

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (12) 932-935 (1990)

チヨロギに関する研究 (第2報¹⁾) 抗 Anoxia 作用と作用成分

山原 條二,^a 木谷 哲也,^{*,b} 小林 弘美,^b 河原 有三^b

京都薬科大学,^a 森下仁丹株式会社^b

Studies on *Stachys sieboldii* MiQ. II.¹⁾ Anti-anoxia Action and the Active Constituents

Johji YAMAHARA,^a Tetsuya KITANI,^{*,b} Hiromi KOBAYASHI,^b
and Yuzo KAWAHARA^b

Kyoto Pharmaceutical University,^a 5, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607,
Japan and Morishita Jintan Co., Ltd.,^b 1-1-30, Tamatsukuri,
Chuo-ku, Osaka 540, Japan

(Received July 2, 1990)

During screening for the development of drugs from natural products, methanolic extract of tuber of *Stachys sieboldii* MiQ. (Labiatae) significantly inhibited the lethal induced by KCN in mice.

The methanolic extract was fractionated by column chromatography to identify the active constituents. Acteoside and stachysoside C, phenylethanoid glycoside, have a significant effect on the KCN-induced anoxia model.

Keywords—*Stachys sieboldii*; phenylethanoid glycoside; acteoside; stachysoside C; KCN-induced anoxia model

緒 言

チヨロギ *Stachys sieboldii* MiQ. (Labiatae) は中国原産のシソ科の植物で草石蚕²⁾と称し、感冒、心痛、滋養強壮などの目的に用いられるほか、その塊茎部は中国、台湾、日本などの一部の地域では専ら食用とされている。

チヨロギの成分については、地上部³⁾に isoscutellarein 4'-methyl ether 7-O-β-(6'''-O-acetyl-2''-allosyl)glucoside, isoscutellarein 7-O-β-(6'''-O-acetyl-2''-allosyl)glucoside, acteoside, 全草²⁾に stachydrine, stachyose, choline などが知られている。著者らは、前報¹⁾でチヨロギ塊茎部の化学的解明を試み、stachysoside A, melto-side, harpagide, 8-acetylharpagide 等のイリドイド配糖体, stachysoside B, C, acteoside, leucosceptoside A, martynoside 等のフェニルエタノイド配糖体の存在を明らかにした。

このように成分に関しては多くの報告がみられるが、チヨロギの有する効能・効果を薬理学的に実証した研究はなされていない。

著者らは天然薬物の新しい応用と開発を目的として種々の生薬や植物エキスについて、生理活性を有する成分を明らかにする研究を進めている。今回脳低酸素状態を誘発させ致死に至らしめる KCN anoxia モデルを用いるスクリーニング試験において、チヨロギ塊茎部メタノールエキスに有効性が認められたので、その作用成分を明らかとするための検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料 (1) 使用生薬——チヨロギは京都及び滋賀方面で 1988 年 10 月—12 月に採集したものを用了。

(2) 試料の調製——細切したチヨロギ塊茎部 (生) 8 kg を常法によりメタノール 20 l で 2 回室温抽出を繰り返し、抽出液を合わせて 40°C 以下で減圧濃縮して乾固させた。得られたメタノールエキス 575 g を水 3 l に懸濁し、アンバーライト XAD-2 (オルガノ) に通導、水 10 l 及びメタノール 2 l で溶出し、それぞれのエキスを得た {水溶出エキス (主に糖類を含有する画分 SS-1 135 g), メタノール溶出エキス (主に配糖体類を含有する画分 SS-2 19 g)}。画分 SS-2 は水溶解後 polyamide C-200 (和光純薬) に通導、水及びメタノール各 2 l で順次溶

出し、それぞれのエキスを得た {水溶出エキス (主にイリドイド配糖体類を含有する画分 SS-2-1 14 g), メタノール溶出エキス (主にフェニルエタノイド配糖体類を含有する画分 SS-2-2 3.6 g)}. 画分 SS-2-2 はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム-メタノール-水 (70:30:5-60:40:10)] で分画後、高速液体クロマトグラフィー [YMC pack ODS-7 (20 i.d.×250 mm), 15-17% CH₃CN] で分離・精製を繰り返すことにより, martynoside 150 mg, leucosceptoside A 630 mg, stachyoside B 280 mg, acteoside 1000 mg, stachyoside C 50 mg を得た.

(3) 実験動物——体重約 20 g の ddY 系雄性マウス (オリエンタルバイオサービス) を使用した.

(4) 比較対照薬——Flunarizine (Sigma).

2. 実験方法 マウスを 1 群 10 匹として用い、24 時間絶食後、被検薬物を経口投与し、薬物投与 1 時間後に KCN 3.0 mg/kg を尾静脈投与 (i.v.) した. KCN 投与後呼吸停止に至るまでの時間 (生存時間) を測定し、180 秒以上呼吸停止しないマウスを生存例とし、その割合を求めた.

被検薬物は 5% アラビアゴム末と精製水に懸濁し、control 群にはアラビアゴム末のみを精製水と懸濁した.

3. 統計処理 被検薬物の効果の判定には、生存時間については Student's *t*-test により、生存率については Fisher の直接確立計算法により control 群と比較して有意差検定を行った.

結 果

(1) チョロギ塊茎部メタノールエキスの抗 KCN 作用

Table I に示すように、1500 mg/kg の経口投与では KCN に対する生存時間延長傾向が認められたが、3000 mg/kg に増量して与えると、有意な差となった.

(2) チョロギ塊茎部メタノールエキスの分画と各画分の抗 KCN 作用

Fig. 1 にその分画法の概略を示した. Table II に示すように、メタノールエキスを SS-1, SS-2, SS-2-1, SS-2-2 に分画し、それぞれの分画収率を勘案して投与量を決定した. その結果、40 mg/kg で画分 SS-2-2 が有意に KCN に対する生存時間を延長させた. しかし比較対照薬として用いた flunarizine よりは弱い作用であった.

TABLE I. Effects of Tuber of *Stachys sieboldii* MiQ. MeOH Ext. on KCN-Induced Anoxia in Mice

| Drugs | Dose (mg/kg) | Survival time (s) | Prolongation (%) | No. of mice surviving/No. used (Mortality %) |
|-------------|--------------|------------------------------|------------------|--|
| Control | — | 33.37 ± 2.48 | — | 0/10 (100.0) |
| MeOH ext. | 1500 | 73.62 ± 18.04 | 120.62 | 2/10 (80.0) |
| | 3000 | 97.65 ± 22.59 ^{a)} | 192.63 | 4/10 (60.0) ^{a)} |
| Flunarizine | 25 | 166.58 ± 13.42 ^{b)} | 399.19 | 9/10 (10.0) ^{b)} |

Test drugs were administered to mice 1 h. (p.o.) before KCN treatment (3.0 mg/kg i.v.). Each value represents the mean ± S.E. Significantly different from the control at a) *p* < 0.05, b) *p* < 0.01.

TABLE II. Effects of SS-1, SS-2, SS-2-1 and SS-2-2 on KCN-Induced Anoxia in Mice

| Drugs | Dose (mg/kg) | Survival time (s) | Prolongation (%) | No. of mice surviving/No. used (Mortality %) |
|-------------|--------------|------------------------------|------------------|--|
| Control | — | 33.62 ± 2.22 | — | 0/10 (100.0) |
| SS-1 | 1500 | 58.72 ± 14.02 | 74.66 | 1/10 (90.0) |
| SS-2 | 200 | 80.56 ± 21.79 | 139.62 | 3/10 (70.0) |
| SS-2-1 | 150 | 69.68 ± 18.99 | 107.97 | 2/10 (80.0) |
| SS-2-2 | 40 | 91.10 ± 19.73 ^{a)} | 170.97 | 3/10 (70.0) |
| Flunarizine | 25 | 168.76 ± 11.24 ^{b)} | 401.96 | 9/10 (10.0) ^{b)} |

Test drugs were administered to mice 1 h. (p.o.) before KCN treatment (3.0 mg/kg i.v.). Each value represents the mean ± S.E. Significantly different from the control at a) *p* < 0.05, b) *p* < 0.01.

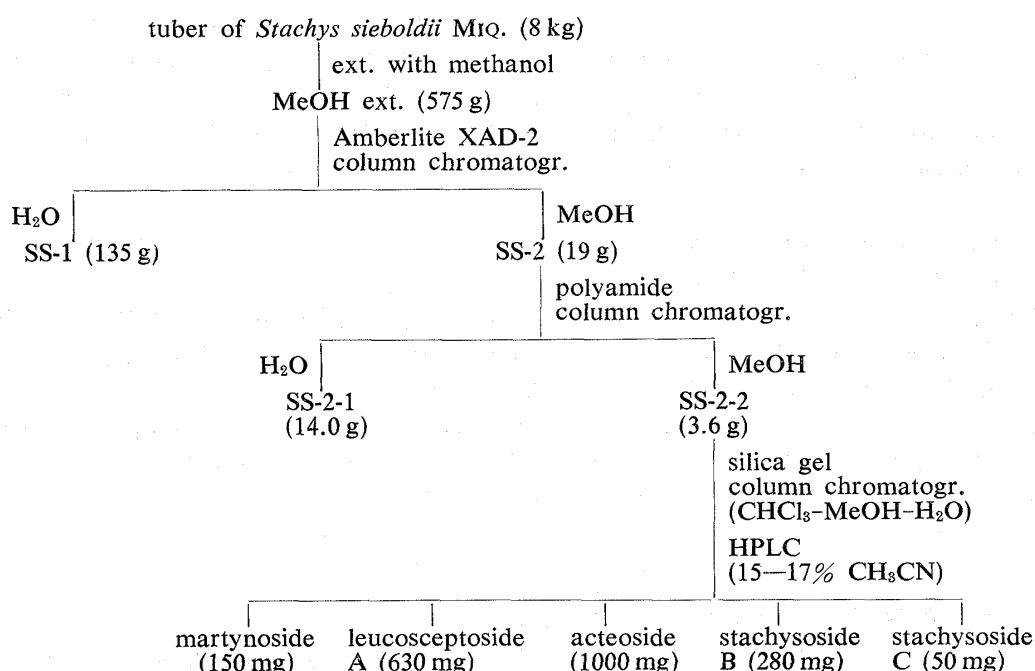
Fig. 1. Flow Diagram of Fractionation of Tuber of *Stachys sieboldii* MiQ. MeOH Extract

TABLE III. Effects of Martynoside, Leucosceptoside A, Acteoside, Stachysoside B and Stachysoside C on KCN-Induced Anoxia in Mice

| Drugs | Dose (mg/kg) | Survival time (s) | Prolongation (%) | No. of mice surviving/No. used (Mortality %) |
|-------------------|--------------|------------------------------|------------------|--|
| Control | — | 32.06 ± 1.91 | — | 0/10 (100.0) |
| Martynoside | 40 | 49.55 ± 14.77 | 54.55 | 1/10 (90.0) |
| Leucosceptoside A | 40 | 55.38 ± 14.50 | 72.74 | 1/10 (90.0) |
| Acteoside | 40 | 77.42 ± 17.51 ^{a)} | 141.48 | 2/10 (80.0) |
| Stachysoside B | 40 | 41.05 ± 3.53 | 28.04 | 0/10 (100.0) |
| Stachysoside C | 40 | 87.46 ± 20.50 ^{a)} | 172.80 | 3/10 (70.0) |
| Flunarizine | 25 | 180.00 ± 0.000 ^{b)} | 461.45 | 10/10 (0.0) ^{b)} |

Test drugs were administered to mice 1 h. (p.o.) before KCN treatment (3.0 mg/kg i.v.). Each value represents the mean ± S.E. Significantly different from the control at a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.

(3) フェニルエタノイド配糖体類の抗 KCN 作用

Table III に画分 SS-2-2 から単離した martynoside, leucosceptoside A, acteoside, stachysoside B, C の効果を示した。投与量は画分 SS-2-2 と同じ 40 mg/kg とした。その結果 acteoside と stachysoside C が有意な効果を示すことが明らかとなった。

考 察

脳組織は酸素需要度が非常に高く、他の組織に比べて、虚血に基づく低酸素状態に極めて感受性が高いと言われている。KCN などのシアン化合物は、各組織のミトコンドリア内の cytochrome oxidase を阻害し、細胞呼吸を抑制する⁴⁾とされている。本研究で用いた脳循環改善薬の flunarizine は持続性の脳血流増加作用を有する。⁶⁾ 実験的 anoxia もしくは脳虚血に対して有効な pentobarbital などの barbiturate 系薬物及び diazepam などの benzodiazepine 系薬物が防御作用を示し、これらの薬物は脳代謝を抑制し、二次的にエネルギー消費が節減されて抗 anoxia 作用を発現するもの^{6,7)}と考えられている。また、KCN anoxia モデルに有効な脳機能改善薬とし

て sufoxazine,⁸⁾ idebenone⁹⁾等の報告がある。チョロギ塊茎部メタノールエキスを KCN anoxia モデルに対する有効性が認められたので、分画検討した結果、主にフェニルエタノイド配糖体を含有する画分 SS-2-2 に有意な生存時間延長作用が認められた。そこで画分 SS-2-2 から 5 種の化合物を単離し、作用を検討した結果、acteoside, stachyoside C に有意な抗 anoxia 作用が認められた。したがって、チョロギの有する抗 anoxia 作用はフェニルエタノイド配糖体である acteoside, stachyoside C 等が強く関与していることが示唆された。ここに、チョロギに今までに知られていなかった新たな薬効を見だし、それを薬理的に実証することができた。このような化学構造式を有する化合物に抗 anoxia 作用の報告はなく、抗 anoxia 作用を有する新薬開発のヒントになるものとする。活性成分の作用機序については今後検討していきたい。

引用文献

- 1) 宮瀬敏男, 上野 明, 木谷哲也, 小林弘美, 河原有三, 山原條二, 薬誌, **110**, 652 (1990).
- 2) 江蘇新医学院, “中薬大辞典,” 上海科学技術出版社, 上海, 1978, pp. 1580—1581.
- 3) 武田美雄, 藤多哲朗, 佐藤利夫, 掛川寿夫, 薬誌, **105**, 955 (1985).
- 4) T. Schubert, W. A. Brill, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **162**, 352 (1968).
- 5) 久保和博, 日薬理誌, **79**, 529 (1982).
- 6) J. D. Michenfelder, J. H. Milde, T. M. Sundt, Jr., *Arch. Neurol.*, **33**, 345 (1976).
- 7) A. Tamura, T. Asano, K. Sano, T. Tsumagari, A. Nakajima, *Stroke*, **10**, 126 (1979).
- 8) 安田 寛, 泉 律好, 中西正人, 阿南惟毅, 丸山 裕, 日薬理誌, **88**, 363 (1986).
- 9) 宮本政臣, 佐治美昭, 永岡明伸, 武田研究所報, **43**, 77 (1984).