

連翹より得られた Forsythiaside の血管平滑筋弛緩作用

飯塚 徹,* 永井正博

Vasorelaxant Effects of Forsythiaside from the Fruits of *Forsythia suspensa*

Toru IIZUKA* and Masahiro NAGAI

The Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received September 16, 2004; Accepted November 16, 2004)

The vasorelaxant effects of forsythiaside (compound 1) from the fruits of *Forsythia suspensa* on isolated rat aortic rings were studied. Compound 1 showed a slow relaxation activity against norepinephrine (NE)-induced contractions of rat aorta with/without endothelium. This compound did not affect contractions induced by a high concentration of potassium (K^+ 60 mM), while it inhibited NE-induced vasoconstriction in the presence of nicardipine. These results show that the inhibition by compound 1 of NE-induced vasoconstriction is due to a decrease in calcium influx from the extracellular space caused by NE.

Key words—forsythiaside; *Forsythia suspensa*; vasorelaxant effects; receptor-operated Ca^{2+} -channels

緒 言

連翹（モクセイ科 Oleaceae 連翹 *Forsythia suspensa* Vahl の果実）は、お血を除き腫れを消すとされ、漢方で消炎、解熱、利尿、解毒、排膿などを目標に用いられる生薬である。主な成分として phillyrin, pinoselinol, forsythenin などのリグナン類,^{1–3)} forsythiaside, suspensaside, suspensaside A 及び B 等のフェニルエタノイド配糖体が知られ、^{3–5)} その他に rutin などのフラボノイドやテルペン類などが含まれている。^{1,6,7)} エキスには、抗酸化作用、⁸⁾ 抗炎症作用、⁹⁾ が知られ、抗炎症作用の活性成分の 1 つとして 3β -acetoxy-20,25-epoxydammaran-24-ol が報告されている。¹⁰⁾ また、pinoselinol は血小板凝集抑制を示した。¹¹⁾

また連翹は、駆お血作用を持つ生薬として血管平滑筋弛緩作用を示す可能性が考えられた。Forsythiaside や suspensaside 及びリグナン類には、cyclic AMP phosphodiesterase 阻害作用が報告されている。^{12,13)} エキスには血圧降下作用があり、活性成分は suspensaside, phillyrin, phillygen とされたが、¹²⁾ 詳細は明らかではない。そこで連翹の血管弛

緩作用に注目して、活性成分を明らかにすべく以下の実験を行うこととした。

試料と方法

1. 材料 連翹は株式会社ウチダ和漢薬（東京）より購入したものを使用した。
2. 試薬 各種溶媒及び試薬は次のものを使用した。MeOH, KH_2PO_4 , NaCl, KCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, $NaHCO_3$, glucose (和光純薬), *l*-norepinephrine, acetylcholine, EGTA (ethylene glycol-bis (β -aminoethylether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid), nicardipine · HCl (SIGMA)。
3. 使用機器 融点は柳本マイクロ融点測定装置で測定した。NMR スペクトルは日本電子 JMN GX-270 型, JMN GX-500 型で測定し、内標準物質として tetramethylsilane (TMS) を用いた。旋光度は日本電子 DIP-370 型で測定した。カラムクロマトグラフィーの担体は Diaion-HP20 (日本練水) を用いた。分取 HPLC システムは次の機器を用いた。ポンプ LC-6AD (Shimadzu, Japan), UV 検出器 S-310A model-II (相馬光学), カラム YMC ODS-AQ 250×20 mm (YMC Co.Ltd., Japan) 及び Develosil C30 250×20 mm (野村化学), レコーダー C-R8A CHROMATOPACK (Shimadzu)。

4. 連翹からの Comp.1 の単離 連翹 (500 g) を 50% メタノールで抽出し (41×2), 溶媒を減圧留去後, 得られたエキス (67.1 g) を水に溶かして可溶部を取り, Diaion-HP20 を充填したカラムに付し, 水-50%メタノール-メタノールで溶出した. 各分画の血管に対する弛緩作用を検討したところ, 50%メタノール溶出分画 (23.5 g) が強い活性を示した. そこでこの分画を減圧濃縮し, 分取 HPLC (検出: 254 nm; カラム: YMC ODS-AQ; 温度: 25°C; 移動相: 0.05% TFA・MeCN (82:18); 流速: 13.2 ml/min) に付したところ, 活性は保持時間 20—27 分の分画 (463 mg) に移行した. さらにこれを分取 HPLC (カラム: Develosil C30; 温度: 30°C に変更) で精製し, 活性成分 Comp.1 の 159 mg を得た.

5. ラット大動脈の摘出 血管に対する作用は, 前報¹⁴⁾に準じて試験した. すなわち, 実験動物として Wistar 系雄性ラット (体重 280—380 g) を使用した. 張力測定装置は等尺性張力装置を用い, 反応を等尺的に記録した.

ラットをエーテル麻酔後瀉血し, 胸部大動脈を摘出した. 大動脈は長さ約 3 mm のリング標本とした. 標本を 10 ml の modified Kreb's-Henseleit 溶液 (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, glucose 11.1 mM) で満たしたバス内に懸垂し, 37°C で保温し 95%O₂+5%CO₂ 混合ガスを通気した. 標本に 1.0 g の負荷をかけ, 1 時間のインキュベート (設置してから 20 分, 40 分, 55 分後に各 1 回洗浄) ののち, KCl を添加してバス内 K⁺ 濃度を 40 mM とした. 15 分後に洗浄し, さらに 40 分のインキュベート (20 分毎に 1 回洗浄) ののち, 実験を行った. Norepinephrine (NE) を 10⁻⁶ M 投与したのち, 血管収縮が平衡状態に達したところで acetylcholine (ACh) 10⁻⁵ M を投与し, NE による収縮に対し, 80%以上の弛緩を示したものを内皮保持標本, 血管標本の内皮をろ紙で軽くこすり, NE 収縮に対し, ACh による弛緩反応が 5%未満のものを内皮除去標本とした.

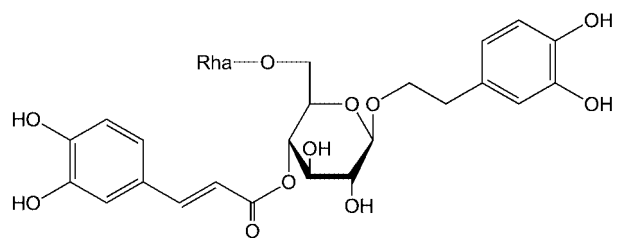
6. 血管反応の測定 血管内皮保持標本に対し, NE を 10⁻⁶ M 投与したのち, 血管収縮が平行状態に達したときに試料を投与して張力変化をみた.

試料存在時の NE 収縮を試験するとき, 血管標

本を設置したバス中にあらかじめ試料を投与し, 1 時間のインキュベーションののち, NE を投与した.

脱分極した血管に対し, Ca²⁺ が誘起する収縮作用は次のように試験した. 血管標本は通常の modified Kreb's-Henseleit 溶液中で 40 分間のインキュベート (20 分, 40 分後に 1 回洗浄) ののち, Ca²⁺-free で 0.01 mM の EGTA を含む modified Kreb's-Henseleit 溶液 (NaCl 119.8 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, glucose 11.1 mM) に置換した. さらに 15 分間のインキュベートののち, 等張の高濃度 K⁺, Ca²⁺-free の modified Kreb's-Henseleit 溶液 (KCl 124.5 mM, KHCO₃ 25.0 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.1 mM) の当量 (3.8 ml) と置換し, バス内 K⁺ 濃度を 60 mM とした. この状態で, Ca²⁺ (CaCl₂) を 10⁻⁵—10⁻³ M を累積的に投与して, コントロールとした. Ca²⁺-free の modified Kreb's-Henseleit 溶液でバス内を洗浄後, 再び高濃度 K⁺, Ca²⁺-free の modified Kreb's-Henseleit 溶液の当量と置換し, バス内 K⁺ 濃度を 60 mM とした. ここで試料を加え 60 分間のインキュベートののち, 先と同様に Ca²⁺ を 10⁻⁵—10⁻³ M を累積的に投与して, コントロールと比較した.

NE 存在下の血管に対し, Ca²⁺ が誘起する収縮作用は次のように試験した. 血管標本は通常の modified Kreb's-Henseleit 溶液中で 40 分間のインキュベート (20 分, 40 分後に 1 回洗浄) ののち, Ca²⁺-free で 0.01 mM の EGTA を含む modified Kreb's-Henseleit 溶液に全置換した. 15 分間のインキュベートののち, nicardipine 10⁻⁶ M, 続いて NE 10⁻⁶ M を投与した. この溶液中で NE がもたらす phasic 相の収縮は静止レベルにまで低下させられている. さらに 15 分間のインキュベートののち,



Rha: α -L-rhamnopyranosyl

Fig. 1. Structure of Comp.1 (Forsythiaside)

Ca²⁺ (CaCl₂) を 10⁻⁵—10⁻³ M を累積的に投与して、コントロールとした。Ca²⁺-free の modified Krebs-Henseleit 溶液でバス内を洗浄後、試料を加え 60 分間のインキュベートののち、先と同様に nicardipine 10⁻⁶ M、続いて NE 10⁻⁶ M を投与した。15 分間のインキュベートののち、Ca²⁺ を 10⁻⁵—10⁻³ M を累積的に投与して、コントロールと比較した。

なお、すべての試薬・試料の濃度は、オルガンバス投与時の最終濃度である。

7. 統計処理 すべての結果は平均値±標準誤差 (S.E.) で示した。データの統計的評価は、Bonferroni-type multiple *t*-test によった。p<0.05 のとき、有意差ありと判断した。

結 果

1. Comp.1 (Forsythiaside) の同定 Comp.1 の同定は NMR (¹H 及び ¹³C) によって行った。

Comp.1, off-white amorphous from MeOH, mp 142—150°C (*lit.* 144—150°C (uncorr.)³⁾), [α]_D20.1 (c, 0.1 in EtOH, *lit.* [α]_D-18.2³⁾). ここで NMR (¹H 及び ¹³C) の値は、forsythiaside の文献値³⁾と一致した。

以上により Comp.1 を forsythiaside と同定した。

2. Comp.1 後投与による NE 収縮に対する作用 内皮保持標本に対して NE を 10⁻⁶ M 投与したのち、血管収縮が平行状態に達した時に Comp.1 の 3×10⁻⁵ M を投与して張力変化をみたところ、ゆっくりとした弛緩作用を示した (Fig. 2)。これは内皮除去標本に対しても、同様であった。さらに NE で収縮させた内皮保持標本に Comp.1 の 3×10⁻⁶—3×10⁻⁵ M を投与したところ、Comp.1 の弛緩作用は濃度依存的に増大した (Fig. 3)。

3. Comp.1 前投与による NE 収縮に対する作用 NE が誘起する収縮に対する Comp.1 の反応を調べた。Comp.1 を 3×10⁻⁵ M 投与して 60 分後、NE を 10⁻⁶ M 投与して血管を収縮させた。NE 刺激による血管平滑筋の収縮は、初期の速やかかつ一過性の収縮である phasic 相と、これに続く持続的収縮の tonic 相からなる。Comp.1 は phasic 相の収縮を抑制せず、tonic 相の収縮を著明に抑制した (Fig. 4)。

4. 電位依存性 Ca²⁺ チャンネル (VDC) に対する作用 Ca²⁺ は、Ca²⁺-free で等張の高濃度 K⁺

(60 mM) 栄養液 (NaCl 119.8 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, glucose 11.1 mM) 中に懸垂した血管標本に対し、濃度依存的な収縮を起こした。この収縮に対し、Comp.1 の 3×10⁻⁴ M は影響を示さなかった (Fig. 5)。

5. 受容体作動性 Ca²⁺ チャンネル (ROC) に対する作用 Ca²⁺-free で nicardipine 10⁻⁶ M 及び NE 10⁻⁶ M を投与した栄養液中に懸垂した血管標本に対し、Ca²⁺ (10⁻⁵—10⁻³ M) は濃度依存的な収縮を起こした。この収縮に対し、Comp.1 の 3×10⁻⁵ M 及び 10⁻⁵ M は抑制を示した (Fig. 6)。

考 察

1. Comp.1 による NE が誘起する血管収縮に対する抑制機構 Comp.1 はラット大動脈リング標本に対し、ゆっくりとした用量依存的な弛緩作用を示した。この弛緩反応は、内皮を除去した標本に対しても同様であった (Fig. 4)。これはこの作用が内皮に依存しないことを示している。また、Fig. 5 に示す通り、Comp.1 を前投与して NE が誘起する収縮をみると、これらの化合物は phasic 相の収縮にほとんど影響せず、tonic 相の収縮を著明に抑制しており、tonic 相に特異性を持つという特徴を示した。さらに Comp.1 は nicardipine 及び EGTA 存在下で NE 前投与した際の、Ca²⁺ が誘起する収縮を抑制した。これは Comp.1 が NE 刺激によって作動する ROC に対する阻害作用を持つことを示している。したがって Comp.1 の作用は、NE 受容体刺激以降から ROC 開口による細胞外 Ca²⁺ の流入に至る、収縮に関するシグナル伝達の過程に関与していると考えられた。ここで Comp.1 の作用点が ROC 開口の直接的な抑制であるならば、NE 以外の受容体刺激によって作動する ROC に対しても阻害作用を示す可能性が考えられる。一方で Comp.1 は、高濃度 K⁺ (60 mM) で脱分極した血管標本に対する Ca²⁺ 誘起の収縮を抑制しなかった。これは Comp.1 が電位依存性 Ca²⁺ チャンネルに対する阻害作用を持たないことを示している。以上のことから、Comp.1 による NE 収縮の抑制は、その効果の一部に ROC の阻害が関与すると考えられた。したがって Comp.1 は、既に報告されている phosphodiesterase 阻害作用^{12,13)}とともに、ROC の阻害により

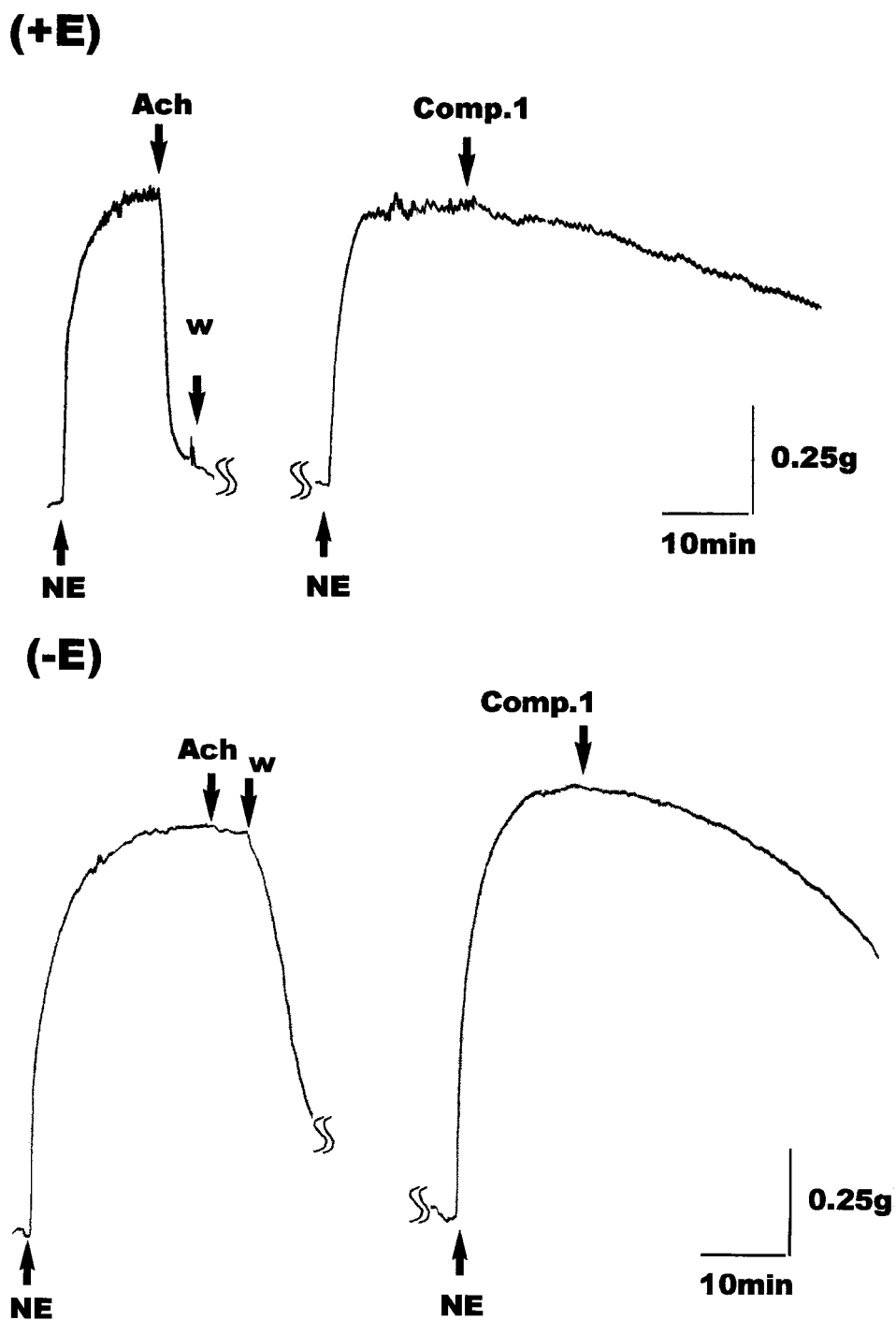


Fig. 2. Effects of Comp.1 on Norepinephrine (NE)-Precontracted Rat Aortic Rings with (+E) or without (-E) Endothelium
 NE: 10^{-6} M, Acetylcholine (ACh): 10^{-5} M, Comp.1: 10^{-4} M.

連翹の駆お血作用に寄与しているものと考えられた。

われわれは既に、升麻由来のフェノールカルボン酸及び合成 *N*-カフェオイルアミノ酸類の血管に対する作用を検討し、フェノールカルボン酸が血管弛緩作用を示す際には、その構造中にカフェー酸構造を持つことが重要であることを報告している。^{15,16)}

今回の実験でも、Comp.1はカフェー酸構造を有し、われわれのこれまでの検討と類似の結果となっている。これは、カフェー酸誘導体の血管弛緩反応の構造活性相関を考える上で興味深い知見と思われる。

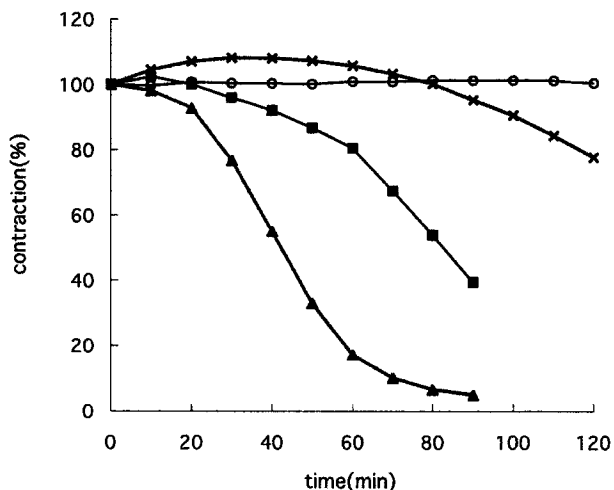


Fig. 3. Relaxation Responses Induced by Comp.1 in Aortic Rings Precontracted with 10^{-6} M Norepinephrine (NE)
 ○: control, ×: Comp.1 3×10^{-6} M, ■: Comp.1 10^{-5} M, ▲: Comp.1 3×10^{-5} M.

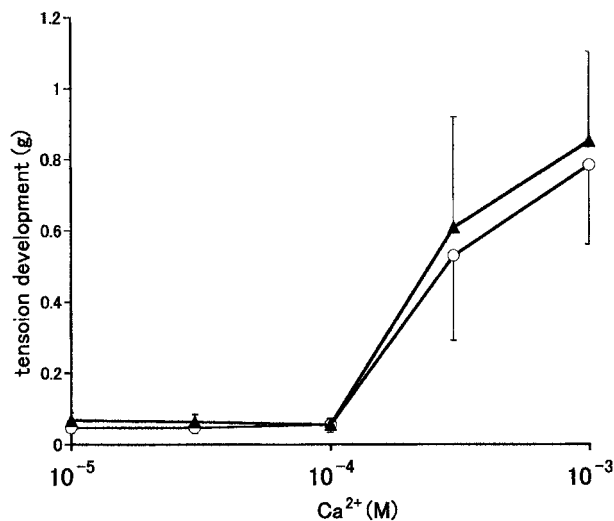


Fig. 5. Concentration-Response Relationships for Contractile Responses of the Aortic Rings to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with High Potassium (60 mM)
 ○: control, ▲: Comp.1 3×10^{-4} M. Values are the means \pm S.E. of 3 determinations.

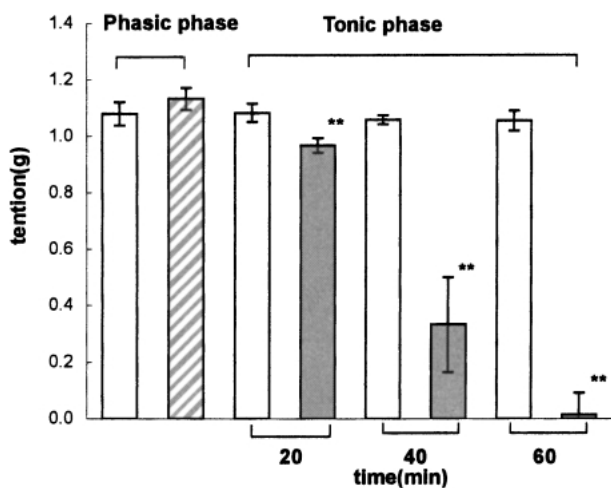


Fig. 4. Time-Dependent Effect of 3×10^{-5} M Comp.1 on the NE-Induced Phasic and Tonic Contraction of Rat Aortic Rings

(□): control, (▨) and (■): in the presence of Comp.1 3×10^{-5} M. Each point represents the means \pm S.E. of 3 determinations. ** $p < 0.01$.

結 論

今回の実験により、連翹中の血管弛緩作用成分として、forsythiasideを得た。ForsythiasideによるNE収縮の抑制は、その効果の一部にROCの阻害が関与すると考えられた。

REFERENCES

1) Nishibe S., Chiba M., Hisada S., *Yakugaku*

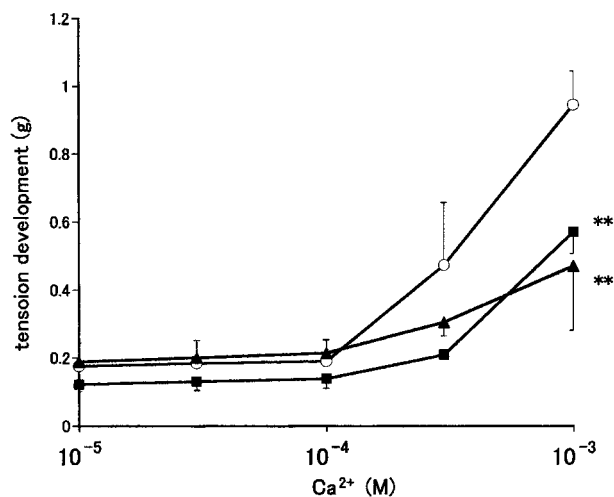


Fig. 6. Concentration Response Relationships for Contractile Responses of Aortic Rings to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with NE (10^{-6} M) and Nicardipine (10^{-6} M)
 ○: control, ■: Comp.1 10^{-5} M, ▲: Comp.1 3×10^{-5} M. Values are the means \pm S.E. of 3 determinations. ** $p < 0.01$.

Zasshi, **97**, 1134-1137 (1977).

- 2) Ming D. S., Yu D. Q., Yu S. S., Liu J., He C. H., *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **1**, 221-226 (1999).
- 3) Nishibe S., Okabe K., Tsukamoto H., Sakushima A., Hisada S., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1048-1050 (1982).
- 4) Nishibe S., Okabe K., Tsukamoto H., Sakushima A., Hisada S., *Chem. Pharm.*

- Bull.*, **30**, 4548–4553 (1982).
- 5) Ming D. S., Yu D. Q., Yu S. S., *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **1**, 327–335 (1999).
 - 6) Chiba M., Hisada S., Nishibe S., *Shoyakugaku Zasshi*, **32**, 194–197 (1978).
 - 7) Rouf A. S. S., Ozaki Y., Rashid M. A., Rui J., *Phytochemistry*, **56**, 815–818 (2001).
 - 8) Schinella G. R., Tournier H. A., Prieto J. M., Mordujovich D., Rios J. L., *Life Sci.*, **70**, 1023–1033 (2002).
 - 9) Prieto J. M., Recio M. C., Giner R. M., Manez S., Giner-Larza E. M., Rios J. L., *J. Pharm. Pharmacol.*, **9**, 1275–1282 (2003).
 - 10) Ozaki Y., Rui J., Tang Y. T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 365–367 (2000).
 - 11) Iwakami S., Wu J. B., Ebizuka Y., Sankawa U., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1196–1198 (1992).
 - 12) Nishibe S., Kitawawa S., Hisada S., Baba H., Yasui S., Narita T., Yoshioka K., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, s–48 (1987).
 - 13) Nikaido T., Ohmoto T., Kinoshita T., Sankawa U., Nishibe S., Hisada S., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3586–3592 (1981).
 - 14) Sakurai N., Iizuka T., Nakayama S., Funayama H., Noguchi M., Nagai M., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 593–598 (2003).
 - 15) Noguchi M., Nagai M., Koeda M., Nakayama S., Sakurai N., Takahira M., Kusano G., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1163–1168 (1998).
 - 16) Iizuka T., Funayama H., Kusano G., Nagai M., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 963–971 (2003).