

和漢薬成分とアラキドン酸代謝

木村 善行

愛媛大学医学部 生化学第2教室

Effects of various components in Chinese and Japanese traditional medicine on arachidonate metabolism

Yoshiyuki KIMURA

2nd Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime University

(Accepted December 26, 1994.)

Abstract

The effects of various components in Chinese and Japanese traditional medicine on arachidonate metabolism and/or degranulation in leukocyte and platelets were studied.

1) Baicalein, a main flavonoid component of *Scutellariae Radix* was found to inhibit the formation of 5-HETE (lipoxygenase product) more strongly than the formation of HHT (cyclooxygenase product); its concentrations for 50% inhibition (IC_{50}) were $7.1 \mu M$ for the formation of 5-HETE and $55 \mu M$ for the formation of HHT. Baicalein inhibited A 23187-induced LTB_4 and LTC_4 formations in human polymorphonuclear leukocytes (PMNs), dose-dependently. Its IC_{50} values for LTB_4 and LTC_4 formations were $1.5 \mu M$ and $0.6 \mu M$, respectively, using $1.0 \mu g/ml$ of A23187. Furthermore, baicalein inhibited β -glucuronidase and lysozyme releases induced by A 23187, LTB_4 plus cytochalasin B (cyto B), and platelet activating factor (PAF) plus cyto B. It was found that baicalein reduced A 23187-, LTB_4 - and PAF-induced the increases of free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in human PMNs, dose-dependently.

Therefore, the possible mechanism of the inhibitory effects of baicalein on LTB_4 and LTC_4 formation and degranulation might be due to the reduction of $[Ca^{2+}]_i$ elevation as well as the inhibition of 5-lipoxygenase system.

These results suggest that baicalein could be useful for the treatment of allergy and inflammation via lysosomal enzyme release, LTB_4 and LTC_4 productions in human PMNs.

2) Ginsenoside Rg_1 , a ginseng saponin isolated from red ginseng roots, inhibited epinephrine- and thrombin-induced platelet aggregation and 5-hydroxytryptamine release dose-dependently, at concentrations 5 to $500 \mu g/ml$. Ginsenoside Rg_1 had no effect on epinephrine- and thrombin-induced arachidonic acid release, but it did reduce the $[Ca^{2+}]_i$ elevation shown in the second phase induced by epinephrine and thrombin, at concentrations of 10 to $500 \mu g/ml$.

Therefore, those data suggest that the inhibitory effects of ginsenoside Rg_1 on 5-hydroxytryptamine release from, and aggregation of platelets might be due to the reduction of $[Ca^{2+}]_i$ elevation at the second phase induced by epinephrine and thrombin.

The results suggest that ginsenoside Rg_1 in red ginseng roots may be active as a drug in the treatment of arteriosclerosis and thrombosis.

3) Licochalcones A and B, isolated from Sinkiang Licorice (*Glycyrrhiza inflata* BAT.), inhibited A 23187-induced LTB_4 and LTC_4 formation in human PMNs, dose-dependently. The IC_{50} values of licochalcone A for LTB_4 and LTC_4 formation were $0.46 \mu M$ and $4.2 \mu M$, respectively. The IC_{50} values of

licochalcone B for LTB₄ and LTC₄ formation were also 1.2 μ M and 2.0 μ M, respectively. Furthermore, these compounds also inhibited the degranulation induced by A 23187, LTB₄ plus cyto B, PAF plus cyto B and fMLP plus cyto B. In addition, lichochalcones A and B reduced the [Ca²⁺]_i elevation stimulated by calcium ionophore ionomycin, fMLP, PAF and LTB₄. Therefore, it seems likely that the inhibitory actions of lichochalcones A and B for leukotrienes biosynthesis and PMN degranulation might also be due to the reduction of [Ca²⁺]_i elevation.

From these results, lichochalcones A and B may be effective as drug for use in the treatment of allergic diseases such as atopic dermatitis and asthma.

4) I attempted to isolate the inhibitory substance from the roots of *Angelica shikokiana* on LTB₄ and LTC₄ biosynthesis in human PMNs. It was found that the EtOAc fraction of the roots inhibited LTB₄ and LTC₄ formations in human PMNs. And the active substance isolated from this roots was elucidated to be 3'(*R*),4'(*R*)-3'-epoxyangeloyloxy-4'-acetoxy-3',4'-dihydroseselin (YN-1).

Therefore, the present results suggest that YN-1 may be effective as drug for use in the treatment of allergic diseases such as atopic dermatitis and asthma.

Key words Scutellariae Radix, Sinkiang Licorice, Red Ginseng, *Angelica shikokiana*, baicalerin, lichochalcones A and B, ginsenoside Rg₁, 3'(*R*),4'(*R*)-3'-epoxyangeloyloxy-4'-acetoxy-3',4'-dihydroseselin, leukotriene, degranulation, leukocyte, platelet.

1. 緒 言

漢方薬は、後漢時代に作成されたと伝承されている「神農本草経」に 365 種の薬物が記載され、用途に応じて上品、中品、下品に分類されている。

個々の漢方薬を患者の体質症状別に従って治療する(随証治療)方剤として確立されたのが、漢方処方の原典「傷寒論」および「金匱要略」である。漢方医学は随証治療を中心としたために、その個々の和漢薬の薬効解析、

有効成分の解析および生化学的機序の解明が不十分であった。しかし、和漢薬がどのような薬能でもって使用されているか、漢方医書、本草書および現在の臨床応用から詳細に吟味することによって、個々の和漢薬の薬効が抽出できると考える。

本論文で取り上げている漢薬「黄芩」、「甘草」および「人参」は、現在、臨床的に最も繁用されている「小柴胡湯」、「大柴胡湯」、「半夏瀉心湯」などに配合されている。上記の漢方処方は漢方理論における少陽病(半表半裏)

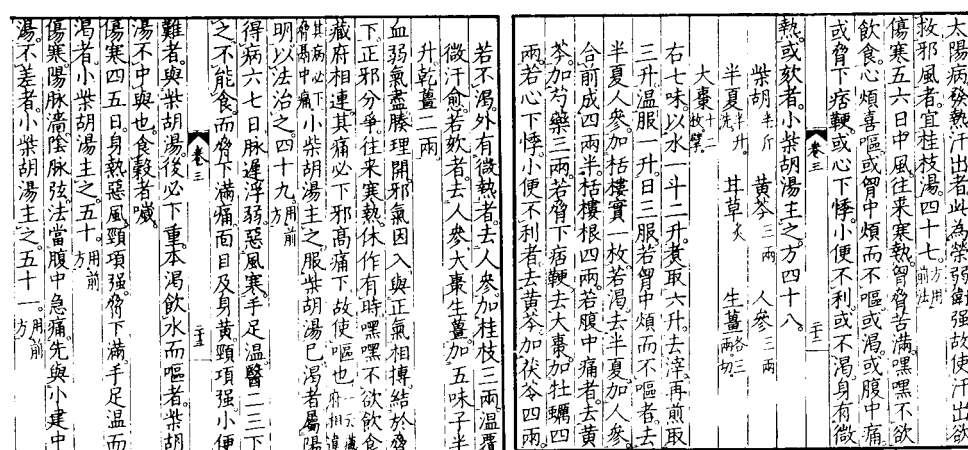


Fig. 1 明 趙清常原本，影刻宋本傷寒論，卷 33，22 丁

の位置する病態症状に用いられ、現在の臨床面において、肝炎、皮膚炎、喘息、高脂血症、動脈硬化症、下痢等のアレルギー性炎症を原因とした疾患に適用されている。その一例として、「小柴胡湯」を取り上げて見ると、Fig. 1に示すように「小柴胡湯」は風邪等によって生じた急性炎症疾患をこじらせて慢性状態に移行した症状、すなわち胸のつかえ、吐き気、腹痛、気管支喘息などの症状を呈し、慢性炎症に移行していると考えられる。この方剤には、「柴胡」、「黄芩」、「甘草」および「人蔘」が配合されていることから、これら漢薬は急性炎症から慢性炎症への移行時の状態に対して作用を有することが想起できる。

従って、本論文では、炎症に深く関与しているアラキドン酸代謝および脱顆粒反応の生化学的評価を用い、「黄芩」、「甘草」および「人蔘」の白血球および血小板での影響を検討した。さらに、「人蔘」の代用薬として一部の地域で民間的に伝承されてきたイヌトウキ (*Angelica shikokiana* MAKINO を基原とする根) の活性成分を白血球でのロイコトリエン類の産生抑制を指標にして、単離・構造決定した。

2. 白血球アラキドン酸代謝と白血球脱顆粒反応

白血球（多核白血球）は生体防御、急性、慢性炎症およびアレルギー反応に深く関わっている。すなわち、Fig. 2に示すように、抗原などの刺激によって白血球が活性化され、白血球内の5-リポキシゲナーゼによってアラキ

ドン酸(AA)は5-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid (5-HPETE)に代謝され、更にロイコトリエンA₄ (LTA₄)からLTB₄、LTC₄、LTD₄およびLTE₄に代謝される。このLTC₄、LTD₄およびLTE₄はアレルギー症状を引き起こすSlow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A)であることが判明している²⁾。白血球からのLysosomal酵素の放出も種々のMediatorもしくは惹起物質、例えば、LTB₄³⁾、血小板活性化因子(Platelet Activating Factor; PAF)^{4,5)}、補体の活性化によって生じたアナフィラトキシン(C3aおよびC5a)³⁾、カルシウムイオノフォアA23187³⁾および白血球遊走ペプチドN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)³⁾によって引き起こされる。このように、白血球を中心として、一つの刺激によって生じる反応、例えば、各種Mediatorによって誘導され、生成されるロイコトリエン類、特にLTB₄およびPAFが次の脱顆粒反応、白血球遊走作用、凝集作用および血小板凝集作用というように連鎖反応を引き起こしてアレルギー性炎症反応という症状を生じさせる。

3. 血小板アラキドン酸代謝とセロトニン放出反応

血小板は、本来、出血時に血小板凝集を通して止血機構として働くが、血小板の過剰な活性化すなわち過度の血小板凝集は動脈硬化および血栓の状態を引き起こすことが報告されている。

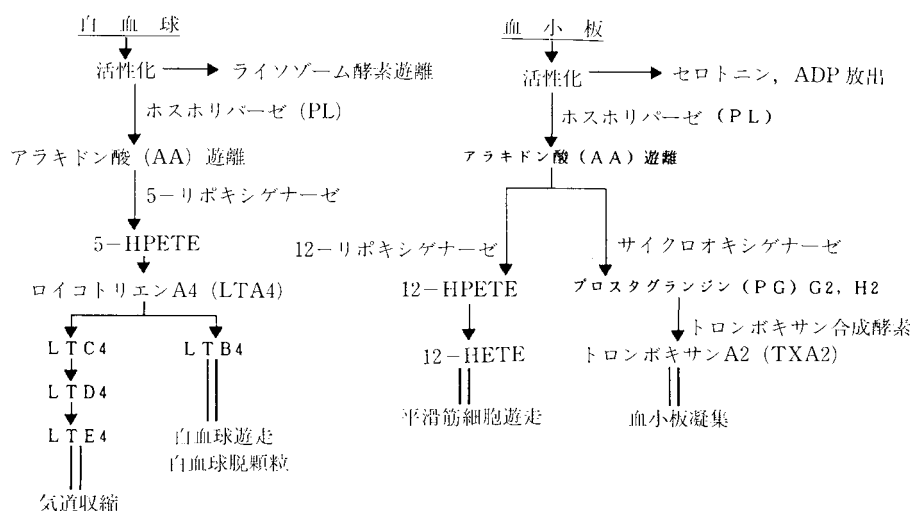


Fig. 2 白血球および血小板におけるアラキドン酸代謝と脱顆粒反応

Fig. 2 に示すように、血小板もまた、トロンビン、ADP、エピネフィリンなどの刺激剤によって血小板が活性化され、遊離したアラキドン酸は血小板内 12-リポキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼによって、12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid (12-HETE) およびトロンボキサン A_2 (TXA₂) に代謝される。これらの代謝物の内、12-HETE は血管中膜平滑筋細胞の遊走を促進し、動脈硬化の進展に関与⁶⁾、TXA₂ は血小板凝集を引き起こし血栓状態を誘発し、更に気道平滑筋を収縮し、喘息発作を誘発する。更に、血小板活性時の脱顆粒反応によって放出されるセロトニンも血管平滑筋収縮を引き起こす。このように、血小板もまた動脈硬化、血栓を誘発する炎症反応に深く関与している。

4. 黄芩中フラボノイド成分 Baicalein の白血球に対する作用^{7,8)}

黄芩 (*Scutellaria baicalensis* GEORGI を基源植物とする乾燥根) の歴代本草書における薬能および用途を Table I にまとめた。その結果、関節炎、皮膚炎、喘息および大腸炎等を想起させる疾患に有効であることが記載されている。このような炎症性疾患は白血球の活性化によって起こる脱顆粒反応とロイコトリエン類 (LTB₄, LTC₄) 産生が深く関与していることが知られている。従って、下記に示したような古文献調査に基づいて、黄芩のフラボノイド成分の白血球に対する影響を検討した。

Table I 歴代本草書における黄芩の薬能、用途

本草書名	時代	薬能・用途
神農本草経	後漢	黄疸、血閉
名医別録	梁	小腹絞痛、女子血閉
薬性論	唐	関節煩悶、心腹堅張
日華子諸家本草	唐	疔瘡、癰背
本草綱目	明	火咳肺喉腫、諸失血、大腸火、肺火

(A) 黄芩中の各フラボノイド成分の 5-リポキシゲナーゼに対する作用⁷⁾

黄芩中の 8 種のフラボノイド成分 (Fig. 3) のラット腹腔内多核白血球ホジネートにおけるアラキドン酸代謝に対する影響を検討した。その結果、Table II および Fig. 3 に示すように、baicalein が最も強く 5-リポキシゲナーゼ活性を阻害し、その 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は 7.1 μ M であった。

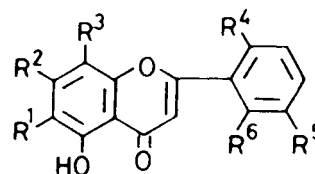
Table II Effects of various flavonoids on the formations of 5-HETE and HHT from arachidonic acid in rat peritoneal polymorphonuclear leukocytes.

Compounds	IC ₅₀ (μ M)	
	5 HETE (Lipoxygenase Product)	HHT (Cyclooxygenase Product)
Baicalein	7.13 $\pm$ 0.767	55.30 $\pm$ 16.90
Baicalin	180.00 $\pm$ 17.80	N.E. ^{a)}
Wogonin	>1000	14.60 $\pm$ 3.51
Skullcapflavone II	72.70 $\pm$ 11.70	44.00 $\pm$ 3.01
2',5,5',7-Tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavone	25.80 $\pm$ 4.13	41.30 $\pm$ 1.67 ^{b)}
Chrysin	N.E.	640.00 $\pm$ 62.40
(2S),2',5,6',7-Tetrahydroxyflavanone	670.00 $\pm$ 85.00 ^{c)}	5.63 $\pm$ 1.27
(2R,3R),2',3,5,6',7-pentahydroxyflavanone	N.E.	50.00 $\pm$ 4.04

^{a)}N.E.: no effect.

^{b)}The percent activities of 2',5,5',7-tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavone on the formation of HHT are 101.6 $\pm$ 1.56 % and 108.6 $\pm$ 3.89 % at concentration of 10⁻⁵M and 10⁻⁶M, respectively as compared to control values.

^{c)}The percent activities of (2S), 2',5,6',7-tetrahydroxyflavanone on the formation of 5-HETE are 124.9 $\pm$ 6.19 %, 158.8 $\pm$ 6.73 % and 126.6 $\pm$ 10.1 % at concentration of 10⁻⁶M, 10⁻⁵M and 10⁻⁴M, respectively, as compared to control values.



Baicalein : R¹=R²=OH, R³=R⁴=R⁵=R⁶=H

Baicalin : R¹=OH, R²=O-D-Glucuronic acid, R³=R⁴=R⁵=R⁶=H

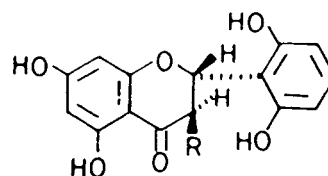
Wogonin : R¹=R⁴=R⁵=R⁶=H, R²=OH, R³=OCH₃

Skullcapflavone II : R¹=R²=R³=R⁶=OCH₃, R⁴=OH, R⁵=H

Chrysin : R¹=R³=R⁴=R⁵=R⁶=H, R²=OH

2',5,5',7-Tetrahydroxy-6',8-dimethoxy

flavone : R¹=H, R²=R⁴=R⁵=OH, R³=R⁶=OCH₃



(2S),2',5,6',7-Tetrahydroxy flavanone : R=H

(2R,3R),2',3,5,6',7-Pentahydroxy flavanone : R=OH

Fig. 3 Structures of flavonoids

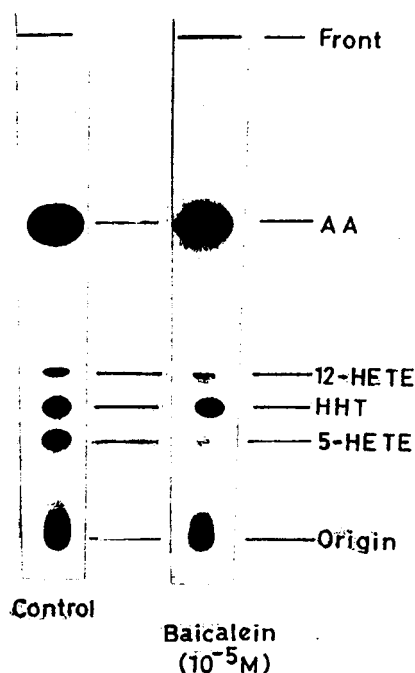
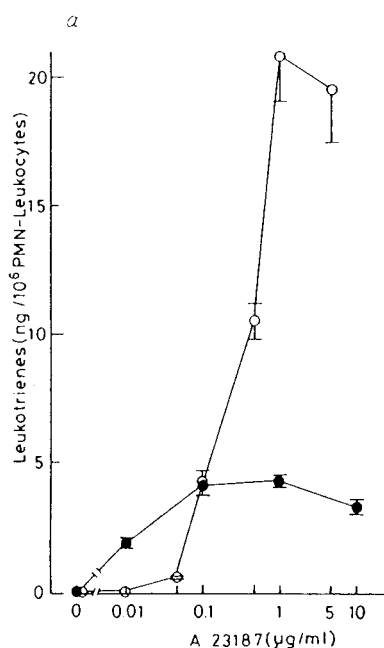


Fig. 4 Autoradiograph of profiles on thin layer chromatography (TLC) of (1-¹⁴C) arachidonic acid metabolites in homogenates of rat polymorphonuclear leukocytes. 12-HETE, 12-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid; HHT, 12-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid; 5-HETE, 5-hydroxy-6, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid.

(B) ヒト多核白血球における LTB₄ および LTC₄ 産生に対する Baicalein の作用⁸⁾

Fig. 5 に示すように, A23187 刺激による LTB₄ および



LTC₄ 産生に対して, Baicalein は濃度依存的に抑制し, LTB₄ および LTC₄ 産生に対する Baicalein の IC₅₀ は 1.0 μg/ml の A23187 を作用させた時, 各々 1.5 μM および 0.6 μM で, 0.1 μg/ml の A23187 を作用させた時, Baicalein の LTB₄ および LTC₄ 生成に対する IC₅₀ は

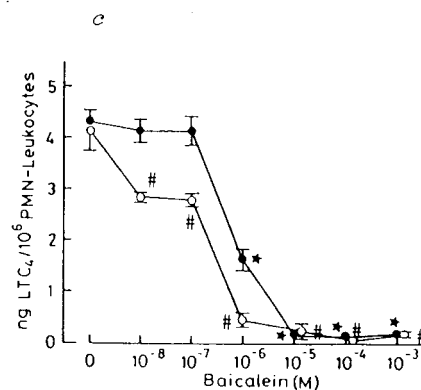
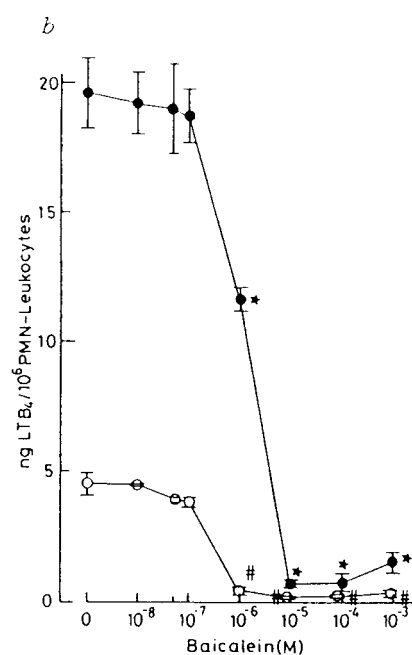


Fig. 5 Effects of baicalein on A23187-induced leukotrienes B₄ and C₄ formation in human polymorphonuclear (PMN) leukocytes. (a) Formation of leukotrienes B₄ and C₄ induced by A23187 at various concentrations. Values are mean ± S.E. for four experiments. ○, Leukotriene B₄; ●, leukotriene C₄. (b), (c) effects of baicalein on A23187-induced leukotriene B₄ (b) and leukotriene C₄ (c) formations in human polymorphonuclear leukocytes. Values are mean ± S.E. for four experiments. ○, A23187 at 0.1 μg/ml; ●, A23187 at 1.0 μg/ml. Significant difference from the value with A23187 alone at 0.1 μg/ml: #*p* < 0.01; significant difference from the value with A23187 alone at 1.0 μg/ml: **p* < 0.01.

各々 $0.3 \mu\text{M}$ および $0.2 \mu\text{M}$ であった。

(C) ヒト多核白血球における脱顆粒反応に対する Baicalein の作用⁸⁾

Fig. 6 に示すように、Baicalein は 10^{-6}M - 10^{-7}M 濃度において、A23187 による多核白血球からの lysozyme の遊離を抑制した。 β -glucuronidase の遊離も Baicalein によって抑制された。LDH の遊離に対しては Baicalein は何ら影響を与えなかった。LTB₄ および PAF による脱顆粒反応も Baicalein によって濃度依存的に抑制された (Fig. 7)。

(D) 白血球におけるロイコトリエン類生成および脱顆粒反応に対する Baicalein の阻害作用機構⁸⁾

Fig. 8 に示すように、Baicalein は A23187, LTB₄ および PAF 刺激による白血球内遊離カルシウム濃度の上昇を濃度依存的に抑制した。以上の実験結果から、白血球におけるロイコトリエン類生成および脱顆粒反応に対する Baicalein の阻害作用機構は、細胞内遊離カルシウム

濃度の低下によって説明できるものと考えられる。

以上のことから、黄芩中の Baicalein はアレルギー性炎症に有効で、歴代本草書・医方書の記載の黄芩の薬効の一部を明らかにした。

5. 新疆甘草 (*Glycyrrhiza inflata* BAT. を基源植物とする乾燥根) 中の Licochalcone A および B の白血球に対する作用およびその作用機構^{9, 10)}

甘草は漢方処方中に最も多く配合されている漢薬で、甘草中のグリチルリチンは抗炎症、抗アレルギー剤として臨床的に使用されている。本論文では、新疆甘草中の Licochalcone A および B の白血球に対する作用およびその作用機構を検討した。

Licochalcone A および B (Fig. 9) はヒト多核白血球アラキドン酸代謝物の 5-HETE, 5,12-diHETE を強く抑制し、さらに、A23187 によるヒト多核白血球からの LTB₄ および LTC₄ 生成もまた Licochalcone A および B によって抑制された (Fig. 10)。

Fig. 11 に示すように、A23187, LTB₄, PAF および

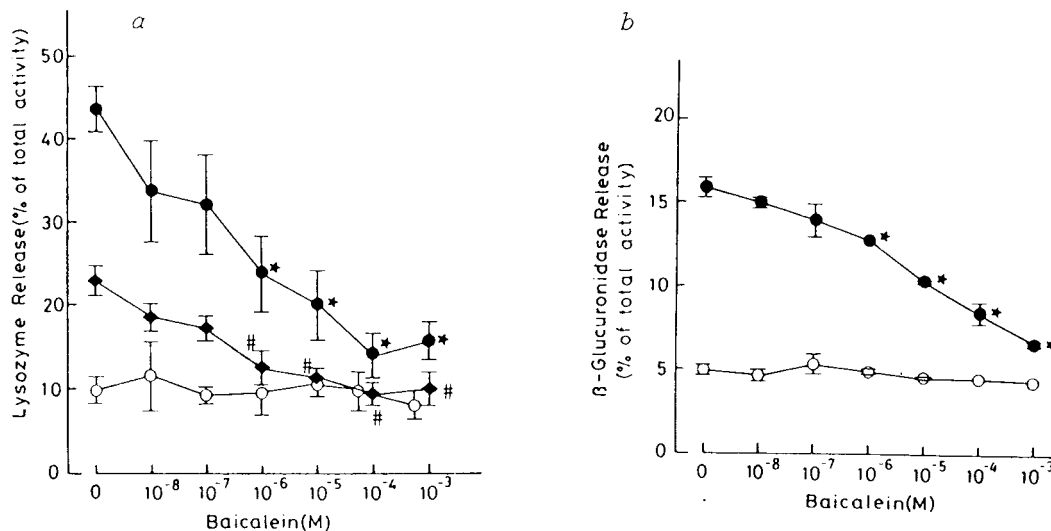


Fig. 6 Effects of baicalein on A23187-induced lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. (a) Effects of baicalein on A23187-induced lysozyme from human polymorphonuclear leukocytes. Values are mean $\pm$ S.E. for four experiments. $\circ$, Without A23187; $\blacklozenge$, with A23187 at $0.1 \mu\text{g/ml}$; $\bullet$, with A23187 at $1.0 \mu\text{g/ml}$. Significant difference with A23187 at $0.1 \mu\text{g/ml}$: # $p < 0.01$; significant difference with A23187 at $1.0 \mu\text{g/ml}$: * $p < 0.01$. Total lysozyme activity was $4.70 \pm 0.95 \mu\text{g egg lysozyme/5 min per } 10^6 \text{ polymorphonuclear leukocytes}$. (b) Effects of baicalein on A23187-induced β -glucuronidase release from human polymorphonuclear leukocytes. Values are mean $\pm$ S.E. for four experiments. $\circ$, Without A23187; $\bullet$, with A23187 at $1.0 \mu\text{g/ml}$. Significant difference from value with A23187: * $p < 0.01$. Total β -glucuronidase activity was $60.3 \pm 1.01 \mu\text{g phenolphthalein/18 h per } 10^6 \text{ polymorphonuclear leukocytes}$.

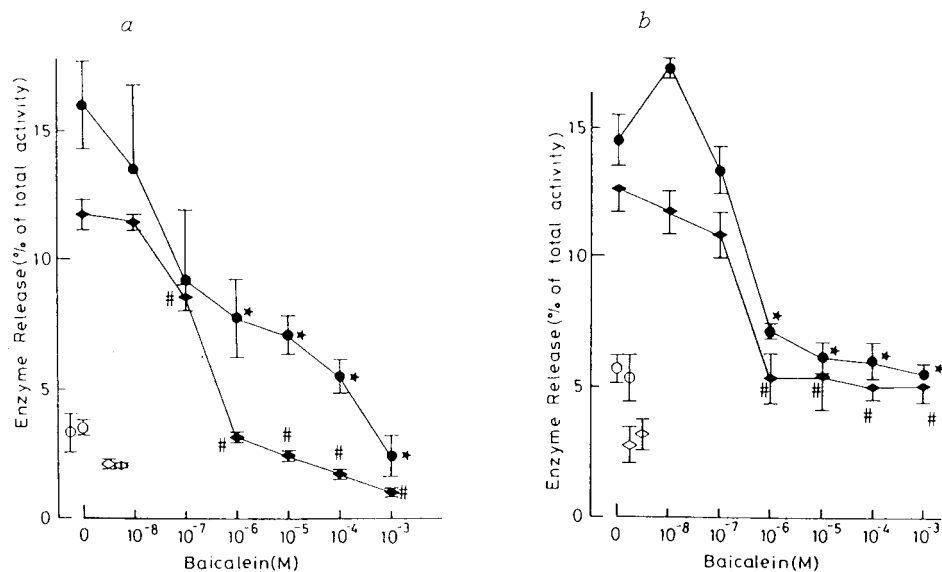


Fig. 7 Effects of baicalein on leukotriene B₄ and platelet-activating factor-induced lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes in the presence of cytochalasin B. Values are mean $\pm$ S.E. for four experiments. (a) Effects of baicalein plus leukotriene B₄ plus cytochalasin B-induced lysosomal enzyme release. $\circ$, $\diamond$, buffer alone; $\diamond$, leukotriene B₄ alone; $\bullet$, lysozyme; $\blacklozenge$, β -glucuronidase. Significant difference with leukotriene B₄ (125 ng/ml) plus cytochalasin B (5 μ g/ml): $\ast\#p < 0.01$. Total lysozyme ($\bullet$) and β -glucuronidase ($\blacklozenge$) activities were 6.39 ± 0.79 μ g egg lysozyme/5 min per 10^6 polymorphonuclear leukocytes and 72.6 ± 3.69 μ g phenolphthalein/18 h per 10^6 polymorphonuclear leukocytes, respectively. (b) Effects of baicalein on platelet-activating factor plus cytochalasin B-induced lysosomal enzyme release. $\circ$, $\diamond$, bovine serum albumin alone; $\diamond$, platelet activating factor alone; $\bullet$, lysozyme; $\blacklozenge$, β -glucuronidase. Significant difference with 100 nM platelet-activating factor plus cytochalasin B (5 μ g/ml): $\ast\#p < 0.01$. Total lysozyme ($\bullet$) and β -glucuronidase ($\blacklozenge$) activities were 6.48 ± 0.38 μ g egg lysozyme/5 min per 10^6 polymorphonuclear leukocytes and 74.9 ± 0.89 μ g phenolphthalein/18 h per 10^6 polymorphonuclear leukocytes, respectively.

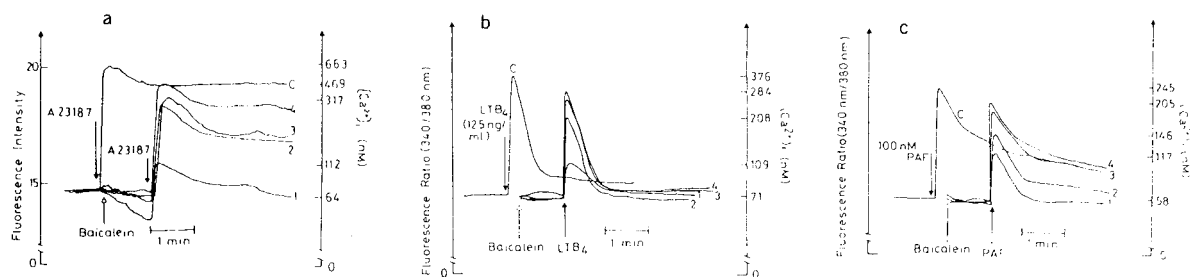


Fig. 8 Effects of baicalein on intracellular free calcium concentrations [Ca²⁺]_i induced by A23187. curve C, polymorphonuclear leukocyte suspensions in HEPES/saline buffer (pH 7.4) containing 1 mM CaCl₂ stimulated with A23187 (1.0 μ g/ml); curves 1-4, polymorphonuclear leukocyte suspensions in HEPES/saline buffer containing 1 mM CaCl₂ stimulated with A23187 after preincubation with 10⁻⁴M (curve 1), 10⁻⁵M (curve 2), 10⁻⁶M (curve 3) and 10⁻⁷M (curve 4) baicalein.

Effects of baicalein on intracellular [Ca²⁺]_i induced by leukotriene B₄. curve C, polymorphonuclear leukocyte suspensions in HEPES/saline buffer containing 1 mM CaCl₂ with leukotriene B₄ (125 ng/ml); curves 1-4, polymorphonuclear leukocyte suspensions in HEPES/saline buffer containing 1 mM CaCl₂ stimulated with leukotriene B₄ after preincubation with 10⁻⁴M (curve 1), 10⁻⁵M (curve 2), 10⁻⁶M (curve 3) and 10⁻⁷M (curve 4) baicalein.

Effects of baicalein on intracellular [Ca²⁺]_i induced by platelet activating factor. curve C, polymorphonuclear leukocyte suspensions in HEPES/saline buffer containing 1 mM CaCl₂ with 100 nM platelet activating factor; curves 1-4, polymorphonuclear leukocyte suspensions in HEPES/saline buffer containing 1 mM CaCl₂ stimulated with platelet activating factor after preincubation with 10⁻⁴M (curve 1), 10⁻⁵M (curve 2), 10⁻⁶M (curve 3) and 10⁻⁷M (curve 4) baicalein.

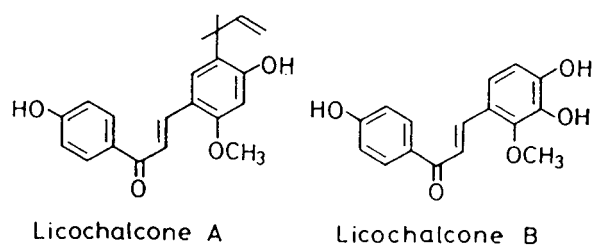


Fig. 9 The structures of test compounds.

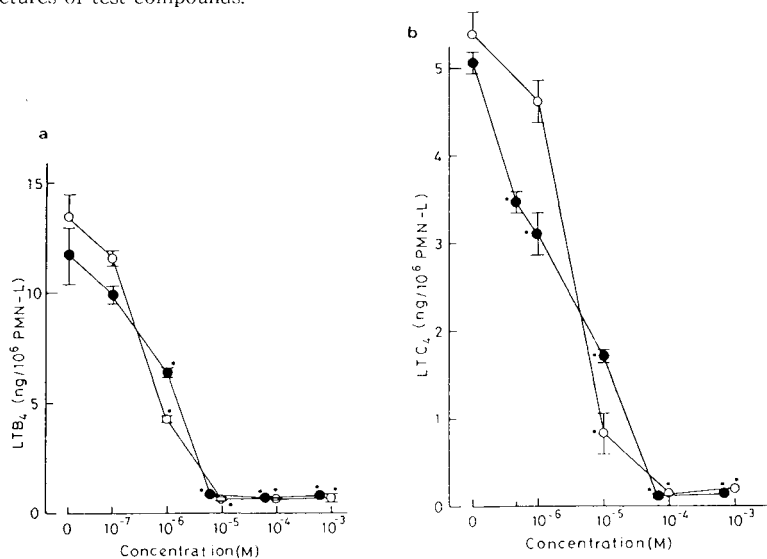
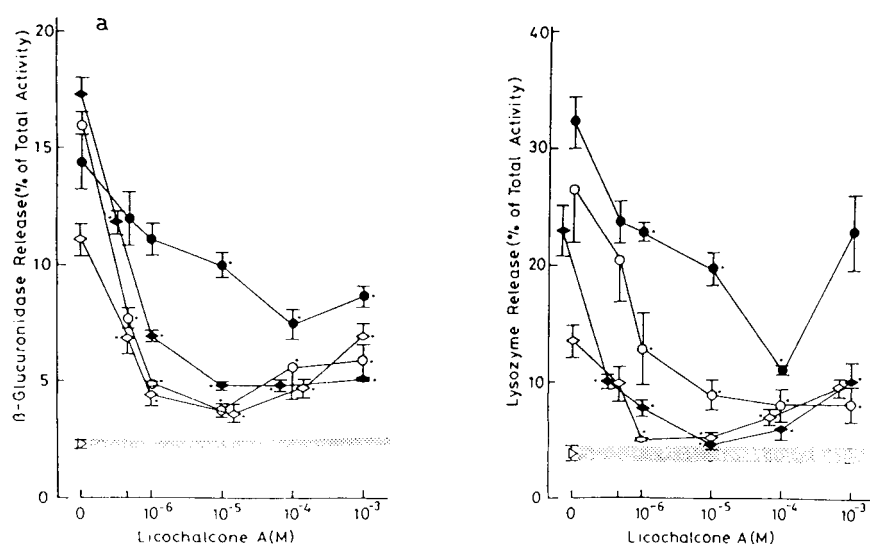
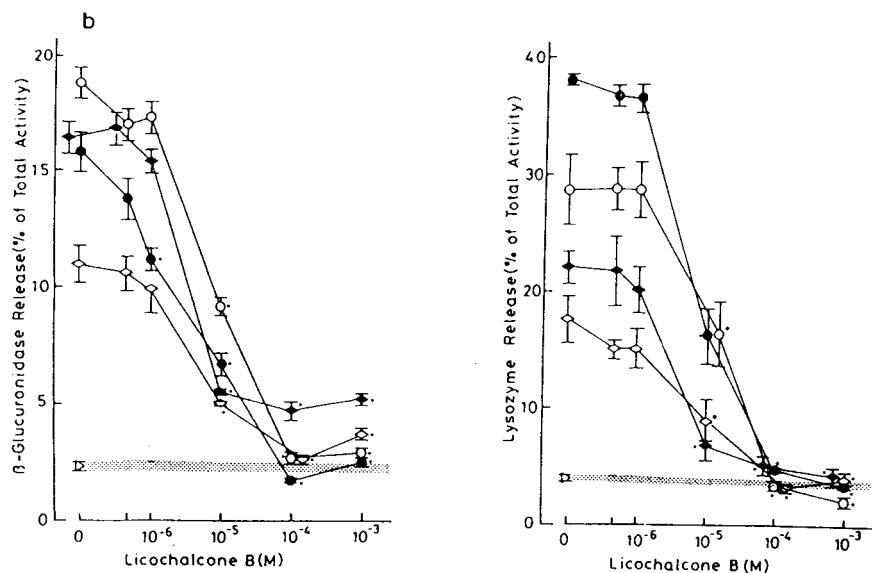
Fig. 10 Effects of licochalcones A and B on A23187-induced leukotrienes B₄ (a) and C₄ (b) in human PMNs. ○, licochalcone A; ●, licochalcone B. Values are means±S.E. for four experiments. Significant difference from the values with A23187 alone; **p*<0.01.Fig. 11 Effects of licochalcone A on lysosomal enzyme release induced by various stimuli. ●, 2 μ M A23187; ○, 50 nM fMLP plus cyto B (5 μ g/ml); ◆, 200 nM PAF plus cyto B; ◇, LTB₄ (125 ng/ml) plus cyto B. Values are means±S.E. for four experiments. Total β -glucuronidase activity was 73.6 ± 2.37 μ g phenolphthalein/18 h/10⁶ PMNs (mean±S.E. for 16 experiments). Total lysozyme activity was 6.16 ± 0.48 μ g egg lysozyme/5 min/10⁶ PMNs (means±S.E. for 16 experiments). Significantly different from the values induced by various stimuli: ★*p*<0.01.

Fig. 11



Effects of licochalcone B on lysosomal enzyme release by various stimuli. ●, $2 \mu\text{M}$ A23187; ○, 50 nM fMLP plus cyto B ($5 \mu\text{g/ml}$); ◆, 200 nM PAF plus cyto B; ◇, LTB_4 (125 ng/ml) plus cyto B. Values are means $\pm$ S.E. for four experiments. Total β -glucuronidase activity was $75.8 \pm 2.69 \mu\text{g}$ phenolphthalein/ $18 \text{ h}/10^6$ PMNs (mean $\pm$ S.E. for 16 experiments). Total lysozyme activity was $6.74 \pm 0.50 \mu\text{g}$ egg lysozyme/ $5 \text{ min}/10^6$ PMNs (means $\pm$ S.E. for 16 experiments). Significantly different from the values induced by various stimuli: * $p < 0.05$; ★ $p < 0.01$.

fMLP による白血球に対する脱顆粒反応に対して, Licochalcone A および B は濃度依存的に抑制した。さらに, Licochalcone A および B はカルシウムイオノマイシン, LTB_4 , PAF および fMLP 刺激による白血球内遊離カルシウム濃度の上昇を濃度依存的に抑制した (Fig.

12)。

以上のことから, Licochalcone A および B の阻害機構もまた Baicalein と同様に細胞内遊離カルシウム濃度の低下によって一部説明できるものと考えられる。

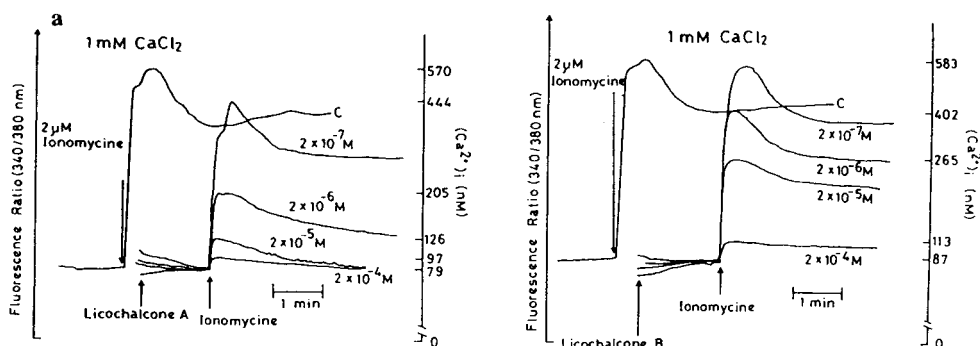
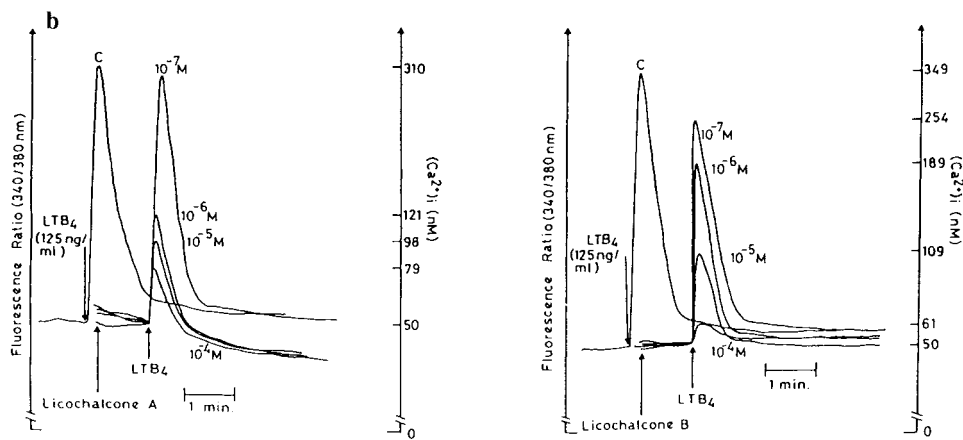
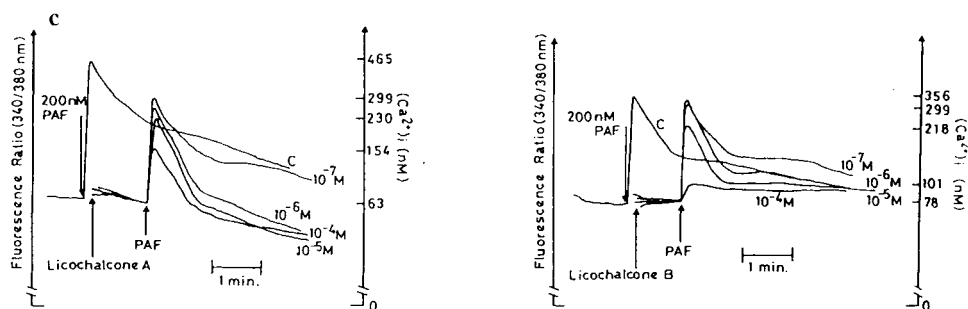


Fig. 12 Effects of licochalcones A and B on intracellular free calcium concentration induced by ionomycin in the presence of 1 mM CaCl_2 , $2 \mu\text{M}$ ionomycin alone.

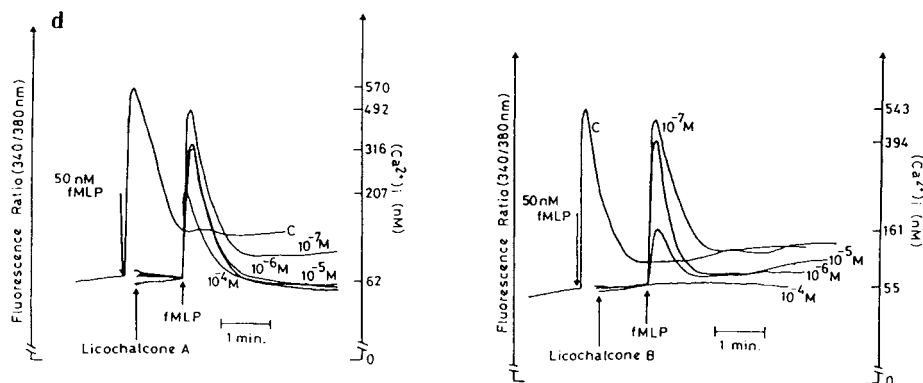
Fig. 12



Effects of licochalcones A and B on intracellular free calcium concentration induced by LTB_4 in the presence of 1 mM CaCl_2 . C, LTB_4 (125 ng/mL) alone.



Effects of licochalcones A and B on intracellular free calcium concentration induced by PAF in the presence of 1 mM CaCl_2 . C, 200 nM PAF alone.



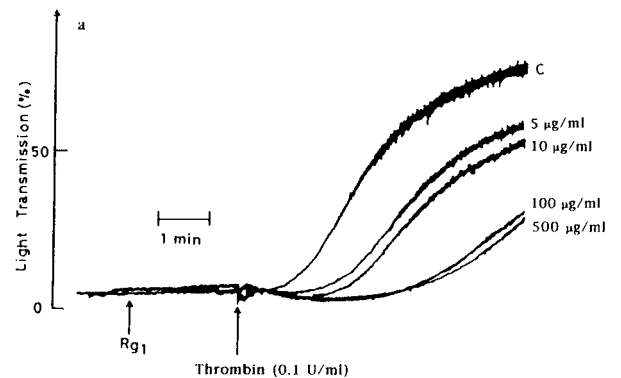
Effects of licochalcones A and B on intracellular free calcium concentration induced by fMLP in the presence of 1 mM CaCl_2 . C, 50 nM fMLP alone.

6. 人参中のサポニン成分 Ginsenoside Rg_1 の血小板に対する作用¹¹⁾

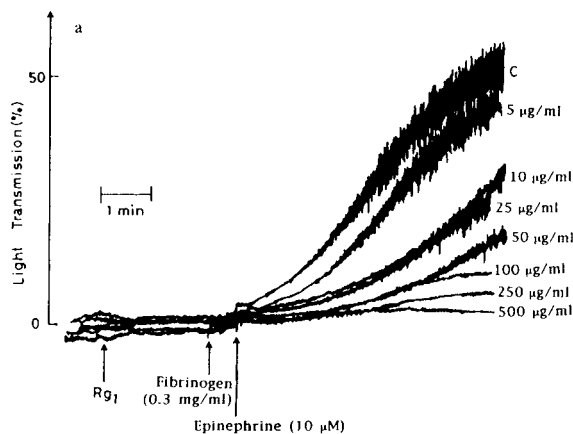
古来から、薬用人参は高貴薬として珍重され、滋養、強壮薬として使用されてきた。近年の人参の研究成果から、末梢循環改善作用、造血促進作用などの効用が知られている。人参の抗血小板作用とその機序に関して、平井によって報告されている。¹²⁾

最近、著者らは、エピネフィリンによる血小板凝集反応がフィブリンノーゲン存在下において α 受容体を介して Na^+/H^+ antiporter を活性化し、細胞内への Ca^{2+} 流入による細胞内遊離カルシウム濃度上昇をもたらして引き起こされることを報告している。¹³⁾

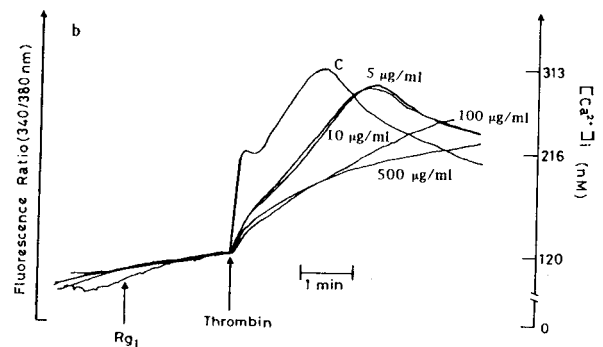
Fig. 13 および Fig. 14 に示すように、Ginsenoside Rg_1 がエピネフィリンおよびトロンビンによる血小板凝集を濃度依存的に抑制すると共に、刺激剤添加後に引き起こ



Effects of ginsenoside Rg_1 on thrombin-induced platelet aggregation.

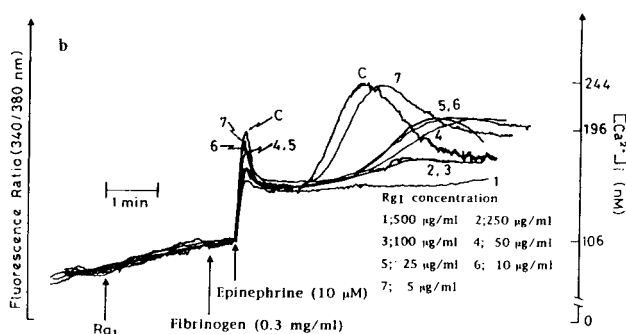


Effects of ginsenoside Rg_1 on epinephrine-induced platelet aggregation.



Effects of ginsenoside Rg_1 on thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ in human platelets.

Fig. 14



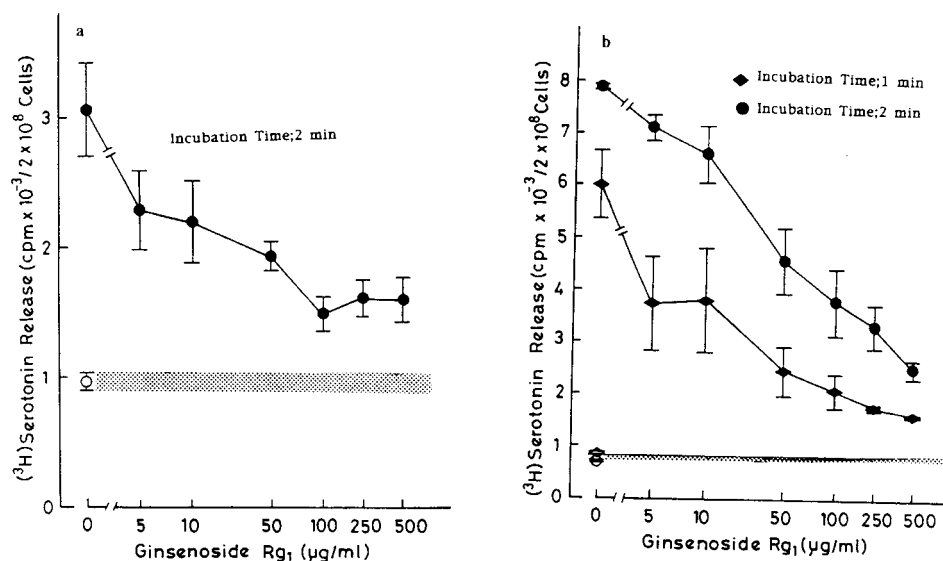
Effects of ginsenoside Rg_1 on epinephrine-induced $[Ca^{2+}]_i$ in human platelets.

Fig. 13

される第2層目の細胞内遊離カルシウム濃度の上昇（これは細胞内への Ca^{2+} 流入を示す）¹³⁾を抑制した。

さらに、Ginsenoside Rg_1 はエピネフィリンおよびトロンビンによる血小板からのセロトニン放出を濃度依存的に抑制した (Fig. 15)。Ginsenoside Rg_1 は血小板膜からのアラキドン酸遊離およびアラキドン酸代謝には影響を及ぼさなかった。

以上の成績から、人参の抗血栓作用には人参サポニン成分 Ginsenoside Rg_1 が関与し、その作用の一部として、血小板凝集抑制によるもので、その作用機序は細胞内への Ca^{2+} 流入抑制を介しているものと考えられる。



Effects of ginsenoside Rg₁ on epinephrine-induced [³H]5-HT release from human platelets.

Effects of ginsenoside Rg₁ on thrombin-induced [³H]5-HT release from human platelets.

Fig. 15

7. イヌトウキ (*Angelica shikokiana* MAKINO) 根からのロイコトリエン類生成阻害物質の単離と構造について¹⁴⁾

Angelica shikokiana MAKINO (イヌトウキ) は近畿南部から四国、九州の山地に自生する多年草で、その根は

九州の一部の地域、特に大分県地方で栽培され、薬用人参の代用薬として民間的に使用されている。特に、その用途として、アレルギー性疾患に効果があると云われている。本論文では、ヒト多核白血球におけるロイコトリエン類生成に対する影響を検討し、その阻害物質を単

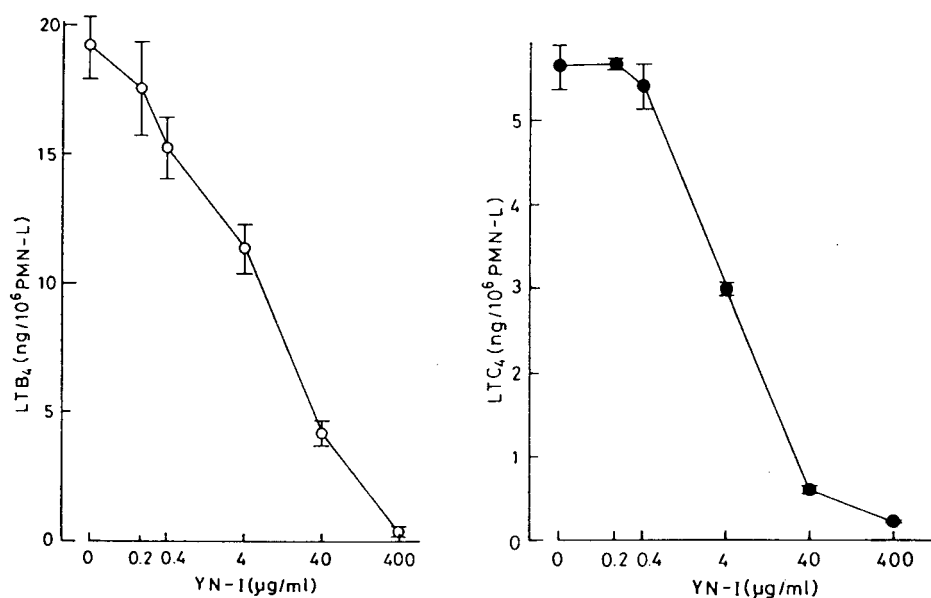


Fig. 16 Effects of YN-I on leukotriene B₄ and C₄ biosyntheses induced by calcium ionophore A23187 in human polymorphonuclear leukocytes.

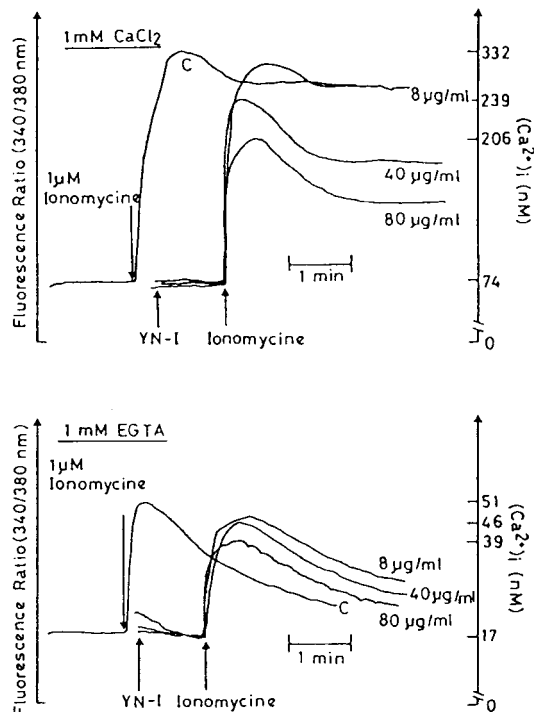
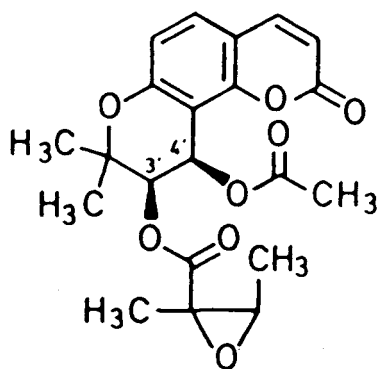


Fig. 17 Effects of YN-1 on intracellular free calcium concentration induced by ionomycin.



YN-1

Fig. 18 The structure of YN-1

離・構造決定した。

イヌトウキ根を EtOAc, MeOH, H₂O で順次抽出し、その各々の抽出画分のロイコトリエン産生に対する作用を検討した結果、EtOAc 抽出画分に強いロイコトリエン産生抑制作用を見出した。この活性画分をシリカゲルカラムクロマト [n-hexane-EtOAc (3:2) および CHCl₃-EtOAc (20:1)] にて分離を繰り返して、阻害活性成分 (YN-1) を単離した。YN-1 はヒト多核白血球での A23187 刺激による LTB₄ および LTC₄ 産生を 4 µg/ml から 400 µg/ml 濃度において抑制した (Fig. 16)。さらに、Fig. 17 に示すように、YN-1 は 40 µg/ml から 80 µg/ml 濃度においてカルシウムイオノフォア (イオノマイシン) による細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を抑制した。

YN-1 は、UV スペクトル、MS スペクトル、IR スペクトルおよび ¹H-NMR スペクトル結果から、Khellactone 型のクマリン誘導体であることが判明した。さらに、YN-1 の EtOH 性 NaOH での加水分解反応等を通して、YN-1 の構造が 3'-(R), 4'-(R)-3'-epoxyangeloyloxy-4'-acetoxy-3',4'-dihydroseselin で、新規成分であることを明らかにした (Fig. 18)。

以上の結果から、本成分がイヌトウキ根の抗アレルギー作用に対して一部寄与しているものと思われる。そして、本成分によるヒト多核白血球内遊離カルシウム濃度の低下作用は 40 µg/ml から 80 µg/ml 濃度で、ロイコトリエン類を阻害する濃度においては影響を及ぼさなかった。従って、本成分のロイコトリエン類産生抑制作用は細胞内遊離カルシウム濃度の上昇抑制よりも、5-リポキシゲナーゼに対する抑制によるものと考えられる。以上の実験事実から、YN-1 はロイコトリエン生成の関与するアレルギー性疾患に対して有望な薬剤となる素材成分候補であると考えられる。

8. 最後に

本論文で取り上げた漢薬「黄芩」、「甘草」および「人參」は代表的な漢方処方「小柴胡湯」、「大柴胡湯」、「半夏瀉心湯」などに配合され、最も繁用されている。

上記漢方処方は漢方理論において、「少陽病」(半表半裏) に位置する病態、症状に用いられ、現在の臨床的な応用面から、肝炎、高脂血症、動脈硬化症、下痢等のアレルギー性炎症を原因とする疾患の治療薬として使用されている。

本論文では、アレルギー性炎症に深く関与している白血球、血小板中のアラキドン酸代謝に対する上記漢薬成分の影響を検討し、古来、伝承されてきた薬能の一部を生化学的に解明することを試みた。その結果、本論文で取り上げた漢薬の薬効の一部を証明することができたと

考える。さらに、わが国の民間伝承薬の一つを取り上げ、生化学的手法を用いて活性成分の単離を試み、その生理活性成分が新規物質であることを明らかにした。このように、文献的に記載されずに、一部の地域のみで伝承されている天然素材も新たな天然薬物の候補となることの可能性を示した。

以上の観点で和漢薬を考える場合、古来の文献記載事実、伝承および現在の臨床的評価に基づいて和漢薬の生理活性成分の本体を発見することが、「天然薬物からの創薬」への一歩となるものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に際しまして、種々の御教示、御便宜を与えて下さいました愛媛大学医学部生化学第2教室奥田拓道教授、並びに近畿大学東洋医学研究所（故）有地滋教授に感謝すると共に、和漢薬成分の御供与および構造決定に際して、種々の御助言を与えて下さいました岡山大学薬学部生薬学教室奥田拓男教授、並びに大阪薬科大学（故）小澤貢教授、馬場きみ江助教授に感謝致します。また、生薬、特に中国歴代本草書、医方薬物書での薬能についての御教示を与えて下さいました近畿大学薬学部薬用植物研究室久保道德教授に感謝致します。

References

- 1) 明 趙清常原本，影刻宋本傷寒論，卷33，22頁（久保道德，谿 忠人：漢方医薬学，広川書店，東京，1984）から引用。
- 2) Morris, H.R., Taylor, G.W., Piper, P.J., Tippins, J.R.: Structure of slow-reacting substance of anaphylaxis from guinea-pig lung. *Nature* **285**, 104-106, 1980.
- 3) O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Jess, C.J., Shewmake, T., McCall, C.E., Thomas, M.J.: Neutrophil degranulating action of 5,12-dihydroxy-6,8,10,14 eicosatetraenoic acid and 1-O-alkyl-1-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine; Comparison with other degranulating agents. *Am.J. Pathol.* **105**, 264-269, 1981.
- 4) Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M., Hanadan, D.J.: Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl / octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Platelet activating factor). *J. Immunol.* **127**, 1250-1255, 1981.
- 5) O'Flaherty, J.T., Jess, C.J., Miller, C.H., McCall, C.E., Lewis, J.C., Love, S.H., Wykle, R.L.: Selective desensitization of neutrophils; Further studies with 1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine analogues. *J. Immunol.* **127**, 731-737, 1981.
- 6) Nakao, J., Ooyama, T., Wen Chang, C., Murota, S., Orimo, H.: Platelets stimulate aortic smooth muscle cell migration in vitro; Involvement of 12- α -hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *Atherosclerosis* **43**, 143-150, 1982.
- 7) Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S.: Studies on *Scutellariae radix* XIII; Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism in leukocytes. *Planta Medica* **51**, 132-136, 1985.
- 8) Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S.: Effects of baicalein on leukotriene biosynthesis and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **922**, 278-286, 1987.
- 9) Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Arichi, S.: Effects of chalcones isolated from Licorice roots on leukotriene biosynthesis in human polymorphonuclear neutrophils. *Phytotherapy Res.* **2**, 140-145, 1988.
- 10) Kimura, Y., Okuda, T., Okuda, H.: Effects of flavonoids isolated from Licorice roots (*Glycyrrhiza inflata* BAT.) on degranulation in human polymorphonuclear neutrophils. *Phytotherapy Res.* **7**, 335-340, 1993.
- 11) Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S.: Effects of various ginseng saponins on 5-hydroxytryptamine release and aggregation in human platelets. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 838-843, 1988.
- 12) Hirai, A.: Study on the mechanisms of anti-platelet and anti-atherosclerotic effects of Sino-Japanese traditional medicines: Focusing arachidonic acid cascade. *J. Trad. Med.* **11**, 16-28, 1994.
- 13) Kimura, Y., Okuda, H.: Effects of α - and β -adrenergic antagonist on epinephrine-induced aggregation and intracellular free calcium concentration in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1069-1075, 1994.
- 14) Kimura, Y., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, M., Arichi, S.: Effects of an active substance isolated from the roots of *Angelica shikokiana* on leukotriene and monohydroxyeicosapentaenoic acid biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Planta Medica* **53**, 521-525, 1987.