

淫羊藿エキスの薬理学的研究 —抗炎症作用—

篠原 達雄,*^{a)} 上川 浩^{a)} 荻田 善一^{b)}

^{a)}グイト株式会社研究所, ^{b)}富山医科薬科大学

Pharmacological study of Epimedii Herba extracts —Anti-inflammatory action—

Tatsuo SHINOHARA,*^{a)} Hiroshi KAMIKAWA^{a)}, Zen-ichi OGITA^{b)}

^{a)}Research Laboratory, Daito Co., Ltd., ^{b)}Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received July 10, 1996. Accepted September 3, 1996.)

Abstract

Anti-inflammatory action of Epimedii Herba extract was studied. Epimedii Herba extract were separated into three fractions, n-Butanol extract fraction (Fr. I), ethyl acetate extract fraction (Fr. II) and ethyl acetate insoluble fraction (Fr. III). Three fractions inhibited the increased vascular permeability induced by acetic acid. Fr. III inhibited the carrageenan-induced paw edema in rats, but Fr. I and Fr. II did not inhibit them. Further, Fr. III inhibited the swelling of hind paws in adjuvant arthritic rats. Fr. III strongly inhibited the arachidonic acid and collagen induced platelet aggregation than ADP induced platelet aggregation. Fr. I and Fr. II also inhibited the three kinds of platelet aggregations, but the actions were weaker than Fr. III. Fr. I and Fr. III inhibited the collagen induced acute death in mice as well as diclofenac, but Fr. II had no affect. These results suggest that Fr. III has anti-inflammatory action and the action appeared due to inhibition of cyclooxygenase in prostaglandin biosynthesis. But further investigation involved to separate the active substance is necessary.

Key words anti-inflammatory action, aspirin, diclofenac, cyclooxygenase.

緒 言

『神農本草経』の下品に収載されている淫羊藿は男性ホルモン様作用を有する生薬として滋養強壮薬として使われている。

また、蟾酥含有強心剤として古くから民間薬として使われてきた六神丸は構成生薬として麝香を含む。ワシントン条約によりその使用が困難となっていく麝香には、男性ホルモン様作用、心房筋収縮力増強作用或は抗炎症作用を有することが知られている。したがって、麝香のこのような作用を淫羊藿が有するなら、淫羊藿は麝香の代替品となりうる可能性がある。

一方、淫羊藿は中国においては滋養強壮薬としてばかりでなく、リウマチにも応用されていたことから、淫羊

藿には抗炎症作用を有する可能性が示唆される。しかしながら、これまで淫羊藿の抗炎症作用について研究はなされていない。そこで今回、淫羊藿を抽出分画し、それぞれの分画について既知の抗炎症剤を比較対照とし、急性炎症及び慢性炎症モデルを用いてその抗炎症作用を検討して試験した。更に、その作用機序も併せて検討した。

材料と方法

(1) 実験動物：実験には SLC: ddY 系雄性マウス、Wistar 系雄性ラット及び日本白色種ウサギ(何れも(株)日本エスエルシー)を使用した。マウス及びラットはプラスチック製の飼育ケージに4匹ずつ、ウサギは1匹ずつ入れ、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間照明(6:00~18:00)の飼育室で飼育し、固形飼料(MM-3(マ

*〒939 富山市八日町326番地
Yokamachi 326, Toyama 939, Japan

ウス及びラット), RM-4 (ウサギ; 何れも船橋農場) および水道水を自由摂取させて1週間予備飼育し, 体重減少を認めなかった健康な動物を選んで実験に供した。

(2) 淫羊藿抽出エキスの調製方法: 朝鮮産の淫羊藿 (*Epimedium Koreanum*) 160 g に 55 % エタノール 1600 ml を加え, 水浴上で5時間加熱還流した後, 濾過した。濾液を減圧濃縮し, 残留物に水 500 ml 及びエチルエーテル 500 ml を加えて振盪後, 水層部及びエチルエーテル層に分けた。エーテル層を減圧下にて溶媒を濃縮してエーテル分画 (Fr. VI) 2.33 g を得た。水層部に *n*-ブタノール 500 ml を加えて振盪した後, *n*-ブタノール層, 水層及び不溶物 (Fr. V) 0.51 g に分けた。水層部はそのまま減圧下にて溶媒を留去し, 残留物 (Fr. IV) 2.0 g を得た。*n*-ブタノール層は減圧下にて溶媒を留去した後, 残留物にヘキサンを加えて結晶を析出させ, この結晶を更にヘキサンで洗浄後, 減圧乾燥して *n*-ブタノール分画 (Fr. I) 8.4 g を得た。Fr. I に酢酸エチル 300 ml を加え, 水浴上で加熱還流した後, 濾過した。濾液を減圧下にて溶媒を留去し酢酸エチル分画 (Fr. II) 4 g を得た。酢酸エチルに不溶な残留物を濾取し, 酢酸エチルで洗浄後乾燥し, 酢酸エチル不溶分画 (Fr. III) 4 g を得た。尚, 淫羊藿の主成分とされる Icariin は Fr. II に存在し, Fr. III に Icariin は認められなかった (Fig. 1)。

(3) その他の試薬: その他の試薬としてアセチルサリチル酸 (以下, アスピリンと略す), ジクロフェナクナト

リウム (以下, ジクロフェナクと略す) フマル酸ケトチフェン (以下, ケトチフェンと略す), *mycobacterium butylcum* (Difco), λ -カラゲニン, 牛血清アルブミン (和光純薬工業株式会社), 卵白アルブミン (生化学工業), アラキドン酸 (Sigma), コラーゲン (Nycomed) 及びアデノシン 5'-二リン酸ナトリウム (以下, ADP と略す) (Sigma) を用いた。

(4) 毛細血管透過性亢進に対する作用

a) Whittle 法

鶴見ら¹⁾の方法に準じ, 10 時間絶食した体重 24 g 前後の ddY 系雄性マウスに薬物を 0.1 ml/10 g の割合で経口投与し, その 25 分後に 4 % ポンタミンスカイブルーを 0.1 ml/10 g の割合で尾静脈内注射した。その 5 分後に 1 % 酢酸を 0.1 ml/10 g の割合で腹腔内投与し, 30 分後に動物を頸椎脱臼により殺して開腹した後, 腹腔内を 10 ml の蒸留水を用いて洗浄した。洗浄液に 1 N 水酸化ナトリウム液 0.1 ml を加えて除蛋白した後, 600 nm における吸光度 (U-1000; 日立製作所) を測定した。対照群には蒸留水を同量の割合で経口投与した。

b) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 法

Martin ら²⁾の方法に従い, 20 mg/ml のアルミナゲル懸濁液 1 ml に 100 μ g/ml の卵白アルブミン液 1 ml を加え, 充分混和して抗原液とした。抗原液 0.5 ml を除毛したラット背部皮内に数カ所に分けて皮内注射すると同時に腹腔内に不活性化百日咳菌懸濁液 (10 億個) を投与した。その 5 日後に追加免疫した後, 感作 14 日目に採血して血清を分離し, 抗血清を得た。抗血清を生理食塩水で 10 倍希釈し, その 0.01 ml を前日除毛したラット背部に皮内注射して受動感作した。感作 48 時間後に薬物を経口投与し, その 30 分後に 1 mg/ml の卵白アルブミンを含む 0.5 % エバンスブルー生理食塩液を 1 ml/ラット静脈内注射した。30 分後に動物をクロロホルムを用いて殺し, 皮膚を剥離して染色された青色部分を切り取った。切り取った皮膚からの色素の抽出には Katayama ら³⁾の方法に準じ, 皮膚を細片した後, 1 N-KOH を 1 ml 加えて 37°C, 12 時間インキュベートした。その後アセトン・0.6 N リン酸 (3:5) 9 ml を加えて攪拌した後, 遠心分離し, 上清部につき 620 nm における吸光度を測定した。尚, ラットは薬物投与前 10 時間は絶食とし, 薬物は 1 ml/100 g の割合で経口投与し, 対照群には蒸留水を同量の割合で経口投与した。

(5) カラゲニン浮腫に対する作用: 体重 140 g 前後のラットの右後肢足容積を測定後, 足蹠皮内に 2 % カラゲニン液 0.1 ml を注射して浮腫を惹起させた。カラゲニン注射後経時的に足容積を測定し, カラゲニン注射前の容積からその浮腫率を算出し, 対照群と比較した。薬物は

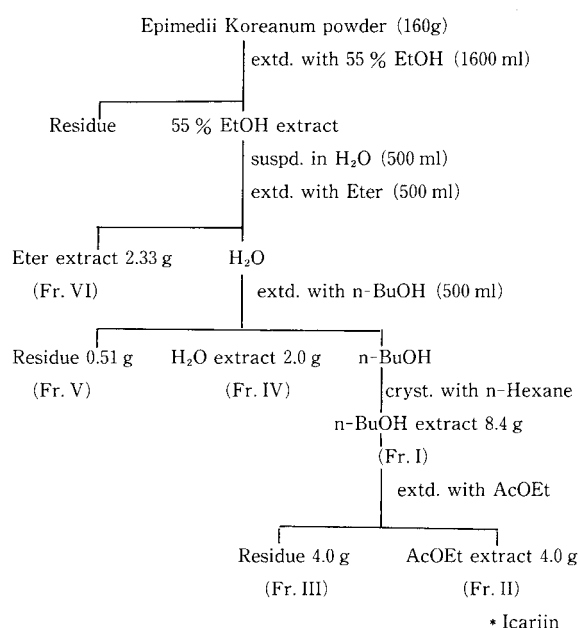


Fig. 1 Preparation of each fraction from *Epimedium Koreanum* for bioactivity screening tests.

カラゲニン注射 30 分前に 1 ml/100 g の割合で経口投与し、対照群には蒸留水を同量の割合で経口投与した。

(6) **Adjuvant 関節炎に対する作用**：藤村ら⁴⁾の方法に準じ、Mycobacterium butylcum を乳鉢を用いて粉碎し、これに流動パラフィンを加えて 10 mg/ml の懸濁液を調製した。この液を体重 160 g 前後のラット右後肢足蹠皮内に 0.05 ml 注射し、Adjuvant 関節炎を惹起した。その後、経日的に足容積ならびに接種後 14 日目及び 21 日目における尾、耳及び前肢の炎症強度を Inflammatory score (最高 3 点とし、合計点は 9 点を最大とする) として採点した。Adjuvant 接種 21 日目に動物よりエーテル麻酔下に腹大動脈より採血するとともに、臓器を摘出してその重量を測定した。また、採血液は遠心分離して血清を分離して血清生化学的パラメーターを測定した。薬物は Adjuvant 接種日より 1 回/日、1 ml/100 g の割合で 21 日間連続経口投与し、対照群には蒸留水を同量の割合で経口投与した。

(7) **コラーゲン凝集致死に対する作用**：コラーゲン溶液を Tomikawa ら⁵⁾の方法に準じて調製した。すなわち、コラーゲン (Type I) 50 mg に 2 μ M CaCl₂, sucrose 1 g を含む 0.05 M 酢酸試液 20 ml を加えて溶解した後、5 N-NaOH で pH を 7.4 に調製した。37°C で 2 時間インキュベート後、4°C、24 時間放置してコラーゲン溶液を調製した。コラーゲン溶液は 24°C、3 時間インキュベートした後使用した。試験は体重 24 g 前後の雄マウスに試験薬物を経口投与し、その 60 分後にコラーゲン溶液 0.07 ml を尾静脈内注射してコラーゲン凝集致死を惹起させた。薬物の効果はコラーゲン注射後のマウスの生存数より求めた。

(8) **アラキドン酸凝集致死に対する作用**：鶴見ら⁶⁾の方法に準じ、7% ニッコール HCO-60 生理食塩水を用い、濃度が 0.1 mg/ml のアラキドン酸溶液を作製した。試験は体重 24 g 前後の雄マウスに試験薬物を経口投与し、その 2 時間後にアラキドン酸溶液 0.3 ml を尾静脈内注射してアラキドン酸凝集致死を惹起させた。薬物の効果はアラキドン酸注射後のマウスの生存数より求めた。

(9) **血小板凝集に対する作用**：体重 3.5 kg 前後の日本白色種ウサギをエーテル麻酔下に心臓より、3.8% クエン酸ナトリウム液 2 ml が入った注射筒を用いて 18 ml 採血した。採血液は充分混和した後 900 r.p.m. で 10 分間遠心分離して上層部を分取して多血小板血漿 (以下、PRP と略す) を得た。下層部を更に 3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して上清部を分取し、これを欠血小板血漿 (以下、PPP と略す) とした。PRP を PPP で希釈し、その数が約 50 万個/ml になるように調製した。血小板凝集試験は Boron ら⁷⁾ 及び Prof ら⁸⁾の方法に準じ、キューベッ

トに PRP を 0.4 ml 入れ、37°C で 2 分間加温した後、試験薬物 5 μ l を加え、その 2 分後に凝集剤を加えてその凝集能をアグリゴメーター (CAF-110; 日本分光) を用いて測定した。尚、凝集剤として ADP (終濃度 10 μ M)、アラキドン酸 (5 μ M) 及びコラーゲン (終濃度 10 μ g/ml) を用い、試験薬物はジメチルスルホキシドに溶解して用いた。尚、ジメチルスルホキシドは今回用いた液量において凝集に対しては影響しなかった。

(10) **赤血球膜安定化作用**：鶴見ら¹⁾の方法に準じ、ラットよりエーテル麻酔下に腹大動脈より 3.8% クエン酸ナトリウム含有注射筒を用いて採血し、3,000 r.p.m. で遠心分離して赤血球層を分取する。赤血球層は 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回混和遠心分離して洗浄後、同緩衝液を用いて 2% 浮遊液を調製した。この浮遊液 3 ml に試験薬物 1 ml を加え、53°C で 20 分間加温後冷却した。その後、遠心分離して上清部の 540 nm における吸光度を測定し、対照に対する抑制率を算出した。尚、薬物はジメチルスルホキシドに溶解後、リン酸緩衝液を用いて希釈調製した。

(11) **蛋白熱変性に対する作用**：鶴見ら¹⁾の方法に準じ、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.3) を用いて 1% 牛血清アルブミン溶液を作製し、この液 2 ml に試験薬物 2 ml を加えて 60°C で 5 分間加温後冷却した。この液につき 645 nm における吸光度を測定し、対照に対する抑制率を算出した。尚、薬物はジメチルスルホキシドに溶解後、リン酸緩衝液を用いて希釈調製した。

(12) **統計処理**：得られた結果は平均値 $\pm$ 標準誤差及び抑制率で示し、有意差検定には Student の *t*-検定並びにカイ 2 乗検定を用いて検定を行った。

結 果

1. 毛細血管透過性亢進に対する作用

a) Whittle 法

酢酸投与によって惹起される腹腔内への色素漏出に対し、Fr. I は 100~600 mg/kg の経口投与で有意な血管透過性亢進抑制作用を示した。一方、Fr. II 及び Fr. III も 100 mg/kg の投与においてアスピリンよりやや弱いものの有意な血管透過性亢進抑制作用を示し、その作用は Fr. I よりも明らかに強いものであった。また、比較対照としたアスピリンも用量依存的な抑制作用を示した (Table I)。尚、Fr. IV、Fr. V 及び Fr. VI は何等作用を示さなかったことから、これらの試験薬物は以後の動物試験は行わなかった。

b) PCA 法

受動的アナフィラキシーによって誘発される皮膚皮内

Table I Effect of Epimedii Herba extracts and aspirin on leakage of dye into the peritoneal cavity induced by acetic acid in mice.

Samples	Dose (mg/kg)	N	Dye amount (μ g) mean $\pm$ S.E.	Inhibition (%)
Control	-----	26	307.4 $\pm$ 12.0	-----
Fr. I	100	10	265.2 $\pm$ 28.9*	13.7
	300	10	209.7 $\pm$ 13.2**	31.8
	600	10	175.4 $\pm$ 10.4**	42.9
Fr. II	100	10	222.7 $\pm$ 23.8**	27.6
	300	10	156.3 $\pm$ 12.3**	49.2
Fr. III	100	10	229.7 $\pm$ 22.9**	25.3
	300	10	169.3 $\pm$ 23.5**	44.9
Aspirin	100	10	195.4 $\pm$ 27.3**	36.4
	300	10	114.7 $\pm$ 16.5**	62.7

* and ** indicate significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively.

色素漏出に対し、Fr. I、Fr. II 及び Fr. III は影響を与えなかった。一方、比較対照として用いたケトチフェンは強力な抑制作用を示した (Fig. 2)。

2. カラゲニン浮腫に対する作用

カラゲニンによって惹起される足蹠浮腫に対し、Fr. I 及び Fr. II は 600 mg/kg までの投与量において有意な抑制作用を示さなかった。一方、Fr. III は 300~600 mg/kg の投与において用量依存的な明らかな抗浮腫作用を示し、その作用はアスピリン 100 mg/kg よりも強いものであった。尚、対照薬として用いたジクロフェナクは強い抗浮腫作用を示すのが認められた (Table II)。

3. Adjuvant 関節炎に対する作用

Adjuvant を接種した処置足の経日的な浮腫の増加に対し、Fr. I 及び Fr. II は何等抑制作用を示さなかった。

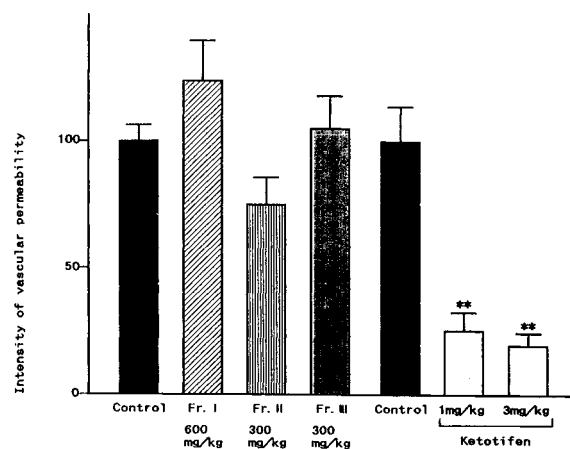


Fig. 2 Effect of Epimedii Herba extracts and ketotifen on IgE-mediated 48-hr homologous PCA in rats. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Significantly different from control (Student's t -test).

一方、Fr. III は接種直後の 1 次炎症ならびに接種後 10 日目頃から発症する 2 次炎症の浮腫を 300 mg/kg/day の投与量から有意に抑制した (Fig. 3)。また、2 次炎症に伴う尾、耳及び前肢の赤発ならびに浮腫の inflammatory score を見た場合、それらの炎症に対しても抑制作用を示し、その抑制は対照薬として用いたジクロフェナクとはほぼ同等の作用であった (Table III)。一方、Adjuvant 関節炎に伴い、血清 Fe の低下、血清 Cu の増加、アルブミン/グロブリン比の増加等、種々の血清生化学的变化が生じる。これら変化に対し、今回試験した薬物は何れも有意な改善を示さなかった (Table III)。

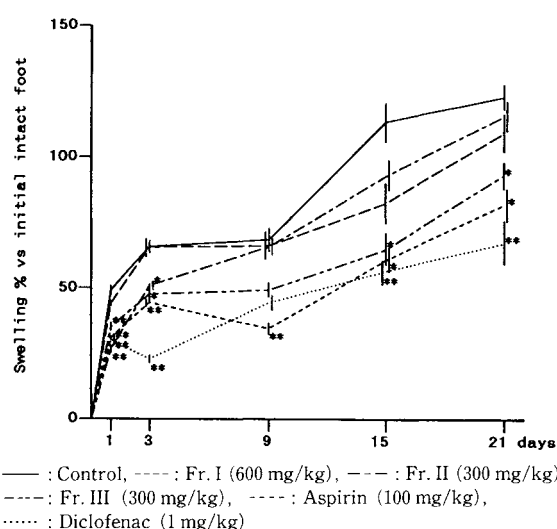
Table II Effect of Epimedii Herba extracts and other drugs on the swelling of rat hind paw induced by carrageenan.

Samples	Dase mg/kg	Swelling after carrageenan induced (%)				
		1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
Control		53.1 $\pm$ 6.2	70.0 $\pm$ 7.9	70.5 $\pm$ 8.5	70.9 $\pm$ 9.5	81.4 $\pm$ 10.7
Fr. I	300	37.2 $\pm$ 4.7	45.9 $\pm$ 7.5	53.7 $\pm$ 7.5	61.2 $\pm$ 10.0	70.4 $\pm$ 11.5
Fr. II	300	33.0 $\pm$ 5.3	42.8 $\pm$ 7.6	55.0 $\pm$ 8.5	60.0 $\pm$ 10.7	68.7 $\pm$ 11.4
	600	37.4 $\pm$ 8.5	51.3 $\pm$ 11.7	65.6 $\pm$ 14.2	75.1 $\pm$ 13.7	84.6 $\pm$ 14.6
Fr. III	300	23.7 $\pm$ 3.2**	29.6 $\pm$ 6.2**	45.8 $\pm$ 5.4*	46.4 $\pm$ 6.3	58.8 $\pm$ 5.9
	600	17.1 $\pm$ 3.4**	24.0 $\pm$ 4.5**	33.6 $\pm$ 4.4**	33.4 $\pm$ 6.6**	44.1 $\pm$ 5.3**
Diclofenac	25	28.1 $\pm$ 4.1**	29.5 $\pm$ 3.4**	33.4 $\pm$ 4.0**	32.5 $\pm$ 4.6**	38.1 $\pm$ 5.3**
Aspirin	100	22.6 $\pm$ 6.0**	30.5 $\pm$ 6.5**	32.6 $\pm$ 6.6**	41.4 $\pm$ 7.1	47.1 $\pm$ 7.4

* and ** indicate significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively.

Table III Effect of Epimedii Herba extracts and other drugs on the inflammatory score and various serum parameters of adjuvant arthritic rats.

Samples	Dose mg/kg	N	Inflammatory Score		Serum Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Serum Cu ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	A/G
			15 day	21 day			
Normal	---		----	----	242.0 $\pm$ 37.5*	123.3 $\pm$ 6.8*	2.57 $\pm$ 0.15*
Cotrol	---	10	5.5 $\pm$ 0.96	5.2 $\pm$ 0.77	151.1 $\pm$ 16.2	268.0 $\pm$ 8.9	1.83 $\pm$ 0.04
Fr. I	600	10	5.4 $\pm$ 0.86	6.0 $\pm$ 1.17	114.8 $\pm$ 9.8	286.9 $\pm$ 19.3	1.91 $\pm$ 0.05
Fr. II	300	10	6.7 $\pm$ 1.24	6.2 $\pm$ 1.18	92.4 $\pm$ 7.6*	88.0 $\pm$ 17.0	1.87 $\pm$ 0.05
Fr. III	300	10	2.7 $\pm$ 0.68*	2.6 $\pm$ 0.40*	134.2 $\pm$ 22.0	278.1 $\pm$ 20.5	1.91 $\pm$ 0.09
Aspirin	100	7	6.0 $\pm$ 1.31	6.3 $\pm$ 1.38	100.6 $\pm$ 10.8*	291.7 $\pm$ 14.5	1.86 $\pm$ 0.06
Diclofenac	1	7	2.1 $\pm$ 0.80*	4.9 $\pm$ 2.04	108.7 $\pm$ 27.7	243.9 $\pm$ 28.4	1.84 $\pm$ 0.11

* indicates significantly different from control at $p < 0.05$.Fig. 3 Effect of Epimedii Herba extracts and other drugs on swelling of rat hind paw induced by adjuvant arthritis. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Significantly different from control (Student's t -test).

4. コラーゲン凝集致死に対する作用

コラーゲンをマウスに静脈内注射した場合、注射数分後にマウスは血小板の凝集による血栓の為、死亡する。この凝集致死に対し、Fr. I 及び Fr. III は用量依存的な抑制作用を示した。一方、Fr. II はコラーゲン凝集致死に対し、300 mg/kg の投与量において抑制作用を示したが、600 mg/kg で作用は減弱した。尚、対照薬であるジクロフェナクはコラーゲン凝集致死を強く抑制したが、アスピリンは有意な作用を示さなかった (Table IV)。

5. アラキドン酸凝集致死に対する作用

アラキドン酸をマウスに静脈内注射した場合、注射後直ちにマウスは血小板の凝集による血栓の為、死亡する。この凝集致死に対し、Fr. III は用量依存的な抑制作用を示したが、Fr. I 及び Fr. II に作用は見られなかった。一方、ジクロフェナクならびにアスピリンはアラキドン酸凝集致死を強く抑制した (Table IV)。

6. 血小板凝集に対する作用

ウサギ血小板を用いてコラーゲン、アラキドン酸及び

Table IV Effect of Epimedii Herba extracts and other drugs on acute death induced by collagen and arachidonic acid in mice.

Samples	Dose mg/kg	N	Collagen		Arachidonic acid	
			Mortality	Inhibition	Mortality	Inhibition
Control	---	10	1/10	10%	0/10	0%
Fr. I	300	10	6/10	60%	1/10	10%
	600	10	8/10**	80%	5/10	50%
Fr. II	100	10	2/10	20%	0/10	0%
	300	10	6/10	60%	5/10	50%
	600	10	2/10	20%	6/10*	60%
Fr. III	100	10	5/10	50%	3/10	30%
	300	10	7/10*	70%	8/10**	80%
	600	10	8/10**	80%	9/10**	90%
Aspirin	100	10	5/10	50%	7/10**	70%
Diclofenac	1	10	8/10**	80%	9/10**	90%

* and ** indicate significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively (χ^2 -test).

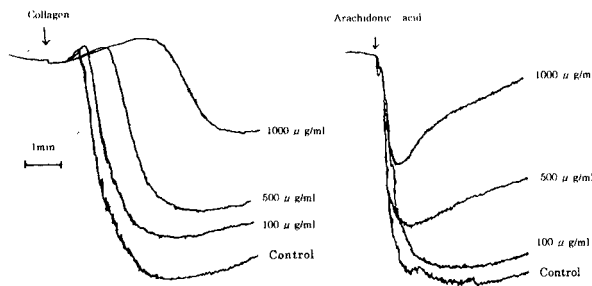


Fig. 4 Effect of Epimedii Herba extract (Fr. III) on platelet aggregation induced by collagen and arachidonic acid in platelet rich plasma of rabbit.

Table V Effect of Epimedii Herba extracts and Diclofenac on heat-induced hemolysis of rat erythrocytes.

Samples	Final concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)			
		100	50	10	1
Fr. I		22.1	-11.6	1.8	-2.9
Fr. II		-31.2	12.6	-10.6	1.5
Fr. III		5.3	-2.3	2.0	-1.0
Diclofenac		95.1	45.0	21.3	8.3

Table VI Effect of Epimedii Herba extracts and Diclofenac on heat denaturation of bovine serum albumin.

Samples	Final concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)			
		100	50	10	1
Fr. I		-12.5	-1.3	1.2	-2.5
Fr. II		-21.3	12.6	-9.6	-1.5
Fr. III		-1.3	6.3	-2.6	1.4
Diclofenac		93.5	69.8	23.5	10.3

ADPによる血小板凝集に対する作用を検討したところ、Fr. I, Fr. II 及び Fr. III はいずれもコラーゲン、アラキドン酸及び ADP による血小板凝集を抑制した。特にコラーゲン凝集ならびにアラキドン酸凝集を強く抑制したが (Fig. 4), ADP 凝集に対する抑制は弱かった。尚, Fr. IV, Fr. V 及び Fr. VI に血小板凝集抑制作用は全く認められなかった (結果は省略)。

7. 赤血球膜安定化作用

加熱によるラット赤血球の溶血に対し, Fr. I, Fr. II 及び Fr. III はいかなる影響を与えなかった。一方, ジクロフェナクは強い抑制作用を示した (Table V)。

8. 蛋白熱変性に対する作用

蛋白熱変性に対し, Fr. I, Fr. II 及び Fr. III はいかなる影響を与えなかった。一方, ジクロフェナクは蛋白熱変性を強く抑制した (Table VI)。

考 察

今回, 淫羊藿の抽出エキスの抗炎症作用について検討を行った。淫羊藿の 55% エタノール抽出液を n-ブタノールを用いて抽出し (Fr. I), この抽出物を更に酢酸エチルを用いて抽出したところ, 淫羊藿の主成分である Icaritin は酢酸エチル抽出物 (Fr. II) に含まれ, 酢酸エチル不溶物 (Fr. III) に Icaritin は存在しなかった。これら抽出物の抗炎症作用について, 炎症の第一段階である血管透過性亢進に対する作用を酢酸刺激及び受動的アナフィラキシーを用いて検討した。Fr. I, Fr. II 及び Fr. III は酢酸刺激による血管透過性亢進をアスピリンと同様に有意に抑制した。一方, 受動的アナフィラキシーによる血管透過性亢進に対しては影響を及ぼさなかった。受動的アナフィラキシーによる血管透過性亢進は抗原抗体反応により, ヒスタミン或はセロトニン等の化学伝達物質が肥満細胞から遊離されることによって起こり, ヒスタミン H_1 拮抗作用を有する薬物或は化学伝達物質遊離抑制作用を有する薬物によって抑制されることが知られている。^{2, 9-12)} したがって, Fr. I, Fr. II 及び Fr. III にヒスタミン H_1 拮抗作用或は化学伝達物質遊離抑制作用は無いものと考えられる。次に急性炎症モデルの代表とされるカラゲニン浮腫に対する作用を検討したところ, Fr. I 及び Icaritin を含む Fr. II は浮腫抑制作用を示さなかったが, Fr. III は有意な抗浮腫作用を示し, その作用は用量依存的であり, またアスピリンと同程度の作用であった。したがって, Fr. III に抗浮腫作用を有する薬理活性成分の存在が示唆された。血管透過性亢進から浮腫に至る急性期の炎症反応に於いては, 化学伝達物質の調節的役割を演じているプロスタグランジン (PG) が積極的な役割を行っており,¹³⁾ PG 合成阻害作用を有する薬物はこれを強く抑制することが知られている。¹⁴⁾ 一方, Fr. I, Fr. II 及び Fr. III はヒスタミン H_1 拮抗或は化学伝達物質遊離に対してはあまり影響せず, 酢酸による血管透過性亢進或はカラゲニン浮腫を抑制したことから, Fr. I, Fr. II 及び Fr. III のそれらに対する抑制作用には PG 生合成に対する影響も考えられる。淫羊藿はリウマチに应用されていたことから, 抗リウマチ作用につき, リウマチの病態モデルとして広く用いられている Adjuvant 関節炎を用いて検討した。その結果, Fr. III は Adjuvant 接種によって生じる一次炎症及び二次炎症に伴う足浮腫をアスピリンと同程度に抑制した。尚, Fr. I ならびに Fr. II に

は先のカラゲニン浮腫と同様抑制作用は認められなかった。一方, Adjuvant 関節炎の二次炎症に伴う尾, 耳或は前肢の赤発及び腫脹に対しても Fr. III はジクロフェナク同様に明かな抑制作用を示した。したがって Fr. III はリウマチのような慢性炎症疾患に対し, ジクロフェナクと同様に抑制作用を有する可能性が示唆される。アスピリンを代表とする非ステロイド系酸性抗炎症剤はアラキドン酸代謝経路においてプロスタグランジンを生合成するシクロオキシゲナーゼを阻害することにより, 抗炎症作用を示すことが知られている。¹⁵⁻¹⁷⁾そこで, 淫羊藿抽出物の抗炎症作用がアスピリンと同様にシクロオキシゲナーゼ阻害に依るか否かを検討した。最初に試験管内試験としてウサギ血小板を用い, ADP, アラキドン酸及びコラーゲンによる凝集に対する作用を検討した。その結果, アラキドン酸及びコラーゲンによる凝集に対し, Fr. I, Fr. II 及び Fr. III は何れも抑制作用を示し, その作用は Fr. III が他のものよりも明らかに強かった。一方, ADP による凝集に対しては何れの薬物もその抑制作用は軽度であった。アラキドン酸凝集及びコラーゲン凝集には何れもシクロオキシゲナーゼが関与していることが知られ, シクロオキシゲナーゼ阻害作用を有する薬物はこれを強く抑制する。^{18, 19)}これら凝集を淫羊藿抽出物が抑制したことから, 淫羊藿にはシクロオキシゲナーゼ阻害作用を有する成分が存在することが示唆された。次にコラーゲン凝集致死に対する作用を検討した。コラーゲン凝集反応は, 血小板膜にコラーゲンが作用してホスホリパーゼを活性化させてアラキドン酸を遊離し, その後プロスタグランジン生合成系によりトロンボキサン A₂ の生成とカルシウムの動員を介する凝集が誘発されることにより血小板凝集を引き起こし,²⁰⁾血栓を生じて凝集致死をきたす。この凝集死はシクロオキシゲナーゼ阻害剤により強く抑制されることが知られている。^{19, 21, 22)}そこでこの凝集死に対する各抽出物の影響を検討したところ, Fr. II に作用は認められなかったが, Fr. III は用量依存的で有意な抑制を示し, 試験管内試験と類似した結果であった。したがって, Fr. III はシクロオキシゲナーゼ阻害作用を有し, その作用に基づき抗炎症作用を示すことが示唆された。

一般的に酸性抗炎症薬は赤血球膜安定化作用ならびに蛋白熱変性抑制作用の性質を有することが知られている。^{1, 20)}そこで淫羊藿各抽出物につきそれらに対する作用を検討したところ, 何れの抽出物も作用を示さなかったことから, 淫羊藿抽出物の抗炎症作用にこれらの作用は関係が無いものと考えられる。

以上, 淫羊藿には抗炎症作用を有する成分が存在し, その成分は炎症の一因とされるアラキドン酸代謝に関与

するシクロオキシゲナーゼを阻害することにより抗炎症作用を示すものと考えられた。従来, 淫羊藿はリウマチに用いられてきたが, その科学的根拠の一部が今回の研究で明らかにされたものと考えられる。

References

- 1) Tsurumi, K., Hiramatsu, Y., Nozaki, M., Hayashi, M., Shibuya, T., Fujimura, H. : Anti-inflammatory action of N-(2,6-dichloro-phenyl)-O-amino-phenyl acetic acid (No.1 free), sodium salt (No.1 Na), N-(2,6-dichlorophenyl) anthranic acid (No.2 free) and sodium salt (No.2 Na). *Acute inflammation. Folia Pharmacol. Japon* **69**, 299-318, 1973.
- 2) Martin, U., Romer, D. : The pharmacological properties of new orally active antianaphylactic compound; ketotifen, A benzocycloheptathiophen. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* **28**, 770-782, 1978.
- 3) Katayama, S., Akimoto, N., Shinoyama, H., Morimoto, T., Katoh, Y. : Anti-allergic effect of azelastine hydrochloride on immediate type hypersensitivity reactions in vivo and in vitro. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* **31**, 1196-1203, 1981.
- 4) Fujimura, H., Tsurumi, K., Hasegawa, J., Yanagihara, M., Maekawa, K. : Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of α -(p-thenoyl phenyl)-propionic acid (TN-762). *Folia Pharmacol. Japon.* **79**, 123-136, 1982.
- 5) Tomikawa, M., Ashida, S., Kakihata, K., Abiko, Y. : Anti-thrombotic action of ticlopidine, A new platelet aggregation inhibitor. *Thrombosis Research* **12**, 1157-1164, 1978.
- 6) Tsurumi, K., Kyuki, K., Okada, K., Mibu, H., Fujimura, H. : Effect of pirofen, 2-[3-chl or o-4 (3-pyrrolinyl)-phenyl]-propionic. On acute inflammatory reactions and prostaglandin biosynthesis. *Pharmacometrics* **24**, 71-83, 1982.
- 7) Born, G., Cross, M. : The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* **168**, 178-195, 1963.
- 8) Prof. G., Born, G. : Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**, 927-929, 1962.
- 9) Fujimura, H., Tsurumi, K., Yanagihara, M., Hiramatsu, Y., Tamura, Y., Hojo, M., Yoshida, Y., Akimoto, Y. : Pharmacological study of Mequitazine (LM-209) (II). Antiallergic action. *Folia. Pharmacol. Japon.* **78**, 291-303, 1981.
- 10) Martin, U., Baggiolini. : Dissociation between the anti-histaminic action of ketotifen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **316**, 186-189, 1981.
- 11) Yanagihara, Y., Kasai, H., Kawashima, T., Shida, T. : Immunopharmacological studies on TBK, a new antiallergic drug (I). Inhibitory effects on passive cutaneous anaphylaxis in rats and guinea pigs. *Japan. J. Pharmacol.* **48**, 91-101, 1988.
- 12) Abe, T., Omata, T., Yoshida, K., Matsumura, T., Ikeda, Y., Segawa, Y., Matsuda, K., Nagai, H. : Antiallergic effect of ZCR-2060 : Antihistaminic action. *Japan. J. Pharmacol.* **66**, 87-94, 1994.
- 13) Ouchi, K., Tsurufuji, S. : Enshyouto, Purosutaguranzin to sono shuhen. *Gendaiyoushi* **12**, 1105-1117, 1980.
大内和雄, 鶴藤丞 : 炎症, プロスタグランジンとその周辺, 現代医療 **12**, 1105-1117, 1980.
- 14) Tsurumi, K., Kyuki, K., Okada, K., Mibu, H., Fujimura, H. : Effect of pirofen, 2-[3-chloro-4(3-pyrrolinyl)-phenyl]-propionic acid, on acute inflammatory reactions and prostaglandin biosynthesis. *Pharmacometrics* **24**, 71-83, 1982.

- 15) Vane, J. R. : Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of action of aspirin-like drugs. *Adv. Biosce.* **9**, 395-411, 1973.
- 16) Tsurumi, K., Kyuki, K., Niwa, M., Doko, R., Fujimura, H. : Pharmacology of 2-[4-(2-thiazolyloxy)-phenyl]-propionic acid (480156-s) a new non-steroidal anti-inflammatory agent (1) Effect on acute inflammatory reaction and platelet aggregation. *Pharmacometrics* **30**, 1001-1012, 1985.
- 17) Ku, E. C., Wasvary, J. M. : Inhibition of prostaglandin synthetase by pirofen : studies with sheep seminal vesicle enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **384**, 360-368, 1975.
- 18) Fujimura, H., Tsurumi, K., Nozaki, M., Imai, H., Niu, K., Muramatsu, Y. : Interaction of phenothiazinic Anti-inflammatory agent, protizinic acid, with the biopolymers : Inhibitory effects on functions of platelets. *Folia. Pharmacol. Japon* **77**, 27-39, 1981.
- 19) Fujimura, H., Nozaki, M., Imai, H., Muramatsu, Y., Hiramatsu, Y., Tamura, Y., Kokubo, S., Yanagihara, M. : Platelet aggregation inhibitory effect of amefenac sodium (AHR-5850). *Pharmacometrics* **22**, 399-404, 1981.
- 20) Gorman, R., Wierenga, W., Miller, O. : Independence of the cyclic AMP lowering activity of thromboxane A2 from the platelet release reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **572**, 95-104, 1979.
- 21) Silver, W., Hoch, W., Kocsis, J., Ingberman, C., Smith, J. : Arachidonic acid causes sudden death in rabbits. *Science* **183**, 1085-1086, 1974.
- 22) Fujimura, H., Tsurumi, K., Hiramatsu, Y., Tamura, Y. : Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of fenoprofen calcium. *Pharmacometrics* **19**, 329-347, 1980.