和漢薬作用に関する薬学的基础研究 (第 12 報¹⁾) 漢薬麝香の β -アドレナリン
増強活性因子の薬理学的探索とその臓器選択的活性²⁾

木村正康, 脇 功巳, 稲垣甚一郎

富山医科薬科大学薬学部³⁾

Fundamental Research on the Pharmacological Activity of Oriental Drugs. XII.¹⁾

Pharmacological Research on β -Adrenergic Potentiation Factors
included in Musk and Their Organ-Selective Activity²⁾

MASAYASU KIMURA, ISAMI WAKI, and JIN-ICHIRO INAGAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University³⁾

(Received August 31, 1977)

Potentiation of β -adrenergic responses by musk, an animal-origin drug, has been studied mainly in cat papillary muscle preparations driven by electric stimulation (10 V, 0.8 msec, 0.4 Hz). In order to isolate the β -adrenergic potentiation factors, musk (20 g) was extracted and the potentiation activity of each fraction was assayed, using the cardiac muscle. The resultant fraction W_{5-a} (64 mg) was homogeneous as judged by thin-layer chromatography. Dialyzed W_{5-a} was soluble in ethanol and water but not in ether. The β -adrenergic potentiation of the cardiac muscle induced by W_{5-a} was not due to the inhibition of catechol-O-methyl transferase (COMT) from the following facts: Parallelism between the COMT-inhibition activity and the β -adrenergic potentiation activity was not observed among the lots of musk tested, a purified musk fraction was a weaker inhibitor of COMT activity than the crude, and musk induced a potentiation of isoproterenol (IsP) to the same extent even in the high doses by which the inhibitory effect of pronethalol was surmounted. On the other hand it was observed that the purified fraction did not potentiate IsP-induced relaxation of smooth muscle preparations of trachea and taenia coli in guinea pigs. The crude musk itself potentiated the effect of IsP but not that of salbutamol which is well known as a COMT-resistant β -agonist. To conclude, the β -adrenergic potentiation induced by W_{5-a} in musk was very selective to cardiac muscle, and also there may be other factors in musk which induce the β -adrenergic potentiation in tracheal muscle, at least in part due to the COMT-inhibitory activity.

Keywords— β -adrenergic potentiation; organ-selective activity; musk; papillary muscle; tracheal muscle; COMT inhibition; isoproterenol; salbutamol

漢薬麝香は日本薬局方第 2 部に記載されている動物性生薬の一つで、ジャコウジカの雄のジャコウ腺分泌物を乾燥したものである。神農本草経には上品中に記載され、古代から亢奮、強心の作用が認められている。わが国では家庭薬の原料として現在も珍重されている高価な生薬である。

著者らは民間薬方剤六神丸の複合作用⁴⁾の研究が動機となって、この麝香の粗水溶性画分がネコ乳頭筋におけるカテコールアミンの陽性変力効果を増強することを見出した。⁵⁾ この麝香によるカテコールアミン増強作用は、isoproterenol (IsP) の効果に対して最も強く、心臓以外にも気管平滑筋、輸精管平滑筋における β -アドレナリン効果を増強した。一方、血管、輸精管平滑筋の α -アドレナリン効果は増強せず、その機作として cocaine 様の noradrenaline store への uptake 抑制に基づくものでないことを明らかにした。

本研究は麝香中のこの増強活性因子の単離、精製を試み、麝香によるカテコールアミン増強作用様式を特に

1) 第 11 報: 木村正康, 脇 功巳, 石田 貢, 薬誌, 98, 442 (1978).

2) 日本薬学会第 91 年会で 1 部発表, 福岡, 1971 年 4 月.

3) Location: Sugitani, Toyama.

4) 木村正康, 長田永三朗, 脇 功巳, 薬誌, 88, 125 (1968).

5) 木村正康, 脇 功巳, 池田浩子, 薬誌, 88, 130 (1968).

catechol-O-methyl transferase (COMT) 阻害作用との関連⁶⁾ において明らかにすることを目的としている。抽出操作は 1 段階進むごとに増強比活性の増加をネコ乳頭筋を用いた実験において確認し、この方法を順次くりかえして抽出の方向を選定し進展させていった。その結果、ネコ乳頭筋における IsP の効果を増強する画分を薄層クロマトグラフィーで単一になるまで精製することができた。この画分の心臓における増強作用は COMT 阻害によるものでないことを明らかにしたが、この精製画分は気管平滑筋における IsP の弛緩効果を増強しないことが認められた。乳頭筋と気管平滑筋では異なる麝香成分が主体となって β -効果増強を生じていることが明らかになった。

実験の部

実験方法

乳頭筋標本実験 前報⁵⁾ と同様に Cattel⁷⁾ の方法に従い行なった。ネコ (♂, ♀, 0.5—1.5 kg) を pento-barbital 30 mg/kg の腹腔内注射で麻酔し、心臓を摘出して右心室の最大直径 1—1.5 mm の乳頭筋を取り出し、一端を固定し他端を strain gauge transducer に接続した。初期張力 0.5 g を負荷し、電気刺激を 10 V, 0.8 msec, 0.4 Hz の条件で与えて生じた張力をインク書きオシログラフに記録した。反応槽の温度は 37° に保ち、栄養液は Lock 液を使用した。反応記録は用量を cummulation 法で投与して用量反応曲線を得た。 β -アドレナリン増強効果は、麝香画分 10 分間前処理による同一標本の用量-反応曲線の移動距離から算出した。

気管および Taenia Coli 平滑筋標本実験 気管, taenia coli はともにモルモット (♂, 350—450 g) を用い、気管は spiral 状標本を作製して 38° で, taenia coli は 26° で Magnus 装置を用いて isotonic に記録した。反応記録法、増強効果の算出法は乳頭筋の場合と同様である。

COMT 抑制実験 Eisenfeld ら⁸⁾ の方法に従い、³H-IsP を用いて行なった。ラット心臓を等張 KCl 液中でホモジネートした上澄を COMT 標品として使用し、薬物処理はリン酸緩衝液 (pH 8.0) 中にて 37° 20 分間行なった。次に ³H-IsP, S-adenosyl-L-methionine iodide, MgCl₂ をそれぞれ 10 ng/ml, 0.1 mg/ml, 2 mg/ml となるように加えて COMT 活性を調べた。各薬物存在下における COMT 活性は薬物無処理における活性を 100 とした相対値で表記した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 吸着剤としてシリカゲル (Wakogel B-5) を用い、3 種類の展開溶媒 EtOH-AcOEt (2:8), BuOH-AcOH-H₂O (5:1:4, 上層), CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, 移動相として上層) を用いて室温で 10 cm 展開した。呈色試薬として 10% H₂SO₄, ninhydrin 液, Dragendorff 液, FeCl₃ 液を用いた。

Chart 1. Route for Fractionation of Musk and the Yield Weight of the Fraction

- 6) A.J. Kaumann, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **173**, 383 (1970); R.E. Giles, J. W. Miller, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **157**, 55 (1967).
- 7) M.K. Cattel, H. Gold, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **71**, 114 (1941).
- 8) A.J. Eisenfeld, L. Landsberg, J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **158**, 378 (1967).

実験材料

麝香は市販のネパール産を用いた。麝香中の β -アドレナリン増強活性因子を得るために序に述べた方針で種々の抽出、分画法を比較検討した結果、Chart 1 に集約できた。

i) エーテル抽出 麝香 M_0 を精製エーテルにて 3 回 (毎回 300 ml, 計 60 時間) 抽出する。エーテルを留去して麝香臭のある赤かっ色、水あめ状の画分 E_1 とエーテル不溶画分 E_2 を得た。

ii) エタノール抽出 E_2 を精製エタノールにて 4 回 (毎回 100 ml, 計 48 時間) 40° の水浴中で温浸抽出する。エタノールを減圧留去し、黒かっ色吸湿性に富んだ画分 A_3 とエタノール不溶画分 A_4 を得た。

iii) 蒸留水抽出 A_3 を蒸留水にて 3 回 (毎回 10 ml, 計 3 時間) 室温で抽出する。抽出液は凍結乾燥し橙黄色、吸湿性に富んだ画分 W_5 と蒸留水不溶性画分 W_6 を得た。

iv) アルミナカラムクロマトグラフィーによる分画 W_5 (0.15 g) を少量の精製エタノールに溶解し、これに蒸留水、メタノールで洗浄し 150° で活性化した中性アルミナ (Merck 社製) 5 g を充填したカラムの上部に吸着させた。エタノールで展開し溶出液を 50 ml 分取し、 40° 以下で減圧濃縮して淡黄色、吸湿性の画分 W_{5-a} 16 mg を得た。次に展開液を蒸留水に変えて展開し、溶出液を 50 ml 分取し凍結乾燥して橙色の画分 W_{5-b} 10 mg を得た。なお Chart 1 には比較の便宜上この操作を 4 回繰り返して W_5 600 mg 全量を使用した場合の W_{5-a} 、 W_{5-b} の収量が表記してある。

実験結果

麝香画分の乳頭筋における増強効果

Chart 1 に示した麝香とその画分を乳鉢内で蒸留水を加えてよくすりつぶすと溶解または懸濁させることができる。この各溶液を作用濃度 1×10^{-4} g/ml となるように反応槽に加える。各画分いずれも乳頭筋に単独直接作用は観察されない。作用時間 10 分後に IsP の用量-反応曲線を得て ED_{50} 値を読み対照の同一標本の ED_{50} 値との比を求めて Fig. 1 にまとめて示した。増強効果を比較すると $E_2 > M_0 > E_1$, $A_3 > E_2 > A_4$, $W_5 > A_3 > W_6$, $W_{5-a} > W_5 > W_{5-b}$ となり結局 $W_{5-a} > W_5 > A_3 > E_2 > M_0$ の順となった。 β -効果増強活性が分画の進行につれて確かに増加している。最終画分 W_{5-a} の濃度を変えて IsP の用量-反応曲線に対する増強効果を同一標本で検討し、その結果を Fig. 2 に示した。増強効果を ED_{50} 値の比で表現してみると 1×10^{-5} g/ml, 3×10^{-5} g/ml, 1×10^{-4} g/ml の各濃度においてそれぞれ 1.3 倍, 3.7 倍, 7.9 倍の値が得られた。この濃度範囲内では直線的に効果が増加し、濃度依存的増強効果が見出された。

W_{5-a} 画分の純度と物性

麝香画分の純度を TLC で検討し、その結果の 1 部を Fig. 3 に示した。 W_5 画分には 10% 硫酸加熱呈色反応陽性の 1 スポットと ninhydrin 反応陽性の 3 スポットが確認されたが、 W_{5-a} 画分は硫酸加熱呈色反応陽性の 1 スポットのみであった。展開溶媒を EtOH-AcOEt (2:8), $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (65:35:10, upper layer as moving phase) に変えても硫酸加熱呈色反応では 1 スポットしか検出できなかった。また呈色試薬を ninhydrin 液, Dragendorff 液, $FeCl_3$ 液と変えるといずれの場合も反応陽性のスポットは検出できなかった。 W_5 で検出さ

Fig. 1. Pharmacological Research on the Potentiation Factors in Musk

Potentiations of inotropic responses to isoproterenol by musk fractions were studied in cat papillary muscles driven by electrical stimulation (10 V, 0.8 msec, 0.4 Hz). The potentiation ratios were represented in parentheses.

Note: The selective potentiation activity was gradually increased along with fractionation ($M_0 < E_2 < A_3 < W_5 < W_{5-a}$).

Fig. 2. Effects of Various Doses of Musk Fraction W_{5-a} on Cumulative Dose-Response Curves Induced by Isoproterenol in Cat Papillary Muscles

A typical result of a group of curves obtained with the same preparation was shown.

Note: The curves were shifted dose-dependently to left by fraction W_{5-a} .

Fig. 3. Thin-Layer Chromatogram of Musk Fractions

Plate: Wakogel B-5.

Solvent: BuOH-AcOH- H_2O (5:1:4, upper layer).

Detection: $\odot$, 10% H_2SO_4 , heat;

$\circ$, ninhydrin reagent.

TABLE I. Non-parallelism between COMT Inhibition and IsP Potentiation Activity

Drugs	Concn. g/ml	COMT Activity ^{a)} %	IsP potentiation ^{b)} fold
Control		100 ± 1	1
Musk #1	1 × 10 ⁻⁴	88 ± 1	3.1
Musk #2	1 × 10 ⁻⁵	75 ± 4	1.1
	1 × 10 ⁻⁴	34 ± 4	1.5
Musk #2 W_5	1 × 10 ⁻⁴	85 ± 1	3.1
Pyrogallol	1 × 10 ⁻⁵	30 ± 1	2.8

a) Rat heart homogenates were incubated with H^3 -IsP (10 ng/ml) and S-adenosyl-L-methionine iodide at 37° for 10 min with or without a drug. Each value represents a mean (±S.E.) for 5–8 experiments.

b) IsP potentiation was assayed using cat papillary muscles driven by electrical stimulation. Each value represents a mean for 2 experiments.

TABLE II. Effects of Pronethalol on Potentiation^{a)} of Isoproterenol in Cat Papillary Muscles

	Musk 1 × 10 ⁻⁴ g/ml	Pyrogallol 2 × 10 ⁻⁵ g/ml
Pronethalol		
0 × 10 ⁻⁷ g/ml	2.9 ± 0.2	3.7 ± 0.5
2.5	2.8	
5	3.0 ± 0.1	
10	2.9	2.4 ± 0.2

a) Each value represents a mean (±S.E.) potentiation ratio for 2–4 experiments.

れたninhydrin 反応に陽性の 3 スポットは W_{5-b} に検出され、両者の分離をアルミナカラムクロマトで行ない得たことを示した。

TLC で単一だった W_{5-a} は水, MeOH, EtOH 可溶で AcOEt, CH_3COCH_3 , CH_2Cl_2 , C_6H_6 , ether 不溶の極めて吸湿性に富んだ物質である. またこの画分は紫外部 275 m μ での吸収があり, visking の透析膜を通過した.

麝香の増強効果と COMT 阻害効果との関連

麝香の β -アドレナリン増強作用が麝香成分による COMT 阻害による可能性について検討した. まずラットホモジネート中の COMT 活性を阻害するかどうかを検討し, Table I を得た. 麝香には lot によって COMT

阻害活性の強く認められるもの (#2) とほとんど認められないもの (#1) があることが明らかとなった. そこで両者の増強活性を検定したところ, COMT 阻害活性の弱い #1 の麝香の方が逆に増強活性が強かった. #2 の麝香から精製した W_5 画分は β -効果の増強活性は確かに増加していたが, COMT 阻害活性は逆に減少していた. 以上の実験的事実は β -アドレナリン増強作用は COMT 阻害によるのが主体でないことを示している.

高濃度 IsP 反応の増強効果

COMT 阻害による増強は対象の agonist の濃度が高い条件下においては出現し難いことが報告されている.⁶⁾ この点に関して競合的拮抗薬 pronethalol を共存させて IsP の用量-反応曲線を高濃度側に shift させた条件においては麝香の増強効果が変化するかどうかで検討した. 結果を比較対照として得た COMT 阻害作用の明らかな pyrogallol⁹⁾ の結果とまとめて Table II に示した. Py-

Fig. 4. Effects of Musk on Cumulative Dose-Response Curves Induced by Salbutamol in Cat Papillary Muscles

Each point represents a mean for 3 experiments.
Symbols: —○—, control; —●—, with musk M_0 (1×10^{-4} g/ml).
Note: An inotropic effect of salbutamol was not quite potentiated by musk.

Fig. 5. Comparison between Musk and Its Fraction W_5 on Potentiation of Relaxation Responses to β -Agonists

Cumulative dose-response curves were isotonicity (1 g) obtained in guinea pig tracheal muscles at 37°. Each point represents a mean for 3—4 experiments.

Symbols: —○—, control; —●—, with musk M_0 (1×10^{-4} g/ml) or musk W_5 (5×10^{-5} g/ml)

Note: In tracheal muscles, the fraction W_5 could not induce the potentiations of β -agonists.

Fig. 6. Effects of Musk Fraction W_5 on Relaxation Responses to β -Agonists in Taenia Coli

Cummulative dose-response curves were isotonicly (200 mg) obtained in guinea pig taenia coli muscles at 26°. Each point represents a mean for 2—4 experiments.

Symbols: —○—, control; —●—, with W_5 (5×10^{-4} g/ml).

Note: Neither of smooth muscle relaxations induced by IsP and Sal. were potentiated by the fraction W_5 .

rogallol による増強は 1×10^{-6} g/ml の pronethalol の共存下 (IsP の用量-反応曲線が約 30 倍高濃度側に shift される) においては明らかにその増強活性の減少が認められたが、麝香の効果は不変であった。以上の事実は麝香による心臓の β 効果の増強は COMT 阻害が主体でないというさきの結果を裏付けた。

Salbutamol 反応の増強効果

Salbutamol (Sal.) は Lands ら¹⁰⁾ の β_2 -receptor に選択的でしかも COMT 抵抗性の agonist として報告されている。¹¹⁾ この薬物の効果を麝香が増強するかどうかをまず乳頭筋を用いて検討した結果を Fig. 4 に示した。Sal. はネコ乳頭筋において心収縮促進的に作用するも効果は弱く ED_{50} 値は 5×10^{-7} g/ml 付近であり、IsP に対する固有活量は 0.85 であった。この Sal. の反応を麝香は全く増強せず、むしろ拮抗とも判断されるデータが得られた。そこで β_2 -効果として知られている気管平滑筋¹⁰⁾ を用いた実験を計画し、Fig. 5 の結果を得た。麝香の粗水溶液を用いた実験では確かに IsP の弛緩反応が増強され前報⁵⁾ の結果が再確認できかつ Sal. の反応は全く増強されなかった。しかしながら麝香の精製画分の効果を検討したところ、まず単独直接作用として収縮が若干認められ、次に Sal. はもちろんのこと IsP の反応も増強されないことが見出された。データ上に現われた W_5 画分による IsP の拮抗現象は、単独直接作用の収縮が関与した現象であると判断している。以上の事実は気管において認められていた麝香による増強作用は、心臓において認められ精製されてきた成分とは異なる物質によることを意味する。粗抽出液が Sal. の反応を増強しないことから気管における増強作用には COMT 阻害の可能性が考えられる。

Taenia Coli 平滑筋における増強効果

気管平滑筋の場合と異なって taenia coli 平滑筋においては単独直接作用が認められなかった。そこで taenia coli 平滑筋における IsP, Sal. の弛緩効果に対して W_5 画分の増強作用を検討して Fig. 6 を得た。 W_5 の 10 分間前処理において、いずれの用量-反応曲線も有意に左方に移動せず、気管における結果を裏付けた。

考 察

前報⁵⁾ において報告した麝香の β -アドレナリン増強作用について、その機作をさらに明らかにするために麝香中の増強活性因子の精製を試みた。精製過程が 1 段階進むごとに元の画分と新しく分画された画分の両方の増強活性を検定して活性が分散しないように留意して精製を進展させた。実際活性の分散は A_4 画分へ若干認められたにすぎない。このように物性に基いた分別よりも、生物活性に重点をおいた精製法によると、確かに増強比活性の増加が認められ、 1×10^{-4} g/ml での効果が 2.3 倍から 8.1 倍へと増加した。 W_{5-8} の増強効果に関する濃

10) A.M. Lands, A. Arnold, J.P. McAuliffe, F.P. Ludena, T.G. Brown, Jun., *Nature*, **214**, 598 (1967).

11) V.A. Cullum, J.B. Farmer, D. Jack, G.P. Levy, *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, **35**, 141 (1969).

度-反応曲線の傾きを利用して計算すると活性の増加は 5 倍となった。

麝香のこの精製画分による増強作用機作の可能性として、麝香粗水溶液において認められた COMT 阻害活性との関係を検討した。実験が進展するに従い、この心臓における IsP の反応を増強する画分が、気管さらには *taenia coli* における IsP の弛緩効果を増強しないことが見出された。さらに M_0 の段階においてすでに Sal. の弛緩効果が増強されないことが確認された。Sal. は COMT 抵抗性であり、 M_0 は W_5 より COMT 阻害活性が強いという事実から、気管においてみられた M_0 による β 効果増強作用機作としては COMT 阻害による可能性が強い。したがって麝香には心臓に対する β 効果増強作用物質以外に、気管に対する β 効果増強作用物質が別個に存在していることが示唆され、それはおそらく A_4 画分に集約されているものと考えられる。

一方心臓においてみられた β 効果の増強作用機作としては COMT 阻害による作用では十分説明できないことを明らかにし得た。前報⁵⁾ですでに store の関与のないことを明らかにし得ているので残るは β -アドレナリン受容体そのものか、それに関連する物質系に対する直接作用機作の可能性である。心臓において増強活性が認められ、気管において認められなかった事実より大きく二つに分けて研究できよう。一つは β_1 -receptor に特異的な機構に作用するが β_2 -receptor には作用しないと仮定する場合で、他方は収縮作用に特異的な β -機構に関与するものであって弛緩作用には関与しないと仮定する場合である。本研究においては、少なくとも麝香 W_5 画分の β -効果増強作用は心臓に臓器選択性をもつと結論できる。しかも、この心臓における β -アドレナリン効果の増強作用は未知の機作による可能性が強いといえる。

謝辞 平滑筋標本実験に技術的協力を得た橋本弘孝氏、salbutamol の提供を得た（株）三共に感謝する。