

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞中の血小板凝集抑制物質

合津陽子・横山峰幸・北村謙始・難波隆二郎*・吉田誠一*・瀬戸 進

(株)資生堂基礎科学研究所, *安全性分析センター
(〒223 横浜市港北区新羽町 1050)

(1989年11月29日受付)

(1990年1月19日受理)

ベタシアニン生産能を持つヨウシュヤマゴボウ培養細胞中の血小板凝集抑制物質の探索を行った。2,4-D 5×10^{-6} M を添加した LS 液体培地中で9日間培養した細胞を用い、メタノール抽出物の *n*-ブタノール可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、続いて HPLC により活性画分を分離したところ活性画分は少なくとも2種類存在した。本研究ではそのうちの1つが強い血小板凝集抑制作用を持つアデノシンであることを明らかにした。アデノシン含量は培養方法を変えることによって大きく変動し、フラスコ培養の場合は乾重量当り 0.04% だったのに対して、ジャーフェーマンター培養の場合は 0.15% であった。生葉中のアデノシン含量としては、バナナ、サフランについて報告があり、産地によって含量は大きく異なるが、いずれと比較してもヨウシュヤマゴボウの含量はそれらよりもかなり高い値であった。

1. 緒言

ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) は北米原産の多年草で、古くは急性リュウマチの民間治療薬として用いられたが、毒性が強くその生理活性についてはこれまであまり報告されていない。一方、その成分については、赤色素であるベタシアニンとトリテルペンサポニン類であるフィトラコシドについて報告があり¹⁻⁵⁾、特にベタシアニンについてはヨウシュヤマゴボウのベタシアニン生産細胞が選抜され、ベタシアニン発現機構についての研究が行われている^{6,7)}。

今回、われわれはヨウシュヤマゴボウのベタシアニン生産細胞の生理活性について評価したところ、血小板凝集抑制効果が認められ、しかも ADP およびアラキドン酸による凝集をいずれも抑制するという特異的な活性が認められた。そこでこの薬理作用の有効成分について検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

(1) 材料および培養方法

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞の培養には、2,4-D 5×10^{-6} M を添加したリスマイヤーとスクーグ液体培地⁸⁾を用い、27°C、110 rpm で7日ごとに継代培養を行った。実験には培養4日目および9日目の細胞を用いた。また 5l ジャーフェーマンター培養については、ミツワ理化学工業製の变形パドル翼を設置した植物細胞培養槽

を用い 40 rpm、26°C で9日間培養を行った。

(2) 血小板凝集阻害試験

日本白色種ウサギ (雄、体重 2.5~3.5 kg) の頸動脈あるいは耳介静脈から 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として常法どおり採血した。採取した血液を 15 分間遠心分離し、上層より多血小板血しょうを得た。血小板凝集はこの多血小板血しょうおよび $2 \mu\text{M}$ ADP、 $250 \mu\text{M}$ アラキドン酸ナトリウム、 $10 \mu\text{M}$ カルシウムイオノファア A 23187 を用いて、理化電気工業社製の凝集計により測定した。サンプルは特に記載のない限り、最終濃度 500 ppm で測定した。

(3) 血小板凝集阻害画分の分画

4日間および9日間 500 ml 三角フラスコで培養した細胞、あるいは、9日間 5l ジャーフェーマンターで培養した細胞をそれぞれ濾集した後、細胞新鮮重量の2倍量のメタノールを加え、ポリトロンでホモジナイズし細胞内物質を抽出した。得られたメタノール抽出液はメタノール留去後、水に転溶しメタノール抽出物とした。このメタノール抽出物はエチルエーテル、水、*n*-ブタノール可溶画分に分画した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。(担体; Silicagel 60 F 254, 溶出液; *n*-BuOH: AcOEt: H₂O 4:1:5 upper phase)。得られたフラクションは、さらに HPLC により分画を行った。HPLC は HPLC pump 64 (KNAUER) および

CAPCELL PAK C₁₈ (資生堂製) カラムを用い、5%メタノールで溶出させ A₂₁₀ で検出した。

(4) 血小板凝集阻害物質の同定

HPLC により分画した血小板凝集阻害画分は、NMR により同定を行った。NMR は GX-400 (日本電子) を用い ¹H-NMR, ¹³C-NMR を測定した。

(5) アデノシンの定量

アデノシンは HPLC により定量を行った。HPLC の分析条件は CAPCELL PAK C₁₈ カラム (資生堂製, 4.6 mm i. d. × 250 mm) (温度; 40 °C, 移動相; 5% MeOH, 流速; 1 ml/min) を用い, 検出波長; 210 nm, 試料導入量; 10 μl, とした。この条件においてアデノシンは約 19.9 分にシャープなピークとして溶出され, 検量線は 0~500 μg/ml の範囲で原点を通る直線 (相関係数 $r=0.993$) を示した。

3. 結果

9日間 500 ml 三角フラスコで培養した細胞のメタノール抽出物を, エチルエーテル, 水, *n*-ブタノール可溶画分に分画したところ, ベタシアニンは水画分に溶出された。この3画分についてアッセイを行ったところ, *n*-ブタノール画分に, わずかに活性が認められた (Fig. 1)。一方, 4日間培養した細胞の各画分はまったく活性がみられず (データ省略), 以後実験には9日間培養した細胞を用いた。

つづいて活性の認められた *n*-ブタノール画分はさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供したところ, Fig. 2 のような TLC 像を示すフラクション No. 1~No. 4 が得られ, 硫酸, アニスアルデヒドによる発色により多量成分としてサポニン類を含んでいると推測された。

そこで, 各フラクションについてアッセイを行ったところ, No. 4 に強い活性が認められた (Fig. 1)。No. 4 については, 繰り返し細胞より調製しその活性を確かめたところ, ADP, アラキドン酸, カルシウムイオノフォアによる凝集をいずれも阻害するという特徴的な活性を示した (Table 1)。

そこで, さらに分取用 HPLC によりフラクション No. 4 (以後, シリカゲルフラクション No. 4 と呼ぶ) からの活性画分の分画を試みた (Fig. 3)。HPLC の溶出成分をピークごとに分取し活性を測定したところピーク A, B のみに活性が認められ (Table 2), 他のピークの活性は ADP に対しては 0~20%, アラキドン酸では 0~17% の範囲であった。活性が認められたピーク A, B はそれぞれ ¹H-NMR, ¹³C-NMR による構造解析を行ったところ, ピーク A はトリプトファンと推定された

Phytolacca americana suspension cells, 9ds, 1600g fr wt

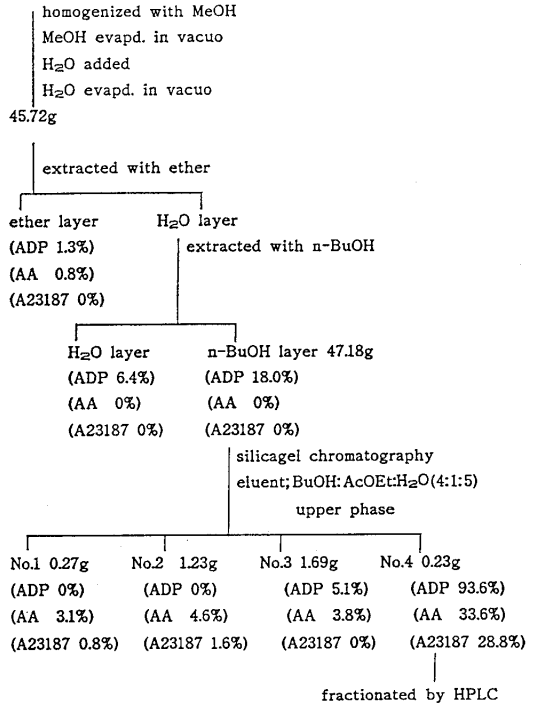


Fig. 1. Fractionation of the inhibitors of platelet aggregation. The values in parentheses indicate the inducers of aggregation and each fraction's activity (inhibition % at 500 μg/ml).

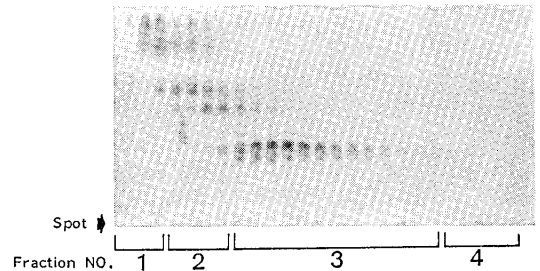


Fig. 2. Thin layer chromatogram of each fraction of silicagel column chromatography. Condition: gel plate, silicagel 60 F₂₅₄; developing solvent, *n*-BuOH: AcOEt: H₂O (4:1:5) upper phase; detection, conc. H₂SO₄ 110°C/15 min.

(データ省略)。また, ピーク B は ¹H-NMR (in D₂O) δ: 3.86 (2H, 5'-H), 4.29 (1H, 4'-H), 4.42 (1H, 3'-H), 4.80 (1H, 2'-H), 6.07 (1H, 1'-H), 8.24 (1H, 8-H), 8.36 (2H, 2-H) ¹³C-NMR (in D₂O) δ: 62.6 (5'-C)

Table 1. The activity of fraction No. 4 separated by silicagel column chromatography (%).

Exp. No.		Inducer		
		ADP	Sodium-arachidonic acid	A23187
Exp. 1	500 μ g/ml	93.6	33.6	28.8
Exp. 2	500 μ g/ml	52.7	98.3	—
Exp. 3	500 μ g/ml	62.7	100.0	—
Exp. 4	500 μ g/ml	82.0	86.0	97.0
Exp. 5	500 μ g/ml	100	—	—
	250 μ g/ml	100	—	—
	50 μ g/ml	95.1	100	—
	25 μ g/ml	90.2	—	—
Exp. 6	500 μ g/ml	86	—	—
	250 μ g/ml	76	—	—
	100 μ g/ml	46	—	—
	50 μ g/ml	33	—	—
	25 μ g/ml	17	—	—

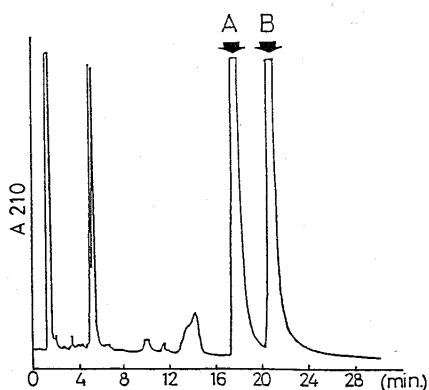


Fig. 3. HPLC chromatogram of silicagel fraction No. 4. Condition: column, CAPCELL PAK C₁₈ (10 mm i. d. \times 25 cm); mobile phase, 5% aqueous methanol (pH not adjusted), 4.5 ml/min; detection, UV 210 nm. Activities of peaks A and B were shown in Table 2. By ¹H- and ¹³C- NMR analyses, peaks A and B were identified as tryptophan and adenosine, respectively.

Table 2. The activities of peak A and B separated by HPLC (%).

Fraction	Inducer	
	ADP	Sodium-arachidonic acid
Peak A	100	20
Peak B	100	60~70

The pH of HPLC eluent was not adjusted.

71.4 (3'-C), 74.5 (2'-C), 86.6 (4'-C), 89.2 (1'-C), 119.6 (5-C), 141.58 (8-C), 149.4 (4-C), 153.5 (2-C), 156.6 (6-C) の核磁気共鳴スペクトルを示しアデノシンと推定された。ピーク B については UV 吸収スペクトル (λ_{\max} =258 nm), HPLC による保持時間がアデノシンとよく一致し, 血小板凝集阻害作用の特徴もよく一致することからアデノシンと同定した。アデノシンの含量は HPLC ピーク面積比によると, シリカゲルフラクション No. 3 に 0.7 mg/100 g dry wt, シリカゲルフラクション No. 4 に 40 mg/100 g dry wt それぞれ含まれるので培養細胞中には 40.7 mg/100 g dry wt 含まれていると推定された。

一方, ピーク A は主要成分としてはトリプトファンを含んでいたが, トリプトファンはそれ自身まったく活性を示さないで (データ省略) トリプトファン以外の活性物質の混在が示唆された。そこでピーク A に含まれる活性成分をさらに分析するため, HPLC の溶出液を塩酸により pH 2.7 に調製した 5% メタノールにしたところ, シリカゲルフラクション No. 4 は Fig. 4 のような溶出パターンを示し, フラクション No. 4 と No. 9 に活性がみられた (Table 3)。HPLC の保持時間および血小板凝集阻害活性の特徴より, フラクション

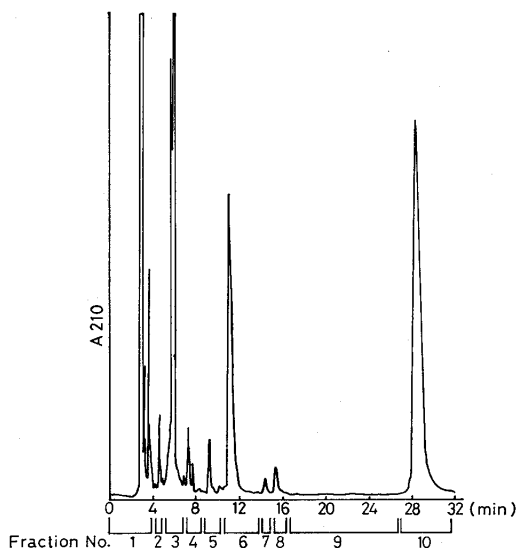


Fig. 4. HPLC chromatogram of silicagel fraction No. 4, in acidic mobile phase. Condition: column, CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm i. d. \times 25 cm); mobile phase, 5% aqueous methanol (pH 2.5), 1 ml/min; detection, UV 210 nm. Activities of each fractions by HPLC were shown in Table 3.

Table 3. The activities of HPLC fractions (%).

Fraction	Inducer		
	ADP	Sodium-arachidonic acid	A23187
No. 1	11	4	—
No. 2	0	0	—
No. 3	0	0	—
No. 4	60	8	—
No. 5	11	4	—
No. 6	25	8	—
No. 7	0	0	—
No. 8	4	0	—
No. 9	98	93	83
No. 10	14	3	—

HPLC eluent was adjusted to pH 2.5 with HCl.

No. 4 の活性はアデノシンによるものと推定されるが、フラクション No. 9 にはアデノシン以外の、UV 吸収を示さない活性成分が溶出していることが推定された。この物質の単離も試みたが、非常に微量であるかあるいは不安定であるために確実なフラクションとして追うことがむずかしく、現在まだ単離には至っていない。

続いて 5 l ジャーフェーマンターで 9 日間培養した細胞を濾集し、フラスコ培養細胞の場合と同様に抽出、分画、精製を行ったところアデノシンと保持時間の等しい位置に大きなピークを示し、そのピークを分取したところ強い血小板凝集阻害作用を示し活性の特徴はアデノシンとよく一致した。また、アデノシン含量はピーク面積比によると 160 mg/100 g dry wt と推定された。

4. 考 察

以上のように、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞より抽出された血小板凝集阻害画分には、多量のアデノシンが存在していることが明らかになった。

しかし、植物体内には、アデノシンを速やかにアデニンヌクレオチドへと変換するサルベージ経路が存在することが知られており^{9,10)}、液体懸濁培養細胞中でこのように多量のアデノシンが蓄積されているとは一般には考えにくい。実際、これまでに液体懸濁培養細胞中のアデノシン含量として *Datura*¹¹⁾、*Nicotiana*¹²⁾ について報告されているが、それらはいずれも 3.7×10^{-7} g/g fr wt, 2.4×10^{-7} g/g fr wt であり、ヨウシュヤマゴボウの約 1/10~1/200 量である。したがって、最終的に活性画分に含まれていたアデノシンは、もともと細胞内に存在していたもの以外に、抽出過程で細胞のホスファターゼにより AMP, ADP, ATP のリン酸が解離することによって二次的に生成されてきたものも、かなり含まれていると考えられる。しかし、ヨウシュヤマゴボウのア

デノシンおよびアデニンヌクレオチドの総量を計算してみると、その含量はフラスコ培養で 71 nmol/g fr wt, ジャー培養で 330 nmol/g fr wt であり、*Datura* (34.4 nmol/g fr wt)¹¹⁾、*Catharanthus* (49.7 nmol/g fr wt)¹³⁾、*Nicotiana* (58.4 nmol/g fr wt)¹²⁾ などの培養細胞やライムギ (40.3 nmol/g fr wt)¹⁴⁾、コムギ (42.2 nmol/g fr wt)¹⁴⁾、オオムギ (69.4 nmol/g fr wt)¹⁴⁾ の葉組織と比較して、特にジャー培養でその含量が高いことが特徴であった。また、生薬中のアデノシン含量としては紅花 (16~550 ppm, 産地により異なる)¹⁵⁾、サフラン (260 ppm)¹⁶⁾ についての報告がみられるがこれらと比較しても、ヨウシュヤマゴボウの活性画分に含まれるアデノシンは約 3~100 倍 (ジャー培養と比較) とかなり高い値であった。

ところで、今回の結果からはアデノシン以外の活性成分の存在も示唆されている (Fig. 3)。この画分は UV 吸収を示さなかったが、本物質が微量であるために UV 吸収を示さなかったとも考えられ、さらに検討が必要である。しかし、活性の特徴について見てみると、アデノシンは ADP による凝集のみを阻害するのに対して、シリカゲルフラクション No. 4 (Table 1) およびフラクション No. 9 (Table 3) は ADP, アラキドン酸, カルシウムイオノフォアのいずれの凝集をも阻害する作用がみられ、アデノシンの活性とは一致しない。したがって、この未知成分はアデノシンとは違うタイプの物質であると思われる。

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞を譲渡いただき、実験にあたって有益なご助言、ご指導を賜りました駒嶺穆教授 (東北大学理学部) に深く感謝致します。また、アデノシンの代謝に関して貴重な御助言を賜りました声原坦博士 (お茶の水女子大学理学部) にも深く感謝致します。

文 献

- 1) Woo, W. S., K. H. Shin, S. S. Kang, 1976. *Kor. J. Pharmacog.*, **7**: 47-54.
- 2) Woo, W. S., S. S. Kang, 1977. *J. Pharm. Soc. Korea*, **21**: 159-162.
- 3) Woo, W. S., S. S. Kang, O. Seligmann, V. M. Chari, 1978. *Planta Med.*, **34**: 87-92.
- 4) Chi, H. J., H. S. Kim, 1985. *Arch. Pharm. Res.*, **8**: 15-20.
- 5) Kang, S. S., W. S. Woo, 1987. *Planta Med.*, **53**: 338-340.
- 6) Sakuta, M., T. Takagi, A. Komamine, 1986. *J. Plant Physiol.*, **125**: 337-343.
- 7) Sakuta, M., 1987. *組織培養*, **13**: 374-378.

- 8) Linsmaier, E. M., F. Skoog, 1965. *Physiol. Plant.*, **18**: 100.
- 9) Guranowfki, A., J. Barankiewicz, 1979. *FEBS Lett.*, **104**: 95-98.
- 10) Hirose, F., H. Ashihara, 1984. *Physiol. Plant.*, **60**: 532-538.
- 11) Meyer, R., K. G. Wagner, 1985. *Planta*, **166**: 439-445.
- 12) Meyer, R., K. G. Wagner, 1985. *Physiol. Plant.*, **65**: 439-445.
- 13) Ashihara, H., X.-N. Li, T. Ukaji, 1988. *Ann. Bot.*, **61**: 225-232.
- 14) Sawert, A., A. Backer, K.-H. Plank-Schumacher, K. G. Wagner, 1987. *J. Plant. Physiol.*, **127**: 183-186.
- 15) 沓名 裕, 藤井誠史郎, 北村謙始, 小松一男, 中野幹清, 1988. *薬学雑誌*, **108**: 1101-1103.
- 16) 西本周充, 深谷 力, 横山和正, 西尾 孝, 松本充彦, 1988. *日本薬学会第 108 年会講演要旨集*, p. 292.

Summary

Inhibitors of Platelet Aggregation in *Phytolacca americana* Suspension Cells

Yoko GOZU, Mineyuki YOKOYAMA, Kenji KITAMURA, Ryujiro NAMBA*,
Seiichi YOSHIDA* and Susumu SETO

*Shiseido Basic Research Laboratories, Toxicological & Analytical Research Center**
1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223, Japan

Research was made on the existence of inhibitory substances of platelet aggregation in the methanol extract of *Phytolacca americana* suspension cells cultivated in Linsmaier and Skoog medium containing 5×10^{-6} M 2,4-D. Methanol extracts were subjected to further extraction by *n*-butanol. The extracts were purified by way of silicagel column chromatography and HPLC. At least two inhibitory substances were identified, one of which was adenosine which has been known to have a strong anti-aggregation activity. The yields of adenosine differed depending on the culture methods to be employed; 0.04% of dry weight of the cells by a flask culture and 0.15% by a jar culture, respectively. These values were much higher than those extracted from safflower or saffron reported in the literatures.