

Receptor Binding Assay 法を用いた薬用植物中の活性成分の研究
(第2報) Dopamine 2 Receptor

隅田利彦,^a 杉本廣之,^a 不破 亨,^a 山崎和男,^b 武田 理,^b
神田博史,^{b,*} 仲田義啓,^b 瀬川富朗,^b 周 俊^c
湧永製薬中央研究所,^a 広島大学医学部,^b 昆明植物研究所^c

Studies on Active Constituents in Medicinal Plants Using the Receptor
Binding Assay. II. Dopamine 2 Receptor

TOSHIHIKO SUMIDA,^a HIROYUKI SUGIMOTO,^a TOHRU FUWA,^a KAZUO YAMASAKI,^b
OSAMU TAKEDA,^b HIROSHI KOHDA,^{b,*} YOSHIHIRO NAKATA,^b
TOMIO SEGAWA,^b and JUN ZHOU^c

The Central Research Laboratories, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.,^a 1624
Shimokotachi, Koda-cho, Takata-gun, Hiroshima 729-64, Japan, Institute of
Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine,^b
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan and
Kunming Institute of Botany, Academia Sinica,^c
Kunming, Yunnan, China

(Received November 27, 1987)

The methanol (MeOH) extracts from 36 crude drugs or medicinal plants were investigated for their effects on [³H]spiperone-binding to membrane preparation from rat brain.

The MeOH extracts of *Amsonia elliptica* or *Corydalis Tubur* or *Evodia Fructus* showed a strong inhibitory effect of [³H]spiperone-binding to D-2 receptors of membrane fraction from rat brain. The activity of MeOH extracts of these drugs transferred to the alkaloid fraction, while main alkaloids of each medicinal plant or crude drug, for example, β -yohimbine, corydaline, evodiamine, synephrine, could not show high activity, respectively. Thus, these results suggest that inhibition by these medicinal plants may be due to another components in the alkaloid fraction.

Keywords—dopamine; receptor; binding assay; crude drug; medicinal plant

ドーパミンはパーキンソン病で代表される運動機能疾患, 精神分裂病に代表される高次精神機能疾患及び脳下垂体ホルモンの分泌に関与する神経伝達物質である。Kebabian と Calne¹⁾ は, 脳腺条体のドーパミンレセプターをアデニル酸シクラーゼにリンクしている D-1 タイプと, していない D-2 タイプに分類している。現在ではすべての抗精神病薬がドーパミンレセプター阻害活性を持つことが明らかにされており, 一般に, 抗精神病薬は抗うつ薬よりも D-2 レセプターに対する親和性が高いとされている。Seemann²⁾ や Creese ら³⁾ は, 抗精神病薬, 抗パーキンソン病薬が D-2 レセプターを標識する [³H]spiperone の特異的結合の阻害力と臨床応用量との間により相関があることを示した。Spiperone は抗精神病作用を有するドーパミン・アンタゴニストであり, D-2 レセプターに特異的に結合する。

一方, 古来よりの漢方にも種々の鎮痛, 鎮静等や精神疾患に適応される処方が存在するが, その薬理的, 化学的証明は未だ十分ではない。

我々は, セロトニン・レセプターについて検討を行った⁴⁾ のに続き, 新規な抗精神病薬抗パーキンソン病薬の資源を探索すべく, 更には, 漢方処方の科学的裏付けを行うため, [³H]spiperone を使用した D-2 レセプター結合阻害活性の検討を各生薬, 薬用植物について行った。

実 験 の 部

試料, 試薬並びに使用機器 試料——本実験に使用した生薬及び薬用植物のうち, *Alangium chinensis* (八角

楓)は昭和61年、中国雲南省中国科学院昆明植物研究所所長 周 俊先生より分譲、*Anthocephalus chinensis* は昭和60年パプア・ニューギニアより導入、*Coleus forskohlii* は、昭和59年インド Hoechst Pharmaceuticals Ltd. の Dr. N. J. de Souza より分譲、この他は中国雲南省昆明市場品(昭和61年購入)及び広島大学医学部附属薬用植物園にて栽培した植物である。各植物、生薬は熱メタノール(MeOH)抽出を行い、減圧乾固後アッセイに供した。

試薬— $[^3\text{H}]$ Spiperone ([phenyl-4- ^3H]spiperone, 16.2 Ci/mmol Radiochemical Center Amersham), spiperone (Janssen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), *d*-butaclamol (*d*-butaclamol HCl, McKenna & Harrison Limited), その他の試薬はすべて特級品を使用した。

使用機器—液体シンチレーションカウンタ; Packard TRI-CARBO Liquid Scintillation Spectrometer model 3320. 冷却遠心器; Kubota KR-20000S.

ラット脳粗膜標本の調製 生後約1ヶ月の雄性 Wistar 系ラットを断頭致死後、氷冷下直ちに脳より線条体を摘出した。粗シナプス膜画分の調製は Usdin 等⁵⁾の方法に準じて行った。100倍量の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7 at 25°C) を加え、Polytron (setting 8) にて30秒間ホモジネートした。この懸濁液を 48000×*g* で10分間遠沈し、得られた沈査を再度同 buffer にてよく懸濁し、48000×*g* で遠沈し、得られた沈査を線条体粗シナプス膜画分とした。

$[^3\text{H}]$ Spiperone Binding Assay 方法 得た粗シナプス膜画分を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1, 0.1% アスコルビン酸含有) 0.7 ml にタンパク量 0.4–0.5 mg/tube になるように液遊させた後、 $[^3\text{H}]$ spiperone (最終濃度 1 nM $K_D=0.104\pm 0.004$ nM) 0.1 ml, 生薬エキス (最終濃度 0.2 mg/ml) 0.1 ml を加え、37°C で15分間 incubate し、これを全結合量とした。一方、非放射性 spiperone (最終濃度 1.0 μM) あるいは、*d*-butaclamol (最終濃度 1.0 μM) 0.1 ml 存在下の結合量を非特異的結合量とし、全結合量から差し引くことにより、特異的結合量を算出した。

また反応の停止は吸引ろ過法でフィルター (Whatmann, GF/B) 上に回収することで行い、その後 Univer gel (半井化学薬品) を加え、液体シンチレーション測定器にて放射線量を測定した。D-2 レセプターに対する各生薬の結合阻害率 (%) は次式にて算出した。

$$\text{阻害活性率 (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 試料の特異的結合量

B: コントロールの特異的結合量

結 果

薬用植物 36 種の $[^3\text{H}]$ spiperone 結合阻害活性を Table I に示す。全試料中 1 種の植物が顕著な阻害活性を示し (80% 以上: 丁字草) 3 種の植物が強い活性 (50% 以上: 延胡索, 呉茱萸, 吐根) を示した。Positive control としてフェノチアジン系の抗精神病薬であるクロルプロマジンは 10^{-6} M で 68.1%, 10^{-5} M で 94.5% の阻害率であり、上記の活性生薬 0.2 mg/ml はクロルプロマジン 10^{-6} M に匹敵する活性を有する。高阻害活性を有する生薬、植物のうち延胡索, 呉茱萸, 吐根及び、D-2 レセプター活性が報告⁶⁾されているベルベリンを多量に含有する黄柏について Fig. 1 に示すような溶媒分画を行い、活性をテストしたところ、各生薬ともにアルカロイド画分 (F-2) に活性が集中した (Table II)。そのため、各生薬中に含まれる代表的なアルカロイド、すなわち、延胡索—cory-

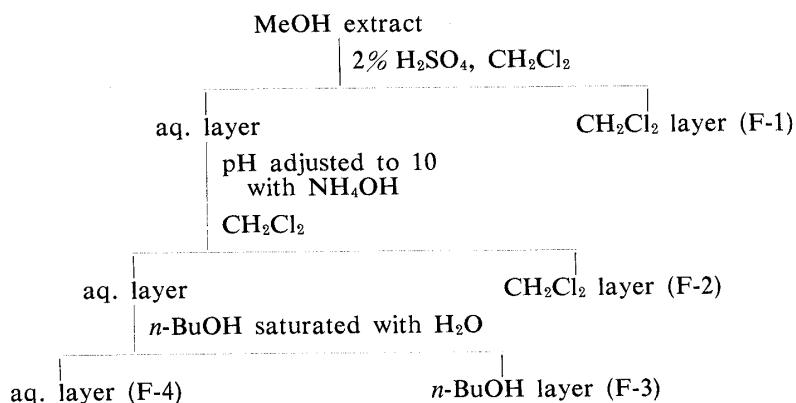


Fig. 1. Fractionation Procedure of MeOH Extract of Active Crude Drug

daline, dehydrocorydaline, 呉茱萸—evodiamine, synephrine, 吐根—emetine, 黄柏—berberine, 丁字草— β -yohimbine について阻害活性を検討した。しかしながら, 10^{-4} M では emetine, β -yohimbine がわずかな活性を示したにすぎず (Table III), 各生薬の活性はアルカロイド画分中の他成分に由来すると示唆された。活性本体については現在検討中である。

また, セロトニンレセプターでは 90% 以上の高活性を示した釣藤鈎,⁴⁾ ウリノキ (*Alangium platanifolium*), 八角楓 (*A. chinensis*), 酸棗仁⁷⁾ にドーパミン D-2 レセプターでは活性が見られないことは, 疾患に対する適応, 作用機序の違いを示すものと考えられ興味深い。セロトニンレセプターの場合, インドールアルカロイドを含有する生薬の大部分が高阻害活性を示すのに対し, D-2 レセプターでは更に選択性が高いことも注目される。また, 気剤として, ある種の向精神作用を有するといわれる厚朴, 中枢作用が知られる大黄等にも中程度の活性が見出された。

本スクリーニングにおいて高阻害活性を示した延胡索, 呉茱萸は古来より鎮痛, 鎮静の目的で使用されており, 今回の結果との相関は興味深い。情報過多の今日, 心身に与えられるストレスは非常なものであり, 心身症由来の精神疾患, 偏頭痛等は増加の一途をたどっている。これらの治療には抗精神病

TABLE I. Inhibitory Effect of Crude Drugs and Medicinal Plants on [³H]Sipiperone Binding

Above 70%		
<i>Amsonia elliptica</i>	丁字草	92.6
Corydalis Tuber	延胡索	76.9
Evodia Fructus	呉茱萸	73.8
Above 50%		
Ipecacuanhae Radix	吐根	60.6
Above 30%		
Magnoliae Cortex	厚朴	48.0
Rhei Rhizoma	大黄	41.8
Coptis Rhizoma	黄连	39.7
Arecae Semen	檳榔子	39.1
Sinomeni Caulis et Rhizoma	防已	38.7
<i>Anthocephalus chinensis</i> (leaf)		35.1
Cinchonae Cortex	キナ皮	32.5
Phellodendri Cortex	黄柏	30.5
0—30%		
<i>Aconiti Radix, Alangium chinensis</i> (root), <i>A. platanifolium</i> (root), <i>Anthocephalus chinensis</i> (bark), <i>Arisaematis Rhizoma</i> , <i>Aristorochiae Fructus</i> , <i>Aristorochiae Radix</i> , <i>Armeniaca Semen</i> , <i>Aurantii Fructus Immaturus</i> , <i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i> , <i>Coleus forskohlii</i> (root), <i>Columbae Radix</i> , <i>Curculiginis Rhizoma</i> , <i>Ephedrae Herba</i> , <i>Fritillariae Tuber</i> , <i>Gambir</i> , <i>Ginseng Radix</i> , <i>Nupharis Rhizoma</i> , <i>Picrorhizae Rhizoma</i> , <i>Scopoliae Rhizoma</i> , <i>Uncariae Ramulus et Uncus</i> , <i>Zanthoxyli Pericarpium</i> , <i>Zingiberis Rhizoma</i> , <i>Ziziphus Semen</i>		

TABLE II. Inhibitory Effect of Each Fractions of Active Crude Drugs on [³H]Sipiperone Binding

	MeOH ext. (%)	F-1 (%)	F-2 (%)	F-3 (%)	F-4 (%)
Evodia Fructus	73.8	—	87.8	0	0
Corydalis Tuber	76.9	57.1	91.6	12.7	0
Ipecacuanhae Radix	60.6	60.7	83.3	8.4	14.0
Phellodendri Cortex	30.5	60.0	78.3	6.8	2.1

F-1 to 4 corresponds to those in Fig. 1.

TABLE III. Inhibitory Effect of Main Alkaloids of Active Crude Drugs on [³H]Sipiperone Binding

Alkaloids	Inhibition (%)	Alkaloids	Inhibition (%)
Chlorpromazine	68.1 (10^{-6} M)	Emetine	38.2
Chlorpromazine	94.5 (10^{-5} M)	β -Yohimbine	34.3
Corydaline	21.4	Dehydrocorydaline	9.5
Berberine	7.7	Evodiamine	0
Synephrine	0		

10^{-4} M final conc.

薬, 抗セロトニン薬, 鎮痛剤, β -遮断薬が頻用されるが, 鎮痛剤は一般に胃腸障害をきたしやすいことが, また, 抗不安薬には眠気, ふらつき等の中樞神経抑制症状, 抗うつ薬には抗コリン作用等の副作用が知られており, 長期投与による薬物依存性の危険性もある.

一方, 古来よりの漢方薬はこれらの副作用の発現率が極めて低く, また偏頭痛の呉茱萸湯による治療例のように, 従来の西洋薬で即効しない場合に, 漢方薬への変更, あるいは, 追加投与により好転する場合が見られる. 漢方薬の精神科領域への適応は大いなる可能性を持ち, 更に化学的, 薬理的説明を進める必要がある.

引用文献

- 1) J. W. Keabian, D. B. Calne, *Nature* (London), **277**, 93 (1979).
- 2) P. Seemann, T. Lee, M. Chau-Wong, K. Wong, *Nature* (London), **261**, 717 (1976).
- 3) I. Creese, D. R. Burt, S. H. Snyder, *Science*, **194**, 546 (1976).
- 4) H. Kanatani, H. Kohda, K. Yamasaki, I. Hotta, Y. Nakata, T. Segawa, E. Yamanaka, N. Aimi, S. Sakai, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 401 (1985).
- 5) T. B. Usdin, I. Creese, S. H. Snyder, *J. Neurochem.*, **34**, 669 (1980).
- 6) 丹羽雅之, 壬生寛之, 野崎正勝, 鶴見介登, 藤村 一, 第 69 回日本薬理学会近畿支部部会 要旨集 1986, p. 9.
- 7) 丹羽 章, 日高和幸, 武田 理, 神田博史, 山崎和男, 仲田義啓, 西尾広昭, 瀬川富朗, 日本生薬学会第 33 回年会 要旨集 1986, p. 8.