釣藤散及び釣藤鈎の抗痙攣作用と活性成分

三巻祥浩,* 利水紳倫, 山田健二, 指田 豊*
東京薬科大学薬学部

Anti-convulsion Effects of Choto-san and Chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramlus*) in Mice, and Identification of the Active Principles

Yoshihiro MIMAKI,* Norinobu TOSHIMIZU, Kenji YAMADA,
and Yutaka SASHIDA*

*School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,
1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan*

(Received August 11, 1997)

The crude drug, Chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramlus*), the hooks of *Uncaria* spp. (Rubiaceae), has been claimed to possess sedative and anti-spasmodic actions, and is contained in a Chinese traditional preparation, Choto-san, as a main crude drug. Examinations were made on the anti-convulsion effects of Choto-san and Chotoko against some animal models of epilepsy conducted by the stimulation of drugs or electricity. Oral administration of the Choto-san extract to mice at the doses of 1.0 g/kg and 3.0 g/kg tended to inhibit the glutamate-induced convulsion in a dose-dependent manner, and the effect of the Chotoko extract at a 3.0 g/kg dose was significant, while both the extracts showed no activity against the picrotoxine-induced, strychnine-induced, and electroshock convulsions. The Choto-san preparation without Chotoko was inactive, and the activity of the Chotoko extract was more potent than that of the every crude drug comprising Choto-san, suggesting that Chotoko plays the most important role in the Choto-san prescription and contains some active compounds. Bioassay-guided fractionation of the Chotoko extract led to the location of the active components in the less polar alkaloids-containing fraction, from which three indole alkaloids, geissoschizine methylether (1), hirsutine (2) and hirsutine (3), and an oxyindole alkaloid, isocorynoxine (4) were isolated and identified. Oral administration of 1 and 2 to mice at the doses of 50, 100, and 200 mg/kg inhibited the glutamate-induced convulsion in a dose-dependent manner. The effect of 3, the dihydro derivative of 2, was less potent than those of 1 and 2. Compound 4 showed no activity at a 100 mg/kg dose compared with control.

The above results support the Chinese herbal description of the anti-spasmodic action of Chotoko, and show that 1 and 2 contained in Chotoko must be mainly contributed to the activity. It is also suggested that Choto-san may be clinically available for treatment of epilepsy.

Key words—Chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramlus*); Choto-san; anti-convulsion effect; glutamate-induced convulsion; indole alkaloid; geissoschizine methylether

てんかんとは、大脳灰白質での過剰なニューロン発射に由来する自発的発作の反復を主徴と

する慢性疾患である。てんかん発作はかつて大発作・小発作・精神運動発作・皮質焦点発作などに分類されていたが、現在では、国際てんかん連盟 (International League Against Epilepsy) による臨床的・脳波学的分類が一般的に用いられ、¹⁾ それぞれの発作に有効な医薬品が開発されている。²⁾ しかしながら、てんかんの薬物治療では発作のコントロールに多剤を併用しなければならない場合が多く、また一般に薬剤の有効血中濃度と副作用発現血中濃度の幅が狭いこと、多くの薬剤に対して抵抗性を示す難治性てんかんが全体の 10—20% 存在すること³⁾ などから副作用との分離が大きい抗てんかん薬や、新しい作用機序を有する抗てんかん薬の開発が求められている。

合成薬とは別に、作用は緩和であるが経験的にあるいは文献上、いくつかの漢方処方薬並びに和漢薬に抗痙攣作用を有することが知られている。釣藤鈎は、アカネ科カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla*) 又は *U. sinensis* を基原とし、中医学の薬能は「平肝止痙」⁴⁾ 名医別録では「十二の驚癇を主治する」と記載されており、てんかんなどの痙攣に有効と考えられる。そこで著者らは、釣藤鈎並びに釣藤鈎が主薬として配合されている漢方処方薬釣藤散に着目し、それらの有効性を明らかにするとともに抗痙攣作用を指標とした活性物質の探索を行った。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 実験動物 埼玉実験動物供給所より購入した 6—8 週令の ddY 系雄性マウスを使用した。マウスは東京薬科大学実験動物施設で飼育し、飼料及び水は自由摂取とした。飼育は、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照明 12 時間照明/12 時間消灯で行った。

2) 薬物及び試薬 ピクロトキシン、グルタミン酸ナトリウム 1 水和物は和光純薬工業(株)より、硝酸ストリキニーネは東京化成工業(株)より、塩酸ケタミンは Sigma 社より、釣藤鈎、橘皮、半夏、麦門冬、茯苓、人參、菊花、防風、石膏、甘草、乾生姜はウチダ和漢薬(株)より購入したものを使用した。

3) 装置 電撃ショック装置は NATUME 社製を用いた。薬物の脳室内投与を正確に行うため、27 G 注射針、マイクロシリンジ、静脈用カテーテルを接続したものを脳定位固定器 (サミットメディカル社製) に装着した。

4) 分析機器、クロマト充填剤 旋光度は JASCO DIP-360 型デジタル旋光度計、IR スペクトルは JASCO A-100 型装置、MS は VG AutoSpec E 質量分析装置、NMR スペクトルは Bruker AM-400 装置を用いて測定した。カラムクロマトグラフィーの充填剤として、シリカゲル BW-300 (富士シリシア化学)、Chromatorex NH シリカゲル (富士シリシア化学)、Diaion HP-20 (三菱化成) を用いた。TLC には Kieselgel 60 F₂₅₄ 0.25 mm (Merck)、Chromatorex NH 0.25 mm (富士シリシア化学) を用いた。検出は UV (254 nm) 照射、ドラージェンドルフ試薬噴霧あるいは 10% H₂SO₄ 試薬噴霧後加熱により行った。NMR は tetramethylsilane (TMS) を内部標準物質とし、 δ (ppm) 値で表わした。

2. 釣藤散及び釣藤鈎の抽出

釣藤散の成人 1 日処方量は、釣藤鈎 3.0 g、橘皮 3.0 g、半夏 3.0 g、麦門冬 3.0 g、茯苓 3.0 g、人參 2.0 g、菊花 2.0 g、防風 2.0 g、石膏 5.0 g、甘草 1.0 g、乾生姜 1.0 g である。⁵⁾ これら生薬を混合し、3 倍量の熱水により 3 時間抽出、抽出液を凍結乾燥した (エキス収量 6.2 g)。同様に、釣藤鈎 30 g を熱水により抽出し、凍結乾燥した (エキス収量 3.5 g)。

3. ピクロトキシン誘発痙攣に対する釣藤散及び釣藤鈎の効果

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 投与容量が 1.0 ml になるように生理食塩水に溶解した釣藤散エキス, 釣藤鈎エキスを 1.0, 3.0 g/kg と用量段階的に経口投与した. コントロール群には生理食塩水を投与した. その 1 時間後にピクロトキシン 20 mg/kg を腹腔内投与し, 間代性痙攣発現までの時間を測定した.

1 群は 5 匹以上で行い, 統計学的処理は Student の t 検定により 2 群間の平均値の差を検定し, 危険率 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した. 表記は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した.

4. 電撃痙攣に対する釣藤散及び釣藤鈎の効果

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 釣藤散エキス, 釣藤鈎エキスを 1.0, 3.0 g/kg と用量段階的に経口投与した. その 1 時間後に 80 V, 0.4 sec をマウス両側角膜に通電し, 直後に起こる強直性伸展の持続時間を測定した.

5. ストリキニーネ誘発痙攣に対する釣藤散及び釣藤鈎の効果

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 釣藤散エキス, 釣藤鈎エキスを 1.0, 3.0 g/kg と用量段階的に経口投与した. その 1 時間後にストリキニーネ 2.5 mg/kg を腹腔内投与し, 強直性痙攣発現までの時間を測定した.

6. グルタミン酸誘発痙攣のスコア化

グルタミン酸の投与量は $5.0 \mu\text{mol/head}$ とし, 投与容量が 10 μl となるように生理食塩水に溶解した. 麻酔はエーテルをガラス円筒内にて 20 秒間吸入させることにより行った.

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスにエーテルを吸入させ, その直後に脳定位固定器に固定し, 27 G 注射針を冠状縫合と矢状縫合が交差する点, すなわち bregma より右に 1 mm, 深さ 3 mm の位置に挿入し, グルタミン酸を脳室内投与した. その後発現する 4 種の異常行動, 四肢筋間代痙攣 (limb myoclonus), 激しい交代性痙攣 (running fit), 強直性屈曲 (tonic flexion), 強直性伸展 (tonic extension) 並びに死亡 (death) を各 1 ポイントとしてスコア化して評価した. なお, 行動観察は投与後 30 分間とした. 1 群は 5 匹以上で行い, 統計処理はノンパラメトリック検定である Mann Whitney の U 検定により順位の違いを検定し, 危険率 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した. 表記はスコアの平均値 $\pm$ 標準誤差で示した.

7. ケタミンのグルタミン酸誘発痙攣抑制効果

ケタミンの投与量をそれぞれ 10, 20, 40 mg/kg とし, 投与容量が 0.1 ml になるように生理食塩水に溶解した.

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスにケタミンを腹腔内投与し, その 15 分後にグルタミン酸を脳室内投与した. 投与後 30 分間発現する異常行動を観察し, スコア化して評価した.

8. グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤散, 釣藤鈎の効果

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 釣藤散エキス, 釣藤鈎エキスを 1.0, 3.0 g/kg と用量段階的に経口投与した. その 1 時間後にグルタミン酸を脳室内投与し, 投与後 30 分間行動観察を行った.

9. グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤鈎単味抜き処方の効果

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 釣藤鈎単味抜き処方エキスを 1.0, 3.0 g/kg と用量段階的に経口投与した. その 1 時間後にグルタミン酸を脳室内投与し, 投与後 30 分間行動観察を行った.

10. 釣藤散構成生薬の抽出と投与量

釣藤鈎 30 g, 橘皮 30 g, 半夏 30 g, 麦門冬 30 g, 茯苓 30 g, 人参 20 g, 菊花 20 g, 防風 20 g, 石膏 50 g, 甘草 10 g, 乾生姜 10 g を 3 倍量の熱水により 3 時間抽出, 抽出液を凍結乾燥して, 釣藤鈎エキス 3.48 g, 橘皮エキス 17.7 g, 半夏エキス 6.42 g, 麦門冬エキス 15.0 g, 茯苓エキス 0.253 g, 人参 5.31 g, 菊花エキス 4.20 g, 防風 3.90 g, 石膏エキス 0.708 g, 甘草エキス 2.32 g, 乾生姜エキス 0.768 g を得た. 釣藤鈎の用量を 1 g/kg を基準とした場合, 各生薬の投与量は, 1 g/kg × 各生薬エキス収量 / 釣藤鈎エキス収量 (g/kg) で計算される. よって, 各構成生薬の投与量を以下のように設定した. 釣藤鈎エキス 1 g/kg, 橘皮エキス 5 g/kg, 半夏エキス 2 g/kg, 麦門冬エキス 4 g/kg, 茯苓エキス 0.07 g/kg, 人参エキス 2 g/kg, 菊花エキス 1 g/kg, 防風エキス 1 g/kg, 石膏エキス 0.2 g/kg, 甘草エキス 0.7 g/kg, 乾生姜エキス 0.2 g/kg.

11. グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤散各構成生薬の効果

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 釣藤散の各構成生薬を先にその抽出量より計算された用量を経口投与した. その 1 時間後にグルタミン酸を脳室内投与し, 投与後 30 分間行動観察を行った.

12. 釣藤鈎の抽出エキスの分画

釣藤鈎 (500 g) を熱水により抽出した. 抽出液を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し, 順次極性を下げながら溶出させ [H_2O ; $\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ (1:1); $\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ (1:4); $\text{MeOH}-\text{EtOH}$ (1:1)], 4 つのフラクション [Fr. 1 (13.2 g), Fr. 2 (19.6 g), Fr. 3 (10.8 g), Fr. 4 (5.5 g)] に分画した. Fr. 4 (アルカロイド画分) については, さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$, 49:1; 19:1; 9:1; MeOH) に付し, Fr. 4-1 (3.75 g, 低極性アルカロイド画分) と Fr. 4-2 (1.33 g, 高極性アルカロイド画分) に分画した.

13. グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤鈎各画分エキスの効果

釣藤鈎エキス各画分 (Fr. 1—Fr. 4) の投与量はすべて 1 g/kg とし, 投与容量が 1.0 ml になるように 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) に懸濁させた. 同様にして Fr. 4-1 (100, 400 mg/kg), Fr. 4-2 (100 mg/kg) を 0.5% CMC-Na 懸濁液として調製した.

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, Fr. 1-4, Fr. 4-1, Fr. 4-2 を経口投与した. その 1 時間後にグルタミン酸を脳室内投与し, 投与後 30 分間行動観察を行った.

14. 低極性アルカロイドの単離, 精製と構造の同定

釣藤鈎 5 kg を使い, 先に述べたと同様の方法により低極性アルカロイド画分 Fr. 4-1 を得た. Fr. 4-1 をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$, 24:1; 9:1; 4:1) により 6 個のフラクション (Fr. 4-1-1—Fr. 4-1-6) に分画した. Fr. 4-1-2 をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane- Me_2CO , 4:1; 3:1; 1:1), Chromatorex NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3-\text{EtOAc}$, 9:1) により精製して, 化合物 4 (153 mg) を得た. Fr. 4-1-5 を Chromatorex NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3-\text{EtOAc}$, 9:1; 6:1; $\text{CHCl}_3-\text{Me}_2\text{CO}$, 9:1), シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane- Me_2CO , 1:1) により精製して, 化合物 1 (360 mg), 2 (331 mg), 3 (290 mg) を得た.

化合物 1 (geissoschizine methylether)——黄褐色粉末, $[\alpha]_D^{25} + 57.8^\circ$ ($c=0.14$, CHCl_3). EI-MS m/z : 366 $[\text{M}]^+$, 351 $[\text{M}-\text{Me}]^+$; IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1705 (C=O), 1635 (C=C); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 168.6, 159.6, 136.1, 134.7, 133.8, 127.3, 126.6, 121.2, 119.2, 118.1, 112.4, 110.7, 108.2, 64.4, 61.7, 58.6, 51.4, 51.3, 36.3, 34.1, 21.4, 13.1.

化合物 2 (hirsuteine)——黄褐色粉末, $[\alpha]_D^{25} + 67.0^\circ$ ($c=0.23$, CHCl_3). EI-MS m/z : 366 $[\text{M}]^+$,

Chart 1

351 $[M-Me]^+$; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} : 1710 (C=O), 1645 (C=C); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 168.7, 159.6, 139.1, 135.9, 132.9, 127.8, 121.3, 119.3, 117.9, 115.2, 111.6, 111.1, 107.9, 61.4, 54.0, 51.2, 51.1, 43.0, 34.0×2 , 31.1, 16.9.

化合物 3 (hirsutine)——黄褐色粉末, $[\alpha]_D^{25} + 54.0^\circ$ ($c=0.22$, CHCl_3). EI-MS m/z : 368 $[M]^+$, 353 $[M-Me]^+$; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} : 1705 (C=O), 1635 (C=C); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 168.9, 159.7, 135.9, 133.1, 127.9, 121.2, 119.3, 117.9, 111.8, 111.1, 107.8, 61.4, 54.1, 51.3, 51.2, 50.6, 38.9, 34.9, 31.7, 24.2, 16.9, 11.3.

化合物 4 (isocorynoxeine)——黄色粉末, $[\alpha]_D^{25} + 7.6^\circ$ ($c=0.11$, CHCl_3). EI-MS m/z : 382 $[M]^+$, 367 $[M-Me]^+$; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} : 1710 (C=O), 1640 (C=C), 1620 (C=O, amide); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 182.0, 168.5, 159.5, 140.2, 139.7, 134.0, 127.5, 125.2, 122.3, 115.3, 112.1, 109.4, 72.0, 61.3, 58.7, 56.9, 54.0, 51.0, 42.5, 37.8, 35.5, 29.6.

15. グルタミン酸誘発痙攣に対する単離されたアルカロイドの効果

単離されたアルカロイドの投与量は, geissoschizine methylether 50, 100, 200 mg/kg, hirsuteine 50, 100, 200 mg/kg, hirsutine 100, 200 mg/kg, isocorynoxeine 100 mg/kg とし, 0.5% CMC-Na 懸濁液として調製した.

6—8 週令 (体重 25—30 g) の ddY 系雄性マウスに, 各アルカロイドを上記の用量で経口投与した. その 1 時間後にグルタミン酸を脳室内投与し, 投与後 30 分間行動観察を行った.

結 果

1. ピクロトキシン誘発痙攣に対する釣藤散及び釣藤鉤の効果

釣藤散エキス, 釣藤鉤エキス経口投与群に, ピクロトキシン誘発痙攣に対する有効性 (間代性痙攣発現までの時間に対する延長効果) は認められなかった (Fig. 1).

2. 電撃痙攣に対する釣藤散及び釣藤鉤の効果

釣藤散エキス, 釣藤鉤エキス経口投与群に, 電撃痙攣に対する有効性 (強直性伸展痙攣持続時間の短縮効果) は認められなかった (Fig. 2).

Fig. 1. Effects of Choto-san and Chotoko Extracts on Picrotoxin-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean $\pm$ S.E. for 5 mice.

Fig. 2. Effects of Choto-san and Chotoko Extracts on Electroshock Convulsion in Mice

Each column denotes the mean $\pm$ S.E. for 5 mice.

3. ストリキニーネ誘発痙攣に対する釣藤散及び釣藤鉤の効果

釣藤散エキス、釣藤鉤エキス経口投与群に、ストリキニーネ誘発痙攣に対する有効性（強直性痙攣発現時間の延長効果）は認められなかった (Fig. 3).

4. グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤散及び釣藤鉤の効果

1) スクリーニング法の設定 釣藤散及び釣藤鉤が抗てんかん薬の一般的なスクリーニング法であるピクロトキシン誘発痙攣、電撃痙攣、ストリキニーネ誘発痙攣に対していずれも無効であった。そこで、てんかん原性獲得過程に興奮性アミノ酸が重要な役割を演じていることが明らかにされていることから、⁶⁾ グルタミン酸誘発痙攣に対する効果を検討した。グルタミン酸は酸性アミノ酸であり、血液-脳関門の形成が未発達である幼若ラットなどでは腹腔内投与により痙攣が誘発されるが、⁷⁾ 成長した実験動物においては血液-脳関門を通過しにくい。⁸⁾ そこでグルタミン酸の投与場所を脳室内とした。投与は軽いエーテル麻酔下マウスを脳定位固定器に固定し、27G注射針を冠状縫合と矢状縫合が交差する点、すなわち bregma より右に 1 mm、深さ 3 mm の位置に挿入して行った。これにより実際に脳室にグルタミン酸が注入されることをまず染色液（ファーストグリーン）を注入し、直後に解剖して確認した。効果

Fig. 3. Effects of Choto-san and Chotoko Extracts on Strychnine-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean $\pm$ S.E. for 5 mice.

Fig. 4. Inhibitory Effect of Ketamine on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean $\pm$ S.E. for 5 mice. ** $p < 0.01$: Mann Whitney U-test when compared with control.

は、グルタミン酸を脳室に投与後に観察される異常行動のうち、発現の再現性が高くその行動発現を容易に観察できる4種の異常行動、四肢筋間代痙攣 (limb myoclonus), 激しい交代性痙攣 (running fit), 強直性屈曲 (tonic flexion), 強直性伸展 (tonic extension) 並びに死亡 (death) を各1ポイントとしてスコア化して評価した。なお、*N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) アントゴニストであるケタミンにより用量依存的なスコアの低下が見られることを確認した (Fig. 4)。

2) グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤散及び釣藤鈎の効果 釣藤散エキス投与群にはグルタミン酸誘発痙攣に対して用量依存的な抑制傾向が見られ、釣藤鈎投与群ではさらに強い抑制効果が認められた (Fig. 5)。このことから、釣藤散、釣藤鈎がグルタミン酸誘発痙攣を抑制し、またグルタミン酸誘発痙攣を抑制する物質が釣藤散、特に釣藤鈎中に存在することが示唆された。

3) グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤鈎単味抜き釣藤散エキスの効果 釣藤鈎単味抜き釣藤散エキス投与群に抑制効果は認められず (Fig. 6), このことから、釣藤散の抑制効果に釣藤鈎が大きく寄与していることが確認された。

4) グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤散構成生薬の効果 釣藤散の各構成生薬のうち、

Fig. 5. Effects of Choto-san and Chotoko Extracts on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean ± S.E. for 8 mice. * $p < 0.05$: Mann Whitney U-test when compared with control.

Fig. 6. Effects of Choto-san Extract without Chotoko on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean ± S.E. for 8 mice.

Fig. 7. Effects of the Crude Drug Extracts Constituting Choto-san on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean ± S.E. for 8 mice.

釣藤鈎以外にも茯苓、半夏、麦門冬に抑制傾向が見られたがいずれも釣藤鈎よりも弱いものであった (Fig. 7).

5. 釣藤鈎中の活性化合物の検索とグルタミン酸誘発痙攣に対する効果 以上より、釣藤鈎中に興奮性アミノ酸拮抗物質が含まれている可能性が示唆された。そこで、興奮性アミノ酸拮抗物質の検索を目的に、釣藤鈎抽出エキスを各種カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、活性物質の単離、同定を試みた。

1) 釣藤鈎の抽出エキスの分画 釣藤鈎を熱水により抽出し、抽出液を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、順次極性を下げながら溶出させ、4つのフラクション (Fr. 1—Fr. 4) に分画した。Fr. 4 (アルカロイド画分) については、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、Fr. 4-1 (低極性アルカロイド画分) と Fr. 4-2 (高極性アルカロイド画分) に分画した。

2) グルタミン酸誘発痙攣に対する釣藤鈎各画分エキスの効果 Fr. 1, Fr. 3 には痙攣抑制傾向が、Fr. 4 には有意な抑制効果 ($p < 0.05$) が認められた (Fig. 8)。さらに、Fr. 4-1, Fr. 4-2 は 100 mg/kg の用量で抑制傾向が見られ、その作用強度は Fr. 4-1 > Fr. 4-2 であった。Fr. 4-1 の 400 mg/kg 投与では顕著な抑制効果 ($p < 0.01$) が認められた (Fig. 9)。これらのことから、Fr. 4-1 (低極性アルカロイド画分) に主要活性化合物が存在することが分かった。

3) 低極性アルカロイドの単離、精製と構造の同定 Fr. 4-1 をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、Chromatorex NH シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物 1 (360 mg), 2 (331 mg), 3 (290 mg), 4 (153 mg) を得た。

4) 単離されたアルカロイドの構造の同定 化合物 1 ($C_{22}H_{26}N_2O_3$; EI-MS m/z 366 $[M]^+$, 351 $[M-Me]^+$), $[\alpha]_D^{25} + 57.8^\circ$ (クロロホルム) は黄褐色の粉末として得られ、ドラージェンドルフ反応に陽性を示した。IR スペクトルでは、エステルカルボニル基 (ν_{max} 1705 cm^{-1}) に基づく吸収を認め、 1H -NMR スペクトルにおいては、 δ 7.48—7.03 に 4H 分の芳香族プロトン、 δ 7.34 (1H, s) と δ 5.41 (1H, q-like, $J=7.1$ Hz) にオレフィンプロトン、 δ 3.81 (3H, s) と δ 3.71 (3H, s) に酸素原子に結合したメチル基のプロトン、 δ 1.55 (3H, d, $J=7.1$ Hz) に二重結合上のメチル基のプロトンに帰属されるシグナルが観測された。以上のデータ並びに ^{13}C -NMR スペクトルを詳細に検討することにより、1 をインドール型アルカロイドである geissoschizine methyl-ether と推定し、標品との TLC 及び 1H -NMR

Fig. 8. Effects of Fractions 1—4 on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean $\pm$ S.E. for 10 mice. * $p < 0.05$: Mann Whitney U-test when compared with control.

Fig. 9. Effects of Fractions 4-1 and 4-2 on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean $\pm$ S.E. for 10 mice. ** $p < 0.01$: Mann Whitney U-test when compared with control.

スペクトルの直接比較により同定した。⁹⁾

同様にして, **2** ($C_{22}H_{26}N_2O_3$; EI-MS m/z 366 $[M]^+$, 351 $[M-Me]^+$), $[\alpha]_D + 67.0^\circ$ (クロロホルム), **3** ($C_{22}H_{28}N_2O_3$; EI-MS m/z 368 $[M]^+$, 353 $[M-Me]^+$), $[\alpha]_D + 54.0^\circ$ (クロロホルム) をそれぞれ hirsuteine, hirsutine と同定した。^{9a, 10)}

化合物 **4** ($C_{22}H_{26}N_2O_4$; EI-MS m/z 382 $[M]^+$, 367 $[M-Me]^+$), $[\alpha]_D + 7.6^\circ$ (クロロホルム) の各種スペクトルデータは, **1—3** とよく類似していたが, IR スペクトル (ν_{max} 1620 cm^{-1}), ^{13}C -NMR (δ 182.0) にアミドカルボニル基に由来する吸収 (シグナル) を認めたことによりオキシインドール型アルカロイドと推定した。さらに, 1H -NMR, ^{13}C -NMR スペクトルを詳細に検討することにより, **4** を isocorynoxine と同定した。^{9a, 10)}

5) グルタミン酸誘発痙攣に対する単離されたアルカロイドの効果 Geissoschizine methylether 投与群では用量依存的な抑制効果が見られ, 200 mg/kg 投与群では有意な抑制効果 ($p < 0.05$) が認められた。Hirsuteine 投与群でも用量依存的な抑制効果が見られ, 100, 200 mg/kg 投与群では有意な抑制効果 ($p < 0.05$) が認められた。Hirsutine 投与群では 200 mg/kg の投与で geissoschizine methylether 50—100 mg/kg 投与量相当と同程度の活性が認められた。Isocorynoxine は収量が少なかったため, 100 mg/kg の投与実験のみ行ったが, その用量で抑制効果は認められなかった (Fig. 10)。

以上のことから, hirsuteine, geissoschizine methylether が活性本体の一部であることが示された。

考 察

本研究は, 釣藤鈎とそれが主薬として配合されている釣藤散のてんかんに対する有効性を明らかにすることを目的に, 各種痙攣モデルに対する効果とそれを指標とした活性成分の同定を試みたものである。

まず, 抗てんかん薬の一般的なスクリーニング法であるピクロトキシン誘発痙攣, 電撃痙攣, ストリキニーネ誘発痙攣に対する効果を検討した。その結果, 釣藤散エキス及び釣藤鈎エキスはいずれの痙攣に対しても無効であった。すなわち, 薬理的には釣藤散, 釣藤鈎はともに, $GABA_A$ - Cl^- チャンネル複合体や $GABA$ トランスアミナーゼなどの $GABA$ 代謝に対して作用を及ぼさないこと, 欠神発作モデル並びに強直間代発作モデルに対して無効であること, 抑制性伝達物質グリシンによる介在性ニューロンへの作用も無いことが分かった。しかしながら, 釣藤鈎の中医学の薬能は「平肝止痙」, 名医別録には「十二の驚癇を主治する」と記載されており, 何らかの抗痙攣作用を有すると推察される。上記3種の実験モデルは, 新薬のスクリーニングで用いられる強力な薬物あるいは刺激による全般性痙攣モデルであり, 作用が緩和で長期投与により有効性を発揮する漢方薬や和漢薬の薬効評価法としては必ずしも適当ではなかったと考えられる。そこでこれらのモデルより相対的に刺激性 (痙攣誘発性) が弱く, 長期投与やてんかん原性獲得過程をも含んだモデルが漢方薬あるいは和漢薬の薬効評価により適すると推定さ

Fig. 10. Effects of Isolated Compounds on Glutamate-Induced Convulsion in Mice

Each column denotes the mean ± S.E. for 10 mice. * $p < 0.05$: Mann Whitney U-test when compared with control.

れた。最近の研究により、興奮性アミノ酸受容体複合体の反復する活性化がてんかん原性過程に重要な役割を演じていること、¹¹⁾ さらに、てんかんの病態においても本質的には興奮性アミノ酸受容体が深く関与していることが明らかになっている。⁶⁾ そこで、興奮性アミノ酸であるグルタミン誘発痙攣に対する釣藤散、釣藤鈎の効果を検討した。まず、グルタミン酸の脳室内投与法によるスクリーニング法を確立した後、その方法による釣藤散エキス、釣藤鈎エキス、釣藤鈎単味抜きエキス、釣藤散構成生薬エキスの痙攣抑制効果について検討した。釣藤散はグルタミン酸誘発痙攣に対して抑制傾向を示し、釣藤鈎はさらに強い抑制効果を示した。釣藤鈎単味抜き処方では抑制効果は全く認められなかった。釣藤散各構成生薬では、茯苓、半夏、麦門冬に弱いながら抑制傾向が認められたが、いずれも釣藤鈎エキスよりも弱いものであった。これらより、釣藤散の興奮性アミノ酸への抑制効果は釣藤鈎の存在によりはじめて発揮され、釣藤散構成生薬の中で釣藤鈎が最も重要な役割を演じていること、そして、釣藤鈎中に興奮性アミノ酸のアンタゴニストが存在する可能性があることが示された。

そこで次に、釣藤鈎中に存在すると推定された活性化合物の単離、構造の同定を試みた。水抽出エキスの粗画分では低極性アルカロイド画分に有意な抑制効果が認められ、さらに、低極性アルカロイドカラム画分をカラムクロマトグラフィーにより分離、精製したところ、3種のインドール型アルカロイド、geissoschizine methylether (1), hirsuteine (2), hirsutine (3) と1種のオキシインドール型アルカロイド、isocorynoxine (4) が単離された。

この4種のアルカロイドについて、グルタミン酸誘発痙攣に対する効果を検討したところ、geissoschizine methylether, hirsuteine に用量依存的な抑制効果が認められ、この2種のアルカロイドが活性本体の一部であることが示された。特に、hirsuteine は200 mgの経口投与で、NMDAの非競合的アンタゴニストであるケタミン40 mg腹腔内投与と同程度の強い活性を示した点は注目に値する。釣藤鈎に含まれる中枢抑制活性成分として、hirsutine, hirsuteine (マウスのメタンフェタミン誘起自発運動亢進に拮抗、ヘキソバルビタール睡眠延長作用)、¹²⁾ rhynchophylline (ヘキソバルビタール睡眠延長作用)、¹²⁾ geissoschizine methylether (ペントバルビタール睡眠延長作用) などが知られているが、¹³⁾ geissoschizine methylether, hirsuteine が抗痙攣作用を示すことの報告は初めてである。また、hirsuteine はhirsutineのC-19, -20位が二重結合になっただけの類似化合物であるが、活性に大きな差が認められたことは興味深い。

なお、今回実験に使用した釣藤鈎からは主要成分としてオキシインドール型アルカロイドであるrhynchophyllineが単離されず、含まれている主アルカロイド成分がインドール型アルカロイドのgeissoschizine methylether, hirsuteine, hirsutineであったことから、その基原はカギカラ (*Uncaria rhynchophylla*) でなく *U. sinensis* と考えられる。¹³⁾ 現在、釣藤鈎のほとんどは中国からの供給に依存しており、中国国内において薬用種としておよそ10種が流通していると言われている。今回、唯一単離されたオキシインドール型アルカロイドであるisocorynoxineに活性が認められず、インドール型アルカロイドのhirsuteine, geissoschizine methyletherに活性が認められたことにより、薬効を考慮に入れた釣藤鈎の正品としての基原種を特定する必要があるものと考えられる。

以上、本研究により、釣藤散及び釣藤鈎が主薬として配合されている釣藤散の興奮性アミノ酸が誘発痙攣に対する有効性、さらにその活性本体と考えられる化合物が明らかとなり、釣藤散の抗てんかん薬としての応用の可能性を示唆された。今後の課題として、活性化合物が興奮性アミノ酸レセプター複合体に直接作用しているのかどうか確かめるため、各種放射性リガンドによる受容体結合実験などの *in vitro* 実験系を含めた薬理学的精査が必要であるが、興奮性

アミノ酸アンタゴニストは抗てんかん薬としてのみならず、虚血性神経細胞死、アルツハイマー病の予防、治療薬¹⁴⁾としての応用が可能と考えられ、さらなる研究に興味が持たれる。

謝辞 Geissoschizine methylether, hirsuteine, hirsutine, isocorynoxine の標品及び ¹H-NMR スペクトルを御恵与下さいました千葉大学薬学部 相見則郎教授、高山廣光助教授に深く感謝致します。

引用文献

- 1) 清野昌一, 神経精神薬理, **13**, 509—517 (1991).
- 2) 兼子 直, 神経精神薬理, **13**, 585—596 (1991).
- 3) 清野昌一, 神経精神薬理, **13**, 202—205 (1991).
- 4) 中山医学院編, 神戸中医学研究会訳・編, “漢薬の臨床応用,” 医歯薬出版, 東京, 1993, pp. 427—428.
- 5) 藤平 健, 山田光胤, “実用漢方処方集,” 薬業時報社, 東京, 1989, pp. 289—290.
- 6) 秋山一文, 伊藤 高, 米田幸雄, 神経精神薬理, **13**, 837—845 (1991).
- 7) Johnston G. A. R., *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 137—140 (1973).
- 8) Bhagavan H. N., Coursin D. B., Stewart C. N., *Nature* (London), **232**, 275—276 (1971).
- 9) a) 相見則郎, 現代東洋医学, **8**, 53—58 (1987); b) Aimi N., Yamanaka E., Shinma N., Fujiu M., Kurita J., Sakai S., Haginiwa J., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2067—2071 (1977).
- 10) 萩庭丈寿, 坂井進一郎, 相見則郎, 山中悦仁, 新聞信夫, 薬学雑誌, **93**, 448—452 (1973).
- 11) 片山かほる, てんかん研究, **8**, 133—142 (1990).
- 12) a) 矢野真吾, 現代東洋医学, **8**, 47—52 (1987); b) 尾崎幸紘, 日薬理誌, **94**, 17—26 (1989).
- 13) 榊原 巖, 高橋宏之, 譲原光利, 加藤孝之, 久保正良, 林 紘司, 石毛 敦, 雨谷 栄, 岡田 稔, 丸野政雄, *Nat. Med.*, **51**, 79—83 (1997).
- 14) 片岡喜由, 三谷 章, 神経精神薬理, **13**, 829—836 (1991); 三好理絵, *ibid.*, **13**, 847—853 (1991).