

Ⅱ－２ 脊髄損傷に有効な和漢薬の活性成分の同定

富山大学・和漢医薬学総合研究所・和漢薬製剤開発分野

客員教授 紺野勝弘

【研究の目的とその背景】

脊髄損傷に対する薬物療法について、多くの研究が行われているが、未だ有効な治療法は確立されていない¹⁾。たとえば、臨床的対処としてステロイド剤の大量投与が試みられているが、その有効性は疑問視されている。また、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を応用した再生医療が有望視され、基礎研究が進められているが、実用化には更なる研究の進展を待たなければならない。このような現状の中、本研究代表者の東田らは、伝統薬物成分が脊髄損傷改善の有効な薬剤になり得る可能性を示している。東田らは、和漢生薬をはじめとした伝統薬物の神経変性疾患改善作用に関する基礎研究を積み重ねてきているが²⁾、その一環として、アユルベーダ薬物である Ashwagandha (インド人参, *Withania somnifera* の根) に含まれるステロイドサポニン Withanoside IV が、記憶障害改善作用と共に脊髄損傷マウスの運動機能を回復させる効果があることも明らかにした³⁾。

これらの結果から、和漢生薬は脊髄損傷改善に有効な薬物素材と考えられるが、これまでその観点からの研究は行われていない。そこで、本研究では、各種和漢生薬エキスを対象にして脊髄損傷改善作用の薬理活性を検討し、活性成分の同定と作用機序の分子的解明を目指す。

昨年度、4種の和漢生薬エキス(人参, 黄耆, 刺五加, 桂枝朮)について薬理活性試験(大脳皮質神経細胞における神経突起伸展作用, プロテオグリカン濃度勾配を持つ軸索終末部における軸索再生活性)を行い、有意の活性を示すことがわかった。そこで今年度、対象を広げて110種の和漢生薬エキスについてスクリーニングを行なったところ、3種(苦参, 牛膝, 連翹)に強い軸索再生活性が認められた。さらに、うち2種(苦参, 連翹)は、脊髄損傷マウスの運動機能を有意に回復させた(東田, 久保山の報告参照)。これら3種の生薬エキスの活性成分同定を目指し、溶媒による分画を行ない、各分画の成分プロファイルをLC-MSにより検討した。

【実験方法】

1. 和漢生薬エキスの溶媒分画

生薬約45 gを秤量した後、水900 mLを加え、煎じ器(ウチダ和漢薬製)を用いて抽出した。溶媒が沸騰するまで強火で加熱し(10~15分)、その後とろ火で計1時間になるように加熱した。茶こしでろ過した後、熱時綿栓ろ過し、ろ液を室温まで放冷後、凍結乾燥。得られた粗抽出物を300 mLの

水に溶かし、酢酸エチル (100 mL x 2) で抽出。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去して、酢酸エチル分画を得た。水層にアンモニア水を加えて塩基性とし (pH~10)、クロロホルム (100 mL x 2) で抽出。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去して、アルカロイド分画を得た。残った水層を凍結乾燥し、水分画を得た。

2. LC-MS 分析

PDA 検出器付 Accela HPLC システム (Thermo Scientific) と ESI プローブ付 LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) をタンデムにつないだ LC-MS システムを用いた。検出はフォトダイオードアレイと MS の同時検出。

i) サンプル調製

凍結乾燥した水分画を純水に溶解し、フィルターでろ過し、LC-MS 用サンプルとした。乾燥した酢酸エチルおよびアルカロイド分画は、50%メタノール水に溶解し、同様にフィルターでろ過し、LC-MS 用サンプルとした。すべてのサンプルは 5 mg/mL の濃度になるよう調製し、その 10 μ L を LC に注入した。

ii) LC 条件

カラム：CAPCELL PAK C18 MGIII (資生堂), 5 μ m, 1.5 mm x 150mm

カラム温度：25 $^{\circ}$ C

移動相：A 液 (0.1%ギ酸/水), B 液 (0.1%ギ酸/アセトニトリル)

溶離条件：直線濃度勾配によるグラジエント (10 \rightarrow 70%B/30分)

検出：全UV (200-600 nm)

流速：200 μ L/分

iii) MS 条件

ネブライザーガス：窒素 (30 psi, 10 L/分, 350 $^{\circ}$)

測定範囲：50-2000 amu

検出：正イオンモード

【結果】

1. 和漢生薬エキスの溶媒分画

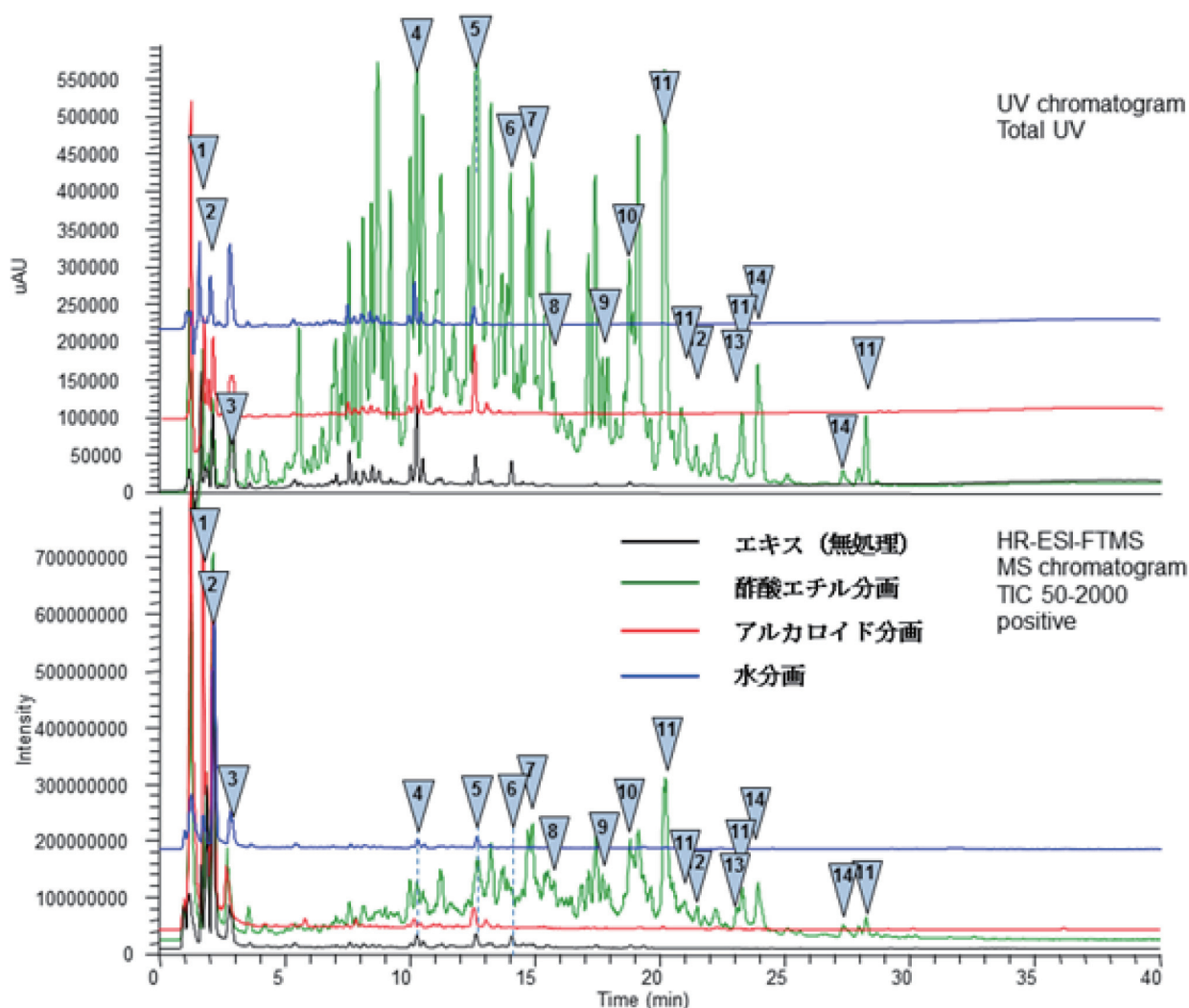
結果を以下の表に示す。牛膝が最も収量が高く、他 2 種の 5 倍近い。アルカロイド分画の収量も高い。しかし、いずれも水分画が最も多く、80-90%を占める。酢酸エチル分画の収量は非常に低いが、連翹だけアルカロイド分画より多いのが特徴的である。現在、各分画の活性を試験中。

各生薬エキスからの溶媒分画による収量

	苦参		牛膝		連翹	
	収量 mg	比率 %	収量 mg	比率 %	収量 mg	比率 %
酢酸エチル分画	57	2	189	1	319	10
アルカロイド分画	425	15	3040	20	88	3
水分画	2411	83	12016	79	2667	87
計	2893		15245		3074	

2. LC-MS 分析

例として、苦参の L-MS プロファイルを示す。



酢酸エチル分画に多くの成分が移行し、MS および MSMS 解析によって、以下に示す14種の化合物が同定できた。

No.	化合物名	計算値 [M+H] ⁺	実測値 [M+H] ⁺
1	Matrine/Isomatrine	249.1969	249.1960
2	Oxymatrine	265.1918	265.1909
3	9 α -Hydroxymatrine/Sophoranol	265.1918	265.1910
4	Kushenol O	563.1764	563.1755
5	Trifolirhizin	447.1291	447.1284
6	Trifolirhizin malonate	533.1295	533.1287
7	Kuraridinol/Kurarinol	457.2227	457.2217
8	Sophoraisoflavanone A	371.1495	371.1488
9	Norkurarinol /Kosamol O	443.2070	443.2064
10	Kushenol I/Kushenol N	455.2070	455.2062
11	Kurarinone/Kushenol C/Isokurarinone/Kuraridine	439.2121	439.2113
12	Sophoraflavanone B	341.1389	341.1380
13	Methoxykurarinone	453.2278	453.2262
14	Sophoraflavone G/ Sophoraflavanone C	425.1965	425.1955

現在、これらの情報をもとに、HPLC をはじめとした種々のクロマトグラフィーを用いて、活性成分の分離・精製を進めている。

【考察】

今回、110種の和漢生薬エキスのスクリーニングから、3種（苦参，牛膝，連翹）の活性の強いエキスを選び、溶媒分画および得られた分画のLC-MSによる成分プロファイル分析を行った。ここで得られた情報をもとに、活性成分を分離・精製し、活性物質を同定できれば、新しい和漢薬の展開、あるいは創薬への発展が期待できる。

【参考文献】

- 1) Tohda C. and Kuboyama T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacol. Ther.* (2011) **132**, 57-71.
- 2) 東田千尋：伝統薬物による神経変性疾患の克服-治療薬開発と病態機序の解明に向けて-, 薬学雑誌 (2008) 128, 1159-1167.
- 3) Nakayama N. and Tohda C. Withanoside IV improves hindlimb function by facilitating axonal regrowth and increase in peripheral nervous system myelin level after spinal cord injury. *Neurosci. Res.* (2007) **58**, 176-182.