

生薬・マムシと紅参のラット強制遊泳 負荷試験における抗疲労作用

松田 秀秋,*^{a)} 森浦 俊次,^{b)} 寒川 慶一,^{c)} 久保 道德^{a)}

^{a)}近畿大学薬学部薬用資源学研究室, ^{b)}(株)阪本漢法製薬, ^{c)}日韓高麗人參(株)薬用人参研究所

Anti-fatigue effects of dried body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* and steamed and dried root of *Panax ginseng* on acute weight-loaded forced swimming-treated rats

Hideaki MATSUDA,*^{a)} Toshitsugu MORIURA,^{b)} Keiichi SAMUKAWA,^{c)} Michinori KUBO^{a)}

^{a)}Department of Natural Drug Resources, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,

^{b)}Sakamoto Kampo Pharmaceutical Inc., ^{c)}Ginseng Institute, Japan Korea Red Ginseng Co., Ltd.

(Received June 26, 1995. Accepted December 11, 1995.)

Abstract

A study was carried out to examine the combined anti-fatigue effect of the dried whole body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE. ("Mamushi" in Japanese) and steamed and dried root of *Panax ginseng* ("Kojin" in Japanese). The 50 % ethanol extract (M-ext) from Mamushi or the 70 % methanol extract (G-ext) from Kojin at successive doses of 500 mg/kg/d for 3 days prolonged significantly swimming time in acute weight-loaded forced swimming (AWLFS) test in rats. In 90 min AWLFS-treated rats, M-ext at a dose of 500 mg/kg inhibited the elevation of thiobarbiturate-reactive substances (TBARS) as an index of lipid peroxide level in plasma and soleus muscle. G-ext at a dose of 500 mg/kg inhibited the decrease in glucose level in plasma and glycogen content in the liver. When M-ext and G-ext was simultaneously administered at a lower dose, 100 mg/kg, the anti-fatigue effect was more potent than that of M-ext or G-ext alone.

Key words *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii*, *Panax ginseng*, anti-fatigue effect, forced swimming, thiobarbiturate-reactive substances, combined effect.

Abbreviations AWLFS, acute weight-loaded forced swimming; Glu, glucose; FFA, free fatty acid; LA, lactate; TBARS, thiobarbiturate-reactive substances; MDA, malondialdehyde.

緒 言

本邦における代表的な強壯生薬のひとつといえる生薬・マムシと薬用人参の強壯効果については既に種々報告¹⁻³⁾され、著者らもマムシについてはその抗疲労作用⁴⁾、血流促進作用^{1,5)}を、薬用人参については血流促進作用⁶⁾を報告している。しかし、これらの強壯効果を同ステー

ジで検討した報告がない。そこで、日本産マムシ及び韓国産紅参の強壯効果を抗疲労作用の面から解明すべく急性重量負荷強制遊泳(AWLFS)試験を行い、その遊泳時間及び血液、組織中生化学的パラメーターを指標に比較検討するとともにそれらの併用効果についても検討を加えた。

*〒577 東大阪市小若江3-4-1
3-4 1, Kowakae, Higashiosaka 577, Japan

材料と方法

(1) 実験材料：生薬・マムシ (*Agkistrodon blomhoffii* blomhoffii BOIE. の全身を乾燥したもの) の粗末に3倍量の50%エタノールを加え、72時間、3回、室温で抽出し、凍結乾燥したエキス(収率：10.1%，以下M-extと略記)及び韓国産6年根紅参 (*Panax ginseng* C.A. MEYER の根を蒸して乾燥したもの) の細末に10倍量の70%メタノールを加え、80℃、2時間、2回抽出し、凍結乾燥したエキス(収率：32.0%，以下G-extと略記)を被検体に用いた。これらの被検体は用時水に懸濁又は希釈して、エキス重量/体重100g/0.2mlの用量で経口投与した。併用投与時はそれぞれのエキスを体重100g当たり0.1mlの用量で連続的に投与した。また、対照群として水のみを体重100g当たり0.2ml投与した。

(2) ラット急性重量負荷強制遊泳(AWLFS)試験

遊泳時間：Slc-Wistar系雄性ラット(180-200g)の尾部に体重当たり4%の重りを付けて遊泳を負荷した。遊泳槽は450×650×300mmの水槽で水温35±1℃とした。遊泳開始からラットが疲労して底に沈み、10秒以内に水面に浮上できない時点までを遊泳時間として記録した。被検体を1日1回3日間経口投与し、最終投与1時間後に強制遊泳運動を負荷した。

生化学的パラメーター：被検体を1日1回3日間経口投与し、最終投与1時間後に上記の方法でラットに遊泳運動を90分間負荷した。ペントバルビタール(45mg/kg, i.p.) 麻酔下で腹部大動脈からヘパリン(20U/ml)処理したシリンジを用いて採血し、3,000rpm, 4℃, 10分間の遠心分離によって血漿を分離した。血漿中のグルコース(Glu)、遊離脂肪酸(FFA)及び乳酸(LA)はそれぞれ、グルコースC-IIテストワコー、NEFA-テストワコー(和光純薬)及びデタミナーLA(協和メデックス)を用いて測定した。また、過酸化脂質(TBARS)量はYagi⁷⁾の方法で測定し、nmolマロンジアルデヒド(MDA)/mlで表した。採血直後ヒラメ筋及び冷生理食塩水で灌流した肝臓を摘出し、各組織を1gにつき10mlの50mMリン酸緩衝液中にてホモジナイズした。肝臓中グリコーゲン量はGoodら⁸⁾の方法で、また、ヒラメ筋中のTBARS量はOhkawaら⁹⁾の方法で測定した。蛋白質量をLowryら¹⁰⁾の方法で測定し、グリコーゲン量をmg/mg蛋白質で、TBARS量をnmolMDA/mg蛋白質で表した。

(3) 統計学的処理：実験結果は平均値±標準誤差で表し、統計学的な有意差検定にはStudent's *t*-testあるいは、Scheffé'sテスト及びBonferroni/Dunnテストを

用いた二元配置分散分析法で行った。

結 果

1. ラット急性重量負荷強制遊泳時間に対する作用

Fig. 1に示したごとく、対照群の遊泳時間は約140分であった。M-extあるいはG-extをAWLFS負荷の開始2日前から1日1回経口投与したところそれぞれ500mg/kgの投与量で遊泳時間を有意に延長した。次にM-ext及びG-extの有効量(500mg/kg)の1/10及び1/5量ずつを併用した時の効果を検討したところ、M-ext及びG-extそれぞれ100mg/kgを併用することにより対照群に比べて有意な遊泳時間の延長が認められた。

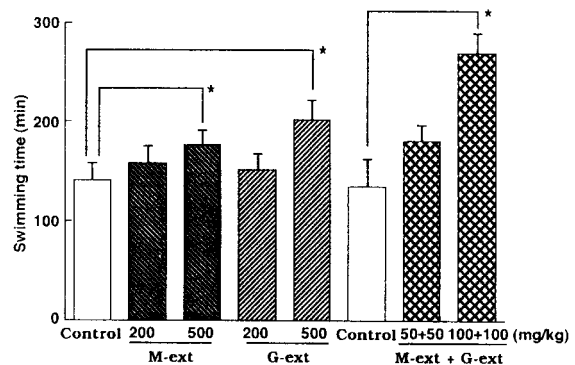


Fig. 1 Anti fatigue effects of M ext, G ext and together M ext with G ext on swimming time of rats with 4% of the body weight attached to the tail. Forced swimming was performed 1 h after the administration of test substances (one time/d for 3 d). Each point represents the mean±S.E. of 8-12 rats. Significantly different from the control group. **p*<0.05 (Scheffé's test).

2. AWLFSによる生化学的パラメーター変化に対する作用

Table Iに示したごとく、ラットにAWLFSを90分間負荷することによって血漿中FFA及びTBARS量は有意に増加し、Glu量は低下傾向を、LA量は増加傾向を示した。これら血液の生化学的パラメーター変化に対してM-ext 500mg/kg投与はTBARS量の上昇を、G-ext 500mg/kg投与はGlu量を有意に上昇させた。M-extとG-extを100mg/kgずつの投与量で併用すると血漿中Glu量を上昇させ、TBARS量の上昇を抑制した。

また、90分間のAWLFSによって肝臓中のグリコーゲン量は著しく低下し、ヒラメ筋中のTBARS量は有意に増加した。M-ext 500mg/kgはヒラメ筋中のTBARS

Table I Effects of M-ext, G-ext and together M-ext with G-ext on changes of biochemical parameters in acute swimming forced rats with 4 % of the body Weight attached to the tail (for 90 min).

Treatment	Dose (mg/kg)	Plasma				Liver	Soleus
		Glu ^{c)} (mg/dl)	FFA ^{d)} (mEq/l)	LA ^{e)} (mg/dl)	TBARS ^{f)} (mg/ml)	Glycogen (mg/mg prote.)	TBARS (mg/mg prote.)
Normal ^{a)}	—	162.0±7.3	0.16±0.03	17.9±1.2	3.78±0.38	234.7±6.3	8.5±0.3
Control ^{b)}	—	132.2±24.6	1.09±0.11#	28.6±4.9	7.54±2.89#	9.3±0.6#	19.3±3.3#
M-ext	200	153.4±18.5	1.26±0.14	27.0±1.4	5.08±1.78	5.8±6.6	12.4±2.3
	500	141.8±20.3	1.15±0.16	27.6±1.2	4.34±1.28*	6.0±4.0	10.0±1.7*
G-ext	200	174.7±20.7	1.14±0.55	27.3±7.2	7.36±0.74	37.0±25.2	18.8±2.9
	500	194.1±17.5**	1.01±0.09	36.8±5.0	8.23±1.59	38.4±18.0**	17.5±4.1
M-ext +	50+50	155.4±16.8	0.94±0.12	25.2±0.9	3.16±0.65*	28.0±16.8	23.3±2.3
G-ext	100+100	216.6±11.8**	0.82±0.13	23.5±2.1	2.52±0.13*	39.6±1.6**	8.9±2.2*

Forced swimming test was performed 1 h after the administration of test substances (one time/d for 3 d).

a) Normal was not treated acute swimming. b) Control was orally administered water alone. c) ; Glu : Glucose. d) ; FFA : free fatty acid. e) ; LA : lactate. f) ; TBARS : lipid peroxide. Each value represents the mean ± S.E. of 10 rats. Significantly different from the normal group, # $p < 0.01$ (Student's t -test). Significantly different from the control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Bonferroni/Dunn test).

量の上昇を有意に抑制し、G-ext 500 mg/kg は肝臓中のグリコーゲン量の低下を有意に抑制した。併用投与(100 mg/kg) すると肝臓中のグリコーゲン量の減少、ヒラメ筋中の TBARS 量の上昇が共に抑制された。

考 察

ラット急性重量負荷強制遊泳試験法を用いて、M-ext 及び G-ext の抗疲労作用を同ステージで比較検討した。その結果、M-ext 及び G-ext は疲労の指標となり得る遊泳時間を 500 mg/kg の用量で有意に延長し、それらの作用強度はほぼ同程度であった。

運動負荷が血液生化学的パラメーターを変動させることはよく知られている¹¹⁾。また、運動負荷に伴って細胞内で活性酸素が生成されることが近年報告され^{12, 13)}、その指標として TBARS 量が測定されている^{14, 16)}。今回の 90 分間の AWLFS 負荷においては Glu 量の低下傾向、FFA, TBARS 量の増加及び LA の増加傾向が観察された。Glu 量の低下, FFA 量の上昇は AWLFS 負荷によるエネルギーの消耗を、LA 量の増加は疲労の蓄積度を、TBARS 量の増加は運動による酸化ストレスの暴露を反映するものと考えられる。G-ext 500 mg/kg は Glu 量を上昇させ、M-ext 500 mg/kg は TBARS 量の上昇を有意に抑制した。また、肝臓中のグリコーゲン量及びヒラメ筋中の TBARS 量を測定した結果、血液生化学的パラメーター変化と相応して G-ext は肝グリコーゲン量の減少を、M-ext はヒラメ筋中の TBARS 量の増加を有意に抑制し、両者は明らかに異なる作用機序を示した。そこで、作用機序の異なる両者を併用すれば相乗的な

効果が得られると考え、単独投与で有意な効果を示した 500 mg/kg の 1/10, 1/5 量ずつの併用投与時の遊泳時間延長作用を検討した。その結果、単独投与時に比して 1/5 量ずつの投与量で単独投与時の効果と同等の効果が認められた。また、生化学的パラメーター変化に対しても 1/5 量ずつの用量で血漿中 Glu 量を上昇させ、TBARS 量の上昇を抑制し、肝臓中グリコーゲン量の低下やヒラメ筋中の TBARS 量の上昇に対しても有意な抑制を示した。これらのことから、マムシと紅参を併用することによって、それぞれの特徴的な活性が 1/5 量ずつの投与量で発揮され、これらの生薬を併用投与することでより低用量で作用範囲の広い抗疲労薬になり得ると推察された。

References

- 1) Kan, M. : Namamamushi suisin-eki narabini shuseiekisu no yakurigakutekisayo ni tsuite. *Tokyo Igakukai Zasshi* **55**, 621-634, 1941.
韓明謙：生蛇水浸液並びに酒粕エキスの薬理学的作用に就て。東京医学会雑誌 **55**, 621-634, 1941.
- 2) Saito, H., Yoshida, Y. and Takagi, K. : Effect of Panax Ginseng root on exhaustive exercise in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **24**, 119-127, 1974.
- 3) Moriura, T., Matsuda, H. and Kubo, M. : Pharmacological study on *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOE. (V). Anti-fatigue effect of the 50 % ethanol extract on acute weight-loaded forced swimming-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 62-66, 1996.
- 4) Kubo, M., Moriura, T., Makino, T. and Matsuda, H. : Shoyaku mamushi no yakurikasseikenkyu (dai 1 ho). 50 % etanoluekisu no jikkenteki ikaiyo ni taisuru sayo. *Yakushi* **109**, 592-599, 1989.
久保道徳, 森浦俊次, 牧野琢生, 松田秀秋：生薬・マムシの薬理活性研究(第1報). 50 % エタノールエキスの実験的胃潰瘍に対する作用. 薬誌 **109**, 592-599, 1989.

- 5) Moriura, T., Matsuda, H. and Kubo, M. : Shoyaku mamushi no yakurikasseikenkyu (dai 3 ho). 50 % etanoruekisu no jikkenteki kanshogai ni taisuru sayo. *Shoyakushi* **47**, 123-130, 1993.
森浦俊次, 松田秀秋, 久保道徳 : 生薬・マムシの薬理活性研究 (第3報). 50 % エタノールエキスの実験的肝障害に対する作用. *生薬誌* **47**, 123-130, 1993.
- 6) Matsuda, H. and Kubo, M. : Yakuyo ninjin no yakurigakuteki kenkyo (dai 6 ho). Junkankikei ni taisuru kojiri no sayo (sono 1). *Yakushi* **104**, 449-453, 1984.
松田秀秋, 久保道徳 : 薬用人参の薬理学的研究 (第6報). 循環器系に対する紅参の作用 (その1). *薬誌* **104**, 449-453, 1984.
- 7) Yagi, K. : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine* **15**, 212-216, 1976.
- 8) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358, 1979.
- 9) Good, C.A., Kramer, H. and Somogyi, M. : The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.* **100**, 485-491, 1933.
- 10) Lowry, O.H., Roserough, J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
- 11) Kumahara, Y., Yano, S., Ogihara, T., Yamamoto, M., Hata, T., Hirayama, A., Uchiyama, J., Saito, T., Sekiya, M., Ito, Y., Sakakibara, T. and Hara, K. : Chuseiyaku TY-01 no hirokentaikan, yotsu to ni taisuru koka. *Yakuri to chiryo* **17**, 3633-3641, 1989.
熊原雄一, 矢野三郎, 萩原俊男, 山本昌弘, 波多一丈, 平山亮夫, 内山樹, 斉藤忠徳, 関谷政雄, 伊藤慶夫, 榎原敏正, 原敬二郎 : 中成薬 TY-01 の疲労倦怠感, 腰痛等に対する効果. *薬理と治療* **17**, 3633-3641, 1989.
- 12) Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., E.E. Dumelin and Tappel, A.L. : Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.* **927**-932, 1978.
- 13) David, L. and Tappel, A.L. : The effect of exhaustive exercise on expired pentane as a measure of in vivo lipid peroxidation in the rat. *Life Sci.* **28**, 2425-2429, 1981.
- 14) Suzuki, M., Katamine, S. and Tatsumi, S. : Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **29**, 141-151, 1983.
- 15) Brady, P.S., Brady, L.J. and Ullrey, D.E. : Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J. Nutr.* **109**, 1103-1109, 1979.
- 16) Kishihara, C. : Undofuka niokeru ratto jihatsu kodoryo to kasan-kashishitsu oyobi sono kanren kosokassei ni kansuru kenkyu. *Hokkaido Igaku Zasshi* **55**, 575-585, 1989.
岸原千秋 : 運動負荷におけるラット自発行動量と過酸化脂質およびその関連酵素活性に関する研究. *北海道医学雑誌* **55**, 575-585, 1989.