

Feruloylputrescine, 8 種混合花粉の水エキスにおける ノルアドレナリン尿道収縮抑制作用物質

中瀬 清一,*^{a)} 瀬川 俊章^{a)} 菌部 徹^{a)} 森 登^{a)}
木村 郁子^{b)} 木村 正康^{b)}

^{a)}東菱薬品工業株式会社青梅研究所, ^{b)}富山医科薬科大学薬学部薬品作用学研究室

Feruloylputrescine, a compound inhibiting noradrenaline-induced contraction of mouse urethral smooth muscle in water-extract from pollen mixture

Kiyokazu NAKASE,*^{a)} Toshiaki SEGAWA^{a)} Tohru SONOBE^{a)} Noboru MORI^{a)}
Ikuko KIMURA^{b)} and Masayasu KIMURA^{b)}

^{a)}Ome Research Laboratories, Tobishi Pharmaceutical Co., Ltd.

^{b)}Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received June 16, 1989. Accepted November 2, 1989.)

Abstract

A compound inhibiting noradrenaline (NA)-induced contraction of mouse urethral smooth muscle was isolated from water-extract of pollen mixture (from 8 species of plants), using ion exchange resin, reversed phase column, and preparative thin-layer chromatography. This compound was identified as feruloylputrescine (I) by ¹H-NMR spectra of I and a dansyl derivative of I (II), by the hydrolysis of II, and by the synthesis of I. The inhibitory activity of I on urethral smooth muscle was greater than that of T-60. These results suggested that I was a major component inhibiting NA-induced contraction of urethral smooth muscle.

Key words pollen, feruloylputrescine, urethral smooth muscle, mouse.

Abbreviations GBX, 花粉アセトンエキス; NA, noradrenaline; T-60, 花粉水エキス.

結 言

花粉の薬理活性については、ナタネおよびヒマワリ等の花粉において若齢ラットの生長促進作用¹⁾、マウスの抗疲労作用²⁾、またマウスの放射線照射後の造血作用²⁾、体内代謝および内分泌調節作用²⁾、抗菌作用²⁾が報告されているにすぎない。また、古来ガマ属植物の花粉である蒲黄が主に止血剤として用いられているが、詳細な薬理作用および有効成分との関連については、ほとんど検討されていない。

一方、チモシイ、トウモロコシなど8種類の植物の混合花粉より抽出した水エキスおよびアセトンエキスを20:1の割合で含む花粉エキス製剤(セルニルトン®)が臨床で前立腺肥大症や前立腺炎に伴う排

尿困難に対して用いられている。セルニルトン®の薬理作用としては、抗炎症作用³⁾、前立腺肥大抑制作用⁴⁾等が知られている。また、前立腺炎、前立腺精嚢炎、非特異的尿道炎に伴う排尿困難を緩解することが知られており^{5, 8)}、これは尿道抵抗の低下⁹⁾、膀胱内圧の上昇¹⁰⁻¹²⁾によるためであることが示唆されていた。

著者らはすでにセルニルトン®に含まれる混合花粉のエキスおよびトウモロコシ花粉のエキスに尿道収縮を抑制し、膀胱を収縮する作用を見出し、排尿促進作用を裏付けている¹³⁻¹⁵⁾。今回、セルニルトン®を構成する混合花粉のエキスのうち、水エキス(T-60)に含まれる活性物質を解明するために、マウス尿道のノルアドレナリン(NA)収縮抑制作用を指標にして分画した。この結果、活性物質の1つを単

*〒198 東京都青梅市末広町1-7-1
1-7-1 Suehiro-cho, Ome, Tokyo 198, Japan

離したので報告する。

方法および結果

1. 尿道平滑筋標本による各分画の活性測定

尿道平滑筋標本の作製は、既報¹³⁾の方法に準じた。すなわち、体重29~47 gのddY系雄性マウス(静岡実験農協)を断頭・瀉血後、開腹し骨盤の恥骨結合部軟骨を切開して尿道を露出した。次に、外尿道括約筋および膀胱頸部で尿道を切り離して縦走方向に二等分した。標本は、5 mlのmodified Krebs液〔NaCl 122, KCl 5.9, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 15.5, glucose 11.5 (mM)〕を充たした反応槽中に懸垂し、100 mgの静止張力を負荷した。反応槽には混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)を通気し、37℃に保温した。

発生張力は、U-gage transducer(ミネベア, UL-2-240)により測定し、Biophysigraph(日本電気三栄, 1236)およびDC amplifier(日本電気三栄, 615)で増幅し、pen oscillograph(日本電気三栄, 8S61ME-1-S)上に記録した。

収縮薬としてED₅₀に相当する濃度(0.3 μg/ml)のnoradrenaline(NA, 三共)を用いた。NA単独による収縮が一定であることを確認した後、各分画(0.3~1.0 mg/ml)を5分前に投与しNA収縮を測定した。NA単独による収縮高を100%とし、各分画共存下での収縮高から抑制率を算出した。

T-60およびferuloylputrescineについては、NAで尿道を収縮させた後、累積的に投与して濃度反応曲線を求め、作用を比較した。なお、NAおよび各分画は蒸留水にて溶解後、希釈して用いた。

2. 活性化合物の単離

T-60は8種の植物の花粉〔チモシイ(オオアワガエリ), トウモロコシ, ライムギ, ヘーゼル, ネコヤナギ, ハコヤナギ, フランスギク, マツ〕を水で抽出した粉末エキスで、ABセルネレ社で製造されたものを用いた。

Dowex 50 (x2, 200-400 mesh, Pyridine型)を0.2 M pyridine-acetic acid bufferでpH 3.1に調整し、内径100 mm, 高さ90 mmのカラムを作成した。T-60約75 gを上記bufferに溶解し、カラムに負荷した。pH 3.1のbuffer 3.5 l(分画A, B, ただしAは通過部), pH 4.6の0.4 M pyridine-acetic acid buffer 1.7 l(分画C), pH 5.0の2.0 M pyridine-acetic acid buffer 3.5 l(分画D)で順次流し、活性分画D 3.3 gを得た。

分画D 11.5 gを先と同様の方法で調整したDowex 50(内径50 mm, 高さ550 mm)のカラムに負荷し、pH 3.1のbuffer 1.6 l, ついでpH 4.6のbuffer 5.0 lで流出させた(D1-D5)。さらに, concave gradient(pH 4.6のbuffer 5.0 l, pH 5.0のbuffer 2.2 l)で流出(D6-D8), 最後にpH 5.0のbuffer 10 lで流出させた(D9-D9_s)。各溶出液は0.1 mlずつ試験管にとり、ninhydrin発色し,¹⁶⁾その

Table I ¹H-NMR spectral data for compound I, ferulic acid and putrescine.

	Compound I (D ₂ O)	Synthetic (D ₂ O)	Ferulic acid (CD ₃ OD)	Putrescine (D ₂ O)
C ₂ -H	6.48 (bd) 15.1	6.45 (d) 15.6	6.31 (d) 15.4	
C ₃ -H	7.45 (bd) 15.1	7.43 (d) 15.6	7.60 (d) 15.4	
C ₅ -H	7.26 (bs)	7.22 (bs)	7.17 (d) 2.1	
C ₈ -H	6.80 (bd) 12.6	6.90 (d) 8.3	6.81 (d) 7.8	
C ₉ -H	7.13 (bd) 12.6	7.15 (bd) 8.8	7.06 (dd) 2.1, 7.8	
C ₁₀ -H	3.92 (bs)	3.89 (s)	3.90 (s)	
C ₁ '-H	3.34 (m)	3.33 (m)		3.05 (m)
C ₂ '-H	1.67 (m)	1.67 (m)		1.76 (m)
C ₃ '-H	1.67 (m)	1.67 (m)		1.76 (m)
C ₄ '-H	2.92 (m)	3.03 (m)		3.05 (m)

d: doublet, bd: broad doublet, s: singlet, bs: broad singlet, m: multiplet.

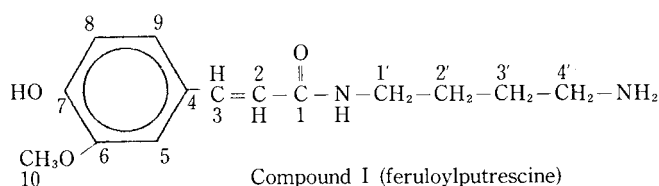


Table II Yield and inhibition (%) of the fractions (D1–D9) from T-60.

Fraction	Yield (mg)	% Yield	% Inhibition ^{a)}	Constituents
D1	—	—	0	
D2	—	—	14.4	
D3	—	—	42.8	
D4	—	—	33.7	
D5	—	—	14.7	
D6	1182.6	0.22	34.9	
D7	14185.5	2.69	45.5	
D8	2027.0	0.38	64.9	cadaverine, putrescine
D9 ₁	712.0	0.14	16.4	histamine
D9 ₂	835.3	0.16	—	tyramine
D9 ₃	463.2	0.09	—	
D9 ₄	81.5	0.02	90.8	feruloylputrescine
D9 ₅	182.7	0.03	—	

^{a)} : % Inhibition of noradrenaline (0.3 μ g/ml)-induced contraction of mouse urethral strips by each fraction (D1–D9, 0.3 mg/ml).

クロマトパターンに従って分画した。

活性分画 D9₄ 81.5 mg を精製水に溶解し、逆相カラム (Iobar column, size A, Lichroprep RP-8, Merck) に負荷し、精製水 100 ml (R1, 32.3 mg), 50% methanol 100 ml および methanol 100 ml (R1), 2% acetic acid, methanol : 2% acetic acid (1 : 1) 各 100 ml (R2, 21.3 mg) で順次流出した。

次いで、R2 を silica gel TLC プレート (0.25 mm, 20×20 cm, Merck No. 5715) に帯状にスポットし、*n*-butanol : water : acetic acid (4 : 1 : 2) で展開し、各バンドは *n*-butanol : water : acetic acid (4 : 1 : 2) で溶出し、有機溶媒を留去後、凍結乾燥し、活性化合物 I (酢酸塩) を得た。化合物 I の ¹H-NMR データを Table I, 各分画の尿道平滑筋標本に対する収縮抑制活性を Table II に示す。

3. 活性化合物 I の同定および合成

化合物 I の約 3 mg を 0.2 M sodium bicarbonate 水溶液 200 μ l に溶解し、20 mg/ml dansylchloride acetone 溶液 200 μ l を加え、室温に 3 時間放置してダンシル (DNS) 化を行った。DNS 化後、水を加え、ethyl acetate 抽出を行った。Ethyl acetate 層は preparative TLC により精製し、化合物 II を得た。

化合物 II の一部を取り 6 N HCl で 105°C, 4 時間加水分解を行った後、少量の水を加え ethyl acetate 抽出を行った。Ethyl acetate 層は濃縮後、TLC および MS の検討 (M^+ m/z 427), さらに trimethylsilyldiazomethane によるメチル化後 (M^+ m/z 441), 標品との比較 (TLC, MS) によって

ferulic acid と同定した。水層は濃縮後、ninhydrin 陽性の DNS 誘導体であることを確認し、再度 DNS 化後 TLC および MS により diDNS putrescine (M^+ m/z 552) と同定した。

Ferulic acid 388 mg (2 mM) を pyridine に溶解し、氷冷下 dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 412 mg (2 mM) の pyridine 溶液を滴下した。次に、putrescine 352 mg (2 mM) を pyridine に溶解し、氷冷下 ferulic acid-DCC 縮合物を滴下した。1 時間後濾過し、濾液に水を加え 1 N HCl で酸性にした後、ethyl acetate で洗浄した。水層を 1 N NaOH にてアルカリ性にした後、*n*-butanol で抽出した。この抽出物を alumina column chromatography [neutral alumina, CHCl₃ : MeOH : 10% AcOH (65 : 24 : 4)] にて精製し、methanol より結晶化した。このものの各種スペクトルデータは feruloylputrescine の文献値²²⁾と一致した。

なお、¹H-NMR スペクトルは JEOL FX-200, MS は JEOL D-300 を用いて測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は、薄層板として遊離体の場合は silica gel (Merck) または avicel® (フナコシ) を用い、展開溶媒として *n*-butanol : water : acetic acid (4 : 1 : 2) を用いた。Dansyl (DNS) 誘導体の場合は silica gel 薄層板で展開溶媒は chloroform : isopropyl alcohol (20 : 1) または *n*-hexane : ethyl acetate (1 : 1) を用いた。

4. Feruloylputrescine (I) の noradrenaline 収縮抑制作用

I について、マウス尿道切片における NA (0.3 μ g/ml) 収縮に対する抑制作用を T-60 と比較した

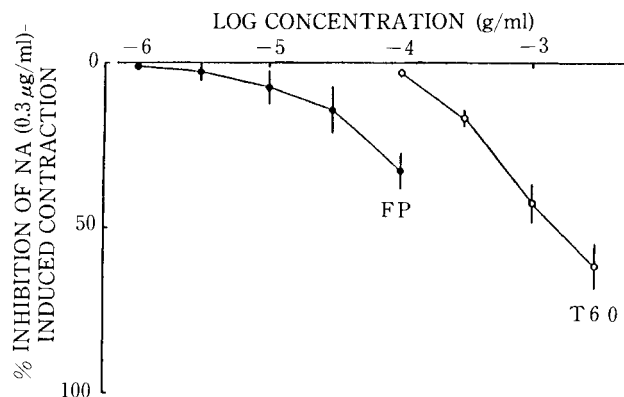


Fig. 1 Log cumulative concentration-response curve for inhibition by water-extract of pollen mixture (T-60) and feruloylputrescine (FP) on noradrenaline (NA, 0.3 μ g/ml)-induced contraction of mouse urethral strips.

The data for T-60 is replotted from Kimura *et al.* (11). Each point represents the mean ($n=5-7$) with vertical lines indicating S.E.M.

(Fig. 1)。

I は 0.1 mg/ml において $32.5 \pm 5.5\%$ ($n=5$) の抑制率を示した。また、1 μ g/ml において $1.2 \pm 1.2\%$ ($n=5$)、3 μ g/ml において $2.9 \pm 2.9\%$ ($n=5$) の抑制率を示した。すなわち、I による抑制作用の最小濃度は 1–3 μ g/ml と推定された。一方、T-60 の 0.1 mg/ml による尿道収縮の抑制率は $2.9 \pm 1.2\%$ ($n=7$) であり、同濃度が抑制作用の最小濃度と推定された。

以上の結果、I が T-60 より 1/100–1/30 の低濃度より尿道収縮抑制作用をあらわし、等濃度 (0.1 mg/ml) では 10 倍以上の抑制作用を示すことが確認された。

なお、T-60 については膀胱平滑筋に対する収縮作用¹¹⁻¹⁵⁾が報告されているが、I および活性分画 D には認められなかった。

考 察

今回、マウス尿道の NA 収縮抑制の活性を指標に分画して得られた feruloylputrescine (I) はすでに *Salsola subphylla* var. *dremaria*^{17,18)} および柑橘類の葉と果実¹⁹⁾ から単離されている。また、合成²⁰⁾、分析方法^{21,22)} や顕花植物における分布²³⁻²⁵⁾ も報告されており、その他にも感染ポテト²⁶⁾ やタバコ²⁷⁾ 等に存在することが報告されている。以上のことから、I は天然に広く存在する成分と考えられる。また、類縁化合物としては、構成酸が cinnamic acid の amide である kukoamine A が、地骨皮の血圧降下作用物質として発見されており、²⁸⁾ 合成も報告されている。^{29,30)}

I は T-60 の少なくとも 10 倍以上の活性を持つことが推定された。この活性は単独で抑制作用のすべてを説明できるほどではない。しかしながら、Kimura *et al.*³¹⁾ (1984) は芍薬および甘草の成分である paeoniflorin および glycyrrhizin が単独では作用のない濃度でも混合した際には、作用をあらわす現象 (『blend 効果』) を報告している。すでに著者らは、尿道収縮抑制において T-60 とアセトンエキス (GBX) の間に相乗作用がみられることを報告している。^{14,15)} また、本実験において cadaverine と putrescine を含む分画にも活性がみられた。これらのことから、T-60 の尿道収縮抑制作用は I と他の成分との様々な相互作用により発現すると考えられる。

また、著者らは横隔膜神経筋標本において、T-60 が GBX の筋弛緩作用を増強することを報告しているが、^{14,15)} I も GBX の作用を増強した (未発表)。このことから、I は活性の一部を担うことが裏付けられた。

今回の著者らの研究は花粉エキス中の尿道収縮抑制物質を単離することが目的であるので feruloylputrescine の薬理作用についての検討は十分でなく、他の平滑筋および収縮薬に対する作用については行っていない。本研究に用いた尿道平滑筋は α -adrenergic 優位な標本であるが、I は尿道平滑筋に対して、単独では作用を示さずに NA の作用を抑制した。また、著者らは I を含む T-60 が NA と競合的に拮抗する要素を持つことをすでに報告している。¹³⁻¹⁵⁾ 一方、I はネコ、イヌ、ウサギにおいて血圧降下作用を有することが報告されている。^{32,33)} これらのことから、I は血管あるいは尿道平滑筋の

α 受容体において NA と競合的に拮抗することが推測される。なお、I および関連化合物の詳細な薬理作用については、現在検討中である。

以上の通り、花粉エキスの主要な尿道収縮抑制活性成分の 1 つとして feruloylputrescine が単離され、本物質が花粉エキスの排尿促進作用の一部を担うものと考えられる。

結 論

1. 花粉水エキス (T-60) 中より、マウス尿道のノルアドレナリン収縮抑制作用を有する化合物を、イオン交換樹脂クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、preparative 薄層クロマトグラフィーにより単離した。

2. この化合物は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルおよび MS, デンシル誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルおよび加水分解、ならびに合成により feruloylputrescine (I) と同定した。

3. I はマウス尿道平滑筋において T-60 の 1/100-1/30 の低濃度 ($1-30 \mu\text{g/ml}$) より抑制作用をあらわし、等濃度 (0.1 mg/ml) における抑制率は T-60 より 10 倍以上高かった。以上の結果より、I は T-60 による尿道のノルアドレナリン収縮抑制活性本体の一部を担うことが推察された。

文 献

- 1) Chung, Y.G., Yoon, S.H., Kwon, J.S., Boe, M.J.: Nutritional and biochemical studies on lipids of sunflower pollen and effects on liver cholesterol metabolism in rat. *Han'guk Yongyang Silkyong-Hakhoechi* 13, 169-174, 1984.
- 2) 銭 伯初, 卞如濂 監校: 蜂花粉薬理研究進展. 中国薬理学通報 2, 1-5, 1986.
- 3) 伊藤隆太, 野口桂一, 山下彰三, 波方庄平, 武永邦三, 吉永雅一, 清水賢治, 石井 誠, 森 登: Cernitin pollen-extract (Cernilton®) の抗炎症作用. 応用薬理 28, 55-65, 1984.
- 4) 伊藤隆太, 石井 誠, 山下彰三, 野口桂一, 国兼和敏, 大窪康貴, 対馬一雄, 佐藤 茂, 赤松 博: Cernitin pollen-extract (Cernilton®) の抗前立腺肥大作用. 応用薬理 31, 1-11, 1986.
- 5) Ask-Upmark, E.: On a new treatment of prostatitis. *Grana palynologica* 2, 115-118, 1963.
- 6) Ask-Upmark, E.: Die Behandlung der Prostatitis. *Z. Urol.* 56, 113-116, 1963.
- 7) 稲田 務, 北山太一, 宮川美栄子: 前立腺肥大症に対するセルニルトンの使用経験. 泌尿紀要 13, 466-469, 1967.
- 8) Ohkoshi, M., Kawamura, T., Nagakubo, I.: Valoracion clinica de Cernilton en prostatitis chronica. *Schweiz Med. Wschr.* 2, 436-439, 1970.
- 9) 北野太路, 江原省治, 中野 博, 仁平寛巳, 長岡修司, 世古昭三, 広本宣彦, 白石恒雄, 藤原英裕, 藤井元広: 前立腺肥大症に対する Cernilton® の治療効果に対する検討. 泌尿紀要 29, 325-331, 1982.
- 10) 中新井邦夫, 園田孝夫: 前立腺抽出物 (Robaveron) の排尿機能におよぼす影響についての実験的研究. 泌尿紀要 18, 501-515, 1972.
- 11) 吉永雅一, 小野寺禎良, 武永邦三, 清水賢治, 石井 誠, 浜中敏議, 豊嶋 稔, 内山利満: 膀胱に対する Ceritin pollen-extract (CN-009) の作用(1). 日薬理誌 90, 74, 1987.
- 12) 武永邦三, 小野寺禎良, 吉永雅一, 清水賢治, 石井 誠, 浜中敏議, 豊嶋 稔, 内山利満: 膀胱に対する Ceritin pollen-extract (CN-009) の作用(2). 日薬理誌 90, 74, 1987.
- 13) Kimura, M., Kimura, I., Nakase, K., Sonobe, T., Mori, N.: Micturition activity of pollen extract. *Planta Medica* No.2, 148-151, 1986.
- 14) 木村正康, 木村郁子: 花粉の薬理-排尿作用の薬理学的裏付け. 医学と薬学 15, 521-532, 1986.
- 15) 中瀬清一, 武永邦三, 浜中敏議, 木村正康: Cernitin pollen extract の摘出尿道平滑筋および横隔膜神経筋標本に対する作用. 日薬理誌 91, 385-392, 1988.
- 16) Moore, S., Stein, S.H.: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211, 907-913, 1954.
- 17) Ryabinin, A.A., Il'ina, E.M.: The alkaloid of *Salola subaphylla*. *Doklady Acad. Nauk. S.S.S.R.* 67, 513-516, 1949.
- 18) Ryabinin, A.A., Il'ina, E.M.: The structure of the alkaloid subaphylline. *Doklady Acad. Nauk. S.S.S.R.* 76, 689-692, 1951.
- 19) Wheaton, T.A., Stewart, I.: Feruloylputrescine. Isolation and identification from Citrus leaves and fruit. *Nature* 206, 620-621, 1965.
- 20) Hillmann-Elies, A., Hillmann, G.: Synthesis of subaphylline. *Z. Naturforsch.* 8b, 526-527, 1953.
- 21) Wheaton, T.A., Stewart, I.: Quantitative analysis of phenolic amines using ion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 12, 585-592, 1965.
- 22) Ponchet, M., Martin-Tanguy, J., Poupet, A., Marais, A., Beck, D.: Separation and quantification of basic hydroxycinnamic amides and hydroxycinnamic acids by reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 240, 397-404, 1982.
- 23) Martin-Tanguy, J., Cabanne, F., Perdrizet, E., Martin, C.: The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochemistry* 17, 1927-1928, 1978.
- 24) Martin-Tanguy, J., Deshayes, A., Perdrizet, E., Martin, C.: Hydroxycinnamic acid amides (HCA) in *Zea mays*. *FEBS Lett.* 108, 176-178, 1979.
- 25) Ponchet, M., Martin-Tanguy, J., Marais, A., Martin, C.: Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some Araceae species.

- Phytochemistry **21**, 2865-2869, 1982.
- 26) Malmberg, A. : N-Feruloylputrescine in infected potato tubers. *Acta Chem. Scand. B* **38**, 153-155, 1984.
- 27) Balint, R., Copper, G., Staebell, M., Filner, P. : N-cafeoyl-4-amino-*n*-butyric acid, a new flower-specific metabolite in cultured tobacco cells and tobacco plants. *J. Biol. Chem.* **262**, 11026-11031, 1987.
- 28) Funayama, S., Yoshida, K., Konno, C., Hikino, H. : Structure of kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinese* root barks. *Tetrahedron Lett.* **21**, 1355-1356, 1980.
- 29) Chantrapromma, K., Ganem, B. : Chemistry of naturally-occurring polyamines. 4. Total synthesis of kukoamine A, an antihypertensive constituent of *Lycium chinese*. *Tetrahedron Lett.* **22**, 23-24, 1981.
- 30) Moriwaka, T., Saito, S., Tamai, H., Mitsuda, H., Inaba, M. : Total synthesis of kukoamine A using 2-methyl-5,6-dihydro-4H-1, 3-oxazine as a carboxamide building block. *Heterocycles* **23**, 277-280, 1985.
- 31) Kimura, M., Kimura, I., Takahashi, K., Muroi, M., Yoshizaki, M., Kanaoka, M., Kitagawa, I. : Blocking effects of blended paeoniflorin or its related compounds with glycyrrhizin on neuromuscular junction in frog and mouse. *Japan. J. Pharmacol.* **36**, 275-282, 1984.
- 32) Panaschenko, A.D., Ryabinin, A.A. : Derivatives of tetramethylenediamine (putrescine). *Farmakol. i Toksikol.* **18**, 9-17, 1955.
- 33) Panaschenko, A.D., Ryabinin, A.A. : Chemical and pharmacological investigation on natural and synthetic compounds of putrescine series. *Trudy Botan. Inst. im V. L. Komarova. Acad. Nauk S.S.S.R., Ser. 5.*, 49-65, 1961.