

“血” 関連生薬エキスの血小板凝集阻害活性¹⁾

— 経験ならびに臨床による効果との相関性 —

西尾 孝,^{a)}大谷 昌子,^{a)}中本 智美,^{a)}奥川 斉,^{a)}松本 克彦,^{a)}守安 正恭,^{b)}加藤 篤^{b)}^{a)}兵庫県立東洋医学研究所, ^{b)}神戸薬科大学・生薬化学教室

Evaluation of the crude drugs by inhibitory effect of platelet aggregation system

Takashi NISHIO,^{*a)} Yoshiko OTANI,^{a)} Tomomi NAKAMOTO,^{a)} Hitoshi OKUGAWA,^{a)}
Katsuhiko MATSUMOTO,^{a)} Masataka MORIYASU,^{b)} Atsushi KATO^{b)}^{a)}Institute for Oriental Medicine, Hyogo, ^{b)}Kobe Pharmaceutical University

(Received December 2, 1993. Accepted March 16, 1994.)

Abstract

Effects of the crude drugs on platelet aggregation were studied *in vitro*. Platelet aggregation was measured by the turbidimetric method of Born²⁾ with NKK Hema Tracer 1. Hot water extracts derived from 57 species of the crude drugs were evaluated by inhibitory effect of platelet aggregation. Seven kinds of hot water extracts showed a strong inhibitory effect.

The contents of adenosine which is one of the antiplatelet aggregative components in the crude drugs were determined by HPLC. It was found that 13 extracts of the crude drugs contained adenosine.

Key words crude drug, evaluation, platelet aggregation, adenosine, inhibition.

緒 言

現在、漢方処方に使われている生薬は、古典的薬能から分類・整理され治療に用いられている。これらの分類は、長年にわたる臨床経験や古典に基づいたものであり、生薬成分の分析研究や薬理学的手法を用いた研究から得られた結果には基づいてはいない。そこで、一つの試みとして、生薬の熱水抽出エキスの薬理活性を指標に漢方生薬の効能を検討し若干の知見を得たので報告する。

近年、漢方医学における瘀血（病理的な原因により生じた血流の停滞とそれに伴う一連の症候³⁾）に用いられる駆瘀血薬についての報告が多く見られる。そこで、検討を試みた生薬は、漢方医学の“血”に関係する生薬を中心に選んだ。瘀血を「血液性状の異常あるいは末梢循環不全である」と認識することで、漢方薬の血液凝固・線溶系⁴⁾、血小板凝集⁴⁾、血管⁵⁾、血液粘度⁶⁾、赤血球⁷⁾などに

およぼす作用について検討が加えられている。今回はそのうち、血小板凝集に対する作用を薬理活性の指標とした。また、生薬中の有効成分の指標としては、駆瘀血薬のサフラン⁸⁾、紅花⁹⁾や当帰¹⁰⁾の血小板凝集抑制物質として報告されているアデノシンの有無についても検討を加えた。

材料と方法

(1) 試料

生薬：実験に共した生薬は、漢方医学において“血”に関係する生薬の中で現在も漢方治療に用いられているものを中心に57種類を選び¹¹⁾“漢薬の臨床応用”¹²⁾に準じて分類し、Table Iに示した。生薬は、全て株式会社栃本天海堂から市場に漢方調剤用として流通しているものを入手し用いた。

(2) 試料の調整

*〒660 尼崎市東大物町1-1-1
1-1-1 Higashi daimotsu, Amagasaki, Hyogo 660, Japan

試料の調整は、臨床で患者が実際に服用することを前提と考え、熱水による1回抽出を抽出条件とした。

1) 生薬の抽出方法：生薬10g(ただし艾葉、紅花、益母草、地骨皮、金銀花、荊芥：5g、サフラン：2g)に蒸留水100mlを加え、還流器を取り付け直火で1時間還流抽出を行った後、抽出液を3000rpm・10分間遠心分離し上澄みを得た。

2) 試料液の調整：遠心上澄みをそのまま凍結乾燥を行い、生薬エキス試料を作成した。生薬エキスを正確に、20mg/mlとなるように蒸留水にて溶解し試料溶液とした。

Table I Screening test of crude drugs on platelet aggregation.

Classification ^{a)}	Material name	Original plant name	Pri.agg. ^{b)}	Sec.agg. ^{c)}	Adenosin ^{d)(e)} contents	Extract ^{f)} yield
A. 理血薬						
a) 止血薬						
1. 艾葉	Gaiyo (Folium)	<i>Artemisia</i> sp.	33.6	29.9	—	22.7
2. 大蓟	Taikei (Herba)	<i>Cirsium</i> sp.	5.5	10.2	—	20.1
3. 降香	Koko (Lignum)	<i>Dalbergia</i> sp.	55.0	94.9	—	1.4
4. 茅根	Bokon (Rhizoma)	<i>Imperata cylindrica</i> BEAUV.	13.7	14.4	—	24.1
5. 三七人參	Sanshichininjin (Rhizoma)	<i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F.H. CHEN	59.7	83.9	86	20.8
6. 茜草根	Sensokon (Radix)	<i>Rubia cordifolia</i> L.	67.0	79.0	—	7.1
7. 地榆	Jiyu (Radix)	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	88.3	93.2	—	24.5
b) 活血薬						
8. 牛膝	Goshitsu (Radix)	<i>Achyranthes bidentata</i> BLUME	10.9	8.3	—	52.4
9. 乳香	Nyuko (Resina)	<i>Boswellia carterii</i> BIRDWOOD	13.4	16.4	—	26.3
10. 蘇木	Soboku (Lignum)	<i>Caesalpinia sappan</i> L.	87.2	100	—	7.0
11. 紅花	Koka (Flos)	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	70.9	85.6	—	33.3
12. 川芎	Senkyu (Rhizoma)	<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	60.0	80.2	67	23.5
13. 沒薬	Motsuyaku (Resina)	<i>Commiphora myrrha</i> ENGL.	56.3	83.0	—	2.0
14. 延胡索	Engosaku (Tuber)	<i>Corydalis turtschaninovii</i> BESSER forma <i>yanhusuo</i> Y.H.CHOU et C.C.HSU	55.6	80.5	—	17.6
15. サフラン	Saffron (Stigma)	<i>Crocus sativus</i> L.	59.9	87.1	100	30.2
16. 宇金	Ukon (Rhizoma)	<i>Curcuma longa</i> L.	64.2	42.1	—	6.8
17. 莪朮	Gajutsu (Rhizoma)	<i>Curcuma zedoaria</i> ROSC.	41.3	38.3	—	7.8
18. 益母草	Yakumoso (Herba)	<i>Leonurus heterophyllus</i> SWEET	63.4	80.4	—	15.4
19. 鶏血藤	Keiketto (Caulis)	<i>Millettia reticulata</i> BENTH.	95.9	96.3	—	7.4
20. 赤芍	Sekishaku (Radix)	<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	57.5	84.2	95	22.3
21. 桃仁	Tonin (Semen)	<i>Prunus persica</i> BATSCH.	61.4	78.3	12	11.3
22. 丹参	Tanjin (Radix)	<i>Salvia miltiorrhiza</i> BGE.	7.7	4.6	—	44.9
23. 三棱	Sanryo (Rhizoma)	<i>Sparganium</i> sp.	7.6	7.1	—	8.8
c) 補血薬						
24. 当帰	Toki (Radix)	<i>Angelica acutiloba</i> KITAGAWA var. <i>Sugiyamae</i> HIKINO	41.5	56.1	49	46.9
25. 龍眼肉	Ryuganniku (Fructus)	<i>Euphorbia longan</i> STEUD.	8.5	3.4	—	58.4
26. 何首烏	Kashu (Radix)	<i>Polygonum multiflorum</i> THUNB.	91.5	93.1	—	18.7
B. 固澁薬						
27. 蓮肉	Renniku (Semen)	<i>Nelumbo nicifera</i> GAERTN.	63.3	79.7	64	21.4
28. 烏梅	Ubai (Fructus)	<i>Prunus mume</i> Sieb. et ZUCC.	84.3	96.4	—	36.7
29. 五倍子	Gobaishi (Rhois)	<i>Rhus chinensis</i> MILL.	43.2	78.8	—	51.3
30. 五味子	Gomishi (Fructus)	<i>Schizandra chinensis</i> BAILL.	35.7	66.6	—	32.6
C. その他						
a) 止血に用いる和漢薬						
31. 山梔子	Sanshishi (Fructus)	<i>Gardenia jasminoides</i> ELLIS	16.5	13.3	—	28.4
32. 板藍根	Banrankon (Radix)	<i>Isatis tinctoria</i> L.	17.6	14.0	—	8.0
33. 防風	Bofu (Radix)	<i>Ledebouriella seseloides</i> WOLFF	48.4	71.9	31	17.1
34. 硬紫根	Koshikon (Radix)	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> SIEB. et ZUCC.	39.6	36.9	—	21.5
35. 地骨皮	Jikoppi (Radix)	<i>Lycium chinense</i> MILL.	19.7	55.8	—	8.7
36. 牡丹皮	Botampi (Cortex)	<i>Paeonia moutan</i> SIMS	62.2	88.6	—	20.4
37. 地黄	Jio (Radix)	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH.	25.3	20.9	127	56.3
38. 大黃	Daio (Rhizoma)	<i>Rheum tanguticum</i> MAXIM.	88.9	91.3	—	25.5
39. 荊芥	Keigai (Herba)	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> BRIQ.	42.2	51.8	—	11.4
40. 玄参	Genjin (Radix)	<i>Scrophularia ningpoensis</i> HEMSLE.	34.1	35.3	—	46.7
b) 活血に用いる和漢薬						
41. 合歡皮	Gokanhi (Cortex)	<i>Albizia julibrissin</i> DURAZZ	37.0	61.8	—	10.3

D. 上記以外の和漢薬

42. 独活	Dokkatsu (Radix)	<i>Angelica pubescens</i>	51.0	87.3	—	40.9
43. 天南星	Tennansho (Radix)	<i>Arisaema</i> sp.	13.6	16.3	—	10.8
44. 党参	Tojin (Radix)	<i>Codonopsis pilosula</i> NANNF.	12.1	18.7	—	45.4
45. 山査子	Sanzashi (Fructus)	<i>Crataegus cuneata</i> SIEB. et ZUCC.	84.3	89.4	—	14.1
46. 天麻	Temma (Radix)	<i>Gastrodia elata</i> BL.	53.5	76.2	—	14.5
47. 浜防風	Hamabofu (Radix)	<i>Glehnia littoralis</i> FR. SCHMIDT et MIQ.	51.8	73.5	—	26.4
48. 甘草	Kanzo (Radix)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCHER	17.1	64.0	14	28.6
49. 女貞子	Joteishi (Semen)	<i>Ligustrum lucidum</i> AIT.	2.2	15.6	—	22.9
50. 金銀花	Kinginka (Flos)	<i>Lonicera japonica</i> THUNB.	35.2	52.6	—	33.9
51. 川楝子	Senrenshi (Semen)	<i>Melia toosendan</i> SIEB. et ZUCC.	15.9	14.1	—	25.0
52. 人參	Ninjin (Radix)	<i>Panax ginseng</i> C.A. MEYER	62.3	80.9	210	19.4
53. 杏仁	Kyonin (Semen)	<i>Prunus armeniaca</i> L. var. <i>ansu</i> MAXIM.	47.2	73.6	71	13.5
54. 百癩	Byakudan (Lignum)	<i>Santalum album</i> L.	16.9	35.6	—	3.5
55. 天花粉	Tenkafun (Radix)	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAXIM.	24.2	20.4	—	19.1
56. 栝楼仁	Karonin (Semen)	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAXIM.	13.2	4.7	—	5.6
57. 薤白	Gaihaku (Bulbus)	<i>Allium macrostemon</i> Bge.	35.6	72.4	34	47.0

a) Classification according to "Kan'yaku No Rinsho Oyo"¹¹⁾

b) Inhibitory index (%) of primary platelet aggregation

c) Inhibitory index (%) of secondary platelet aggregation

d) Adenosine contents of crude drugs ($\mu\text{g/g}$)

e) none detected

f) Extract yield (%)

た。必要に応じ、超音波処理ならびに加温・攪拌を行い溶解したが、不溶物が存在する場合は、使用時に超音波処理または攪拌を行い懸濁状態として用いた。

(3) ヒト血小板凝集抑制活性測定²⁾

1) ヒト多血小板血漿 (PRP) 調整法: 3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容を添加したヒト新鮮血を 1000 rpm, 10 分間遠心分離して、上澄みを採取し、これを PRP とした。血球を含む沈澱層をさらに 3000 rpm, 10 分間遠心して、上澄みに寡血小板血漿 (PPP) を得た。PRP 中の血小板数を自動血小板計数装置 (Platelet Counter PL-100, Sysmex 社) を用いて測定し、PPP で希釈し血小板数を 20~35 万に調整し、それを被験血漿とした。

ヒト新鮮血は、20~36 歳の健康な男女で、2 週間以内に解熱鎮痛剤などの薬を服用していない者から得た。

2) 測定法: 自動血小板凝集計 (Hema Tracer 1, NKK 社) を用い、装置されているキュベットに被験血漿 250 μl に試料溶液 20 μl を入れて攪拌し、これに凝集のインデューサー ADP (Sigma 社) 溶液を 20 μl 添加し、凝集挙動を透過率の時間的变化として観察した。対照として試料の代わりに蒸留水を用いて同様に測定し、その対照の凝集率に対する比で表し抑制率とした。

この操作を、同一 PRP に対して二重測定し、平均値を抑制率とした。また、PRP の個体差を考え、異なる 3 人より得た PRP にて同様に測定を行い、その平均値をもって各試料エキスの血小板凝集抑制率とした。

なお、実験に用いた PRP は、インデューサーに対する反応性を一定化するため ADP 溶液の終濃度 1~3 μM の

範囲において最大凝集を示す PRP のみを用いた。また、インデューサーの ADP 溶液の濃度は、最大凝集を示す、最小値 (1.0, 2.0, 2.5, 3.0 μM) を用いて測定した。

(4) 生薬中のアデノシンの定性ならびに定量

1) 試料の調整ならびに装置: 生薬エキスの調整法と同様に抽出を行い、遠心分離により得た上澄みを、メスフラスコを用いて正確に 100 ml とした後、メンブランフィルター (column gard-LCR, Millipore 社) を用いて濾過を行い HPLC 試料とした。装置として、510 型 HPLC 用ポンプ (日本ウォーターズ・リミテッド)、三次元フォトダイオードアレイ検出器 ((株) 島津製作所) を用いた。

2) 測定法: カラムは、Cosmosil5C18 (4.6 mm $\times$ 150 mm) を用いて、流速は、1.0 ml/min で、検出は、240~450 nm の波長で測定し、アデノシンの検出は 260 nm にて行った。移動相は、定性時には、0.05 M KH_2PO_4 : アセトニトリルを、10 分間に 100:0 から 50:50 に、さらに 10 分間に 10:90 にするグラジュエントをかけて用いた。定量時には、0.05 M KH_2PO_4 : アセトニトリルを 95:5 としして用いた。

結果と考察

1. 各試料エキスのヒト血小板凝集抑制作用

Table I に各試料エキスのヒト血小板凝集に及ぼす影響を、一次・二次凝集抑制率で示した。

一次・二次凝集ともに強い抑制作用を示した生薬は、鶏血藤・何首烏・大黃・地榆・蘇木・烏梅・山査子であ

った。また、一次・二次凝集ともに 20 % 以下の抑制率を示した、大薊・茅根などをはじめ 14 種類の生薬は、血小板に対する作用はないと考えられる。この両グループは、薬能分類上においては全般に分布しており、特徴的な傾向はみられなかった。

降香・サフラン・五味子・合歓皮・甘草などのように、一次凝集抑制作用に比べて二次凝集抑制作用が強い生薬がみられた。この結果は、これらの生薬が、血小板のインデューサーによる粘着・凝集の反応を抑制する作用よりも、血小板の ADP 放出にともなう反応をより強く抑制する成分を含有しているためと考えられる。このような作用を示す生薬が存在することは興味深く思われる。

全般的にみると、血小板凝集抑制作用による分類と薬能分類の間には、特徴的な分布傾向はみられないと考えられる。

2. 生薬中のアデノシンの定性ならびに定量

定性の結果、今回の抽出法ならびに測定法では、57 種類中 13 種類の生薬エキスのアデノシンの含有が認めら

れた。

Table I に各生薬のアデノシン含有ならびに定量値を示した。

しかし、アデノシン含有が報告されている紅花^{8,13)}・五味子¹³⁾など数種の生薬において、今回の測定では、含有が認められず異なった結果を得た。これは、生薬の産地や採取からの期間、市場品となるまでの製造工程、抽出方法などの種々の条件の違いによると考えている。

アデノシン含有生薬の分布を、薬能分類上で見ると、全体的に散らばっており、特徴的な分布傾向は見られなかった。

3. アデノシン含有生薬と含有アデノシンのヒト血小板凝集抑制率の比較

試料エキス中のアデノシン含有量を、Table I に示した凍結乾燥エキス収量を用いて算出し、生薬エキスとその相当アデノシンの血小板凝集抑制率を比較した結果を Table II に示した。

なお、血小板の反応性を一定にするため、同一の PRP

Table II Comparison on inhibition of platelet aggregation.

No.	Samples	Inhibition (%)	
		Primary Aggregation	Secondary Aggregation
5	三七人參 (SANSHITININJIN) (20 mg/ml)	48.0	83.9
	Adenosine (8.3 μ g/ml)	35.6	85.7
12	川芎 (SENKYU) (20 mg/ml)	60.4	90.0
	Adenosine (5.7 μ g/ml)	31.7	77.5
15	サフラン (SAFFRON) (20 mg/ml)	61.5	88.7
	Adenosine (6.6 μ g/ml)	33.0	86.8
20	赤芍 (SEKISHAKU) (20 mg/ml)	70.4	94.5
	Adenosine (8.5 μ g/ml)	37.2	86.5
21	桃仁 (TONIN) (20 mg/ml)	46.2	40.0
	Adenosine (2.1 μ g/ml)	5.1	0
24	当帰 (TOKI) (20 mg/ml)	33.4	51.9
	Adenosine (2.1 μ g/ml)	0	0
27	蓮肉 (RENNIKU) (20 mg/ml)	48.6	75.5
	Adenosine (6.0 μ g/ml)	13.2	7.7
33	防風 (BOFU) (20 mg/ml)	34.8	85.1
	Adenosine (3.6 μ g/ml)	1.4	6.5
37	地黄 (JIO) (20 mg/ml)	17.9	12.4
	Adenosine (4.6 μ g/ml)	18.9	58.6
48	甘草 (KANZO) (20 mg/ml)	0	2.9
	Adenosine (1.0 μ g/ml)	0	0
52	人參 (NINJIN) (20 mg/ml)	60.6	89.4
	Adenosine (21.6 μ g/ml)	63.0	94.9
53	杏仁 (KYONIN) (20 mg/ml)	41.6	90.5
	Adenosine (10.5 μ g/ml)	27.3	91.1
57	薤白 (GAIHAKU) (20 mg/ml)	38.0	67.0
	Adenosine (1.5 μ g/ml)	23.1	12.3

を用いて同時に測定し比較した。そのため試料エキスの抑制率が、Table I と異なっている場合もある。

当帰・薤白・防風・桃仁のエキスは含有アデノシンより強い抑制を示した。地黄エキスは、含有アデノシンより弱い抑制を示した。蓮肉エキスは、含有アデノシンより強い抑制を示したが、アデノシンに対する PRP の反応性に問題があった可能性が考えられ、再検討の必要性があると思われる。他の試料エキスは、両者間に差はみられなかった。これらの結果は、生薬エキスにおいて、アデノシン以外の血小板に作用する成分が含有していることによると考えられる。

今回著者らは、“血”に関係するとされる生薬を中心に 57 種類をヒト血小板凝集抑制作用の強さによる分類を試みた。しかし、血小板凝集抑制作用による分類と古典的薬能分類の間には、特徴的な分布傾向はみられなかった。また、生薬エキス中にアデノシンの有無を測定し、57 種類中 13 種の生薬エキスを含有が見られた。しかし、アデノシン含有生薬は薬能分類上では、全般的に見られ、特徴的な成分とは考えられなかった。今回、著者らが得た結果からでは古典的薬能分類と血小板に対する作用との関係に相関性は認められなかった。しかしながら、今後、多方面の薬理活性・多数の指標成分に基づいて生薬を分類・整理していく研究は、臨床に漢方薬を用いる際の参考となっていくものと考えられる。

謝 辞

本研究に際し、いくつかの生薬を供与していただいた(株)栃本天海堂に深謝いたします。

References

- 1) Part of this work was presented at the 10 th Annual Meeting of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, Toyama, August, 1993, p.131.
- 2) G.V.R. Born, *Nature* (London), **194**, 927-929, 1962; J.R.O' Brien, *J. Clin. Path.* **15**, 452-455, 1962.
- 3) Nagahama, Y.: "Toyoigaku Gaisetsu" Sougensha, Inc., Osaka, pp.82-90, 1997.
- 4) Nishio, T., Okugawa, H., Kato, A., Hashimoto, Y., Matsumoto, K., Fujioka, A.: Effect of Crocus (*Crocus sativus* LINNE, Iridaceae) on Blood Coagulation and Fibrinolysis. *Shoyakugaku Zasshi* **41** (4), 271-276, 1987.
- 5) Yu, M., Nishimoto, T., Matsumoto, K., Fujioka, A.: Saffron no kekkanakuchyo-sayo ni tsuite (サフランの血管拡張作用について). *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **4**, 352-353, 1987.
- 6) Toriizuka, K., Zhang Tie Zhong, Terasawa, K., Okamoto, M., and Tosa, H.: Effects of Toki-shakuyaku-san on blood viscosity and platelet functions in normal subjects. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **4**, 20-25, 1987.
- 7) Tani, T., Iwanaga, M., Ohno, T., Higashino, M., Namba, K., Kubo, M., Arichi, S.: Steroid-zai no ketsueki-seijo ni oyobosu eikyo to Keishi-bukuryo-gan no kaizen-sayo (ステロイド剤の血液性状に及ぼす影響と桂枝茯苓丸の改善作用). *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **1**, 50-51, 1984.
- 8) Okano, K., Nishio, T., Fukaya, C., Yokoyama, K., Nishimoto, T., Matsumoto, K.: Isolation and identification of a platelet aggregation inhibitor from Saffron (*Crocus sativus* LINNE, Iridaceae). *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **9**, 175-181, 1992.
- 9) Kutsuna, H., Fujii, S., Kitamura, K., Komatsu, K., Nakano, M.: Identification and determination of platelet aggregation inhibitor from safflower (*Carthamus tinctorius* LINNE). *Yakugaku Zasshi* **108** (11), 1101-1103, 1988.
- 10) Toriizuka, K., Nishiyama, P., Adachi, I., Kawashiri, N., Ueno, M., Terasawa K., and Horikoshi, I.: Isolation of a platelet aggregation inhibitor from Angelicae radix. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 5011-5015, 1986.
- 11) Okuyama, T., Narui, T., Kurata, H., Jen-Der Wang, Hashimoto, T., Takeuchi, K., Ohmura, Y., Ohno, S.: Effects of oriental plant drugs on blood coagulation system. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**, 167-178, 1988.
- 12) Kobe Chuigaku Kenkyukai, "Kan'yaku no Rinsyo-oyo", Ishiyaku shuppan, Inc., Tokyo, 1991.
- 13) Seto, T., Akiyama, K., Sunagane, N., Kubota, K.: Studies on the bioactive constituents in jio (Di-huang)(1). Isolation of a suppressive component for the guinea pig heart function from Kan-jio (Gan-di-huang). *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **8**, 115-124, 1991.