

漢薬・黄芩中のフラボノイド成分の抗トリプシン作用

荻田善三郎, 高田あゆみ, 木村 善行*

住友金属工業(株)ハイクオリティライフ研究所, 医薬研究部 薬理研究室

Anti-trypsin actions of various flavonoids isolated from
Scutellariae Radix

Zensaburou OGITA, Ayumi TAKADA and Yoshiyuki KIMURA*

Pharmacology Laboratory, New Drug Research Department, High Quality-Life
Research Laboratories, Sumitomo Metal Industries

(Received June 29, 1995. Accepted August 10, 1995.)

Abstract

We found that both ethylacetate and methanol fractions extracted from *Scutellariae Radix* inhibited trypsin activities at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. To determine whether the inhibitory effects of the above fractions on trypsin activities were due to inhibitions by the flavonoid components contained in *Scutellariae Radix*, we attempted to examine the effects of nine flavonoids (*e.g.* baicalein, wogonin, oroxylin-A, skullcapflavone II, 2',5',7'-tetrahydroxy-6',8' dimethoxyflavone *etc.*) isolated from *Scutellariae Radix* on trypsin activities. Among the nine flavonoids, baicalein inhibited trypsin activities, most strongly. Its concentration for 50 % inhibition (IC_{50}) was $5.0 \times 10^{-7} \text{M}$. In addition, we studied the effects of other flavonoids (*e.g.* quercetin, luteolin, kaempferol *etc.*) except for the nine flavonoids isolated from *Scutellariae Radix* on trypsin activities. It was found that quercetin, luteolin and kaempferol inhibited trypsin activities; their IC_{50} were $2.5 \times 10^{-7} \text{M}$, $3.0 \times 10^{-7} \text{M}$ and $7.5 \times 10^{-6} \text{M}$, respectively. The flavonoids used in this study had no effect on thrombin. Baicalein, quercetin and luteolin inhibited plasmin activities, though less strongly; their IC_{50} were $3.2 \times 10^{-5} \text{M}$, $3.6 \times 10^{-5} \text{M}$ and $2.5 \times 10^{-5} \text{M}$, respectively. Therefore, it was elucidated that the above flavonoids such as baicalein, quercetin and luteolin inhibited trypsin activities without affecting thrombin and plasmin activities.

Key words anti-trypsin, thrombin, plasmin, *Scutellariae Radix*, flavonoids.

緒 言

漢薬・黄芩は *Scutellaria baicalensis* GEORGI を基源植物とする乾燥根で、「小柴胡湯」、「大柴胡湯」、「半夏瀉心湯」などの漢方処方中に配合され、「心下痞」即ち胸のつかえ、悪心などの症状を有する消化器性疾患に漢方臨床的に用いられている。このような症状は、近年の欧米化された食生活、特に肉類および脂肪分の摂取過多、アルコール性飲料過多によって引き起こされる急性および慢性膵臓炎の症状に類似している。膵臓炎は膵酵素のト

リプシンの活性化によって開始され、膵腺房細胞が傷害される炎症性疾患である。¹⁾

従って、黄芩の薬効の一部として膵炎に対して有効であると考えられたので、黄芩の酢酸エチル(EtOAc)、メタノール(MeOH)抽出画分およびフラボノイド成分の抗トリプシン作用を検討し、同時に、セリンプロテアーゼ類の血液凝固系・線溶系を調節しているトロンビンおよびプラスミンに対する影響を比較検討した。更に、黄芩以外の天然物由来の代表的なフラボノイド成分の抗トリプシン、抗トロンビンおよび抗プラスミン作用も検討した。

*〒619-02 京都府相楽郡精華町光台3-5
3-5 Hikaridai, Seika-cho, Souraku gun, Kyoto 619-02,
Japan

材料と方法

(1) 各種試薬およびフラボノイド成分：本実験に使用した溶媒、試薬類は和光純薬工業(株)から購入した。Quercetin, rutin, および luteolin は和光純薬工業(株)から購入し, apigenin, kaempferol, hesperetin, hesperidin, naringenin および naringin はシグマ社から購入した。Acacetin は岡山大学薬学部生薬学教室の奥田教授から供与して頂いた。N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-Nitroanilide (シグマ社) はトリプシンおよびトロンピン活性測定のための合成基質として, H-D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilide (S-2251) (第一化学薬品(株))はプラスミン活性測定のための合成基質として用いた。トリプシン阻害剤としてメシル酸ナファモスタット (フサン) (鳥居薬品(株))を用いた。

(2) 黄芩からの各抽出エキスの調製および各種フラボノイド成分の単離：黄芩(10 kg)を EtOAc (11×3 回) および MeOH (11×3 回) で順次環流抽出し, 各抽出物の抗トリプシン活性を測定した。その結果, EtOAc および

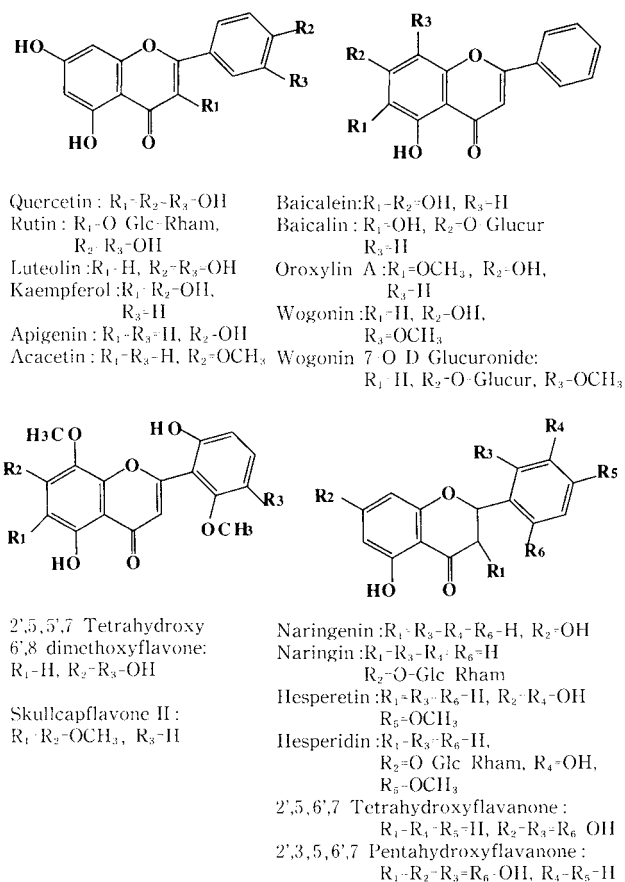


Fig. 1 Chemical structures of various flavonoids.

MeOH 抽出画分に抗トリプシン作用が認められた(結果の項に記述)。そこで, 阻害活性の認められた EtOAc 抽出エキス (100 g) および MeOH 抽出エキス (50 g) をすでに著者らが報告している方法^{2,4)}によって9種のフラボノイド化合物を得た。即ち, EtOAc 抽出エキスから, baicalein (31.2 g), 2',5,5',7-tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavone (3.5 g), oroxylin-A (1.1 g), skullcapflavone II (6.3 g), wogonin (10.5 g), 2',5,6',7-tetrahydroxyflavanone (3.8 g) および 2',3,5,6',7-pentahydroxyflavanone (4.2 g) を得, MeOH 抽出エキスから baiclein (5.1 g), baicalin (16 g) および wogonin-7-O-D-glucuronide (1.3 g) を得た。これらの化合物は標準化合物の 1H -NMR および IR スペクトルデータの比較によって同定した。

(3) トリプシン, トロンピンおよびプラスミン活性の測定方法：トリプシン, トロンピンおよびプラスミンの測定方法は, Fujimaki & Kato の方法⁵⁾ および Fujii & Hitomi の方法⁶⁾ を改良して行った。各種被験薬はジメチルスルホキシド溶液 (DMSO 溶液) に溶解し, 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈して用いた (DMSO の終濃度は酵素反応に影響を及ぼさない 0.5 % 以下にした)。方法の概略は, 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.6 ml 中に蛋白分解酵素トリプシン (45 μ g/ml), トロンピン (5 U/ml) あるいはプラスミン (0.5 U/ml) 溶液 100 μ l および各濃度に調製した各種被験薬溶液 100 μ l を加え, 25°C, 10 分間プレインキュベーションした。次に, トリプシンおよびトロンピン活性測定のための合成基質 N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-Nitroanilide (1 mg/ml) 200 μ l を加え, 最終容量 1.0 ml として, 更に 25°C, 15 分間反応させた。反応溶液に 50 % トリクロル酢酸 100 μ l を加えて酵素反応を停止させ, 30 分間氷水中に放置後, 4°C, 1500×g で 20 分間遠心分離し, 上清中に遊離した p-nitroaniline を定量した。プラスミン活性には合成基質 H-D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilide (1 mg/ml) を用い, 同様の操作で行った。各種フラボノイド化合物のトリプシン, トロンピンおよびプラスミン活性に対する 50 % 阻害濃度 (IC_{50}) はコントロール (被験薬の無添加) の遊離 p-nitroaniline 量を 100 % として算出した。

結果

1. 黄芩の各抽出画分の抗トリプシン作用および各種フラボノイド成分の抗トリプシン, 抗トロンピン, 抗プラスミン作用

黄芩の EtOAc および MeOH 抽出画分 100 μ g/ml 濃度において, 各々 83 % および 76 % の抗トリプシン作

用が認められた。黄芩の各種フラボノイド成分の内、baicalein が最も強く抗トリプシン作用を示し、その IC_{50} は $5 \times 10^{-7} M$ であった。Baicalein 以外の 6 種類のフラボノイド成分の抗トリプシン作用は弱く、それらの IC_{50} は $10^{-5} M$ オーダーで、Baicalein の配糖体 baicalin および wogonin の配糖体 wogonin-7-*O*-D-glucuronide には抗トリプシン作用は認められなかった。

トロンビンに対して、上記 9 種のフラボノイド化合物は何ら影響を及ぼさなかった。

プラスミンに対して、9 種類のフラボノイド成分の内、baicalein のみがプラスミンに対して阻害活性を示し、その IC_{50} は $3.6 \times 10^{-5} M$ でトリプシンの阻害活性と比較すると約 64 倍弱かった。

以上の実験結果に基づいて、黄芩以外の代表的な天然物由来のフラボノイド成分 10 種類、例えばフラボノール

化合物として、quercetin, rutin, kaempferol の 3 種、フラボン化合物として luteolin, apigenin, acacetin の 3 種、フラバノン化合物として, hesperetin, hesperidin, naringenin, naringin の 4 種を選択し、トリプシン、トロンビンおよびプラスミンに対する作用を検討した。

2. 黄芩以外のフラボノイド成分の抗トリプシン、抗トロンビンおよび抗プラスミン作用

Quercetin, luteolin および kaempferol が抗トリプシン作用を示し、各々の IC_{50} は各々 $2.5 \times 10^{-7} M$, $3.0 \times 10^{-7} M$ および $7.5 \times 10^{-6} M$ で、quercetin の配糖体 rutin およびフラバノン誘導体は抗トリプシン作用を示さなかった。

トロンビンに対して、黄芩以外の 10 種のフラボノイド化合物は何ら影響を及ぼさなかった。

Quercetin, luteolin および acacetin が抗プラスミン

Table I Effects of various flavonoids and futhan on trypsin, thrombin and plasmin activity.

Compounds	50 % Inhibitory Concentration (IC_{50})		
	Trypsin Activity	Thrombin Activity	Plasmin Activity
Baicalein	$5.0 \times 10^{-7} M$	$> 10^{-4} M$	$3.2 \times 10^{-5} M$
Baicalin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
2',5,5',7-Tetrahydroxy-6',8-di-methoxyflavone	$1.2 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Oroxylin-A	$1.5 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Skullcapflavone II	$1.8 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Wogonin	$2.8 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Wogonin-7- <i>O</i> -D-glucuronide	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
2',5,6',7-Tetrahydroxyflavanone	$2.5 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
2',3,5,6',7-Penta-hydroxyflavanone	$3.0 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Quercetin	$2.5 \times 10^{-7} M$	$> 10^{-4} M$	$3.6 \times 10^{-5} M$
Rutin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Luteolin	$3.0 \times 10^{-7} M$	$> 10^{-4} M$	$2.5 \times 10^{-5} M$
Kaempferol	$7.5 \times 10^{-6} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Apigenin	$3.5 \times 10^{-5} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Acacetin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$5.4 \times 10^{-5} M$
Hesperetin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Hesperidin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Naringenin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Naringin	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$	$> 10^{-4} M$
Futhan	$1.7 \times 10^{-9} M$	$5.6 \times 10^{-9} M$	$8.5 \times 10^{-9} M$

作用を示し、それらの IC_{50} は各々 $3.6 \times 10^{-5} M$, $2.5 \times 10^{-5} M$ および $5.4 \times 10^{-5} M$ で、抗トリプシン作用と比較すると弱い作用を示した。(Table I)

考 察

今回、黄芩の薬能の観点から、急性膵炎を引き起こす膵酵素トリプシンに対する黄芩の各抽出分画の作用を検討した。その結果、黄芩の抗トリプシン作用成分として baicalein を明らかにした。黄芩エキスの主要成分 baicalin をラットに経口投与した時、血中に baicalin, baicalein およびその代謝物 baicalein-6,7-di-O-glucuronide が存在することが既に報告されている⁷⁾。従って、黄芩エキスを経口投与した時、血中に baicalein として存在し、抗トリプシン作用を有する可能性が考えられる。今後、膵炎モデル動物を使用した *in vivo* 実験で、黄芩エキス、baicalin および baicalein の薬効を詳細に検討する必要があると考える。

黄芩以外の代表的な天然物由来のフラボノイド成分の抗トリプシン、抗トロンビンおよび抗プラスミン作用を検討し、quercetin および luteolin が baicalein と同様に、トロンビンおよびプラスミン活性に対して影響することなしに抗トリプシン作用を有することを明らかにした。

今回の研究に使用した 19 種類のフラボノイド成分の化学構造と抗トリプシン活性の関係から、フラボン骨格中に隣接した水酸基を有する化合物、例えば、baicalein

(5,6,7 trihydroxyflavone), quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) および luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) に抗トリプシン作用が認められた。これらの事実は、フラボン骨格中の隣接する水酸基がトリプシン阻害に必要と推定されるが、この推測は多くのフラボノイド成分の抗トリプシン作用を検討することによって明らかにできると考える。

References

- 1) Takeda, K., Kobari, M., Sunamura, M., Matsuno, S.: Continuous arterial infusion of protease inhibitor as a new therapeutic intervention for severe acute pancreatitis. *Saishin Igaku* (最新医学), **47**, 2168-2174, 1992.
- 2) Kubo, M., Kimura, Y., Odani, T., Tani, T., Namba, K.: Studies on *Scutellariae Radix* Part II; The antibacterial substance. *Planta Medica* **43**, 194-201, 1981.
- 3) Kimura, Y., Okuda, H., Tani, T., Arichi, S.: Studies on *Scutellariae Radix* VI. Effects of flavanone compounds on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1972-1975, 1982.
- 4) Kimura, Y., Okuda, H., Shoji, N., Taira, Z., Takemoto, T., Arichi, S.: Studies on *Scutellariae Radix* IX. New component inhibiting lipid peroxidation in rat liver. *Planta Medica* **50**, 290-294, 1984.
- 5) Fujimaki, M. and Kato, M.: Synthetic chromogenic substrates for determination of blood clotting and fibrinolytic factors. *J. Med. Enzymology* **3**, 554-564, 1980.
- 6) Fujii, S. and Hitomi, Y.: New synthetic inhibitors of Clr, Cl esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **661**, 342-345, 1981.
- 7) Abe, K., Inoue, O., Miura, O., Umioka, E.: Abstract papers, 105th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan. Kanazawa, April 1985, p. 455.