

鈎藤鈎アルカロイドの薬物動態に関する研究

串田 浩孝

株式会社ツムラ ツムラ研究所 〒300-1192茨城県稲敷郡阿見町吉原3586

Pharmacokinetic study of Uncaria hook alkaloids

Hiroataka Kushida

TSUMURA Research Laboratories, TSUMURA&Co.,
3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-1192, Japan

Abstract

Uncaria hook is the main component of some Kampo medicines such as yokukansan, yokukansankachinpihange, chotosan, and shichimotsukokato, which are used to treat anxiety and high blood pressure. Uncaria hook contains various alkaloid ingredients such as corynoxine (CX), isocorynoxine (ICX), rhynchophylline (RP), isorhynchophylline (IRP), hirsuteine (HTI), hirsuteine (HTE), and geissoschizine methyl ether (GM). However, the pharmacokinetics of these compounds is yet unclear. In this study, we studied the pharmacokinetic properties of these alkaloids.

This study consists of three chapters. In the first chapter, we developed and validated a simultaneous quantification method for Uncaria hook alkaloids using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The results of stability experiments indicate that all analytes were stable under conditions mimicking situations likely to be encountered during sample preparation, sample storage and post-treatment. This method was applied to obtain the pharmacokinetics of Uncaria hook alkaloids in the plasma and brain of rats after oral administration of yokukansan. RP, HTI, HTE, and GM were detected in the plasma, but only GM was found in the brain. This observation suggests that GM is important for the pharmacological effects of yokukansan.

In the second chapter, we present the metabolic profile of GM. The GM metabolites in the rat and human liver microsomes were examined using the developed LC/MS/MS method. Thirteen metabolites were detected and identified. There were two demethylation metabolites (M1-1 and M1-2), one dehydrogenation metabolite (M2-1), three methylation or oxidation-dehydrogenation metabolites (M3-1, M3-2, and M3-3), three oxidation metabolites (M4-1, M4-2, and M4-3), two water-adduct metabolites (M5-1 and M5-2), one di-demethylation metabolite (M6-1), and one water-adduct metabolite after oxidation (M7-1). The main metabolic routes for the production of these compounds were demethylation, dehydrogenation, methylation, oxidation, and water-adduct metabolism. To determine which metabolizing enzymes are involved in GM metabolism in the human liver microsomes, we examined the relative activity factors of individual cytochrome P450 (CYP) isoforms. We found that CYP3A4 was primarily responsible for GM metabolism.

In the third chapter, we examined the distribution of GM in the brain. Specific [³H]-GM binding sites were determined using quantitative autoradiography in rat brain sections. The maximum binding densities and dissociation constants were obtained, employing a competitive binding assay in [³H]-GM-treated brain sections using

various ligands. Strong binding was observed in the frontal cortical region, including the prefrontal cortex, pre-
limbic cortex, and orbitofrontal cortex. The competitive binding assay using various ligands showed that GM
mainly bound to serotonin (5-HT) receptors, such as 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, or 5-HT₇ and to
adrenergic α_{2A} and μ -opioid receptors. A microautoradiographic assay to identify the cells that bind [³H]-GM
showed that the [³H]-GM signals were distributed in neuron-like large cells. These findings provide valuable
insight into the neuropharmacology of GM after the oral administration of the Uncaria hook-containing Kampo
medicine.

In conclusion, our LC/MS/MS simultaneous quantification method can be employed in the pharmacokinetic
studies of Kampo medicines, including Uncaria hook derivatives. The proposed GM metabolic pathway would
supply useful information on the drug–drug interactions and side effects observed in clinical practice. The result
of GM binding in the brain contributes to elucidation of the pharmacological mechanisms of Kampo medicines
including GM and Uncaria hook alkaloids. Our achievement of this study provides information for further studies
regarding the pharmacokinetics and pharmacodynamics of Kampo medicines.

Keywords: Uncaria hook, geissoschizine methyl ether, pharmacokinetics, metabolic profile, specific binding site
in brain

【緒言】

釣藤鈎 (ちょうとうこう, *Uncariae Uncis cum Ramulus, Gambir Plant, Morning Star*) は、アカネ科 (Rubiaceae)
のカギカズラ (釣藤 *Uncaria rhynchophylla* Miquel, 華釣藤 *Uncaria sinensis* Haviland 又は大葉釣藤 *Uncaria
macrophylla* Wallich) を基原とする鈎棘の付着した茎枝の薬用部位である。本生薬は、古来より名医別録
下品など多くの本草書に記載されており、小児の驚癇、発疹、疳症、頭痛、眩暈に効果があると記載され
ている。

この釣藤鈎を配合する漢方処方には、不安症を主訴とする患者に対して抑肝散や抑肝散加陳皮半夏、高
血圧を主訴とする患者に対して釣藤散や七物降下湯などがあり、現在も臨床において頻用されている処方
である。最近では、釣藤散による脳血管障害性認知症や抑肝散による認知症周辺症状 (BPSD) に対する有
効性が二重盲検試験により検証されている^(1, 2)。特に抑肝散は、BPSDの他に、統合失調症や睡眠障害な
どに対しても効果的であることが報告されている^(3, 4)。これら漢方処方の作用を担う構成生薬の一つが釣
藤鈎である。これまでの基礎研究から、釣藤鈎には、corynoxine (CX), isocorynoxine (ICX),
rhynchophylline (RP), isorhynchophylline (IRP), hirsutine (HTI), hirsuteine (HTE) 及び geissoschizine methyl
ether (GM) (Fig. 1) などのインドール系及びオキシインドール系アルカロイドが含まれており、これら成
分が血圧降下作用^(5, 6)、睡眠鎮静作用^(5, 7)、精神安定作用^(8, 9, 10)、鎮痙作用⁽¹¹⁾、セロトニン (5-HT) 調節
作用⁽¹²⁾、脳細胞保護作用^(13, 14)、血管拡張作用^(15, 16, 17, 18) 及び神経保護作用^(19, 20) などの薬理作用を担う
有力な活性成分であろうと考えられている。

一方で、医療用漢方製剤の普及は著しく、医師に対する使用調査では漢方薬処方経験医師の割合が上
市された1976年で2割程度であったものが2003年では既に9割に達している⁽²¹⁾。また、最近の調査状況
では、8割以上の医師が西洋薬との併用で用いており、留意点として薬物相互作用を挙げている^(22, 23)。特
に現在の高齢化社会においては、それに伴う認知症、高血圧、癌などの高齢化疾患の発生頻度も高くなっ
ており、漢方薬の需要や西洋薬との併用の割合も益々増えていくものと推測される。特に身体的虚弱傾向
にある高齢者にとっては、薬物相互作用や副作用についての情報は重要となる。

しかしながら、生薬や漢方製剤の薬物相互作用や副作用に関わるそれらの成分の吸収、分布、代謝及び

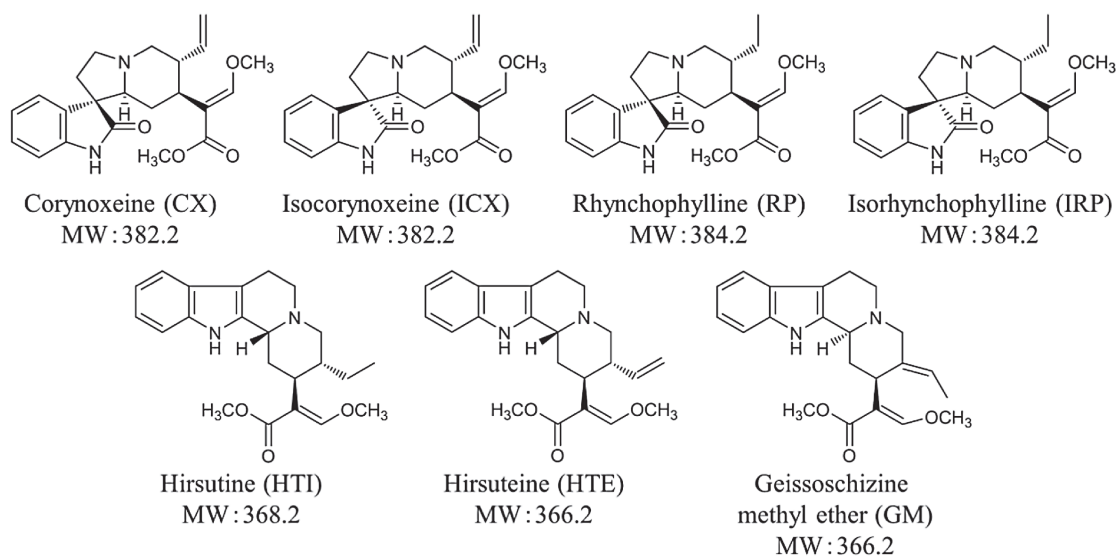


Fig. 1 The chemical structures of *Uncaria hook* alkaloid.

排泄といった、いわゆる薬物動態学的研究はほとんど行われていない。それは、漢方薬が複数生薬からなる多成分系合剤であるためである。漢方薬の薬物動態学的研究を行うためには、その中から生体作用成分を先ず見つけ、それらを検出する分析法を確立する必要がある。そこで、本研究では、釣藤鈎アルカロイドの高速液体クロマトグラフィー／直列型質量分析装置 (LC/MS/MS) 一斉定量法を構築し、釣藤鈎を含む種々漢方薬の薬物動態の解明という大きな課題の基盤となる釣藤鈎アルカロイドの薬物動態について検討した。本論文ではそれらの成果を3章に分けて論述した。

第1章 釣藤鈎アルカロイドの体内動態

本章第1節では、先ず釣藤鈎の薬効成分であるアルカロイドに焦点をあて、LC/MS/MSを用いた7種のインドール系及びオキシインドール系アルカロイドの特異的高感度一斉定量法を開発し、本法によって得られる測定値の信頼性を担保するため、安定性など含むバリデーションを米国食品医薬品局 (FDA) のガイドライン「Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation (2001)」に従い検討した。その結果、ラット血漿及び脳中の測定試料中の釣藤鈎アルカロイド成分は、2か月間以内の -20°C での冷凍保存、実験中の試料の暴露環境 (4時間室温放置、24時間 10°C オートサンプラー内放置及び -20°C /室温の凍結融解の3回繰り返し) において安定であり、この条件下で保存された試料を測定することにより信頼性のある定量値が担保できることを実証した。

第2節では、前節で開発した釣藤鈎アルカロイドのLC/MS/MS一斉定量法を構成生薬として釣藤鈎を含む漢方薬・抑肝散の薬物動態研究に応用した。一晩絶食させたラットに抑肝散 (0.25, 1及び4 g/kg) を経口投与し (各 n=3), 投与0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 及び24時間後の血漿及び脳中の7種の釣藤鈎アルカロイドをLC/MS/MSを用いて定量した。Fig. 2には血漿中に検出された4成分 (RP, HTI, HTE及びGM) の経時的濃度変化を示す。いずれの成分も抑肝散投与後30~60分の t_{max} , 用量依存的なAUCを示した。また, Fig. 3には、脳中で唯一検出されたGMの経時的濃度変化を示す。GMの濃度-時間曲線のパターンは、血漿と類似していた。

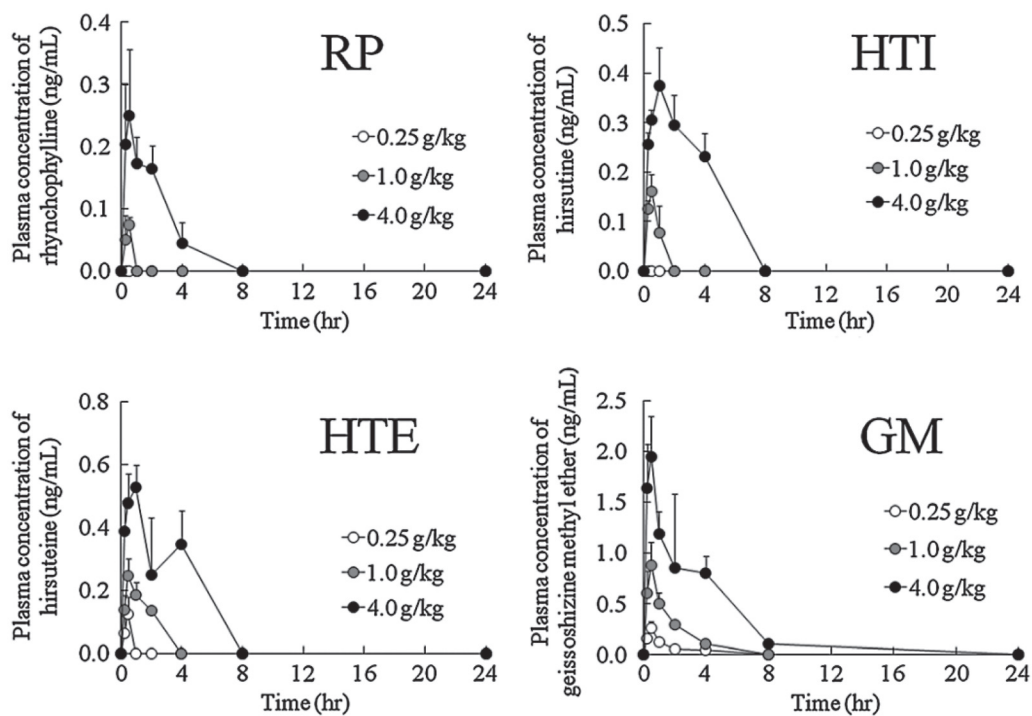


Fig. 2 Concentrations of RP, HTI, HTE and GM in the plasma after oral administration of Yokukansan at 0.25, 1 and 4 g/kg to rats. Each point represents the mean \pm SD (n=3).

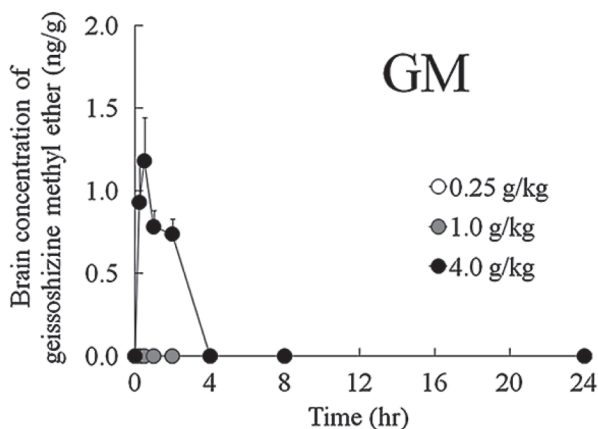


Fig. 3 Concentration of GM in the brain after oral administration of Yokukansan at 0.25, 1, and 4 g/kg to rats. Each point represents the mean \pm SD (n=3).

以上の結果から、釣藤鈎アルカロイド成分の内、RP、HTI、HTE及びGMが血中から検出され、特にGMが唯一脳中から検出されることを示し、この成分がアルカロイド成分の中でも中枢作用を担う重要な成分であることを見出した。

第2章 GMの薬物代謝

GMは検討した7種のアルカロイドの中で唯一脳中から検出された。また、本成分はアルカロイドの中でも血管拡張作用、各種5-HT受容体結合作用及び神経細胞保護作用などの薬効力価が高い。これらの知見から、GMの代謝プロファイルを明確にすることは、薬効や他剤との併用による薬物相互作用を考える上で非常に重要である。

そこで、本章第1節では、GMの代謝プロファイルを明らかにするため、GMにラットまたはヒト肝ミクロソームを作用させどのような代謝物が生成されるかを前章で開発したLC/MS/MS分析法を用いて検討した。その結果、ラットまたはヒト肝ミクロソームのいずれにおいても、Fig. 4に示したような13個の代謝物が検出された。

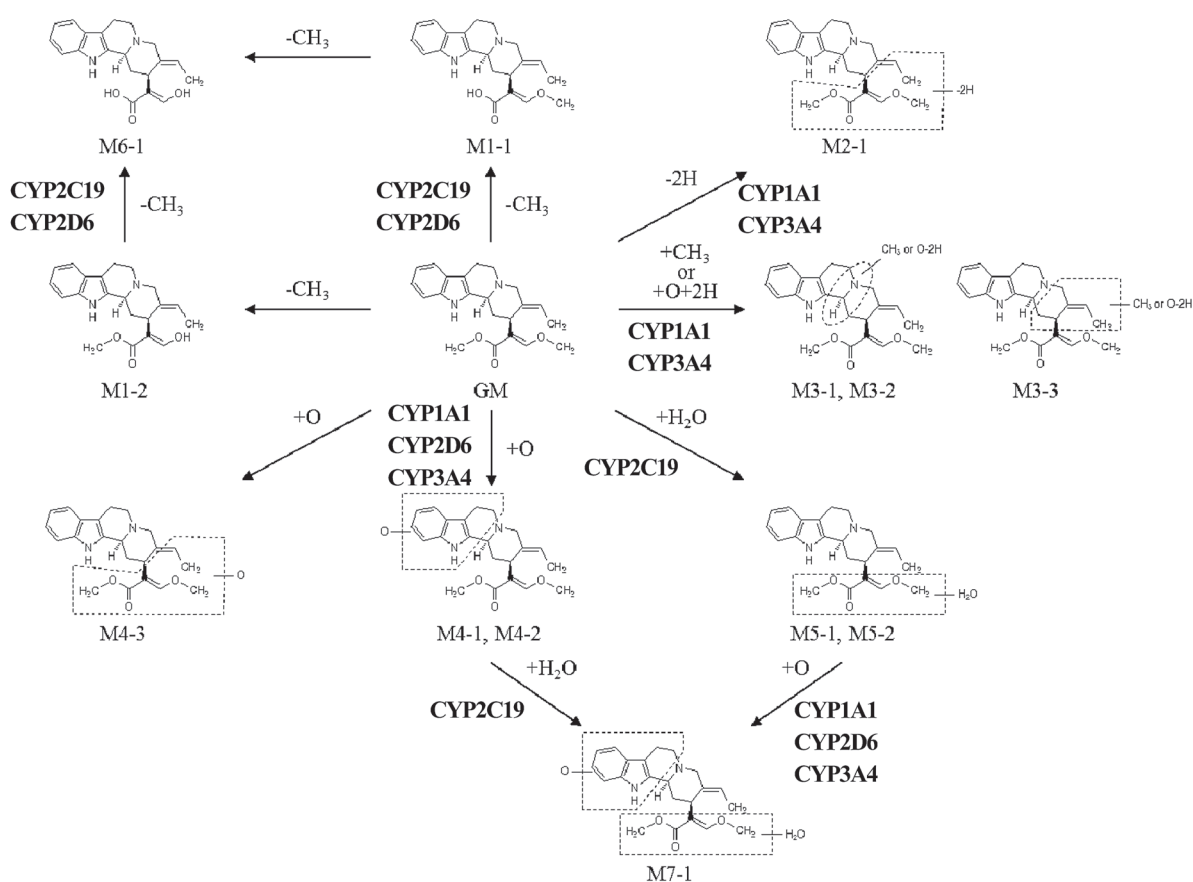


Fig. 4 Proposed in vitro metabolic pathways of GM in rat and human microsomes and human CYP isoforms involved in the metabolism of GM.

MS/MS解析の結果、これらの代謝物は、主に五つの経路(脱メチル化反応、脱水素化反応、メチル化反応、酸化反応及び水付加代謝)により生成されるものと推定された。即ち、二種類の脱メチル化代謝物(M1-1及びM1-2)、一種類の脱水素化代謝物(M2-1)、三種類のメチル化または酸化脱水素化代謝物(M3-1, M3-2及びM3-3)、三種類の酸化代謝物(M4-1, M4-2及びM4-3)、二種類の水付加代謝物(M5-1及びM5-2)、一種類の二脱メチル化代謝物(M6-1)及び一種類の酸化水付加代謝物(M7-1)であった。

本成果は、ヒト及びラット肝ミクロソームにおけるGMの薬物代謝を提示した初めての報告であり、釣

藤鈎を構成生薬とする漢方薬の薬物動態学と薬力学の今後の研究に大きく貢献するものと思われる。

第2節では、GMの代謝に関与する代謝酵素について検討した。GMと構造が類似するHTIとHTEがラット肝シトクロムP450 (CYP) によって代謝されることが報告されている⁽²⁴⁾。このことから、GMもまたCYPによって代謝される可能性が推察されたため、CYP、フラビンモノオキシゲナーゼ及びUDPグルコニルトランスフェラーゼなどの薬物代謝酵素が含まれるヒト肝S9画分を用いて第1節で認められたGMの代謝物生成に関与する薬物代謝酵素がCYPであるか否かをまず検討した。

GMとヒト肝S9を反応させたところ、GM未変化体のピーク面積値は大きく減少した。また、このGMピーク面積の減少はCYPの非特異的阻害剤1-aminobenzotriazoleの添加により有意に抑制された。この結果からGMの代謝にCYPが関わっていることが示唆された。そこで、組み換えヒトCYP分子種発現系によるGM代謝とヒト肝ミクロソームにおけるポリクローナル抗体を用いたGM代謝阻害を検討し、これらGM代謝反応に関わるヒトCYP分子種の候補選定を行った。その結果、M1-1はCYP2C19及びCYP2D6、M2-1はCYP1A1及びCYP3A4、M3-1及びM3-2はCYP3A4、M3-3はCYP1A1及びCYP3A4、M4-1はCYP1A1及びCYP3A4、M4-2はCYP1A1及びCYP2D6、そしてM5-1及びM5-2はCYP2C19によって代謝生成されることが示唆された (Fig. 4)。また前節において、M3-1～M3-3をGMのメチル化または酸化脱水素化代謝物と推定したが、CYPはメチル化反応を触媒しないと考えられることから、M3-1～M3-3はメチル化代謝物ではなく酸化脱水素化代謝物であることが示唆された。

さらに、選定したCYP分子種からGM代謝に関わるCYPを同定するため、その寄与率を $RAF_{CYPisoform}$ (Relative Active Factor) 値と組み換えCYP分子種を用いたGM代謝の $CL_{rec-CYPisoform}$ を用いて算出した。その結果、CYP3A4が一番高く、61.3%、続いてCYP2C19が23.5%、CYP2D6が15.2%であった。この結果から、CYP3A4がGM代謝に最も寄与していることが明らかとなった。以上のように、GMの代謝酵素を明確にしたことは、臨床で併用される可能性のある西洋薬との薬物相互作用や副作用を予見するうえで非常に重要なことである。

第3節では、抑肝散を経口投与したラットの脳内にGMのほかにその代謝物が存在するかどうか、また存在するならばその代謝物がGMと同じような5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用を持つかどうかについて検討した。抑肝散 (4 g/kg) を経口投与した1時間後のラット脳にはGMに加え、主にその代謝物である23-O-脱メチルGM (M1-1) が検出されたが、そのほかの代謝物はほとんど検出されなかった。また、この代謝物がGMと同様な5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用があるか否かを *in vitro* [³⁵S] GTPγS 結合試験を用いて調べたところ、受容体に対する結合性はほとんど認められなかった。この結果は、少なくとも脳内における5-HT作用はGMに依存するもので、その活性は脱メチル化されることにより不活化されることを示唆した。

以上、本章では釣藤鈎アルカロイドの中でも最も薬効力価が高いと推察されているGMに焦点をあて、その薬物代謝について初めて明らかにした。

第3章 GMのラット脳内結合部位の特定とその特性

GMが釣藤鈎含有処方の中枢作用を担う活性物質候補の一つであること、また血液脳関門を通過して脳内に移行することは既に報告されているが⁽²⁵⁾、脳のどの領域でどのような分子と結合しているかについては全く判っていない。そこで、本章第1節では、トリチウム標識GM ([³H] GM) を用いたラット脳切片の定量的オートラジオグラフィーを行いGMの脳内結合部位を検討した。その結果、 [³H] GMの放射活性は脳の広範囲に検出された (Fig. 5)。さらにスキッチャードプロット解析を行ったところ、特に前頭前野、

前辺縁皮質，眼窩前頭皮質を含む前頭皮質領域に高親和性のGM結合分子が高密度に存在していることが明らかになった。

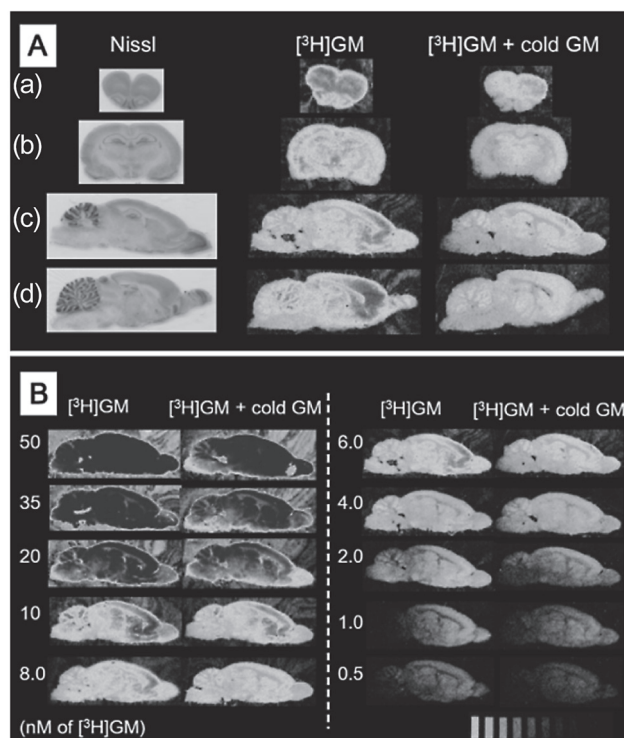


Fig. 5 Autoradiograms of $[^3\text{H}]$ GM binding in rat brain tissue.

(A) Representative autoradiograms of $[^3\text{H}]$ GM binding in the four planes of the brain slice. $[^3\text{H}]$ GM binding was detected in several brain regions, and was clearly decreased in the presence of cold GM. (B) Dose-dependency of $[^3\text{H}]$ GM binding. $[^3\text{H}]$ GM binding was increased with rising its concentration, and was partially reduced by cold GM.

第2節では，GMの結合分子を同定するために，同様な脳切片を用いた $[^3\text{H}]$ GMのオートラジオグラフィにおいて各種受容体リガンドと競合的結合試験を行った。5-HT_{1A}受容体アゴニスト (DPAT)，5-HT_{2A}受容体アンタゴニスト (ketanserin)，5-HT_{2B}受容体アゴニスト (BW 723 C 86)，5-HT_{2C}受容体アゴニスト (RO 60-0175)，5-HT₇受容体アンタゴニスト (SB 269970)，アドレナリン α_{2A} 受容体アンタゴニスト (yohimbine)，ドーパミンD₂受容体アンタゴニスト ((S)-(-)-sulpiride)，L型Ca²⁺チャネルブロッカー (verapamil)， μ -オピオイド受容体アンタゴニスト (naloxone) をリガンドとして用いたところ，小脳を除く前辺縁皮質，内側前頭前野，眼窩前頭皮質を含む前頭皮質及び縫線核において，5-HT_{1A}，5-HT_{2A}，5-HT_{2B}，5-HT_{2C}，5-HT₇受容体などの5-HT受容体やアドレナリン α_{2A} 受容体，Ca²⁺チャネル受容体， μ -オピオイド受容体などに競合拮抗性が認められた。これらの結果は，これら受容体がGMの結合分子であることを示唆した。

最後に第3節において，GM結合分子が結合部位でどの細胞に存在しているかを証明するため， $[^3\text{H}]$ GMの乳剤マイクロオートラジオグラフィを用いて標的細胞の同定を行ったところ，前頭皮質及び縫線核の大型及び小型細胞や細胞外マトリクスに $[^3\text{H}]$ GM陽性シグナル (黒色の銀粒子) が標識された。これらの結

果から、GM結合分子は神経細胞（大型細胞）、非神経細胞（小型細胞）や神経突起（細胞外マトリクス）に発現していることが示唆された。

本章をまとめると、脳内にはGMの特異的結合部位が広範に存在し、その中で特に前頭前野、前辺縁皮質、眼窩前頭皮質を含む前頭皮質領域に高親和性のGM結合分子が高密度に存在しており、その結合分子は神経細胞（大型細胞）、非神経細胞（小型細胞）や神経突起（細胞外マトリクス）に発現している5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₇受容体などの5-HT受容体やアドレナリン α_{2A} 受容体、Ca²⁺チャンネル受容体、 μ -オピオイド受容体などであることが示唆された。

以上、本研究の成果の内、特異的高感度LC/MS/MS一斉定量法は、今後、抑肝散だけでなく釣藤鈎を構成生薬として含む抑肝散加陳皮半夏、釣藤散、七物降下湯などの動物さらにはヒトでの薬物動態学的研究に幅広く応用される分析法である。また、釣藤鈎アルカロイドの主要成分GMの代謝経路の提唱は、臨床での薬物相互作用や副作用の今後の研究の基盤をなすものである。さらにGMの脳内結合性に関する知見は、GM（釣藤鈎）を含有する漢方薬の薬理学的作用（薬力学的研究）の解明に貢献するものである。本論文の成果／新知見は今後の漢方薬の薬物動態や薬力学的研究に応用され、患者をはじめ、医師や薬剤師などの多く医療関係者がこれまで以上に安心して使える漢方薬の研究に役立つものと考えられる。

【参考文献】

- 1) Terasawa, K.; Shimada, Y.; Kita, T.; Yamamoto, T.; Tosa, H.; Tanaka, N.; Saito, Y.; Kanaki, E.; Goto, S.; Mizushima, N.; Fujioka, M.; Takase, S.; Seki, H.; Kimura, I.; Ogawa, T.; Nakamura, S.; Araki, G.; Maruyama, I.; Maruyama, Y.; Takaori, S. Choto-san in the treatment of vascular dementia: a double-blind, placebo-controlled study. *Phytomedicine* **1997**, *4*, 15–22.
- 2) Iwasaki, K.; Satoh-Nakagawa, T.; Maruyama, M.; Monma, Y.; Nemoto, M.; Tomita, N.; Tanji, H.; Fujiwara, H.; Seki, T.; Fujii, M.; Arai, H.; Sasaki, H. A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J. Clin. Psychiatry*. **2005**, *66*, 248–252.
- 3) Miyaoka, T.; Furuya, M.; Horiguchi, J.; Wake, R.; Hashioka, S.; Tohyama, M.; Mori, N.; Minabe, Y.; Iyo, M.; Ueno, S.; Ezoe, S.; Murotani, K.; Hoshino, S.; Seuo, H. Efficacy and safety of yokukansan in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (a Positive and Negative Syndrome Scale, five-factor analysis). *Psychopharmacol.* **2015**, *232*, 155–164.
- 4) Shinno, H.; Utani, E.; Okazaki, S.; Kawamukai, T.; Yasuda, H.; Inagaki, T.; Inami, Y.; Horiguchi, J. Successful treatment with Yi-Gan San for psychosis and sleep disturbance in a patient with dementia with Lewy bodies. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2007**, *31*, 1543–1545.
- 5) 榊原 巖, 高橋宏之, 譲原光利, 加藤孝之, 久保正良, 林 紘司, 石毛 敦, 雨谷 栄, 岡田 稔, 丸野政雄. 釣藤鈎の研究（第1報）華鈎藤の科学的評価. *Nat. Med.* **1997**, *51*, 79–83.
- 6) 榊原 巖, 寺林 進, 久保正良, 樋口正視, 佐々木博, 岡田 稔. 釣藤鈎の研究（第三報）釣藤の血圧降下作用成分と抽出過程での含量変化. *Nat. Med.* **1999**, *53*, 308–312.
- 7) Sakakibara, I.; Takahashi, H.; Terabayashi, S.; Yuzurihara, M.; Kubo, M.; Ishige, A.; Higuchi, M.; Komatsu, Y.; Okada, M.; Maruno, M.; Biqiang, C.; Jiang, HX. Effect of oxindole alkaloids from the hooks of *Uncaria macrophylla* on thiopental induced hypnosis. *Phytomedicine* **1998**, *5*, 83–86.
- 8) Sakakibara, I.; Terabayashi, S.; Kubo, M.; Higuchi, M.; Komatsu, Y.; Okada, M.; Taki, K.; Kamei, J. Effect

- on locomotion of indole alkaloids from the hooks of uncaria plants. *Phytomedicine* **1999**, 6, 163–168.
- 9) Nishi, A.; Yamaguchi, T.; Sekiguchi, K.; Imamura, S.; Tabuchi, M.; Kanno, H.; Nakai, Y.; Hashimoto, K.; Ikarashi, Y.; Kase, Y. Geissoschizine methyl ether, an alkaloid in *Uncaria hook*, is a potent serotonin (1A) receptor agonist and candidate for amelioration of aggressiveness and sociality by yokukansan. *Neuroscience* **2012**, 207, 124–136.
 - 10) Ueki, T.; Nishi, A.; Imamura, S.; Kanno, H.; Mizoguchi, K.; Sekiguchi, K.; Ikarashi, Y.; Kase, Y. Effects of geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid in *Uncaria hook*, a constituent of yokukansan, on human recombinant serotonin 7 receptor. *Cell Mol. Neurobiol.* **2013**, 33, 129–135.
 - 11) Mimaki, Y.; Toshimizu, N.; Yamada, K.; Sashida, Y. Anti-convulsion effects of choto-san and chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramulus*) in mice, and identification of the active principles. *Yakugaku Zasshi* **1997**, 117, 1011–1021.
 - 12) Pengsuparp, T.; Indra, B.; Nakagawasai, O.; Tadano, T.; Mimaki, Y.; Sashida, Y.; Ohizumi, Y.; Kisara, K. Pharmacological studies of geissoschizine methyl ether, isolated from *Uncaria sinensis* Oliv., in the central nervous system. *Eur. J Pharmacol.* **2001**, 425, 211–218.
 - 13) Shimada, Y.; Goto, H.; Itoh, T.; Sakakibara, I.; Kubo, M.; Sasaki, H.; Terasawa, K. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, 51, 715–722.
 - 14) Shimada, Y.; Yokoyama, K.; Goto, H.; Sakakibara, I.; Sekiya, N.; Mantani, N.; Sakai, S.; Terasawa, K. Protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *J. Trad. Med.* **2002**, 19, 15–20.
 - 15) Goto, H.; Sakakibara, I.; Shimada, Y.; Kasahara, Y.; Terasawa, K. Vasodilator effect of extract prepared from *Uncariae ramulus* on isolated rat aorta. *Am. J. Chin. Med.* **2000**, 28, 197–203.
 - 16) Ozaki, Y. Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **1989**, 94, 17–26.
 - 17) Ozaki, Y. Vasodilative effects of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. Et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **1990**, 95, 47–54.
 - 18) Yuzurihara, M.; Ikarashi, Y.; Goto, K.; Sakakibara, I.; Hayakawa, T.; Sasaki, H. Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncariae Ramulus et Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 31, 183–189.
 - 19) Shimada, Y.; Goto, H.; Kogure, T.; Shibahara, N.; Sakakibara, I.; Sasaki, H.; Terasawa, K. Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am. J. Chin. Med.* **1999**, 29, 173–180.
 - 20) Kawakami, Z.; Kanno, H.; Ikarashi, Y.; Kase, Y. Yokukansan, a kampomedicine, protects against glutamate cytotoxicity due to oxidative stress in PC12 cells. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 134, 74–81.
 - 21) 日経メディカル編集部. 漢方薬使用実態調査. *NIKKEI MEDICAL* **2003**, 10 (別冊), 33–38.
 - 22) 早坂正孝, 片山潤, 中村修子, 村井ユリ子, 斎藤邦人, 水柿道直. 漢方エキス製剤と西洋薬の併用に関する調査. *病院薬学* **1991**, 17, 353–360.
 - 23) 及川秀司, 赤坂善昭, 松浦牧雄. 医薬品の併用に関する調査研究 (第9報) 漢方エキス製剤の併用実態について. *医薬品相互作用研究* **1991**, 15, 141–148.
 - 24) Nakazawa, T.; Banba, K.; Hata, K.; Nihei, Y.; Hoshikawa, A.; Ohsawa, K. Metabolites of hirsuteine and hir-

sutine, the major indole alkaloids of *Uncaria rhynchophylla*, in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29, 1671–1677.

- 25) Imamura, S.; Tabuchi, M.; Kushida, H.; Nishi, A.; Kanno, H.; Yamaguchi, T.; Sekiguchi, K.; Ikarashi, Y.; Kase, Y. The blood–brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in *Uncaria hook*, a galenical constituent of the traditional Japanese medicine Yokukansan. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2011**, 31, 787–793.

【謝辞】

本研究をまとめるにあたり、御指導及び御高閲を受け賜わり、また論文審査の主査を務めて頂きました福岡大学薬学部 岩崎克典教授、副査を務めて頂きました薬学部 金城順英教授、薬学部 山野茂教授、及び薬学部 三島健一教授に深く感謝致します。