影響. (a)尿中アドレナリン (AD), (b)尿中ノルアドレナリン (NAD) 排泄量の投与開始前日に対する変化, (c) 血漿中アンジオテンシン II (Ang II) 濃度. ○および□, 対照群 (純水投与, 各 n=6); ●および■, ACh 群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg 体重 投与, 各 n=6). \* $p<0.05$ .

## 5. M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害試験

SHR に M3mAChR の選択的アンタゴニストである 4-DAMP あるいは ACh の単独投与および両化合物を共投与した後の血圧変化を図 9 に示す。ACh 群は 4-DAMP 群および共投与群に対して投与 6, 9 時間後に有意な血圧低下を引き起こした。しかし、4-DAMP 群と共投与群の間には血圧変化の有意な差は見られず、経口投与 ACh による血圧低下は消失した。

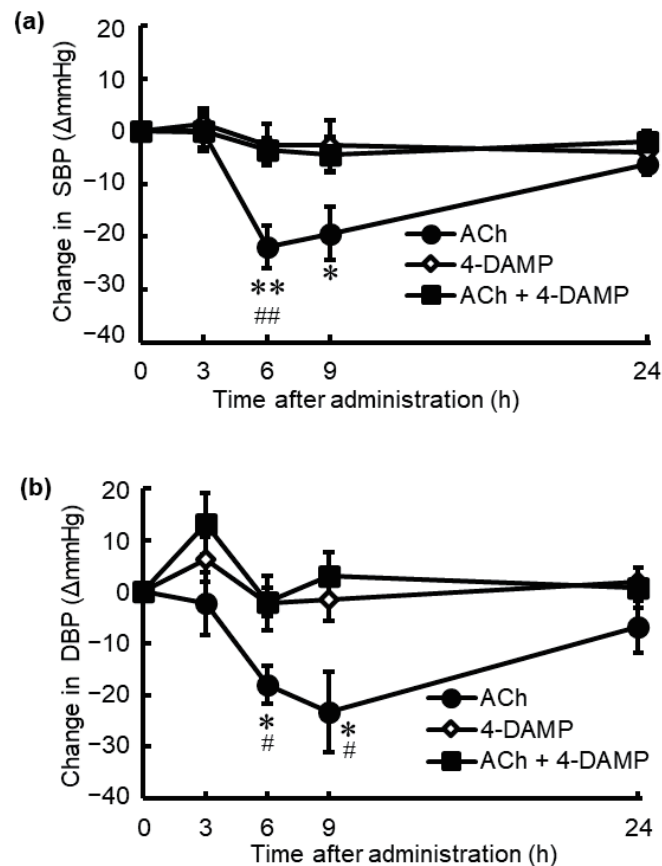


図 9. 高血圧自然発症ラットへのアセチルコリン (ACh) および M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニスト (4-DAMP : 4-[(2,2-diphenylacetyl)oxy]-1,1-dimethyl-piperidinium monoiodide) の経口投与後の血圧変化. (a)収縮期血圧 (SBP) 変化, (b)拡張期血圧 (DBP) 変化, ●, ACh 群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg 体重[BW] 投与, n=6); ◇, 4-DAMP 群 (4-DAMP  $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=6), ■, 共投与群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW, 4-DAMP  $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=6). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (vs 4-DAMP 群), # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  (vs 共投与群).



## 6. 迷走神経切断試験

迷走神経線維を胃噴門部で切断した SHR および偽手術 SHR に ACh ( $10^{-8}$  mol/kg BW) を単回経口投与した後の血圧変化を図 10 に示した. ACh の経口投与により偽手術群では迷走神経切断群に対して投与 9 時間後に有意な血圧低下を示した.

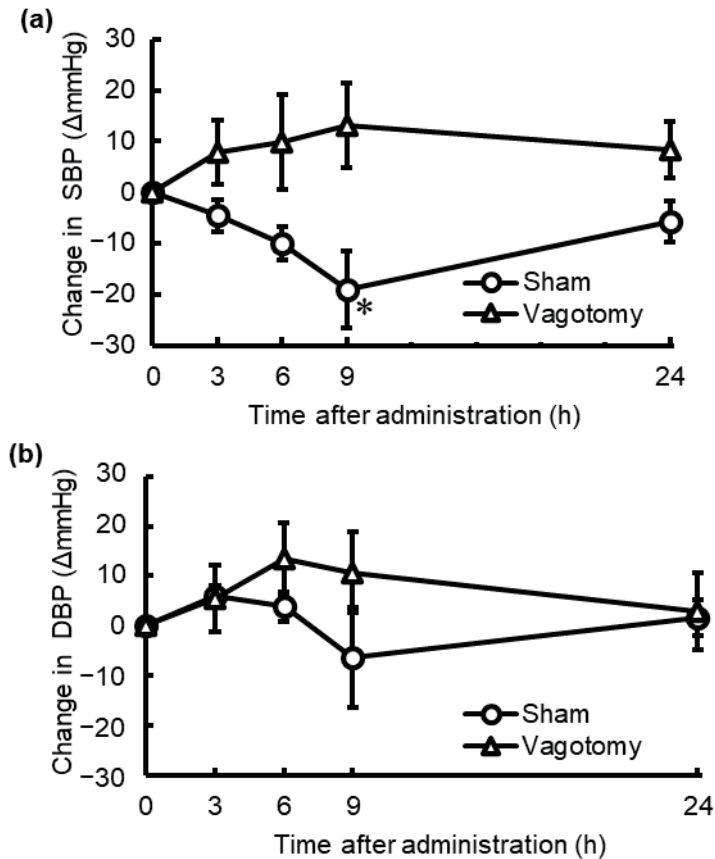


図 10. 迷走神経の切断が経口投与アセチルコリン (ACh) による高血圧自然発症ラットの血圧変化に与える影響. (a) 収縮期血圧 (SBP) 変化, (b) 拡張期血圧 (DBP) 変化,  $\Delta$ , 迷走神経切断群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg 体重[BW] 投与, n=3);  $\circ$ , 偽手術群 (ACh  $10^{-8}$  mol/kg BW 投与, n=3). \* $p < 0.05$ .

## 7. 安定同位体標識アセチルコリン経口投与試験

門脈カニューレション SHR への安定同位体標識 ACh である d9-ACh の経口投与直前および投与後の門脈血中 d9-ACh 濃度およびその加水分解物である d9-コリン濃度の測定結果を図 11 に示した。d9-ACh の門脈血中濃度に群間で有意な差はなかった。一方で d9-コリンは d9-ACh 群で増加が認められ、対照群に対して投与 15 分後および 3 時間後には有意な高値を示した。

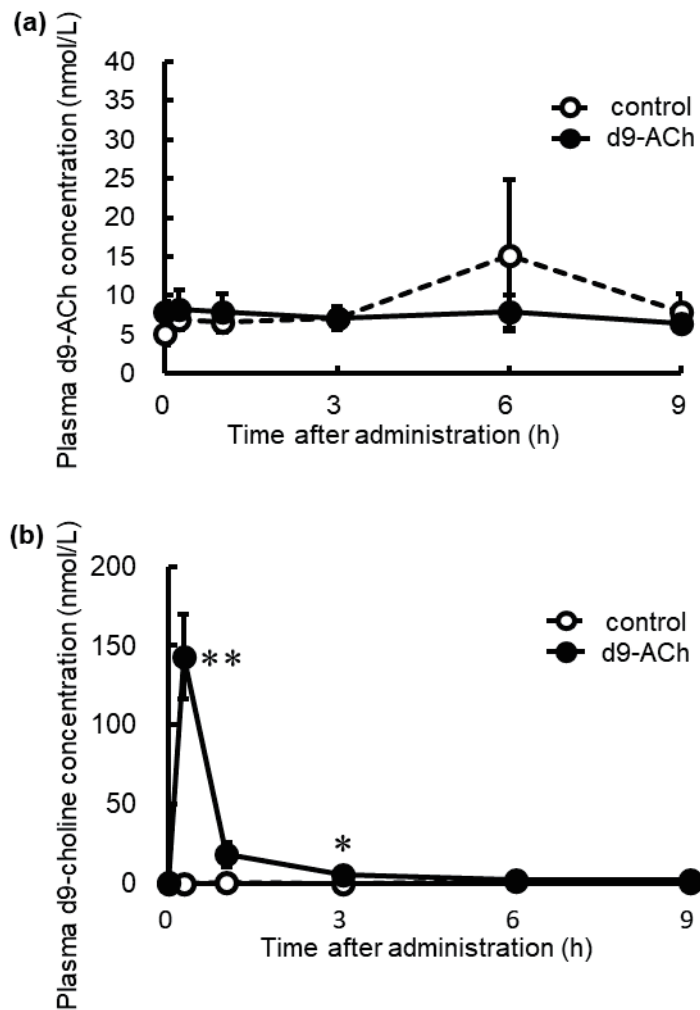


図 11. 高血圧自然発症ラットへの安定同位体標識アセチルコリン (d9-ACh) 経口投与後の門脈血中の d9-ACh および安定同位体標識コリン (d9-コリン) 濃度変化。(a) 門脈血中 d9-ACh 濃度, (b) 門脈血中 d9-コリン濃度, ○, 対照群 (純水投与, n=6); ●, d9-ACh 群 (d9-ACh  $10^{-6}$  mol/kg 体重 投与, n=5). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

## 考察

本研究では、自由行動下の SHR への ACh の反復経口投与が交感神経活動の低下とともに、慢性的な血圧上昇の抑制を引き起こした。またこれらの効果は単回経口投与でも急性の変化として生じた。さらに、経口投与された ACh は門脈血中濃度増加が見られなかったこと、迷走神経切断および M3mAChR アンタゴニスト阻害剤の共投与による経口投与 ACh の抗高血圧作用の消失から、経口投与 ACh は体循環に移行せず、消化管上の M3mAChR を介して迷走神経を刺激することが示唆された。交感神経活動の抑制は、経口投与した ACh の消化管の刺激による迷走神経（求心性副交感神経）活動の増加が自律神経反射の機序を介して生じた可能性がある。つまり、経口投与 ACh の抗高血圧作用メカニズムは次のように推定された。「経口投与された ACh は消化管上の M3mAChR に作用し、求心性迷走神経（副交感神経）活動を増加させ、自律神経反射によって遠心性交感神経活動の抑制を引き起こし、昇圧性カテコールアミン放出を低下させ、抗高血圧作用を示す」。詳細なメカニズムについて以下で考察する。

求心性迷走神経の関与は、迷走神経切断 SHR における経口投与 ACh の血圧低下作用の消失に裏付けられる。交感神経活動と副交感神経活動は、自律神経反射によって拮抗的に調節されており、求心性迷走神経（副交感神経）活動の亢進は吻側延髄腹外側野における血管運動中枢活動の低下を引き起こし、遠心性交感神経活動を反射的に抑制する。SHR では、圧受容器反射などの求心性副交感神経活動の亢進による尾側延髄腹外側野を介した吻側延髄腹外側野の活動抑制機能が減弱しており、これによる遠心性交感神経活動の亢進が SHR の高血圧に寄与すると推定されている[32]。本研究では、ACh の単回経口投与は消化管を支配する求心性迷走神経活動の亢進による自律神経反射を介して腰部交感神経活動を抑制し、急性の血圧低下が引き起こされたと考えられる。

経口投与 ACh の抗高血圧作用について、交感神経活動抑制の下流のメカニズムを解明するために、交感神経系の昇圧物質である NAD および AD 排泄レベルを測定した。本研究では、単回経口投与 ACh は、腰部交感神経活動および尿中 NAD レベルを有意に低

下させた。NAD は交感神経終末から放出され、血管平滑筋上の  $\alpha$ -AD 受容体に作用し、血管収縮を引き起こして血圧を上昇させる。その後、NAD の大部分はシナプス前終末に再取り込みされるが、一部は尿中に排泄される。そのため、尿中の NAD 量は全身の交感神経活動を推定するための指標となり得る。腰部交感神経はラットの後肢半部の血管運動を支配し、末梢血管抵抗を調節することで全身の血圧調節に寄与している [33, 34]。神経節遮断薬であるヘキサメトニウムは、血中 NAD レベルを低下させ、ラットの後肢領域の末梢血管抵抗の減少により、血圧を低下させる [35]。したがって、腰部交感神経系を含む交感神経活動の抑制による NAD 放出の減少は、経口投与 ACh の急性の血圧低下作用の主要な要因であると推定される。しかしながら、ACh を単回経口投与したにもかかわらず、腎交感神経活動および尿中 AD レベルの急性の減少は見られなかった。

ACh 経口投与後の腰部交感神経活動と腎交感神経活動の急性動態の差異は、自律神経反射である圧受容器反射による血圧の恒常性維持機能によるものと考えられた。頸動脈洞および大動脈弓上に存在する圧受容器への圧力刺激の変化による、圧受容器求心性副交感神経活動の亢進または抑制は、自律神経反射により遠心性交感神経活動をそれぞれ抑制または亢進することで血圧を一定に保つ。経口投与 ACh による血圧低下は、圧受容器求心性副交感神経活動を抑制し、腎交感神経活動および腰部交感神経活動を含む遠心性交感神経の亢進を引き起こして血圧を上昇させる可能性がある。しかし、圧受容器反射機能が低下している SHR では [36]、低下した血圧を維持できるだけの交感神経活動の亢進が生じず、腰部交感神経活動の低下とそれによる血圧の低下が持続したと考えられる。腰部交感神経活動よりも圧受容器反射による調節感度が高い腎交感神経活動では [37]、より高い亢進調節を受けたため減少が見られなかったと推察される。以上のように、高血圧状態における圧受容器反射の機能障害は、経口投与 ACh が高血圧状態に対して効果的に血圧低下作用を示す原因である可能性がある。血圧が高めの人を対象とした臨床試験において、ACh を含むナス粉末の摂取による血圧低下が、血圧がより高い I 度高血圧に属する被験者でより高い効果を示した結果と一

致している [20]。AD は副腎交感神経の活動により副腎髄質から分泌されるが、腎交感神経活動と同様に圧受容器反射の影響を強く受ける副腎交感神経活動は [38]、圧受容器反射を介して経口投与 ACh の血圧低下により亢進され低下しなかったことが示唆される。そのために ACh を投与しても AD の排泄量に変化が生じなかった可能性がある。

ACh の反復経口投与試験では、腎交感神経活動は投与開始後 7 日目まで変化が見られず、単回経口投与試験と同様に圧受容器反射が腎交感神経活動の亢進をもたらしたためであると推察される。その後、腎交感神経活動は 8 日目から減少し始め、11 日目からは有意に低下したが、これは ACh の反復経口投与による血圧低下状態が持続したため、圧受容器反射による腎交感神経活動の亢進が抑制され、経口投与 ACh による腎交感神経活動の抑制作用が現れたと考えられる。尿中 NAD 量が 19 日目と 29 日目で有意に低下した結果から、ACh の反復経口投与による血圧上昇抑制には、腎交感神経を含む交感神経活動の低下による NAD 分泌の抑制も寄与していると考えられる。30 日目には ACh の反復経口投与によりレニン-アンジオテンシン系の昇圧物質である Ang II の血漿レベルが有意に低下した。レニン-アンジオテンシン系の出発物質であるレニンは、カテコールアミンによる  $\beta$  1-AD 作用によって腎臓の傍糸球体細胞から分泌される。腎除神経を行った SHR では血漿レニン活性が低下することが報告されており [39]、経口投与 ACh による腎交感神経活動の低下もレニン分泌の抑制を介して血漿 Ang II レベルの低下に寄与したと推察される。SHR では、交感神経系とレニン-アンジオテンシン系の両方が亢進していることが知られている [10, 40]。さらに、Ang II は NAD の放出を促進し、NAD の再取り込みを抑制する作用があり [41]、昇圧系間の相互作用は SHR の高血圧状態を相乗的に悪化させる原因であり得る。経口投与 ACh は、両昇圧系を抑制することで、SHR に対して効果的な抗高血圧作用を示したと考えられる。また、SHR の血圧上昇抑制やカテコールアミン排泄量の低下など、ACh の SHR への経口投与が同量の ACh を含むナス粉末を投与した場合と類似の抗高血圧作用を示したことは、ナス粉末摂取による抗高血圧作用に寄与する主要な成分が ACh であることを裏付ける結果である。

本研究では、テレメトリー法により交感神経活動を測定した。測定センサおよび送信機の体内への埋込手術には高度な技術が必要であるが、意識下の実験動物から継続的にデータを取得できる本法を用いることで、経口投与 ACh による腎交感神経活動および腰部交感神経活動への影響が明らかとなった。また、経口投与 d9-ACh の血中動態評価試験は、門脈カニューレション SHR を用いた門脈血の連続採血により実施した。門脈は吸収された物質が最初に通過する血管であり、門脈血には消化管から吸収された物質が肝臓で代謝される前の最大量が含まれているため、経口投与した物質の吸収動態を反映していると考えられる。門脈血中では d9-コリンのみ濃度増加が認められたことから、経口投与 ACh の吸収動態として、体内には吸収されず、加水分解物であるコリンとして体内に移行することが明らかとなった。

食品由来の抗高血圧成分のひとつである GABA は、体内に吸収された後に末梢神経細胞に発現する GABA<sub>B</sub> 受容体に作用し、交感神経活動および神経末梢からの NAD 分泌を抑制すると考えられている [42, 43]。しかしながら、GABA が交感神経活動に影響を与えるデータを示す報告はない。SHR に抗高血圧作用を示す経口投与 ACh の有効量は、GABA の最低有効用量 [43] の 1/291 (0.00291 mmol/kg BW) であった。経口投与 ACh の有効量が低いのは、交感神経系とレニン-アンジオテンシン系の 2 つの主要な昇圧系に対する抑制作用に起因し、SHR の高血圧状態に効果的に作用したためと考えられる。加えて、作用部位が吸収による利用度の低下を受けない消化管であること、求心性迷走神経の中でも最大の分布面積を持つ消化管を支配する神経系を介した経路が関与していることも一因として考えられる。

経口投与した ACh は加水分解物であるコリンとして吸収されるため、過度の低血圧や徐脈など、ACh の体循環での作用による副作用の可能性はない。また、コリンは食品中に広く存在する化合物であり、細胞膜の構成や脂質代謝など重要な生理機能への関与が研究されているなど、米国では必須栄養素の一つとして認められている。そのため、経口投与 ACh はコリンに代謝され体内に移行しても安全性は高いといえる。したがって、本研究で明らかにした経口投与 ACh の吸収動態は、食品成分としての ACh

の高い安全性を示している。

結論として、ACh の反復経口投与は、本態性高血圧モデルラットである SHR に対して交感神経系およびレニン-アンジオテンシン系を抑制することで抗高血圧作用を示した。テレメトリー法による意識下 SHR の交感神経活動の直接測定により、交感神経活動の抑制が作用メカニズムとして経口投与 ACh の抗高血圧作用に関与していることが明らかになった。ACh は、吸収されずに消化管を支配する求心性迷走神経を介して高血圧を改善および予防するための安全な食品機能性成分として有用である。

### 第三章 異なる血圧状態におけるラット系統間の経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用の差異の検討[44]

第一章および第二章では本態性高血圧モデルラットである SHR に対するナス粉末および ACh の経口投与による抗高血圧作用とその作用メカニズムを明らかにした。しかしながら、正常状態の血圧における経口投与 ACh の影響は明らかではない。ナスをはじめとして、様々な食品中に存在する ACh は血圧が正常の人々も日常で摂取する機会が多く、血圧状態の違いに基づく有効性の差異は、新規な抗高血圧食品成分としての ACh の安全性を確立するために調査する必要がある。そこで本研究では、正常血圧状態における経口投与 ACh の血圧への影響を明らかにすることを目的に試験を実施した。

本研究では、SHR を高血圧状態のモデルとして、WKY ラットを正常血圧状態の対照モデルとして使用した。両系統について、ACh の単回経口投与後の血圧、心拍数、およびカテコールアミン排泄量の変化を調査および比較し、系統間の差異を明らかにした。両系統は共通の親株から作出されており、SHR の高血圧は血圧調節に関連する遺伝子について WKY ラットに対する変異により引き起こされていると考えられる。そこで、SHR と WKY ラットの血圧調節に関わる遺伝子配列を比較し、血圧状態による経口投与 ACh の作用の差異の原因について考察した。



## 試薬および方法

### 1. 試薬

超純水は超純水製造装置 (sartorius arium 611, Sartorius Co., ドイツ) から製造した。メタノール, アセトニトリル, ギ酸, 5 mol/L 塩酸, 水酸化ナトリウム, 酢酸, HEPES はナカライテスク株式会社(京都) より購入した。DL-AD, 酒石酸水素 L-NAD 一水和物, イソプロテレノール塩酸塩は東京化成工業株式会社(東京) より購入した。塩化 ACh は, 関東化学株式会社(東京) より購入した。

### 2. 実験動物

日本エスエルシー株式会社(静岡) より購入した SHR/Izm または WKY/Izm を用い, 搬入後は代謝ゲージ内で飼育した。室温は  $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ , 湿度は  $50 \pm 20\%$ , 明暗周期は 12 時間(明期 7 時~19 時) に設定した。固形飼料(MF ; 日本チャールスリバー株式会社, 神奈川) および水道水は自由摂取とした。動物試験は信州大学農学部動物実験指針に従って実施した。

### 3. 経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用の系統間差異

雄性 11~13 週齢の SHR または WKY ラット各 4 匹に対し,  $10^{-7}$  mol/kg BW,  $10^{-5}$  mol/kg BW,  $10^{-3}$  mol/kg BW および純水の単回経口投与を行った。一晩絶食した後, 胃ゾンデにて各サンプルの投与を行い, 投与直前と投与 3, 6, 9, 24 時間後の血圧および心拍数をテイルカフ法 (BP-98A, 株式会社ソフトロン, 東京) で測定した。

### 4. アセチルコリン単回経口投与による尿中カテコールアミン変化の系統間差異

雄性 11 週齢の SHR および WKY 各 6 匹を代謝ケージにて 1 週間順化飼育した後, 系統ごとに ACh 群(ACh  $10^{-3}$  mol/kg BW 投与, n=6) と対照群(純水投与, n=6)に群分けした。12 週齢時に各投与物の単回経口投与を胃ゾンデにより行った。投与 6 時間後から 12 時間後までの 6 時間分の尿を採取した。採尿は, カテコールアミンの分解を防ぐため

に予め 5 mol/L 塩酸 250  $\mu$ L を添加したメスシリンダーを用いた。尿量を記録し、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

#### 5. 高血圧自然発症ラットとウィスター京都ラットにおける *Chga* 遺伝子比較

SHR/Izm と WKY/Izm の一塩基多型(SNP)については SHR 等疾患モデル共同研究会より入手した遺伝子配列情報 (各ラットから得られたシーケンスデータを, Brown Norway ラットのゲノム配列をリファレンスとしてアッセンブリされたデータ)を用いた[45]。本研究では特に, カテコールアミンの貯蔵や分泌に関与するタンパク質であるクロモグラニン A をコードする *Chga* 遺伝子について, SHR/NCr1 と WKY/NCr1 間の SNP を調査している報告[46]を参照し, 本試験で使用した SHR/Izm と WKY/Izm の該当する遺伝子領域について塩基配列の差異を確認した。

## 結果

### 1. 経口投与アセチルコリンの抗高血圧作用の系統間差異

試験に使用した WKY ラットと SHR の一般状態について測定した結果をサポーティングデータ図 S1 に示した。SHR は 9 週齢時点で同週齢の WKY ラットに対して一日中有意な血圧の高値を示した。また、11 週齢以降は SHR の体重が WKY よりも有意な低値を示す系統間の差が認められた。

SHR および WKY ラットに ACh を単回経口投与した後の血圧および心拍数の変化を図 12 に示した。SHR では ACh $10^{-5}$  mol/kg BW の投与で 3, 6 時間後に、ACh $10^{-3}$  mol/kg BW の投与で 3, 9 時間後に対照群に対して血圧が有意な低値を示した。WKY ラットでは経口投与 ACh による血圧低下作用は確認されなかった。系統間の差を比較するために、SHR で最大の血圧低下を示した投与 6 時間後の血圧変動値を棒グラフで示した。ACh $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  mol/kg BW の投与では、SHR の血圧変動値は WKY の血圧変動値に対して有意な低値を示した。

SHR では ACh 投与により心拍数が低値を示す傾向がみられ、ACh $10^{-5}$  mol/kg BW の投与で 3, 6 時間後に対照群に対して有意な低値を示した。WKY ラットでは  $10^{-5}$  mol/kg BW の投与で 3, 6, 9 時間後に対照群に対して低値を示す傾向がみられたが、有意な差はなかった。系統間の差を比較するために、投与 6 時間後の心拍数変動値を棒グラフで示した。ACh 投与による SHR の心拍数変動は WKY ラットに対して  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  mol/kg BW の投与で有意な低値を示した。

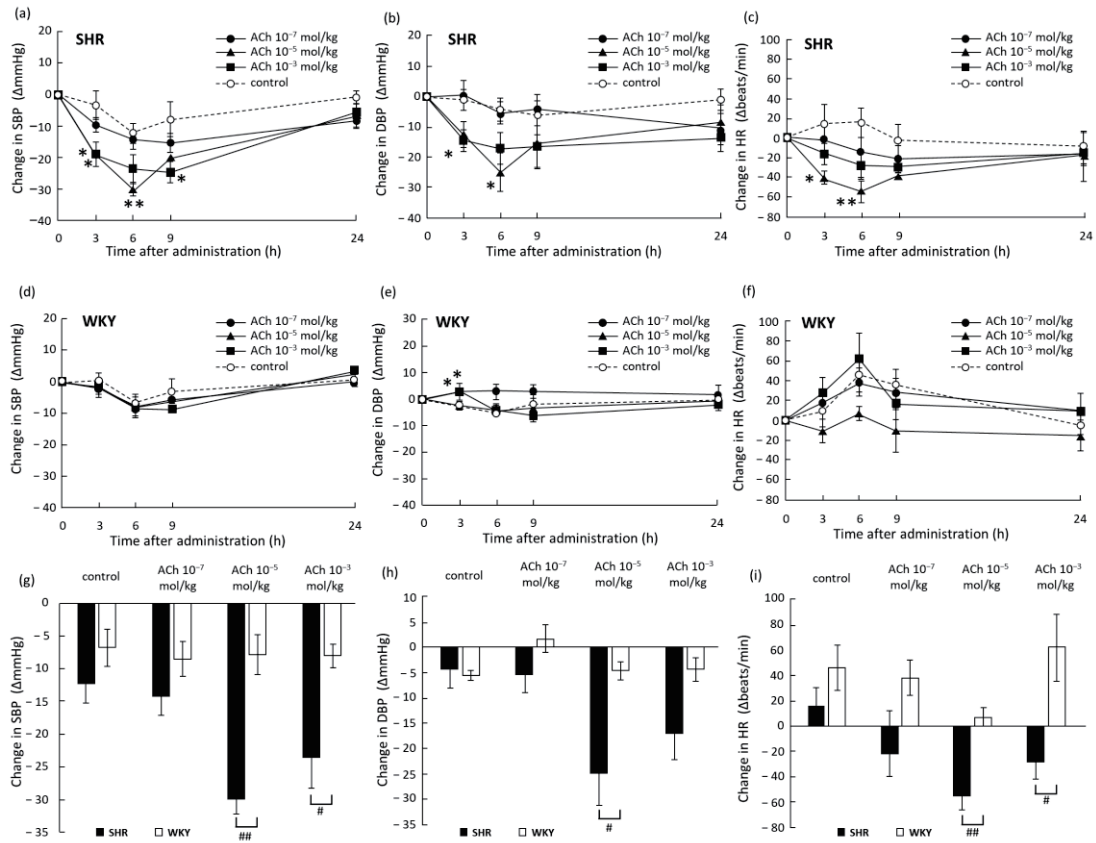


図 12. アセチルコリン (ACh) の単回経口投与による高血圧自然発症ラット (SHR) およびウィスター京都 (WKY) ラットの血圧および心拍数への影響。 (a) SHR の収縮期血圧 (SBP) 変化, (b) SHR の拡張期血圧 (DBP) 変化, (c) SHR の心拍数 (HR) 変化, (d) WKY ラットの SBP 変化, (e) WKY ラットの DBP 変化, (f) WKY ラットの HR 変化, (g) 投与 6 時間後の SBP 変化量, (h) 投与 6 時間後 DBP 変化量, (i) 投与 6 時間後の HR 変化量。  
 \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (vs 対照群), # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  (vs WKY).

## 2. アセチルコリン単回経口投与による尿中カテコールアミン変化の系統間差異

SHR および WKY ラットへの ACh ( $10^{-3}$  mol/kg BW) 単回経口投与後の尿中カテコールアミン排泄量を図 13 に示した。NAD 排泄量は対照群において SHR が WKY に対して有意に高値であった。ACh の単回経口投与により、SHR では NAD 排泄量および AD 排泄量が対照群に対して有意に低下したが、WKY ラットでは有意な差がなかった。ACh 群の系統間での比較では、AD 排泄量について、SHR が WKY ラットよりも有意な低値を示した。

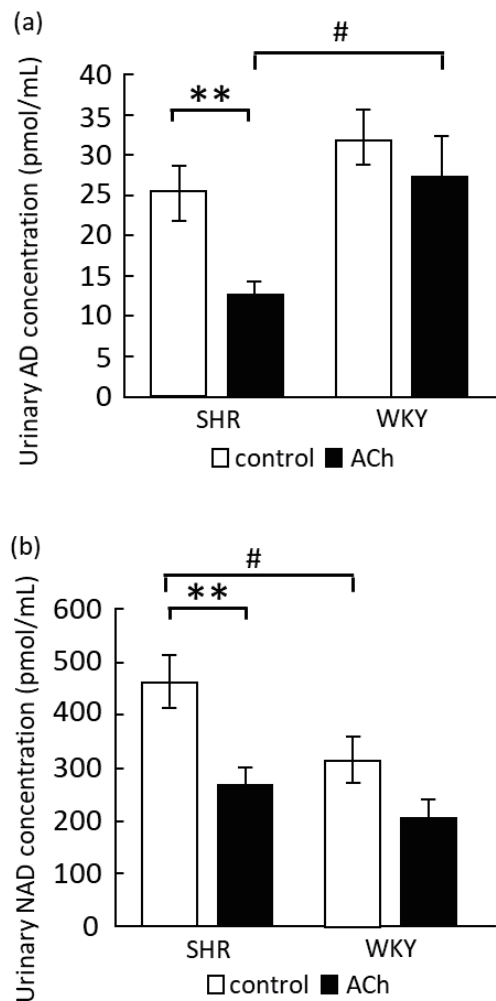


図 13. アセチルコリンの単回経口投与による高血圧自然発症ラット (SHR) およびウイスター京都 (WKY) ラットの尿中カテコールアミン排泄量に与える影響。 (a)尿中アドレナリン(AD)濃度, (b)尿中ノルアドレナリン (NAD) 濃度. □, 対照群 (純水投与, n=6) ; ■, ACh 群 (ACh  $10^{-3}$  mol/kg BW 投与, n=6) , \*\* $p < 0.01$ (vs 対照群), # $p < 0.05$  (vs WKY).

### 3. 高血圧自然発症ラットとウィスター京都ラットにおける *Chga* 遺伝子比較

クロモグラニン A をコードしている *Chga* 遺伝子 (NM 021655) の多型について Brown Norway ラット (BN), SHR/NCr1, WKY/NCr1 を対象にした調査結果[46]を以下の表 2 に示した. また, 本試験で使用したラット系統 (SHR/Izm, WKY/Izm) のシーケンス データから該当部分を抽出し比較した. WKY/Izm ラットにおいて, WKY/NCr1 にはなかつた変異が認められた (A-1600T, C-161T, C+8850T, G+11184T). WKY/Izm と SHR/Izm の系統間では以下の 2 つの変異が認められた. Exon7 では WKY/Izm に特異的な変異が認められた (C+8850T) が, アミノ酸配列の変化を伴わないサイレント変異であった. SHR/Izm に特異的な変異 (C-43T) はプロモーター領域上であった.

表 2. *Chga* 遺伝子における一塩基多型

| Strain Alleles |          |    |     |           |          |    |     |     |
|----------------|----------|----|-----|-----------|----------|----|-----|-----|
| Domain         | Izm      |    |     | NCr1 [46] |          |    |     |     |
|                | Location | BN | WKY | SHR       | Location | BN | WKY | SHR |
| Promoter       | A-1600T  | A  | T   | T         | A-1616T  | A  | A   | T   |
| Promoter       | C-161T   | C  | T   | T         | C-177T   | C  | C   | T   |
| Promoter       | C-43T    | C  | C   | T         | C-59T    | C  | C   | T   |
| Exon 7         | C+8850T  | C  | T   | C         | n/a      |    |     |     |
| Exon 8         | G+11184T | G  | T   | T         | G+11177T | G  | G   | T   |

## 考察

本研究で対照群において SHR の NAD 排泄量が WKY ラットと比較して高かったのは、SHR における交感神経活動の異常亢進によるカテコールアミン分泌の亢進によるものと推察される [10, 47]. 第一章および第二章では、経口投与 ACh の投与による SHR での抗高血圧作用は、交感神経活動の低下によるカテコールアミン分泌の抑制によって引き起こされるものと推察した. 本試験における経口投与 ACh による SHR の血圧および尿中 NAD および AD 排泄量の減少は、この抗高血圧作用メカニズムと一致する. しかしながら、WKY ラットでは ACh を経口投与したにもかかわらず血圧や尿中カテコールアミンの排泄量が低下しなかった. この原因について以下で考察する.

本研究で使用した SHR/Izm と WKY/Izm の系統間では、*Chga* 遺伝子の Exon7 領域上に塩基配列の変異が認められた. この変異はアミノ酸配列には影響を与えないサイレント変異であったため、系統間でクロモグラニン A の機能的な差異はないと考えられる. しかし、プロモーター領域に SHR に特異的な変異 (C-43T) が観察され、クロモグラニン A の発現量が系統間で異なる可能性がある. SHR/NCr1 における *Chga* 遺伝子の近位プロモーターの遺伝子変異は、SHR における交感神経活動の亢進および圧受容器反射機能の低下に関連する可能性が指摘されている [46]. また、*Chga* 遺伝子のノックアウトマウスの特徴として、野生型に比べ血圧の増加と圧受容器反射機能の低下が認められている [48, 49]. つまり、SHR/Izm においても *Chga* 遺伝子の変異がクロモグラニン A の発現量に影響を及ぼし、これを原因として WKY/Izm に比べ圧受容器反射の機能低下やこれに伴う血圧の上昇が生じている可能性がある.

ACh 群において、WKY ラットの AD 排泄量は SHR の AD 排泄量よりも有意に高かった. この差異が生じた原因として、WKY ラットでは ACh の経口投与による血圧低下に対し、元の血圧を維持するために圧受容器反射が正常に機能したことが考えられる. 第二章で推察されたように、AD の分泌を促進するための腎交感神経活動は交感神経活動の中でも圧受容器反射による調節感度が大きいいため、AD 排泄量にこのような差が見られたと考えられる. WKY ラットにおける ACh の経口投与 3 時間後の拡張期血圧の上昇は、

この圧受容器反射を原因とする可能性がある。一方で、SHR では WKY ラットに比べて圧受容器反射機能が低下しており、ACh の経口投与による血圧および心拍数の低下作用に対して元の状態を維持することができなかったことが示唆される。

本研究の結果は、経口投与 ACh による血圧低下作用は高血圧状態では生じるものの、正常血圧状態に対しては見られないことを示している。その原因として、SHR における交感神経活動の亢進および圧受容器反射機能の低下の関与が推察された。高血圧症患者において、交感神経活動と圧受容器反射機能はそれぞれ、高血圧の重症度と正あるいは負の相関を示す[50, 51]。ナス粉末を用いた臨床試験では、2.3 mg/日のナス由来 ACh の摂取による血圧改善効果は、正常高値血圧者よりも I 度高血圧者でより高く[20]、経口摂取した ACh の抗高血圧作用が血圧が高い人でより効果的であることを示唆している。したがって、ACh は正常血圧者においては摂取により血圧低下を引き起こすことがない、安全性の高い食品成分であることが期待される。

結論として、経口投与 ACh は SHR において血圧低下およびカテコールアミンレベルの低下を引き起こすが、正常血圧である WKY ラットではこれらの作用を示さなかった。交感神経活動の亢進が高血圧状態に寄与する SHR では、経口投与 ACh による交感神経性のカテコールアミン作用の抑制による血圧の低下が顕著に表れたと考えられる。さらに、この血圧低下状態は、SHR の圧受容器反射機能の低下により維持された可能性がある。ACh の経口投与による血圧低下作用が血圧状態に依存することは、日常生活におけるナスや発酵食品などの ACh を豊富に含む食品の摂取は安全であり、高血圧の予防、改善を目的とした血圧管理に有用であることを示す。



## 総括

少子高齢化が加速する我が国では、高齢者健康寿命を延伸し、医療や介護にかかる費用および労働力の削減が喫緊の課題である。特に高血圧は発症後の QoL を著しく損なう脳心血管疾患の重大な危険因子であり、これを予防および改善する社会的意義は大きい。近年はセルフヘルスケアによる生活習慣病の予防が注目されており、機能性食品の摂取はその手段の一つとして注目されている。筆者の所属研究室ではごく少量の経口摂取により血圧を改善する乳酸発酵食品を開発し、その有効成分として ACh を単離した。さらに、ACh を豊富に含む食品素材としてナスを特定し、一日当たり 2.3 mg の ACh を含むナスの摂取による血圧改善効果を臨床試験で実証し、ACh の抗高血圧食品成分としての有用性を実証してきた。しかしながら、ACh は神経伝達物質としてよく知られる一方で、体内では分解されやすいため経口摂取による作用の研究事例はなかった。そこで本研究では、抗高血圧作用を示す新規な食品機能性成分としての ACh について、経口摂取による抗高血圧作用メカニズムの解明を目的に研究を行った。

第一章では、ナス粉末の経口摂取による抗高血圧作用メカニズムを推定するために SHR にナス粉末を反復経口投与し、血圧と、生体の主要な昇圧系である交感神経系の昇圧物質であるカテコールアミン排泄量に与える影響を評価した。ナス粉末の反復投与は SHR の尿中カテコールアミン排泄量の減少とともに有意な血圧上昇の抑制を示した。また、SHR 胸部大動脈を用いた血管等尺性張力測定試験により、ナス中の ACh が標準試薬と同等の M3mAChR への活性を示すことを確認した。これらのことから、経口摂取されたナス中の ACh は、生体の M3mAChR への作用を介して、交感神経活動を抑制することで抗高血圧作用が引き起こされるものと推定された。

第二章では、テレメトリー法を用いて意識下の SHR に ACh を経口投与し、血圧および交感神経活動に与える影響について調査した。その結果、ごく少量 ( $10^{-8}$  mol/kg BW) の ACh の経口投与は血圧低下とともに交感神経活動の抑制および尿中 NAD 排泄量の低下を引き起こした。また、経口投与 ACh による血圧低下作用は、M3mAChR の選択的アンタゴニストである 4-DAMP を共投与した SHR や迷走神経を切断した SHR で消失し

た。安定同位体標識 ACh を経口投与した後の SHR の門脈血では、加水分解物であるコリンの濃度のみが増加したことから経口投与した ACh は体内に移行せずに作用を示すことが明らかとなった。これらのことから、経口投与 ACh の抗高血圧作用メカニズムとして「経口投与した ACh は消化管上の M3mAChR への作用により求心性迷走神経を刺激し、自律神経反射により遠心性交感神経活動を抑制、交感神経末梢からの NAD 分泌を抑制し抗高血圧作用を示す」が明らかとなった。

第三章では、高血圧ラットである SHR と正常血圧ラットである WKY ラットを用いて、異なる血圧状態に対する経口投与 ACh の抗高血圧作用の差異を調査した。経口投与 ACh は SHR に対しては血圧低下およびカテコールアミン低下作用を示したが、WKY ラットにはこれらの作用を示さなかった。この原因として、経口投与 ACh は SHR の高血圧状態の原因の一つである交感神経系の亢進を抑制することにより血圧低下を引き起こすこと、および SHR では血圧の恒常性を維持するための圧受容器反射機能が WKY ラットよりも低下しているために、経口投与 ACh による血圧低下が持続したことが関与していると推察された。

本研究により、ACh が少量の経口摂取で抗高血圧作用を示す食品機能性成分であることが実証された。その作用メカニズムとして体内に吸収されずに作用し、交感神経活動を抑制することが明らかとなった。生理活性物質である ACh は医薬品として、注射による局所投与としての利用は確立されているものの、食品成分として経口投与による生体への作用の有効性とその作用メカニズムを明らかにしたのは本研究が初の事例である。また、経口投与 ACh の高血圧状態に選択的な血圧低下作用は、正常な血圧状態において ACh が豊富な食品を摂取しても、過度の血圧低下を引き起こさないことを示す。これらの結果は ACh の食品成分としての高い安全性を裏付けており、ACh は日常における血圧のセルフマネジメントとして安全に高血圧を予防、改善するための食品機能性成分として有用である。ナスや発酵食品などの ACh を豊富に含む食品であれば、少量の摂取で有効用量の ACh の摂取が可能のため、ACh を関与成分とする機能性食品としての利用が期待される。

## 参考文献

1. Fujiyoshi, A., Ohkubo, T., Miura, K., Murakami, Y., Nagasawa, S. Y., Okamura, T., and Ueshima, H. Blood pressure categories and long-term risk of cardiovascular disease according to age group in Japanese men and women. *Hypertension Research*, 35, 947-953, 2012.
2. 令和2年(2020)人口動態統計月報年計(概数)の概況, 厚生労働省, 2020.
3. 令和2年(2020)版 高齢社会白書, 内閣府, 2020.
4. 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会(編), 高血圧治療ガイドライン2019, ライフサイエンス出版, 2019.
5. Ozawa, T., Iwamoto, M. Blood pressure and age. *Japanese Journal of Geriatrics*, 14, 14-20, 1977.
6. Okamoto K, and Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27, 282-93, 1963.
7. Fukuda, S., Tsuchikura, S., and Iida, H. Age-related changes in blood pressure, hematological values, concentrations of serum biochemical constituents and weights of organs in the SHR/Izm, SHRSP/Izm and WKY/Izm. *Experimental animals*, 53, 67-72, 2004.
8. Clemitson, J. R., Dixon, R. J., Haines, S., Bingham, A. J., Patel, B. R., Hall, L., Lo, M., Sassard, J., Charchar, F. J., and Samani, N. J. Genetic dissection of a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1 and gene expression analysis identifies SPON1 as a novel candidate hypertension gene. *Circ Res*, 100, 992-9, 2007.
9. Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrall, M., and Gauguier, D. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 14412-

- 14417, 2007.
10. Judy, W. V., Watanabe, A. M., Henry, D. P., Besch Jr, H. R., Murphy, W. R., & Hockel, G. M. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ. Res.*, 38, 21-29, 1976.
  11. Esler, M. D., Jennings, G. L., Johns, J., Burke, F., Little, P. J., and Leonard, P. Estimation of 'total' renal, cardiac and splanchnic sympathetic nervous tone in essential hypertension from measurements of noradrenaline release. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, 2, S123-5, 1984.
  12. Dale, H. H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 6, 147-190, 1914.
  13. Loewi, O. Navratil, E. Über hormonale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. (Mit teilung X). Über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflügers Arch ges Physiol.*, 214, 678-688, 1926.
  14. Wessler, I., and Kirkpatrick, C. Acetylcholine beyond neurons: the non - neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*, 154, 1558-1571, 2008.
  15. Horiuchi, Y. Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., Kato, T., and Kawashima, K. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.*, 72, 1745-1756, 2003.
  16. Nakamura, K., Naramoto, K., and Koyama, M. Blood-pressure-lowering effect of fermented buckwheat sprouts in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods*, 5, 406-415, 2013.
  17. Nakamura, K., Okitsu, S., Ishida, R., Tian, S., Igari, N., and Amano, Y.

- Identification of natural lactoylcholine in lactic acid bacteria-fermented food. *Food Chemistry*, 201, 185–189, 2016.
18. Wang, W., Yamaguchi, S., Koyama, M., Tian, S., Ino, A., Miyatake, K., and Nakamura, K. LC-MS/MS analysis of choline compounds in Japanese-cultivated vegetables and fruits. *Foods*, 9, 1029, 2020.
  19. Wang, W., Yamaguchi, S., Suzuki, A., Wagu, N., Koyama, M., Takahashi, A., Takada, R., Miyatake, K., and Nakamura, K. Investigation of the Distribution and Content of Acetylcholine, a Novel Functional Compound in Eggplant. *Foods*, 10, 81, 2021.
  20. Nishimura, M., Suzuki, M., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Tsubaki, K., Fujita, T., Nishihira, J., and Nakamura, K. Daily ingestion of eggplant powder improves blood pressure and psychological state in stressed individuals: a randomized placebo-controlled study. *Nutrients*, 11, 2797, 2019.
  21. Yamaguchi, S., Matsumoto, K., Koyama, M., Tian, S., Watanabe, M., Takahashi, A., Miyatake, K., and Nakamura, K. Antihypertensive effects of orally administered eggplant (*Solanum melongena*) rich in acetylcholine on spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 276, 376–382, 2019.
  22. Kumai, T., Tanaka, M., Watanabe, M., and Kobayashi, S. Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 65, 367–369, 1994.
  23. Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I., and Saito, I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25, 99–107, 2002.
  24. Yoshimura, M., Toyoshi, T., Sano, A., Izumi, T., Fujii, T., Honishi, C.,

- Inai, S., Matsukura, C., Fukada, N., Ezura, H., and Obata, A. Antihypertensive effect of a  $\gamma$ -aminobutyric acid rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 615-619, 2010.
25. Wess, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 423-450, 2004.
26. Seki, E., Kawasaki, T., Yoshida, M., Osajima, K., Tamaya, K., Matsui, T., and Osajima, Y. Antihypertensive effect of sardine peptide and valyl-tyrosine in spontaneously hypertensive rats, *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 5, 271-277, 1999.
27. Kleiber, M. The fire of life. An introduction to animal energetics, Wiley, New York, 1961.
28. 平成 27 年 家計調査, 総務省統計局, 2015.
29. Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., and Kirkpatrick, C. J. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 85, 2-10, 2001.
30. Yamaguchi, S., Hayasaka, Y., Suzuki, M., Wang, W., Koyama, M., Nagasaka, Y., and Nakamura, K. Antihypertensive Mechanism of Orally Administered Acetylcholine in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*, 14, 905, 2022.
31. Carruba, M. O., Bondiolotti, G., Picotti, G. B., Catteruccia, N., and Da Prada, M. Effects of diethyl ether, halothane, ketamine and urethane on sympathetic activity in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 134, 15-24, 1987.
32. Katsurada, K., Ogoyama, Y., Imai, Y., Patel, K. P., and Kario, K. Renal denervation based on experimental rationale. *Hypertension Research*, 44,

1385-1394, 2021.

33. Miki, K., Oda, M., Kamijyo, N., Kawahara, K., and Yoshimoto, M. Lumbar sympathetic nerve activity and hindquarter blood flow during REM sleep in rats. *J. Physiol.*, 557, 261-271, 2004.
34. Iriuchijima, J. Further evidence for abnormal hindquarter tone in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Physiol.*, 40, 523-529, 1990.
35. Iriuchijima, J., and Sakata, S. Regional difference in sympathetic vasoconstrictor tone in conscious rats. *The Japanese journal of physiology*, 35, 1051-1063, 1985.
36. Kumagai, H., Averill, D. B., and Ferrario, C. M. Renal nerve activity in rats with spontaneous hypertension: effect of converting enzyme inhibitor. *Am. J. Physiol.*, 263, R109-115, 1992.
37. Kanbar, R. Chapuis, B., Oréa, V., Barrès, C., and Julien, C. Baroreflex control of lumbar and renal sympathetic nerve activity in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295, R8-R14, 2008.
38. Scislo, T. J., Augustyniak, R. A., and O'Leary, D. S. Differential arterial baroreflex regulation of renal, lumbar, and adrenal sympathetic nerve activity in the rat. *Am. J. Physiol.*, 275, R995-R1002, 1998.
39. Machino, T., Murakoshi, N., Sato, A., Xu, D., Hoshi, T., Kimura, T., and Aonuma, K., Anti-hypertensive effect of radiofrequency renal denervation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 110, 86-92, 2014.
40. Ruiz, P., Basso, N., Cannata, M. A. and Taquini, A. C. The renin-angiotensin system in different stages of spontaneous hypertension in the rat (S H R). *Clin. Exp. Hypertens. A*, 12, 63-81, 1990.
41. Saxena, P. R. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19, S80-88, 1992.

42. Hayakawa, K., Kimura, M., and Kamata, M. Mechanism underlying  $\gamma$ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 438, 107-113, 2002.
43. Kimura, M., Hayakawa, K., and Sansawa, H. Involvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypotensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 89, 388-394, 2002.
44. Yamaguchi, S., Matsumoto, K., Wang, W., and Nakamura, K. Differential Antihypertensive Effects of Oral Doses of Acetylcholine between Spontaneously Hypertensive Rats and Normotensive Rats. *Foods*, 10, 2107, 2021.
45. Isomura, M., Saar, K., Ohara, H., Hübner, N., Kato, N., and Nabika, T. 1A.05: Comparison of the whole genome sequence revealed genetically distinct loci between SHR/Izm and SHRSP/Izm. *J. Hypertens.*, 33 (Suppl. S1), e2, 2015.
46. Friese, R. S., Altshuler, A. E., Zhang, K., Miramontes-Gonzalez, J. P., Hightower, C. M., Jirout, M. L., Salem, R. M., Gayen, J. R., and Mahapatra, N. R. MicroRNA-22 and promoter motif polymorphisms at the Chga locus in genetic hypertension: Functional and therapeutic implications for gene expression and the pathogenesis of hypertension. *Hum. Mol. Genet.*, 22, 3624-3640, 2013.
47. Lim, D. Y., Jang, S. J., Park, D. G., Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton. Autacoid. Pharmacol.*, 22, 225-232, 2002.
48. Mahapatra, N. R., O' Connor, D. T., Vaingankar, S. M., Hikim, A. P., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B.



- P, Ziegler, M. G., Ross Jr, J., and Mahata, S. K. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J. Clin. Investig.*, 115, 1942-1952, 2005.
49. Gayen, J. R.; Gu, Y.; O' Connor, D. T.; Mahata, S. K. Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin a null mouse. *Endocrinology*, 150, 5027-5035, 2009.
50. Mussalo, H., Vanninen, E., Ikäheimo, R., Laitinen, T., Laakso, M., Länsimies, E., and Hartikainen, J. Baroreflex sensitivity in essential and secondary hypertension. *Clin. Auton. Res.*, 12, 465-471, 2002.
51. Philipp, T. H., Distler, A., Cordes, U. Sympathetic nervous system and blood-pressure control in essential hypertension. *Lancet*, 312, 959-963, 1978.

## 謝辞

本研究を遂行し博士論文をまとめるにあたり，貴重なご指導とご助言を頂きました  
主指導教官である信州大学農学部准教授 中村浩蔵先生に深く感謝の念を申し上げます。  
副指導教官として貴重なご助言とご協力頂きました信州大学農学部教授 大神田淳子  
先生，信州大学農学部准教授 河原岳志先生に深く感謝いたします。また、審査委員  
を受けていただいた信州大学農学部教授 真壁秀文先生、外部審査委員を引き受けて  
くださった東京女子医科大学教授 長坂安子先生に感謝いたします。テレメトリーセ  
ンサの埋込手術についてご助言，ご指導を頂きました国立循環器病研究センターの土  
持裕胤先生に深く感謝いたします。

最後になりましたが，信州大学大学院総合理工学専攻，農学部生命機能科学コース  
食品分子工学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

サポーターティングデータ

## ナス凍結乾燥粉末中のアセチルコリン、 $\gamma$ -アミノ酪酸、クロロゲン酸の定量方法

本研究では、血管等尺性張力測定試験には大阪府産泉州水ナス、反復経口投与試験には高知県産土佐鷹ナスを使用した。

ナスのへたを切り落とし、水で洗い、1~2 cm幅に包丁でスライスして凍結乾燥した。凍結乾燥したナスをミルミキサーで粉末状にし、ナス凍結乾燥粉末を作製した。ナス凍結乾燥粉末を純水に懸濁させてそれぞれの試験サンプルとした。2品種のナスの定量方法を以下に示した。ナス凍結乾燥粉末 (10 mg) を 2 mL チューブに量り取り、EN 内部標準 (10  $\mu$ L) を加えた。50 mmol/L 塩酸 (190  $\mu$ L) を添加し、ボルテックスで 3 分間攪拌した後、遠心分離 (1,000 $\times g$ , 室温, 3 分) し、上清を得た。残渣に 50 mmol/L 塩酸 (200  $\mu$ L) を添加し攪拌、遠心分離、上清採取の操作を 2 回繰り返した。採取した上清をすべて合わせ (約 600  $\mu$ L), 1 mol/L リン酸緩衝液 (300  $\mu$ L) を加え抽出サンプルとして固相抽出を行った。

固相抽出カートリッジは弱酸性陽イオン交換カートリッジ Inert Sep CBA 100 mg/1 mL を用いた。メタノール (1 mL), 純水 (1 mL) で活性化した固相抽出カートリッジを 10 mmol/L リン酸緩衝液 (8 mL) で平衡化した後、調製した抽出サンプル (約 900  $\mu$ L) を添加した。10 mmol/L リン酸緩衝液 (600  $\mu$ L) で安定化、純水 (2.5 mL) で洗浄後、1 mol/L 塩酸 (500  $\mu$ L) で溶出し、LC-MS/MS を用いた標準添加法で定量した。LC-MS/MS の測定条件は次に示す通り。

分析溶媒： 0.01%(v/v)ギ酸-33%(v/v)メタノール含有水, カラム：YMC-Triart PFP (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m, YMC CO., LTD., 京都), 流速：0.5 mL/min (LC), 0.3 mL/min (MS), 注入量：50  $\mu$ L, 分離温度：40 $^{\circ}$ C, 分析時間：30 min, イオン化モード：ESI(+), MRM モード, コーン電圧：20 V (ACh), 10 V (GABA), 15 V (クロロゲン酸), コリジョン電圧：10 V (ACh), 10 V (GABA), 10 V (クロロゲン酸),  $m/z$ ：ACh (146.10 $\rightarrow$ 87.00), GABA (104.01 $\rightarrow$ 86.94), クロロゲン酸 (355.15 $\rightarrow$ 163.06).

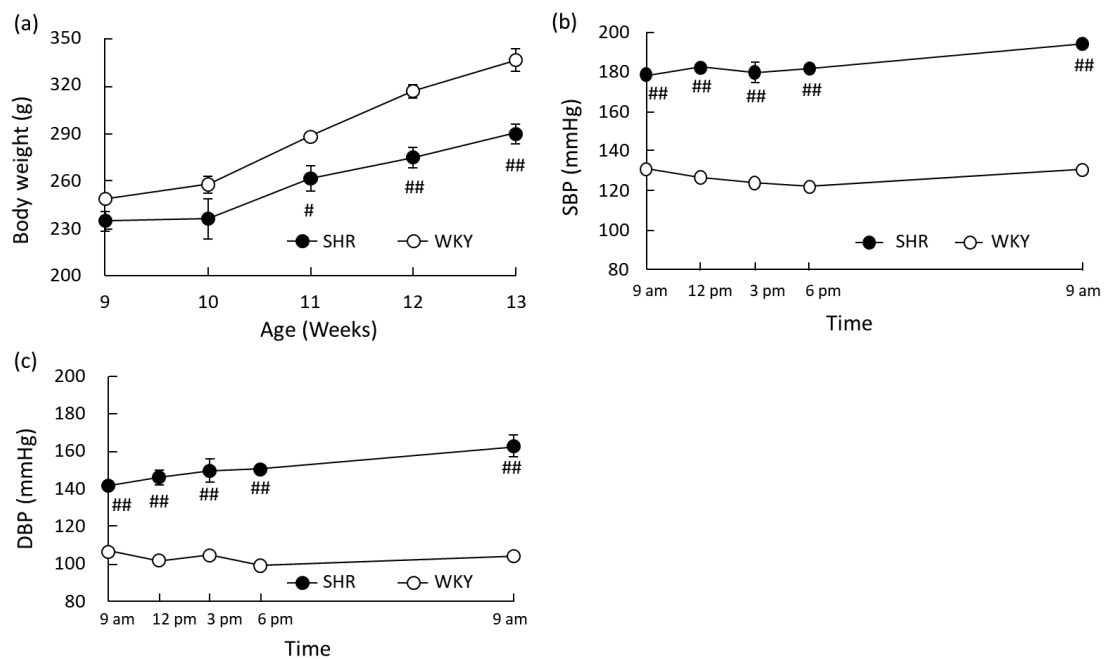


図 S1. ウィスター京都ラット (WKY/Izm) および高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) の一般生体データ. (a) 9~13 週齢の間の体重変化, (b) 一日の収縮期血圧 (SBP), (c) 一日の拡張期血圧 (DBP), 血圧は 9 週齢の時点でテイルカフ法 (BP-98A, ソフトロン株式会社, 東京) により測定した. ●, SHR (n=6), ○, WKY (n=6). # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$