

雷公藤に含まれるロイコトリエン D₄ 拮抗物質

諸田 隆^{*,a}, 斎藤 和子^a, 丸野 政雄^a
 楊 春欣^b, 秦 万章^b, 楊 秉輝^b

^a(株)ツムラ中央研究所, ^b上海医科大学附属中山医院

Leukotriene D₄ Antagonists in *Tripterygium wilfordii*

TAKASHI MOROTA,^{*,a} KAZUKO SAITOH,^a MASAO MARUNO,^a
 CHUN-XIN YANG,^b WAN-ZHANG QIN^b and BING-HUI YANG^b

^aTsumura Central Research Laboratories, 3586 Yoshiwara,
 Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-11, Japan

^bZhong Shan Hospital of Shanghai Medical University,
 136 Yi-Xue-Yuan Road, Shanghai 200032, China

(Received July 17, 1995)

Roots of *Tripterygium wilfordii* has been long used in China for treatment of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE) and Bechet's disease, chronic nephritis, allergic conjunctivitis and rhinitis, and asthma. However, not many studies have been made on its clinical effects. We previously isolated nine diterpenoids and 17 triterpenoids from the heartwood and bark of the plant. In the present report, we examined the inhibitory activities of these constituents on leukotrien D₄-induced smooth muscle contraction which is considered to be involved in the pathology of asthma. Seven diterpenoids and ten triterpenoids were found to be quite active in this assay.

Keywords—*Tripterygium wilfordii*; Celastraceae; leukotrien D₄; LTD₄; smooth muscle contraction; diterpenoids; triterpenoids

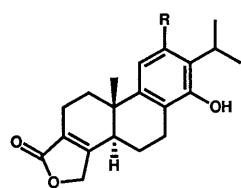
雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) はニシキギ科 (Celastraceae) に属する多年草のツル性植物で、その分布は、浙江、江西、湖南、広東、福建各省、台湾等である。本植物の粉末は、古代より中国の農村部において殺虫剤として利用されている¹⁾。本植物の薬理作用については、抗炎症、免疫抑制作用を始めとして、多彩な作用が知られており、現在中国では、リュウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE)、ベーチェット病等の自己免疫性疾患、糸球体腎炎、アレルギー性の結膜炎および鼻炎、喘息等の治療薬として、本植物の根の根皮を取り去った木質部の抽出エキスが単味で処方され、有効例についての多くの臨床結果が報告されている^{1,2)}。また近年、資源保護の観点から、従来は毒性が強いとされ、薬用とされなかった根皮も用量を減じて用いられ、その臨床における作用も同等であると報告されている^{2a)}。一方、化学成分の研究は、各方面で精力的に行われており、Kupchanらの *in vitro* における L1210 に対する細胞毒性作用を指標とした成分検索による、ジテルペントリエポキサイドの triptolide, triptonide, triptodioidide の単離報告ほか、多くの報告がある³⁾。本植物成分の生物活性研究に関しては、triptolide およびその類縁体の抗腫瘍活性、免疫抑制活性並びに抗炎症作用^{2a)}、

celastrol (tripterin, 雷公藤紅素) に抗体産生能の低下、LPS 誘導インターロイキン-1 (IL-1), Con A 誘導 IL-2 産生抑制作用⁴⁾、アルカロイド類の殺虫作用⁵⁾ 並びに高投与量での抗体産生能、移植片対宿主反応の抑制作用が報告されている⁶⁾。しかしながら、その他の多種単離されている化合物についての薬理学的存在意義は不明である。今回、著者らは本植物の薬理活性のうち、従来証明されていない事項についての解明を行うことを目的として、雷公藤根の木質部並びに根皮についての成分研究を行った。この結果、雷公藤根の木質部および根皮部より新規化合物 6 種を含む計 26 種のジテルペン、トリテルペン類を単離した⁷⁾。

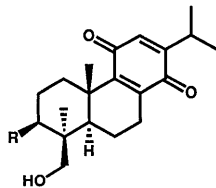
単離した化合物について、雷公藤の示す多彩な薬理作用の一つである喘息改善作用に着目し、本疾患のメディエーターの一つとして知られるロイコトリエン D₄ (LTD₄) に対する作用を検討した。この結果、モルモット摘出回腸を用いた LTD₄ の平滑筋収縮作用に対し、多くの化合物が抑制活性を示したので報告する。

実験の部

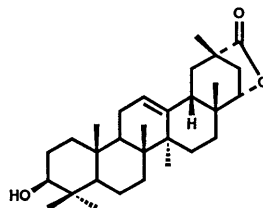
実験材料 原料植物は、中国福建省、武夷山周辺地区で採集され、上海医科大学附属中山医院の秦 万章らによ



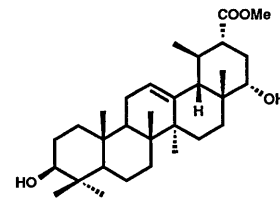
triptophenplide (1) : R=H



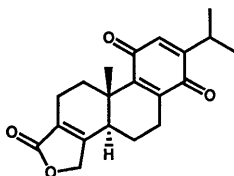
triptoquinone B (3) : R=O
triptoquinone C (4) : R=OH



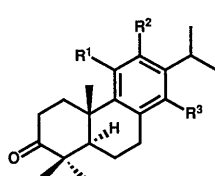
wilforlide A (8)



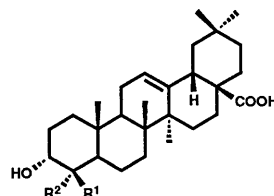
tripterigic acid methylester (9)



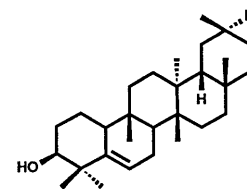
compd 5



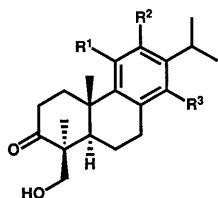
triptonoterpenol (2) : R¹=OH, R²=H, R³=OMe
compd 6 : R¹=R²=H, R³=OH
wilfolol F (7) : R¹=H, R²=OMe, R³=OH



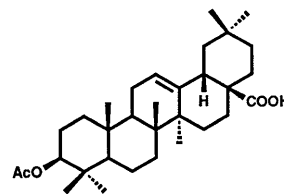
wilforol C (16) : R¹=Me, R²=CH₂OH
compd 19 : R¹=CH₂OH, R²=Me



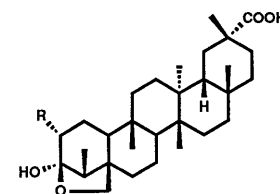
wilforol D (17) : R=COOH
compd 20 : R=CH₂OH



triptonoterpene methyl ether (25) : R¹=H, R²=OMe, R³=OH
wilforol E (26) : R¹=H, R²=OH, R³=OMe

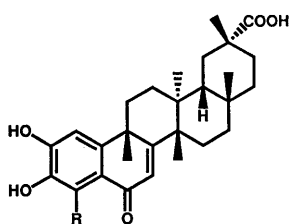


3-acetoxy oleanolic acid (18)

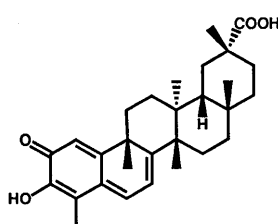


salaspermic acid (21) : R=H
orthospermic acid (22) : R=OH

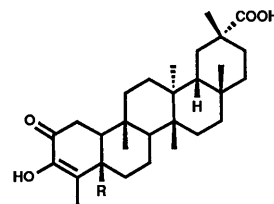
Chart 1. Diterpenoids from *T. wilfordii*



wilforol A (10) : R=Me
demethylzeyrasteral (13) : R=CHO
23-nor-6-oxo-demethylpristimerol (14) : R=H
demethylzeyrasterone (15) : R=COOH

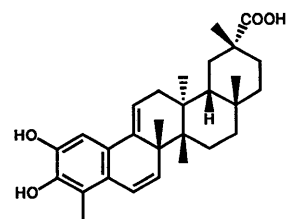


celastrol (12)



cangoronin (23) : R=CHO
compd 24 : R=Me

Chart 3. Triterpenoids from *T. wilfordii*



wilforol B (11)

Chart 2. Nor-triterpenoids from *T. wilfordii*

て *Tripterygium wilfordii* Hook. f. と鑑定されたものを用いた。

雷公藤根の根皮を取り去った木質部 20 kg を粉碎し、100 l のメタノールで 2 時間加熱還流抽出し、熱時ろ過後減圧乾固し、メタノールエキス 1.1 kg を得た。これを水 5 l に懸濁した後、順次 *n*-ヘキサン (5 l)、酢酸エチル

(5 l)、*n*-ブタノール (5 l) で抽出し、それぞれ *n*-ヘキサンエキス (53 g)、酢酸エチルエキス (345 g)、*n*-ブタノールエキス (250 g) を得た。酢酸エチルエキスから各種カラムクロマトグラフィー、再結晶によって、9 種の化合物を TABLE I に示す収率で得た^{7c)}。

雷公藤根の根皮 100 kg を粉碎し、500 l のアセトンで 2 時間加熱還流抽出し、熱時ろ過後減圧乾固し、アセトンエキス 4.5 kg を得た。アセトンエキス 1.5 kg を等量の Avicell と混合し、予めカラムに充填した Avicell (0.5 kg) に重層した。これを *n*-ヘキサン (20 l)、25% アセトン-*n*-ヘキサン (30 l) で溶出し、25% アセトン-*n*-ヘキサン溶出部 527 g を得た。25% アセトン-*n*-ヘキサン溶出部から各種カラムクロマトグラフィー、再結晶によって、17 種の化合物を TABLE I に示す収率で得た^{7a, 7b)}。

単離された化合物のロイコトリエン D₄ 平滑筋収縮に対する抑制作用

1. 動物 東京実験動物より購入した体重 400 g 前後の

TABLE I. Yields of the Compounds from *T. wilfordii* (%/dry wt.)

1	0.0260*	10	0.0016	19	0.00153
2	0.0027*	11	0.073	20	0.00070
3	0.0313	12	0.052	21	0.00060*
4	0.0014	13	0.050	22	0.00080*
5	0.0338	14	0.0046	23	0.00173
6	0.0253	15	0.0053	24	0.00057*
7	0.0055	16	0.00019	25	0.00020
8	0.0022*	17	0.00012	26	0.00019
9	0.0041	18	0.00070		

Compounds 1-9 were isolated from heart wood and 12-26 from bark.

* Not completely isolated.

Hartley 系雄性モルモットを使用した。

2. 使用薬物 LTD₄, histamine dihydrochloride は和光純薬より購入し、蒸留水にて希釈した。また、被験薬物はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、蒸留水にて希釈した (DMSO の終濃度: 0.5%)。栄養液として以下の組成のタイロート液を用いた。

NaCl: 137.9 mM, KCl: 2.7 mM, MgCl₂/6H₂O: 0.5 mM, NaHPO₄/2H₂O: 1.1 mM, CaCl₂/2H₂O: 1.8 mM, NaHCO₃: 11.9 mM, glucose: 5.6 mM.

3. モルモット回腸標本の作製および収縮反応の測定
モルモットを放血致死させ、その後開腹して回腸を摘出した。これを約 2 cm の筒状標本として 32°C 95% O₂-5% CO₂ ガス通気のタイロート栄養液に入ったマグナス管に懸垂し、1 g の負荷をかけた。等張性収縮は、アイソトニックトランスジューサー (Phsico-Tech; IT-300) を介してペン書き記録計 (RIKADENKI; R-62) で記録した。各標本は histamine dihydrochloride (終濃度: 1×10⁻⁵ M) で収縮を惹起し、一定の収縮反応が得られた後実験を開始した。標本を栄養液で洗浄し、洗浄から 15 分後、LTD₄ 1×10⁻⁸ M の等張性収縮 (A) をコントロール収縮として記録した。さらに洗浄後約 30 分後に被験薬を加え、その 10 分後に LTD₄ 1×10⁻⁸ M を加え、等張性収縮 (B) を記録した。抑制率は終濃度として 3, 10, 30, 100 μM の各濃度で 3 回実験を繰り返し、以下の式によって平均値を算出し、50% 阻害率 (IC₅₀) を求めた。

$$\text{抑制率 (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

結果および考察

結果を化合物の類別に、TABLE II~IV に示す。

ジテルペノイド類では wilforol F (7), wilforol E (25), 12-methoxy-triptonoterpene (26) が IC₅₀ 値として約 5 μM の強い活性を示した。キノイドを有する triptoquinone B (3), triptoquinone C (4) はこれらより 1/10 程度活性が低く、さらに α, β 不飽和ラクトンを有する triptophenolide (1), 化合物 5 は活性が著しく低下した。また, triptonoter-

TABLE II. Inhibitory Activities of Diterpenoids on LTD₄-Induced Contraction of Smooth Muscle

Compd	IC ₅₀ (μM)
1	weak
2	17.5
3	77.0
4	24.5
5	NA
6	45.0
7	5.5
25	6.0
26	5.0

NA: not active.

TABLE III. Inhibitory Activities of Nor-triterpenoids on LTD₄-Induced Contraction of Smooth Muscle

Compd	IC ₅₀ (μM)
10	16.0
11	7.5
12	2.5
13	8.0
14	24.0
15	NA

NA: not active.

TABLE IV. Inhibitory Activities of Triterpenoids on LTD₄-Induced Contraction of Smooth Muscle

Compd	IC ₅₀ (μM)
8	NA
9	NA
16	17.0
17	4.0
18	NA
19	weak
20	NA
21	NA
22	7.5
23	4.2
24	7.0

NA: not active.

penol (2), 化合物 6, wilforol F (7) は同じ母核を有しながら、C 環の官能基の位置によって活性には相違が認められた。ノルトリテルペノイドでは, celastrol (12) に最も強い活性が認められた。その他の化合物も 1×10⁻⁶ から 10⁻⁵ M の IC₅₀ 値を示したが、4 位にカルボン酸を有する demethylzeyrasterone (15) は活性を示さなかった。C30 型トリテルペノイドでは, wilforol D (17), orthosphenic acid (22), cangoronin (23), 化合物 24 に 4.0~7.5 μM, また wilforol C (16) に 17.0 μM の IC₅₀ 値が認められた。構造活性相関について明確なことは言えないものの, 21 と 22 を比較した場合、構造の違いは 2 位の水酸基の有無であり、また 16 と 19 のそれは 4 位の立体構造のみ、さらに 17 と 20 のそれは、29 位の官能基の相違であるにもかかわらず、活性には大きな差が認められた。

雷公藤根は、喘息に改善作用を示すことが知られている

が¹⁾, このメカニズムについては, 化合物レベルではもとより, 抽出エキスや粗分画物レベルにおいても全く解明されていなかった. 著者らは本研究によって, 雷公藤根に含まれる多くの成分が, 気管支喘息の重要なメディエーターである LTD₄ の平滑筋収縮作用を阻害することを初めて明らかにした. 現在までのところ, I型アレルギーに属するアレルギー性鼻炎や気管支喘息に対する雷公藤根の臨床的効果は一定していないという見解もあるが^{2b)}, 本研究の結果は, 本植物の喘息に対する有効臨床例の根拠の一つとなりうるものと考えられる.

謝 辞: 本研究にあたり, 植物エキスの作製をしていただいた, 中国上海医科大学附属中山医院の諸氏に深謝致します. また, 本研究をご協力いただいた, 札幌北楡病院 玉置透博士, (株)ツムラ中央研究所 小松靖弘博士, 佐藤俊次博士, 池谷幸信博士, 川村秀樹博士, 丸山博文博士, 西村浩昭博士, 他同研究所の諸氏に深謝いたします.

引用文献

- 1) “中薬大辞典”, 日本語版, 小学館編, 東京, 1985, p. 2632.
- 2) a) 李 瑞林, 舒 達夫, 王 兆銘, 中西医結合, **3**, 8 (1992); b) 石山淳一, 中医臨床, **4**, 319 (1983).
- 3) a) S. M. Kupchan, W. A. Court, R. G. Daiely, C. J. Gilmore, R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7194 (1972); b) L. Zhang, Z. X. Zhang, D. K. Ann, *J. China Pharmaceut. Univ.*, **21**, 251 (1990).
- 4) X. Y. Li, *Int. J. Immunother.*, **4**, 181 (1993).
- 5) F. Acree, Jr., H. L. Haller, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1608 (1950).
- 6) Y. L. Zheng, Y. Xu, J. F. Lin, *Acta Pharmaceut. Sinica*, **24**, 568 (1989).
- 7) a) T. Morota, C. X. Yang, T. Ogino, W. Z. Qin, T. Katsuhara, L. H. Xu, Y. Komatsu, K. L. Miao, M. Maruno, B. H. Yang, *Phytochemistry*, **39**, 1159 (1995); b) T. Morota, C. X. Yang, H. Sasaki, W. Z. Qin, K. Sugama, L. H. Xu, T. Yoshino, K. L. Miao, M. Maruno, B. H. Yang, *Phytochemistry*, **39**, 1153 (1995); c) T. Morota, W. Z. Qin, K. Takagi, L. H. Xu, M. Maruno, B. H. Yang, *Phytochemistry*, **40**, 865 (1995).