

Receptor Binding Assay 法を用いた薬用植物中の活性成分の研究 (第 1 報)
Serotonin Receptor

金谷裕敏, 神田博史*, 山崎和男, 堀田和泉, 仲田義啓, 瀬川富朗
広島大学医学部総合薬学科

Studies on Active Constituents in Medicinal Plants Using the Receptor Binding Assay (I)
Serotonin Receptor

HIROTOSHI KANATANI, HIROSHI KOHDA*, KAZUO YAMASAKI,
IZUMI HOTTA, YOSHIHIRO NAKATA and TOMIO SEGAWA

*Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Medicine, Hiroshima University,
Kasumi-1-2-3, Minami-ku, Hiroshima, 734*

(Received July 25, 1983)

Aqueous and MeOH extracts from 72 crude drugs or medicinal plants were investigated for their effect on [³H] serotonin-binding to membrane preparation from rat brain. A number of indole alkaloid-containing plants, *Zanthoxyli Fructus*, and *Corydalis decumbens* showed strong inhibitory effect, while *Lithospermi Radix* (MeOH extract), *Nupharis Rhizoma* (H₂O extract) and *Geum japonicum* (H₂O extract) accelerated the [³H] serotonin-binding.

Keywords—serotonin; receptor; binding assay; crude drugs; medicinal plants

近年, 薬物の作用点としてのレセプターの研究技術が急速な進展をとげ, レセプターの諸性質が次々と解明されつつある。レセプターは, 主として効果細胞膜上に存在し, 認識した薬物や伝達物質としての生体アミンなどと結合し, その結果, 種々の薬理作用や生理作用を発現しているものと考えられている¹⁾。

薬物は, レセプターに対する作用態度から, agonist (作動薬) と antagonist (拮抗薬) の 2 つのタイプに大別することができる。

たとえば, propranolol (β -receptor antagonist; 狭心症, 不整脈治療薬^{2a)}), clonidine (α_2 -receptor agonist; 降圧薬^{2b)}), mianserin (serotonin receptor antagonist; 抗うつ薬^{2c)}), methysergide (serotonin receptor antagonist; 片頭痛治療薬^{2d)}), cyproheptadine (serotonin receptor antagonist; 胃摘出後の dumping 症候群治療薬³⁾) などである。

したがって, レセプターとリガンドとの結合に何らかの影響を与える成分が, 生薬, 薬用植物中に存在すれば, その生薬, 薬用植物の薬理効果の解明に役立つ可能性があり, また, 単独で効果を発揮する有効成分単離も考えられる。

われわれは, 現在, 数種のレセプターについて, radioreceptor assay 法を用いた生薬, 薬用植物のスクリーニングを行っており, 今回はその中より, セロトニンレセプターに関する結果について報告する。

セロトニン (以下 5-HT と略記) は, 生体内で tryptophan から生合成され, 腸管の蠕動, 体温調節, 血圧調節などの生理的役割に関与していると考えられており, 特に中枢神経系での伝達物質の 1 つであることが明らかにされて以来, 多くの研究者の注目を集めている。セロトニンレセプターに antagonist として働く化合物は, 前述のように, 抗うつ, 片頭痛治療など多くの治療効果を有しており, この事からも今回の実験が意義のあることであると思われる。

なお, セロトニンレセプターの材料としては, ラットの脳のうち, セロトニンニューロンの終末が存在し, セロトニンレセプターの密度が比較的高い大脳皮質と海馬の粗膜標本を用いた。

Procedure for Preparation of Rat Brain Membranes

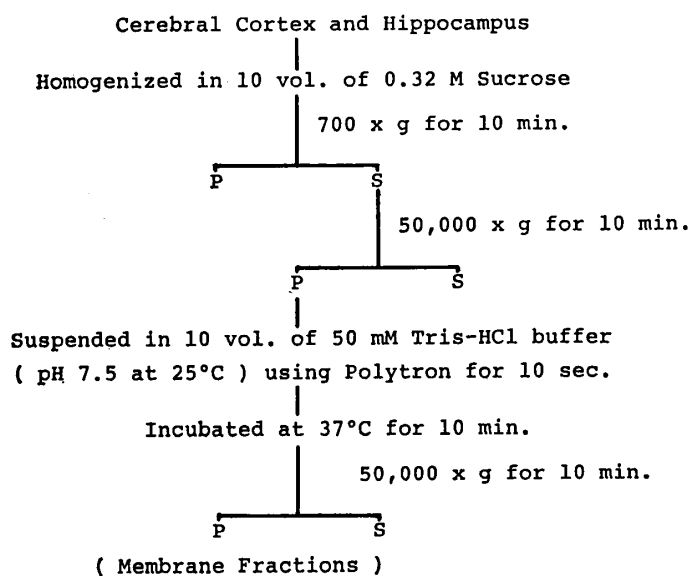


Chart 1.

実験の部

ラット脳粗膜標本の調製

4～5週齢の雄性ウィスター系ラットのセロトニンレセプターに比較的富んだ大脳皮質と海馬を用い, Snyder 等の方法⁴⁾に従って, Chart 1 のごとく調製を行った.

Binding Assay 法

後述の A～F の各溶液を作製した後, これらの溶液を用いて試験溶液 T_c , N_c , T_s , N_s を調製した. 各試験溶液は, 37°, 10分間インキュベートした後, Whatman GF/B グラスフィルターで吸引濾過し, さらに Tris-HCl buffer で洗浄後, フィルター上の放射活性を測定した.

A] 0.1 ml of [3H] 5-HT (final conc. 2 nM)

B] 0.1 ml of MeOH or H_2O

C] 0.1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) containing 10 μ M nialamide

D] 0.1 ml of 5-HT (final conc. 100 μ M)

E] 0.1 ml of sample in MeOH or H_2O

F] 0.7 ml of membrane fractions [resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) containing 10 μ M nialamide]

T_c ; total binding of control

$$= A + B + C + F$$

N_c ; non-specific binding of control

$$= A + B + D + F$$

T_s ; total binding of sample

$$= A + C + E + F$$

N_s ; non-specific binding of sample

$$= A + D + E + F$$

1次スクリーニング

サンプルによるトリチウムセロトニンレセプター結合の阻害活性率は, 後述のA式に従って計算した. 各々のサンプルは, それぞれ triplicate で3回繰り返し実験を行い, その平均値で表わした.

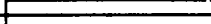
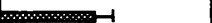
$$\% \text{ of Inhibition} = \frac{T_c - T_s}{T_c - N_c} \times 100 \quad (\text{A式})$$

TABLE I. Inhibitory Effects of Crude Drugs and Medicinal Plants on [³H] 5-HT Binding (1st. Screening)

Inhibitory effects of MeOH ext.		Inhibitory effects of H ₂ O ext.	
above 70%		above 70%	
南 天 実	Nandinae Fructus	吐 根	Ipecacuanhae Radix
ストロファン	<i>Strophanthus gratus</i> FRANCH. (leaf)	チョウジソウ	<i>Amsonia elliptica</i> (THUNB.) ROEM. et SCHULT. (root)
ツス			
牽 牛 子	Pharbitidis Semen	南 天 実	Nandinae Fructus
呉 茱 萸	Evodiae Fructus	呉 茱 萸	Evoidae Fructus
チョウジソウ	<i>Amsonia elliptica</i> (THUNB.) ROEM. et SCHULT. (root)	印 度 蛇 木	Rauwolfiae Radix
		ストロファン	<i>Strophanthus gratus</i> FRANCH. (leaf)
吐 根	Ipecacuanhae Radix	ツス	
山 椒	Zanthoxyli Fructus	山 椒	Zanthoxyli Fructus
印 度 蛇 木	Rauwolfiae Radix		
甘 茶	Hydrangeae Dulcis Folium	above 50%	
ジロボウエン	<i>Corydalis decumbens</i> PERS (tuber)	キ ナ	Cinchonae Cortex
ゴサク		ツルニチニチ	<i>Vinca major</i> LINN. (herb)
		ソウ	
above 50%		黄 柏	Phellodendri Cortex
ニチニチソウ	<i>Catharanthus roseus</i> G. DON. (herb)	甘 茶	Hydrangeae Dulcis Folium
薏 苡 仁	Coicis Semen	馬 錢 子	Strychni Semen
サ フ ラ ン	Crocus	阿 仙 薬	Gambir
馬 錢 子	Strychni Semen	陳 皮	Aurantii Nobilis Pericarpium
当 帰	Angelicae Radix	防 已	Sinomeni Caulis et Rhizoma
十 薬	Houttuyniae Herba		
独 活	Araliae Rhizoma	above 30%	
蒼 朮	Atractylodis Lanceae Rhizoma	黄 連	Coptidis Rhizoma
白 芷	Angelicae Dahuricae Radix	ジロボウエン	<i>Corydalis decumbens</i> PERS (tuber)
甘 草	Glycyrrhizae Radix	ゴサク	
黄 連	Coptidis Rhizoma	遠 志	Polygalae Radix
竹 節 人 参	Panacis Japonici Rhizoma	牽 牛 子	Pharbitidis Semen
		苦 木	Picrasmae Lignum
		大 棗	Zizyphi Fructus
		桑 白 皮	Mori Cortex
		黄 耆	Astragali Radix
		ニチニチソウ	<i>Catharanthus roseus</i> G. DON. (herb)
			
above 30%		ダイコンソウ	<i>Geum japonicum</i> THUNB. (herb)
ツルニチニチ	<i>Vinca major</i> LINN. (herb)	川 骨	Nupharis Rhizoma
ソウ			
サツマイナモ	<i>Ophiorrhiza japonica</i> BLUME (herb)		
リ			
釣 藤 鈎	Uncariae Ramulus et Uncus		
キ ナ	Cinchonae Cortex		
コ ロ ン ボ	Calumbae Radix		
陳 皮	Aurantii Nobilis Pericarpium		
檳 榔 子	Arecae Semen		
龍 胆	Gentianae Scabrae Radix		
黄 柏	Phellodendri Cortex		
ダイコンソウ	<i>Geum japonicum</i> THUNB. (herb)		
杏 仁	Armeniaca Semen		
黄 耆	Astragali Radix		
.....			
紫 根	Lithospermi Radix		

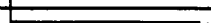
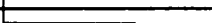
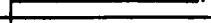
TABLE II. Inhibitory Effects of Crude Drugs and Medicinal Plants on [³H] 5-HT Binding (2nd. Screening)

MeOH ext.

Sample	% of Inhibition	lst.	Sample	% of Inhibition	lst.
南天実		111	サフラン		61
ストロファン ツス		105	甘草		52
壺牛子		105	黄連		52
ゴシュユ		105	ツルニチニチ ソウ		50
丁子草		102	サツマイナ モリ		50
吐根		96	釣藤鉤		47
山椒		72	キナ		47
印度蛇木		89	コロンボ		45
甘茶		82	陳皮		41
次郎坊延胡索		75	ピンロウジ		41
ニチニチソウ		65	黄柏		34
ヨクイニン		63	大根草		34
阿仙薬		58	each of 0.2 mg/ml/tube		

0 50 100 %

H₂O ext.

Sample	% of Inhibition	lst.	Sample	% of Inhibition	lst.
吐根		104	キナ		68
丁子草		98	ツルニチニチ ソウ		67
南天実		96	黄柏		65
ゴシュユ		95	馬錢子		64
印度蛇木		94	阿仙薬		58
ストロファン ツス		87	陳皮		50
山椒		72	黄連		47
甘茶		70	ニチニチソウ		30

0 50 100 %

each of 0.2 mg/ml/tube

2次スクリーニング

1次スクリーニングで強い阻害効果の認められたサンプルに関しては、サンプルの non-specific binding に与える影響を考慮し、サンプル共存下での non-specific binding (N_s) を測定した。トリチウムセロトニンレセプター結合の阻害活性率は、後述のB式に従って計算した。各々のサンプルは、それぞれ triplicate で3回繰り返し実験を行い、その平均値で表わした。

$$\% \text{ of Inhibition} = \left(1 - \frac{T_s - N_s}{T_c - N_c} \right) \times 100 \quad (\text{B式})$$

試料、試薬ならびに使用機器

試料——生薬は、大阪市場品(昭和56~57年購入)を、薬用植物は、採集あるいは本学医学部附属薬用植物園で栽培したものを用い、それらを MeOH ならびに H₂O で抽出したものをサンプルとした。

試薬——[³H] 5-HT; 5-hydroxy [G-³H] tryptamine creatinine sulfate, RCC Amersham, 10.8 Ci/mmol, 5-HT; Serotonin Kreatininsulfat MERCK, 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ー; Packard TRI-CARBO Liquid Scintillation Spectrometer model 3320, 冷却遠心器; Kubota KR-20000S, 超遠心機; Hitachi 55 P-72.

実験結果

生薬および薬用植物の **MeOH** エキス (68種類) ならびに **H₂O** エキス (72種類) による 1 次スクリーニング (トリチウムセロトニンレセプター結合の **total binding** に対する阻害) において, 30%以上の阻害効果を示したものは, **TABLE I** のごとくであった. また, 2 次スクリーニング (トリチウムセロトニンレセプター結合の **specific binding** に対する阻害) の結果については, **TABLE II** のごとくであった.

1 次スクリーニングの結果から考えると, **H₂O** エキス, **MeOH** エキスで阻害率の程度の差はあっても, 高い阻害活性率を示した生薬, 薬用植物は, 一般にインドールアルカロイドを含有しているといわれている, アカネ科, ミカン科, キョウチクトウ科などのものが多かった. また, 川骨, 大根草の **H₂O** エキス, 紫根の **MeOH** エキスにおいては, トリチウムセロトニンレセプター結合を促進する強い効果を有している結果となった.

1 次スクリーニングは, 1 度に多くのサンプルを処理できるという長所を有しているものの, 2 次スクリーニングの甘茶の結果の如く, みかけ上の活性を追う危険性もあるため, 1 次スクリーニングで活性の認められたサンプルに関しては, 必ず 2 次スクリーニングを行う必要があると思われる.

現在これらの結果より 2, 3 の材料をとりあげ, その活性本体の検討を行っている.

引用文献

- 1) J. R. Cooper, F. E. Bloom, R. H. Roth, *In* "The Biochemical Basis of Neuropharmacology," 4th ed., Oxford University Press, New York, 1982, p. 61.
- 2) 栗山欣弥, 北川晴雄編, "生化学的観点からみた薬理学", 第 1 版, 理工学社, 東京, 1981, a) p. 507; b) p. 709; c) p. 443; d) p. 267.
- 3) R. J. Levine, *In* "Duncan's Disease of Metabolism: The Genetic and Biochemical Basis of Disease," 7th ed., Vol. II. (ed. by P. K. Bondy, L. E. Rosenberg), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1974, p. 1651.
- 4) S. J. Peroutka, R. M. Lebovitz, S. H. Snyder, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 700 (1979).