

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590025

研究課題名（和文） 睡眠調節物質オキシピナタニンの作用メカニズムの解明

研究課題名（英文） Research for the mechanism of sleep-promoting substance, oxypinnatanine

研究代表者

小西 天二（KONISHI TENJI）

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70102366

研究成果の概要（和文）：オキシピナタニンは、マウスの腹腔内および経口投与後の脳波測定により、経口投与においてのみ睡眠量の増加が認められた。また、血中濃度の検討で、経口投与時の血中濃度は非常に低いことがわかった。オキシピナタニンは体内で代謝を受け、作用する可能性が判明した。人工胃液、人工腸液での安定性、肝臓での代謝の検討から、胃、腸および肝臓で代謝されていないことがわかった。更に、サーモグラフィーを用いた体温測定により、オキシピナタニンは末梢血管の拡張作用に伴う熱放出により、睡眠改善効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：By the electroencephalographic measurement after intraperitoneally administration and oral administration of oxypinnatanine in mice, the increase in amount of sleep was observed only in the oral administration. And it was clear that the concentration in the blood showed lower level after an oral administration of oxypinnatanine from the measurement of the concentration of oxypinnatanine in the blood. It was clear that oxypinnatanine was metabolized in the body of the mouse and its metabolite showed the effect. We demonstrated that from consideration of the metabolism in the liver and the stability in the artificial intestinal fluid or artificial gastric fluid of oxypinnatanine, oxypinnatanine are not metabolized in the liver, stomach, and intestine. Possibility that oxypinnatanine show the sleep improvement effect by the heat release associated with peripheral vasodilation, was suggested from the results of temperature measurement using thermography.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生薬・天然物化学

キーワード：オキシピナタニン、睡眠改善物質、アミノ酸誘導体、アキノワスレグサ

1. 研究開始当初の背景

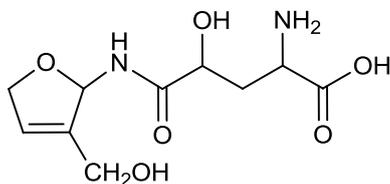
現代のストレス社会で不眠に悩む人が増

加している中、快適な睡眠を望む人はこれまで以上に増加している。不眠を改善する薬の

需要は益々高まっているが、睡眠薬の使用による様々な副作用がみられ、必ずしも自然な睡眠が得られるとはいえない。したがって、より快適な睡眠覚醒が得られる治療薬の開発は非常に重要と考え、天然薬物からの睡眠調節物質を探索することを考えた。

2. 研究の目的

民間薬として利用されているユリ科植物アキノワスレグサ (*Hemerocallis fulva* L. var. *sempervivrona* M. Hotta) の花や葉は、沖縄において不眠の際に食することが知られている。この植物は通称ニブイグサ (眠くなる草の意) と呼ばれ、眠れないときに食すると熟睡できるといわれており、本植物の乾燥粉末をマウスに経口摂取させたところ、マウスの睡眠量は有意に増加するという報告がある (Uezu, E. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 1998, 52(2), 136-137.)。しかし、活性成分やその活性メカニズムについては明らかにされていない。そこで、我々はラットおよびマウスを用いた脳波測定実験から、アキノワスレグサに含まれる鎮静、睡眠調節作用物質オキシピナタニンの単離に成功し、特許出願 (特願番号 2007-141608) を行った。本研究では、アキノワスレグサから単離した睡眠調節作用物質オキシピナタニンの作用機構を解明することを目的としている。



oxypinnatanine

3. 研究の方法

オキシピナタニンの睡眠改善効果について詳細に検討するため、以下の実験を行った。

(1) オキシピナタニンの睡眠改善効果

① 投与経路の違いによる活性の有無

10 週令の雄の C57BL マウスに脳波、筋電位測定用の電極の処理手術を行い、一定の回復期間を設けた。その後、明期と暗期を 12 時間サイクルで設定したチャンバー内でマウスを慣らして実験を行った。暗期の開始時刻に水または生理食塩水を、一方でオキシピナタニンを投与 (*i. p.* または *p. o.*) し、投与後 24 時間の脳波、筋電位および行動量を両群で比較した。データの解析は、睡眠解析システム "Sleep Sign" (キッセイコムテック社) を用いて行い、10 秒間を 1 エポックとして、脳波の波形や周波数成分から、(non-rapid eye movement) NREM, (rapid eye movement) REM 睡眠または覚醒のいずれかのステージに

判定した。

② 経口投与時の睡眠改善効果

オキシピナタニンは 10 mg/kg の経口投与後に活性を示した。そこで、マウスの脳波測定を用い、オキシピナタニンの有効濃度域を検討した。

③ 脳波解析を用いたオキシピナタニン作用メカニズムの検討

オキシピナタニンを経口投与した後の脳波を詳細に解析し、オキシピナタニンが脳波に及ぼす影響について検討した。

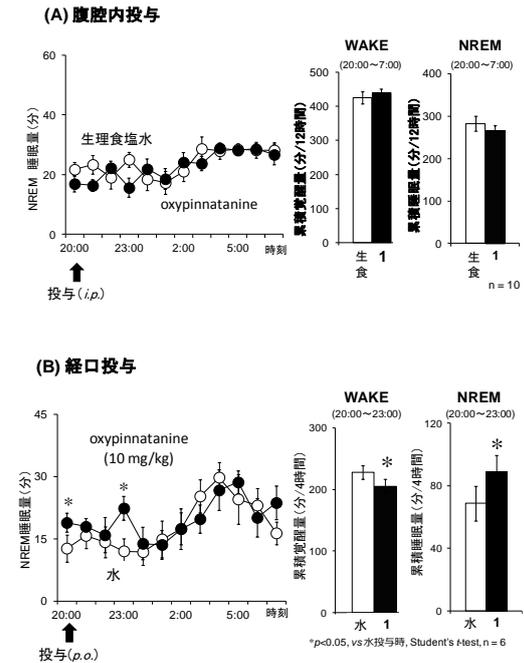


Fig. 1 オキシピナタニン投与後の睡眠改善効果

Time courses of the hourly amount of wakefulness, NREM sleep, and REM sleep for 24 h (A) after the administration of vehicle (○) or oxypinnatanine (●) at a dose of 10 mg/kg ($n = 6$). Each circle represents the hourly mean \pm SE of NREM sleep.

(2) 経口投与時と腹腔内投与時の血中濃度の比較

オキシピナタニンは、経口投与時のみに活性を示し、腹腔内投与時には活性を示さなかったことから、体内で代謝されて活性を示す可能性が考えられた。そこで、ラットにオキシピナタニン 30 mg/kg を経口投与または静脈内投与した後に頸部静脈から採血を行い、各時間の血中濃度について、蛍光検出法を用いた HPLC による分析を行った。

(3) オキシピナタニンの消化管における安定性

オキシピナタニンが消化管において代謝されている可能性が考えられたことから、人工胃液および人工腸液を作成し、オキシピナタニンの安定性について検討した。

(4) オキシピナタニンの肝臓における代謝の有無

オキシピナタニンの代謝経路について詳細に検討するため、肝ミクロソームを用いて肝臓への関与を検討した。

(5) オキシピナタニンが体温に及ぼす影響

睡眠は深部体温が低下し始めてから開始し、上昇して終了するといわれており、睡眠と体温には深い関係がある。そこで、サーモグラフィーを用いてオキシピナタニン投与後の体温変動を検討した。

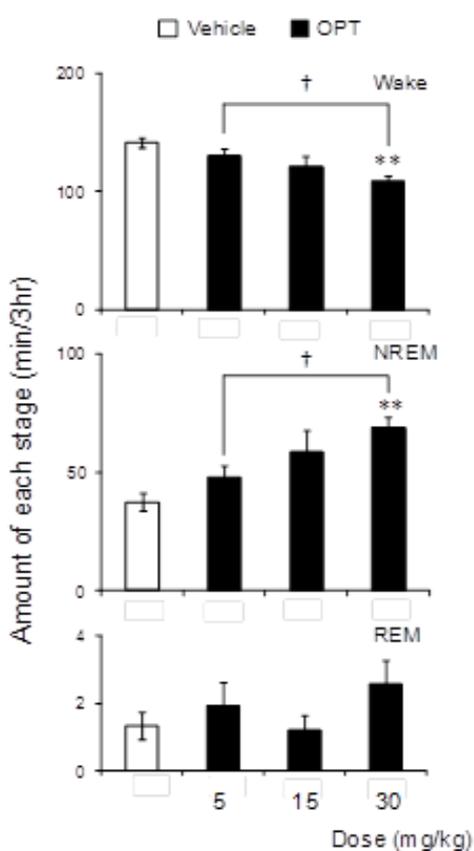


Fig. 2 Total time spent in wakefulness, NREM sleep and REM sleep for 3h after the administration of vehicle (open columns) and oxypinnatanine (closed columns) at a dose of 5, 15 or 30 mg/kg. Each value represents mean \pm SE (n=8). ** p <0.01, compared with vehicle control and † p <0.05 versus 5 mg/kg by one-way ANOVA with Sceff's test. F-value of wake: F (3, 28) = 2.9680, F-value of NREM: F (3, 28) = 2.9668.

4. 研究成果

(1) オキシピナタニンの睡眠改善効果

マウスの脳派測定を用い、オキシピナタニン投与後のマウスの睡眠改善効果について検討した。

① 投与経路の違いによる活性の有無

Fig. 1 に示す通り、オキシピナタニンは経口投与時には有意な睡眠改善効果を示し、腹腔内投与時には活性を示さなかった。したがって、オキシピナタニンは体内で代謝された後に活性を示すと考えられた。

② 経口投与時の睡眠改善効果

また、オキシピナタニンの投与量を変えて活性を比較したところ、Fig. 2 に示す通り、オキシピナタニンは 5-30 mg/kg の範囲内でマウスの NREM 睡眠量を濃度依存的に増加させることが明らかとなった。

③ 脳波解析を用いたオキシピナタニン作用メカニズムの検討

オキシピナタニン投与後のマウスの脳波を詳細に解析し、オキシピナタニンが脳波に及ぼす影響について検討した。その結果、Fig 3 に示す通り、オキシピナタニンは NREM 睡眠および覚醒の発現頻度を増加させた。一方、オキシピナタニンは Wake の持続時間を有意に短縮させたが、NREM 睡眠および REM 睡眠時には影響を示さなかった。

したがって、オキシピナタニンは、睡眠の導入や持続ではなく、覚醒の抑制に働いているのではないかと考えられた。

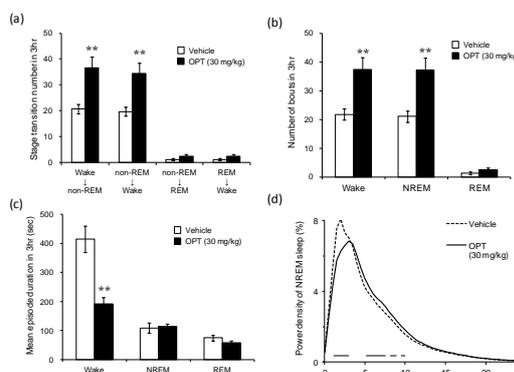


Fig. 3 An increase in NREM sleep by oxypinnatanine. Stage transition (A), number of bouts (B) and mean episode duration (C) during 3 h after the administration of vehicle (open columns) or oxypinnatanine at a dose of 30 mg/kg (closed columns) are shown. Each value represents mean \pm SE (n=8). * p <0.05, ** p <0.01 versus vehicle control by two-tailed paired t-test. (D) The EEG power spectrum was analyzed in a frequency range from 0 to 24.5 Hz

during NREM sleep for 3 hr after administration of vehicle or oxypinnatanine. The horizontal bars indicate where there is a statistical difference ($p < 0.05$, paired t-test) between oxypinnatanine and vehicle control.

(2) 経口投与と腹腔内投与時の血中濃度の比較

オキシピナタニンとは、経口投与時のみに活性を示し、腹腔内投与時には活性を示さなかったことから、体内で代謝されて活性を示す可能性が考えられた。そこで、ラットにオキシピナタニン 30 mg/kg を経口投与と静脈内投与した際の血中濃度について、蛍光検出法を用いた HPLC を用いて測定した。その結果、Fig. 4 に示す通り、経口投与時の血中濃度は静脈内投与の時と比較して非常に少ない値であることが明らかとなった。したがって、オキシピナタニンは体内で代謝され、代謝体が睡眠改善効果を示していると考えられた。

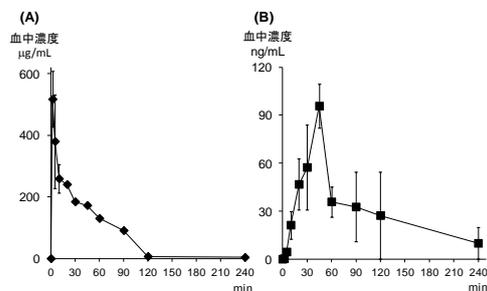


Fig. 4 Blood level of oxypinnatanine (A): intravenous administration of rats (B): oral administration of rats. Each value represents mean \pm SE (n=3).

(3) オキシピナタニンの消化管における安定性

オキシピナタニンの体内動態について検討するため、オキシピナタニンの消化管における安定性について人工胃液および人工腸液を用いて検討した。その結果、Fig. 5 に示す通り、人工胃液および人工腸液の何れにおいてもオキシピナタニンは安定であることが分かった。したがって、オキシピナタニンはそのままの構造で胃または腸を通過し、吸収されていると考えられた。

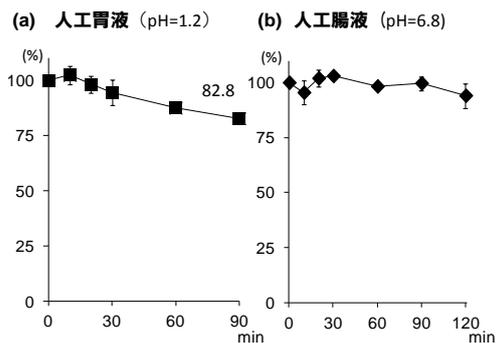


Fig. 5 The stability of oxypinnatanine in (a) artificial gastric juice or (b) artificial intestinal juice. Each value represents mean \pm SE (n=3).

(4) オキシピナタニンの肝臓における代謝の有無

次に、肝臓での初回通過効果について検討するため、肝ミクロソームを用いて肝臓での代謝の有無を検討した。その結果、Fig. 6 に示す通り、肝ミクロソーム中において大きな変動を示さず、一定の値を示した。したがって、オキシピナタニンは肝臓での代謝を受けていない可能性が考えられた。詳細については、現在検討中である。

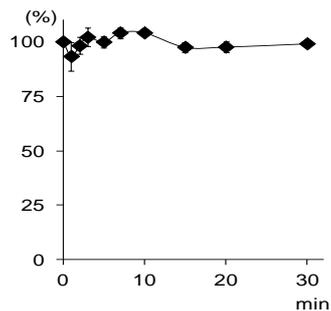


Fig. 6 The stability of oxypinnatanine in hepatic microsome Each value represents mean \pm SE (n=3).

(5) オキシピナタニンが体温に及ぼす影響

睡眠は深部体温が低下しはじめてから開始され、上昇してから終了するといわれており、睡眠と体温には深い関係がある。アミノ酸のグリシンは、末梢血管の拡張に伴う熱放出により睡眠改善効果を示すとされることから、サーモグラフィーを用いてグリシン投与後の体温変動を測定した。その結果、Fig. 7a に示す通りマウスの体温は末梢血管の拡張作用に伴う一過性の上昇が認められ、その後徐々に低下する傾向を示した。

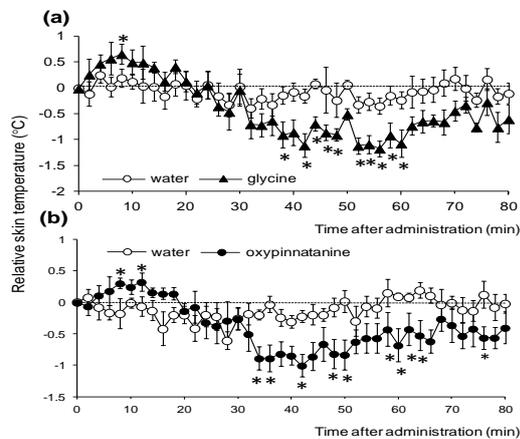


Fig. 7 The effect of glycine or capsaicin on the skin temperature of mice.

○: water group, (a); ▲: glycine (2 g/kg, *p.o.*), (b); ●: oxypinnatanine (30 mg/kg, *p.o.*) administration group (*n* = 5). Each circle represents the mean ± S.E. of the difference of the normal skin temperature of each mouse. **p*<0.05 versus water group by student's *t*-test after two-way analysis of variance was used to test for statistical differences (*p*<0.05).

次に、オキシピナタニン投与後の体温を測定したところ、投与後の体温はグリシンと同様の傾向を示した (Fig. 7b)。したがって、オキシピナタニンの睡眠改善効果に関するメカニズムの1つとして、末梢血管の拡張作用に伴う熱放出が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yuko Ogawa, Nahoko Uchiyama, Tenji Konishi and Yoshihiro Urade, Oxypinnatanine promotes non-rapid eye movement sleep in mice, *Sleep and Biological Rhythms*, 11, 40-45 (2013).
- ② Y Ogawa, A Minamizawa, S Tada, T Konishi, The Variation of Body Temperature After Administration of Amino Acid Amides, *Research Journal of Phytochemistry*, in press (2013): <http://scialert.net/qredirect.php?doi=rjphyto.2013.51032.51032&linkid=pdf>.

[学会発表] (計6件)

- ① 小川優子, 宇都宮千愛, 小西天二, 睡眠改善物質 oxypinnatanine の活性メカニズムに関する検討, 日本薬学会第132年会(横浜), 2013. 3. 29, パシフィコ横浜.
- ② 小川優子, 内山奈穂子, 裏出良博, 小西天二, 天然薬物に含まれる睡眠改善物質の探索 -オキシピナタニンの睡眠改善効果-, 第19回天然薬物の開発と応用シンポジウム(大阪), 2012. 11. 1, 大阪大学.
- ③ 木下彩, 小川優子, 小西天二, 睡眠改善物質 oxypinnatanine の活性メカニズムの解明 -Oxypinnatanineの肝ミクロソームによる代謝-, 日本薬学会第132年会(北海道), 2012. 3. 30, 北海道大学.
- ④ 小川優子, 松本直実, 内山奈穂子, 裏出

良博, 小西天二, Oxypinnatanine および kwansonine A の睡眠改善効果—消化管における安定性—, 日本薬学会第131年会(静岡), 2011. 3. 31, 静岡大学.

- ⑤ Y. Ogawa, N. Matsumoto, N. Uchiyama, Y. Urade, T. Konishi, Sleep-Promoting Components from Natural Medicines -Glutamic Acid Derivatives in *Hemerocallis fulva* var. *sempervirens*-, Pacificchem 2010, (Hawaii), 2010. 12. 8, USA.
- ⑥ Yuko Ogawa, Naomi Matsumoto, Nahoko Uchiyama, Yoshihiro Urade, Tenji Konishi, Sleep-promoting constituents from *Hemerocallis fulva* var. *sempervirens*, The 5th JSP-CCYNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (Tokushima), 2010. 9. 24, Tokushima Bunri Daigaku.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 睡眠改善剤
発明者: 小川優子, 小西天二, 裏出良博, 黄志力, 松本直美
権利者: 株式会社 クレイ沖縄
種類: 特許
番号: 2010-062620号
出願年月日: 2010年3月18日
国内外の別: 国内

[その他]

同志社女子大学研究者データベース
<http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/up/faces/up/kg/Kgb00201A.jsp>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
小西 天二 (KONISHI TENJI)
同志社女子大学・薬学部・教授
研究者番号: 70102366
- (2) 研究分担者
中村 憲夫 (NAKAMURA NORIO)
同志社女子大学・薬学部・准教授
研究者番号: 90377268
小川 優子 (OGAWA YUKO)
同志社女子大学・薬学部・助教
研究者番号: 00454497
- (3) 連携研究者
東 朋子 (TOMOKO HIGASHI)
大阪バイオサイエンス研究所・研究員
研究者番号: 90400134

正木 美佳 (MASAKI MIKA)
大阪バイオサイエンス研究所・研究員
研究者番号：80455245
松本 直美 (MATSUMOTO NAOMI)
大阪バイオサイエンス研究所・研究員
研究者番号：60450246