

和漢薬・民間伝承薬由来の向神経活性成分に関する
化学的・薬理学的研究

1997年

中村 智徳

目 次

序論	4
本論	8
第1章 ペルー民間薬 CEDRON <i>Lippia triphylla</i> (L'Her) O.Kuntze の鎮痛活性成分に関する研究	9
緒言	9
第1節 鎮痛活性成分 acteoside の単離および構造決定	12
第1項 CEDRON メタノール抽出エキスの活性	12
第2項 酢酸ライジング抑制活性を指標とした鎮痛活性成分の単離	14
第2節 acteoside の薬理活性の検討	16
第1項 acteoside の鎮痛活性	16
第2項 acteoside の向神経活性	20
第3節 acteoside 及び関連化合物の鎮痛活性の比較による活性構造の検討	22
考察	28
小括	30
第2章 漢薬大茴香 <i>Illicium verum</i> Hook. fil. の向神経活性成分に関する研究	31
緒言	31
第1節 向神経活性成分 veranisatin A、B、C の単離及び構造解析	33
第1項 大茴香メタノール抽出エキスの活性	33
第2項 veranisatin A、B 及び C の単離	36
第3項 verasnaitin A、B 及び C の構造決定	38

第2節	1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の単離及び構造解析	46
第1項	1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の単離	46
第2項	1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の構造決定	46
第3項	1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の立体化学	47
第3節	veranisatin A、B、C の薬理活性の検討及び anisatin との比較	49
第1項	anisatin の単離	49
第2項	veranisatin A、B 及び C の痙攣誘発及び致死毒性の検討	50
第3項	veranisatins A、B 及び C の正常体温下降作用	51
第4項	veranisatin A の鎮痛活性	53
第5項	veranisatin A のメタンフェタミン誘発自発運動亢進作用に対する影響	56
第6項	その他の薬理活性についての検討	57
考察		59
小括		61
総括		62
実験の部		65
使用機器及び試薬		66
動物実験における諸条件		67
第1章第1節に関する実験		69
第1章第2節に関する実験		72
第1章第3節に関する実験		77
第2章第1節に関する実験		85
第2章第2節に関する実験		88
第2章第3節に関する実験		90
謝辞		103
文献		
参考文献		105
主論文目録		114
審査委員		116

序論

近年、ケニア、タンザニア等に生息する類人猿の生態研究において、「薬」の摂取と思われる行動を示す一群の存在が明らかにされ注目を浴びている。そのグループでは、彼らの住む密林内に自生する植物の中から特定の植物を選択し、独特な摂取行動によりその植物を飲み込み、それまで示していた症状の緩解を思わせる変化が観察された。研究者らが注目した植物は、現地で駆虫薬的に用いられている民間薬用植物 *Vernonia amygdalina* (キク科) で、この植物を分析したところ、数種の抗蟻虫、抗アメーバ赤痢活性及び抗腫瘍活性物質の含有が確認され、中には新規物質の存在も明らかにされた¹⁾。

この薬用植物の摂取行動は、その類人猿達と植物との偶然の遭遇が重なった結果によるものであろうが、病的症状を認識し、さらにある特定の薬用植物を摂取することによってその症状の回復と関連づけることが出来た彼らの知的能力の高さは、我々人類の持つ高次脳機能への進化過程の一段階を成すものと思われる。人類が様々な疾病や傷害からの開放を欲して「薬」を探し求めた歴史は恐らく人類誕生の頃とほぼ同じ時期から始まったと考えられるが、幾度となく繰り返された試行錯誤の末にようやく「医薬」が得られたのはつい最近の話と言っても過言ではない。人類が作り上げてきた薬の歴史は、そうした幾万年もの長い期間行なわれた試行錯誤の歴史の流れの下流に位置するものとも言えるかもしれないが、近代から現在また未来への創薬の歴史というものは、それ以前の「薬」発見の歴史とは異質の進化過程と考えるべきであろう。このような「前代創薬史」と「現代創薬史」は、それぞれ「偶然」と「必然」という言葉で象徴できるものと思われ、現在行なわれている医薬品開発はこの必然性に立脚した創造過程と言えよう。但し、前者、後者の歴史の中で共通して言えることは、その素材のほとんどが天然薬用資源由来であり、素材学的見地からは後者の「現代創薬史」は前者「前代創薬史」の発展系であるとも考えることが出来る。

一方、現代の創薬の歴史がそれまでの「薬」発見の歴史と異なると思われる根拠としては、まず天然素材由来の薬理活性物質がそのままの形で使用されることはほとん

どなく、化学修飾や、精密な有機化学合成が施された物質として使用されていること。さらに医薬品として使用される物質の多くは、病態生理学的メカニズムに立脚した観点から創製され、疾病の発症原因や進展過程の解明を前提とし、その事実に基づいてデザインされ、帰納的に疾病の治療を特異的に行なうことが出来るということ等があげられ、結果として優れた治療薬が「必然的に」誕生する可能性がもたらされたと思われる。

現在行なわれている天然物化学領域の中で、特に薬理活性物質の探索に関する研究は、医薬品開発においてはファーストステップとして重要視され、新規素材、活性新規物質、既知物質の新規活性等の検索がその重要な役割となる。その結果としてもたらされる、膨大な数に上る活性天然物質の蓄積は、医薬品開発を進めるうえでのリード化合物の幅を拡げ、層を厚くするという意味で非常に重要といえる。しかし、医学の進歩に伴い、治療に求められる医薬品の質は、近年次第に高いレベルのものが求められ、必然的にファーストステップである Seed Compounds の探索研究においてもその素材の選択方法並びにその活性物質の分画方法に高度の工夫が求められるとともに、得られた化合物の構造と活性の相関性から、新規薬効の可能性についても検討すべきものもあると考えられる。さらに、世界各地には非常に多数の伝承民間薬が存在し、中にはその薬効について科学的検証を必要とする有用な民間薬もある。これらの伝承薬は、実際にヒトに対する治療目的に施用されており、その薬効や使用方法に関する伝承は非常に重要な情報を与えてくれるものと思われる。ただ、これらの伝承薬をそのまま医薬品として応用するにはあまりにも様々な危険があり、直ちに取り入れるわけには行かない。そこで、これらが医薬品素材として十分な価値があるかどうかを判断するのは我々活性天然物化学研究に携わる薬学研究者の使命と思われる。

本論文で取り上げている素材はいずれも古来民間伝承の形で現在もなお使用され続けている生薬で、長い年月の間淘汰されずに残ってきた「薬」である。しかし、これらの生薬はヒトに対して効能を発揮するらしいことは分かっていたものの、それを科

学的、客観的に判断した事実はなく、現代の医薬品開発の事情からは到底受け入れられ難い「薬」であり、今後、加速度的に進化する医薬品開発段階の中で淘汰され、消滅してしまう可能性はあると思われる。だが、ヒトのある特定の病的症状の緩解に効果があるという臨床情報は容易く排除してはならず、新しい医薬品開発の段階を開く可能性が大いに期待できるものと思われる。

このような意味で、効能に関する情報が添付された民間伝承薬を現在の医薬品開発のレベルに合わせ、より客観的かつ効果的な情報を付加して医薬品素材に組み入れ、将来の新しい医薬品開発の在り方を模索し、実現する天然医薬品素材研究が今後発展すべきではないかと思う²⁾。

本 論

第1章 ペルー民間薬 CEDRON (*Lippia triphylla* (L'Her) O. Kuntze) の鎮痛活性成分に関する研究

緒言

ペルーは、その多様な気象あるいは地理的条件から、非常に多種の植生を有しており、中でも地域医療に根差した民間伝承薬の豊富さは特筆に値する。下表 (Table 1-1) は、これらの伝承情報に基づき、鎮痛・鎮静等の向神経活性成分の検索を目的として行なった、ペルー民間薬 (14 種) エキスについてのスクリーニング結果である。

crude drugs	part used	rectal temp. ^a $\Delta T_{\max}^{\circ}\text{C}$ (1hr)	general behavior ^b	Inhibition of AcOH writhing (% vs control)	
				f	g
ASNA CORA	whole plant ^c	$\pm 0^e$			
BALSAMINA <i>Momordica balsamina</i> L.	fruit	+0.4*	▲		
BOTONCILLO <i>Spilanthes urens</i>	whole plant	+0.3		60.0**	56.0*
CABUYA <i>Fourcroya andina</i> Trel.	leaves	-0.4	▼		
CEDRON <i>Lippia triphylla</i> O.Kuntze	stems leaves	+0.2		40.6*	51.7*
CUTI CUTI HUANARPO ³⁾ <i>Jatropha cillolata</i>	aerial part stems	-0.5 ^e +0.6(3hr)	anti-conflict effect (+) isorientin: 385%*** (40mg/kg, s.c.)	-20.4	-1.8
HIERBA SANTA <i>Cestrum auriculatum</i> L.	aerial part ^c	-0.4		59* (1g/kg, p.o.) fraxetin: 62%***	41*** (500mg/kg)
MANCA PPAQUI <i>Eupatorium sternbergianum</i>	stem	+0.1 ^e		22.6	71.8**
MASTUERZO <i>Tropaeolum majus</i>	aerial part ^c	-0.3	▼	31.7	19.0
MUNA MUNA <i>Mimthosta chrysetosa</i>	aerial part	± 0			
ORTIGA <i>Cajophora tenuis</i>	whole plant	-0.3		39.5**	43.1*
PAICO ⁴⁾ <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	aerial part ^c	-0.8**	▼▼	38.0	88.2***
VIRA VIRA ⁵⁾ <i>Culcitium canescens</i> HBK	aerial part ^d	-0.1	▼	44.4	66.2*

Table 1-1 Effect of the Methanol Extracts of Peruvian Crude Drugs on Rectal Temperature, General Behavior and Inhibition of Acetic Acid-Induced writhing in Mice⁶⁾

*p<0.05, **p<0.01

a: N=6, 3g/kg p.o., b: behavioral depression or activation, c: including some fruits, d: including some seeds

e: N=4, 4.5g/kg p.o., f: N=4~14, 2g/kg p.o., g: N=4~8, 3g/kg p.o.

このうち、顕著な活性を示した、HUANARPO (*Jatropha cillata*)³⁾より flavone C-glycoside (orientin, isorientin ; 抗不安活性) 及び flaxetin (鎮痛活性) を、PAICO (*Chenopodium ambrosioides*)⁴⁾より ascaridole (鎮痛・鎮静活性) を、Huirra-Huirra (*Culcitium canescens*)⁵⁾より cacalohastine 類をそれぞれ活性本体として単離したことが奥山等により既に報告されている (Fig.1-1)。

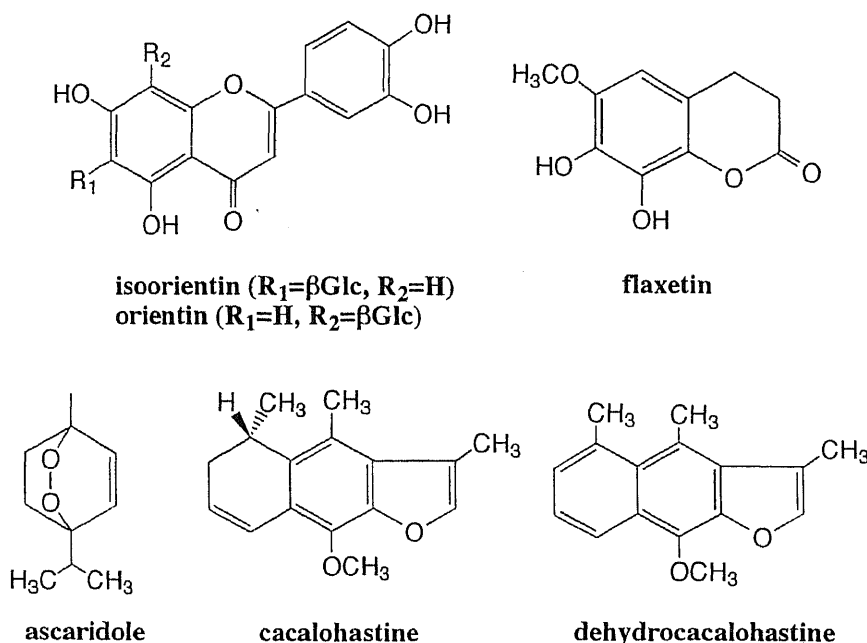


Fig.1- 1 Pharmacologically Active Components Isolated from the Peruvian Medicinal Plants, Huanarpo, Paico and Huirra-Huirra

本研究は、上表に示すペルー民間薬 (14 種) エキスのうち、顕著な活性を示した CEDRON の鎮痛・鎮静活性物質の検索及び得られた活性本体の薬理活性に関する新知見、及び活性構造に関する詳細な検討を目的として行なった。

CEDRON (*Lippia triphylla* (L'Her) O. Kuntze) は、シソ目クマツツラ科 (Verbenaceae) に属する非耐寒性小低木の乾燥した花、葉及び茎で、その香気がレモンに類似していることから、英名 Lemon verberna、和名コウスイボク等とも言わ

モンに類似していることから、英名 Lemon verbena、和名コウスイボク等とも言われている。本植物は、南米（アルゼンチン、チリ、ペルー）の広範囲な地域で自生あるいは栽培され、一般的な香水原料、ハーブティー、鎮静剤として利用されており、さらにフランスでも人気の高いハーブとされ、日本へはヨーロッパを介して伝来した（Fig.1-2）。本植物は、葉部の精油成分に鼻や喉のつまりを和らげるような鎮静効果があるとされ、特にペルーにおいては、小児の腹痛などにも民間薬として用いられている⁷⁾。しかし、本植物の効能に関し、詳細な検討は少なく、特に化合物レベルでの薬効解明に関する研究は見られない⁸⁾。



Fig.1-2 CEDRON (*Lippia triphylla* (L'Her) O. Kuntze)地上部⁹⁾

第1節 鎮痛活性成分 acteoside の単離及び構造解析

第1項 CEDRON メタノール抽出エキスの活性

マウスを用いた動物実験で、一般行動観察、体温変化、鎮痛作用等の検討を行い、CEDRON エキスに、一般行動や体温には変化を来さなかったものの、3 g/kg, p.o. で有意な酢酸ライジング抑制作用 (52%, $p < 0.05$) が観察された (Fig.1-3)。

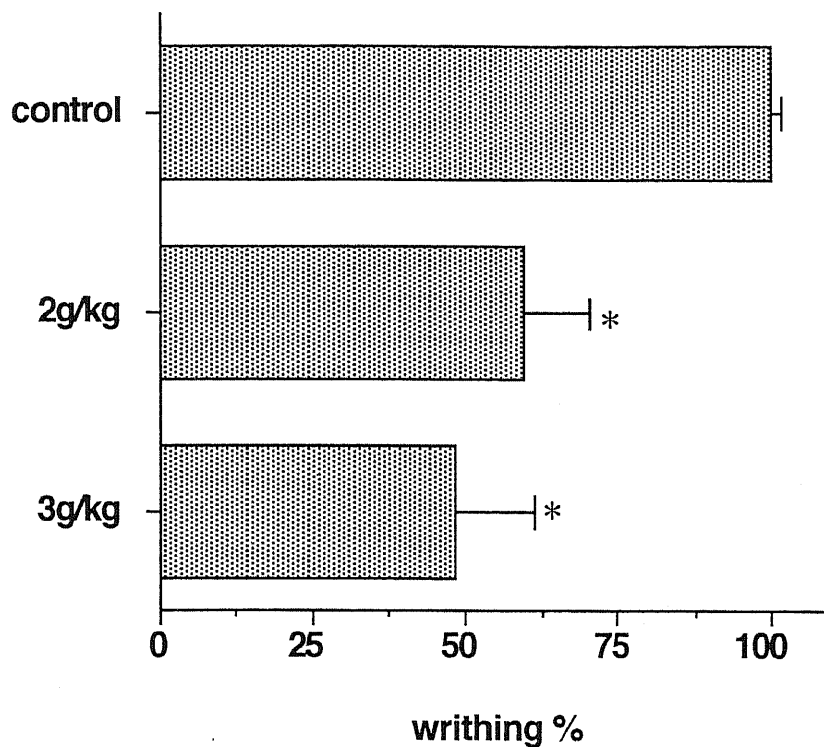


Fig.1-3 Effect of the Methanol Extract of CEDRON on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice¹⁰⁾

ddY male mice, 5 weeks old. n=6. *: $p < 0.05$.

以上の結果に基づき、鎮痛活性成分の単離を目的に、酢酸ライジング抑制活性を指標とした各種カラムクロマトグラフィー分画を行なった (Chart 1-1)。

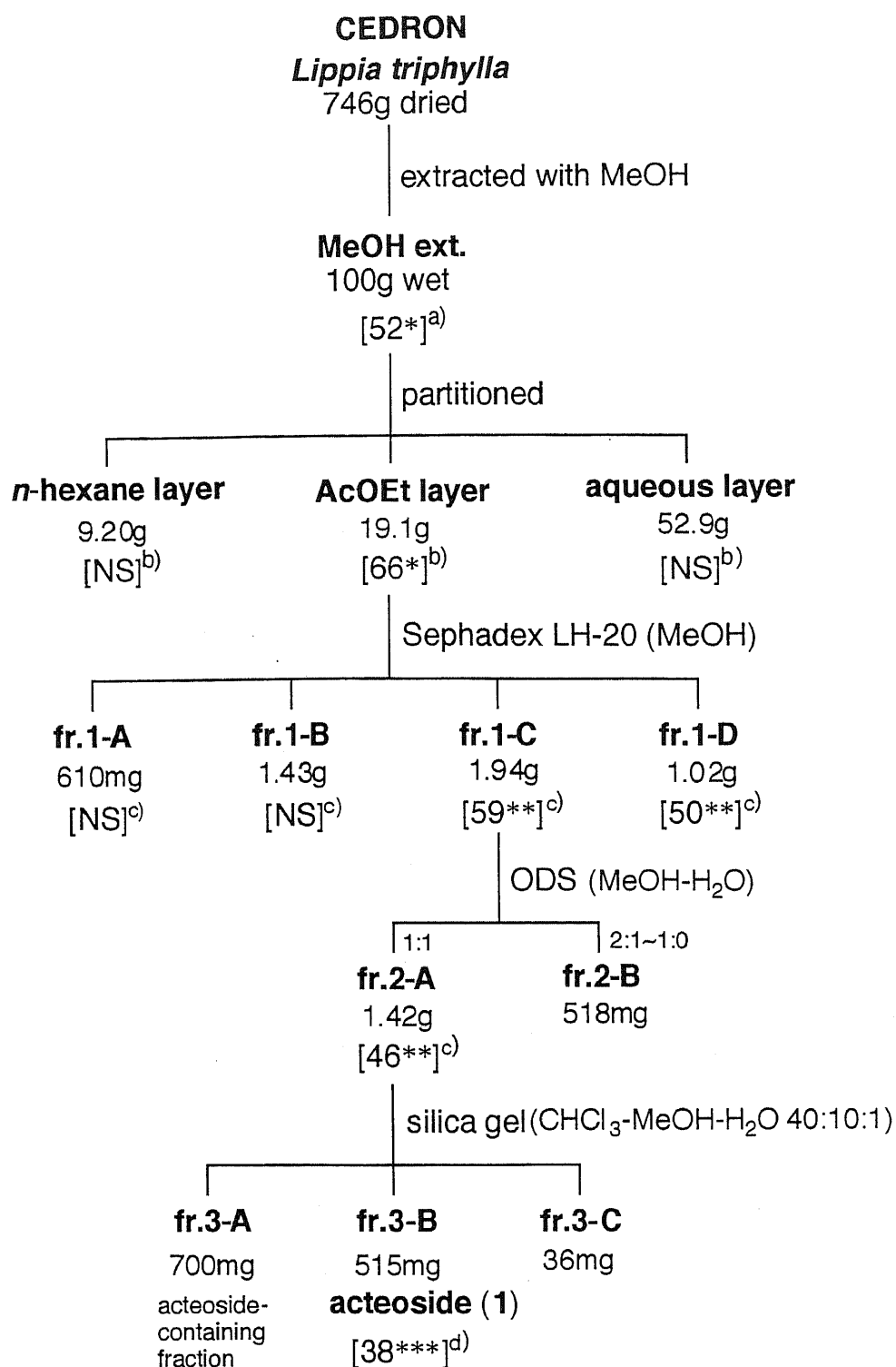


Chart 1-1 Isolation procedure of acteoside from the methanol extract of CEDRON

[]: inhibitory % of writhing. NS: no significance.

a): 3g/kg, p.o., b): 2g/kg, p.o., c): 1g/kg, p.o. d): 300mg/kg, p.o.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

第2項 酢酸ライジング抑制活性を指標とした鎮痛活性成分の単離

メタノールエキス (Ext.1, 100g) を水に懸濁し、*n*-ヘキサン、酢酸エチルで順次液-液分配し、各画分の活性を見たところ、Chart 1-1 に示したとおり、酢酸エチル層のみに 2g/kg, *p.o.* で有意な抑制活性 (66%, $p < 0.05$) が観察され、以後、セファデックス LH-20、ODS、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより活性画分の分画を進めたところ、最終的に単一物質として淡黄色粉体 (1, 515mg) を得た。

1 は、TLC 上塩化第二鉄試薬陽性で、フェノール性物質であることが示唆され、水、メタノール、アセトン等極性溶媒に対する溶解性が高く、ヘキサン、ベンゼン等非極性溶媒には不溶であった。FAB-MS より、分子量は 624 で、赤外吸収スペクトルからは水酸基 (3400cm^{-1})、芳香族二重結合 (1610cm^{-1}) 等の強い吸収が観測された。FG-HMQC、FG-HMBC (Fig. 1-4) 等の二次元 NMR を含む、NMR スペクトルの解析から、1 は、*Cistanche*¹¹⁾¹²⁾、*Forsythia*¹³⁾ 及び *Rehmannia*¹⁴⁾ 属等多くの植物中に分布する既知物質 acteoside (syn. verbascoside) であることが推定され (Fig. 1-5)、acteoside 標品と、融点、TLC、¹H-NMR を直接比較し同定した。

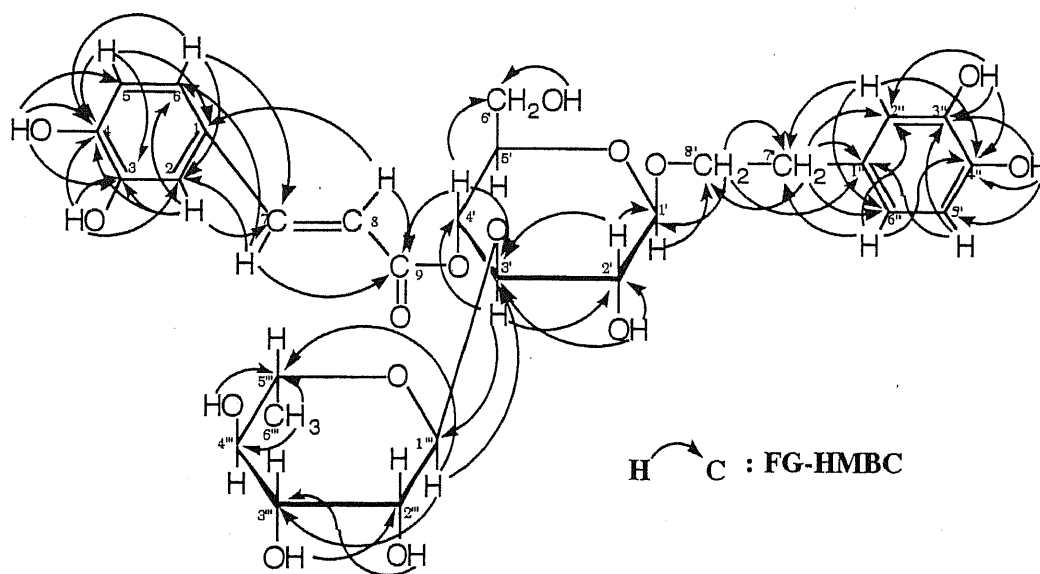


Fig.1-4 FG-HMBC Correlations of Acteoside (1)

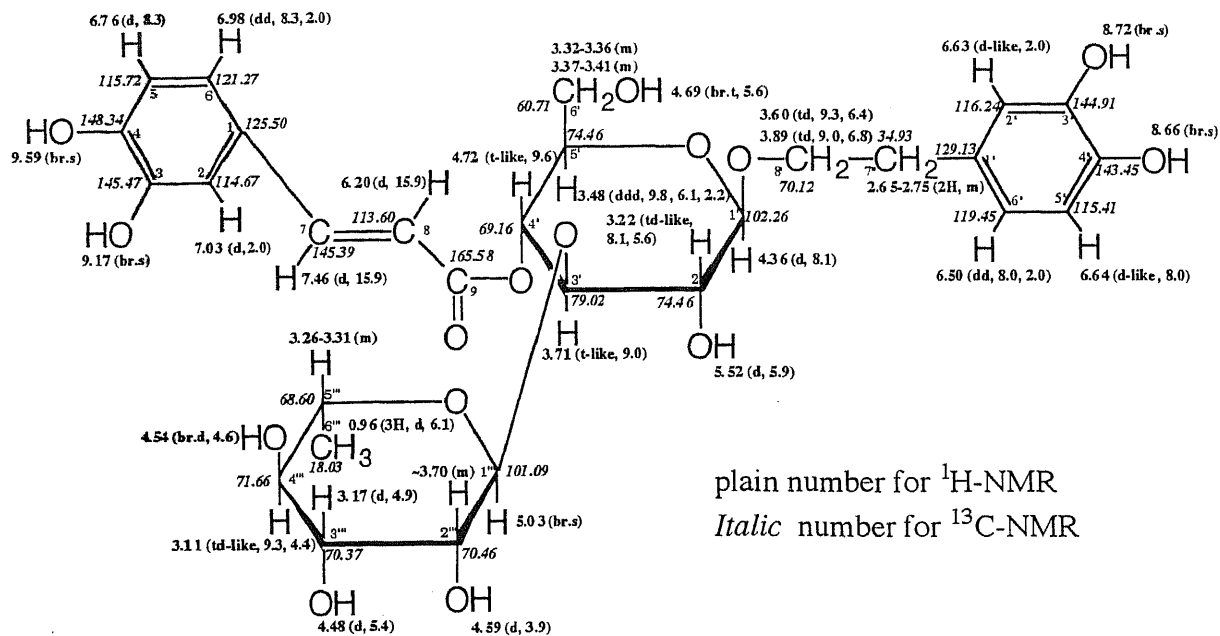


Fig.1-5 NMR Assignment of Acteoside in DMSO- d_6

さらに本物質の大量確保を目的として、1のTLCスポットを指標に以下のような分画を進めた。Ext.1と同様にメタノールエキス(Ext.2)を作成し、Ext.2(50.4g)を水に懸濁して、*n*-ヘキサンで液-液分配した結果、水層に1の存在を確認した。ダイアイオンHP-20、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで水層を順次分画し、1(2.88g)を、エキスから高収率(5.7%)で得た(Chart 1-2)。

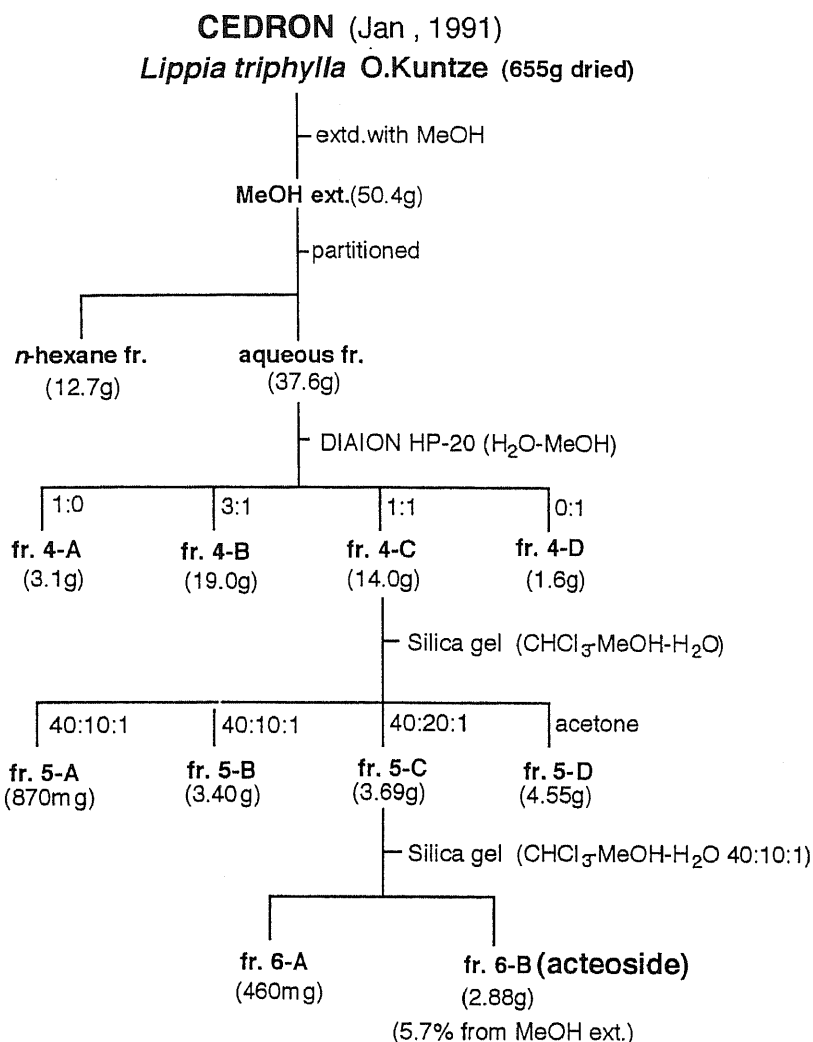


Chart 1-2 Isolation Procedure of Acteoside

第2節 acteosideの薬理活性の検討

第1項 acteosideの鎮痛活性

1は、100、300、500mg/kg, *p.o.*で、用量依存的で有意な酢酸ライジング抑制活性を示し (Fig.1-6)、ライジング抑制率はそれぞれ11、24、39%であった。投与経路を変更し、皮下投与 (300mg/kg, *s.c.*) した場合は (Fig.1-7)、抑制率41%で、経口投与に比べ活性の増強が観察されたため、さらに本物質の水への溶解性が良好であること

も考慮し、静脈内投与 (*i.v.*) についても試みた。2、10、50mg/kg, *i.v.* でそれぞれ 33、42、63%の用量依存的に有意な活性を示し (Fig.1-8)、経口投与時に比べ著しい活性の増大が観察された。

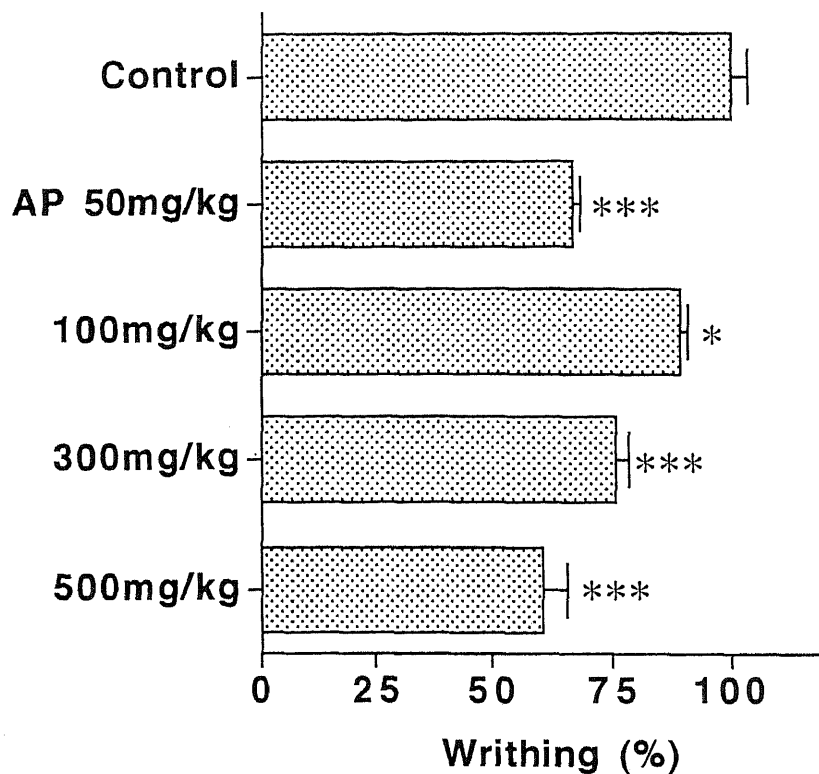


Fig.1-6 Effect of Acteoside on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice by Oral Administration

Each bar represents the mean±S.E. The number of squirms in control (26.6±0.898) was taken as 100%. AP: aminopyrine. *n*=6. *: *p*<0.05, ***: *p*<0.001.

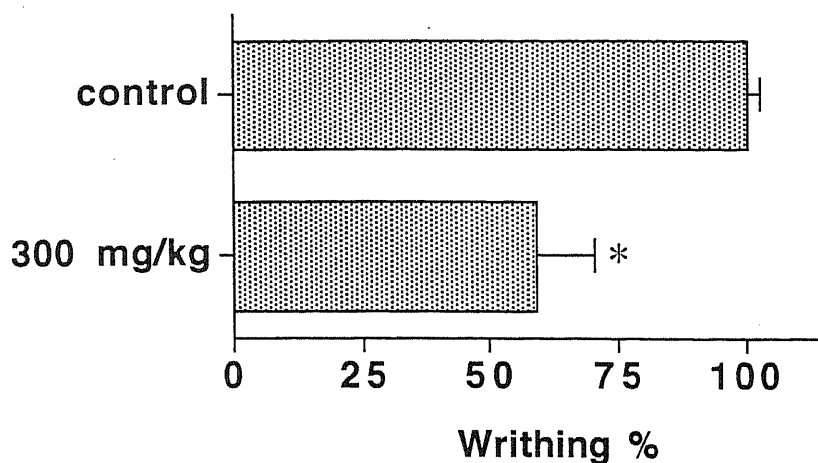


Fig.1-7 Effect of Acteoside on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice by Subcutaneous Injection

Each bar represents the mean±S.E. The number of squirms in control (28.75±0.803) was taken as 100%. *n*=6. *:*p*<0.05

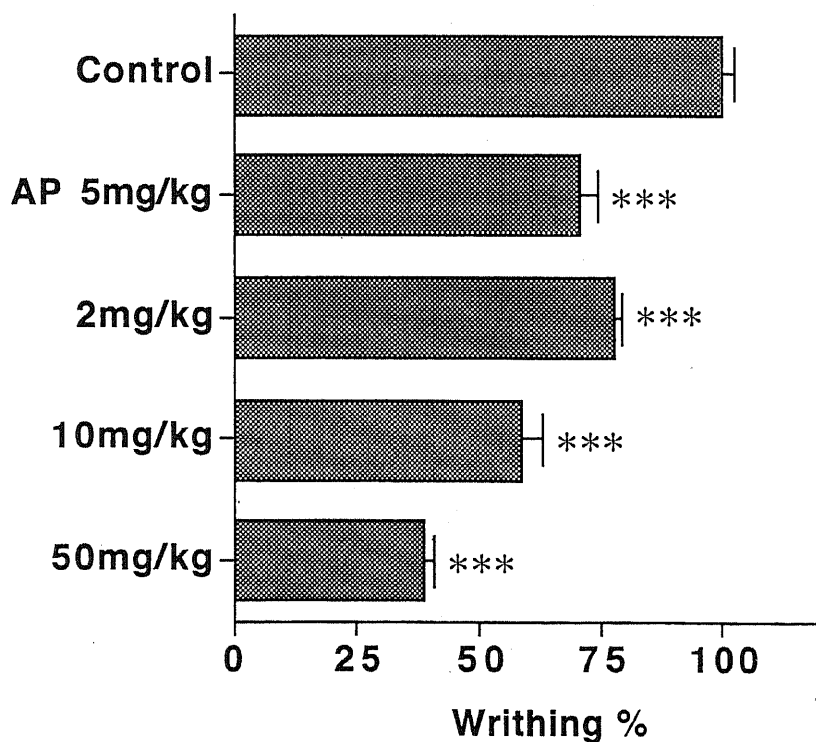


Fig.1-8 Effect of Acteoside on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice by Intravenous Injection

Each bar represents the mean±S.E. The number of squirms in control (27.8±0.655) was taken as 100%. AP: aminopyrine. *n*=6. ****p*<0.001

また、鎮痛作用の生物試験法で、化学的疼痛の抑制を観察する酢酸ライジング法¹⁵⁾の他に、物理的疼痛を試験法に取り入れた、圧刺激疼痛閾値測定法¹⁶⁾を用い鎮痛作用について検討した。

本試験はマウス尾根部に圧力子をあて、等速加重し、痛覚を感じた時点での重量を被験動物の疼痛閾値とする試験法で、検体投与後の疼痛閾値を経時的に測定するものである。その結果、100、300mg/kg, *p.o.*で用量依存的で有意な疼痛閾値の上昇が観察された (Fig.1-9)。

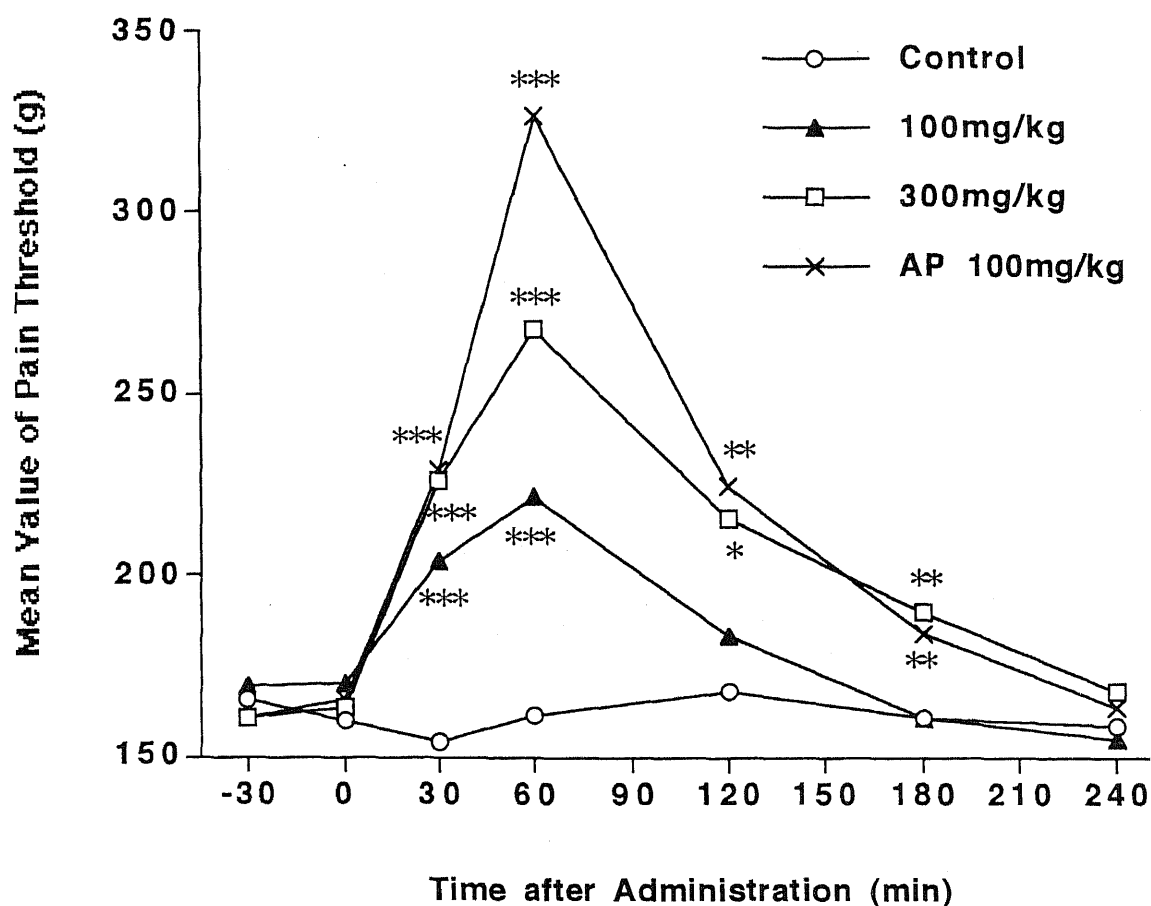


Fig.1-9 Effect of Acteoside on Tail Pressure Pain Threshold in Mice

AP: aminopyrine. *n*=8. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

以上のことから、1は有意な鎮痛活性を有しており、その収量から、本物質が本生薬の鎮痛活性本体であることが示唆された。

第2項 acteosideの向神経活性

さらに、本生薬が鎮静作用を期待して用いられている点及び本物質が主成分である点を考慮し、1の中枢作用を検討する目的で、ペントバルビタール催眠延長作用、メタンフェタミン誘発自発運動亢進抑制作用について検討を行った。

1は、100、300、500mg/kg, *p.o.*で、弱いながら、用量依存的に、ペントバルビタール麻酔持続時間を有意に延長させた (Fig.1-10)。また、300、500mg/kg, *p.o.*でメタンフェタミン (2mg/kg, *s.c.*) による自発運動亢進を有意に抑制した (Fig.1-11)。

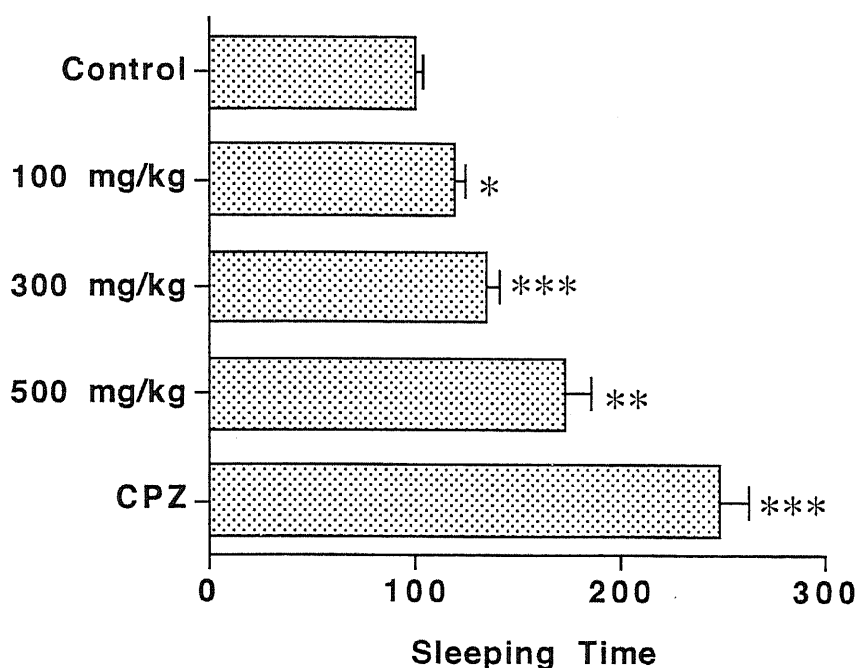


Fig. 1-10 Effect of Acteoside on Pentobarbital-Induced Anesthesia in Mice

Each bar represents the mean±S.E. The sleeping time of control (45.0±1.96 min) was taken as 100%. CPZ: chlorpromazine (5mg/kg, *p.o.*). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n=8$.

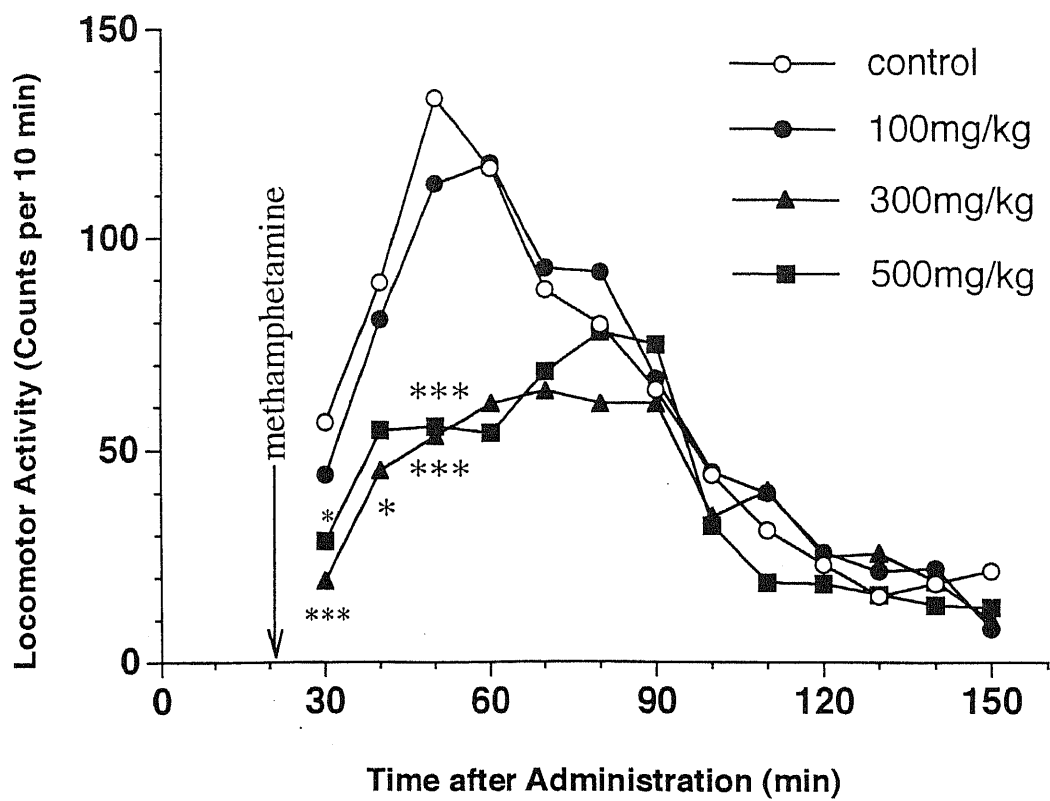


Fig.1-11 Effect of Acteoside on Methamphetamine-Enhanced Locomotor Activity in Mice

Methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) was injected 20 min after administration of samples. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$. $n = 10$.

本知見は、acteoside が中枢神経系に対し何らかの作用を及ぼし、鎮静作用を現していることを示唆するものと考えられる。

第3節 acteoside 及び関連化合物の鎮痛活性の比較による活性構造の検討

1 は構造的に、グルコースを中心に、その1位にフェニルエタノール基、3位にラムノシル基、4位にカフェオイル基が置換している (Fig.1-12)。

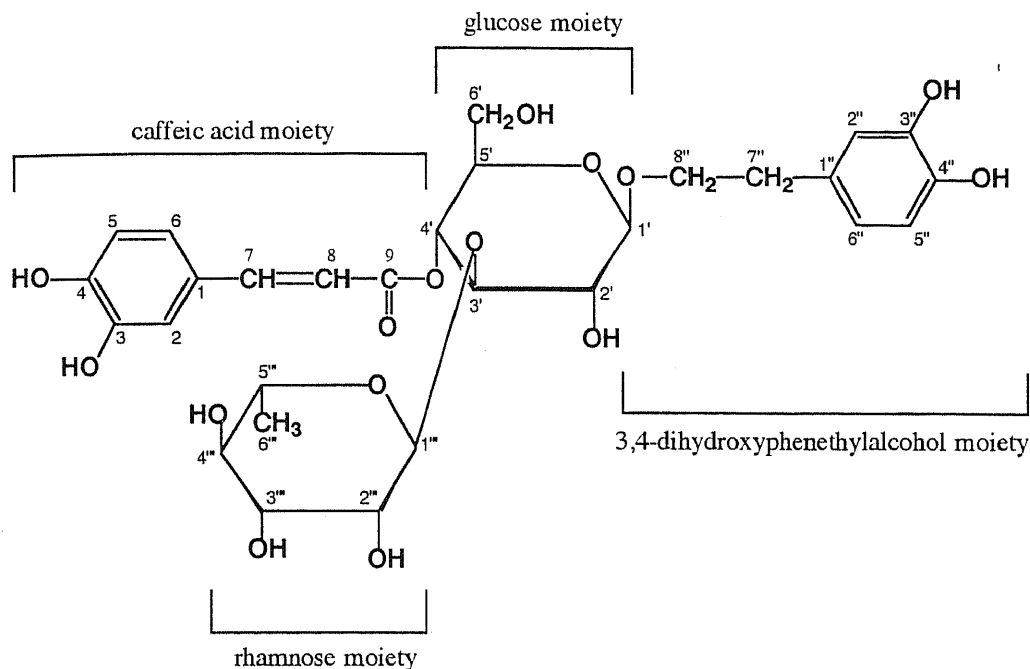


Fig.1-12 Structure of Acteoside

まず1の各部分構造である、3,4-dihydroxyphenethyl alcohol (2) 及び caffeic acid (3) について酢酸ライジング抑制作用を検討したが、これらには活性が観察されず、さらに acteoside (500mg/kg, *p.o.*) と等モルの 2 (143mg/kg, *p.o.*) 及び 3 (124mg/kg, *p.o.*) を混合して投与しても活性は見られなかった (Fig.1-13)。従って、1の活性発現には、加水分解などの作用を受けて、アグリコン部分だけが作用するのではなく、糖部分をも含む配糖体構造が必要であることが示唆された。

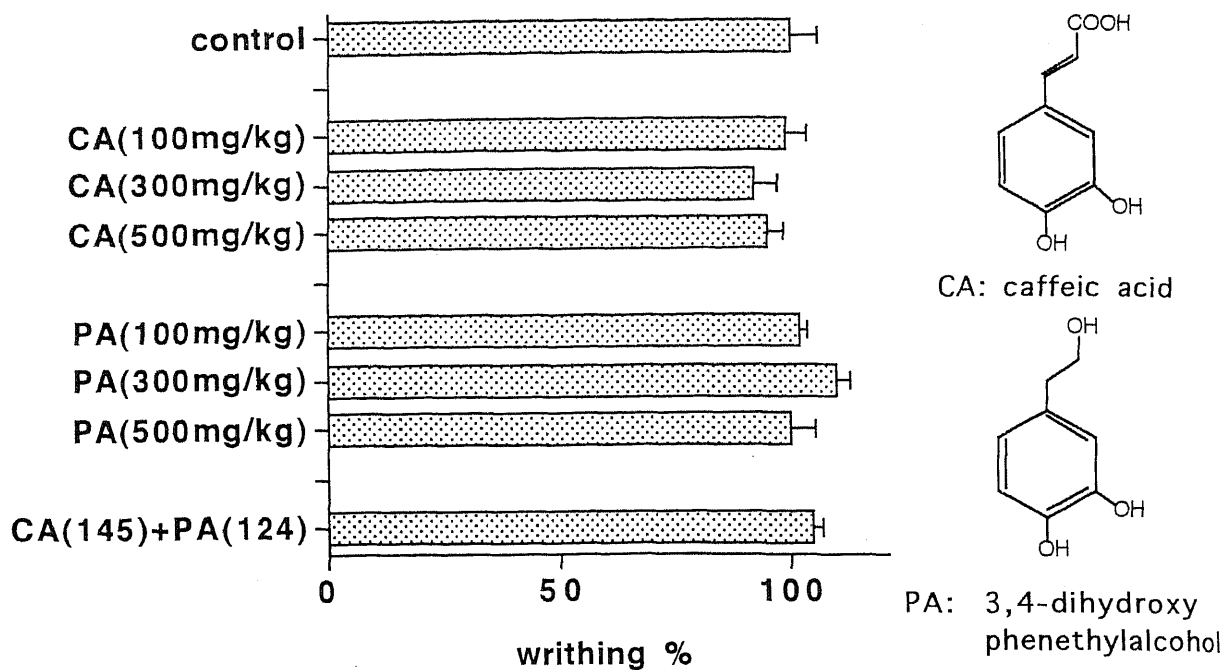


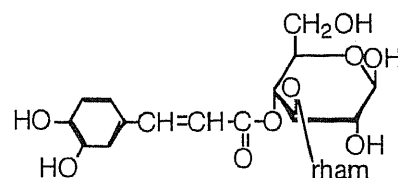
Fig.1-13 Effect of the Aglycone of Acteoside on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice

Each bar represents mean±S.E. The number of squirms in control (30.58±2.63) was taken as 100%. n=6.

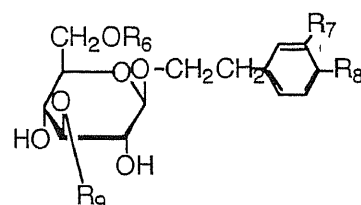
以上のことから、糖を含む本化合物の活性構造を検討する目的で、13種の acteoside 関連化合物 (Table 1-2) の酢酸ライジング抑制活性について比較した。

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
acteoside (1)	OH	H	OH	OH	rham
leucosceptoside A (4)	OMe	H	OH	OH	rham
martynoside (5)	OMe	H	OH	OMe	rham
jionoside D (6)	OH	H	OH	OMe	rham
plantamajoside (7)	OH	H	OH	OH	glc
desrhamnosylacteoside (8)	OH	H	OH	OH	H
forsythiaside (9)	OH	rham	OH	OH	H
jionoside C (10)	OH	H	H	H	rham
echinacoside (11)	OH	glc	OH	H	rham
purpureaside C (12)	OH	gal	OH	OH	rham

gal; galactose, glc; glucose, rham; rhamnose



cistanoside F (13)



decaffeoylacteoside (14)
R₆=H, R₇=R₈=OH, R₉=rham

isoacteoside (15)
R₆=caffeoyl, R₇=R₈=OH, R₉=rham

salidroside (16)
R₆=R₇=R₉=H, R₈=OH

Table 1-2 Structures of the Acteoside-Related Compounds

これらの化合物については、acteoside との構造比較から、以下のようなグループに分類し、その活性について比較した (Table 1-3)。

グループ I は、アグリコン部の水酸基が変化した、構造上、比較的相違点の少ない化合物で、leucosceptoside (4)、martynoside (5)、jionoside D (6) 及び jionoside C (10) を配属した。グループ II は、糖部分に変化がある化合物群で、ラムノシル基がグルコシル基に変化した程度の比較的变化の小さい plantamajoside (7)、ラムノシル基が消失した desrhamnosyl acteoside (8)、ラムノシル基がグルコース 3 位から 6 位に転移した forsythiaside (9)、また糖が更に 1 個増加した echinacoside (11) 及び purpureaside C (12) をグループ II とした。グループ III は、アグリコン部分に変化の見られる化合物群で、片方のアグリコンが欠損した cistanoside F (13)、decaffeoyl acteoside (14) 及び salidroside (16) また、アグリコンの置換位置に変化が見られる

isoacteoside (15) を配属した。

まず、静脈内投与 (2、10、50mg/kg) での活性比較を行ない、30%-ライジング抑制用量 (ID_{30}) を回帰式から算出して比較したところ (Fig.1-14)、1の活性が最も強力で (ID_{30} : 2.1mg/kg)、次にグループ I の様な構造的相違のわずかな化合物 4 (ID_{30} : 9.3mg/kg)、6 (ID_{30} : 13mg/kg) 及び II 群に属している化合物 7 (ID_{30} : 3.9mg/kg) が比較的強力な活性を有していた。また、糖の転移や消失などの比較的大きな構造的相違の見られる化合物 8 (ID_{30} : 16mg/kg) 及び 9 (ID_{30} : 25mg/kg) では活性がやや低下し、グループ II の化合物 11 (ID_{30} : >50mg/kg) 及び 12 (ID_{30} : 42mg/kg) では顕著な活性低下が見られた。更にグループ III の化合物 13 (ID_{30} : >50mg/kg) 及び 14 (ID_{30} : >50mg/kg) では活性がほとんど見られなかった。

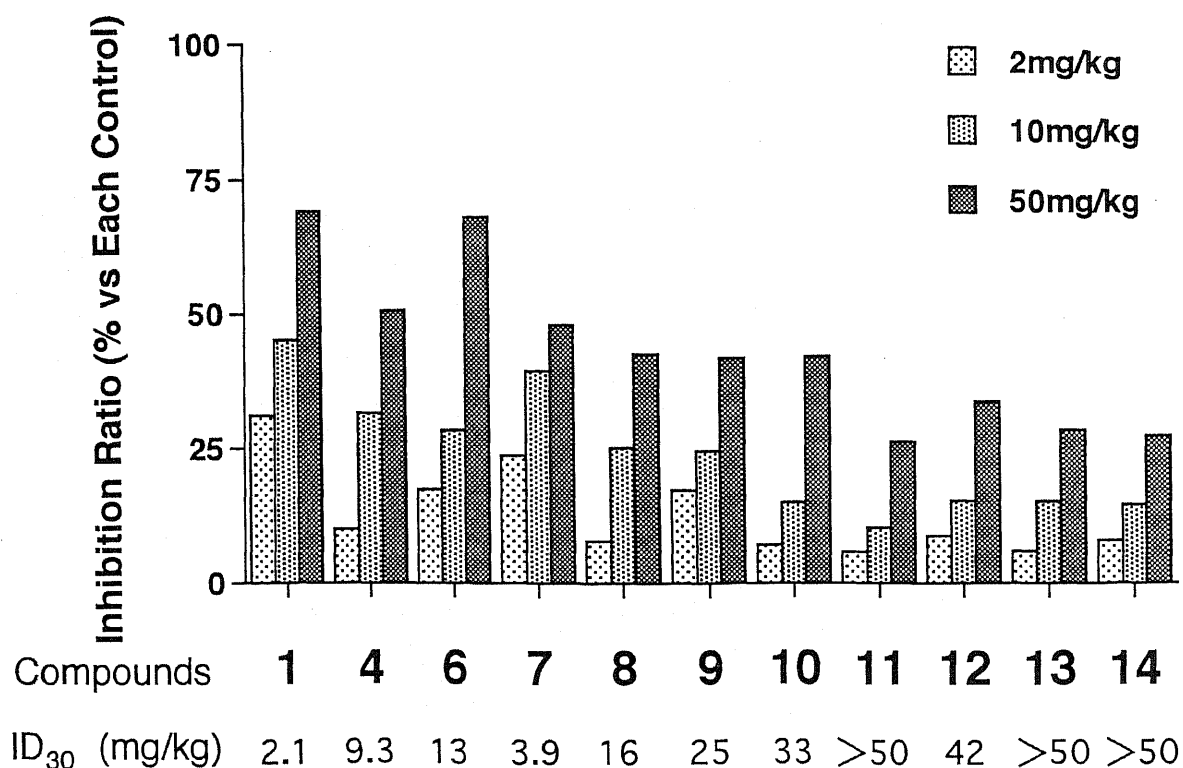


Fig.1-14 Analgesic Effect of the Acteoside Related Compounds on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice by Intravenous Injection

Each bar represents the mean value. $n=6$. ID_{30} : 30%-inhibition dose.

比較的大量に入手できた化合物については、経口投与（100、300、500mg/kg）による活性についても比較したところ（Fig.1-15）、経口投与の場合も静脈内投与時と同様の傾向が観察され、1（ID₃₀:260mg/kg）の活性が最も強く、わずかな構造的相違のあるグループI及びIIの化合物4（ID₃₀:500mg/kg）、5（ID₃₀:500mg/kg）及び8（ID₃₀:380mg/kg）で活性低下が見られ、構造的相違の顕著なグループII及びIIIの化合物12、14、15及び16ではID₃₀値が全て500mg/kgを大幅に上回っており、活性は見られなかった。

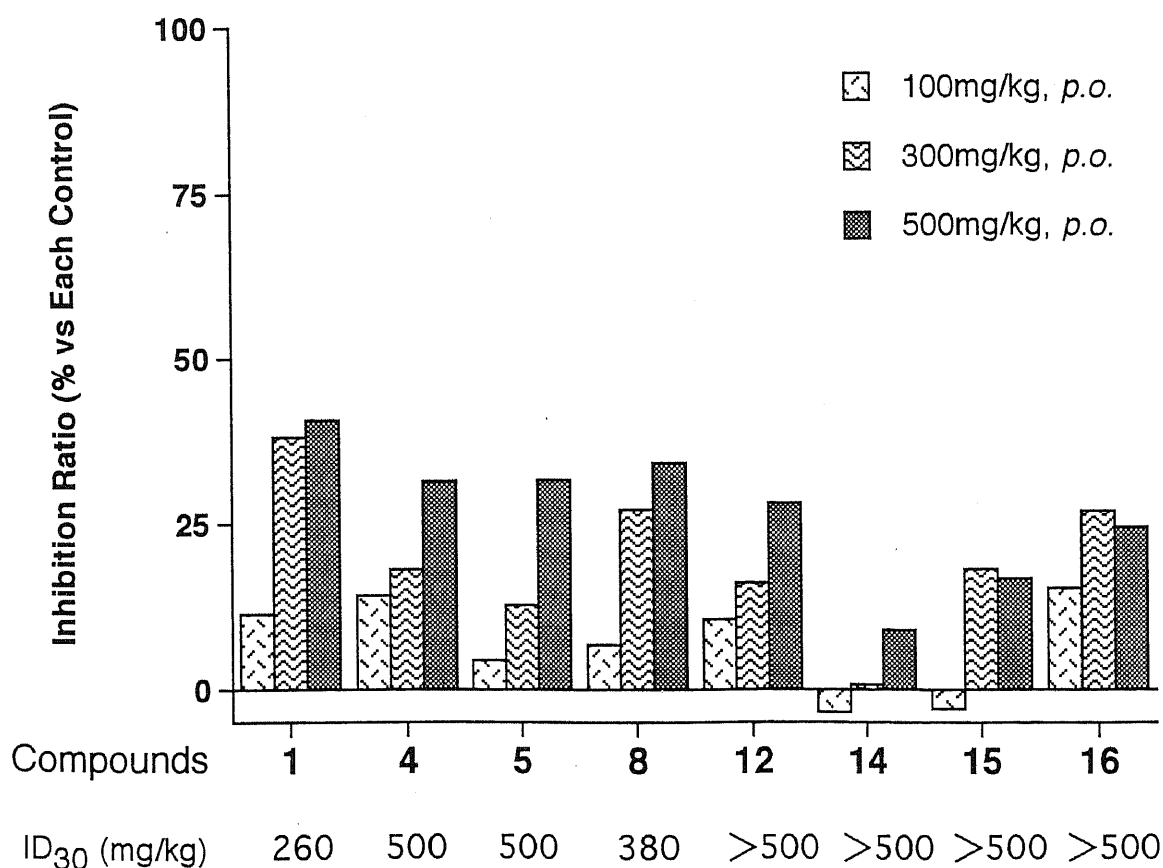


Fig.1-15 Analgesic Effect of the Acteoside Related Compounds on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice by Oral Administration

Each bar represents the mean value. *n*=6. ID₃₀: 30%-inhibition dose.

		変化	化合物	<i>i.v.</i>	<i>p.o.</i>
acteoside				+++	+++
OH 基の 変化	Ia	1個のOH → OCH ₃	(4), (6)	++	(4)++
	Ib	2個のOH → OCH ₃	(5)		++
	Ic	2個のOH 欠損	(10)	±	
糖部の 変化	IIa	rham → glc	(7)	++	
	IIb	rham 欠損	(8)	+	++
		rham の位置異常	(9)	+	
	IIc	余剰なglcの存在	(11), (12)	±	(12) -
aglyconeの 変化	IIIa	aglycone 欠損	(13), (14), (16)	-	(14) - (16) -
	IIIb	aglycone の位置異常	(15)	-	-

Table 1-3 構造変化と活性強度との相関

+++ : acteosideの活性強度, ++ : やや低下, + : 低下, ± : 顕著に低下, - : 活性が見られない

考察

acteoside の薬理活性として、酢酸ライジング抑制作用及び圧刺激疼痛閾値上昇作用が観察されたことから、本物質は鎮痛活性を有しているものと結論付けられる。特に酢酸ライジング法での投与経路による比較から、静脈内投与時には鎮痛薬であるアミノピリンとほぼ同程度の鎮痛活性を有することが示された反面、経口投与時には静脈内投与の場合と比較して顕著な活性低下が見られた。このことは消化管内での吸収性、分解性、更には吸収後の代謝等の複雑なファクターが関与し、活性低下につながっていることが考えられる。

また、ペントバルビタール麻酔持続時間及びメタンフェタミン誘発自発運動亢進に及ぼす影響を検討した結果、前者では用量依存的な麻酔時間延長作用が見られ、後者でも用量依存性は見られなかったものの、明かな自発運動亢進抑制作用が観察されたことから、鎮静作用を示唆する結果を得た。また、本研究では acteoside が一般行動に変化をもたらすような結果は得られなかったものの、他の研究グループによる報告においては、佐藤等は、acteoside の示す薬理活性として、慢性ストレス負荷マウスの性及び学習行動に及ぼす効果を検討した実験¹⁷⁾で、本物質が、ストレスによる性及び学習の両行動の低下を防御していることを示唆する結果を得ている。本研究での結果を考え併せ、本物質が中枢神経系に対し何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられる。

さらに、acteoside の薬理活性に関しては、木村等により、シクロオキシゲナーゼや5-リポキシゲナーゼ等のアラキドン酸代謝酵素阻害活性¹⁸⁾が報告されており、本物質の鎮痛作用に関しても、機械的刺激や化学的刺激に対して痛覚線維の感受性を高め、発痛作用を増強しているとされるプロスタグランジン E₂ や I₂ 及びジヒドロエイコサテトラエン酸などの生合成をそれぞれ阻害するシクロオキシゲナーゼ及び5-リポキシゲナーゼの酵素阻害作用 (Fig.1-16) が活性と関連している可能性が考えられる。本

物質にはまた、神田等によるレンズ-アルドース還元酵素阻害活性¹⁹⁾、武田等によるヒアルロン酸加水分解酵素阻害活性²⁰⁾に関する報告もある。

acteosideの活性構造に関して検討する目的で行った関連化合物13種との比較実験から、acteosideの構造との相違の増加にしたがい、活性の低下が著明となる傾向があり、アグリコンの消失や糖の付加などにより顕著に活性の低下が見られた。したがって活性発現にはacteoside全体の分子サイズ及び分子形が必要であることが示唆された。

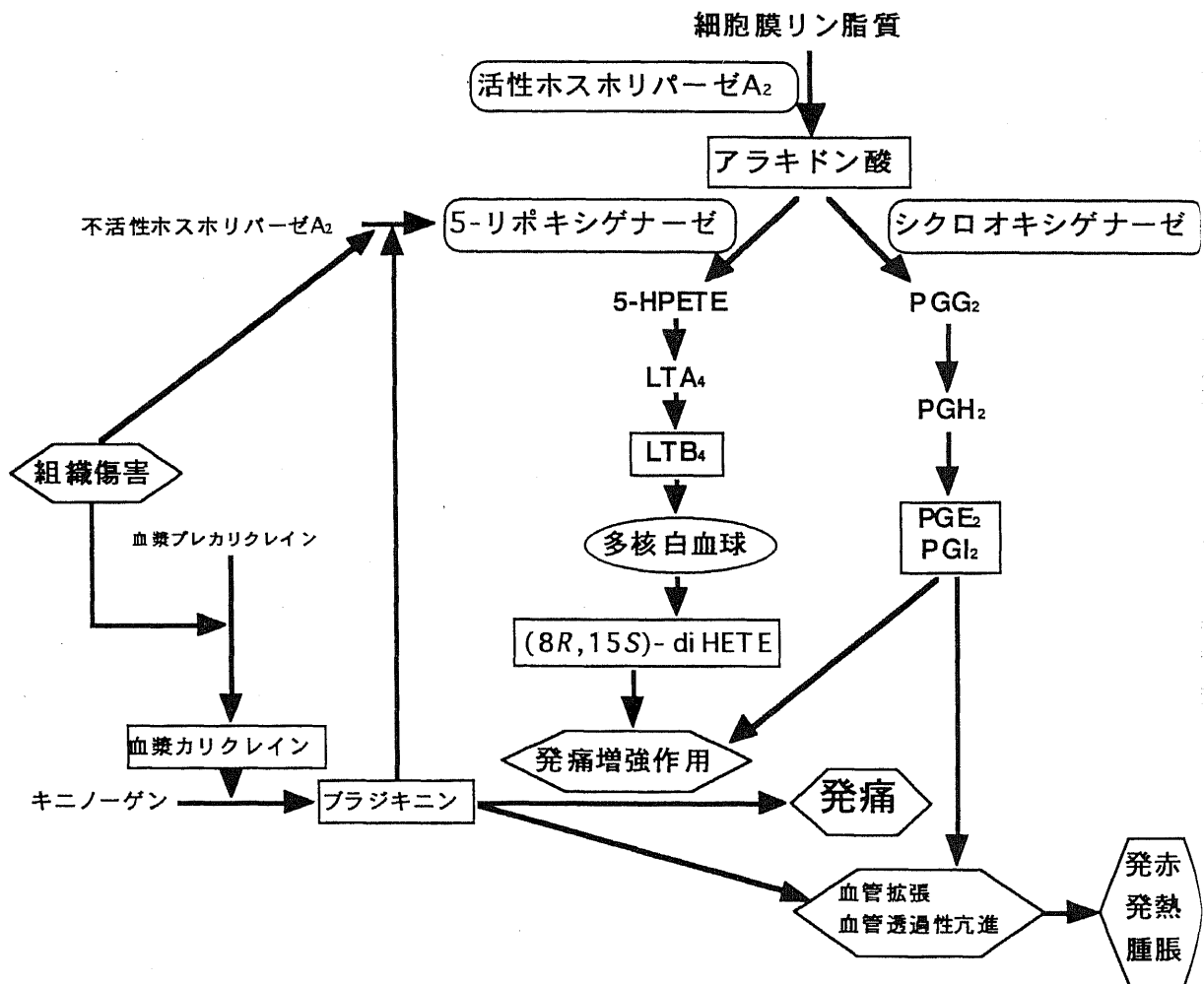


Fig.1-16 プロスタグランジン、ロイコトリエン類産生による炎症および発痛の発現の模式図²¹⁾

小括

- 1) acteoside が鎮痛活性を有することが示され、本生薬の民間伝承的使用法である、「痛み止め」の効能に科学的知見を与えた。
- 2) 鎮静作用を期待した民間伝承的使用法について、本研究における実験結果から、本生薬の主成分である acteoside が、効力は弱いものの、その効能の活性本体の一つであることを示唆する結果を得た。
- 3) acteoside の鎮痛活性について、その活性構造に関する比較検討の結果、本活性に適した分子サイズ及び分子形が存在することが示唆され、acteoside の構造が検討した化合物中最も適した構造であることが明かとなった。

第2章 漢薬大茴香 *Illicium verum* Hook. fil.の向神経活性成分に関する研究

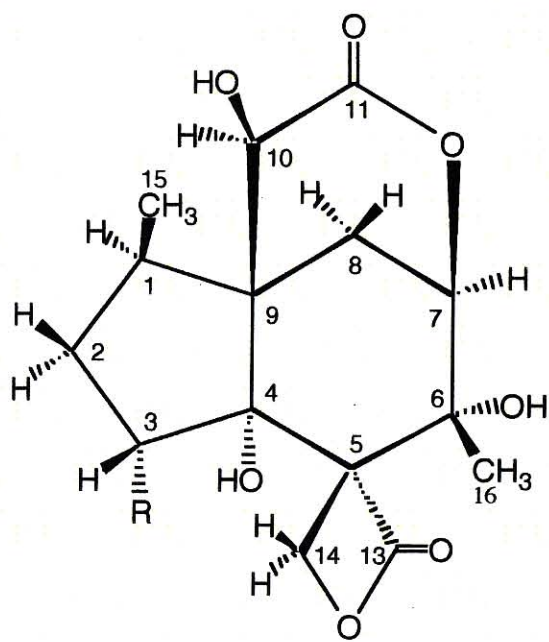
緒言

大茴香 (*Illicium verum* Hook.fil.) は (Fig.2-1)、モクレン目シキミ科 (Illiciaceae) に属する低木常緑樹の乾燥果実で、その形が星型をしていることから、英名 Star Anise、中国名 八角茴香とも言われている。特に中国、東南アジア、日本等の広範囲な地域で、大茴香を一般的な香料として食用に供しており、その香気は主成分であるアネトール由来のものである。また日本薬局方収載のウイキョウ油²²⁾には、ウイキョウ (セリ科) と共に、そのアネトール含量の高さから大茴香も原材料に採用されている。

一方、同属植物として日本各地に分布しているシキミ (*Illicium anisatum* L.) も大茴香に類似し、六角と称される果実を有しており、Japanese Star Anise の英名を持っている (Fig.2-2)。しかし、本植物は有毒植物として古くから知られており、八角との誤認による食中毒事件を起こした経緯がある²³⁾。1952年 Lane らの研究により anisatin がその毒性本体であることが発見され²⁴⁾、1965、6年、名古屋大学理学部の山田等によりその化学構造が関連化合物 neoanisatin と共に決定された²⁵⁾。その後、同植物からは数種の関連化合物が単離、構造決定され、長崎大学薬学部 河野等により、同属植物からの関連化合物の単離が報告されているが。²⁶⁾ しかし、これまでに大茴香からの類似セスキテルペン化合物の単離に関する報告はない。

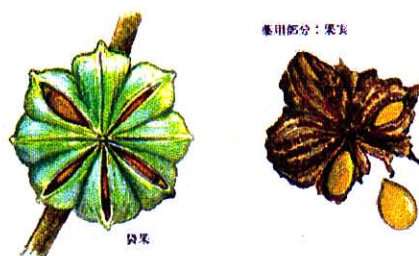


Fig.2-1 大茴香²⁷⁾

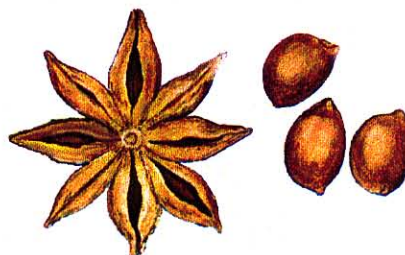


anisatin
neoanisatin

R=OH
R=H



シキミ *Illicium anisatum* L. 果実



大茴香 *Illicium verum* Hook. fil. 果実

Fig.2-2 anisatin, neoanisatin の構造式とシキミ果実、及び大茴香果実²⁸⁾

本研究では、香料として食用に供される大茴香に anisatin 類似の痙攣誘発成分の含有を見出し²⁹⁾、3 種の新規痙攣発現成分の単離及び構造決定を報告すると共に、本成分の薬理活性に関する興味ある新知見について詳細な検討を加えた³⁰⁾。

第 1 節 向神経活性成分 veranisatin A、B、C の単離及び構造解析

第 1 項 大茴香メタノール抽出エキスの活性

本研究室では、和漢薬における向神経活性成分の探索を目的として 28 種の和漢生薬メタノールエキスについて各種スクリーニングを行なった。特に、マウス正常体温に対する作用を検討したところ (Table 2-1)、大茴香メタノールエキス (3g/kg, 経口投与(p.o.)) が正常体温を顕著に下降させた (Fig. 2-3)。さらに本エキスは、より低用量 (500mg/kg, p.o.) において、体温を下降させず、マウス酢酸ライジングを有意に抑制したこと等から (Fig. 2-4)、向神経活性成分の存在が示唆された。

Table 2-1 漢薬スクリーニング結果³¹⁾

生薬名	体温変化 (最大)	生薬名	体温変化 (最大)
赤目柏	+0.38 °C	大茴香	-5.18*** °C
遠志	-1.63 *	タラ根皮	-7.74*
遠志刻	-1.61 *	釣藤鈎	-0.35
吉草根	+0.30	天南星	-0.46
甘草	-0.41	当帰	-0.23
杏仁	-8.23***	ハコベ	-0.22
苦参	-9.95***	浜千舎	-0.70
熊柳	-0.24	半夏	-0.45
藁本	-0.18	茯苓	-0.13
山梔子	+0.76	附子	+0.18
酸棗仁	+0.75**	防己	-1.34**
紫蘇葉	+0.28	茅根	+0.62
芍薬	-0.22	牡丹皮	-0.44
辛夷	-3.47	木通	-0.61**

n=4, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

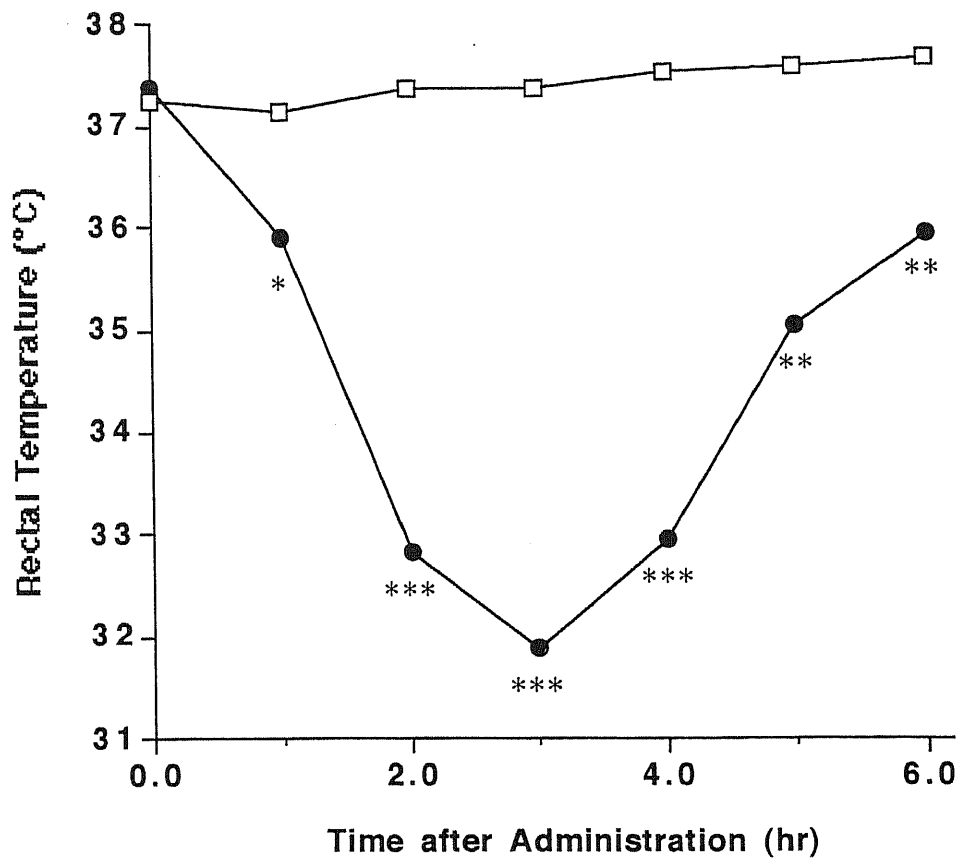


Fig. 2-3 Effect of the Methanol Extract of Star Anise on Body Temperature in Mice

n=5. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

—□— control —●— MeOH Ext. (3 g/kg, p.o.)

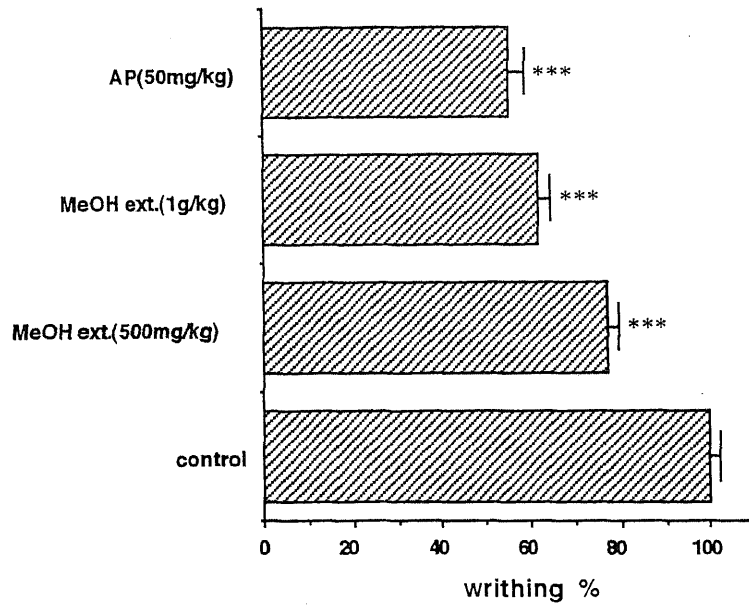


Fig. 2-4 Effect of MeOH Extract of Star Anise on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice

n=6, p.o., ***:p<0.001, AP: aminopyrine

第2項 veranisatin A、B 及び C の単離

スクリーニング結果に基づき、マウス正常体温下降作用を指標としたメタノールエキスのカラムクロマト分画を試みたが、大量に含有されるアネトール、シキミ酸及び数種の1,4置換ベンゼン化合物等 (Fig. 2-5) の共存が障害となり、低含有率の活性本体の単離には至らなかった。

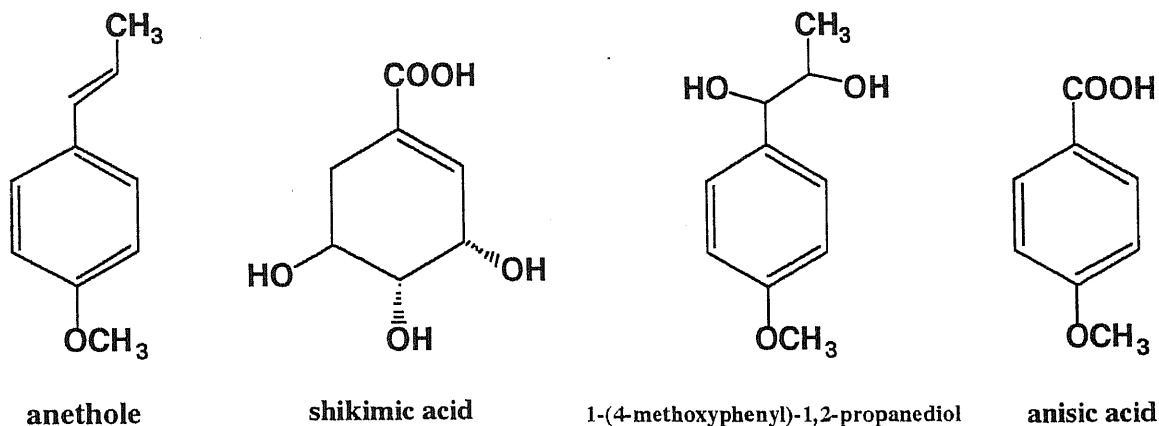


Fig. 2-5 Isolated Compounds from Star Anise

抽出及び分画方法に関して様々な再検討を繰り返し、以下に示した様な方法により分画を進行したところ、3種の活性本体の単離に成功し、それぞれ veranisatin A、B、C と命名した。

本生薬に大量に含有されるアネトール等の精油成分を除去する目的で、市販大茴香果実 (20kg) を粉碎し、*n*-ヘキサン (18Lx3) で攪拌抽出 (脱脂) した。残渣については酢酸エチル (18Lx3) を用いて攪拌抽出し、酢酸エチルエキス (115.8g) を得た。酢酸エチルエキスは 500mg/kg, *p.o.* で顕著な体温下降作用及び強力な痙攣誘発作用を示し、以前のメタノール抽出に比べ著明な活性強度の増大が見られた。以下痙攣誘発、致死毒性を指標として、各種カラムクロマトグラフィーによる分画を行なった。

シリカゲル、セファデックス LH-20、ODS 等のカラムクロマトグラフィー分画を行ない、最終的に水系シリカゲル高速液体クロマトグラフィー (Aquasil HPLC) によって veranisatin A (1)、B (2)、C (3) をそれぞれ 33、20、2mg の収量 (果実からの収率はそれぞれ、0.00016、0.00010、0.000015%) で単離した (Chart 2-1)。

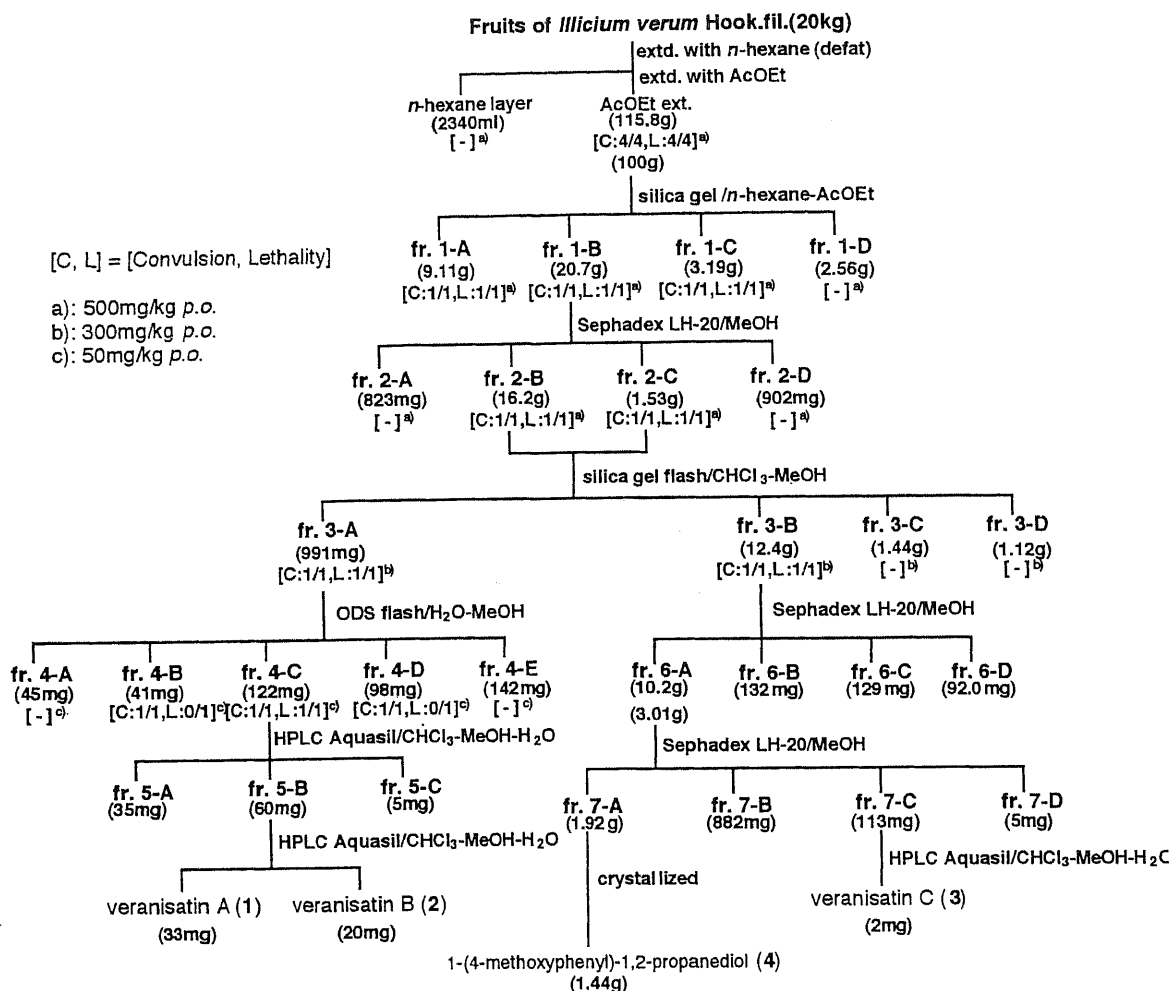


Chart 2-1 Isolation Procedure of Veranisatins

第3項 verasnitin A、B及びCの構造決定

veranisatin A (1) は酢酸エチルより無色プリズム晶として再結晶され、融点 181-182°C、高分解能 FAB マススペクトル (HR-FAB MS) より $C_{16}H_{22}O_8$ [m/z : 365.1209 ($M+Na$)⁺; err. -0.3mmu for $C_{16}H_{22}O_8Na$] が与えられた。

IR スペクトルにおいて、水酸基 (3380 cm^{-1})、 β -lactone (1830 cm^{-1})、 δ -lactone (1750 cm^{-1}) の存在が推定される吸収が見られた。 $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ 関連スペクトル (COSY) を含む ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルにおいては (Table 2-2)、 $-\text{C}(15)\text{H}_3-$ 、 $\text{C}(1)\text{H}-\text{C}(2)\text{H}_2-\text{C}(3)\text{H}_2-$ 、 $-\text{C}(8)\text{H}_2-\text{C}(7)\text{H}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(12)\text{H}_2-$ 、 $-\text{C}(14)\text{H}_2-\text{O}-$ 、及び

-C(10)H-OH の部分構造が推定されると共に、¹H-NMR において、 δ 3.41 にメトキシ基、 δ 5.07、5.52 及び 6.05 に 3 個の水酸基、¹³C-NMR において、 δ 169.04 及び δ 174.84 に 2 個のエステルカルボニル基、 δ 51.97、64.29、78.86 及び 86.10 に 4 個の 4 級炭素の存在がそれぞれ推定された。

Position	veranisatin A		veranisatin B		veranisatin C	
	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	39.50	2.43-2.51(m)	39.36	2.46-2.50(m)	37.73	2.55-2.60(m)
2	31.56	a 1.59(dddd,12.4,11.7,8.2,2.5) b 2.07-2.14(m)	31.19	a 1.65(dddd,12.1,11.7,8.6,2.6) b 2.12-2.18(m)	42.00	a 1.81(ddd,12.9,10.7,4.4) b 2.07-2.11(m)
3	32.88	a 2.43-2.51(m) b 1.67(ddd,12.4,9.3,2.5)	32.87	a 2.54(ddd,13.0,9.0,6.4) b 1.75(ddd,13.0,9.0,2.6)	71.06	4.98(ddd,9.3,5.2,4.4) 5.09(OH,d,5.2) 5.41(OH,s)
4	86.10	5.52(OH,s)	87.05	5.82(OH,s)	86.12	5.41(OH,s)
5	64.29		63.87		61.97	
6	78.86	6.05(OH,d,1.5)	80.87	6.85(OH,br.s)	80.10	6.59(OH,s)
7	79.49	4.26(dd,3.9,2.2)	79.00	4.88(dd,3.9,2.2)	78.44	4.89(dd,3.9,2.0)
8	27.80	a 2.07(dd,14.7,3.9) b 2.43(dd,14.7,2.2)	27.51	a 2.18(dd,14.9,3.9) b 2.47(dd,14.9,2.2)	26.69	a 2.24(dd,14.9,3.9) b 2.49(dd,14.9,2.0)
9	51.97		51.48		50.91	
10	71.01	4.30(d,3.4) 5.07(OH,d,3.4)	71.06	4.36(d,3.7) 5.25(OH,d,3.7)	70.39	5.39(OH,d,3.7) 4.35(d,3.7)
11	174.84		174.50		173.65	
12	76.36	a 4.05(dd,11.0,1.5) b 3.53(d,11.0)	170.06		169.45	
13	169.04		168.66		167.52	
14	65.15	a 4.03(d,6.1) b 4.30(d,6.1)	65.85	a 4.08(d,5.9) b 4.36(d,5.9)	64.78	a 4.09(d,6.0) b 4.41(d,6.0)
15	14.22	1.10(3H,d,7.0)	14.11	1.12(3H,d,7.1)	13.41	1.06(3H,d,7.1)
16	60.54	3.41(3H,s)	53.59	3.82(3H,s)	53.08	3.81(3H,s)

Position	anisatin	neoanisatin
	¹ H-NMR	¹ H-NMR
1	2.50-2.58(m)	2.42-2.48(m)
2	a 1.78(ddd,13.2,10.5,4.4) b 1.99(ddd,13.1,9.7,8.6)	a 1.60(dddd,12.5,12.0,8.3,2.7) b 2.09-2.16(m)
3	a 4.96(dt,9.7,4.4) b 4.78(OH,br,d,4.4)	a 2.51(ddd,12.4,12.0,6.4) b 1.69(ddd,12.4,8.3,2.7)
4	5.36(OH,br.s)	5.64(OH,br.s)
5		
6	6.02(OH,br.s)	6.18(OH,br.s)
7	4.21(dd,3.7,2.2)	4.20(dd,3.6,2.2)
8	a 2.13(dd,14.9,3.7) b 2.49(dd,14.9,2.2)	a 2.07(overlapped with solv.) b 2.47(dd,14.7,2.2)
9		
10	5.20(OH,d,3.1) 4.29(d,3.1)	5.05(OH,d,3.2) 4.29(d,3.2)
11		
12	1.46(3H,s)	1.49(3H,s)
13		
14	a 3.99(d,6.6) b 4.41(d,6.6)	a 4.02(d,6.5) b 4.37(d,6.5)
15	1.04(3H,d,7.1)	1.09(3H,d,7.1)
16		

Table 2-2 NMR Data of Veranisatin A - C, Anisatin and Neoanisatin in Acetone-*d*₆

水酸基の帰属については、 ^{13}C -NMR スペクトルの測定において、1 滴の CD_3OD - CD_3OH (1:1) を 1 のアセトン- d_6 溶液中に添加し、重水素化シフトの見られる炭素シグナルを観測することで行ない、 δ 32.88 (C-3)、71.01 (C-10)、78.86 (C-6) 及び 86.10 (C-4) にそれぞれ 0.07、0.08、0.12 及び 0.12 ppm のシフトしたシグナルが観察された (Fig.2-6)。このうち δ 32.88 (C-3) に観察された小さい重水素化シフトは C-4 の水酸基による γ -効果によるシフトであることが推定された。³²⁾

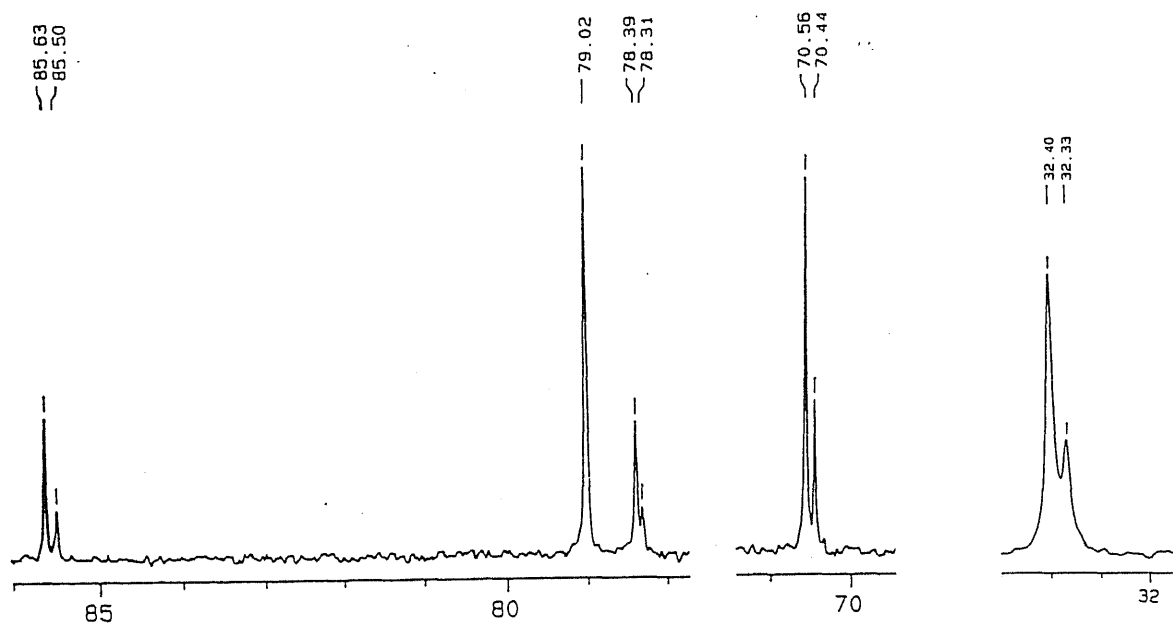


Fig. 2-6 Deuterium Isotope Shifts on ^{13}C -NMR of Veranisatin A

これらの部分構造は遠隔 ^1H - ^{13}C -COSY (COLOC) により結合した (Fig. 2-7)。C-9 と C-1、C-4、C-8 及び C-10 との結合は、 H_3 -15/C-9、4-OH/C-9、Hb-8/C-1 及び 10-OH/C-9 の各クロスピークの観測から推定した。また、5員環 (A-環) を形成する部分構造 -C(9)-C(1)H-C(2)H₂-C(3)H₂- は 4-OH/C-3 及び 4-OH/C-9 の相関ピークの観測により -C(3)-C(4)-C(9)- を介して閉環することが推定された。部分構造-C(4)-C(9)-C(8)H₂-

C(7)H- と 4 級炭素 C(5) 及び C(6) は、4-OH/C-5、H-7/C-5、H-7/C-6 及び Ha-8/C-6 の各クロスピークの観測から 6 員環 (B-環) を形成することが示唆された。δ-ラクトン構造の 6 員環 (C-環) は、H-7/C-11 及び H-10/C-11 のクロスピークより、エステルカルボニル炭素 C-11 が C-10 及び、酸素原子を介して C-7 とそれぞれ結合していることから推定した。C-5、C-13 及び C-14 で形成される β-ラクトン環 (D-環) は、C-14 のメチレンプロトンと C-4、C-6 及び C-13 との間のクロスピークの観測より推定した。

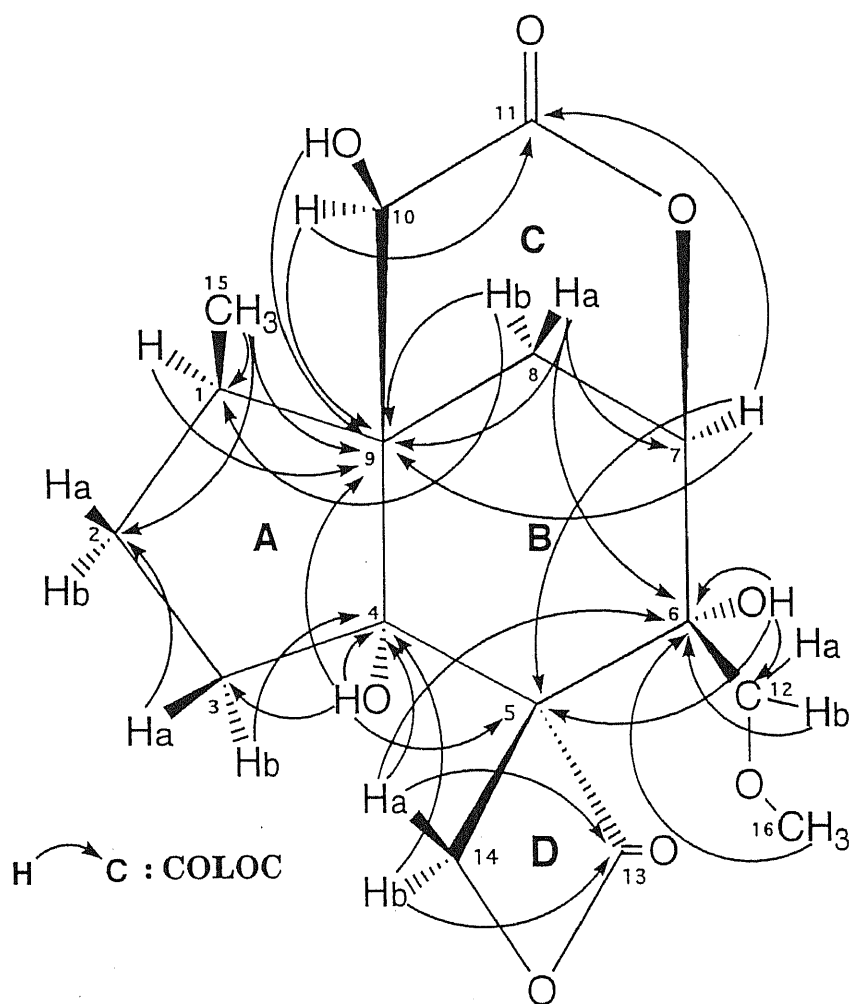


Fig.2-7 COLOC Correlations of Veranisatin A

以上の結果から、1 の構造は anisatin 及び neoanisatin と同様のセスキテルペンラクトン骨格を有し、立体構造に関しては核オーバーハウザー効果(NOE)実験により推定した(Fig. 2-8)。δ 1.10 (H₃-15) のメチルプロトン及び δ 3.53 (Hb-12) のメチレンプ

クトン骨格を有し、立体構造に関しては核オーバーハウザー効果(NOE)実験により推定した(Fig. 2-8)。 δ 1.10 (H_3 -15) のメチルプロトン及び δ 3.53 (H_b -12) のメチレンプロトンの照射により、 δ 1.59 (H_a -2)と δ 4.30 (H -10)及び δ 4.03 (H_a -14) にそれぞれ NOE が観察され、各位の相対構造を推定した。

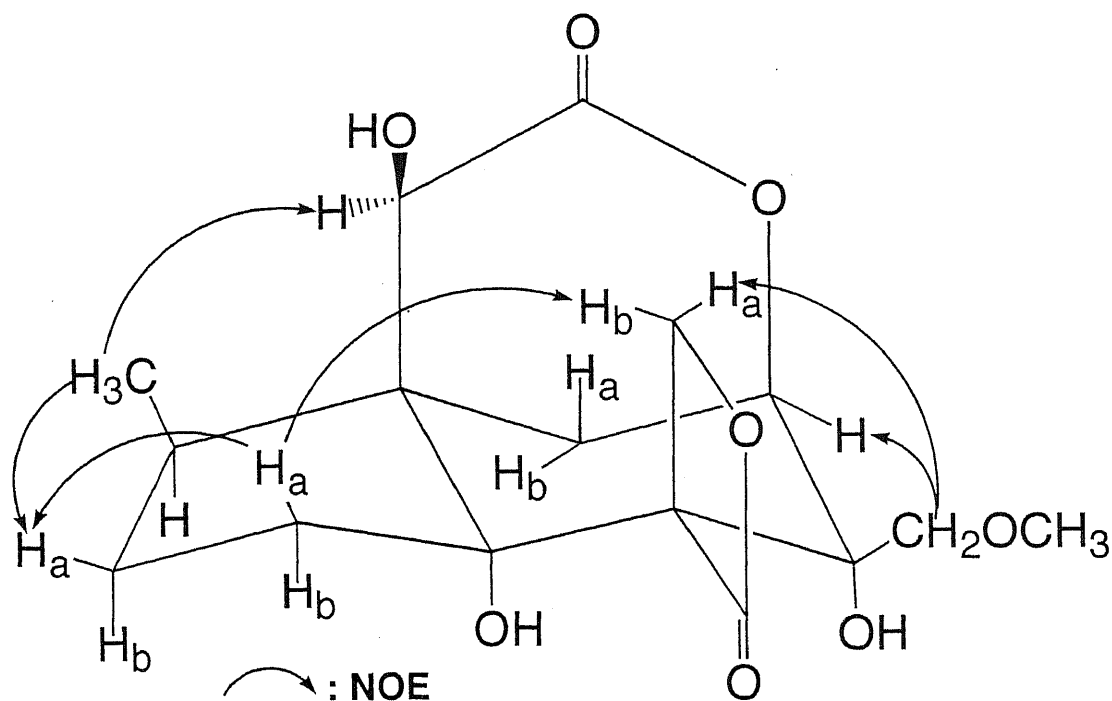


Fig. 2-8 NOEs of Veranisatin A

更に円二色性(CD)スペクトルを、同じ立体構造を有する anisatin ($[\theta]_{233} - 2720$)及び neoanisatin ($[\theta]_{238} - 1940$)と直接比較したところ、**1**($[\theta]_{236} - 1950$)は neoanisatin とほぼ同様のスペクトルを示したことから、絶対構造もこれらと同様であることが推定された(Fig. 2-9)。

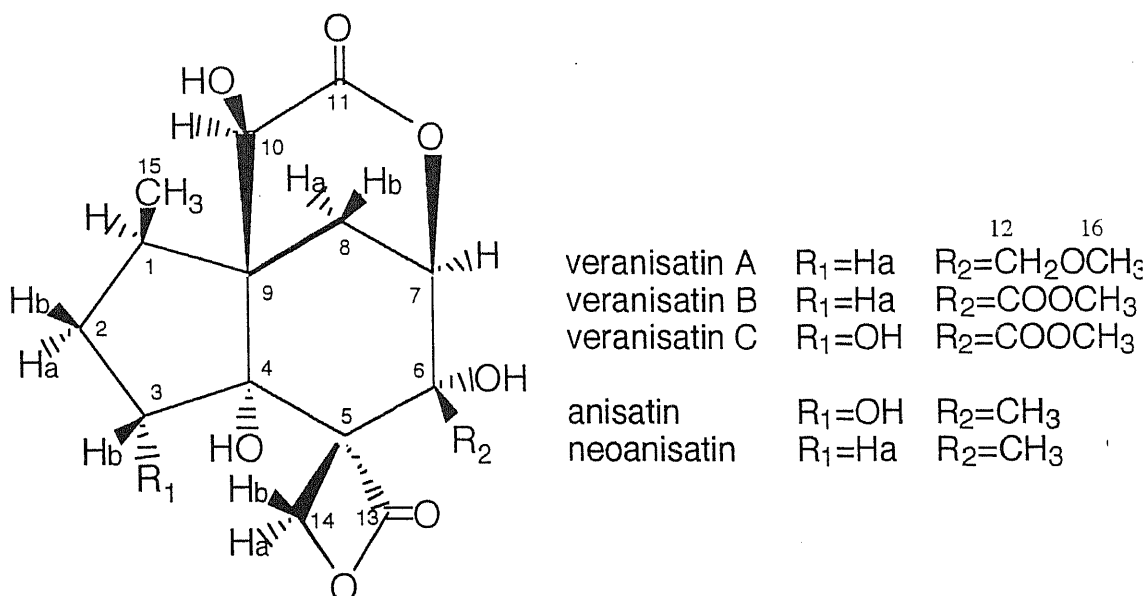


Fig. 2-9 Structure of Veranisatins, Anisatin and Neoanisatin

veranisatin B (2) は酢酸エチルより無色プリズム晶として再結晶され、融点 212-213°C、HR-FAB MS より $C_{16}H_{20}O_9$ [m/z : 379.1003 ($M+Na$)⁺; err. -0.2mmu for $C_{16}H_{20}O_9Na$] が与えられた。IR スペクトルにおいて、水酸基 (3480cm^{-1})、 β -lactone (1825cm^{-1})、 δ -lactone (1760cm^{-1})、エステルカルボニル(1740cm^{-1})の存在が推定された。¹H-及び¹³C-NMR スペクトルにおいては、6 位炭素の置換基を除き 1 と同様のシグナルを示した(Table 2-2)。一方、1に見られたメトキシメチレン炭素($\delta 60.54$ 及び 76.36)に代り、メトキシカルボニル炭素($\delta 53.59$ 及び 170.06)と思われるシグナルが観察され、 $\delta 4.88$ (1H, dd, $J=3.9, 2.2$, C-7)に脱遮蔽されたメチンプロトンシグナルが観測されたことなどから、6 位の置換基はメトキシカルボニル基であることが推定された。また、CD スペクトル($[\theta]_{237} -2370$)が anisatin の CD と同様であったことから、2 の絶対構造についても 1 と同様であることが推定された。

veranisatin C (3) はエタノールより無色針状晶として再結晶され、融点 228-229.5°C、HR-FAB MS より $C_{16}H_{20}O_{10}$ [m/z : 373.1140 ($M+H$)⁺; err. -0.5mmu for $C_{16}H_{21}O_{10}$] が与えられた。IR スペクトルにおいて、水酸基 (3450cm^{-1})、 β -lactone (1825cm^{-1})、 δ -lactone (1760cm^{-1})、エステルカルボニル(1743cm^{-1})の存在が推

定された。 ^1H -及び ^{13}C -NMR スペクトルにおいては、2 とほぼ同様のシグナルが観測されたが、2 の3 位メチレンプロトンに代り、メチンプロトン(δ 4.98)及び水酸基(δ 5.09)のシグナルが観測され、FG-HMBC 及び HMQC 等の測定より、これらのプロトンが3 位に帰属されることが示唆された(Fig.2-10)。

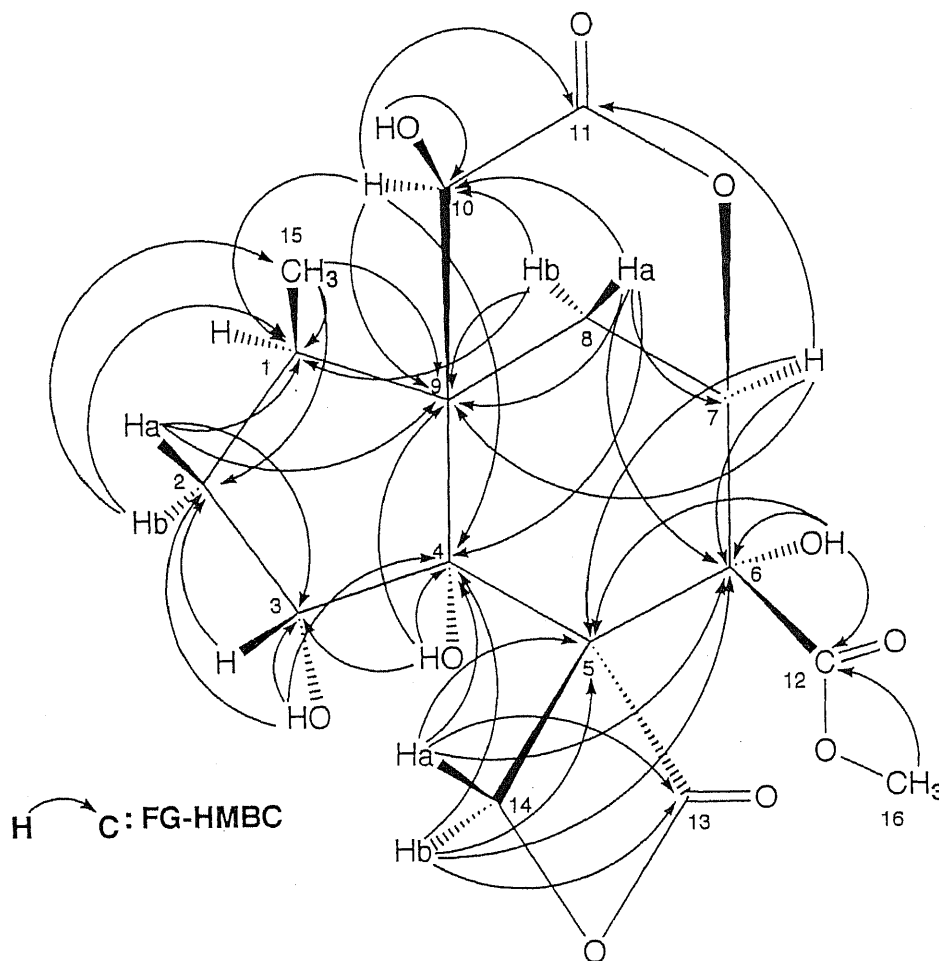


Fig. 2-10 HMBC Correlations of Veranisatin C

3 の立体構造に関しては、差 NOE 実験において、H-3 と 10-OH 及び Hb-14 との間、Ha-8 と H-7 との間、H-10 と H3-15 及び H-10 との間 NOE がそれぞれ観測され、H-3 と Ha-14 との間には負の NOE が観察されたことから Fig.2-11 に示すような構造を推定した。さらに CD スペクトルにおいて 2 と同様のコットン効果($[\theta]_{235} - 3730$)が観測されたことから、3 の絶対構造に関しても 2 と同様であることが示唆された。

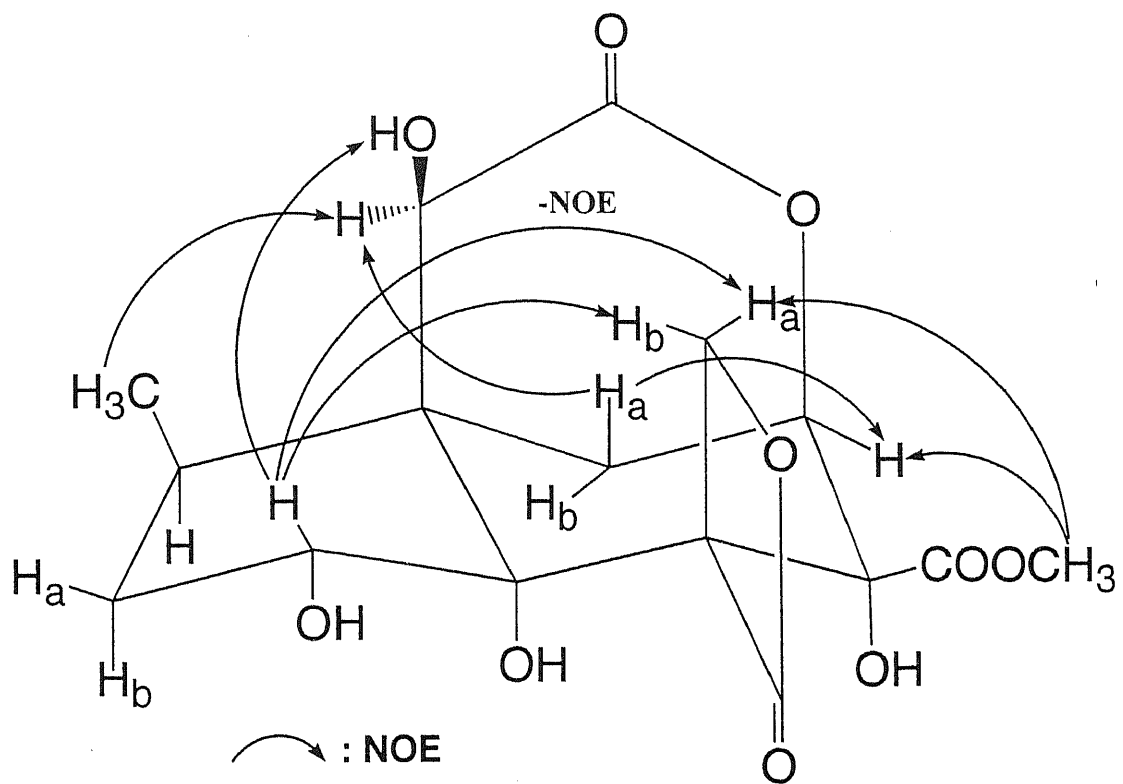


Fig. 2-11 NOEs of Veranisatin C

第 2 節 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の単離および構造解析

第 1 項 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の単離

活性画分の分画途中で(Chart 2-1)、活性本体の一つである 3 と同様の極性を有し、カラムクロマトグラフィーにおいて 3 の精製の障害となった物質 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol (4) の単離と構造解析について以下に示す。なお本物質は、ミカン科植物 *Ruta montana* L. からの単離の報告があるが³³⁾、本生薬からの単離は初めてと思われる。

活性画分 fr.3-B (12.4g)を繰り返し Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分画し、fr.7-A (3.01g) より 4 (1.44g) が結晶として得られた。4 は中圧液体カラムクロマトグラフィー(MPLC) によりさらに 2 種の化合物 4A 及び 4B に分画された。

第 2 項 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の構造決定

4 はベンゼンより無色針状晶として再結晶され、IR スペクトルにおいて、水酸基 (3250cm^{-1})、芳香族二重結合 (1610cm^{-1}) の存在が推定される吸収が見られた。 ^1H - ^1H COSY 及び DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)を含む NMR スペクトルの解析から、4 の平面構造は本植物からの単離は初めての、1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol であることが推定された。さらに、MPLC により分離された 4A 及び 4B はそれぞれ異なる融点を示し、立体異性体であることが示唆されたため、以下に示すように別個に構造解析を行った。

4A は、ベンゼンより無色板状晶として再結晶され、融点 $118-119^\circ\text{C}$ を示した。 ^1H -NMR においては、それぞれ 1 個のメチル(δ 1.03) 及びメトキシメチルプロトン (δ

3.77)のシグナル、それぞれ 2 個ずつの AA'XX'型をした芳香族メチンプロトン(δ 6.86-6.88 及び δ 7.26-7.29)、2 個のメチンプロトン(δ 3.84 及び 4.50-4.51)及び重水添加により消失する 2 個の水酸基プロトン(δ 3.49 及び 4.09)のシグナルが観測された。

^{13}C -NMR 及び DEPT の解析より、それぞれ 1 個のメチル(δ 18.08)及びメトキシメチル炭素(δ 55.43)、酸素原子に結合していると思われる 2 個のメチン炭素(δ 72.11 及び 77.88)、それぞれ 2 個ずつと思われる 2 個の芳香族メチン炭素(δ 113.98 及び 128.74) 及び 2 個の 4 級炭素(δ 135.56 及び 159.72)の各シグナルが観測された。

4B は、ベンゼンより無色プリズム晶として再結晶され、融点 67.5-68.0°C を示し、IR、UV、NMR は 4A とほぼ同様のスペクトルパターンを示した。

以上の結果から、4 は dihydroxypropyl 基の 1、2 位の不斉炭素に関し、(1*R*,2*S*)、(1*S*,2*R*)、(1*R*,2*R*)、(1*S*,2*S*) の 4 種の光学異性体の存在する可能性が考えられ、文献値^{33a)}では、(±)-*threo* 体及び(±)-*erythro* 体の融点がそれぞれ 115.5-116.5°C 及び 67.5-68.0°C であることから、4A 及び 4B はそれぞれ(±)-*threo* 体及び(±)-*erythro* 体であることが示唆された。さらに旋光度の測定を行ったところ、互いに $[\alpha]_{\text{D}}=0^\circ$ を示したため、それぞれラセミ体であることが推定された。以上の推測を確定するために、anethole から 4A または 4B への誘導を行ない直接比較により立体構造を決定することにした。

第 3 項 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の立体化学

anethole は、1 位の二重結合に関し、*trans* 体及び *cis* 体が存在するため、各異性体に対しオスミウム酸化により水酸基を導入した際に、それぞれ、(±)-*threo* 体及び(±)-*erythro* 体がそれぞれ誘導されると考えた。³⁴⁾ しかし、市販 anethole の *trans* 体及び *cis* 体の分離を試みたが、*cis* 体に関しては含有量が少量であるうえに、不安定である

ために単離が困難であったので、得られた *trans* 体を用いて(±)-*threo* 体のみ誘導を行なった (Fig. 2-12)。

市販 anethole (1.14g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分離を行い、*trans*- anethole (561mg)を得た。*trans*-anethole (100mg)を、ピリジン中、四酸化オスmiumにて酸化し、4C (61mg) を得た。

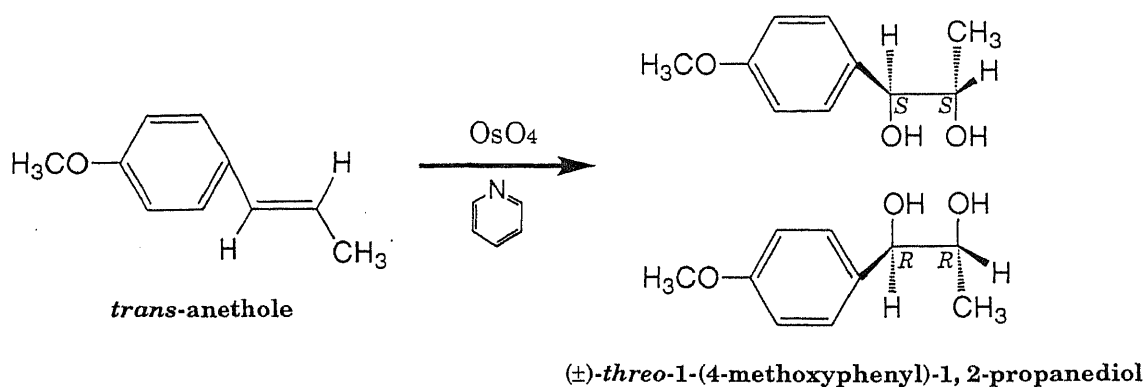


Fig. 2-12 Synthetic Procedure of 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol

4C はベンゼンより無色プリズム晶として再結晶され、融点 66.5-67.0°C、 $[\alpha]_D^{20}=0^\circ$ であった。4C は IR、UV、NMR スペクトルにおいて 4A、4B と同様のスペクトルを示し、薄層クロマトグラフィー(HPTLC silica gel F₂₅₄) 及び融点より 4B と一致した。従って、4A は(±)-*erythro*-1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol、4B は(±)-*threo*-1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol であると同定した。

以上の結果から、4 は 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol の(1*R*,2*S*)、(1*S*,2*R*)、(1*R*,2*R*)、(1*S*,2*S*) 体の 4 種の光学異性体混合物であると結論した。

第3節 veranisatin A、B、Cの薬理活性の検討及び anisatin との比較

veranisatin A、B、Cの薬理活性を検討する目的で以下に示す実験を行い、さらに同属植物シキミ(*Illicium anisatum* L.)より単離された anisatin との活性比較についても検討した。

第1項 anisatin の単離

veranisatin 類との薬理活性を比較する目的で、シキミより anisatin を以下のように単離した。

1990年10月、千葉大学薬学部薬用植物園(西千葉圃場及び館山圃場)にて採集したシキミ果実(2.18kg)をヘキサンの脱脂後、酢酸エチルにて抽出し、エキス(93.2g)を作成し、痙攣誘発、致死毒性及び anisatin 標品の TLC を指標に、ダイアイオン HP-20、ODS、シリカゲルの各種カラムクロマトグラフィーにて順次分画し、最終画分よりエタノールにて再結晶し、無色針状晶(5,466mg)を得た(Chart 2-2)。5は、TLC、NMR を標品と直接比較し、anisatin であることを確認した。

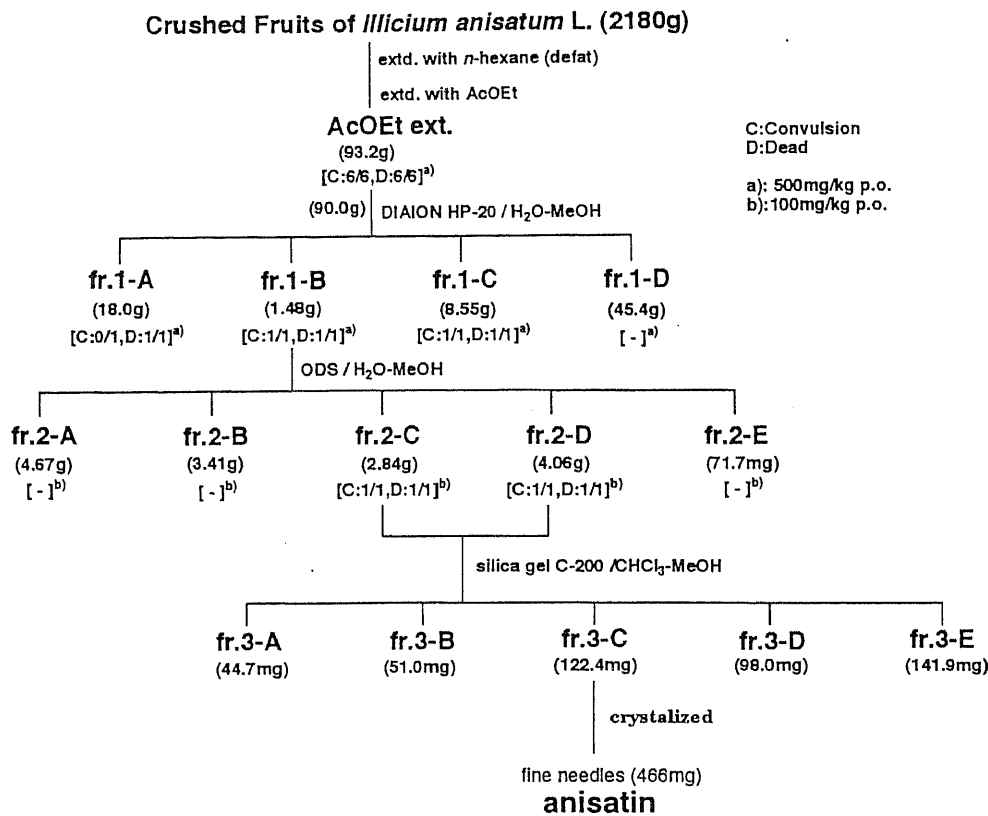


Chart 2-2 Isolation Procedure of Anisatin

第 2 項 veranisatin A、B 及び C の痙攣誘発及び致死毒性の検討

1、2、3 は共に 1mg/kg, p.o. において、鎮静傾向を示したが、痙攣及び致死毒性は示さなかった。さらに 3mg/kg, p.o. においてはピクロトキシン様の間代性痙攣を誘発し (3 匹中全匹、3 は 4 匹中全匹)、約 30 分後から強直性痙攣に移行して、約 1 時間で全匹死亡した。一方、anisatin は 1mg/kg, p.o. において、投与後 30 分以内に強直性痙攣を誘発 (3 匹中全匹) し、1 時間以内に全匹死亡した (Table 2-3)。

	Dose	Convulsion	Lethality
Veranisatin A	1mg/kg <i>p.o.</i>	0/3	0/3
	3mg/kg <i>p.o.</i>	3/3	3/3
Veranisatin B	1mg/kg <i>p.o.</i>	0/3	0/3
	3mg/kg <i>p.o.</i>	3/3	3/3
Veranisatin C	1mg/kg <i>p.o.</i>	0/4	0/4
	3mg/kg <i>p.o.</i>	4/4	4/4
Anisatin	1mg/kg <i>p.o.</i>	3/3	3/3

Table 2-3 Toxicity of Veranisatins and Anisatin

第3項 veranisatins A、B及びCの正常体温下降作用

1、2、3は共に0.5mg/kg, *p.o.*において、弱い正常体温下降作用を示した。1mg/kg, *p.o.*においては、投与1時間後に最大-3~-4°Cの体温下降作用を示し、4時間後には回復した。また、anisatinは0.5mg/kg, *p.o.*において強い体温下降作用を示し、投与30分後に約-3.5°Cの最大活性を示した (Fig.2-13)。

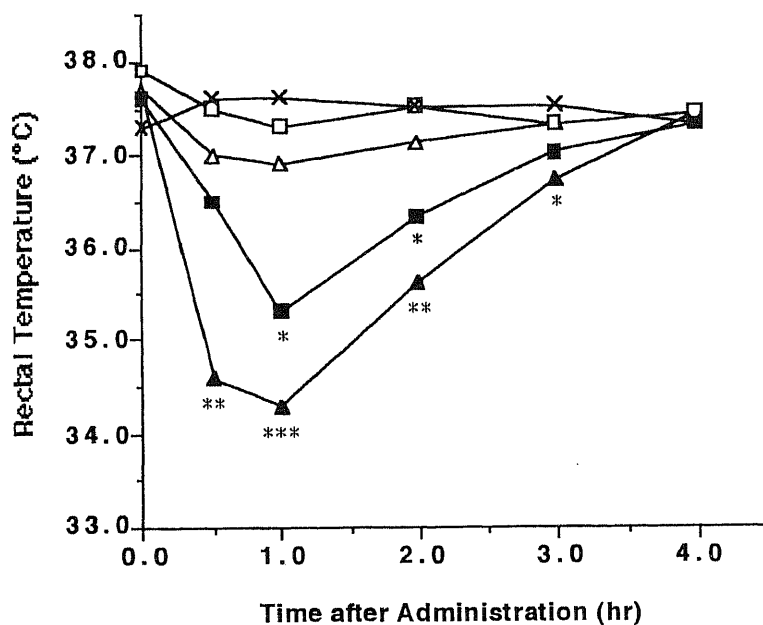


Fig.2-13A Effect of Veranisatins A and B on Body Temperature in Mice

—x— control —□— veranisatin A (0.5mg/kg) —■— veranisatin A (1mg/kg)
 —△— veranisatin B (0.5mg/kg) —▲— veranisatin B (1mg/kg)
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n = 3$.

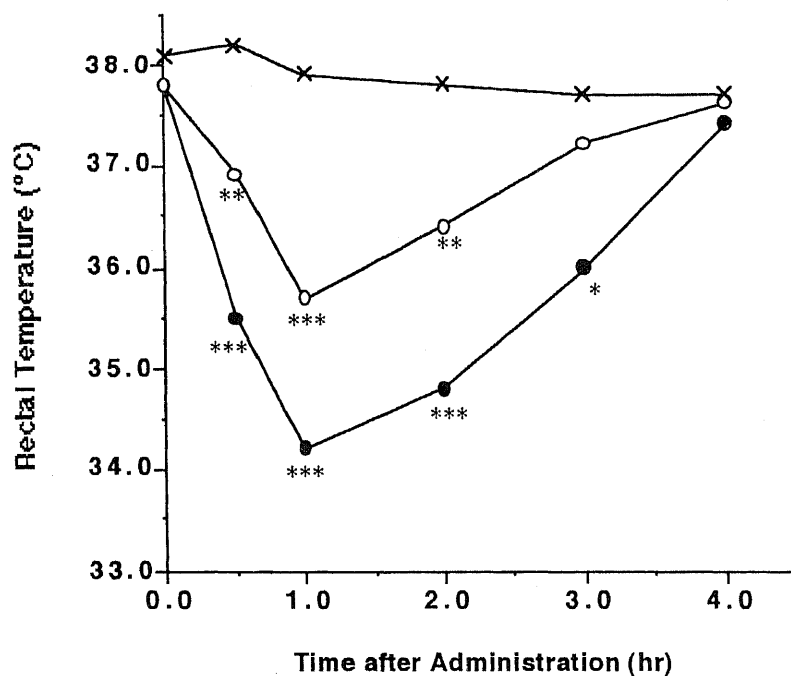


Fig.2-13B Effect of Veranisatin C on Body Temperature in Mice

—x— control —○— veranisatin C (0.5mg/kg)
 —●— veranisatin C (1mg/kg)
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n = 4$.

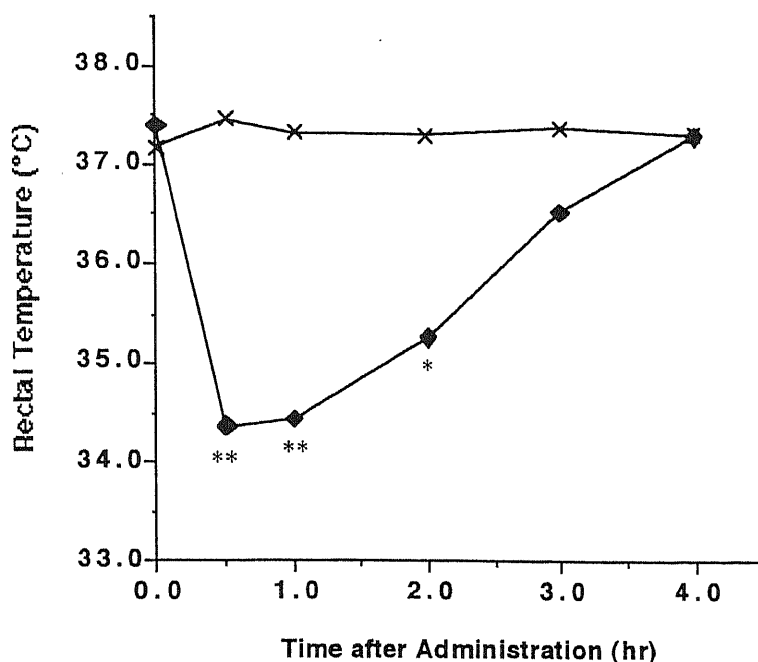


Fig.2-13C Effect of Anisatin on Body Temperature in Mice

—x— control —◆— anisatin(0.5mg/kg)
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, $n = 3$.

上記の薬理活性は本物質が中枢神経系に作用していることを示唆しており、痙攣誘発作用及び正常体温下降作用を示す用量が過剰量である可能性が考えられ、より低用量、すなわち毒性を示さない用量における中枢神経系への作用を検討する目的で以下に示す様な実験を行った。なお、量的関係から収量の多かった veranisatin A (1) のみを用いて、anisatin (5) との比較検討を行なうことにした。

第4項 veranisatins A の鎮痛活性

毒性を示さない用量である 0.5mg/kg 以下における鎮痛活性を検討する目的で、酢酸ライジング抑制作用及び圧刺激疼痛閾値の上昇作用を検討した。

1 及び 5 の、酢酸ライジング抑制作用を検討したところ、1 は 0.1mg/kg, p.o. で 22.9% ($p < 0.001$)、0.5mg/kg, p.o. で 68.6% ($p < 0.001$) の有意な抑制率を示した。一

方 5 は 0.1mg/kg, *p.o.* で 42.4% ($p < 0.01$) の有意な抑制活性を示した (Fig. 2-14)。

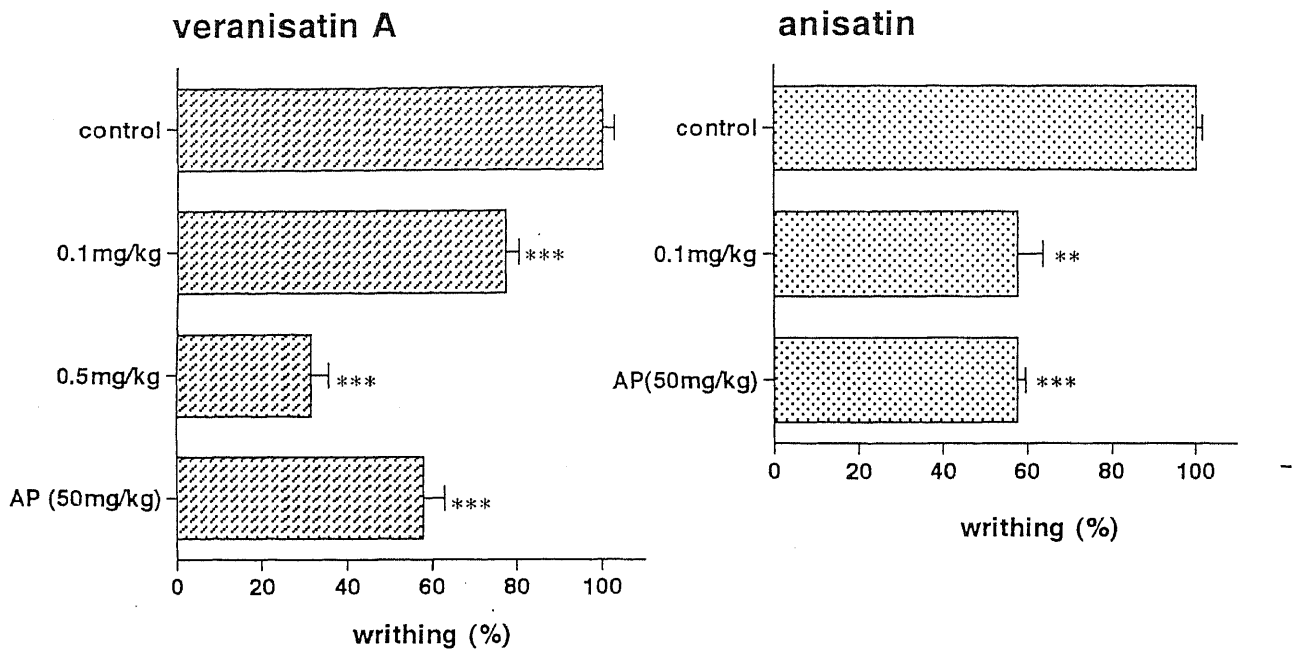


Fig. 2-14 Analgesic Effect of Veranisatin A and Anisatin on Acetic Acid-Induced Writhing in Mice

Each bar represents the mean \pm S.E. The number of each control (26.3 ± 0.68 and 26.3 ± 0.44 for left and right panels, respectively) was taken as 100%. AP: aminopyrine. ** $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n = 6$.

次に 1 及び 5 の圧刺激疼痛閾値上昇作用を検討したところ、1 は、0.1 及び 0.3mg/kg, *p.o.* で、5 は、0.03 及び 0.1mg/kg, *p.o.* でそれぞれ用量依存的に有意な疼痛閾値の上昇作用を示した (Fig. 2-15)。

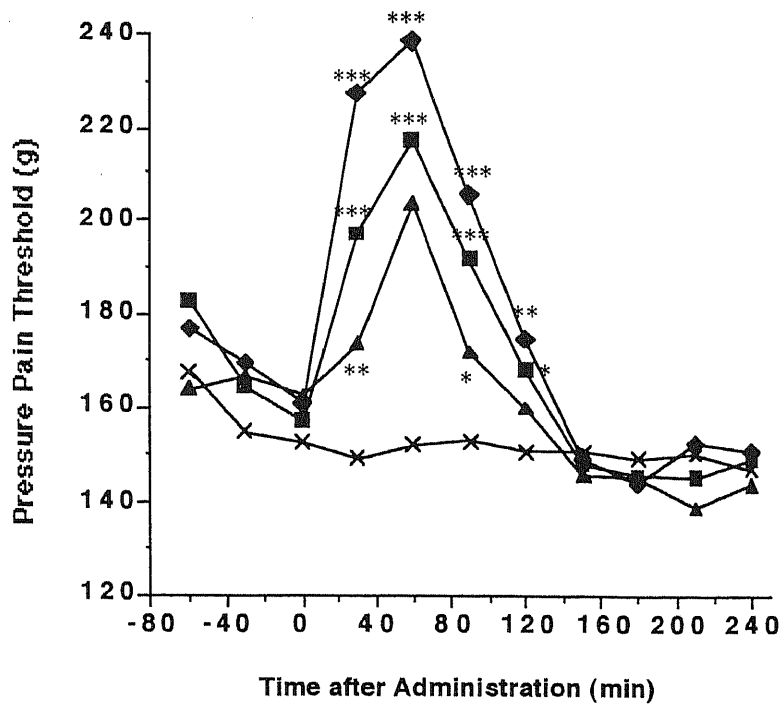


Fig.2-15A Analgesic Effect of Anisatin on Tail Pressure Pain Threshold in Mice

—x— control —△— 0.1 mg/kg —■— 0.3 mg/kg —◆— AP
 AP: aminopyrine (50mg/kg, p.o.). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n=8$.

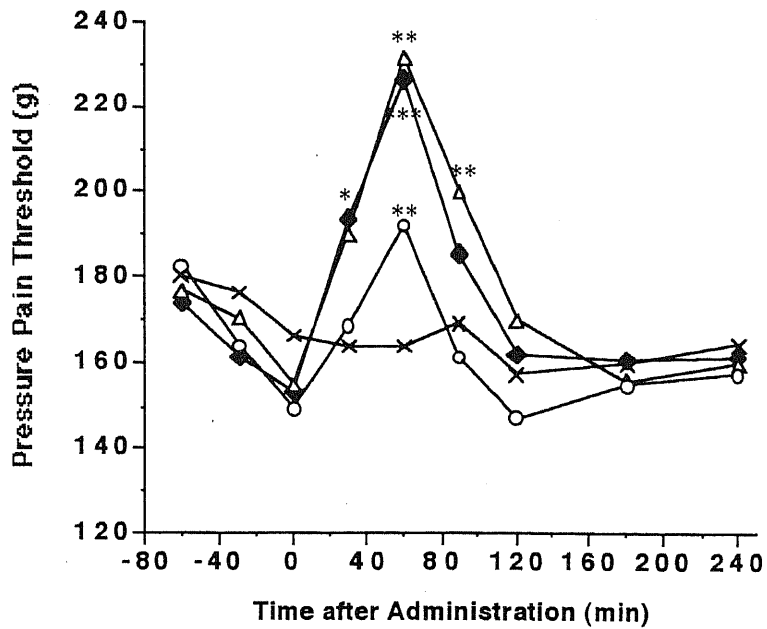


Fig.2-15B Analgesic Effect of Anisatin on Tail Pressure Pain Threshold in Mice

—x— control —○— 0.03 mg/kg —△— 0.1 mg/kg —◆— AP
 AP: aminopyrine (50 mg/kg, p.o.). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n=8$.

第5項 veranisatins A のメタンフェタミン誘発自発運動亢進作用に対する影響

1 及び 5 の、メタンフェタミン誘発自発運動亢進に及ぼす影響を検討したところ、1 は、0.3mg/kg, *p.o.* で有意に自発運動亢進を抑制した。一方 5 は、0.03 及び 0.1mg/kg, *p.o.* で用量依存的に有意に自発運動亢進を抑制した(Fig. 2-16)。

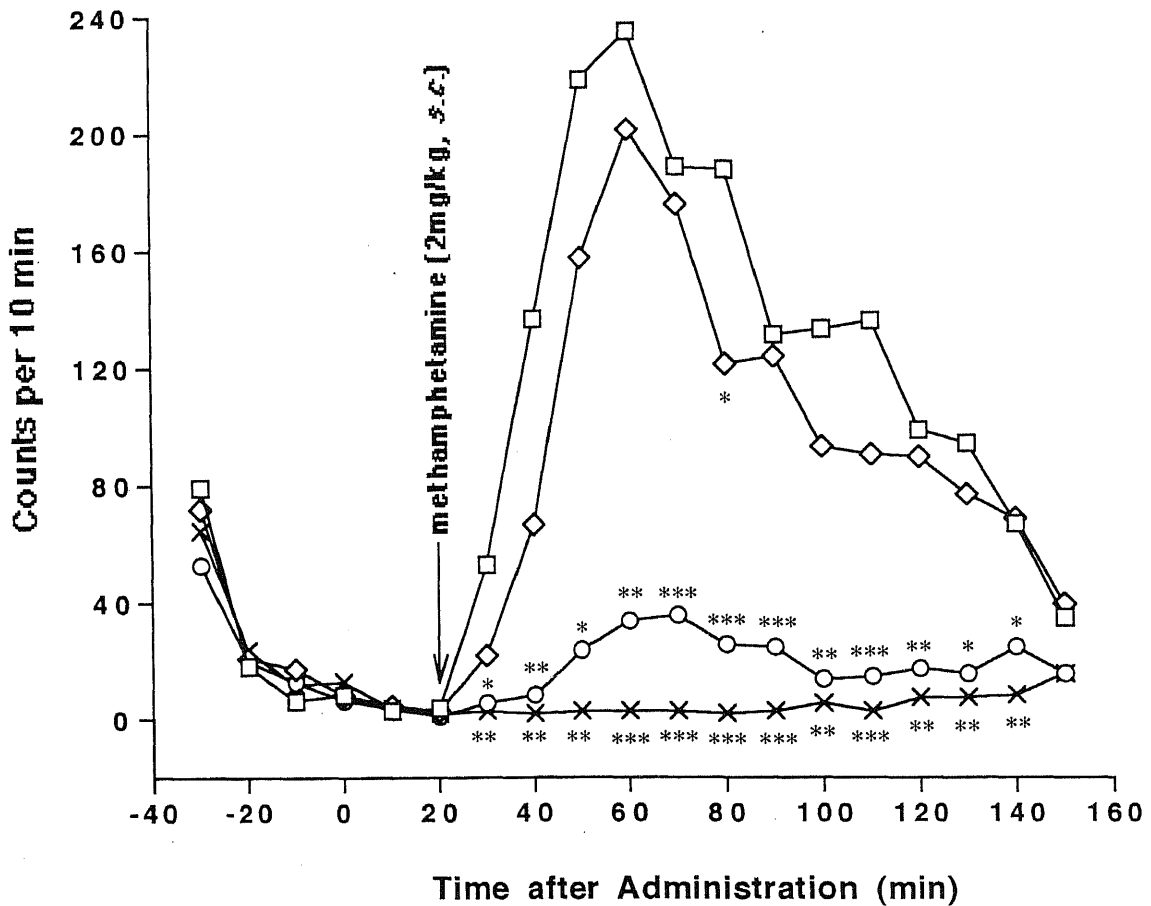


Fig.2-16A Effect of Veranisatin A on Methamphetamine-Induced Locomotor Activity in Mice

—□— control —◇— 0.1 mg/kg —○— 0.3 mg/kg —×— CPZ
 CPZ: chlorpromazine (10mg/kg, *p.o.*). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n=10$

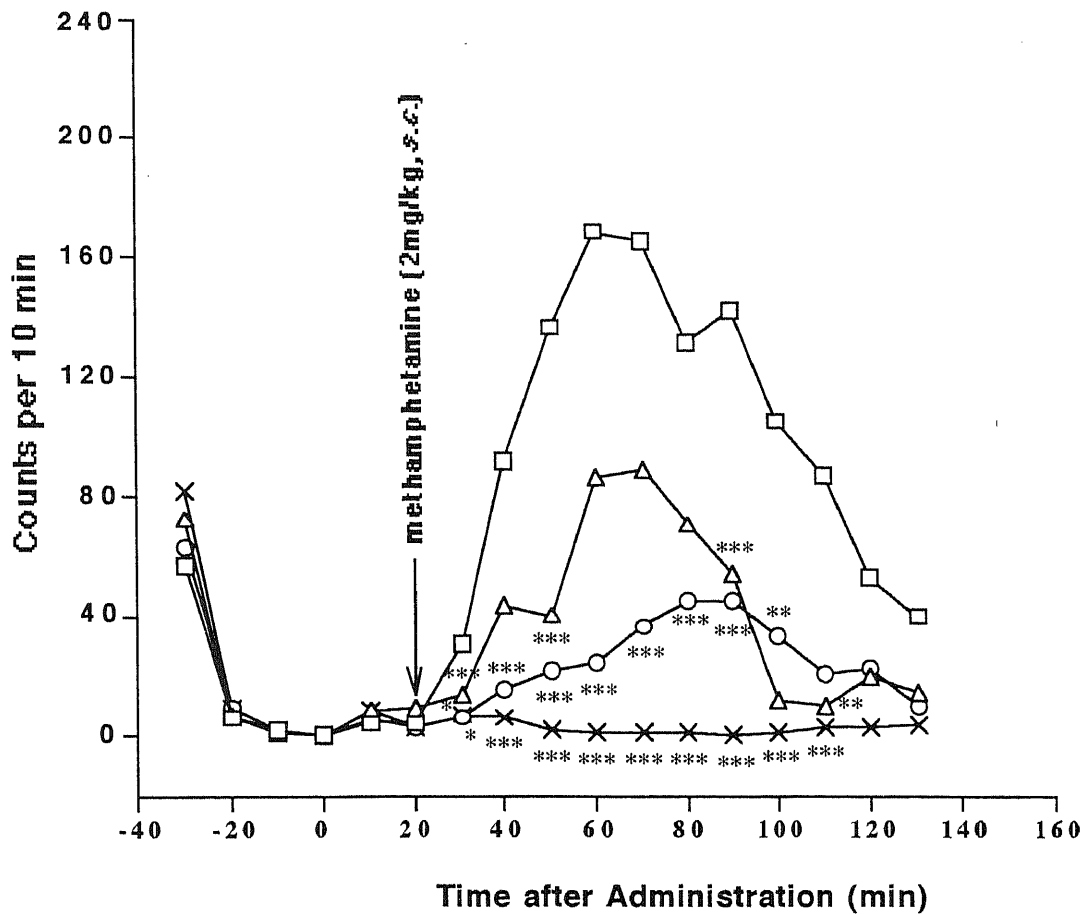


Fig.2-16B Effect of Anisatin on Methamphetamine-Induced Locomotor Activity in Mice

—□— control —△— 0.03 mg/kg —○— 0.1 mg/kg —×— CPZ

CPZ: chlorpromazine (10mg/kg). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. $n = 10$.

第6項 その他の薬理活性についての検討

その他の中枢神経系への作用を検討する目的で、anisatin を用いて、ペントバルビタール麻酔作用時間に及ぼす影響(Fig. 2-17) 及び Vorgel 型飲水-罰事態実験装置を用いた抗不安作用の検討(Fig. 2-18) を行ったが、0.1 及び 0.03mg/kg, *p.o.* において活性は見られなかった。

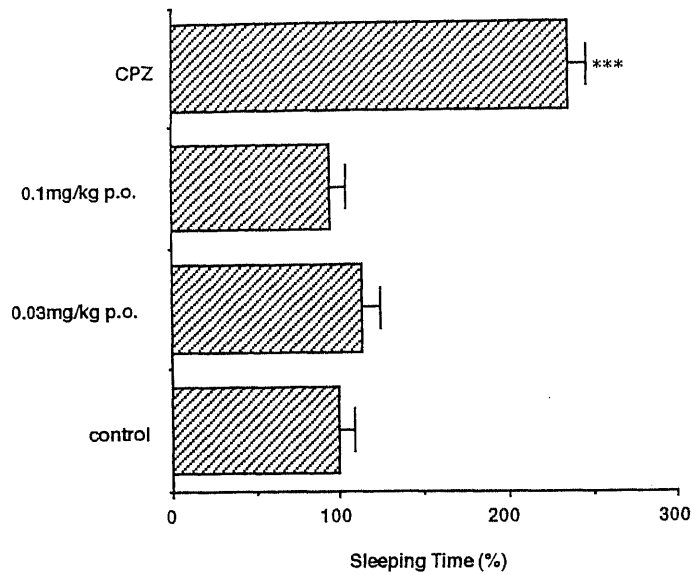


Fig.2-17 Effect of Anisatin on Pentobarbital-induced Anesthesia in Mice

Duration time of anesthesia in control (47.88 min) was taken as 100%. CPZ: chlorpromazine (5 mg/kg, p.o.), Pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.). ***: $p < 0.001$. n=8.

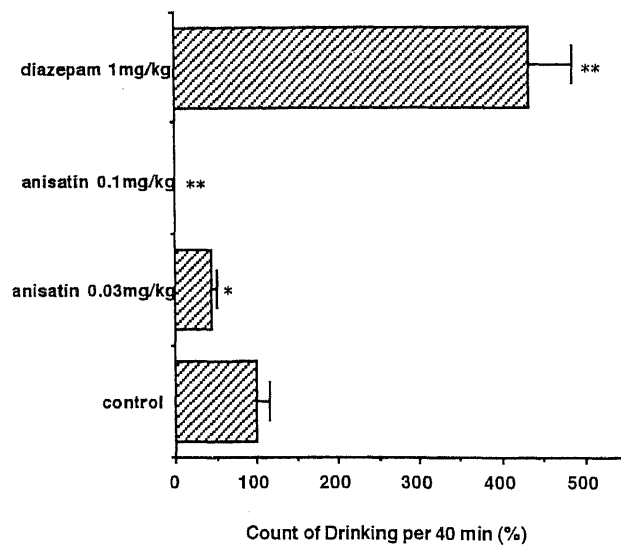


Fig.2-18 Anti-conflict Effect of Anisatin in Mice

The number of drinking in control (7.13) was taken as 100%. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. n=8. Each sample was administered by subcutaneous injection.

考察

anisatin(5)と neoanisatin(6)は3位の水酸基の有無に構造的差異があり(Fig.2-19)、活性においても LD₅₀ 値はそれぞれ 1.03 及び 1.62mg/kg, *i.p.* であり、明かな差が報告されている³⁵⁾。本研究においても、3が1、2より若干強い正常体温下降作用を示したが、6位以外の基本骨格に対し、1、2が6の基本骨格を有し、3は5の基本骨格に類似した構造を有していることから、3位の水酸基が活性強度に影響を与えていることが示唆される。また、6位の構造差異が活性に及ぼす影響については、5及び6のメチル基が酸化され、メトキシメチレン基あるいはメトキシカルボニル基に置換した形をとっている1、2、3では全ての活性試験で5及び6よりも弱い活性が見られたことから、この置換基が、直接的に、あるいは同6位の水酸基に作用して間接的に活性に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

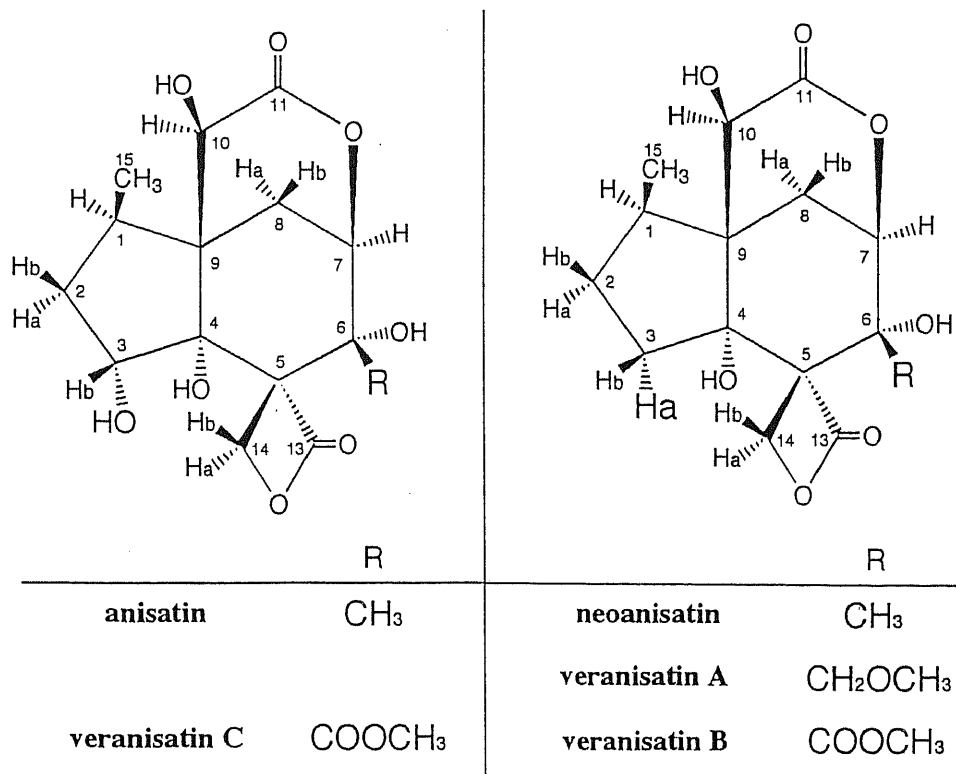


Fig. 2-19 anisatin 及び neoanisatin と veranisatin 類の構造比較

第1項のように3 mg/kg程度の用量で5と同様の picrotoxin 様痙攣が観察されたことは、以前報告がある様な anisatin の GABA (γ -aminobutylic acid) 受容体に対する非競合的拮抗による作用³⁶⁾を veranisatin 類も有しているものと思われる。また、痙攣誘発作用及び致死毒性を示さないような低用量において、veranisatin 及び anisatin は共に強力な鎮痛作用を示したが、この作用についても、GABA 受容体拮抗作用によることが推定できる。生体内の疼痛抑制機構には (Fig.2-20)、内因性オピオイドペプチド β -エンドルフィンによる下行性疼痛抑制系が存在し、中脳灰白質に存在する GABA 受容体は、視床下部弓状核より放出される β -エンドルフィンの下行性疼痛抑制系の賦活を持続的に抑制しており、この GABA 作動性ニューロンによる抑制を制御 (脱抑制) すれば、結果的に侵害受容反応の抑制により鎮痛効果として表現されることになる。以上のことから、veranisatin 類の示す鎮痛作用は、中枢神経系を介した間接的な疼痛抑制作用であることが推測される。

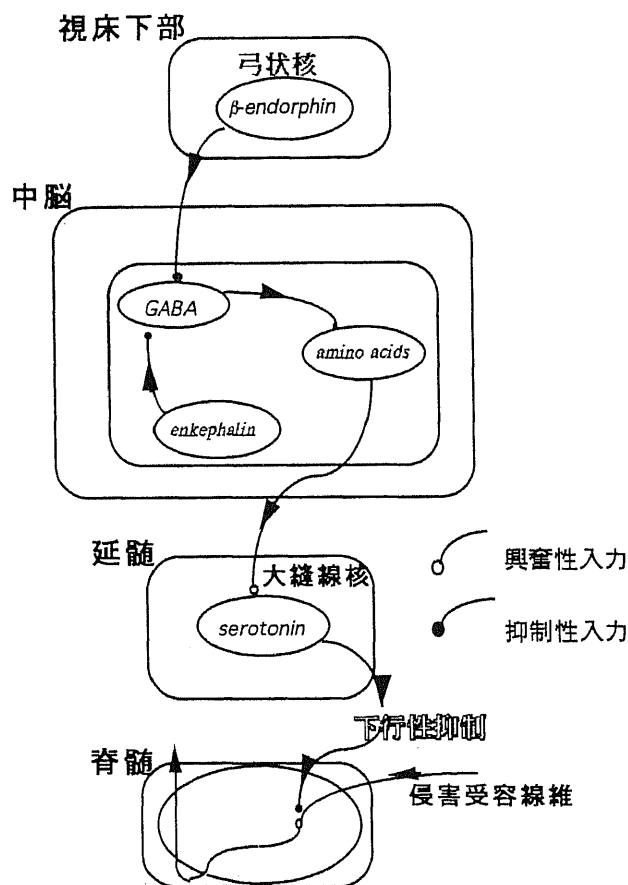


Fig.2-20 下行性疼痛抑制系の模式図³⁷⁾

小括

1) 大茴香果実より得られた veranisatin A、B、C は、同属植物シキミより得られた anisatin に構造が類似した新規セスキテルペンラクトンで、それらの含有率は、乾燥果実重量に対しそれぞれ 0.00016、0.00010、0.000015%と、anisatin の 0.021%に比較して極めて低いことを示し、大茴香とシキミとをそれぞれ薬用植物と有毒植物とに分別されていることに科学的意義を与えた。

2) veranisatin A は、anisatin に比べ若干弱いものの類似の薬理メカニズムで中枢神経系に有意に作用し、3mg/kg 経口投与で痙攣誘発及び致死毒性、1mg/kg 経口投与で正常体温下降作用、0.3mg/kg で鎮静作用（メタンフェタミン誘発自発運動亢進の抑制作用）、0.1mg/kg 経口投与で鎮痛作用（化学的及び物理的疼痛の抑制）を示した。

総括

本研究では、和漢薬を始めとした民間伝承薬由来の薬理活性成分に関して、化学的及び薬理学的手法を取り入れた探索研究を行い、その活性本体を明らかにすると共に、下記に示す結論は、各民間伝承薬の伝承情報に科学的情報を付加し、その用法の妥当性を客観的に考察するうえでの一助となるものと思われる。

- (1) ペルー民間薬 CEDRON (*Lippia triphylla* (L'her) O.Kuntze)より、鎮痛活性を指標としたクロマト分画により、活性本体として acteoside を単離した。本生薬中より非常に多量の acteoside (収率はエキス量の 5.7%) が得られ、本物質が本生薬のほぼ唯一の鎮痛活性本体と考えられる。
- (2) acteoside の鎮痛活性は経口投与では弱いものの、静脈内投与での活性は、鎮痛薬アミノピリンに相当する活性を示した。更に、本物質の活性構造を、関連化合物を用いて検討した結果、構造中のアグリコンのみでは活性を示さず、acteoside の構造との相違が拡大するに従って活性低下が見られたことから、本物質及び関連化合物群の示す鎮痛活性には、適した分子サイズまたは分子形の存在することが示唆された。
- (3) acteoside の鎮痛活性以外の薬理活性については、非常に弱いものの、メタンフェタミンの誘発する自発運動亢進作用を抑制し、ペントバルビタール麻酔効果を有意に延長した。このことから acteoside が、中枢神経系に対し何らかの作用を及ぼし、鎮静的な効果を現していることが示唆された。
- (4) 漢薬大茴香 (*Illicium verum* Hook. fil.) より、強力な新規向神経活性成分 veranisatin A、B 及び C を単離した。本化合物は用量によっては正常体温下降作用や痙攣を誘発し、致死毒性を示すこともあるが、極低用量においては、強力な鎮痛・鎮静活性を示すことを明かとした。このことから、大茴香の鎮痛・鎮静を期待した使用法に妥当性を与えるものと考えられる。

(5) 類似の痙攣誘発物質 anisatin のシキミ (*Illicium anisatum* L.) 果実からの収量に比べ (果実乾燥重量の 0.021%)、本化合物の収量が非常に微量 (果実乾燥重量の 0.00028%) であるということは、大茴香とシキミとをそれぞれ食用及び薬用植物と有毒植物とに分類することに科学的妥当性を付加するものであると思われる。

以上の結論から、CEDRON の、鎮痛を目的とした現地での使用法に妥当性が見出されたものと考えられるとともに、それぞれ単独では活性を示さない化合物が適当に組み合わせることにより著明な生理活性を示す場合があることを明らかとした。このことは、抽出された活性物質単体を化学修飾し、より強い活性物質に変換して用いる今日的な医薬品の開発戦略に、更に違った角度からのアプローチを付加するものであり、今後の和漢薬・民間伝承薬または漢方方剤研究における新しい方向性を見出し、医薬品開発の中に組み入れる発端に成り得る可能性を示唆している。

一方、現在まで無毒とされ、その薬理活性成分に関する研究がなされていなかった大茴香より、用量によっては毒性を示す、強力な向神経活性成分を発見したことは、十分な新規性と発展性を持つ知見であると考えられ、今日広く知られ、用いられている多数の生薬の中にも、十分研究の余地の残されているものがあることが考えられる。

実験の部

使用機器及び試薬

融点測定装置 :	Yanagimoto Micro Melting Point Apparatus(未補正)
旋光度測定装置 :	JASCO DIP-140 Digital Polarimeter (日本分光)
旋光分散計 :	JASCO J-20 Automatic Recording Spectra Polarimeter (日本分光)
円二色性測定装置 :	JASCO J-500 Spectrometer (日本分光) JASCO J-720WI Spectrometer (日本分光)
赤外吸収スペクトル測定装置 :	Hitachi 260-10 Spectrophotometer (日立製作所) JASCO FT/IR-230 Spectrometer (日本分光)
紫外吸収スペクトル測定装置 :	Hitachi U-3200 Spectrometer (日立製作所)
核磁気共鳴測定装置 :	JEOL JNM GSX-400 Spectrometer (日本電子) JEOL JNM GSX-500 Spectrometer (日本電子) JEOL JNM GSX-A400 Spectrometer (日本電子) JEOL JNM GSX-A500 Spectrometer (日本電子)

内部標準として tetramethylsilane (TMS)を用い、化学シフト値は δ [ppm] で示した。ピークの分裂形式は s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet, br.: broad 等で示した。二次元 NMR スペクトルにおいて、パルス磁場勾配型スペクトル (FG-HMQC, FG-HMBC, FG-COSY 等) は JNM GSX-A500 に接続された Pulse Field Gradient Control Unit (日本電子) を用いて測定した。

質量分析装置 :	Hitachi M-60 Spectrometer (日立製作所) JEOL JMX-HX 110A Spectrometer (日本電子)
----------	---

液体クロマトグラフィー装置 :

送液装置： SSC 3100 Flow System 3100, SSC 3110 Pressure
Control (センシユー科学)

UV 検出器： SSC Y-1000 UV detector (センシユー科学)
SSC 3000 UV detector (センシユー科学)
SSC 5200 UV detector (センシユー科学)

RI 検出器： ERC-7521 RI-detector (エルマ)
ERC-7522 RI-detector (エルマ)

HPLC システム： Waters 600E System Controller (Waters)
Waters 486 Tunable UV/VIS Detector (Waters)
Waters M741 Data Module (Waters)

動物実験における諸条件

使用動物：日本エスエルシー株式会社より購入した Std; ddY 系雄性マウス (4 週齢) を、室温 22~25°C、12 時間の明暗周期の環境下で 1 週間飼育し用いた。飼料にはオリエントアル固形飼料 MF マウス、ラット、ハムスター飼育用 (オリエントアル酵母株式会社) を与え、水道水を自由摂取させた。

使用薬物：生理食塩水 (大塚生食注; 大塚製薬株式会社)、塩酸メタンフェタミン (ヒロポン; 大日本製薬株式会社)、ペントバルビタールナトリウム (田辺製薬株式会社)、塩酸クロルプロマジン (Research Biochemicals International 社)、ジアゼパム (和光純薬工業株式会社)、ピクロトキシン (ナカライテスク社)、アミノピリン (和光純薬工業株式会社)

酢酸ライジング法¹⁵⁾：サンプル経口投与または皮下投与 40 分後に、0.7%-酢酸を体重 10g 当り 0.1mL 腹腔内投与し、その 5 分後から 15 分間の腹部のよじり運動回数を計測した。また、静脈内投与の場合は、サンプル投与 20 分後から上記と同様に行なった。陽性対照群にはアミノピリンを用い、経口及び皮下投与の場合は 50mg/kg、静脈内投与の場合は 5mg/kg を投与した。

圧刺激疼痛閾値測定法¹⁶⁾：Ugo Basile 社（イタリア）製の疼痛閾値測定装置（Basile Analgesy-Meter）を用いて実験を行い、マウス尾根部に圧力子を当て、等速加重し、マウスが疼痛により逃避行動を示した時点の重量を疼痛閾値として計測した。サンプル経口投与 30 分前及び直前に、2 回の測定を行い、その平均が 100~200 g の範囲内にあるマウスを実験に使用した。計測は、サンプル投与後 30 分置きに 4 時間まで行なった。陽性対照群には、アミノピリン（100mg/kg）を投与した。

ペントバルビタール麻酔持続時間に及ぼす効果：サンプル経口投与 40 分後にペントバルビタールナトリウム（50mg/kg）を腹腔内投与し、正向反射消失から発現までの時間を計測し、麻酔持続時間とした。陽性対照群には、塩酸クロルプロマジン（5mg/kg）を投与した。

メタンフェタミン誘発自発運動亢進に及ぼす効果：大原医科機械株式会社（日本）製の移所運動測定装置（Ambulometer AMB-10）を用いて実験を行い、10 分毎のマウス（ $n=10$ ）の移動回数を計測した。サンプル経口投与 20 分後に塩酸メタンフェタミン（2mg/kg）を皮下投与し、さらに 10 分毎に 130 分までの移所運動回数を計測し

た。陽性対照群には、塩酸クロルプロマジン (10mg/kg) を投与した。

飲水-罰事態実験装置を用いた抗不安活性：大原医科機械株式会社（日本）製の Vorgel 型コンフリクト事態測定装置 (5 個体同時実験用コントロール装置 VC-2050, 5 個体同時実験用実験架台 VC-5050, 実験箱 VC-3002, 給水ユニット VC-7010) を用いて実験を行い、2 日間絶水状態で飼育した 6 週齢 ddY 系雄性マウス ($n=8$) に、検体を生理食塩水に 3%-tween 80 を用い懸濁して皮下投与した後、20 分後から 40 分間の飲水回数を測定した。但し、0.05mL の飲水に対し、55 V の電気ショックを与えるよう設定した。陽性対照群には、ジアゼパム (1mg/kg) を投与した。

第 1 章第 1 節に関する実験

1.1 acteoside の単離及び構造決定

素材：衛生試験所（筑波）を通じ、ペルー-FIT の塩田哲夫氏より 1989 年 (Lot.1) 及び 1991 年 (Lot.2) に入手した CEDRON (*Lippia triphylla* (L'Her) O.Kuntze) の乾燥葉部及び枝部を用いた。

抽出：CEDRON (Lot.1, 746 g) をメタノール (5Lx3) で抽出し、茶緑色粘性のエキス (Ext.1, 100 g) を得た。また Lot.1 由来のエキスの分画精製に基づき、活性物質の大量確保を目的として Lot.2 (655 g) をメタノールで抽出し、茶緑色粘性のエキス (Ext.2, 50.4 g) を得た。

分画：マウスに対する酢酸ライジング抑制活性（抑制率を(%)に示した）を指標としてメタノールエキス（Ext.1）の分画を行なった。Ext.1(100g)を、水（3L）に懸濁し、順次 *n*-ヘキサン（1Lx3）、酢酸エチル（1Lx3）、*n*-ブタノール（1Lx3）で液-液分配を行ない、*n*-ヘキサン層（9.20g）、酢酸エチル層（19.1g）、水層（52.9g）を得た。唯一活性の見られた酢酸エチル層（66%*）を、メタノールを溶出溶媒としたセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーにて分画し、fr.1-A（610mg）、fr.1-B（1.43g）、fr.1-C（1.94g）、fr.1-D（1.02g）を得、活性は C（59%**）及び D（50%**）に見られた。TLC 上比較的主スポットのみが大量に含まれていると思われた fr.1-C を、メタノール-水を溶出溶媒として、ODS カラムクロマトグラフィーにて分画し、fr.2-A（1.42g）及び fr.2-B（518mg）を得、A のみに活性（46%**）が見られた。fr.2-A は、クロロホルム-メタノール-水（40:10:1）を溶出溶媒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し fr.3-A（700mg）、fr.3-B（515mg）、fr.3-C（6mg）を得、fr.3-A は単一物質であることが ODS 及びシリカゲル TLC 上で認められた。

acteoside (1): pale-yellow amorphous powder, *m.p.* 142-147°C, $[\alpha]_D^{25}$ -8.3° (*c*=1.0, methanol), FAB-MS *m/z*: 624[M]⁺, 647[M+Na]⁺. IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3400(br), 1690, 1630, 1610, 1520. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 220 (4.18), 233sh (3.92), 248sh (3.92), 292 (4.04), 333 (4.19). ¹H-NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.97 (3H, d, *J*=6.1; H-6^m), 2.66-2.76 (2H, m; H-7ⁿ), 3.12 (1H, d, *J*=6.1; H-6^m), 0.97 (3H, d, *J*=6.1; H-6^m), 0.97 (3H, d, *J*=6.1; H-6^m), 0.97 (3H, td-like, *J*=9.4, 3.4; H-4^m), 3.23 (1H, td-like, *J*=8.4, 5.4; H-2'), 3.31-3.36 (2H, m; H-3^m, H-6'), 3.36-3.40 (1H, m; H-5^m), 3.39-3.43 (1H, m; H-6'), 3.48 (1H, ddd, 9.8, 6.1, 2.2; H-5'), 3.62 (1H, td, *J*=9.1, 6.7; H-8ⁿ), ~3.70 (1H, overlapped with the other signal; H-2^m), 3.71 (1H, t-like, *J*=9.3; H-3'), 3.89 (1H, td, *J*=9.1, 6.8;

H-8"), 4.35 (1H, d, $J=7.8$; H-1'), ~4.35 (1H, overlapped with the other signal; OH-3"), 4.44 (1H, br.d, $J=3.7$; OH-4"), 4.48 (1H, d, $J=3.4$; OH-2"), 4.59 (1H, br.t, $J=5.6$; OH-6'), 4.72 (1H, t-like, $J=9.6$; H-4'), 5.05 (1H, br.s; H-1"), 5.41 (1H, br.d, $J=5.6$; OH-2'), 6.19 (1H, d, $J=15.9$; H-8), 6.50 (1H, dd, $J=8.0, 2.1$; H-6"), 6.64 (1H, d, $J=2.1$; H-2"), 6.64 (1H, d, $J=8.0$; H-5"), 6.77 (1H, d, $J=8.3$; H-5), 6.97 (1H, dd, $J=8.3, 2.0$; H-6), 7.02 (1H, d, $J=2.0$; H-2), 7.46 (1H, d, $J=15.9$; H-7), 8.55 (1H, br.s, OH-4"), 8.61 (1H, br.s, OH-3"), 9.07 (1H, br.s; OH-3), 9.43 (1H, dd, br.s; OH=4). $^{13}\text{C-NMR}$ (125.65MHz, DMSO- d_6) δ : 18.03 (C-6"), 34.93 (C-7"), 60.71 (C-6'), 68.60 (C-5"), 69.16 (C-4'), 70.12 (C-8"), 70.37 (C-3"), 70.46 (C-2"), 71.66 (C-4"), 74.46 (C-2', C-5'), 79.02 (C-3'), 101.09 (C-1"), 102.26 (C-1'), 113.60 (C-8), 114.67 (C-2), 115.41 (C-5"), 115.72 (C-5), 116.24 (C-2"), 119.45 (C-6"), 121.27 (C-6), 125.50 (C-1), 129.13 (C-1"), 143.45 (C-4"), 144.91 (C-3"), 145.39 (C-7), 145.47 (C-3), 148.34 (C-4), 165.58 (C-9).

Ext.2は *n*-ヘキサン-水で液-液分配し、*n*-ヘキサン層 (12.7g) 及び水層 (37.6g) を得た。acteoside の TLC スポットを指標に、本物質を含有する水層を以下のように分画した。水-メタノール (1:0→3:1→1:1→0.1) を溶出溶媒として、水層をダイアイオン HP-20 カラムクロマトグラフィーによって分画し、fr.4-A (3.1g)、fr.4-B (19.0g)、fr.4-C (14.0g) 及び fr.4-D (1.6g) を得た。fr.4-C は、クロロホルム-メタノール-水 (40:10:1 →40:20:1→acetone) を溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、fr.5-A (870mg)、fr.5-B (3.40g)、fr.5-C (3.69g) 及び fr.5-D (4.55g) を得た。fr.5-C はクロロホルム-メタノール-水 (40 : 10 : 1) を溶出溶媒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、fr.6-A (460mg) 及び fr.6-B (2.88g) を得、fr.6-B は acteoside 単一であることを TLC 上確認した (メタノール

エキスより 5.7%の収率)、¹H-NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) で acteoside と同定した。

第 1 章第 2 節に関する実験

1.2.1 acteoside の鎮痛活性

1) 酢酸ライジング抑制活性

経口投与

<i>p.o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	26.58±0.898 (100.0±3.38)
acteoside (100mg/kg)	23.80±0.406 (89.53±1.53)*
acteoside (300mg/kg)	20.17±0.406 (75.86±2.78)***
acteoside (500mg/kg)	16.08±1.37 (60.50±5.17)***
aminopyrine(50mg/kg)	17.70±0.539 (66.58±2.03)***

n=6, *: *p*<0.05, ***: *p*<0.001

静脈内投与

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	27.75±0.655 (100.0±2.36)
acteoside (2mg/kg)	21.50±0.563 (77.48±2.03)***
acteoside (10mg/kg)	16.25±1.28 (58.56±4.60)***
acteoside (50mg/kg)	10.67±0.667 (38.45±2.40)***
aminopyrine (5mg/kg)	19.67±0.980 (70.88±3.53)***

n=6, ***: *p*<0.001

皮下投与

s.c.	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.75±0.804 (100.0±2.80)
acteoside (300mg/kg)	17.00±3.20 (59.13±11.14)*

$n=6$, *: $p<0.05$

2) 圧刺激疼痛閾値上昇作用

Mean Value of Pressure Pain Threshold (g)

[min]	control	acteoside (100mg/kg)	acteoside (300mg/kg)	aminopyrine (100mg/kg)
-60	176.4±4.84	168.8±6.32	161.3±5.49	162.5±4.33
-30	162.5±6.05	170.0±5.82	161.3±6.32	160.0±3.27
0	160.0±6.55	170.6±6.58	163.8±6.46	166.3±2.27
30	154.4±8.84	203.8±8.00***	225.6±9.04***	228.6±8.07***
60	161.9±7.67	221.3±7.83***	267.5±17.6***	325.6±8.53***
120	168.1±3.77	183.8±6.80	215.6±15.1*	224.4±11.2**
180	160.6±3.46	160.6±3.20	190.0±8.02**	184.4±6.30**
240	158.8±4.09	155.0±4.01	168.1±10.9	163.8±3.98

$n=8$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

1.2.2 acteoside の中枢神経系への作用

1) ペントバルビタール誘導麻酔の持続時間延長作用

Duration Time of Pentobarbital-Induced Anesthesia

<i>p.o.</i>	Mean±S.E.[min] (%)
control	45.00±1.96 (100.0±4.36)
100mg/kg	53.75±2.40 (119.4±5.34)*
300mg/kg	60.63±2.69 (134.7±5.97)***
500mg/kg	77.63±6.20 (172.5±13.8)**
CPZ (5mg/kg)	111.6±6.85 (248.1±15.2)***

$n=8$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

pentobarbital sodium (50mg/kg, *i.p.*)

CPZ: chlorpromazine

2) メタンフェタミン誘発自発運動亢進に対する抑制作用

The Number of Locomotion (Mean±S.E.)

[min]	control	100mg/kg	300mg/kg	500mg/kg
10	52.50±8.66	35.56±6.21	16.56±2.50**	24.22±5.04*
20	87.80±12.7	70.00±9.92	45.30±10.7*	56.30±13.7
30	116.6±19.7	112.6±19.9	44.40±9.29**	72.00±15.8
40	98.30±27.2	117.5±18.3	61.00±15.9	72.00±19.3
50	81.10±17.6	92.50±15.3	63.80±11.7	74.50±18.8
60	76.70±15.4	91.40±14.9	60.60±11.0	79.70±21.2
70	71.80±22.1	66.30±10.2	60.60±10.8	66.20±15.6
80	41.70±9.48	44.60±14.2	34.30±9.57	34.30±7.37
90	33.90±8.29	20.56±6.28	26.22±10.2	16.00±3.99
100	27.60±7.06	16.44±6.33	24.80±8.85	9.111±3.68
110	9.000±4.98	11.44±3.69	25.60±11.4	16.50±4.17
120	18.60±7.29	2.222±1.31	11.33±5.62	13.50±6.20
130	13.11±6.09	1.889±1.05	5.667±3.34	12.30±4.31

n=10, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

第 1 章第 3 節に関する実験

1.3.1 acteoside のアグリコン部の酢酸ライジング抑制作用

acteoside の各アグリコン(カフェイン酸(2)及び 3,4-ジヒドロキシフェニルエタノール(3)) を経口投与 (100, 300, 500mg/kg) し、投与 40 分後に 0.7%-酢酸を体重 10 g 当り 0.1mL の用量で腹腔内投与して、その 5 分後から 15 分間のライジング回数を計測した。また、2 (144mg/kg) と 3 (124mg/kg) を混合 (それぞれ acteoside 500mg/kg に相当) し、同様に計測した。

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.25±1.58 (100.0±5.59)
CA (100mg/kg)	27.92±1.18 (98.80±4.17)
CA (300mg/kg)	25.92±1.43 (91.94±5.06)
CA (500mg/kg)	26.67±1.08 (94.40±3.81)
PA (100mg/kg)	29.58±0.569 (104.7±2.01)
PA (300mg/kg)	30.92±0.811 (109.4±2.87)
PA (500mg/kg)	28.25±1.30 (100.0±4.59)
CA + PA (144+124 mg/kg)	29.42±0.712 (104.1±2.52)

n=6, CA: caffeic acid, PA: 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol

1.3.2 acteoside 関連化合物の酢酸ライジング抑制活性

各関連化合物を経口投与（100、300、500mg/kg, *p.o.*）または静脈内投与（2、10、50mg/kg, *i.v.*）し、それぞれ投与 40 分後または 20 分後に、0.7%-酢酸を体重 10 g 当り 0.1mL の用量で腹腔内投与して、その 5 分後から 15 分間のライジング回数を計測した。

1) leucosceptoside A (4)

<i>p.o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	27.50±0.785 (100.0±2.86)
100mg/kg	23.58±0.507 (85.76±1.84)**
300mg/kg	22.25±1.36 (81.82±4.94)**
500mg/kg	18.83±0.813 (68.49±2.96)***

$n=6$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	27.08±0.597 (100.0±2.21)
2mg/kg	24.33±0.715 (89.85±2.64)*
10mg/kg	18.50±1.30 (68.31±4.79)***
50mg/kg	13.33±0.980 (49.23±3.62)***

$n=6$, *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$

2) **martynoside (5)**

<i>p.o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.17±1.24 (100.0±4.41)
100mg/kg	26.92±0.507 (95.56±1.80)
300mg/kg	24.60±1.04 (87.34±3.70)
500mg/kg	19.25±0.814 (68.34±2.89)***

n=6, ***: *p*<0.001

3) **jionoside D (6)**

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	26.67±0.494 (100.0±1.85)
2mg/kg	22.00±0.931 (82.50±3.49)**
10mg/kg	19.10±0.430 (71.63±1.61)***
50mg/kg	8.583±0.700 (32.19±2.63)***

n=6, **: *p*<0.01, ***: *p*<0.001

4) **plantamajoside (7)**

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	27.08±0.539 (100.0±1.99)
2mg/kg	20.67±0.703 (76.31±2.60)***
10mg/kg	16.42±0.898 (60.62±3.31)***
50mg/kg	14.10±0.367 (52.66±1.36)***

n=6, ***: *p*<0.001

5) desrhamnosylacteoside (8)

<i>p.o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.33±0.357 (100.0±1.26)
100mg/kg	26.42±0.676 (93.24±2.39)*
300mg/kg	20.67±3.39 (72.94±11.97)
500mg/kg	18.67±2.55 (65.88±9.02)*

n=6, *: $p < 0.05$

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.50±0.742 (100.0±2.60)
2mg/kg	26.25±0.882 (92.11±3.10)
10mg/kg	21.33±0.813 (74.85±2.85)***
50mg/kg	16.50±0.796 (57.54±2.79)***

n=6, ***: $p < 0.001$

6) forsythiaside (9)

<i>i.v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	26.92±0.300 (100.0±1.12)
2mg/kg	22.25±0.955 (82.66±3.55)***
10mg/kg	20.33±0.980 (75.54±3.64)***
50mg/kg	15.67±0.833 (58.21±3.10)***

n=6, ***: $p < 0.001$

7) jionoside C (1 0)

<i>i. v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.00±0.258 (100.0±0.922)
2mg/kg	26.00±0.885 (92.86±3.16)
10mg/kg	21.00±1.13 (75.00±4.05)**
50mg/kg	16.20±0.406 (57.86±1.45)***

n=6, **: *p*<0.01, ***: *p*<0.001

8) echinacoside (1 1)

<i>i. v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	27.08±0.768 (100.0±2.84)
2mg/kg	25.50±0.719 (94.15±2.65)
10mg/kg	24.30±0.604 (89.72±2.23)*
50mg/kg	20.00±0.387 (73.85±1.43)***

n=6, *: *p*<0.05, ***: *p*<0.001

9) purpureaside C (1 2)

<i>p. o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	24.83±1.15 (100.0±4.61)
100mg/kg	22.20±1.25 (89.40±5.04)
300mg/kg	20.83±1.90 (83.89±7.65)
500mg/kg	17.83±2.00 (71.81±8.05)*

n=6, *: *p*<0.05

<i>i. v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.25±0.281 (100.0±0.996)
2mg/kg	25.75±0.443 (91.15±1.57)***
10mg/kg	23.92±0.811 (84.66±2.87)***
50mg/kg	18.75±0.496 (66.37±1.76)***

n=6, ***: *p*<0.001

10) **cistanoside F** (1 3)

<i>i. v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	29.17±0.853 (100.0±2.92)
2mg/kg	27.42±0.779 (94.00±2.67)
10mg/kg	24.75±1.05 (84.86±3.59)**
50mg/kg	20.92±0.396 (71.71±1.36)***

n=6, **: *p*<0.01, ***: *p*<0.001

11) **decaffeoylacteoside** (1 4)

<i>p. o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	24.17±0.601 (100.0±2.49)
100mg/kg	25.00±1.17 (103.5±4.84)
300mg/kg	24.00±1.43 (99.31±5.93)
500mg/kg	22.00±0.742 (91.03±3.07)*

n=6, *: *p*<0.05

<i>i. v.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	27.33±0.641 (100.0±2.35)
2mg/kg	24.92±0.583 (91.16±2.13)*
10mg/kg	23.33±0.543 (85.37±1.99)***
50mg/kg	19.90±0.485 (72.81±1.77)***

$n=6$, *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$

12) isoacteoside (15)

<i>p. o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	28.58±0.746 (100.0±2.61)
100mg/kg	29.42±2.67 (102.9±9.33)
300mg/kg	23.40±0.367 (81.87±1.29)***
500mg/kg	23.83±2.14 (83.38±7.50)

$n=6$, ***: $p<0.001$

13) salidroside (16)

<i>p. o.</i>	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	26.25±1.20 (100.0±4.57)
100mg/kg	22.25±0.727 (84.76±2.78)*
300mg/kg	19.20±1.53 (73.14±5.83)**
500mg/kg	19.83±1.61 (75.54±6.13)**

$n=6$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

acteoside 関連化合物の酢酸ライジング抑制活性に関する効力比較

各化合物の効力を比較するために、以下の様な統計処理を用いて求められた回帰式 (用量 x と反応 y との関係式) より 30%-抑制用量 (ID_{30}) を算出した。

各用量での平均ライジング抑制率を計算し、表計算ソフト Microsoft Excel Version 5.0 (Microsoft 社) を用いて回帰式及びその相関係数 (R^2 値) を計算すると共に、その各 R^2 値について F 検定により有意性を確認した。

静脈投与時

Compounds	Regression Formula	R^2 value	F -test
acteoside (1)	$y=11.83 \cdot \ln x+21.30$	0.9793	$p<0.10$
leucosceptoside A (4)	$y=12.62 \cdot \ln x+1.813$	0.9988	$p<0.025$
jionoside D (6)	$y=1.028x+16.65$	0.9974	$p<0.05$
plantamajoside (7)	$y=7.534 \cdot \ln x+19.80$	0.9651	$p<0.25$
desrhamnosylacteoside(8)	$y=10.75 \cdot \ln x+0.4326$	1.000	$p<0.01$
forsythiaside (9)	$y=0.4848x+17.84$	0.9830	$p<0.10$
jionoside C (10)	$y=0.7128x+6.695$	0.9965	$p<0.05$
echinacoside (11)	$y=0.4145x+5.528$	0.9972	$p<0.05$
purpureaside C (12)	$y=0.4972x+8.997$	0.9902	$p<0.10$
cistanoside F (13)	$y=0.3596x+9.478$	0.9762	$p<0.10$
decaffeoyleacteoside (14)	$y=6.928 \cdot \ln x+0.5280$	0.9893	$p<0.10$

経口投与時

Compounds	Regression Formula	R^2 value	F-test
acteoside (1)	$y=19.20 \cdot \ln x+75.747$	0.9446	$p<0.25$
leucosceptoside A (4)	$y=0.0432x+8.3533$	0.9102	$p<0.25$
martynoside (5)	$y=0.0681x-4.1617$	0.9503	$p<0.25$
desrhamnosylacteoside(8)	$y=17.24 \cdot \ln x-72.281$	0.9958	$p<0.05$
purpureaside C (12)	$y=0.0440x+5.1075$	0.9556	$p<0.25$
decaffeoyleacteoside (14)	$y=0.0311x-7.2450$	0.9643	$p<0.25$
isoacteoside (15)	$y=13.25 \cdot \ln x-62.372$	0.8623	$p<0.25$
salidroside (16)	$y=6.527 \cdot \ln x-13.776$	0.7600	$p<0.5$

第 2 章第 1 節に関する実験

素材：ウチダ和漢薬より購入した大茴香乾燥果実（20kg）を用いた。（ツムラ株式会社寺林氏の鑑定によりシキミ等類縁植物果実の混入がないことを確認した。）

抽出：大茴香果実を電動粉砕機（Blender 7010, Waring 社）により粉砕し、*n*-ヘキサン（18L × 3）で脱脂を目的に攪拌抽出して、黒緑色液状、強いアネソール臭の *n*-ヘキサン画分（2340mL）を除去した。上記抽出残渣を、酢酸エチル（18L×3）で抽出し、茶褐色粘性固形状の酢酸エチルエキス（115.8g）を得た。

分画：マウスに対する痙攣誘発及び致死毒性活性を指標として酢酸エチルエキス(100g)の分画を行なった。酢酸エチルエキス(100g)を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ない、*n*-ヘキサン-酢酸エチル(10:1~1:1)を溶出溶媒として、fr.1-A(9.11g)、fr.1-B(20.7g)、fr.1-C(3.19g)、fr.1-D(2.56g)に分画した。活性画分 fr.1-B をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーによりメタノールを溶出溶媒として分画し、fr.2-A(823mg)、fr.2-B(16.2g)、fr.2-C(1.53g)、fr.2-D(902mg)を得た。活性画分 fr.2-B 及び fr.2-C を合わせ、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーによりクロロホルム-メタノール(1:0~5:1)を溶出溶媒として分画し、fr.3-A(991mg)、fr.3-B(12.4g)、fr.3-C(1.44g)、fr.3-D(1.12g)を得た。

活性画分 fr.3-A は ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーにより、水-メタノール(2:1~0:1)を溶出溶媒として、fr.4-A(45mg)、fr.4-B(41mg)、fr.4-C(112mg)、fr.4-D(98mg)、fr.4-E(142mg)に分画した。活性画分 fr.4-C を Aquasil 高速液体クロマトグラフィーで、クロロホルム-メタノール-水(100:5:0.1)を溶出溶媒として繰り返し分画、精製し、veranisatin A(1)(33mg)及び veranisatin B (2)(20mg)を得た。

一方、活性画分 fr.3-B はセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーによりメタノールを溶出溶媒として分画し、fr.6-A (10.2g)、fr.6-B (132mg)、fr.6-C (129mg)、fr.6-D (92mg)を得た。さらに fr.6-A (3.01g)をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーにて、メタノールを溶出溶媒として分画し、fr.7-A (1.92g)、fr.7-B (882mg)、fr.7-C (113mg)、fr.7-D (5mg)を得た。fr.7-A から白色針状晶が析出し、ベンゼンを再結晶溶媒として 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol (4) (1.44g) が得られた。fr.7-C は Aquasil 高速液体クロマトグラフィーで、クロロホルム-メタノール-水(100:5:0.1)を溶出溶媒として分画、精製し、veranisatin C (3) (2mg)を得た。

veranisatin A (1): colorless prisms from ethylacetate. *m.p.* :181-182°C. $[\alpha]_D^{22}$ -15° (c=1.0, methanol). HR-FAB-MS *m/z*: 365.1209 [(M+Na)⁺; err. -0.3mmu for C₁₆H₂₂O₈Na]. IR $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3380 (br), 1830, 1750. ¹H-NMR (500MHz, Acetone-*d*₆) δ : 1.10 (3H, d, *J*=7.0), 1.59 (1H, dddd, *J*=12.4, 11.7, 8.2, 2.5), 1.67 (1H, ddd, *J*=12.4, 9.3, 2.5), 2.07 (1H, dd, *J*=14.7, 3.9), 2.07-2.14 (1H, m), 2.43 (1H, dd, *J*=14.7, 2.2), 2.43-2.51 (2H, m), 3.41 (3H, s), 3.53 (1H, d, *J*=11.0), 4.03 (1H, d, *J*=6.1), 4.05 (1H, dd, *J*=11.0, 1.5), 4.26 (1H, dd, *J*=3.9, 2.2), 4.30 (1H, d, *J*=3.4), 4.30 (1H, d, *J*=6.1), 5.07 (OH, d, *J*=3.4), 5.52 (OH, s), 6.05 (OH, d, *J*=1.5). ¹³C-NMR (125MHz, Acetone-*d*₆) δ : 14.22, 27.80, 31.56, 32.88, 39.50, 51.97, 60.54, 64.29, 65.15, 71.01, 76.36, 78.86, 79.49, 86.10, 169.04, 174.84. CD (c=0.20 mg/mL, methanol) $[\theta]^{17}$ (nm): -1950 (236)(negative maximum).

veranisatin B (2): colorless prisms from ethylacetate. *m.p.* :212-213°C. $[\alpha]_D^{22}$ -15° (c=1.0, methanol). HR-FAB-MS *m/z*: 379.1003 [(M+Na)⁺; err. -0.2mmu for C₁₆H₂₀O₉Na]. IR $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3480 (br), 1825, 1760, 1740. ¹H-NMR (500MHz, Acetone-*d*₆) δ : 1.12 (3H, d, *J*=7.1), 1.65 (1H, dddd, *J*=12.1, 11.7, 8.6, 2.6), 1.75 (1H, ddd, *J*=13.0, 9.0, 2.6), 2.12-2.18 (1H, m), 2.18 (1H, dd, *J*=14.9, 3.9), 2.47 (1H, dd, *J*=14.9, 2.2), 2.46-2.50 (1H, m), 2.54 (1H, ddd, *J*=13.0, 9.0, 6.4), 3.82 (3H, s), 4.08 (1H, d, *J*=5.9), 4.36 (1H, d, *J*=3.7), 4.36 (1H, d, *J*=5.9), 4.88 (1H, dd, *J*=3.9, 2.2), 5.25 (OH, d, *J*=3.7), 5.82 (OH, s), 6.85 (OH, br.s). ¹³C-NMR (125MHz, Acetone-*d*₆) δ : 14.11, 27.51, 31.19, 32.87, 39.36, 51.48, 53.59, 63.87, 65.85, 71.06, 79.00, 80.67, 87.05, 168.66, 170.06, 174.50. CD (c=0.20 mg/mL, methanol) $[\theta]^{17}$ (nm): -2370 (237)(negative maximum).

veranisatin C (3): colorless needles from ethanol. *m.p.*: 228-229.5°C. HR-FAB-MS *m/z*: 373.1140 [(M+H)⁺; err. -0.5mmu for C₁₆H₂₁O₁₀]. IR $\gamma_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3450 (br), 1760, 1743. ¹H-NMR (500MHz, Acetone-*d*₆) δ : 1.06 (3H, d, *J*=7.1), 1.81 (1H, ddd, *J*=12.9, 10.7, 4.4), 2.07-2.11 (1H, m), 2.24 (1H, dd, *J*=14.9, 3.9), 2.49 (1H, dd, *J*=14.9, 2.0), 2.55-2.60 (1H, m), 2.49 (1H, dd, *J*=14.9, 2.0), 3.81 (3H, s), 4.09 (1H, d, *J*=6.0), 4.35 (1H, d, *J*=3.7), 4.41 (1H, d, *J*=6.0), 4.89 (1H, dd, *J*=3.9, 2.0), 5.09 (OH, d, *J*=5.2), 5.39 (OH, d, 3.7), 5.41 (OH, s), 6.59 (OH, s). ¹³C-NMR (125MHz, Acetone-*d*₆) δ : 13.41, 26.69, 37.73, 42.00, 50.91, 53.08, 61.97, 64.78, 70.39, 71.06, 78.44, 80.10, 86.12, 167.52, 169.45, 173.65. CD (c=0.50 mg/mL, methanol) $[\theta]^{23}$ (nm): -3730 (235)(negative maximum).

第2章第2節に関する実験

2.2.1 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol (4) の単離およびそのジアステレオアイソマー4Aおよび4Bへの分離

活性画分 fr.6-A の分画で得た fr.7-A からは白色針状晶が析出し、ベンゼンを再結晶溶媒として 1-(4-methoxyphenyl)-1,2-propanediol (4) (1.44g)を得、さらに 4 (110mg)を、メタノール/水 (2/3) を溶出溶媒として、直列に連結した Pre-packed column ODS MPLC(22φx100mm, 3.0ml/min) により分画し、4A (38mg, 保持時間 32min) および 4B (42mg, 57min) に分離した。

1-(4-methoxyphenyl)-1RS,2SR-propanediol (4A): colorless plates from

benzene. *m.p.* 118~119°C. IR $\gamma_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3250 (br), 1620, 1250. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}} \text{ nm (log } \epsilon)$: 224 (4.07), 274 (3.19), 280 (3.12). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 1.03 (3H, d, $J=6.3$), 3.49 (1H, d, $J=6.0$), 3.77 (3H, s), 3.82~3.86 (1H, m), 4.09 (1H, d, $J=3.9$), 4.51 (1H, dd, $J=4.7, 3.9$), 6.86 (2H, AA'XX'), 7.29 (2H, AA'XX'). δ 3.49 and 4.09 were disappeared with D_2O addition. $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8MHz, CDCl_3) δ : 18.1, 55.4, 72.1, 77.9, 114.0, 128.8, 135.6, 159.7.

1-(4-methoxyphenyl)-1RS,2RS-propanediol (4B): colorless prisms from benzene. *m.p.* 67.5~68.0°C. IR $\gamma_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3250 (br), 1620, 1250. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}} \text{ nm (log } \epsilon)$: 224 (4.07), 274 (3.19), 280 (3.12). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 0.93 (3H, d, $J=6.3$), 3.69~3.72 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.81 (1H, d, $J=3.8$), 4.27 (1H, d, $J=5.1$), 4.27 (1H, dd, $J=7.3, 5.1$), 6.88 (2H, AA'XX'), 7.28 (2H, AA'XX'). δ 3.81 and 4.27 were disappeared with D_2O addition. $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8MHz, CDCl_3) δ : 18.1, 55.4, 72.1, 77.9, 114.0, 128.7, 135.6, 159.7.

2.2.2 1-(4-methoxyphenyl)-1RS,2RS-propanediol (4C) の合成

市販 anethole (1.14g) を、ヘキサン-ベンゼンを溶出溶媒とする、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、trans-anethole (561mg) を得、四酸化オスミウム (230mg) を trans-anethole (103mg) のピリジン溶液 (3.5ml) に加え、室温下 85 分間攪拌した。反応液に硫酸ナトリウム (310mg) のピリジン-水 (2:3) 溶液 (8.7ml) を加え 60 分間攪拌した。反応液は酢酸エチルにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムにより乾燥した後、溶媒を減圧留去して油状物質を得、油状物質をベンゼンにて再結晶し、1-(4-methoxyphenyl)-

1RS,2RS-propanediol (4C; 61mg) を得た。

1-(4-methoxyphenyl)-1RS,2RS-propanediol (4C): colorless prisms from benzene. *m.p.* 66.5~67.0°C. IR $\gamma_{\max}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$: 3250 (br), 1610, 1250. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}} \text{ nm} (\log \epsilon)$: 224 (4.07), 274 (3.19), 280 (3.12). $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ : 0.93 (3H, d, $J=6.2$), 3.68~3.72 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.81 (1H, d, $J=3.8$), 4.27 (1H, d, $J=5.1$), 4.27 (1H, dd, $J=7.3, 5.1$), 6.88 (2H, AA'XX'), 7.28 (2H, AA'XX'). δ 3.81 and 4.27 were disappeared with D_2O addition. $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8MHz, CDCl_3) δ : 19.2, 55.4, 72.7, 79.4, 114.1, 129.0, 135.5, 160.0.

第2章第3節に関する実験（動物実験）

2.3.1 大茴香メタノールエキスの活性

1) 大茴香メタノールエキスのマウス正常体温に及ぼす効果

検体 (3.0g/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、経口投与した。体温は直腸体温計を用いて1時間毎に6時間まで測定した。

Rectal Temperature (Mean±S.E. [°C])

hr	control	MeOH ext. (3.0g/kg)
0	37.3±0.102	37.4±0.136
1	37.2±0.050	35.9±0.321*
2	37.4±0.037	32.8±0.511***
3	37.4±0.049	31.9±0.576***
4	37.5±0.051	33.0±0.370***
5	37.6±0.037	35.1±0.380**
6	37.7±0.075	35.9±0.250**

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

2) 大茴香メタノールエキスの酢酸ライジングに及ぼす効果

検体 (500mg/kg, 1g/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、経口投与した。

	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	25.92±0.490 (100.0±1.89)
MeOH ext. (500mg/kg)	20.00±0.645*** (77.16±2.49)
MeOH ext. (1g/kg)	16.08±0.651*** (62.04±2.51)
aminopyrine (50mg/kg)	14.33±0.910*** (55.29±3.51)

$n=5$, ***: $p < 0.001$

2.3.2 大茴香酢酸エチルエキスの活性

1) 酢酸エチル抽出エキスにおけるマウス正常体温に及ぼす効果、痙攣誘発及び致死毒性作用

検体 (500mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、マウス ($n=4$) に経口投与して、30分毎に直腸体温を計測した。また痙攣発現時間及び症状、並びに死亡時間を計測した。(投与1時間以内に全匹死亡したため1時間で終了した)。

2) 酢酸エチル抽出エキスのクロマト分画における痙攣誘発及び致死毒性作用

検体 fr.1-A~-D 及び fr.2-A~-D (各 500mg/kg)、fr.3-A~-D (各 300mg/kg)、及び fr.4-A~-E (各 50mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁して、マウス ($n=1$) に経口投与し、痙攣誘発作用及び致死毒性の有無を観察した。

2.3.3 veranisatin 類の薬理活性

1) veranisatin A、B 及び C の痙攣誘発作用及び致死毒性

検体 (各 3.0mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁して、マウス ($n=3\sim 4$) に経口投与し、痙攣誘発作用及び致死毒性の有無を観察した。

2) veranisatin A、B 及び C の正常体温下降作用

検体（各 0.5, 1.0mg/kg）はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、マウス（ $n=3\sim 4$ ）に経口投与して、30分毎に4時間まで直腸体温を計測した。

Rectal Temperature (Mean±S.E. [°C])

[hr]	control	veranisatin A		veranisatin B	
		0.5mg/kg	1.0mg/kg	0.5mg/kg	1.0mg/kg
0	37.3±0.060	37.9±0.12	37.6±0.15	37.7±0.088	37.7±0.13
0.5	37.6±0.090	37.5±0.059	36.5±0.44	37.0±0.22	34.6±0.26**
1.0	37.6±0.058	37.3±0.088	35.3±0.48**	36.9±0.27	34.3±0.032*
2.0	37.5±0.034	37.5±0.089	36.3±0.66**	37.1±0.058	35.6±0.15
3.0	37.5±0.12	37.3±0.058	37.0±0.24	37.3±0.13	36.7±0.33
4.0	37.3±0.088	37.4±0.058	37.3±0.057	37.4±0.088	37.4±0.088

$n=3$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

Rectal Temperature (Mean±S.E. [°C])

[hr]	control	veranisatin C	
		0.5mg/kg	1.0mg/kg
0	38.1±0.15	37.8±0.13	37.8±0.13
0.5	38.2±0.13	36.9±0.23**	35.5±0.21***
1.0	37.9±0.11	35.7±0.17***	34.2±0.085***
2.0	37.8±0.085	36.4±0.18**	34.8±0.21***
3.0	37.7±0.091	37.2±0.14*	36.0±0.33*
4.0	37.7±0.064	37.6±0.085	37.4±0.20

$n=4$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

3) veranisatin A の酢酸ライジングに及ぼす効果

検体 (0.1、0.5 mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し経口投与した。陽性対照群にはアミノピリン (50 mg/kg) を用いた。

	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	26.25±0.680 (100.0±2.59)
veranisatin A (0.1mg/kg)	20.25±0.814 (77.14±3.10)***
veranisatin A (0.5mg/kg)	7.917±1.10 (31.35±4.19)***
aminopyrine (50mg/kg)	15.17±1.30 (57.78±4.96)***

$n=6$, ***: $p<0.001$

4) veranisatin A の圧刺激疼痛閾値に及ぼす効果

Mean Value of Pressure Pain Threshold (g)

[min]	control	veranisatin A (0.1mg/kg)	veranisatin A (0.3mg/kg)	aminopyrine (50mg/kg)
-60	167.5±6.94	163.8±5.24	182.9±5.22	176.9±6.54
-30	155.0±5.00	166.9±7.00	164.4±4.27	169.3±6.21
0	152.5±2.99	162.5±5.18	156.9±4.11	160.7±3.85
30	149.4±4.48	173.8±5.65**	197.5±7.79***	227.5±5.67***
60	151.9±5.59	203.8±6.73***	217.5±8.29***	238.6±3.40***
90	153.1±5.26	171.9±4.11*	191.9±6.68***	205.6±7.22***
120	150.6±4.17	160.0±5.09	168.1±5.90*	174.4±4.77**
150	150.6±2.90	145.6±3.20	148.1±5.90	149.4±3.33
180	149.4±3.05	145.0±2.31	145.6±3.95	143.6±2.10
210	150.0±2.31	138.8±3.24	145.0±3.90	152.5±4.12
240	146.9±3.77	143.8±3.63	149.4±2.74	150.6±1.75

$n=8$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

5) veranisatin A のメタンフェタミン誘発自発運動亢進に及ぼす効果

検体 (0.1、0.3 mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、経口投与した。陽性対照群にはクロルプロマジン (10 mg/kg) を用いた。

Mean Number of Locomotion (Mean±S.E.)

	control	0.1mg/kg	0.3mg/kg	CPZ 10mg/kg
-30	79.43±13.4	72.00±12.53	52.29±11.0	64.50±4.10
-20	18.33±4.57	21.17±4.45	20.14±5.20	23.29±2.88
-10	6.667±1.02	16.86±7.61	12.50±1.48	12.14±3.57
0	8.571±3.91	8.429±3.09	6.167±3.47	12.71±4.81
10	2.667±1.26	4.857±1.67	3.429±0.719	3.500±1.34
20	3.667±1.36	2.667±0.615	1.286±0.286	1.833±0.601
30	52.71±13.2	22.00±6.87	5.857±1.26*	2.857±1.20**
40	136.3±29.3	66.14±20.9	8.143±2.36**	2.142±0.937**
50	218.3±53.6	157.4±45.1	23.43±7.16*	2.286±0.944**
60	234.6±36.7	200.9±32.1	34.00±12.3**	2.286±1.04***
70	188.5±15.4	175.1±26.7	35.43±12.9***	2.500±0.619***
80	187.0±20.5	120.8±13.9	25.29±11.2***	1.714±0.837***
90	131.3±15.9	123.9±20.8	24.14±8.66***	2.833±1.35***
100	132.3±23.0	92.57±10.2	13.57±5.52**	5.167±2.17**
110	135.4±20.8	90.43±15.4	14.57±7.36***	2.667±0.989***
120	98.00±17.4	89.43±11.9	17.14±5.79**	7.667±1.93**
130	93.86±20.9	76.71±15.3	15.43±4.28*	7.000±2.16**
140	66.71±12.4	68.17±5.85	24.50±0.992*	7.857±3.19**
150	34.29±11.3	36.43±13.2	15.86±7.15	15.43±5.74

n=10, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

2.3.4 anisatin の薬理活性

1) anisatin の痙攣誘発作用及び致死毒性

検体 (1.0 mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、マウス ($n=3$) に経口投与し、痙攣誘発作用及び致死毒性の有無を観察した。

2) anisatin のマウス正常体温に及ぼす効果

検体 (0.5 mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、マウス ($n=4$) に経口投与し、30分毎に4時間まで直腸体温を計測した。

Rectal Temperature ($^{\circ}\text{C}$)

[hr]	control	anisatin (0.5mg/kg)
0	37.2 \pm 0.12	37.4 \pm 0.15
0.5	37.5 \pm 0.088	34.4 \pm 0.27**
1.0	37.3 \pm 0.031	34.4 \pm 0.19**
2.0	37.3 \pm 0.057	35.3 \pm 0.38*
3.0	37.4 \pm 0.060	36.5 \pm 0.27
4.0	37.3 \pm 0.033	37.3 \pm 0.058

$n=3$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

3) anisatin の酢酸ライジングに及ぼす効果

検体 (0.1mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し経口投与した。陽性対照群にはアミノピリン (50 mg/kg) を用いた。

	Mean Number of Squirms±S.E. (%)
control	26.33±0.440 (100.0±1.67)
anisatin (0.1mg/kg)	15.17±1.60 (57.60±6.08)**
aminopyrine (50mg/kg)	15.00±0.548 (57.00±2.08)***

$n=6$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

4) anisatin の圧刺激疼痛閾値に及ぼす効果

検体 (0.03、0.1、0.3 mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し経口投与した。陽性対照群にはアミノピリン (50 mg/kg) を用いた。

Mean Value of Pressure Pain Threshold (g)

[min]	control	anisatin (0.03mg/kg)	anisatin (0.1mg/kg)	aminopyrine (50mg/kg)
-60	180.6±5.30	182.5±11.4	176.9±8.29	173.8±8.85
-30	176.3±4.41	163.8±8.44	170.6±3.95	161.3±8.44
0	166.3±8.00	149.3±11.8	155.0±9.21	153.1±8.61
30	163.8±3.50	168.6±10.0	190.0±12.6	193.8±10.5*
60	163.8±3.50	192.1±7.78**	231.3±14.0**	226.3±10.8***
90	169.4±6.64	161.4±6.79**	200.0±5.59	185.6±13.1
120	157.5±5.82	147.1±3.76	170.0±4.50	161.9±9.30
180	160.0±6.20	155.0±5.23	155.6±3.71	160.6±7.16
240	164.4±5.21	157.1±5.76	160.0±5.09	161.3±6.39

n=8, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

5) anisatin のメタンフェタミン誘発自発運動亢進に及ぼす効果

検体 (0.03、0.1mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し、経口投与した。陽性対照群にはクロルプロマジン (10 mg/kg) を用いた。

Mean Number of Locomotion (Mean±S.E.)

[min]	control	0.03mg/kg	0.1mg/kg	CPZ 10mg/kg
-30	56.20±6.63	71.90±5.47	62.20±13.1	81.40±7.75
-20	6.000±1.81	6.600±1.41	9.700±3.76	9.333±3.11
-10	1.900±0.900	0.5556±0.377	1.400±0.859	1.444±0.835
0	0	0	0	0
10	4.221±1.20	8.400±2.05	5.222±1.16	8.500±1.75
20	4.400±1.83	9.600±2.37	2.800±0.712	2.900±0.888
30	30.80±7.84	14.22±4.06	6.400±1.97*	6.900±2.18*
40	91.70±13.9	43.50±12.4*	15.60±3.48***	5.700±1.84***
50	136.3±11.6	40.33±11.9***	21.70±5.59***	1.444±0.5800***
60	168.6±18.7	85.90±30.1*	24.78±6.76***	1.000±0.471***
70	165.4±21.6	89.00±31.4	36.40±10.1***	0.5556±0.444***
80	131.3±15.8	70.40±26.9	45.30±11.0***	0.7778±0.572***
90	142.8±16.3	54.10±22.3**	45.10±9.53***	0.3333±0.333***
100	105.4±15.6	11.89±4.86***	33.00±7.50***	1.000±0.578***
110	86.80±16.0	10.00±2.67**	20.78±3.80**	2.900±1.05***
120	52.80±15.1	19.90±6.76	22.40±7.99	2.900±0.882**
130	39.90±12.1	14.90±4.24	10.20±3.47*	3.333±2.35*

n=10, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

6) anisatin のペントバルビタール麻酔に及ぼす効果

検体 (0.03、0.1 mg/kg) はアラビアゴム末を用いて水に懸濁し経口投与した。陽性対照群にはクロルプロマジン (5 mg/kg) を用いた。

Duration Time of Pentobarbital-Induced Anesthesia

<i>p.o.</i>	Mean±S.E.[min] (%)
control	47.88±4.48 (100.0±9.35)
0.03mg/kg	54.63±5.43 (114.1±11.3)
0.1mg/kg	45.43±4.13 (94.89±8.62)
chlorpromazine (5mg/kg)	113.4±5.45 (236.9±11.4)***

$n=8$, ***: $p<0.001$

pentobarbital sodium (50mg/kg, *i.p.*)

7) anisatin の飲水- 罰事態型コンフリクトに及ぼす効果

2日間絶水状態で飼育したマウス (6週齢) に、検体 (0.03、0.1 mg/kg) をアラビアゴム末を用いて水に懸濁して皮下投与し、その20分後から40分間の飲水回数を計測した。但し、0.05mLの飲水行動に対し55Vの電気ショックを与えた。陽性対照群にはジアゼパム (1 mg/kg) を用いた。

Mean Number of Drinking

<i>p.o.</i>	Mean±S.E.[min] (%)
control	7.125±1.13 (100.0±15.8)
0.03mg/kg	3.125±0.441 (43.86±6.18)**
0.1mg/kg	0±0 (0)***
diazepam (1mg/kg)	30.86±3.70 (433.3±51.9)***

n=8, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

謝 辭

本研究の遂行並びに本学位論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました、千葉大学薬学部 山崎幹夫教授に心より御礼いたします。

本研究に際し、常に有益な御助言賜りました、千葉大学薬学部 藤本治宏助教授、直接の御指導賜りました、千葉大学薬学部 奥山恵美助手に心より感謝申し上げます。

生薬鑑定をして頂きました、株式会社ツムラ 寺林 進 博士、CEDRON の同定に際し御助言いただきました、国立衛生試験所生薬部長 佐竹元吉氏に感謝いたします。

化合物の同定に際し、acteoside 標品を御供与頂きました、広島大学医学部 神田博史助教授、anisatin 及び neoanisatin 標品を御供与頂きました、名古屋大学理学部 山田澁之教授に感謝いたします。 シキミ果実の収集に際し御助言いただきました、千葉大学薬学部 池上文雄助教授、薬理実験での統計処理に際し御助言頂きました、千葉大学薬学部 上野光一助教授に御礼申し上げます。

薬理実験に際し、大量の acteoside 関連化合物を御供与頂きました、北海道医療大学薬学部 西部三省教授、株式会社ツムラ 研究所長 丸野政雄博士、養命酒製造株式会社中央研究所 出山 武博士に心より感謝申し上げます。

各種スペクトルデータを測定していただきました、千葉大学分析センター 関 宏子博士、倉持忠雄氏、原 律子氏に御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり御協力いただきました、岩瀬信久氏（89年修了）、高 麗宏博士（93年博了）、松田真弓氏（91年修了）、西村悟嗣博士（95年博了）、沈 浮氏（95年修了）、渡部ゆき子氏（90年卒業）、深井千賀氏（91年卒業）、塚田 篤氏（91年卒業）、田川誠子氏（96年卒業）、岡島理恵氏（97年卒業）、森藤絵里子氏（97年卒業）並びに千葉大学薬学部活性構造化学研究室の皆様感謝いたします。

最後に、本研究遂行の為に貴重な生命を提供頂きました数多くの実験動物達に心から御礼申し上げますと共に、その御霊前に本論文を捧げます。

参考文献

序論

1 a) Michael A Huffman and Mohamedi Seifu : Observations on the Illness and Consumption of a Possibly Medicinal Plant *Vernonia amygdalina* (DEL.), by a Wild Chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*, 30(1), 51-63, (1989) b) 大東 肇、地坂光生、高垣輝嘉、小清水弘一、ハフマン マイケル A.、西田利貞、高崎浩幸、梶 幹夫 : 野生チンパンジーの薬用植物と生理活性成分。アフリカ研究 39, 15-27, (1991) c) ハフマン マイケル A. : 野生チンパンジー薬草利用研究: 既知と展望. 霊長類研究, 9, 179-187, (1993) d) Hajime Ohigashi, Michael A. Huffman, Daisuke Izutsu, Koichi Koshimizu, Masanori Kawanaka, Hiromu Sugiyama, Geoffrey C. Kirby, David C. Warhurst, David Allen, Colin W. Wright, J. David Phillipson, Pierre Timon-David, Florence Delmas, Riad Elias and Guy Balansard : Toward the Chemical Ecology of Medicinal Plant Use in Chimpanzees: The Case of *Vernonia amygdalina*, a Plant Used by Wild Chimpanzees Possibly for Parasite-Related Diseases. *Journal of Chemical Ecology*, 20 (3), 541-553, (1994).

2 a) 山崎幹夫 : 医薬品開発と天然物化学. 三橋 博ら編. 天然物化学第4版, 5-12, 1992. b) 齋藤 洋 : ルネッサンスを迎えた伝統医薬品. ファルマシア, 32 (6), 623, (1994)

第1章

3) Emi Okuyama, Yoshiko Okamoto, Mikio Yamazaki, Motoyoshi Satake : Pharmacologically Active Components of a Peruvian Medicinal Plant, Huanarpo (*Jatropha cillata*), *Chem. Pharm. Bull.*, 44 (2), 333-336, (1996)

- 4) Emi Okuyama, Kazuhiro Umeyama, Yukie Saito, Mikio Yamazaki, Motoyoshi Satake : Ascaridole as a Pharmacologically Active Principle of “Paico”, a Medicinal Peruvian Plant, *Chem. Pharm. Bull.*, **41** (7), 1309- 1311, (1993)
- 5) Emi Okuyama, Kazuhiro Umeyama, Shigeru Ohmori, Mikio Yamazaki, Motoyoshi Satake : Pharmacologically Active Components from a Peruvian Medicinal Plant, Huiru-Huiru (*Culcitium canescens* H. & B.), *Chem. Pharm. Bull.*, **42** (10), 2183- 2186, (1994)
- 6) 大塚真弓 : 修士論文 (千葉大学大学院薬学研究科 1991 年修了) ペルー及びボルネオ民間薬における中枢抑制成分の探索 (一部改訂)
- 7 a) Jiménez P. A., “El Libro Verde : Guia de Recursos Terapeuticos Vegetales 1” p.35, ed. by Gustavo Dongo Aguirre, published by Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Medicina Traditional, Lima, Peru, 1992; Velásquez N.A.C., “La Materia Medica en el Incanato”. Editorial Mejía Baca, Lima, Peru, 1977. b) Cheiej R. : “The Macdonald Encyclopedia of Medicinal Plants”, Macdonald & Co., Ltd., UK, 1980. c) Tetsuo Shiota : Fundacion F.I.T.- list of 100 undeveloped useful plants in Peru.
- 8) J. L. Lamaison, C. Petitjean-Freytet, A. Carnat : Le Verbascoside, Composé Phénolique Majeur des Feuilles de Frêne (*Fraxinus excelsior*) et de Verbeine (*Aloysia triphylla*), *Plantes médicinales et phytothérapie*, **26** (3), 225- 233, 1993 (筆者等は、acteoside の本植物からの単離に関する報告を行なっているが、その同定法は TLC 及び HPLC だけで行なっている。)

- 9) 三橋 博 編：原色牧野和漢藥草大圖鑑, p.74-75 北隆館 (1988)
- 10) 塚田 篤：卒業論文 (千葉大学薬学部 1991 年卒業) 二、三のインドネシア生薬、ペルー生薬における生理活性成分の探索 (上記卒業論文に基づき本学位論文著者による追試データを掲載)
- 11) Hiromi Kobayashi, Hiroko Oguchi, Nobuo Takizawa, Toshio Miyase, Akira Ueno, Khan Usmanghani, Mansoor Ahmad : New Phenylethanoid Glycosides from *Cistache tubulosa* (Schrenk) Hook. f. I. *Chem. Pharm. Bull.*, **35** (8), 3309-3314, (1987)
- 12) C. Andary, G. Privat, P. Chevallet, H. Orzalesi, J. J. Serrano, M. Boucard : Etude Chimique et Pharmacodynamique D'Esters Heterosidiques de L'Acide Caffeique, Isoles D'*Orobanche Rapum-Genistae*. *IL Farmaco-Ed. Sc.*, **35**, 1-30, 1980
- 13) Sansei Nishibe, Kazuo Okabe, Hiroki Tsukamoto, Akiyo Sakushima, Sueo Hisada : The Structure of Forsythiaside isolated from *Forsythia suspensa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **30** (3), 1048- 1050, (1982)
- 14) Hiroshi Sasaki, Hiroaki Nishimura, Masao Chin, Hiroshi Mitsuhashi : Hydroxycinnamic Acid Esters of Phenethylalcohol Glycosides from *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*. *Phytochemistry*, **28** (3), 875-879 (1989)
- 15) B. A. Whittle : *J. Pharmacol. Chemother.*, **22**, 246- 253 (1964)

- 16) Emi Okuyama, Kazuhiro Umeyama, Mikio Yamazaki, Yasuhiro Kinoshita, Yoshikazu Yamamoto : Usnic Acid and Diffractaic Acid as Analgesic and Antipyretic Components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.*, **61**, 101-198 (1995)
- 17) 佐藤 周、小島 暁、小林久美子、小林弘美：肉従蓉の薬理学的研究（第1報）慢性ストレス負荷マウスの性行動及び学習行動に対する肉従蓉成分の影響 その1. *薬学雑誌*, **105**(12), 1131-1141 (1985)
- 18) Yoshiyuki Kimura, Hiromichi Okuda, Sansei Nishibe, Shigeru Arichi : Effects of Caffeoylglycosides on Arachidonate Metabolism in Leukocytes. *Planta Med.*, **1987**, 148-153
- 19) Hiroshi Kohda, Seiji Tanaka, Yasutoshi Yamaoka, Shoji Yahara, Toshihiro Nohara, Tsuyoshi Tanimoto, Akira Tanaka : Studies on Lens-Aldose-Reductase Inhibitor in Medicinal Plants. II. Active Constituents of *Monochasma savatierii* FRANCH. et MAXIM. *Chem. Pharm. Bull.*, **37** (11), 3153-3154, (1989)
- 20) 武田美男、藤多哲朗、佐藤利夫、掛川寿夫：チヨロギ *Stachys sieboldi* Miq.の配糖体成分とそのヒアルロニダーゼ活性に及ぼす影響. *薬学雑誌*, **105**(10), 955-959 (1985)
- 21 a) 田中千賀子, 加藤隆一 編：NEW 薬理学 第2版, 南江堂 1993, p.453 図VIII-1 炎症のケミカルメディエーターの精製、遊離および作用. b) 横田敏勝 脳と痛み, 共立出版(1993), p.101 図3-5 発痛の分子機構. c) 釘宮豊城、高橋成輔、土肥修司 編：図説最新麻酔科学シリーズ4 痛みの臨床 メジカルビュー社 (1996)

第 2 章

- 22 a) 日本公定書協会 監修：第 13 改正日本薬局方解説書 生薬総則 ウイキョウ、ウイキョウ末及びウイキョウ油の項. 廣川書店 (1996) b) 鈴木 洋：漢方のくすりの事典 - 生薬・ハーブ・民間薬-. 医歯薬出版 (1994)
- 23) 曾 床佩：莽草子中毒 55 例的臨床分析及防治方法的探討. 中葯通報 6 (3), 33-35 (1981) 注) 莽草子 (もうそうし) : シキミ果実のこと
- 24) J. F. Lane, W. T. Koch, N. S. Leeds and G. Gorin : On the Toxin of *Illicium Anisatum*. I. The Isolation and Characterization of a Convulsant Principle: Anisatin. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3211- 3215 (1952)
- 25 a) Kiyoyuki Yamada, Susumu Takada, Shiro Nakamura and Yoshimasa Hirata, The Structure of Noranisatin, an Oxidation Product of Anisatin. *Tetrahedron Lett.*, No.52, 4785- 4794 (1965) b) N. Sakabe, Y. Hirata, A. Furusaki, Y. Tomiie, I. Nitta, X-Ray structure determination of Bromo-noranisatin, a Derivative of Anisatin. *ibid.*, No.52, 4795- 4796 (1965) c) Kiyoyuki Yamada, Susumu Takada, Shiro Nakamura, Yoshimasa Hirata : Structure of Anisatin. *ibid.*, No.52, 4797- 4801 (1965). d) Susumu Takada, Shiro Nakamura, Kiyoyuki Yamada, Yoshimasa Hirata, Isolation and Structure of Neoanisatin, *ibid.*, No.39, 4739- 4744 (1966). e) K. Yamada, S. Takada, S. Nakamura, Y. Hirata : The Structures of Anisatin and Neoanisatin, Toxic Sesquiterpenes from *Illicium anisatum* L. *Tetrahedron*, **24**, 199- 229 (1968)

26 a) C. S. Yang, I. Kouno, N. Kawano, S. Sato, New Anisatin-like Sesquiterpene Lactones from Pericarps of *Illicium majus*. *Tetrahedron Lett.*, **29**(10), 1165-1168 (1988) b) Isao Kouno, Nobusuke Kawano, Chun-Shu Yang : New Pseudoanisatin-like Sesquiterpene Lactones from the Bark of *Illicium dunnianum*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, (1988), 1537-1539

27) 滝戸道夫、指田 豊 編：カラーグラフィック薬用植物 第2版 廣川書店 (1995)

28) 江蘇新医学院編：中薬大辞典 上海科学技術出版社 (1986)

29) Tomonori Nakamura, Emi Okuyama, Mikio Yamazaki : Convulsants from Star Anise (*Illicium verum* Hook. f.). *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1670-1671 (1993)

30) Tomonori Nakamura, Emi Okuyama, Mikio Yamazaki : Neurotoropic Components from Star Anise (*Illicium verum* Hook. fil.). *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1908-1914, (1996)

31) 岩瀬信久：修士論文（千葉大学大学院薬学研究科 1989年修了）インドネシア生薬、漢薬における向神経性成分の探索研究

32 a) Didier Gagnaire, Marc Vincendon : Easy Identification of Hydroxy-bearing Carbon Atoms in ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: a New Method for Signal Assignment in Carbohydrates. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1977**, 509-510 b) Philip E. Pfeffer, Kathleen M. Valentine, Frederick W. Parrish :

Deuterium-Induced Differential Isotope Shift ^{13}C NMR. I. Resonance Reassignments of Mono- and Disaccharides. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**(5), 1265-1274 (1979) c) Shuji Takahashi, Kayoko Serita, Mamoru Arai, Haruo Seto, Kazuo Furihata, N. Otake : Structure of Pholipomycin. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 499-502 (1983)

33 a) "Dictionary of Organic Compounds", 5th ed., Vol. 4, p.3712, Chapman & Hall, London (1982). b) Alexandre St. P. : Etude sur les matières végétales volatiles, IX. Sur quelques constituants inédits de l'huile essentielle de rue. *Helv. Chim. Acta*, **22**, 382-391 (1939)

34 a) Louis F. Fieser and Mary Fieser : Fieser & Fieser's Reagents for Organic Synthesis Vol. 1, p.759-764. John Wiley & Sons, Inc. (1967) b) Mary Fieser : Fieser & Fieser's Reagents for Organic Synthesis Vol. 12, p.358-359. John Wiley & Sons, Inc. (1986) c) J. K. Cha, W. J. Christ, Y. Kishi : On Stereochemistry of Osmium Tetroxide Oxidation of Allylic Alcohol Systems: Empirical Rule. *Tetrahedron Lett.* **24** (37) 3943-3946 (1983) d) W. J. Christ, J. K. Cha, Y. Kishi : On Stereochemistry of Osmium Tetroxide Oxidation of Allylic Alcohol Systems: Examples. *Tetrahedron Lett.* **24** (37) 3947-3950 (1983) e) Gilbert Stork, Michael Kahn : A Highly Stereoselective Osmium Tetroxide-Catalyzed Hydroxylation of γ -Hydroxy α, β -Unsaturated Esters. *Tetrahedron Lett.* **24** (37) 3951-3954 (1983)

35) Isao Kouno, Naosuke Baba, Miwa Hashimoto, Nobusuke Kawano, Masakatsu Takahashi, Hiroshi Kaneto, Chun-Shu Yang, Sadao Sato : Isolation of Three New Sesquiterpene Lactones from the Pericarps of *Illicium majus*. *Chem. Pharm. Bull.*,

37(9), 2448-2451, (1989)

36 a) Yoshihisa Kudo, Jun-ichiro Oka, Kiyoyuki Yamada : Anisatin, a Potent GABA Antagonist, Isolated from *Illicium anisatum*. *Neuroscience Lett.*, **25** (1981) 83-88

b) Kinzo Matsumoto and Hideomi Hukuda : Anisatin Modulation of GABA- and Pentobarbital-Induced Enhancement of Diazepam Binding in Rat Brain. *Neuroscience Lett.*, **32** (1982) 175-179 c) Kinzo Matsumoto and Hideomi Fukuda :

Anisatin Modulation of Temperature-Dependent Inhibition of [³H]Muscimol Binding by Chloride Ion. *Brain Research*, **270** (1983) 103-108.

37) 横田敏勝 : 脳と痛み, p.183 図 5.4 下行性疼痛抑制系の伝達物質. 共立出版 (1993)

主論文目録

本学位論文の内容は下記の発表論文による

- 1) Emi Okuyama, Tomonori Nakamura and Mikio Yamazaki : Convulsants from Star Anise (*Illicium verum* Hook. f.). *Chem. Pharm. Bull.*, 41(9), 1670-1671, (1993) (学会誌)

- 2) Tomonori Nakamura, Emi Okuyama and Mikio Yamazaki : Neurotopic Components from Star Anise (*Illicium verum* Hook. fil.). *Chem. Pharm. Bull.*, 44(10), 1908-1914, (1996) (学会誌)

- 3) Tomonori Nakamura, Emi Okuyama, Atsushi Tsukada, Mikio Yamazaki, Motoyoshi Satake, Sansei Nishibe, Haruhiko Tamayama, Takeshi Deyama, Akira Moriya, Masao Maruno, Hiroaki Nishimura : Acteoside as the Analgesic Principle of CEDRON (*Lippia triphylla* (L'Her) O.Kuntze), a Peruvian Medicinal Plant. *Chem. Pharm. Bull.*, 45 (2), 印刷中, (1997) (学会誌)

審査委員

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行なわれた。

主査 千葉大学薬学部 教授 薬学博士 山崎 幹夫

副査 千葉大学薬学部 教授 薬学博士 相見 則郎

副査 千葉大学薬学部 教授 薬学博士 斉藤 和季

副査 千葉大学薬学部 教授 薬学博士 中川 昌子

副査 千葉大学薬学部 教授 薬学博士 渡辺 和夫