五味子成分 Gomisin J 並びに類縁リグナン類化合物の 摘出臓器平滑筋に対する作用

末川 守,^{*,a} 志賀 隆,^a 曾根秀子,^a 池谷幸信,^b
田口平八郎,^b 油田正樹,^a 細谷英吉^a
津村薬理研究所,^a 津村研究所^b

Effects of Gomisin J and Analogous Lignan Compounds in Schisandra Fruits on Isolated Smooth Muscles

MAMORU SUEKAWA,^{*,a} TAKASHI SHIGA,^a HIDEKO SONE,^a YUKINOBU IKEYA,^b
HEIHACHIRO TAGUCHI,^b MASAKI ABURADA,^a and EIKICHI HOSOYA^a
*Tsumura Research Institute for Pharmacology, Ami-cho,
Ibaraki, 300-11, Japan*

(Received March 17, 1987)

The effects of 15 lignan compounds, which were extracted from schisandra fruits, on the contractions of an isolated mesenteric artery of dog induced by prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), $CaCl_2$ or norepinephrine (NE) were examined. As a result, all lignan compounds used showed inhibitory effects on the contractions of mesenteric artery induced by $PGF_{2\alpha}$ and $CaCl_2$. However, 6 compounds such as gomisin J (GJ) also showed inhibitory effects on NE-induced contraction. We further examined the actions of GJ with much better activity. Since GJ is not soluble in water, we synthesized GJ-Na (GJN) and further used throughout the experiments. In the isolated mesenteric artery of dog, GJN showed inhibitory effects on the NE-induced contraction ($ID_{50}=131.8\pm0.11\times10^{-6}$ M), and relaxant effects on $PGF_{2\alpha}$ -induced contractions ($ED_{50}=9.72\pm0.36\times10^{-6}$ M), and also showed inhibitory effects on $CaCl_2$ -induced contraction ($ID_{50}=6.96\pm0.16\times10^{-6}$ M). Furthermore, GJN showed relaxant effects and an increase in coronary flow on the isolated trachea, ileum, taenia coli and heart in guinea-pigs. GJ (10^{-4} and 3×10^{-4} g, i.a.) produced an increase in coronary artery blood flow in anesthetized dog, although its effect was slightly weaker than that in diltiazem, a well known calcium antagonist. As mentioned above, it was confirmed that lignan compounds extracted from schisandra fruits had Ca antagonistic actions in varying degrees, and that GJN had a dilating effect on the coronary artery.

Keywords—schisandra fruit; lignan compound; mesenteric artery; trachea; ileum; taenia coli; coronary artery; calcium antagonist

五味子はマツブサ科 (Schisandraceae) のチョウセンゴミン (*Schisandra Chinensis* BALLON) の成熟果実を乾燥したもので、北五味子ともいわれる。五味子の成分として、精油類、有機酸類の他に、dibenzocyclooctadiene 骨格を有する schisandrin, deoxyschisandrin, gomisin A など約 30 種のリグナン類が知られている。¹⁾ それらのリグナン類の中で、gomisin A, gomisin B 及び schisandrin がカルシウム (Ca) 拮抗様作用を有していることが示されている。²⁾ Gomisin A (GA) は、実験的肝障害に対し保護作用を有することが明らかにされており、³⁻⁵⁾ その機序の 1 つに GA の Ca 拮抗様作用が推測されている。そこで我々は血管平滑筋標本を用い、GA を含む五味子由来のリグナン類化合物のいくつかについて Ca による平滑筋収縮への影響を検討し、更にそれらの成分のうち、強い活性を示した化合物の 1 つの gomisin J (GJ) についてその Na 塩 (GJN) を作成し詳細に調べた。

実 験 の 部

実験材料

1. 被検薬 種々の五味子成分並びに GJN は津村研究所で抽出、作成した。GJ は白色の粉末で水に難溶で

ある。GJN は薄い褐色様の粉末で水に易溶である。五味子成分並びに GJ は 10% のプロピレングリコールに懸濁して用い、GJN は生理食塩水に溶解して用いた。その他、norepinephrine hydrochloride (三共), papaverine hydrochloride (和光純薬), diltiazem hydrochloride (田辺), verapamil hydrochloride (エーザイ), histamine dihydrochloride (東京化成), acetylcholine chloride (第一製薬), prostaglandin $F_{2\alpha}$ (小野薬品) を用いた。

2. 使用動物 実験に使用した雄性雑種成犬は武田化製場株式会社, Hartley 系雄性モルモットと New Zealand White 系ウサギは日本クレア株式会社, そして Wistar 系ラットは東京実験動物株式会社から購入し、イヌの場合を除き、入荷後空調管理 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$) の行われている飼育室で一定期間の予備飼育を行った後に実験に供した。

実験方法

1. イヌ摘出腸間膜動脈標本に対する作用 体重 10—15 kg のイヌを用いた。Pentobarbital Na 30 mg/kg の静脈内投与 (i.v.) で麻酔し放血により死亡させた後、腸間膜動脈を摘出した。腸間膜動脈は螺旋状に切開し、 37°C に加温し混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2) を通気した modified Lock-Ringer 液 (mm: NaCl 120, KCl 5.4, MgCl_2 1.0, CaCl_2 2.2, NaHCO_3 20, glucose 5.6) を満たした organ bath に懸垂し、F-D トランスデューサー (三栄測器: 4-5196A) で標本の反応を等尺性に測定し、インク書き記録計 (日立: 056) で記録した。なお、Ca-free の栄養液は栄養液より CaCl_2 を除き 1 mm の ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) を加えて作成し、Ca による収縮は 30 mm の K を適用した後、Ca 2.2 mm を適用して行った。また被検薬は収縮誘発薬を適用する 10 分前に処置した。

2. 各種摘出臓器に対する作用 体重 300—400 g の雄性モルモットを用いた。後頭部を強打後、放血により死亡させ、回腸、気管、盲腸紐を摘出した。気管は平滑筋と反対側を開き同じ幅で切断した後、5—7 個の切片の両端を糸で連結し気管標本とした。各平滑筋標本は 32°C に加温し混合ガスを通気した Krebs-Ringer 液 (mm: NaCl 117.7, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 22.4, glucose 10.0) を満たした organ bath に懸垂した。回腸及び盲腸紐標本の反応は等張性に、気管標本の反応は等尺性に調べた。

3. モルモット摘出心臓に対する作用 体重 300—400 g のモルモットを用いた。後頭部を強打し、直ちに心臓を摘出した後ランゲンドルフ装置に装着し、 37°C に加温し混合ガス (95% O_2 , 5% CO_2) を通気した Lock-Ringer 液 (mm: NaCl 155, KCl 5.7, CaCl_2 2.2, NaHCO_3 6.0, glucose 2.8) はポンプを介して一定速度 (5 ml/min) で灌流した。灌流装置の途中に設置した T 状カニューレを介して灌流圧を圧トランスデューサー (三栄測器: MPU-0.5) で測定した。拍動数及び収縮力は心尖部にセルフィンを装着し F-D トランスデューサーを介し、タコメーター (三栄測器: 2140) で測定した。各々のパラメーターはポリグラフ (三栄測器: 5210C) で記録した。薬物は灌流装置の途中に設置したゴム管部より 0.1 ml を投与した。

4. 生体位麻酔犬の冠動脈血流量に及ぼす影響 体重 11—16.5 kg の雄性雑種成犬を用い、pentobarbital Na 30 mg/kg (i.v.) で麻酔し背位に固定した。左第 5 肋骨間で開胸し、心臓を露出した。左冠状動脈前下行枝を遊離しポリエチレン製カニューレを末梢性に挿入した。また左後肢動脈にもカニューレを中枢性に挿入した。Heparin Na 300 IU/kg を静脈内に投与した後、血液が左後肢動脈より左冠状動脈前下行枝に灌流する体外循環路を作成した。体外循環路の途中に電磁流量計用プローブを装着し、冠動脈血流量を電磁流量計 (日本光電: MF-20) で測定した。血圧は後肢動脈より圧トランスデューサー (日本光電: MPU-0.5) で測定した。心拍数は血圧の脈波よりタコメーター (日本光電: AT-600G) で測定した。各々のパラメーターはポリグラフ (日本光電: MR-6000) で記録した。薬物の投与は体外循環路系のプローブと前下行枝へのカニューレとの間に設置したゴム管部より行った。

結 果

1. 種々の五味子成分の摘出イヌ腸間膜動脈標本に及ぼす影響

種々の五味子成分の摘出イヌ腸間膜動脈標本に対する影響についての結果を Table I に示す。検討した五味子成分は、gomisin A, gomisin B, gomisin D, gomisin F, gomisin G, gomisin H, gomisin J, gomisin N, deangeloylgomisin F, dehydrated gomisin A, dimethyl gomisin J, (+)-deoxyschisandrin, (+)-gomisin K3-acetate, schisandrin, wuweizisu C, pregomisin, であった。Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) 10^{-7} — 10^{-8} M で収縮を惹起した標本に対し、これら五味子成分はいずれも抑制作用を示し、特に GJ, gomisin B 及び gomisin D に強い抑制作用を認めた。結果は IC_{50} として示した。

次に、Ca イオンを除いた栄養液を用いて検討した。Ca-free の状態下に K (30 mm) の適用後、 CaCl_2 (2.2 mm)

を添加すると収縮が生じる。この収縮に対する五味子成分の影響を調べた。CaCl₂ で惹起する収縮に対し, dehydrated gomisin A は影響を及ぼさなかったが, 他の化合物はいずれも抑制作用を示し, 特に GJ, gomisin D 及び gomisin B に強い抑制作用を認めた。更に, norepinephrine (NE) 5×10^{-9} — 10^{-5} M による収縮に対する影響を調べ, 結果は NE の濃度反応曲線を 2 倍平行移動させるに必要な濃度, pD'₂ で示した。その結果, gomisin A,

TABLE I. Effects of 15 Lignan Compounds Extracted from Schizandria Fruits on Isolated Mesenteric Artery in Dogs

Sample name	Relaxation of mesenteric arteries ^{a)} IC ₅₀ (M)	Calcium contraction ^{b)} IC ₅₀ (M)	Norepinephrine contraction ^{c)} pD' ₂
Gomisin A	7.0×10^{-5}	5.3×10^{-5}	3.61
Schisandrin	6.3×10^{-5}	5.1×10^{-4}	N
Wuweizisu C	7.6×10^{-5}	3.9×10^{-3}	N
Gomisin J	1.7×10^{-5}	1.2×10^{-5}	3.72
Pregomisin	—	5.1×10^{-5}	N
Gomisin N	6.0×10^{-5}	1.1×10^{-4}	3.54
(+)-Deoxyschisandrin	2.0×10^{-4}	2.1×10^{-1}	3.66
Gomisin H	4.1×10^{-5}	5.3×10^{-4}	N
Gomisin G	2.1×10^{-5}	1.0×10^{-4}	N
Deangeloylgomisin F	1.1×10^{-3}	1.3×10^{-3}	N
Gomisin B	1.4×10^{-5}	1.8×10^{-5}	3.97
Dehydrated gomisin A	8.5×10^{-5}	N	N
Gomisin D	1.9×10^{-5}	4.0×10^{-6}	4.29
(+)-Gomisin K3-Acetate	2.3×10^{-4}	1.6×10^{-3}	N
Dimethyl gomisin J	2.9×10^{-5}	7.7×10^{-4}	N
Verapameal	1.7×10^{-5}	2.8×10^{-7}	5.44

a) Contraction was induced by prostaglandin F_{2α} (10^{-7} — 10^{-6} M).

b) Contractions induced by Ca²⁺ were obtained in Ca²⁺-free media with the addition of K⁺ (30 mM).

c) Norepinephrine was cummulative applied. IC₅₀ and pD'₂ represents the means of 3—4 experiments. N: no effects.

Fig. 1. Effect of GJN on the Contractions Induced by PGF_{2α} ($\times 10^{-7}$ M) (A) and NE (B) in the Isolated Dog Mesenteric Artery

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 experiments.

(A) ●—●, GJN. ED₅₀ = $9.72 \pm 0.36 \times 10^{-6}$ M.

(B) ○—○, control; ●—●, GJN 2×10^{-6} M; ●—●—●, GJN 2×10^{-5} M; ●—●—●—●, GJN 2×10^{-4} M. ID₅₀ = $131.8 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ M.

Fig. 2. Effects of GJN, Diltiazem and Papaverine on the Contractile Responses in the Isolated Dog Mesenteric Artery

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5–6 experiments.
 ○—○, control; ●—●, GJN 2×10^{-6} M; ●—●, GJN 6×10^{-6} M; ●—●, GJN 2×10^{-5} M; ●—●, GJN 2×10^{-4} M; ■—■, diltiazem 10^{-6} M; ▲—▲, papaverine 10^{-5} M.

gomisin J, gomisin N, (+)-deoxyschisandrin, gomisin B, gomisin D で効果を認め、その $\text{pD}'/2$ はそれぞれ 3.61, 3.72, 3.54, 3.66, 3.97, 4.29 であった。他の成分においては効果を認めなかった。

2. イヌ摘出腸間膜動脈標本に対する GJN の作用

GJ は水に難溶である。そこで易溶性の GJN を作成しその効果を調べた。PGF $_{2\alpha}$ 5×10^{-7} M で収縮を惹起した血管標本に対して GJN は弛緩作用を示し、その ED_{50} は $9.72 \pm 0.36 \times 10^{-6}$ M であった (Fig. 1)。また NE で惹起した収縮に対して、GJN は収縮抑制作用を示し、その ID_{50} は $132.8 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ M であった (Fig. 1)。次に CaCl_2 収縮に対する Ca 拮抗薬 diltiazem 並びに平滑筋弛緩薬 papaverine の作用と GJN の作用を比較検討した。その結果、diltiazem 10^{-6} M は CaCl_2 による用量-反応曲線を右方に平行移動する競合的抑制作用を示し、また papaverine 10^{-5} M は、右方に移動するものの最大収縮も抑制する非競合的抑制作用を示した。GJN は 2 及び 6×10^{-6} M では右方へ平行移動する作用を示したが、それ以上の濃度では最大収縮を抑制した (Fig. 2)。

3. モルモット摘出回腸、気管及び盲腸紐標本に及ぼす影響

モルモット回腸、気管及び盲腸紐に及ぼす GJN の影響についての結果を Fig. 3 及び 4 に示した。摘出回腸標本において、GJN は acetylcholine (10^{-10} — 10^{-6} M) で惹起した収縮に対して、 3×10^{-6} 及び 10^{-5} M で抑制作用を示した (Fig. 3)。一方, histamine 10^{-5} M で惹起した摘出気管標本に対し、GJN は 6×10^{-6} 及び 2×10^{-5} M で、また自発性緊張を保持している盲腸紐標本に対し、GJN は 2×10^{-6} — 8×10^{-5} M の濃度で濃度依存的な弛緩作用を示した (Fig. 4)。

Fig. 3. Effect of GJN on the Contraction of Isolated Ileum in Guinea-Pigs

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 6 experiments.
 ○—○, control; ●—●, GJN 2×10^{-6} M; ●—●, GJN 2×10^{-5} M; ●—●, GJN 2×10^{-4} M.

Fig. 4. Effects of GJN on the Contractions of the Isolated Trachea Induced by Histamine (10^{-5} M) and Spontaneous Contraction of the Isolated Taenia Coli of Guinea-Pigs

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4—6 experiments.

Fig. 5. Effects of GJN, Adenosine and Diltiazem on Coronary Flow in the Isolated Guinea-Pigs Heart

P. P., perfusion pressure; C. F., contractile force; H. R., heart rate.

4. モルモット摘出心臓標本に及ぼす影響

ランゲンドルフ法で検討したモルモット心臓標本に対する結果を Fig. 5 に示す. GJN は 10^{-5} — 10^{-4} g で冠血管系の拡張作用を示し, また心運動に対して投与直後に一過性の増加, その後は逆に抑制作用を示した. しかし, GJN は心拍数には影響を及ぼさなかった. 一方, diltiazem は 10^{-6} g で心運動に対し投与直後に一過性の増加, そしてその後に軽度の抑制を示したが, 10^{-5} g では抑制作用のみが観察された. また冠血管系に対しては, 用量依存性の拡張作用を示した.

5. イヌ冠動脈血流量に及ぼす影響

後肢動脈より左冠動脈前下行枝に血液が灌流する対外循環路を作成し, GJN は同循環路内に投与し冠動脈血

Fig. 6. Effects of GJN, Papaverine and Diltiazem on Coronary Blood Flow in the Anesthetized Dog

Drugs were intra-arterially injected into the circuit which perfused left coronary artery anterior descending branch.

C.F., coronary blood flow.

流量への影響を調べた。結果を Fig. 6 に示す。GJN は 10^{-4} 及び 3×10^{-4} g で冠動脈血流量を用量依存的に増大した。また papaverine 及び diltiazem も 10^{-4} 及び 3×10^{-4} g で冠動脈血流量を用量依存的に増大した。

考 察

五味子に含まれるリグナン類は約 30 種類の化合物が知られているが、本研究ではそれらの成分のうち gomisin A, gomisin B, gomisin D, gomisin G, gomisin H, schisandrin, wuweizisu C, pregomisin, deangeloyl-gomisin F, dehydrated gomisin A について $\text{PGF}_{2\alpha}$, CaCl_2 及び NE で収縮を惹起したイヌ摘出腸間膜動脈標本に対する影響を検討した。その結果、いずれの化合物も $\text{PGF}_{2\alpha}$ で惹起した収縮に対して弛緩作用を、また CaCl_2 で惹起した収縮に対しても抑制作用を示した。しかし、NE で惹起した収縮に対しては gomisin A, B, C, D, J として (+)-deoxyshizandrin が抑制を示したに過ぎなかった。

以上、五味子より得られたリグナン類の一部について $\text{PGF}_{2\alpha}$, CaCl_2 並びに NE で惹起した血管平滑筋の収縮に対する影響を検討した結果、gomisin J, gomisin B そして gomisin D に強い活性を認めたが、本実験においては gomisin J (GJ) について更に検討した。

GJ は水に難溶なために、GJ の作用を詳細に検討するには正確さに欠けると思われたので、水に易溶の Na 塩 (GJN) を作成し検討を加えた。GJN の NE 収縮に対する ID_{50} は $131.8 \pm 0.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、また CaCl_2 収縮に対する ID_{50} は $6.96 \pm 0.16 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、GJN は GJ と同様に CaCl_2 収縮に対して強く作用を及ぼすことが確認された。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 及び高濃度 (10^{-6} M) の NE による収縮は Ca-influx と細胞内小器官からの Ca 遊離によるとされており⁶⁻⁹⁾ また CaCl_2 による収縮は完全に Ca-influx に依存している⁹⁾ と言われている。したがって、この結果は、GJN は Ca-influx に対して強い抑制作用を有するかもしれないことを示唆している。

一方、GJN は低濃度側 (10^{-6} 及び $3 \times 10^{-6} \text{ M}$) で CaCl_2 の濃度作用曲線を右方に平行移動させる作用を示した。したがって、GJN は非競合的 Ca 拮抗作用以外に、競合的な Ca 拮抗作用も部分的に有している可能性が推測される。

更にモルモットの摘出回腸、気管及び盲腸紐標本を用いて GJN の作用を検討した。GJN は acetylcholine (10^{-10} — 10^{-6} M) で惹起した回腸標本の収縮に対し $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ 及び $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ の濃度で濃度依存的に抑制し、また histamine (10^{-5} M) で収縮を惹起した気管標本及び自然発生的に生じた盲腸紐の緊張に対し 2×10^{-6} — $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ の濃度で濃度依存的な弛緩作用を示した。Histamine 及び acetylcholine による収縮は受容体を介する Ca-influx 並びに細胞内小器官からの Ca 遊離による^{10,11)} とされ、また盲腸紐の自発性緊張は筋原性で Ca-influx によるものであることが知られている。したがって、GJN が示した上記の結果は GJN は外液からの Ca-influx 並びに部

分的な Ca 遊離に対し抑制作用を有している可能性を示唆している。

冠動脈平滑筋細胞は細胞内に Ca 貯蔵器官が乏しいことからその収縮の大部分は細胞外からの Ca-influx に依存していることが示唆されている。¹²⁾したがって、GJN は冠動脈に対しても拡張作用を示すかもしれないと推測することができよう。そこでモルモット摘出心臓標本を用いて検討したところ、GJN は、Ca 拮抗薬 diltiazem の効果よりも弱いものの、 10^{-5} g より冠動脈拡張作用を示した。また心運動に対しては促進と抑制の 2 つの作用を示した。しかし、心拍数には影響を及ぼさなかった。一方、後肢動脈より左冠動脈前下行枝に血液が流れる体外循環路を作成したイヌにおいて GJN をその循環路内に投与すると、GJN は 10^{-4} 及び 3×10^{-4} g で用量依存的に冠動脈流量を増加したが、GJN のこの作用は、Ca 拮抗薬ではないが、平滑筋ミトコンドリアの呼吸抑制作用とともに Ca-influx 抑制作用を有しているとされる papaverine の作用よりも若干弱かった。

以上、五味子のリグナン類化合物の一部について Ca 依存性の平滑筋標本の収縮に対する影響について検討した結果、いずれの化合物も程度の差はあるが抑制作用を有していることが判明した。また本実験で検討した GJ について薬理学的に検討した結果、GJ 並びに GJN はともに外因性 Ca の influx を抑制する作用を有しているという示唆が得られたが、その作用は市販の Ca 拮抗薬と比較すると弱かった。しかし、本研究で検討した五味子由来の化合物はいずれも $\text{PGF}_{2\alpha}$ 及び CaCl_2 で惹起した収縮反応に抑制作用を示していることから、漢方薬として配合されている五味子の作用に、GJ 並びにその他のリグナン類化合物の Ca イオンに対する効果が一部寄与しているかもしれないという示唆が得られた。

引用文献

- 1) 中島 薫, 田口平八郎, 池谷幸信, 遠藤 徹, 吉岡一郎, 薬誌, **103**, 743 (1983).
- 2) 許 鴻源, 陳 玉盤, 陳 建考, 陳 憲宗, 日本薬学会第 106 年会講演要旨集, **2A-9-1**, 1986, p. 9.
- 3) S. Maeda, S. Takeda, Y. Miyamoto, M. Aburada, M. Harada, *Jpn. J. Pharmacol.*, **38**, 347 (1984).
- 4) 竹田茂文, 前村俊一, 須藤和彦, 加瀬義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 布野秀二, 藤井裕一, 油田正樹, 細谷英吉, 日薬理, **87**, 169 (1986).
- 5) 竹田茂文, 加瀬義夫, 新井一郎, 長谷川雅之, 関口裕子, 布野秀二, 油田正樹, 細谷英吉, 溝口靖紘, 森沢成司, 日薬理, **88**, 321 (1986).
- 6) 戸田 昇, 臨床薬理, **6**, 24 (1976).
- 7) T. Godfraind, R. C. Millerand, L. Sorcates, *J. Br. J. Pharmac.*, **80**, 115 (1983).
- 8) N. Toda, *Am. J. Physiol.*, **225**, 350 (1973).
- 9) 石橋 昭, 花形理香, 堀井大治郎, 久山哲廣, 高柳一成, 日薬理, **82**, 361 (1983).
- 10) 谷山紘太郎, 荒木宏昌, 前田昌良, 鄭 瑞, 松本 博, 日薬理, **72**, 105 (1976).
- 11) 唐木英明, 日薬理, **77**, 1 (1981).
- 12) 木村英一, 平 則夫, 編集, “カルシウム拮抗薬—基礎と臨床—,” 医薬ジャーナル社, 東京, 1983 p. 27.