

和漢方剤の抗炎症効果 (II) 桂枝加朮附湯のアラキドン酸代謝におよぼす影響

加野 軒作*, 安田 晶子, 金本 郁男, 足立伊佐雄
上野 雅晴, 堀越 勇

富山医科薬科大学附属病院薬剤部

Anti-inflammatory effects of the chinese medicinal prescription (II) The effect of Keisi-ka-zyutubu-tô on arachidonic acid metabolism

Kensaku KANO*, Akiko YASUTA, Ikuo KANAMOTO, Isao ADACHI
Masaharu UENO and Isamu HORIKOSHI

Department of Hospital Pharmacy, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received August 5, 1985)

Abstract

Previously, we reported Keisi-ka-zyutubu-tô (KZ) and other two chinese prescriptions suppressed inflammations in two experimental models, carrageenin-induced edema and adjuvant arthritis, in rats.

In this paper, we examined the effect of KZ on metabolism of arachidonic acid (AA) which was considered to regulate many inflammatory reactions.

KZ inhibited the production of heptadecatetraenoic acid (HHT) and thromboxane B₂ (TxB₂), cyclooxygenase metabolites of AA, in rat washed platelet. Among the components of KZ, syôkyô, syakuyaku, kanzô and sirakawa-busi inhibited the production of HHT and TxB₂. Taisô and syakuyaku inhibited the production of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), 12-lipoxygenase metabolite.

Key words chinese medicine, anti-inflammatory effect, cyclooxygenase inhibition, Keisi-ka-zyutubu-tô

Abbreviations AA ; arachidonic acid, BL ; baicalein, EDTA-Na ; sodium ethylenediaminetetraacetate, HHT ; heptadecatetraenoic acid, 12-HETE ; 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, IM ; indomethacin, TxB₂ ; thromboxane B₂, KZ ; Keisi-ka-zyutubu-tô (Gui-Zhi-Jia-Shu-Fu-Tang) ; 桂枝加朮附湯

緒 言

和漢薬の有用性が再認識されるに伴い、その作用機序の解明が多く研究者により実施されている。著者らは、先に、関節リウマチ、神経痛などの慢性炎症性疾患に用いられている桂枝加朮附湯、桂枝二越婢一湯加附子及び桂枝芍薬知母湯が、2種の炎症疾患モデル、カラゲニン足蹠浮腫及びアジュバント関節炎に対し抑制効果を示すことを報告した¹⁾。

カラゲニン足蹠浮腫に対する抑制効果は、いずれの方剤においても、炎症惹起後3～5時間で著明に現われ、その効果は、桂枝加朮附湯(KZ)に最も強く認められた。

カラゲニンによる炎症反応では、炎症惹起後1時間で、ヒスタミン遊離に起因する血管透過性の亢進が強く現われ、更に4～5時間で、炎症反応が最高に達するといわれ、この4～5時間の反応は、生体内のブラジキニン、プロテアーゼ類、プロスタグランディン、及び補体等が関与しているといわれてい

*〒930-01 富山市杉谷2630
2630, Sugitani, Toyama 930-01, Japan

る²⁾。前記3方剤の効果発現が、これらの生体内物質の出現する時間とよく一致することより、これらの方剤が、炎症巣への生体内物質の出現に、何らかの影響をおよぼしている可能性があり、殊に、プロスタグランディンは、多くの生体内反応に多種多様な作用を有し、炎症反応を考える上で、重要な物質であるので、今回、3方剤中、最も強い効果を示したKZに関して、プロスタグランディンの生合成に対する影響を検討した。その結果、ラット血小板のアラキドン酸代謝において、本方剤が、プロスタグランディン生合成を著明に抑制することが判明した。以下、その詳細を報告する。

材料と方法

KZの構成生薬(1日量)をTable Iに示す。白河附子(新潟県産)は内田和漢薬より、桂枝(広西省産)、芍薬(奈良県産)、大棗(山東省産)、甘草(西北省産)、生姜(雲南省産)、及び白朮(湖南省産)は枋本天海堂より入手し、方剤又は各構成生薬1日量に水800 mlを加えて600 W電熱器で1時間軽く煮沸し、温時濾別後得られた煎液に水を加えて300 mlに調整し検体とした。indomethacin (IM), baicalein (BL), arachidonic acid (AA) 及び thromboxan B₂ (TxB₂) は、Sigma 社製を、(1-¹⁴C)-AA (10 μ Ci/0.05 ml toluene : 58 μ Ci/mole) は、Amersham 社製を、薄層クロマトグラフィは、Merk 社製 Kiesel gel G60 プレートを用いた。その他化学試薬は、すべて試薬特級を使用した。

洗浄血小板は、関谷ら^{3,4)}の方法に準じて調整した。すなわち、SD系雄性ラット(200~250 g)をether麻酔下、抗凝血剤に77 mM sodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA-Na) (7.5% in 1

ml blood)を用い、心採血し、これを、18℃、220×gで10分間遠心し、その上清を、更に、18℃、1500×gで10分間遠心した。得られた血小板を、0.15M, NaCl-0.15M, Tris-HCl-77 mM, EDTA-Na (45 : 4 : 1, v/v ; pH 7.4) で2回洗浄後、0.15 M NaCl-0.15 M, Tris-HCl, (4 : 1, v/v ; pH 7.4) に懸濁し、10⁶個血小板/ μ lに調整した。この血小板懸濁液260 μ lに検体50 μ lを加え、37℃で5分間、preincubateし、これに、[1-¹⁴C]-AA (0.05 μ Ci/0.02 μ mole in 10 μ l EtOH) を加え、更に、10分間、incubateした。0.5 N formic acid 200 μ lを加え、反応を停止させ、ethylacetate 1.5 mlを加え、vortex mixerで30秒間振盪抽出後、ethylacetate層を1.0 ml分取し、N₂ガス中で濃縮し、薄層クロマトグラフィ(展開溶媒 : chlorform-methanol-acetic acid-water, 90 : 8 : 1 : 0.8, v/v)を用いて代謝物を分離した。AA及びその代謝物に由来する部位をautoradiogramを用いて確認し、放射活性部位を薄層板上よりかきとり、各部の放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定した。代謝物の生成率は、各部位の放射活性の総和を100%として算出した(放射活性回収率 ; 74.8%)。なお、有意差検定は、対照群の各代謝物生成率と各検体の代謝物生成率間でStudent's-t検定を行った。

結 果

1. KZの血小板AA代謝におよぼす影響

KZ, IM 10⁻⁵ mole 及び BL 10⁻⁷ mole を検体とした場合のAA代謝物をTLCで分離し、得られたautoradiogram及び各々による代謝物の生成率をFig. 1及びFig. 2に示した。

Table I The components of KZ.

Japanese name	Crude drugs	Species	g/day
Keihi	Cinnamomi Cortex	<i>Cinnamomum cassia</i> BLUME	4.5
Syakuyaku	Paeoniae Radix	<i>Paeonia albiflora</i> PALLS var. <i>trichocarpa</i> BUNGE	4.5
Kanzō	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. var. <i>glandulifera</i> REGEL et HERDER	3.0
Syōkō	Zingiberis Rhizoma	<i>Zingiber officinale</i> ROSCOE	1.0
Taisō	Zizyphus Fructus	<i>Zizyphus vulgaris</i> LAMARCK var. <i>intermis</i> BUNGE	4.5
Byakuzutu	Atractylodis Rhizoma	<i>Atractylodes ovata</i> DC.	5.0
Sirakawa-busi	Aconiti Tuber	<i>Aconitum japonicum</i> THUNB.	1.0

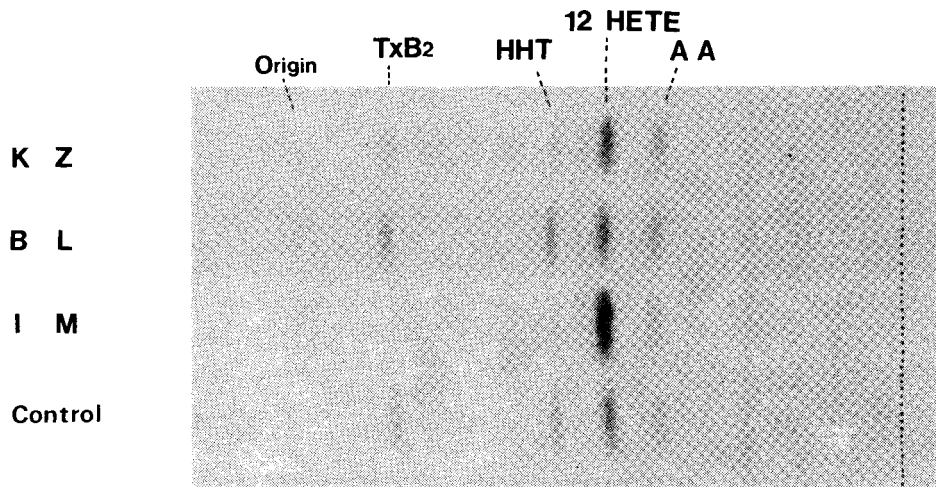


Fig. 1 Autoradiogram of TLC of $[1-^{14}\text{C}]$ -AA metabolism in platelet.
Platelet was incubated in presence of KZ, BL or IM.
Details of procedure are described in "Methods."

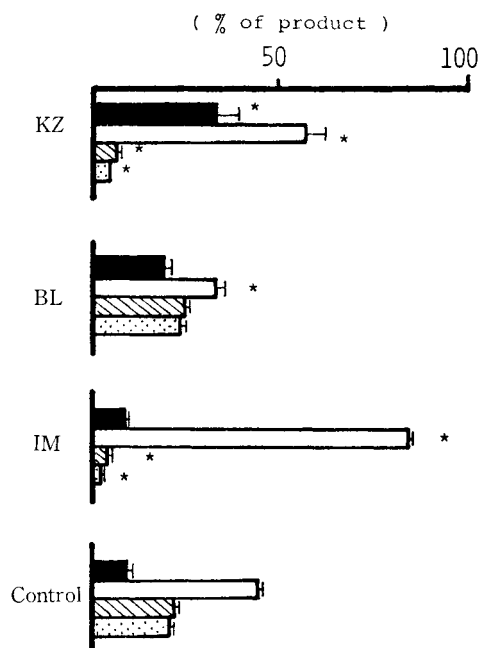


Fig. 2 The effect of KZ on the metabolism of exogenous $[1-^{14}\text{C}]$ -AA in platelet.
Data are presented as mean $\pm$ S.E. (n=4).
■ : AA □ : 12-HETE
▨ : HHT ▤ : TxB₂
(* : $p < 0.005$)

代謝物として、未変化の AA, 12-lipoxygenase 産物である 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), cyclooxygenase 産物である heptadecatetraenoic acid (HHT) 及び TxB₂ が確認され、各々の検体のこれらの代謝生成におよぼす影響をみると、明らかな差異が認められた。すなわち、IM では、HHT, TxB₂ の生成量が、BL では、12-HETE の生成量が対照群に比して有意に減少し、KZ では、IM の効果にほぼ近い結果が得られた。TxB₂, HHT の生成率を比較すると、対照群では、21.72 %, 22.96 %, IM では、2.16 %, 4.69 %, KZ では、4.52 %, 6.57 % と、IM 及び KZ で著明な減少が認められた。逆に、12-HETE の生成量は、両者共に増加した。また、(1)式に従い、selective ratio を算出し、2つの代謝系におよぼす阻害活性の選択性を比較すると、対照群 0.98, IM 0.08, BL 1.46, KZ 0.19 となり、KZ は、IM に比べ選択特異性は劣るが、cyclooxygenase 系の反応に対し、強く阻害することが確認された。

(1)式

$$\text{selective ratio} = \frac{\text{cyclooxygenase activity}}{\text{lipoxygenase activity}} = \frac{[\text{HHT}] + [\text{TxB}_2]}{[\text{12-HETE}]}$$

更に、Fig. 3 に KZ の濃度 (原液, 2倍, 3倍, 5倍及び 10 倍希釈) による影響を示した。Fig. 3 で

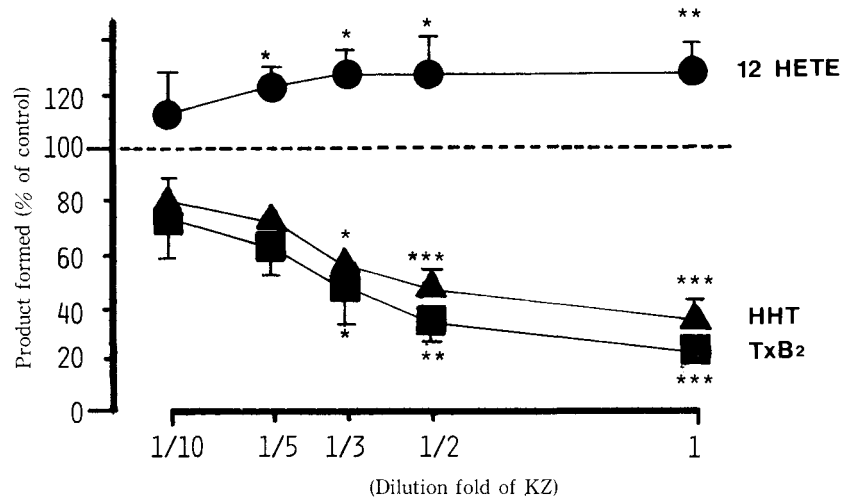


Fig. 3 The effect of KZ on HHT, TxB₂ and 12-HETE formation in platelet. Data are presented as means±S.E. (n=4). (***: $p<0.001$, **: $p<0.025$, *: $p<0.05$)

は、各代謝物の生成率を対照群のそれとの割合で示しているが、HHT 及び TxB₂ の生成率は、3 倍希釈した KZ においても対照群に比して有意な抑制を示した。この結果からも、KZ が、AA 代謝における cyclooxygenase 系の反応を強く阻害することが証明された。

2. 構成生薬の血小板 AA 代謝におよぼす効果

Fig. 4 に KZ の構成生薬による代謝物の生成率を示した。

HHT, TxB₂ の生成阻害は、生姜、甘草、芍薬及び白河附子に認められ、とくに、生姜の阻害効果は著明であった。生姜及び白河附子では、cyclooxygenase 産物である HHT, TxB₂ の生成阻害が強く、その結果、AA の大部分が、12-lipoxygenase 産物である 12-HETE に代謝され、IM の場合と同一傾向を示したが、甘草及び芍薬では、同時に、12-HETE の生成阻害も認められ、AA の代謝系を全体的に阻害する傾向を示した。

大棗では、逆に、HHT, TxB₂ の生成率が、わずかではあるが増加し、12-HETE の生成が有意に抑制され、他の構成生薬とは異なり、12-lipoxygenase 反応を強く阻害することが示唆された。

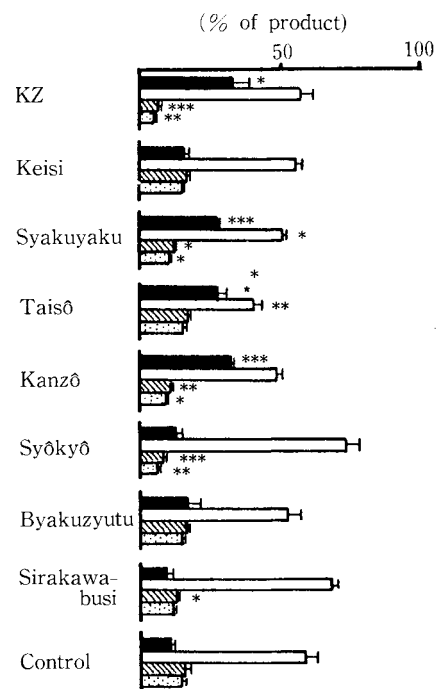


Fig. 4 The effect of KZ and its components on the metabolism of exogenous [1-¹⁴C]-AA in platelet. Data are presented as means±S.E. (n=4). (***: $p<0.005$, **: $p<0.01$, *: $p<0.05$)

考 察

炎症反応において、AA 代謝物は、ヒスタミンやブラジキニンと同様に重要な生体内物質であるといわれている。1970 年代に入り、アスピリン様薬物の抗炎症作用が、プロスタグランジン生合成阻害に由来するものであると報告されて以来、非ステロイド性消炎鎮痛剤の作用機序が、AA 代謝阻害、とくに、cyclooxygenase 阻害によるものであることは、多くの研究者により立証され、この阻害活性を指標として多くの薬物がスクリーニングされ、新しい抗炎症剤が開発されている。

今回、KZ の抗炎症効果の作用機序解明の目的で、ラット血小板を用い、外因性 AA の代謝におよぼす効果を検討した結果、この方剤が、強力な非ステロイド性消炎鎮痛剤である IM には少々劣るが、AA の cyclooxygenase 産物である HHT 及び TxB_2 の生成阻害を示したことは、この方剤の作用機序を考えるにあたり 1 つの方向性を示すものである。つまり、アジュバント関節炎やカラゲニン足蹠浮腫抑制効果¹⁾ いずれもが、非ステロイド性消炎鎮痛剤と同様な作用機序によるという可能性が強く示唆され、更に、この AA の代謝阻害効果により、免疫担当細胞であるマクロファージやリンパ球に間接的に作用するという可能性が考えられる。

また、和漢薬は、数種の生薬より構成され、多数の成分が複雑に作用し、目的とする薬効を現していると考えられる。AA 代謝阻害効果を有する生薬として、これまで数種の生薬が報告され、とくに、lipoxygenase 代謝を強く阻害する生薬としては、秦皮³⁾、黄芩⁴⁾、牡丹皮⁵⁾、山梔子⁶⁾などがあげられ、cyclooxygenase 代謝を強く阻害する生薬としては、生姜^{7,8)}、香附子⁸⁾などが知られている。今回得られた KZ では、構成生薬中の生姜、甘草、白河附子及び芍薬に、HHT、 TxB_2 の生成阻害が、大棗及び芍薬に、12-HETE の生成阻害が認められ、これらの阻害作用が総合的に相加され、全体として強い cyclooxygenase 系の代謝を阻害していると考えられる。IM では、cyclooxygenase を強く阻害するために、AA の他方の代謝系である lipoxygenase 由来の代謝が著明に促進され、AA の大部分が、12-HETE に変換されたが、KZ では、AA 自体の代謝も阻害され、12-HETE の生成に著明な変化が認められなかったことは、2 つの代謝経路いずれも

阻害されたことを示すものである。ただし、この阻害の強度は、cyclooxygenase 系の代謝阻害が強く、lipoxygenase 系の代謝阻害が比較的に弱いので、全体として、cyclooxygenase 系の代謝阻害が著明に現われたと考えられる。

今回の実験において、ラット血小板を用い、AA 代謝の 12-lipoxygenase による最終産物 12-HETE、および cyclooxygenase による最終産物 HHT、 TxB_2 の生成に関してのみ追求したが、炎症初期にみられる血管透過性亢進反応では、プロスタグランジン D_2 , E_2 , I_2 、ロイコトリエン D_4 , C_4 , B_4 などが増強作用を有し、また、多核白血球遊走作用においてもロイコトリエン B_4 にとくに強い増強作用が認められている⁹⁾。本実験では、直接これらの代謝物に対する阻害作用をみたものではないが、間接的に、これらの代謝系をも阻害する可能性を示唆するものであり、今後、更に、詳細な検討を加えるつもりである。

文 献

- 1) Kano, K., Yasuta, A., Kanamoto, I., Adachi, I., Ueno, M., Horikoshi, I. and Terasawa, K.: Anti-inflammatory effects of Keisi-ka-zyutubu-tô, Keisi-ni-eppi-iti-tô and Keisi-syakuyaku-timo-tô. (II) Inhibitory effects on inflammatory models in rats. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU* 1, 249-253, 1984
- 2) 山村雄一, 林 秀男: カラゲニンによる足蹠浮腫, “炎症学叢書(4), 炎症動物実験法,” 医学書院, p 48, 1975
- 3) Sekiya, K. and Okuda, H.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. *Biochim. Biophys. Acta* 713, 68-72, 1982
- 4) Sekiya, K. and Okuda, H.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105 (3), 1090-1095, 1982
- 5) Hirai, A. and Terano, T.: Studies on mechanism of anti-aggregatory effect of Mutan cortex. *Thrombos. Res.* 31, 29-40, 1983
- 6) 西澤 信, 藤本康雄: 山梔子の lipoxygenase 活性阻害物質. 日本薬学会第 105 年会講演要旨集, p 468, 1985
- 7) 山川 潮: 漢薬中のプロスタグランジン生合成阻害物質. 医学のあゆみ 126 (11), 867-873, 1983
- 8) Kiuti, F. and Sankawa, U.: Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (2), 754-757, 1982
- 9) 室田誠逸: 炎症とアラキドン酸カスケード. 現代化学(増刊), “プロスタグランジンと病態,” 東京化学同人, p 137-143, 1984