

## ラフマ葉エキスの脳内モノアミン含量及び細胞膜流動性への影響

張 国平<sup>1</sup> 森 昌夫<sup>2</sup> 下村 史子<sup>2</sup> 謝 張錦<sup>3</sup> 王 中<sup>4</sup>

1. 復旦大学上海医学院 2. 微小循環研究所 3. 上海応用技術学院 4. 和漢生薬研究所

**要約** ラフマ葉エキスは脳内セロトニン (5-HT) 及びドーパミン (DA) への促進作用がある。水溶性成分はセロトニン、5-HIAA 及び DA を上昇させ、ノルアドレナリン (NE) を低下させる働きがある。アルコール成分の場合、作用は更に強い。ラフマ葉エキスの中には、中枢 5-HT 神経の興奮、NE 神経の抑制に働く物質が存在し、水溶性とアルコール溶性に分けられる。脳神経細胞膜脂質流動性を測定した結果、ラフマ葉エキス水溶性部分は膜の流動性を高める効果があった。

**キーワード** ラフマ葉エキス；モノアミン伝達物質；脳神経細胞膜流動性

### Effects of Apocynum venetum Leaf Extract on Monoamine Transmitter and Cell Membrane Fluidity in Brain

**Abstract** Extract of Apocynum venetum leaves can markedly increase levels of 5-HT and DA in the brain. Its water-soluble portion elevated the levels of 5-HT, 5-HIAA and DA but lowered that of NE. The effects of its alcoholic soluble portion were even more evident. These results suggested that extract of A.venetum leaves might contain chemical substances which can excite serotonergic neuron but inhibit adrenergic neuron of central nervous system. These substances are either water soluble or alcoholic soluble.

Results obtained by determine the lipid fluidity of cell membrane showed that the water soluble component of A.venetum leaves improved the cell membrane fluidity in brain.

**Key words** extract of Apocynum venetum leaves; monoamine transmitter; cell membrane fluidity of cerebral nerve

羅布麻—ラフマ(学名 : Apocynum venetum L.)は、キョウチクトウ科植物トウバシクルモンの全草或は葉である。根は強心作用があり、葉は血圧低下、喘息寛解、免疫増進<sup>[1]</sup>などの作用がある。以前の研究もラフマ葉エキスの鎮静、鎮痛作用は確認された。当実験は、ラフマエキスの水溶性部分、アルコール溶性部分、脂溶性部分の脳内モノアミン伝達物質の含量及び脳神経細胞膜流動性への影響を調べ、中枢に対する働きのメカニズム並びに作用部位を分析したものである。

## 1. 実験材料

1.1 動物 : Kunming 種マウス、雄雌、体重 18-22g ; Wistar ラット、雄雌、体重 150-200g、復旦大学上海医学院実験動物センター提供。

1.2 実験物 : ラフマ葉エキス、和漢生薬研究所提供、褐色粉末。使用時に 0.5%CMC 液で 20%混濁液に調剤する。ラフマエキスの水溶性部分、アルコール溶性部分、脂溶性部分は当研究室で分離される。水溶性部分とアルコール溶性部分は使用時に生理食塩水で希釈、脂溶性部分は 3% Polysorbate-80 で混濁液に調製する。

1.3 試薬 : n-Butyl alcohol (AR、無錫溶剤社製品) ; n-ヘプタン (AR、杭州精製所製品) ; 1,2-Benzenedicarboxaldehyde (Fluka AG の製品) ; 5-HT (スイス製品) ; 5-HIAA (Aldrich 社製品) ; ノルアドレナリン (上海第十製薬会社製品) ; ドーパミン (Fluka AG の製品) ; 蔗糖 (AR、上海試薬社製品) ; Tris (Fluka 製品) ; 蛍光剤 DPH (Sigma の製品)。

1.4 機器 : RF-510 蛍光分光光度計 (日本島津)。

## 2. 実験方法

### 2.1 モノアミン伝達物質の測定 :

正常マウス 80 匹、無作為で 10 匹毎、8 組に分ける。ラフマ葉エキスの水溶性、脂溶性、アルコール溶性部分及び対照液を ip、30 分後屠殺、低温で大脳を取り出し、小脳及び Rhinencephalon を取り除き、重量を測り、10 倍量の酸性 n-Butyl alcohol を加え混合、ホモジネートにする。5-HT、5-HIAA、NE、DA を抽出し<sup>[2]</sup>、OPT 法及び Trihydroxyindole 法を用いて、RF-510 蛍光分光光度計で各蛍光物質の蛍光強度を測定する。

### 2.2 神経細胞膜流動性の測定 :

Jones 法<sup>[3]</sup>で、ラットの前脳 (Forebrain) ホモジネートから、シナプス (P<sub>2</sub> 部分) を分離し、5mmol/L Tris-HCl (pH=8.1) 低張緩衝液で混濁し、1 時間 (0°C) に攪き、膜を破裂させる。4°C、9000×g 遠心分離 20 分にかけて、シナプス小胞、ミトコンドリア及び髄鞘の混合膜を得られた。修正 Shilling 法<sup>[4]</sup>で、膜脂質流動性を測る。等張リン酸緩衝液 (PBS、pH=7.2) で全たんぱく量を 30 μg/ml まで希釈、混濁液にする (Bradford 法)。希釈した混濁液 1.5ml

に等体積の  $2 \times 10^{-6} \text{mol/L}$  DPH を加え、振動し、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間培養後蛍光標識し、蛍光分光光度計で波長 363/428nm、恒温  $37^\circ\text{C}$ 、各時間帯の偏光を測定、偏光度  $P$  を計算する。

$$P = \frac{(I_{0/0} - G \times I_{0/90})}{(I_{0/0} + G \times I_{0/90})} \quad G = (I_{90/0}) / (I_{90/90})$$

$I_{0/0}$ 、 $I_{0/90}$  は偏光子光軸を垂直に設置、偏光検光子は垂直と水平で測定した蛍光強度。

$I_{90/0}$ 、 $I_{90/90}$  は偏光子光軸を水平に設置、偏光検光子は垂直と水平で測定した蛍光強度。

$P$  値は大きいほど、膜の流動性は小さい、 $P$  値は小さいほど、膜の流動性は大きい。

PBS 及び他の組織の非標識蛍光による誤差発生を無くするため、組織空白管（膜混濁液 + PBS）及び標識剤空白管（DPH + PBS）を設け、363/428nm で偏光蛍光測定し、実験管の蛍光強度は標識空白管の 40~50 倍以上であることを確認したあと、実験物の膜混濁液偏光蛍光強度に対する影響を測定する。実験物空白管も設ける。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 モノアミン類伝達物質への影響：

4g/kg 水溶性部分（4g は全成分エキスとする）のラフマ葉エキス投与は脳内 5-HT、DA の上昇が見られた。6g/kg 水溶性部分の場合は、5-HT、5-HIAA、DA の上昇と NE の低下が現れた。3g/kg アルコール溶性部分の作用はさらに強くなる。3g/kg の脂溶性部分の場合、5-HIAA 以外、他の伝達物質の変化は現れなかった（表 1）。10g/kg まで増やしても顕著な差が無かった。ラフマ葉エキスの水溶性、アルコール溶性部分は脳内モノアミン伝達物質及び 5-HIAA に影響がある。脂溶性部分は、ほとんど影響が無い。ラフマ葉エキスの中にはセロトニン神経と DA 神経へ興奮、ノルアドレナリン神経へ抑制する成分があり、これらの神経に作用すると考えられる。

#### 3.2 脳神経細胞膜流動性への影響：

近年、薬物の生物膜流動性への影響はますます注目されている<sup>[6]</sup>。Chin らは ESR 法で、アルコールのマウスの脳組織ホモジネートから分離された髄鞘膜、ミトコンドリア膜及びシナプス膜の流動性に対する影響を研究した<sup>[6]</sup>。

当研究室は偏光蛍光法を用いて、ラフマ葉エキス水溶性部分の脳ホモジネート混合膜の流動性への影響を観察した。結果、1.33mg/ml 濃度（全成分エキスとする、以下同）の水溶性部分は、投薬後 10min~20min、偏光度は 31.34%~41.80% の低下になった。2.66mg/ml 濃度の場合、偏光度は 43.35%~50.24% の低下になった。投薬濃度は増加とともに偏光度の低下は大きくなる傾向は見られた。作用強度はラフマ葉エキスと正相関していることを表した。上述の変化は投与前に比べると顕著な差が認められた ( $P < 0.01$ )。今のところ、ラフマ

葉エキス有効成分は、シナプス膜或はミトコンドリア膜どっちに影響するか、更なる研究が必要と思う。また、有効成分の単一分離もこれからの課題となる。

表 1. ラフマ葉エキスのマウス脳内モノアミン伝達物質への影響

組分け	n	モノアミン伝達物質含量(平均±標準偏差, $\mu\text{g/g}$ )			
		5-HT	5-HIAA	NE	DA
ラフマエキス全成分	10	0.946±0.027**	0.694±0.038	0.412±0.028**	1.112±0.021*
5%GMC-Na 液対照	10	0.789±0.018	0.748±0.019	0.485±0.023	0.991±0.035
変化率		19.90%	-7.22%	-15.05%	12.21%
水溶性部分	10	1.067±0.015**	0.692±0.019*	0.523±0.011**	1.273±0.026*
生理食塩水対照	10	0.834±0.026	0.591±0.018	0.606±0.031	1.129±0.023
変化率		27.94%	17.90%	-13.70%	12.75%
アルコール溶性部分	10	0.921±0.012**	0.741±0.017**	0.519±0.014**	1.368±0.033**
生理食塩水対照	10	0.803±0.015	0.571±0.021	0.609±0.018	1.197±0.018
変化率		14.69%	29.77%	-14.78%	14.285
脂溶性部分	10	0.817±0.018	0.541±0.025**	0.568±0.025	0.988±0.035
3%Polysorbate-80 対照	10	0.825±0.02	0.643±0.036	0.581±0.023	0.931±0.037
変化率		0	-15.86%	-2.29%	6.12%

\*P<0.05、\*\*P<0.01 各対照組と比較

表 2. ラフマ葉エキス水溶性部分の脳神経細胞膜蛍光偏光度への影響 (n=10)

濃度 (mg/ml)	投与前	蛍光偏光度(平均±標準偏差)		
		投与後 10min	投与後 20min	投与後 30min
1.33	0.1866±0.0218	0.1279±0.0210**	0.1096±0.0354**	0.1585±0.0217*
2.66	0.1866±0.0218	0.1068±0.0242**	0.0939±0.0232**	0.1476±0.0311*
3.99	0.1866±0.0218	0.0753±0.0267**	0.1018±0.0261**	0.1153±0.0358**

\*P<0.05 \*\*P<0.01 投与前と比較

参考文献

- 「1」 Chinese Pharmacopeia Committee of Ministry of Public Health of the People' s Republic of China, [The Chinese Pharmacopeia, Vol. 1], Chemical and Technical Press, Beijing, 2000, p170
- 「2」 錢 高峰, 等. 広州医学院学報, 1992, 2(1) : 17
- 「3」 Jones D H, et al. Biochem Biophys Acta, 1974, 356:276
- 「4」 石 玲, 等. 蘇州医学院学報, 1993, 3(3) : 1
- 「5」 黄 芳, 等. 国外医学 - 分子生物学, 1992, 4 (4) : 169
- 「6」 Chin J H, et al. Science, 1977, 196:684