

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—

東田 千尋

Overcoming Several Neurodegenerative Diseases by Traditional Medicines
—The Development of Therapeutic Medicines and Unraveling Pathophysiological Mechanisms—

Chihiro TOHDA

Division of Biofunctional Evaluation, Research Center for Ethnomedicine, Institute of Natural Medicine,
University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama City 930-0194, Japan

(Received March 27, 2008)

Ashwagandha (root of *Withania somnifera*) has been used for many purposes, it is mainly considered a tonic in traditional Ayurvedic medicine. This review focuses on the effects of compounds isolated from Ashwagandha on dementia models and on the spinal cord injury model. Our study demonstrated that the active constituents, withanolide A, withanoside IV, and withanoside VI, restored presynapses and postsynapses, in addition to both axons and dendrites in cortical neurons after $A\beta(25-35)$ -induced injury. *In vivo*, oral withanolide A, withanoside IV, and withanoside VI (10 $\mu\text{mol/kg/day}$ for 12 days) improved $A\beta(25-35)$ -induced memory impairment, neurite atrophy, and synaptic loss in the cerebral cortex and hippocampus in mice. Since spinal cord injury (SCI) is also difficult to treat, and therefore practical and curable strategies for SCI are desired. Oral treatment with withanoside IV improved locomotor functions in mice with SCI. In mice treated with withanoside IV (10 $\mu\text{mol/kg/day}$ for 21 days), the axonal density and peripheral nervous system myelin level increased. The loss of CNS myelin and increase in reactive gliosis were not affected by withanoside IV. Additionally, sominone, an aglycone of withanoside IV, was identified as the main metabolite after oral administration of withanoside IV in mice. Withanolide A, withanoside IV, and withanoside VI are therefore important candidates for the therapeutic treatment of neurodegenerative diseases. In particular, withanoside IV was shown to control neurons as well as glial cells for reconstruction neuronal networks. To clarify key events in overcoming neurodegeneration, we are now studying the molecular targets and signal cascades of sominone.

Key words—alzheimer's disease; spinal cord injury; axon; dendrite; synapse; myelin

1. はじめに

中枢神経系においては、神経細胞の変性が生じたのちに、変性した神経細胞そのものの機能を回復させることや、神経細胞の数を元に戻すことは難しい。それに比べ、生き残った神経細胞を活性化し、新たにシナプスを形成させることの方がより効果的である。またそれが薬物投与により達成されれば、神経細胞の移植といった方法よりも多くの患者の治療が可能となる。そこで、障害を受けた中枢神経機能を回復させるような神経回路網を再構築する薬物

の開発を目指した。

Ashwagandha (ナス科 *Withania somnifera* Dunal の根) はインド人参とも呼ばれ、アーユルヴェーダ医学で用いられる代表的な薬物であり、強壯、向知性薬として用いられている。基礎研究としては、Ashwagandha エキスを経口投与することにより、ラットにおいてストレス誘発性の海馬神経細胞の脱落が抑制され、¹⁾ マウスにおいてスコポラミン誘発性の記憶・学習障害が改善される²⁾ ことが報告されている。Ashwagandha から単離された化合物の研究では、sitoinoside IX 及び sitoinoside X が正常ラットの記憶・学習能力を高め、³⁾ sitoinosides VII, VIII, IX, X 及び withaferin A の等モル混合物が、イボテン酸誘発の脳障害ラットにおいて脳内のアセチルコリン濃度、コリンアセチルトランスフェ

富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物研究センター
薬効解析部 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

e-mail: chihiro@inm.u-toyama.ac.jp

本総説は、北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ラーゼ活性及びムスカリン性アセチルコリン受容体数を増加させることにより、記憶・学習障害を改善させること⁴⁾が明らかにされている。しかし、神経突起伸展作用に関しては、Ashwagandh エキス及びその含有成分が検討されたことはなかった。

2. アルツハイマー病モデルにおける Withanolide 類の作用

2-1. 培養神経細胞における神経突起伸展作用及びシナプス形成作用

Ashwagandha メタノールエキスと水エキスの神経突起伸展活性を、株化神経細胞を用いてスクリーニングしたところ、メタノールエキスのみ有意な活性がみられた。⁵⁾そこで、メタノールエキスから 18 種の化合物を単離し、さらに神経突起伸展活性を検討した結果、活性化化合物として withanolide A, withanoside IV, withanoside VI を同定した (Fig. 1)。^{6,7)}

アルツハイマー病患者の脳内では、アミロイド β を核とする老人斑が蓄積し、その周辺で神経突起の変性、シナプスの減少が生じ、これらが記憶障害と関連していることが報告されており、⁸⁻¹⁰⁾アミロイド β の生成、沈着がアルツハイマー病の主要原因とするアミロイド仮説が支持されている。また、アミロイド β ($A\beta$) を *in vitro* で神経細胞に処置することにより、神経細胞死^{11,12)}及び神経突起萎縮¹³⁾が誘発されること、 $A\beta$ をラット脳室内に投与することにより記憶学習障害が生じること¹⁴⁾が報告されている。

ラット大脳皮質神経細胞培養 24 時間後、 $A\beta$ (25–35) (10 μ M) あるいは溶媒を細胞に処置した。 $A\beta$ (25–35) 処置 4 日後、withanolide A, withanoside

IV, withanoside VI (各 1 μ M)、あるいは NGF (100 ng/ml)、あるいは溶媒 (Veh) を細胞に処置した。 $A\beta$ (25–35) は、全長 $A\beta$ (1–40 あるいは 1–42) と同様の作用を表すことが知られている部分配列である。 $A\beta$ (25–35) 処置後に溶媒を処置した群では、コントロール群に比べて軸索 (Fig. 2) 及び樹状突起 (Fig. 3) が萎縮したままであった。一方、withanolide A,^{15,16)} withanoside IV,¹⁷⁾ withanoside VI¹⁶⁾ を処置した群では、溶媒処置群に比べ、軸索 (Fig. 2) 及び樹状突起 (Fig. 3) が有意に長く再伸展していた。ポジティブコントロールの NGF を処置した群でも同様に、軸索及び樹状突起の再伸展が認められた。

神経回路網を再構築するためには、伸展した軸索及び樹状突起がシナプスを形成することが必要である。次に、シナプス減少が生じた神経細胞に対する各化合物の作用を検討した。21 日間ラット大脳皮質神経細胞を培養して十分にシナプスを形成させたのちに、 $A\beta$ (25–35) を処置してシナプス減少を誘発させた。 $A\beta$ (25–35) 処置 4 日後、各化合物を処置し、その 7 日後、抗 synaptophysin 抗体あるいは抗 PSD-95 抗体を用いて免疫染色を行った。 $A\beta$ (25–35) 処置後に溶媒を処置した群では、コントロール群に比べ、synaptophysin 陽性顆粒の面積及び PSD-95 陽性顆粒の面積ともに有意に減少したままであった [Figs. 4 (B), 5 (B)]。一方、withanolide A, withanoside IV, withanoside VI を処置した群では、synaptophysin 陽性顆粒の面積 (Fig. 4) 及び PSD-95 陽性顆粒の面積 (Fig. 5) が、溶媒処置群に比べて有意に増加した。

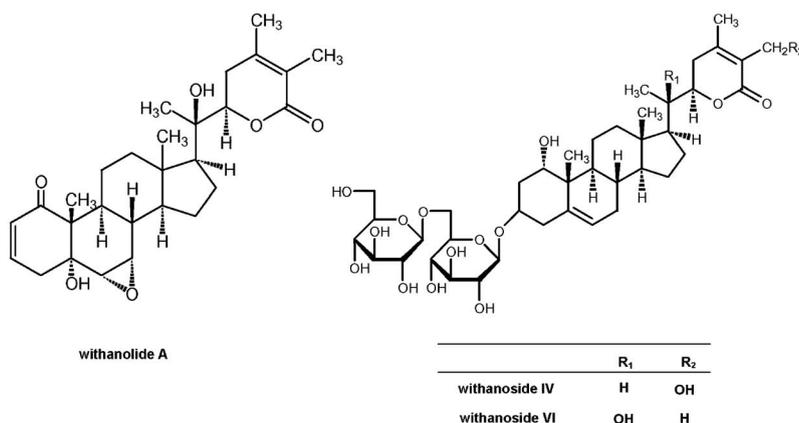


Fig. 1. Structures of Withanolide A, Withanoside IV and Withanoside VI

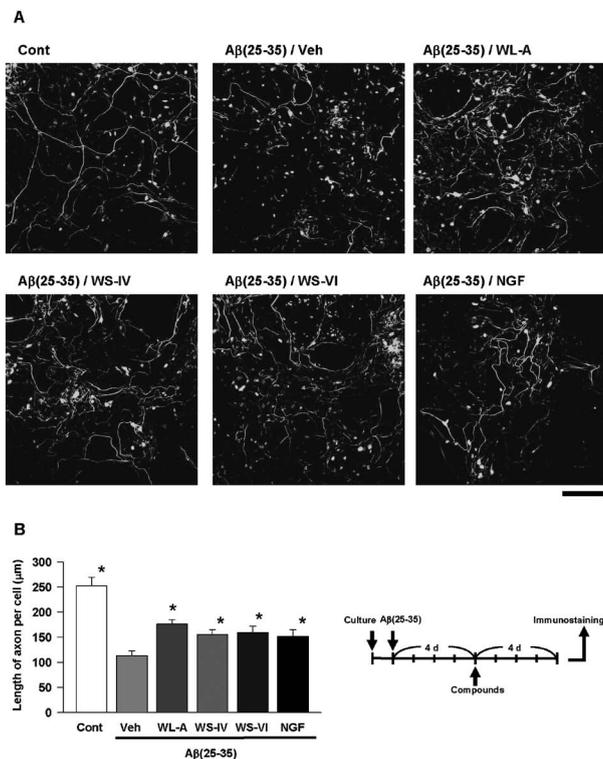


Fig. 2. Effects of Withanolides on Axons After $A\beta(25-35)$ -induced Atrophy

Cortical neurons were cultured for 24 h and were then treated with or without $10 \mu\text{M}$ $A\beta(25-35)$. Four days after the administration of $A\beta(25-35)$, cells were treated with withanolide A (WL-A; $1 \mu\text{M}$), withanoside IV (WS-IV; $1 \mu\text{M}$), withanoside VI (WS-VI; $1 \mu\text{M}$), NGF (100 ng/ml), or vehicle (0.1% DMSO, Veh). Four days after treatment, the cells were fixed and immunostained for phosphorylated NF-H. The lengths of immunopositive neurites were measured. Values are means \pm s.e.m. of data from 30 cells. $*p < 0.05$ when compared with Veh. Scale = $100 \mu\text{m}$.

NGF 処置では前シナプス及び後シナプスいずれも再形成されなかった。様々な投与スケジュールで NGF 処置によるシナプス形成促進作用を検討したが、前シナプス及び後シナプスいずれも形成が促進されなかった。

2-2. Withanolide A, withanoside IV, withanoside VIによる記憶障害改善作用 $A\beta(25-35)$ を側脳室に単回投与して作製したアルツハイマーモデルマウスに対する各薬物の作用を検討した。マウスに $A\beta(25-35)$ を投与して7日後、各化合物の連続経口投与を開始した。経口投与開始7日後、すなわち $A\beta(25-35)$ を投与して14日後からモーリス水迷路を用いて記憶獲得試験を行った。いずれの群のマウスも、記憶獲得試験を繰り返す毎に escape latencies を短縮していった。記憶獲得試験開始5日目、 $A\beta(25-35)$ 投与群は、コントロール群に比べ、escape latencies が遅延する傾向を示した。一方、

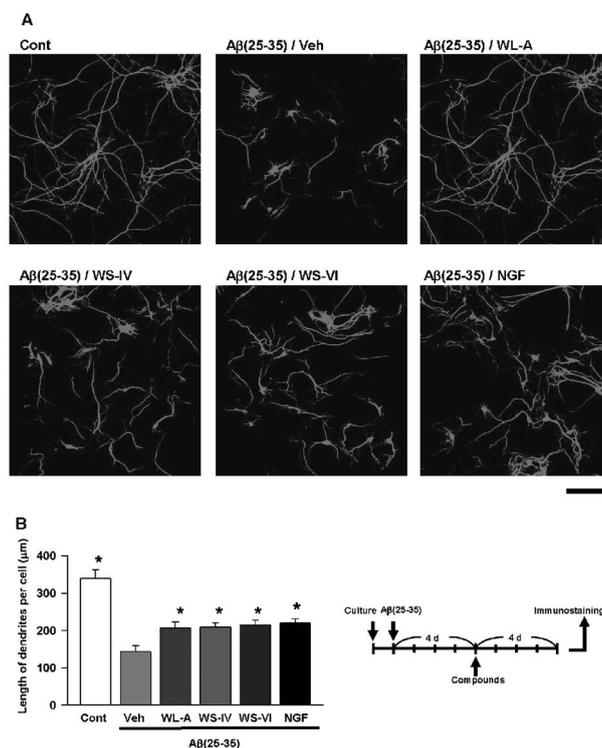


Fig. 3. Effects of Withanolides on Dendrites after $A\beta(25-35)$ -induced Atrophy

Cortical neurons were cultured for 24 h and were then treated with or without $10 \mu\text{M}$ $A\beta(25-35)$. Four days after the administration of $A\beta(25-35)$, cells were treated with withanolide A (WL-A; $1 \mu\text{M}$), withanoside IV (WS-IV; $1 \mu\text{M}$), withanoside VI (WS-VI; $1 \mu\text{M}$), NGF (100 ng/ml), or vehicle (0.1% DMSO, Veh). Four days after treatment, the cells were fixed and immunostained for MAP2a & 2b. The lengths of immunopositive neurites were measured. Values are means \pm s.e.m. of data from 30 cells. $*p < 0.05$ when compared with Veh. Scale = $100 \mu\text{m}$.

withanolide A,^{15,16)} withanoside IV,¹⁷⁾ withanoside VI¹⁶⁾ を経口投与した群では、escape latencies はむしろコントロールレベルよりも短縮傾向にあった [Fig. 6(A)].

記憶獲得試験終了後、化合物の経口投与を止め、その7日後に記憶保持テストを行った。Crossing numbers を測定した結果、 $A\beta(25-35)$ 投与群では、コントロール群に比べて有意に減少した。一方、withanolide A, withanolide IV, withanoside VI を経口投与していた群では、crossing numbers はコントロール群と同程度であり、中でも withanoside IV の作用が最も強く、 $A\beta(25-35)$ 投与群に比べて有意に crossing numbers を増加させた [Fig. 6(B)].

記憶保持試験終了後、マウス脳切片を作製し、抗リン酸化型 NF-H 抗体、抗 MAP2 抗体、抗 synaptophysin 抗体、抗 PSD-95 抗体をそれぞれ用いて免疫染色を行い、軸索、樹状突起、前シナプス、後シ

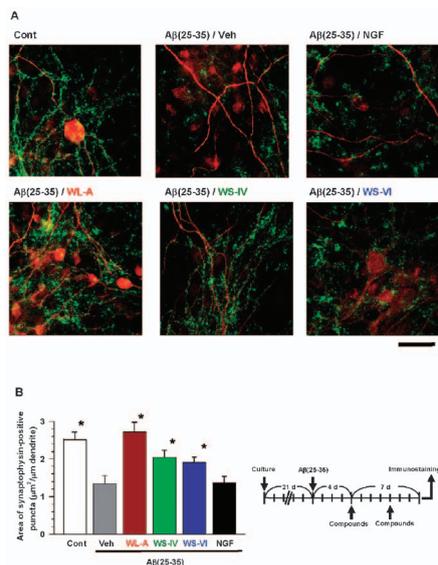


Fig. 4. Effects of Withanolides on Synaptic Reconstruction After $A\beta(25-35)$ -induced Presynaptic Loss

After cultivation for 21 days, the cortical neurons were treated with or without $A\beta(25-35)$. Four days after the administration of $A\beta(25-35)$, the cells were treated with withanolide A (WL-A; $1 \mu M$), withanoside IV (WS-IV; $1 \mu M$), withanoside VI (WS-VI; $1 \mu M$), NGF (100 ng/ml), or vehicle (0.1% DMSO, Veh). Seven days after the drug treatment, the cells were fixed and double-immunostained for synaptophysin (green) and MAP2a & 2b (red). Areas of synaptophysin-positive puncta per $1 \mu m$ of dendrites were measured. Values are means \pm s.e.m. of data from 20–25 dendrites. $*p < 0.05$ when compared with Veh. Scale = $20 \mu m$.

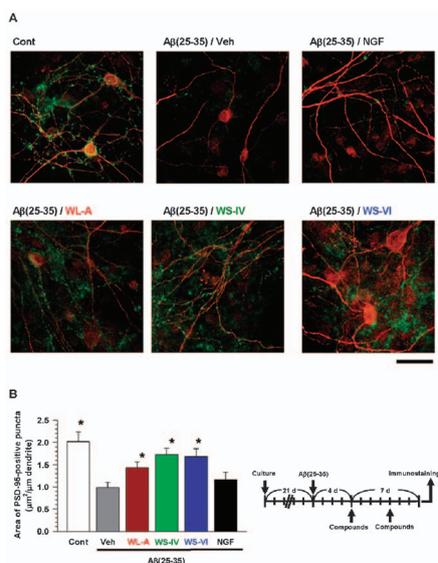


Fig. 5. Effects of Withanolides on Synaptic Reconstruction After $A\beta(25-35)$ -induced Postsynaptic Loss

After cultivation for 21 days, the cortical neurons were treated with or without $A\beta(25-35)$. Four days after the administration of $A\beta(25-35)$, the cells were treated with withanolide A (WL-A; $1 \mu M$), withanoside IV (WS-IV; $1 \mu M$), withanoside VI (WS-VI; $1 \mu M$), NGF (100 ng/ml), or vehicle (0.1% DMSO, Veh). Seven days after the drug treatment, the cells were fixed and double-immunostained for PSD-95 (green) and MAP2a & 2b (red). Areas of synaptophysin-positive puncta per $1 \mu m$ of dendrites were measured. Values are means \pm s.e.m. of data from 20–25 dendrites. $*p < 0.05$ when compared with Veh. Scale = $20 \mu m$.

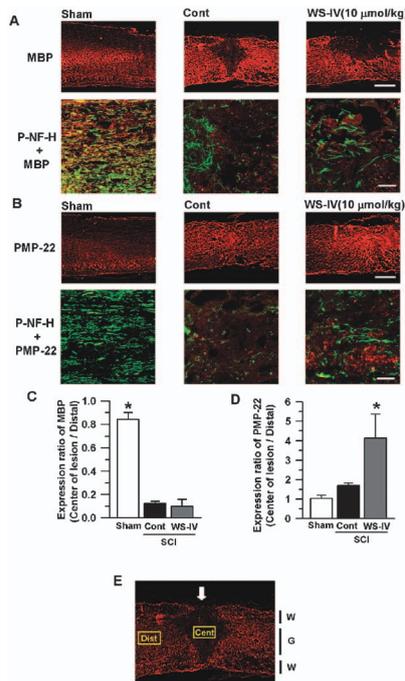


Fig. 9. Regenerative Effects of Withanoside IV on Damage to Axons and Myelin

Twenty-one days after SCI, spinal cords were immunostained with the anti-P-NF-H antibody or double immunostained with the anti-P-NF-H and -MBP antibodies (A), or anti-P-NF-H and -PMP-22 antibodies (B). P-NF-H-positive axons are shown in green, and MBP- or PMP-22-positive myelin is shown in red. The expression levels of MBP (C) and PMP-22 (D) are shown as the ratios of fluorescence intensity in the center of lesion to that in the distal site 800–1100 μm apart from the center of lesion in the white matter. Values represent mean and SEM. $*p < 0.05$ when compared with vehicle-treated SCI group (Cont) (Student's *t*-test).

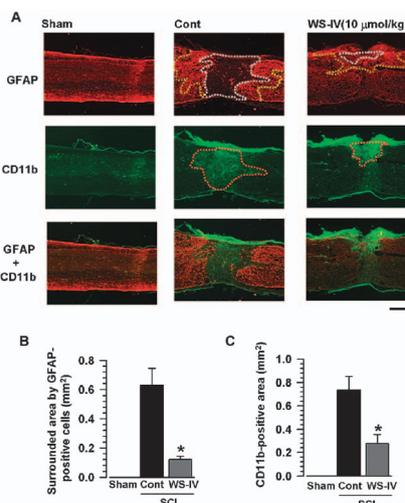


Fig. 10. Cohesive Effects of Inflammatory Cells by Withanoside IV

Fourteen days after SCI, spinal cords were immunostained with the anti-GFAP antibody and anti-CD11b antibody. Surrounded area by GFAP-positive cells (B) and CD11b-positive area (C) in sham-operated (open column, $n = 3$), vehicle-treated SCI (closed column, $n = 5$), and withanoside IV-treated SCI (hatched column, $n = 5$) mice are shown. Values represent mean and SEM of 3–5 mice. $*p < 0.05$ when compared with vehicle-treated SCI group (Cont) (Student's *t*-test).

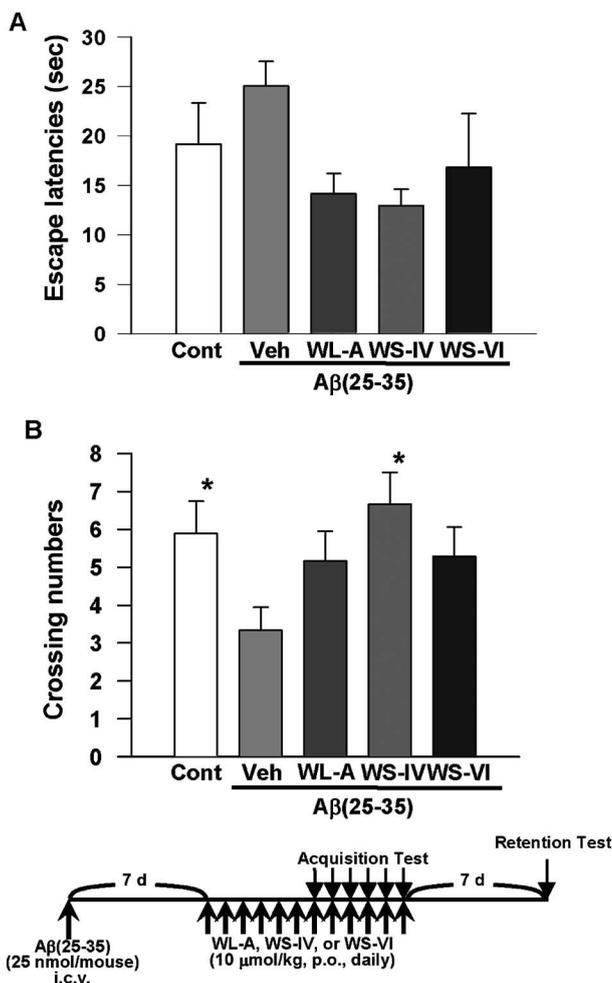


Fig. 6. Effect of Withanolides on Spatial Memory Deficits Induced by A β (25-35)

Withanolide A (WL-A; 1 μ M), withanoside IV (WS-IV; 1 μ M), withanoside VI (WS-VI; 1 μ M), or vehicle (Veh) was administered per orally 7 days after i.c.v. injection of A β (25-35) into mice. (A) Escape latencies at 5 days after starting the memory acquisition test. (B) The memory retention test was performed 7 days after the last acquisition test. Crossing numbers over the position where the platform had been located were measured for 60 s. The time schedule of the experiment is illustrated. Data are means \pm s.e.m. of values from 6–9 mice. * p <0.05 when compared with Veh.

ナプスの形成を評価した。観察は、海馬 CA1, CA3 領域、頭頂皮質、側頭皮質について行った。観察したいずれの部位においても、A β (25-35) 投与群ではコントロール群に比べて軸索、樹状突起、前シナプスが減少していた。特に軸索及び樹状突起は、海馬に比べて大脳皮質において顕著に減少していた。前シナプスに関しては、観察した 4 部位いずれにおいても減少していた。また、線条体及び視床においては、A β (25-35) 投与による軸索、樹状突起、前シナプスの明らかな減少はみられなかった。一方、withanolide A, withanoside IV, withanoside VI を経口

投与した群では、これらの減少はみられず、コントロール群とほぼ同じ発現を示した。またこのとき withanoside IV 経口投与群は、他の 2 化合物投与群に比べて、側頭皮質においてより多くの軸索を再形成していた。後シナプスに関しては、観察したいずれの部位においても A β (25-35) 投与による明らかな減少はみられず、いずれの群間でも明らかな差はみられなかった。

3. 脊髄損傷マウスにおける Withanoside IV の改善作用

脊髄損傷では、脳と脊髄を結ぶ上行性、あるいは下行性軸索路が、損傷により断裂し、神経細胞やオリゴデンドロサイトの損失が起これると、脳と末梢との神経伝達が正常に行われなくなり、運動、感覚機能の麻痺を起こす。脊髄損傷の予後は損傷直後の治療に左右され、慢性期からの回復は期待できない。また、完全麻痺の場合予後は極めて悪く、不完全麻痺においても完全な改善は望めず、機能回復を目指した治療法が求められている。そこで、withanoside IV が損傷脊髄においても機能回復に至る治療薬となり得る可能性を考え検討した。¹⁸⁾

3-1. 後肢運動機能に対する作用 後肢運動機能は BBB スケール [Figs. 7(A), 7(C)] と立ち上がり回数 [Figs. 7(B), 7(D)] によって評価した。偽手術 (Sham) 群のスコアは手術翌日から観察期間終了時まで、手術前の正常な後肢運動機能を示す 21 であった。脊髄損傷したコントロール群では、sham 群と比較して有意なスコアの減少がみられ、損傷翌日には、可動幅 50% 以内で 1 ないし 2 関節のみ動かせることを示すスコア 1 であった。以後、損傷 14 日後にかけて次第にスコアが上昇したが、後肢に体重をかけ歩行可能なことを示すスコア 11 を超えることはなかった。これに対し、withanoside IV (10 μ mol/kg) 投与群では投与翌日より、コントロール群と比較して有意にスコアの上昇がみられた。立ち上がり回数では、コントロール群では損傷後から観察期間を通して立ち上がり行動はほとんど観察されなかったが、withanoside IV (10 μ mol/kg) 投与群では、損傷 7 日後より 21 日後にかけて次第に立ち上がり行動の増加が観察され、コントロール群と比較すると有意な増加だった。Withanoside IV の 50 μ mol/kg 投与の効果は 10 μ mol/kg の場合と有意には差がみられなかった。

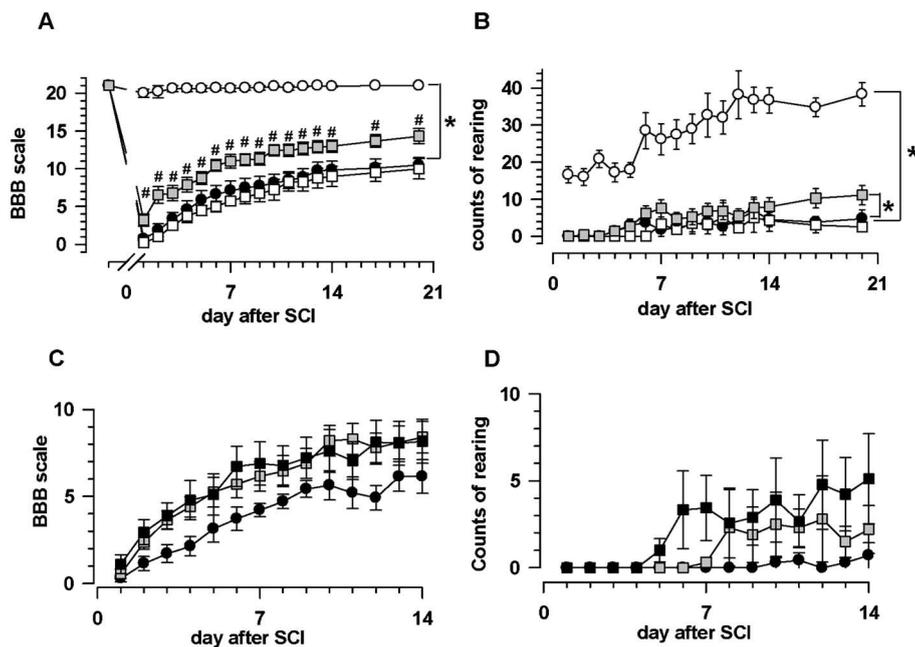


Fig. 7. Treatment with Withanoside IV Improves Hindlimb Function

To the Sham-operated control group, vehicle was administered (open circles, $n=10$). To SCI mice, withanoside IV at a dose of $1 \mu\text{mol/kg}$ body weight (open squares, $n=4$) or $10 \mu\text{mol/kg}$ body weight (gray squares, $n=9$), $50 \mu\text{mol/kg}$ body weight (closed squares, $n=9$), or vehicle alone (closed circles, $n=8$) was administered orally for 21 days. Hindlimb behavior was assessed using a BBB locomotor scale for 20 days after SCI (A, C). The frequency of open-field rearing behavior on hindlimbs was determined for 5 min (B, D). Values represent mean and SEM. * $p<0.05$; # $p<0.05$ when compared with vehicle-treated SCI group (*: repeated measures two-way ANOVA, #: Kruskal-Wallis one-way ANOVA).

3-2. Withanoside IV の軸索伸展作用 損傷 21 日後, 脊髓切片を作製し, 軸索マーカーである抗リン酸化型 NF-H 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った [Fig. 8(A)]. 白質においては単位面積当たりの軸索の全長を測定した [Figs. 8(B), 8(C)]. 一方, 灰白質においては軸索が様々な方向に高密度で投射しており, 個々の軸索の長さを測定することが不可能なため, リン酸化型 NF-H の蛍光輝度を定量した [Figs. 8(D), 8(E)]. コントロール群の白質における軸索は, 吻側部及び尾側部の両方で sham 群と比較し有意に減少した. それに対し, withanoside IV 投与群では, 吻側部及び尾側部の両側で軸索の伸展がみられた [Figs. 8(B), 8(C)]. また, コントロール群の灰白質でも, 吻側部, 及び尾側部において sham 群と比較して軸索密度の低下が有意にみられた. それに対し, withanoside IV 投与群では, コントロール群に比べ軸索密度の増加傾向がみられた [Figs. 8(D), 8(E)].

3-3. Withanoside IV のグリア細胞への作用

リン酸化型 NF-H と中枢性ミエリンのマーカーである MBP [Fig. 9(A)], あるいはリン酸化型 NF-H と末梢性ミエリンのマーカーである PMP-22

[Fig. 9(B)] に対する抗体の組み合わせを用い脊髓切片の二重免疫染色を行った. MBP, 及び PMP-22 の発現は, 無傷である損傷遠位部に対する損傷中心部の蛍光輝度の比によって評価した. Sham 群の無傷脊髓では MBP の発現がみられた. 一方, コントロール群では, 損傷中心部位で MBP 陽性, すなわち中枢性ミエリンの脱落が観察された. 定量的結果, MBP の発現レベルは sham 群と比較し有意に減少した [Fig. 9(C)]. Withanoside IV 投与群では, 損傷中心部位で軸索伸展が観察されているものの, 中枢性ミエリンの脱落の程度は, コントロール群との差はみられなかった [Figs. 9(A), 9(C)].

一方, 末梢性ミエリンの発現を示す PMP-22 の陽性部位は sham 群ではほとんど観察されなかった [Fig. 9(B)]. これに対し, コントロール群の損傷脊髓では, 損傷中心部位でわずかに PMP-22 の発現増加がみられ, withanoside IV 投与群では, 軸索の伸展がみられる付近でコントロール群と比較し有意に PMP-22 の発現が増加した [Figs. 9(B), 9(D)].

損傷 14 日後に作製した切片を用い, アストロサイトマーカーである GFAP, マイクログリアマ

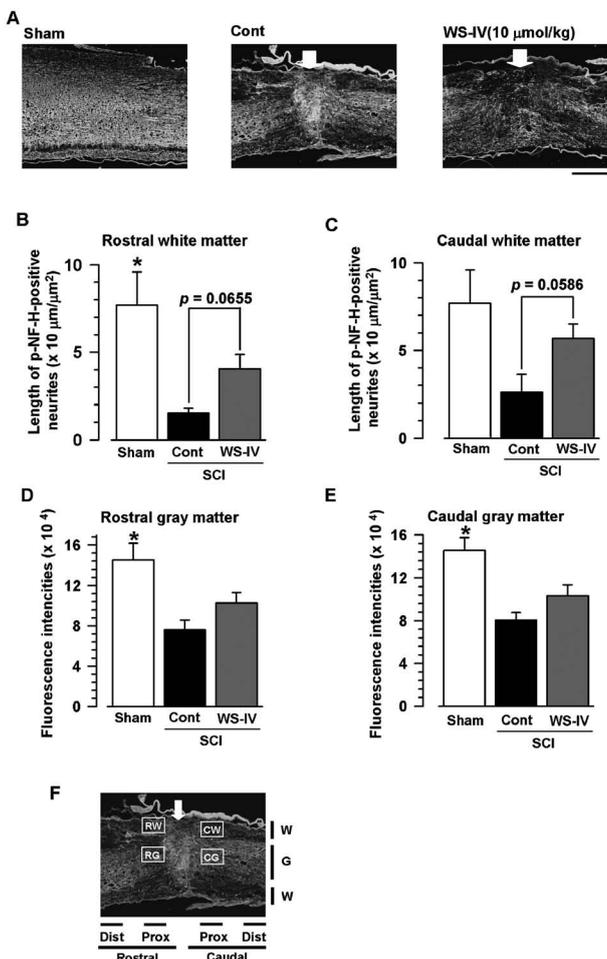


Fig. 8. Treatment with Withanoside IV Induces the Growth of Axons

The length of phosphorylated NF-H-positive axons in the rostral (A) or caudal (B) site adjacent to the center of lesion in the white matter was measured in the sham-operated (open column, $n=5$), vehicle-treated SCI (closed column, $n=3$) and withanoside IV-treated SCI (gray column, $n=5$) mice. The fluorescence intensity of phosphorylated NF-H-positive areas in the rostral (C) or caudal (D) site adjacent to the center of lesion (proximal site: Prox) in the gray matter was measured in the sham-operated (open column, $n=5$), vehicle-treated SCI (closed column, $n=4$) and withanoside IV-treated SCI (hatched column, $n=5$) mice. In a photograph, the center of lesion (arrow) and measured sites were indicated as follows; the rostral white matter: RW, the caudal white matter: CW, the rostral gray matter: RG, the caudal gray matter: CG. Values represent mean and SEM. * $p<0.05$ when compared with vehicle-treated SCI group (Cont) (Student's *t*-test).

カーである CD11b (Fig. 10) に対する抗体による蛍光免疫染色を行った。炎症性グリアの局在変化を観察するため、GFAP 陽性アストロサイトの損傷中心部位への浸潤、及び CD11b 陽性マイクログリアの凝集を、陽性面積から測定した。Sham 群の無傷脊髄においては GFAP 陽性アストロサイトの発現は観察されなかったが、コントロール群では損傷中心部位の空洞部周囲にアストロサイトの発現が観察された。また、マイクログリアの発現は sham 群

では観察されなかったが、コントロール群では損傷中心部位で発現が増加された。アストロサイトが囲む空洞部の面積が、withanoside IV 投与群ではコントロール群に比べ有意に減少した。また、withanoside IV 投与群では、コントロール群に比べ CD11b 陽性マイクログリアの局在範囲の有意な減少がみられた。

4. 経口投与された Withanoside IV の活性本体

薬物を経口投与で用いる場合、その薬物は体内に吸収されて血中に移行し、標的臓器において作用を発現する。経口投与された薬物は、未変化体のまま標的臓器へ作用する場合と、胃酸、cytochrome P450、腸内細菌等により代謝物となって作用する場合がある。天然薬物由来の化合物、特に配糖体においては、腸内細菌による代謝を受ける例が多くみられる。Withanoside IV は 3 位にグルコースが 2 つ結合したステロイドサポニンであるため、経口投与後には代謝されて体内に吸収される可能性が高い。

マウスに withanoside IV (1000 μmol/kg) を単回経口投与して、10 分、15 分、30 分、3 時間、7 時間、12 時間後の血清を HPLC で分析した。WS-IV (保持時間 14 分付近) はいずれの血清からも検出されず、投与 3 時間後に保持時間 18 分付近 (化合物 2) と 35 分付近 (化合物 1) に 2 つの新たなピークが検出され、両ピークとも 7 時間後に最大になった。

Withanoside IV (1000 μmol/kg) を単回経口投与して 7 時間後の血清を用いて、LC/MS 測定を行った (Fig. 11)。UV クロマトグラムを比較した結果、withanoside IV 投与マウスの血清中には [Fig. 11 (B)], 代謝物 1 (保持時間 13.9 分)、代謝物 2 (保持時間 12.6 分) が検出された。

代謝物 1 の分子イオンピーク m/z 459.3 は withanoside IV のサポゲニンと考えられた。一方、代謝物 2 の m/z 800.2 は withanoside IV に分子量 18 の一価の陽イオンが付加した分子イオンピークであると考えられたが、どのようなイオンが付加しているのかどうかは不明であった。Withanoside IV 投与 7 時間後の血清中には、UV クロマトグラム [Fig. 11 (B)] においても MS クロマトグラム [Figs. 11 (C), 11 (D)] においても、withanoside IV の保持時間と一致するピークは検出できなかった。よって、MS クロマトグラムと UV クロマトグラムでのピークの一致により、代謝物 1 を sominone と同定した。

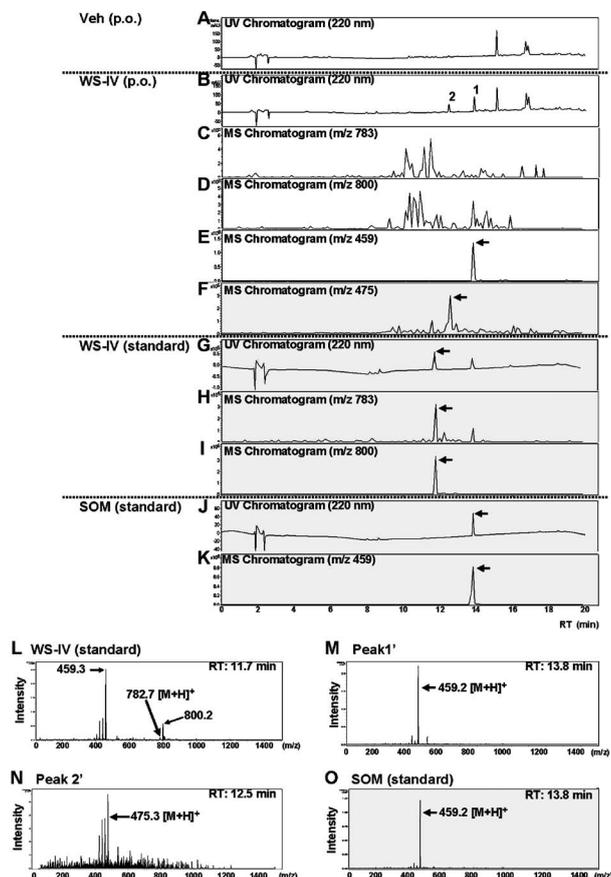


Fig. 11. LC/MS Chromatograms of Serum From Mice After Oral Administration of Withanoside IV

A UV chromatograms at 220 nm of serum from mice at 7 h after oral administration of vehicle (A) or withanoside IV (1000 $\mu\text{mol/kg}$) (B) were shown. MS chromatograms at m/z 783 (C), m/z 800 (D), m/z 459 (E) and 475 (F) of serum at 7 h after oral administration of withanoside IV (1000 $\mu\text{mol/kg}$) were shown. A UV chromatogram at 220 nm (G) and a MS chromatogram at m/z 783 (H) and m/z 800 (I) of standard withanoside IV, and a UV chromatogram at 220 nm (J) and a MS chromatogram at m/z 459 (K) of standard sominone are shown as references. MS spectra of peaks with retention times of 13.8 min (M) and 12.5 min (N) in a UV chromatogram of the serum from mice after oral administration of withanoside IV were shown. A pattern of molecular ion peaks of retention times 11.7 min (L) of a standard withanoside IV and 13.8 min (O) of standard sominone in a UV chromatogram was shown as a reference.

5. おわりに

現在、臨床で用いられている抗認知症薬は、症状の進行を遅らせる効果しか期待されていない。その他、様々な観点から認知症治療薬が模索されているが、synapse 形成作用が確認されている例はほとんどない。脊髄損傷においても対処の中心は外科的手術による圧迫の除去や大量のステロイド投与であり、機能障害を回復させるものではない。今回紹介した withanolide A, withanoside IV, withanoside VI の効果はいずれも断薬後も継続することから、一時的な作用ではなく、神経の構造的な萎縮、脱落が改

善されることによるものであると考えられ、こういった作用を有する薬物は、治療薬あるいは治療薬シイズとして非常に画期的である。また少なくとも withanoside IV は、axon 伸展, synapse 形成, 末梢性ミエリン増加, microglia 減少といった複数の現象を促進させ機能回復を導くものである。今後その活性本体である sominone の作用点, 作用機序を探ることにより、神経細胞を多様な細胞が取り巻く神経系の環境を巧妙に制御する、分子メカニズムの同定につながるものと考え、研究を進行中である。

謝辞 本研究は、(旧) 富山医科薬科大学・和漢薬研究所・薬効解析センター、及び(現) 富山大学・和漢医薬学総合研究所・民族薬物研究センター・薬効解析部において行われたものでありますが、小松かつ子先生(前・薬効解析センター助教授、現・生薬資源科学教授)の御指導と御協力がなければスタートしなかったものであり、この場をお借りして心より感謝申し上げます。今回紹介した内容は、久保山友晴博士(現・理研脳科学総合研究センター)と中山なつき修士(現・兵庫医科大学)の精力的な取り組みがなければ見い出せなかった成果であり、ここに心より感謝申し上げます。また成分の単離をして下さった、趙 静博士、Meselhy Ragab Meselhy 博士、鄒 坤博士、劉 洪宇修士の諸氏に深謝いたします。この研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金により実施されたことを付記いたします。

REFERENCES

- 1) Jain S., Shukla S.D., Sharma K., Bhatnagar M., *Phytother. Res.*, **15**, 544–548 (2001).
- 2) Dhuley J. N., *Phytother. Res.*, **15**, 524–528 (2001).
- 3) Ghosal S., Lal J., Srivastava R., Bhattacharya S. K., Upadhyay S. N., Jaiswal A. K., Chattopadhyay U., *Phytother. Res.*, **3**, 201–206 (1989).
- 4) Bhattacharya S. K., Kumar A., Ghosal S., *Phytother. Res.*, **9**, 110–113 (1995).
- 5) Tohda C., Kuboyama T., Komatsu K., *NeuroReport*, **11**, 1981–1985 (2000).
- 6) Zhao J., Nakamura N., Hattori M., Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K., *Chem. Pharm.*

- Bull.*, **50**, 760–765 (2002).
- 7) Kuboyama T., Tohda C., Zhao J., Nakamura N., Hattori M., Komatsu K., *NeuroReport*, **13**, 1715–1720 (2002).
 - 8) DeKosky S., Scheff S. W., *Ann. Neurol.*, **27**, 457–464 (1990).
 - 9) Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., De Teresa R., Hill R., Hansen L. A., Katzman R., *Ann. Neurol.*, **30**, 572–580 (1991).
 - 10) Dickson T. C., Vickers J. C., *Neuroscience*, **105**, 99–107 (2001).
 - 11) Pike C. J., Burdick D., Walencewicz A. J., Glabe C. G., Cotman C. W., *J. Neurosci.*, **13**, 1676–1687 (1993).
 - 12) Lorenzo A., Yankner B. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12243–12247 (1994).
 - 13) Postuma R. B., He W., Numan J., Beyreuther K., Masters C. L., Barrow C. J., Small D. H., *J. Neurochem.*, **74**, 1122–1130 (2000).
 - 14) Nakamura S., Murayama N., Noshita T., Annoura H., Ohno T., *Brain Res.*, **912**, 128–136 (2001).
 - 15) Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K., *Br. J. Pharmacol.*, **144**, 961–971 (2005).
 - 16) Tohda C., Komatsu K., Kuboyama T., *J. Trad. Med.*, **22**(Suppl. 1), 176–182 (2005).
 - 17) Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K., *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 1417–1426 (2006).
 - 18) Tohda C., Nakayama N., *Neurosci. Res.*, **58**, 176–182 (2007).