

蔓荊子をはじめとする諸生薬の機能性成分の探索研究

小 野 政 輝

九州東海大学農学部

Studies on Biologically Functional Compounds from Some Crude Drugs, Including Viticis Fructus

Masateru Ono

School of Agriculture, Kyushu Tokai University,

Choyo 5435, Aso, Kumamoto 869-1404, Japan

(Received May 14, 2003)

Recently, it has been recognized that reactive oxygen species and free radicals cause various human diseases such as atherosclerosis, inflammation and cancer. Therefore, natural antioxidants from crude drugs and edible plants, which would be safer for human consumption than synthetic antioxidants, may reduce the incidence of the human diseases associated with reactive oxygen species and free radicals. This review summarizes the isolation and structure elucidation of the constituents from the antioxidative extract of five medical plants, *Vitex rotundifolia* L., *V. trifolia* L., *Foeniculum vulgare* MILLER, *Tessaria integrifolia* Ruiz. et Pavon and *Dendrobium* spp.

Keywords: *Vitex rotundifolia*; *Vitex trifolia*; *Foeniculum vulgare*; *Tessaria integrifolia*; *Dendrobium* spp.; antioxidative activity; antihyaluronidase activity; cytotoxic activity

近年、活性酸素種やフリーラジカルがアテローム性動脈硬化症、炎症、さらには癌など、きわめて広範囲の疾患に関与することが明らかにされ、抗酸化物質による各種疾患の予防や健康維持に強い関心が寄せられている^{1,2)}。また、これに伴い、生薬あるいは食用植物等に含まれる天然抗酸化物質が注目されてきている。このような背景から、本研究は当初、生薬中に含まれる抗酸化物質の探索を主目的に開始した。現在、抗酸化活性の測定法としては、ESR法、化学発光法ならびに反応生成物測定法等が一般的に用いられているが、我々は、それらの中で簡便なアッセイ法の一つであるロダン鉄法³⁾を用い、エキスの抗酸化スクリーニングを行った。ここでは、本スクリーニングにおいて、強い活性を示した蔓荊子、ウイキョウ果実、ペルー産生薬 *Tessaria integrifolia* 地上部ならびに石斛の各エキスの成分研究、ならびにそれらの生物活性（抗酸化活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性、癌細胞増殖抑制活性）について報告する。

蔓荊子の成分研究⁴⁻¹¹⁾

蔓荊子 (*Viticis Fructus*) は、クマツヅラ科 (*Verbenaceae*) のハマゴウ (*Vitex rotundifolia* L.) およびミツバハマゴウ (*V. trifolia* L.) の成熟乾燥した果実で、鎮痛、解熱、消炎等の目的で用いられる。また、漢方方剤として蔓荊子湯、菊花散等に処方される。

ハマゴウ果実のメタノールエキスをヘキサンとメタノールで分配後、強い抗酸化活性を示したメタノール可溶画分を各種カラムクロマトグラフィー (Diaion HP20, silica gel, Sephadex LH20, Chromatorex ODS) ならびに HPLC (ODS, silica gel) を用いて分離・精製し、20 種の新 labdane-type ジテルペノイド (1-20)、1 種の新 clerodane-type ジテルペノイド (21)、1 種の新 abeoabietane-type ジテルペノイド (22)、2 種の新 norlabdane-type ジテルペノイド (23, 24) ならびに 2 種の新イリドイド (25, 26) を 18 種の既知化合物と共に得た (Fig. 1)。また、これらの化合物の構造は、各種機器分析 (FAB-MS, EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H

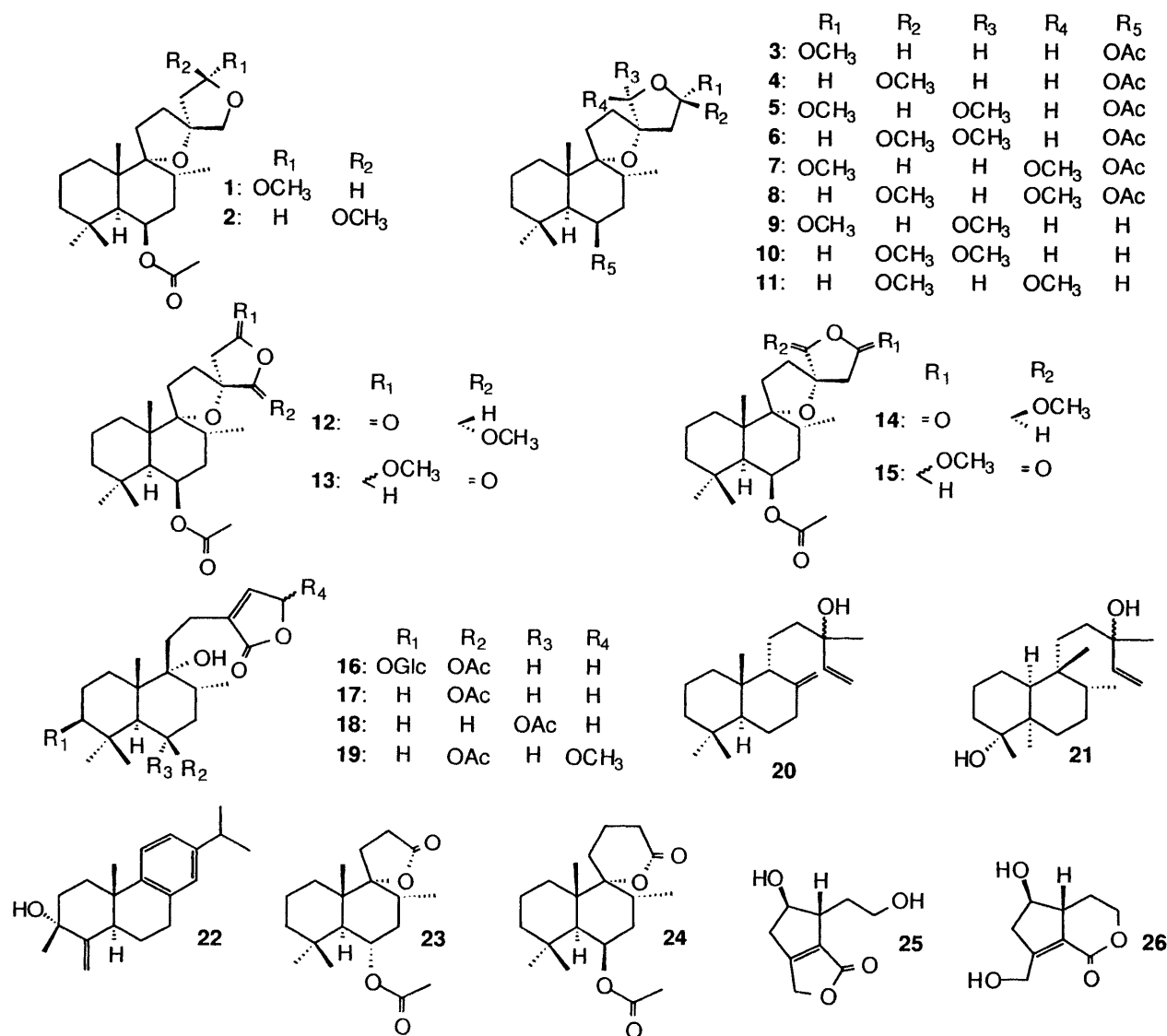


Fig. 1

COSY, HMQC, HMBC, 差 NOE) ならびに化学反応を用いて決定した。分離した化合物のうち、1-15 は 2 個の spiro-tetrahydrofuran 環を持つ特異な構造を有していたが、抽出、分離過程で生成した artifact の可能性が考えられた。尚、この spiro 環上の methoxy 基の配置については、X 線結晶解析等 (Fig. 2) により、決定した。

一方、ミツバハマゴウ果実からは、2 種の新 labdane-type ジテルペノイド (27, 28), 1 種の新 abietane-type ジテルペノイド (29) ならびに 4 種の新 halimane-type ジテルペノイド (30-33) を 13 種の既知化合物と共に分離した (Fig. 3)。

また、分離した化合物の中で、16 種の芳香族化合物 (34-49) (Fig. 4) にロダン鉄法を行い、12 種のフェノール類 (34, 35, 37, 39-46, 49) に合成抗酸化物質の

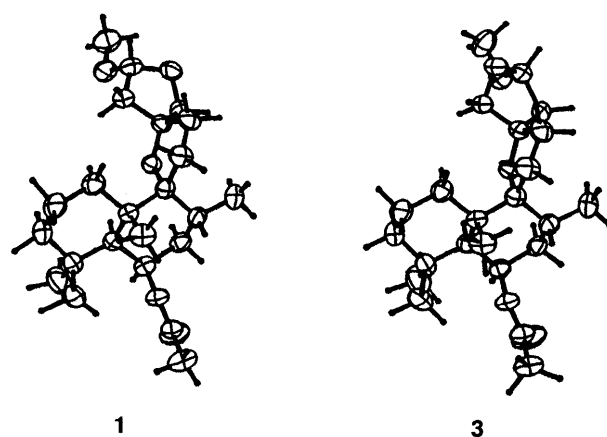


Fig. 2. ORTEP drawings of 1 and 3

3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) よりも強い活性が確認された。さらに、7 種の化合物 (34, 35, 40-42, 43, 49)

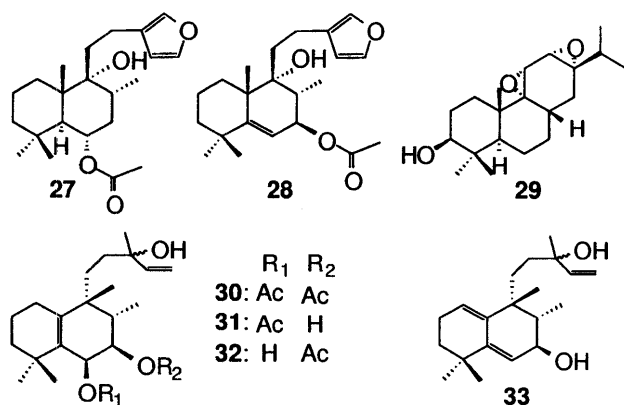


Fig. 3

る。また、この活性発現が、チューブリンの重合阻害にあることも報告していることから¹⁷⁾、46 の細胞毒性もそれと同一のメカニズムによるものと考えられた。

Table 1. Cytotoxic Activities of 44, 46, 47 and Cisplatin against PC-12 Cells and HCT116 Cells (GI₅₀, ng/mL)

compound	PC-12	HCT116
44	2270	2870
46	114	119
47	2270	2200
cisplatin	111	794

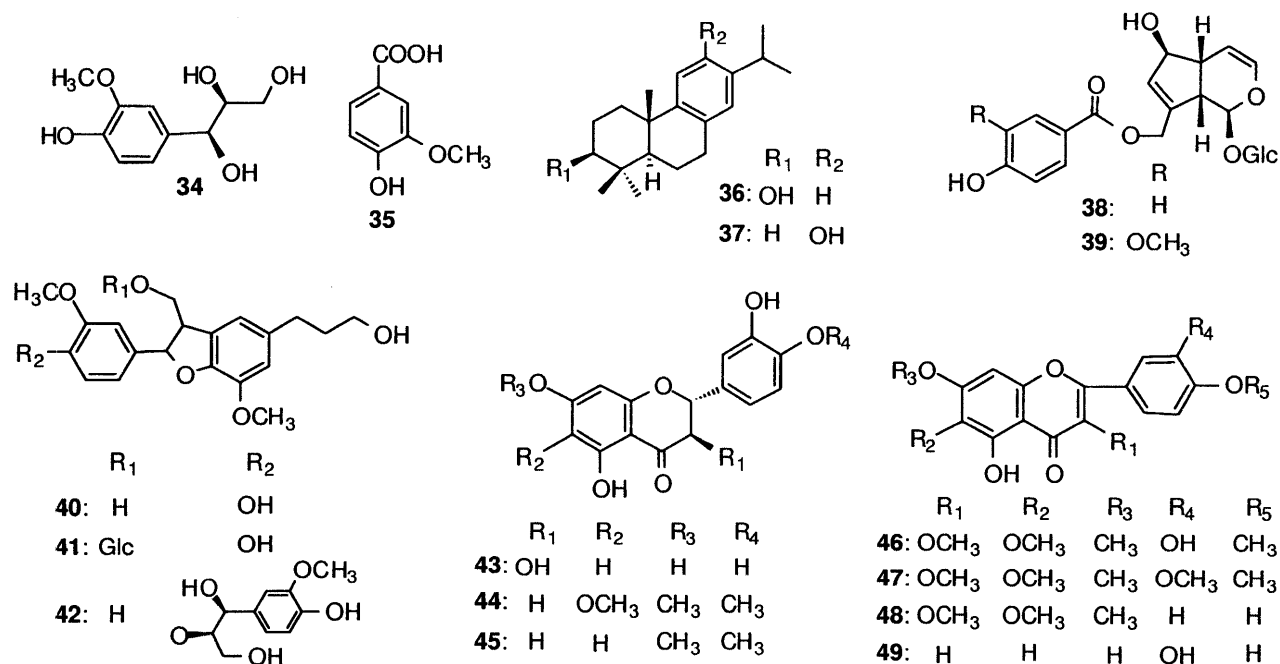


Fig. 4

は1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 消去活性試験¹²⁾で、L-cysteine よりも強いラジカスキャベンジグ活性を示した。特に、43 と 49 には α -tocopherol よりも強い活性が観察された。Yokozawa らは、DPPH 消去活性において、フラボノイド骨格の B 環の 3,4-dihydroxy 構造が活性発現に最も重要であると報告しているが¹³⁾、本試験結果もそれを支持した。さらに、46 は *in vitro* 実験 (MIT assay)¹⁴⁾でヒト肺癌細胞株 PC-12¹⁵⁾ およびヒト大腸癌細胞株 HCT116¹⁶⁾ に対して抗癌剤 cisplatin と同程度の強い細胞毒性を示した (Table 1)。最近、Beutler らは、フラボノイドの細胞毒性の発現において、B 環の 3-hydroxy-4-methoxy 構造、3 位の methoxy 基ならびに 5 位の水酸基が重要であり、さらに、46 の 7 位の methoxy 基が水酸基に置き換わった centaureidin が強い細胞毒性を示すことを明らかにしてい

尚、46 はハマゴウ果実に比較的多量に含まれていることから、今後詳細な活性試験を行う予定である。

ウイキョウ果実の成分研究¹⁸⁻²⁰⁾

ウイキョウ (*Foeniculum vulgare* MILLER) は、ヨーロッパ南部地中海沿岸地方原産のセリ科 (Umbelliferae) の多年草で、温帯各地で栽培されている。この果実 (Foeniculi Fructus) は香りが強く、芳香性健胃、駆風、去痰の目的で利用され、漢方方剤として安中散、補陰湯、丁香柿蒂湯に配合される。また、果実は香料として利用される他、パン、ケーキおよびクッキー等に混入される。ウイキョウ果実のメタノールエキスをヘキサンで脱脂し、ヘキサン可溶画分と不溶画分に分画した。両画分のうち、抗酸化活性の強かった不溶画分から、5 種の新モノテルペノイド配糖体

(50-54)ならびに4種の新オリゴスチルペノイド配糖体(55-58)を9種の既知化合物と共に分離した(Fig. 5). オリゴスチルペノイドがセリ科植物から分離されたのは本研究がはじめてと考えられる. また, ロダン鉄法で6種のスチルペノイド(55-60)にBHAよりも強い活性が確認された. さらに, 抗酸化活性を示すフェノール類の中に, ヒアルロニダーゼ阻害活性を示す化合物が報告されていることから^{21, 22)}, 55-60に上記阻害活性試験を行い, 59(IC₅₀: 135 μM)と60(IC₅₀: 60 μM)に抗アレルギー剤の disodium

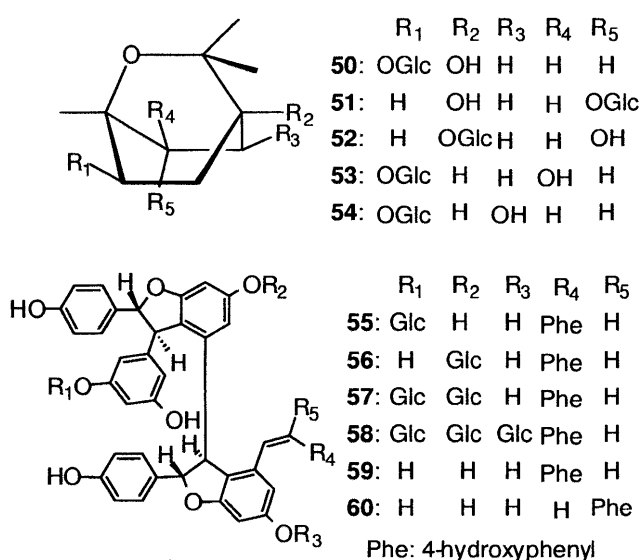


Fig. 5

cromoglycate (DSCG)よりも強い阻害活性が確認された. また, この阻害率(0.4 mM 濃度)はアグリコンのフェノール性水酸基に結合する glucose の数が増加するに従い, 減少した(阻害率: 59, 100%; 60, 98%; 55, 41%; 56, 37%; 57, 3%; 58, 8%). したがって, 本阻害活性には, これらのフェノール性水酸基が関与しているとも考えられた.

Tessaria integrifolia の成分研究^{23, 24)}

古来, ペルーではアンデス山中やアマゾン川流域に自生する植物を医療, 香味ならびに染色等の目的で利用している. 我々はペルー産有用植物の機能性成分研究の一環として²⁵⁻²⁷⁾, 喘息, 胃炎ならびに肝臓障害等の治療に用いられるキク科(Compositae)植物 *Tessaria integrifolia* Ruiz. et Pavon の成分研究を行い, 本植物地上部のメタノールエキスから, 10 種の新 eudesmane-type セスキテルペノイド(61-70)を18種の既知化合物と共に分離した(Fig. 6). 分離したセスキテルペノイドの中で, 3種の配糖体(61, 62, 64)の3位の配置は, いずれもβ配置であったが, 3位に

アシル基の結合したものは, すべて3α配置であった. また, 11種の芳香族化合物(71-81)(Fig. 7)にロダン鉄法を行い, 74を除くすべての化合物にα-tocopherolと同程度あるいはそれ以上の活性が観察された. 特に, 71と72はBHAよりも強い活性を示した. 本活性試験から, フラボノイド骨格の3位の糖結合は活性を弱めると推察された. 一方, DPPH消去活性試験では, 3種のフラボノイド(71-73), 5種の caffeoyl quinic acid 誘導体(75-79)ならびに1種のリグナン類(81)がα-tocopherolよりも強い活性

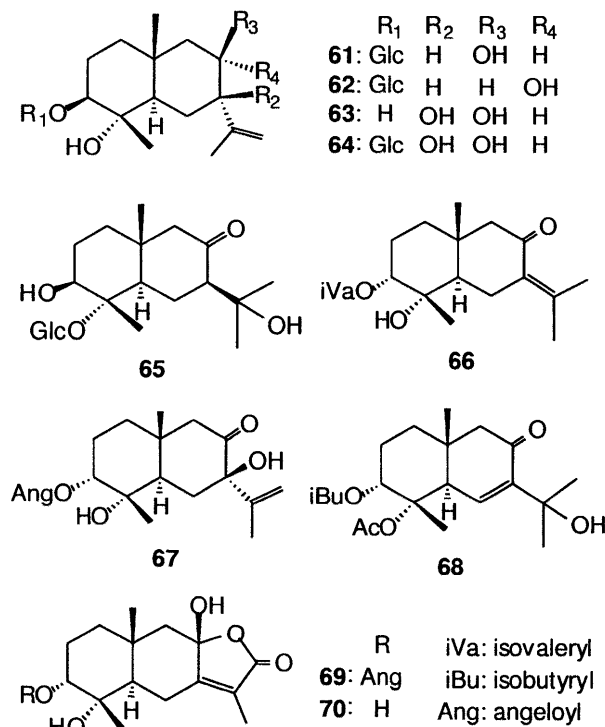


Fig. 6

を示した. 特に, フラボノイドならびに caffeoyl quinic acid 誘導体の8種はα-tocopherolの2倍あるいはそれ以上の強い活性を示した. 一方, ヒアルロニダーゼ阻害活性試験では, 75, 76および78にDSCGの約1/3, 77と79にDSCGの約2/3の阻害活性が, 観察された. これらの化合物はいずれも, 2個の caffeoyl 基を有するが, 活性の強かった77と79は, それぞれ quinic acid 残基ならびに isoquinic acid 残基のカルボキシル基が遊離状態で存在することから, 両カルボキシル基のメチルエステル化は活性を弱めると考えられた. 一方, フラボノイドでは72にDSCGと同程度の活性が見られた. また, この活性は3位のグルコシド結合, ならびにA環のフェノール性水酸基のメチル化により弱まった.

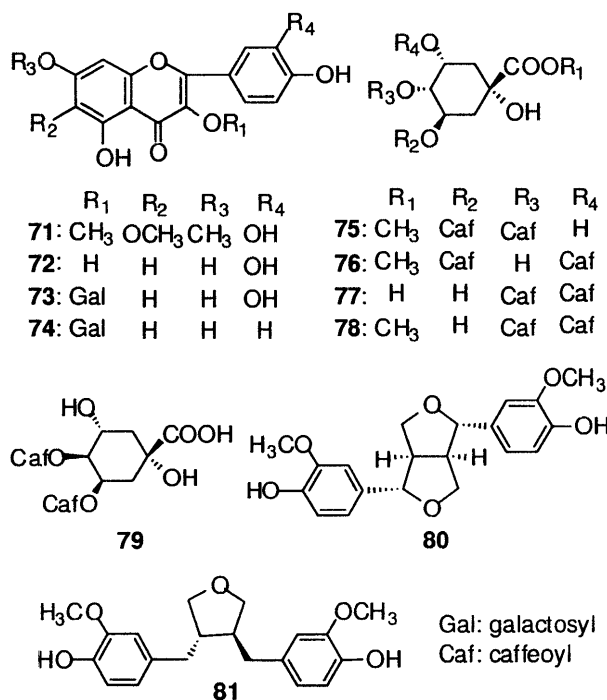


Fig. 7

石斛の成分研究²⁸⁾

石斛 (*Dendrobii Herba*) は、ラン科 (Orchidaceae) の *Dendrobium nobile* または同属植物の茎で、強壯、解熱、健胃の目的で利用される。また、漢方方剤として石斛湯、石斛清胃湯に処方される。石斛のメタノールエキスを酢酸エチルと水で分配後、さらに、酢酸エチル可溶画分をヘキサンで脱脂した。これら三画分のうち、最も抗酸化活性の強かった酢酸エチル可溶画分から1種の新 bibenzyl 誘導体 (82) を9種の既知化合物 (83-91) と共に、分離した (Fig. 8)。これらの化合物は、いずれもロダン鉄法で、BHA よりも強い活性を示した。さらに、84 は PC-12 および HCT116 に対して、強い細胞増殖抑制活性 (GI₅₀: PC-12, 460 ng/mL; HCT116, 532 ng/mL) を示した。尚、84 と類似化合物の 3'-hydroxy-3,4,4',5-tetramethoxybibenzyl にチューブリンの重合阻害活性が、報告されていることから^{29, 30)}、84 の細胞増殖抑制活性も、それと類似のメカニズムによるものと考えられた。

以上、強い抗酸化活性を示した5種の生薬エキスの機能性成分の研究について報告してきた。抗酸化活性においては、活性試験に用いた試料数が少なく、未だ詳細な構造活性相関を提出するには至っていないが、3,4-dihydroxyphenyl 基 > 3-hydroxy-4-methoxyphenyl 基 = 4-hydroxy-3-methoxyphenyl 基 > 4-hydroxyphenyl 基の順に活性が強

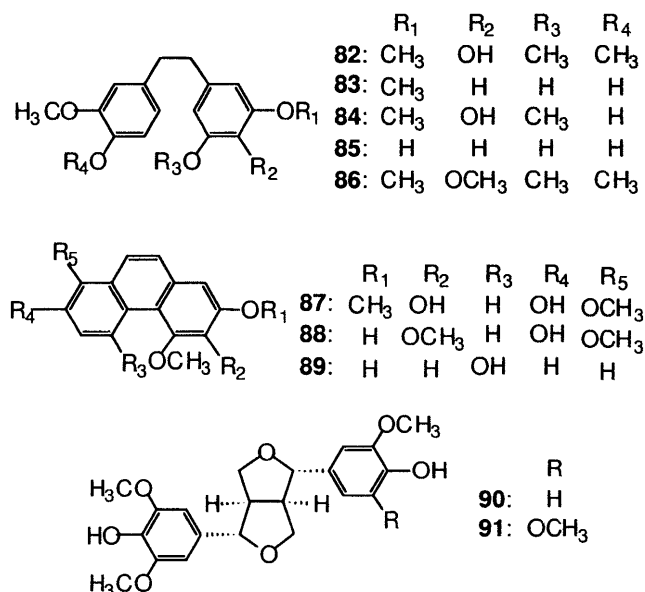


Fig. 8

まる傾向が観察された。また、ヒアルロニダーゼ阻害活性試験においても、3,4-dihydroxyphenyl 基を有する化合物に、強い阻害活性が確認された。特に、caffeoyl quinic acid 誘導体は強い阻害活性を示したが、本化合物群には強い 5-lipoxygenase 阻害活性も報告されていることから³¹⁾、それらに関する詳細な抗アレルギー活性解明に期待が持たれる。

今日、国民の健康維持への関心が高まるにつれて、薬用植物や食用植物に含まれる機能性成分研究の重要性が再認識されてきている。また、それらの研究成果として、特定保健用食品等が開発されてきているが、最近、著者らはラビットアイブルーベリー (*Vaccinium ashei* READE) 果実³²⁾ ならびにブラックベリー (*Rubus allegheniensis* PORT.) 果実³³⁾ 等の食用植物に含まれる成分研究にも着手しており、今後は、これらの食用植物も含めた有用植物中に含まれる機能性成分を明らかにしていきたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました恩師・熊本大学薬学部・野原稔弘教授に衷心より感謝致します。また、適切なご助言を頂きました九州東海大学農学部・伊東保之教授ならびに福岡大学薬学部・金城順英助教授に厚く御礼申し上げます。さらに、ご協力頂きました太田胃散・新甫勇次郎氏、中島嘉次郎氏および九州東海大学農学部の皆様に厚く感謝致します。

最後に、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補

助金ならびに学校法人東海大学総合研究機構研究奨励補助金の援助を受けました。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Yagi K., *Chem. Phys. Lipids*, **45**, 337-341 (1987).
- 2) Yoshikawa T., Naito Y., Kondo, M. "Anti-oxidants (Free Radicals and Biological Defense)" ed. by Niki E., Shimasaki H., Mino M., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1994, pp. 149-160.
- 3) Kikuzaki H., Nakatani N., *J. Food Sci.*, **58**, 1407-1410 (1993).
- 4) Ono M., Ito Y., Kubo S., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1094-1096 (1997).
- 5) Ono M., Ito Y., Nohara T., *Phytochemistry*, **48**, 207-209 (1998).
- 6) Ono M., Ito Y., Masuoka C., Nohara T., *Food Sci. Technol., Int.*, **4**, 115-120 (1998).
- 7) Ono M., Yamamoto M., Masuoka C., Ito Y., Yamashita M., Nohara T., *J. Nat. Prod.*, **62**, 1532-1537 (1999).
- 8) Ono M., Sawamura H., Ito Y., Mizuki K., Nohara T., *Phytochemistry*, **55**, 873-877 (2000).
- 9) Ono M., Yamamoto M., Yanaka T., Ito Y., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 82-86 (2001).
- 10) Ono M., Ito Y., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1220-1222 (2001).
- 11) Ono M., Yanaka T., Yamamoto M., Ito Y., Nohara T., *J. Nat. Prod.*, **65**, 537-541 (2002).
- 12) Uchiyama M., Suzuki Y., Fukuzawa K., *Yakugaku Zasshi*, **88**, 678-683 (1968).
- 13) Yokozawa T., Chen C. P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 213-222 (1998).
- 14) Mosmann T., *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 15) Kinjo M., Oka K., Naito S., Kohga S., Tanaka K., Oboshi S., Hayata Y., Yasumoto K., *Br. J. Cancer.*, **39**, 15-23 (1979).
- 16) Brattain M. G., Fine W. D., Khaled F. M., Thompson J., Brattain D. E., *Cancer Res.*, **41**, 1751-1756 (1981).
- 17) Beutler J. A., Hamel E., Vlietinck A. J., Haemers A., Rajan P., Roitman J. N., Cadellina J. H., II, Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, **41**, 2333-2338 (1998)
- 18) Ono M., Ito Y., Kinjo J., Yahara S., Nohara T., Niiho Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 868-871 (1995).
- 19) Ono M., Ito Y., Ishikawa T., Kitajima J., Tanaka Y., Niiho Y., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 337-342 (1996).
- 20) Ono M., Masuoka C., Ito Y., Niiho Y., Kinjo J., Nohara T., *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 53-55 (1997).
- 21) Kakegawa H., Matsumoto H., Endo K., Satoh T., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5079-5082 (1985).
- 22) Kuppusamy U. R., Khoo H. E., Das N. P., *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 397-401 (1990).
- 23) Ono M., Masuoka C., Odake Y., Ikegashira S., Ito Y., Nohara T., *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 106-114 (2000).
- 24) Ono M., Masuoka C., Odake Y., Ito Y., Nohara T., *Phytochemistry*, **53**, 479-484 (2000).
- 25) Masuoka C., Ono M., Ito Y., Nohara T., *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 285-289 (1997).
- 26) Masuoka C., Ono M., Ito Y., Okawa M., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1413-1415 (2002).
- 27) Masuoka C., Ono M., Ito Y., Nohara T., *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 197-201 (2003).
- 28) Ono M., Ito Y., Masuoka C., Koga H., Nohara T., *Food Sci. Technol., Int.*, **1**, 115-120 (1995).
- 29) Lin C. M., Singh S. B., Chu P. S., Dempcy R. O., Schmidt J. M., Pettit G. R., Hamel E., *Mol. Pharmacol.*, **34**, 200-208 (1988).
- 30) Getahun Z., Jurd L., Chu P. S., Lin C. M., Hamel E., *J. Med. Chem.*, **35**, 1058-1067 (1992).
- 31) Nishizawa M., Izuhara R., Kaneko K., Koshihara Y., Fujimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 87-95 (1988).
- 32) Ono M., Masuoka C., Koto M., Tateishi N., Komatsu H., Kobayashi H., Igoshi K., Ito Y., Okawa M., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1416-1417 (2002).
- 33) Ono M., Tateishi M., Masuoka C., Kobayashi H., Igoshi K., Komatsu H., Ito Y., Okawa M., Nohara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 200-202 (2003).