

コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価

Evaluation of Sodium Chondroitin Sulfate

富山県薬事研究会分析部会 (コンドロイチン分科会)

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

春日香織	共栄製薬株式会社
Kaori KASUGA	Kyoei pharmaceutical Co.,LTD
田保慎一郎	株式会社 廣貫堂
Shinichiro TABO	Kokando Co., LTD
佐賀一典	
Kazunori SAGA	
瀧本辰也	ダイト株式会社
Tatsuya TAKIMOTO	Daito Co., LTD
高橋浩美	株式会社 内外薬品商会
Hiromi TAKAHASHI	Naigai Medicine Co.,LTD
青木真知子	明治製薬株式会社
Machiko AOKI	Meiji pharmaceutical Co.,LTD
横田洋一	富山県薬事研究所
Youichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

結 言

コンドロイチン硫酸ナトリウムは、クジラやサメなどの軟骨に含まれる酸性ムコ多糖類の一種で点眼剤や食品などに乾燥防止剤や粘稠剤として配合されている。コンドロイチン硫酸はウロン酸、N-アセチルガラクトサミン及び硫酸により構成され、硫酸の結合位置、ウロン酸の種類などから3種の異性体A、B、Cがあることが見いだされており、一般に用いられるものはAあるいはCである (Fig.1)。また、市販コンドロイチン硫酸ナトリウムには注射用、内服用の2つのグレードがある。コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価法としては、窒素及びイオウ含量が局外規に

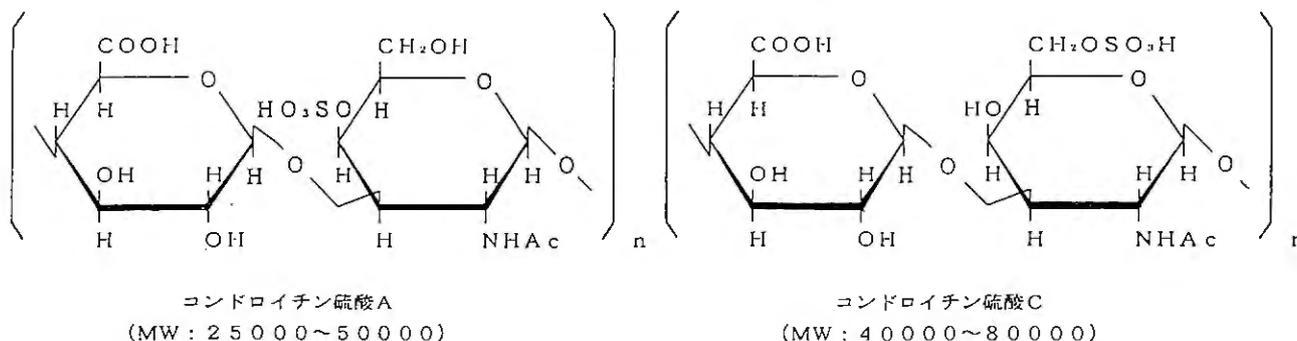


Fig.1 コンドロイチン硫酸A及びCの構造式

規定されているだけで、酸加水分解により得られたD-グルクロン酸をカルバズールにより発色させる方法が一般に用いられてきた。これらの方法は、分解物として間接的に評価する方法であり、操作も煩雑である。そこで、分解せず直接評価する方法についても検討を行い、市販コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価を行い、若干の知見を得たので報告する。

実 験

市販コンドロイチン硫酸ナトリウムとコンドロイチン硫酸 A 及び C 標準品について、3 項目の試験を行った。

1. 試 料

市販品：A社製及びB社製、内服用及び注射用

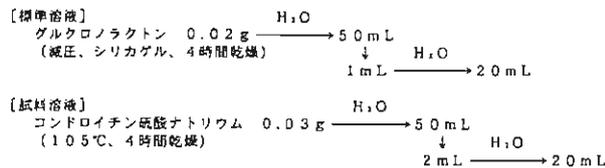
標準品：コンドロイチン硫酸 A 及び C、生化学工業(株)製、Super special grade

2. 試験方法

(1) D-グルクロン酸含量の測定

Bitter らの方法¹⁾に準じて行った (Chart.1)。

D-グルクロン酸の定量



【反応操作】

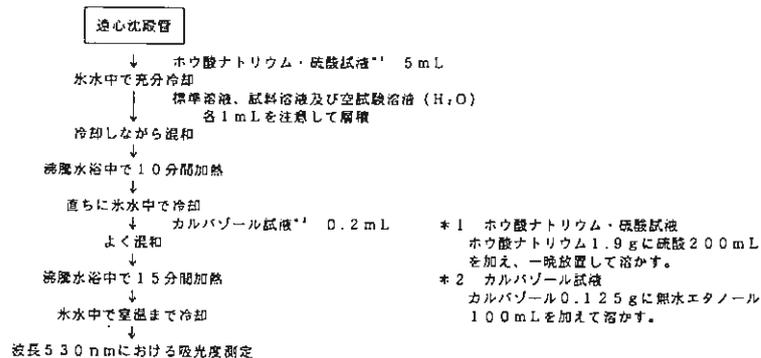


chart.1 D-グルクロン酸の定量方法

(2) ゲルろ過カラムによる HPLC パターン分析

Fukano らの方法²⁾に準じて行った。なお、検出器は示差屈折計は用いず、以下に示す HPLC 条件で行った。

〔HPLC 操作条件〕

検 出 器：紫外吸光光度計 (測定波長 210 nm)

カ ラ ム：東ソー(株)製 TSKgel G4000SW_{XL} (内径 7.8mm、長さ 30cm)

カラム温度：40℃付近の一定温度

移 動 相：0.1mol/L 塩化ナトリウム溶液

流 量：0.5mL/min

注 入 量：10 μL

試 料 溶 液：コンドロイチン硫酸ナトリウム 60mg を水にとかし、100mL とした。

(3) IR スペクトルの測定

赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により測定を行った。赤外分光光度計は(株)パーキンエルマー ジャパン製 1650 QS を用いた。

結果及び考察

1. D-グルクロン酸含量

試験結果を Fig.2 に示した。標準品はコンドロイチン硫酸 A が 34.4%、C が 35.4% であり、市販品は A 社内服用が 3 ロット平均 27.6%、B 社内服用が 6 ロット平均 31.5%、A 社注射用が 3 ロット平均 37.0%、B 社注射用が 3 ロット平均 35.4% と、内服用より注射用の方が含量が高く、グレードによる差がみられた。また、製造メーカーによる差はみられないが、ロット間のバラツキが大きく、使用の際には注意が必要である。

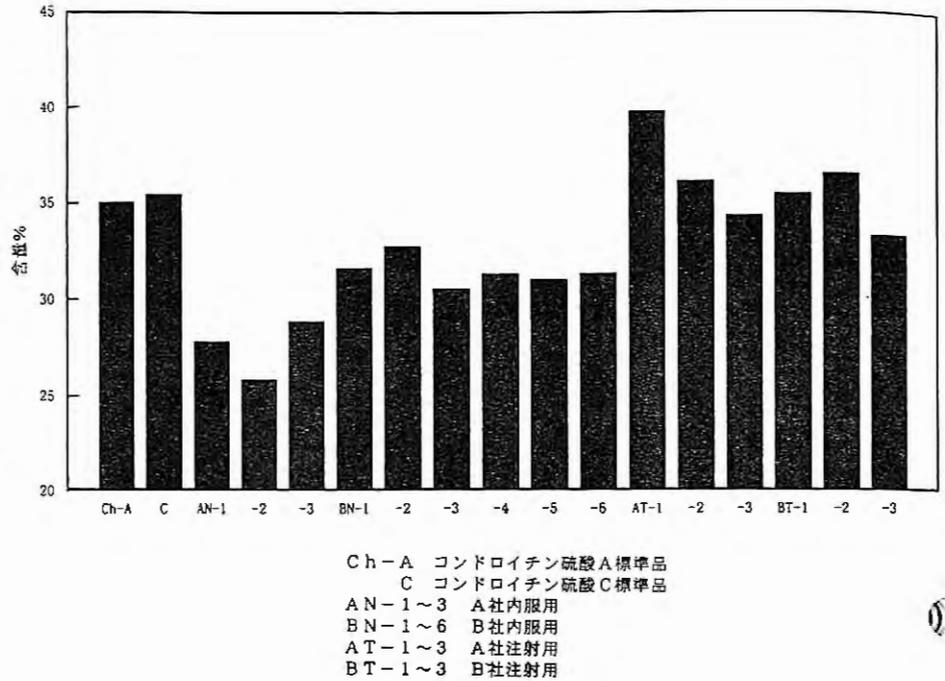


Fig.2 D-グルクロン酸含量

2. ゲルろ過カラムによる HPLC パターン分析

本条件はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) モードにより、分子量の大きいものから順に溶出するため、コンドロイチン硫酸 A と C の区別が可能であった。標準品と市販品の代表的なクロマトグラムを Fig.3 に示した。A は分子量が小さく、分子量分布幅が狭いため、ピークの溶出時間は遅くシャープな形状を示した。C は分子量が大きく、分子量分布幅が広いから、ピークの溶出時間は早くブロードな形状を示した。市販コンドロイチン硫酸ナトリウムにおいても、それぞれ標準品と同様の HPLC パターンが得られ、A タイプのものと C タイプのものがあった。例えば、市販品 1 は溶出時間が遅く、ピーク形状はシャープなので A タイプと思われる。また、市販品 2 は溶出時間が早く、ピーク形状はブロードなので C タイプと思われる。

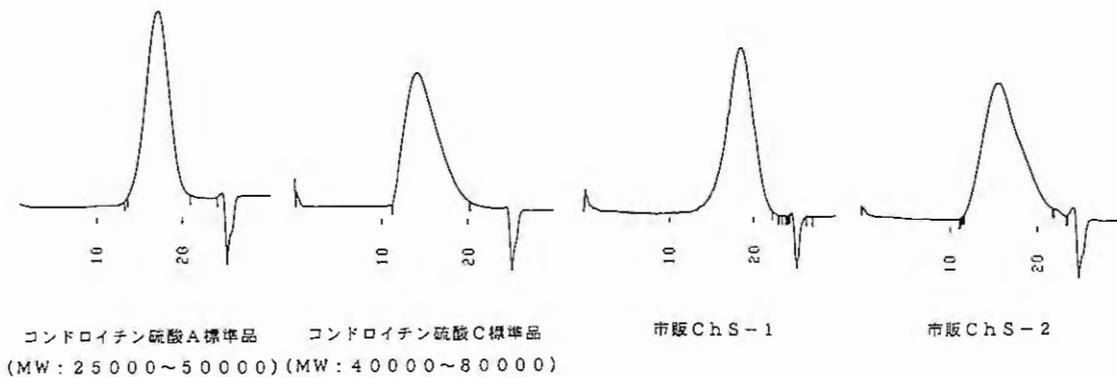


Fig.3 コンドロイチン硫酸ナトリウムの HPLC クロマトグラム

3. IR スペクトル

市販標準品の試験項目に IR スペクトルの記載があったことから、実際に標準品の IR スペクトルを測定したところ、コンドロイチン硫酸 A と C に明確な差が認められた。A では波数 927cm^{-1} 及び 857cm^{-1} 付近に、C では 826cm^{-1} 付近に特徴的な吸収が認められた。コンドロイチン硫酸 A はコンドロイチン 4-硫酸、また、コンドロイチン硫酸 C はコンドロイチン 6-硫酸とも言われ、硫酸基の結合位置が異なっている。 $800\sim 900\text{cm}^{-1}$ の領域の吸収は C-O-

S結合による吸収であり、それぞれの硫酸基の立体配座の違いから、Aは 850cm^{-1} 付近に、Cは 820cm^{-1} 付近に吸収が現れる³⁾といわれている。

市販コンドロイチン硫酸ナトリウムのIRスペクトルを測定したところ、AタイプとCタイプのものがあり、これはHPLCパターン分析の結果と一致していた。すなわち、HPLCパターンよりAタイプと思われる試料は、IRスペクトルでもA標準品と同様のパターンを示していた (Fig.4)。

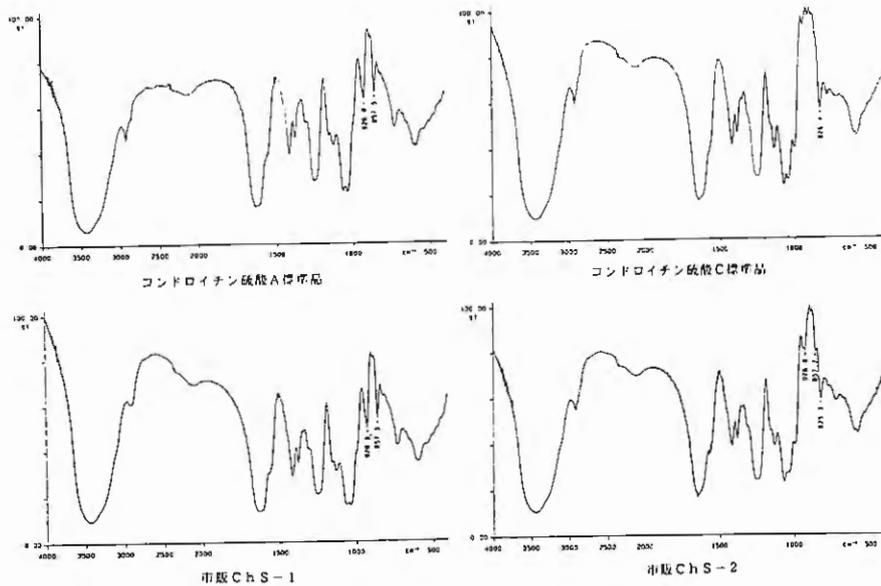


Fig.4 コンドロイチン硫酸ナトリウムのIRスペクトル

標準品及び市販コンドロイチン硫酸ナトリウムについて、以上3項目の試験を行った結果をTable.1に示した。

	D-グルクロン酸(%)	HPLCパターン	IRスペクトル
A標準品	34.41	A	A
C標準品	35.41	C	C
A社 内服用-1	27.81	C	C
2	26.23	C	C (A) *1
3	28.82	C	C (A) *1
B社 内服用-1	31.61	C	C+A *2
2	32.73	C	C (A) *1
3	31.09	C	C+A *2
4	31.33	—	—
5	31.04	—	—
6	31.36	—	—
A社 注射用-1	39.81	C	C
2	36.16	C	C
3	34.99	C	C
B社 注射用-1	35.49	C	C (A) *1
2	36.56	A	A
3	34.09	A	A

- * 1 Cに特徴的な吸収とともに、Aに特徴的な吸収がわずかにみられる
- * 2 Cに特徴的な吸収とAに特徴的な吸収が同程度の大きさでみられる

Table.1 コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価結果

ま と め

コンドロイチン硫酸ナトリウムについて3項目の試験を行ったところ、グレード、構造によって品質が異なることがわかった。

- ・内服用と注射用の2つのグレード間でD-グルクロン酸含量に差がみられた。
- ・コンドロイチン硫酸AとCではHPLCパターンとIRスペクトルに違いがみられた。この方法を市販コンドロイチン硫酸ナトリウムに応用したところ、AタイプとCタイプが混在していた。

参考文献

- 1) Bitter ら, Anal . Biochem., 4,330 (1962)
- 2) Fukano ら, J . Chromatogr., 166,47 (1978)
- 3) 長谷川栄一ら, ムコ多糖の構造と機能, 化学の領域増刊83, 南江堂 (1968)

和漢薬配合製剤の理化学的品質評価

— アロエ中のバルバロインについて —

Chemical Evaluation of Gastrointestinal Remedies Containing Oriental Drugs

Barbaloin in Aloe

富山県薬事研究会分析部会（バルバロイン分科会）

barbaloin of Analytical Chemistry,

Toyama Pharmaceutical Research Association

松 平 薫	大協薬品工業(株)
Kaoru MATSUHIRA	Taikyou Pharmaceutical Co., LTD.
江野本 加壽雄	(株)廣貫堂
Kazuo ENOMOTO	Kokando Co.,LTD.
南 泉 介	(株)富士薬品
Sensuke MINAMI	Fuji medicine Co.,LTD.
安 倍 房 江	東亜薬品(株)
Fusae ABE	Toa Medicine Co.,LTD.
春 日 香 織	共栄製薬(株)
Kaori KASUGA	Kyoei Pharmaceutical Co.,LTD.
横 田 洋 一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

結 言

アロエは、*Aloe ferox* Miller等の葉の液汁を乾燥したもので、古くから健胃薬、緩下薬として広く使用されており、日本薬局方では、第1版以来続けて収載されている。

医薬品製造指針では、アロエの定量成分としてバルバロインが指定されており、生薬標準品として各社から販売されている。しかし、標準品の規格及び試験方法には定まったものがなく、日本薬局方第13版では、TLC法による純度試験が記載してあるだけである。

そこで本分科会では、これまでに、バルバロイン標準品の規格及び試験方法の設定¹⁾を行ってきた。

今回、原料アロエ及びアロエ末中のバルバロインの定量、モデル処方中のバルバロインの定量を行ったので報告する。更に、市販医薬品中のバルバロインの定量も実施したので報告する。

実 験 の 部

1. アロエ及びアロエ末中のバルバロイン含量試験法（定量法1）の設定

1) 標準品及び標準溶液

前年度の薬事研究会分析部会バルバロイン分科会の報告¹⁾で示した標準品の規格に合致したものをを用いた。また、標準溶液の安定性を確保するためにシュウ酸のメタノール溶液（0.2—1000）を用いた。

2) HPLC 条件 1

操作条件は、前年度の薬事研究会分析部会バルバロイン分科会の報告¹⁾で示したHPLC条件で行った。

検 出 器：紫外吸光光度計（測定波長296 nm）

カラム：内径4～6 mm、長さ10～30cmのステンレス管に5～10 μmの液体クロマトグラフ用オクタデシリルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：アセトニトリル・水・氷酢酸（26：74：1）

流量：バルバロインの保持時間が10分前後になるように調節する。但し、他の物質との分離により変更してもよい。

注入量：10 μL

カラムの選定：バルバロイン 1 mg及びm-ニトロアニリン 1 mgをシュウ酸のメタノール溶液（0.2～1000）100 mLに溶かす。この20 μLつき、上記の条件で操作するとき、バルバロイン、m-ニトロアニリンの順に溶出し、完全に分離するものを用いる。

3) 内標準物質の検討

エテンザミド、m-ニトロアニリン及びp-オキシ安息香酸エチルについて検討を行った。

4) 試料の抽出

(1) 抽出時間の検討

試料の抽出時間を検討するために、アロエ末約100mgメタノールを加えて正確に100 mLとし、時々振り混ぜながらそれぞれ、10分間、20分間、30分間及び、60分間超音波抽出し試料溶液とした。

(2) 抽出溶媒の検討

HPLC法で定量を行なう際に、一般的にオートインジェクターが使用されるため試料抽出液の安定性を確認するため、シュウ酸のメタノール溶液（0.2～1000）及びメタノールでの抽出溶液を抽出直後、5時間後及び48時間後にHPLCに注入し安定性の検討を行った。

(3) 直線性及び注入精度の確認

直線性を確認する為に検量線を作成した。また、注入精度を確認する為に標準溶液10 μLを5回繰り返し注入し注入精度を確認した。

2. アロエ及びアロエ末の品質評価

1. の検討結果をもとに、アロエ（10検体）アロエ末（5検体）を試料として、品質評価を行った。

3. 製剤への応用（定量法2）

市販されている胃腸薬や瀉下薬によく配合されている他の生薬と混合したモデル処方調製し、定量を行った。処方①は、一般に瀉下薬によく配合されている生薬を配合し、処方②は、これに胃腸薬等に用いられる定量を妨害する可能性のある成分を加えた。Table 1にモデル処方を示す。

	モデル処方①	モデル処方②
アロエ	150 mg	150 mg
センナ	150 mg	150 mg
ダイオウ	150 mg	150 mg
ケンゴシ	75 mg	—
カンゾウ	—	150 mg
オウレン	—	75 mg

Table 1 モデル処方

1) HPLC 条件 2

製剤中の妨害物質の影響を避ける為に、移動相にイオンペア試薬を加えた。

検出器：紫外吸光度計（測定波長360 nm）

カラム：内径4～6 mm, 長さ10～30cmのステンレス管に5～10 μmの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：酢酸ナトリウム三水合物0.544 g/L 及び塩化ベンゼトニウム2.5 g/L を含む水/アセトニトリル混液（82：18 or 85：15）

流量：1.0 mL/min

注入量：20 μL

2) 抽出溶媒の検討

HPLC 法で定量を行なう際に、一般的にオートインジェクターが使用されるため試料抽出液の安定性を確認するため、シュウ酸のメタノール溶液（0.2—1000）及びメタノールでの抽出溶液を抽出直後及び24時間後に HPLC に注入し安定性の検討を行った。

3) 直線性及び注入精度の確認

直線性を確認する為に検量線を作成した。また、注入精度を確認する為に標準溶液10 μLを6回繰り返し注入し注入精度を確認した。

4) 製剤からの回収率

処方①及び処方②をそれぞれ定量法1及び定量法2で定量し、回収率を求めた。

4. 市販製剤の実測

市販されている胃腸薬、瀉下薬6種類（Table 2）を購入し検討を行った。

1) 市販製剤の抽出時間の検討

市販製剤の抽出方法を検討するために、抽出しにくいと思われた市販製剤 No. 6 について検討を行った。60℃加熱抽出、超音波抽出及び振とう抽出をおこない、また、抽出回数についても検討を行った。

2) 抽出時間、抽出溶媒の検討結果をもとに市販製剤の定量を行った。

	製品 A	製品 B	製品 C	製品 D	製品 E	製品 F
1 日 量	15 丸	24 丸	3 錠	5 錠	60 粒	3 個
アロエ末	50mg	750mg	120mg	150mg	340mg	150mg
センナ末	150mg	900mg		500mg		
ダイオウ末	300mg	750mg		180mg	1000mg	32mg
ケンゴシ末					200mg	
カンゾウ末				カンゾウ抽出物 50mg		10mg
オウレン末					100mg	
その他			フェノールフタレイン 97.5mg センノシト 12mg		オウゴン 200mg センキュウ末 760mg チンキライ末 1000mg	ケンチブナエキス 30mg オウハクダエキス 200mg ニカキエキス 30mg エンメイソウエキス 30mg チクセフニンジンエキス 30mg 牛胆 100mg
タイプ	1	1	1	2	2	2

Table 2 アロエ配合市販薬

結果及び考察

1. 試験法の設定

1) 内標準物質の検討結果

エテンザミド、m-ニトロアニリン及びp-オキシ安息香酸エチルとアロエ末のHPLCクロマトグラムを比較した結果、いずれも妨害が確認された。よって今回は絶対検量線法により定量を行うことにした。

2) 抽出時間の設定

抽出時間を変えて行った結果を、Table 3に示す。この結果より抽出時間は、バルバロインの定量値が高かった超音波20分間抽出で行うことにした。

n = 3

抽出時間	平均含量	
	バルバロイン	イソバルバロイン
10分	6.41%	7.09%
20分	6.47%	7.13%
30分	6.46%	7.11%
60分	6.32%	6.96%

Table 3 アロエの抽出時間の設定

3) 抽出溶媒の設定

シュウ酸のメタノール溶液(0.2-1000)及びメタノールでの抽出溶液を抽出直後、5時間後及び48時間後にHPLCに注入した結果、メタノール抽出液のクロマトグラムには変化は認められなかった。しかし、シュウ酸のメタノール溶液(0.2-1000)抽出液のクロマトグラムでは、抽出5時間後以降にバルバロインの溶出位置にシュウ酸によるものと考えられる妨害ピークが認められた。従ってアロエ及びアロエ末の抽出溶媒は、メタノールとした。また、メタノール抽出液は、48時間後でも安定であり、オートインジェクターで分析しても問題が無いことを確認した。

4) 直線性及び注入精度の確認

3.328mg~13.31mg/100mLの濃度範囲で検量線を作成したところ、各社共、原点を通る良好な直線が得られた。また、注入精度を確認する為に標準溶液10 μ Lを5回繰り返し注入し面積の変動を確認したところ、相対標準偏差も小さく問題がないことを確認した。Table 4に結果を示す。

	A社	B社	C社	D社
相関係数	0.9999	0.9999	0.9999	1.0000
回帰式	$y = -61582 + 2274800x$	$y = 12363 + 105144x$	$y = -21852 + 71955x$	$y = -1784 + 84029x$
C.V. n=5	1.32%	0.36%	0.21%	0.23%

Table 4 HPLC条件1における直線性及び注入精度の確認

2. 市販アロエ及びアロエ末の品質評価

市販アロエ及びアロエ末の定量結果を、Table 5 に示す。アロエ末は4社、アロエは3社で試験を行なった結果である。

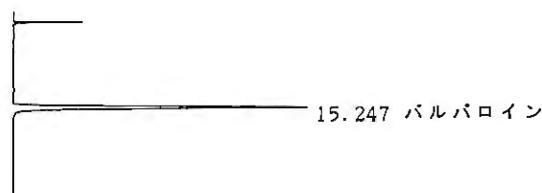
	ロット数	n	バルバロイン含有率		イソバルバロイン含有率		成分比
			平均値	C V	平均値	C V	
アロエ末	5	4	6.89 % 最大 9.58 最小 4.89	23.8 %	6.48 % 最大 9.00 最小 4.72	23.3 %	1.06
アロエ	10	3	8.16 % 最大 11.01 最小 6.48	16.5 %	7.41 % 最大 9.58 最小 4.89	15.0 %	1.10

Table 5 原料アロエ及びアロエ末の定量結果

定量結果より、バルバロイン含量は、原料により、かなり差があることが判明した。また、バルバロイン及びその立体異性体であるイソバルバロインの成分比は約1:1であった。これは、文献²⁾の成分比と一致した。

Fig. 1 にバルバロイン及び原料アロエのクロマトグラムを示す。

標準溶液



アロエ試料溶液

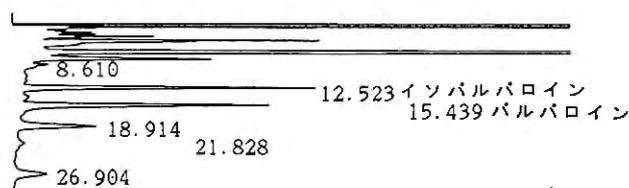


Fig.1 バルバロイン及び原料アロエのクロマトグラム

3. 製剤への応用

1) モデル処方①は、先に示した HPLC 条件 1 により妨害もなく分離しおおむね良好な回収率が得られた。

モデル処方②はカンゾウとダイオウによる影響で回収率が高くなってしまった。そこで、イオン交換系カートリッジカラムによる前処理や移動相の検討を行った結果、移動相にイオンペアー試薬として塩化ベンゼトニウムを加える HPLC 条件 2 により良好な結果が得られることが判明した。

2) 抽出溶媒の設定

シュウ酸のメタノール溶液 (0.2-1000) 及びメタノールでの抽出溶液を、抽出直後及び24時間後に HPLC に注入した結果、シュウ酸のメタノール溶液 (0.2-1000) 抽出液のクロマトグラムには変化は認められなかった。しかし、メタノール抽出液のクロマトグラムでは、24時間後にバルバロインの面積が減少する傾向が認められた。この事よりアロエ及びアロエ末では、シュウ酸を添加することにより妨害ピークが認められたが、製剤抽出液中のバルバロインは、シュウ酸のメタノール溶液 (0.2-1000) 中で24時間は安定であることが判明した。従って、製剤の抽出溶媒は、シュウ酸のメタノール溶液 (0.2-1000) とした。

3) 直線性及び注入精度の確認

HPLC 条件 2 について、3.314mg~13.25mg/100mL の濃度範囲で検量線を作成したところ、各社共、原点を通る良好な直線が得られた。また、注入精度を確認する為に標準溶液 10 μL を 6 回繰り返し注入し面積の変動を確認したところ、相対標準偏差も小さく問題がないことを確認した。

Table 6 に結果を示す。

	A 社	B 社	C 社	D 社
相関係数	0.9972	0.9978	0.9999	0.9995
回帰式	$y = 1679 + 96163x$	$y = 4655 + 1771x$	$y = -4 + 63163x$	$y = -0.05 + 14331x$
C.V. n=6	2.82%	3.43%	0.85%	0.46%

Table 6 HPLC 条件 2 における直線性及び注入精度の確認

4) 製剤からの回収率結果

定量法 1 によるモデル処方①の結果及び、定量法 2 によるモデル処方②の結果を、Table 7 に示す。それぞれ、定量方法を変えることにより、良好な回収率が得られた。

Fig. 2 にモデル処方②のイオンペアーの入っていない移動相でのクロマトグラムとイオンペアーの入っている移動相でのクロマトグラムを示す。

	モデル処方① (定量法 1)		モデル処方② (定量法 2)	
	ハルハロイン	イソハルハロイン	ハルハロイン	イソハルハロイン
A 社	97.8 %	120.0 %	95.0 %	97.1 %
B 社	102.0 %	103.9 %	102.8 %	92.4 %
C 社	100.3 %	99.4 %	105.2 %	102.0 %
D 社	-	-	111.0 %	105.0 %

Table 7 モデル処方の定量結果 (添加回収率)

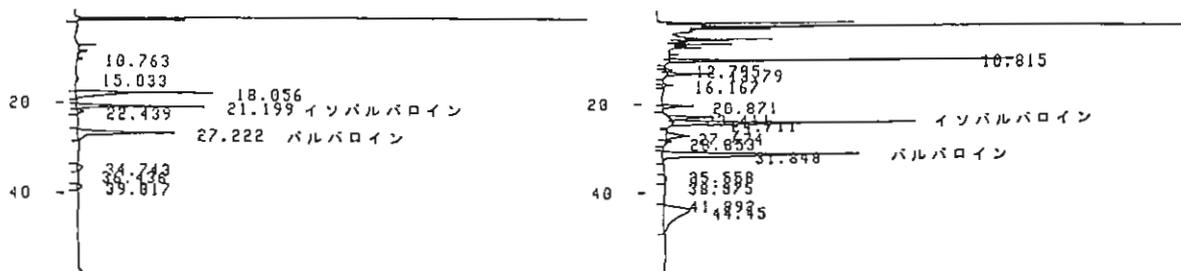


Fig.2 モデル処方②のクロマトグラム

4. 市販製剤の実測結果

1) 市販製剤の抽出時間の検討

市販製剤の製品Fの抽出条件を検討した結果を、Table 8に示す。

この結果より市販製剤の抽出時間は、バルバロインの定量値が高かった超音波抽出40分間で1回抽出により行うことにした。

(mg/アロエ100mg)

		20分	40分	20分×2
60℃加熱	イソバルバロイン	2.28	2.99	2.94
	バルバロイン	3.12	3.32	3.30
超音波	イソバルバロイン	3.09	3.22	3.09
	バルバロイン	3.17	3.32	3.22
振とう	イソバルバロイン	2.51	2.69	2.93
	バルバロイン	2.96	3.17	3.42

Table 8 抽出法の検討—製品Fのアロエの抽出量

2) 市販製剤の定量結果を、Table 9に示す。

n = 3

	イソバルバロイン含有率	バルバロイン含有率
製品 A	3.01 %	3.01 %
製品 B	6.96 %	7.11 %
製品 C	6.32 %	6.47 %
製品 D	8.48 %	9.28 %
製品 E	8.08 %	8.58 %
製品 F	6.18 %	6.44 %

Table 9 アロエ配合市販薬の定量結果

(各市販薬におけるアロエ中のイソバルバロイン及びバルバロインの含有率)

ま と め

1. 原料アロエ及びアロエ末中のバルバロインを定量法1により試験した結果、再現性の良い結果が得られた。
2. 定量法1をモデル処方に適用した所、オウレン及びカンゾウが妨害物質となったが、移動相をイオンペア法に変更した定量法2で試験を行う事により妨害を除く事が出来た。
3. 定量法1及び定量法2を市販胃腸薬に応用したところ、良好な結果が得られた。

文 献

- 1) 富山県薬事研究会分析部会 バルバロイン分科会；生薬試験用標準品の規格設定に関する検討 (第9報) —バルバロインについて— 家庭薬研究 No.16, pp.28-32(1997)
- 2) M.Grüm et al, Pharmazie, 34, 669 (1979)

生薬ベラドンナエキス配合パップ剤の消炎鎮痛作用について

Analgesy and Anti-inflammatory Effects of Poultice
containing Belladonna Extract

加藤 三穂 浜本 哲和
Miho KATO Tetsukazu HAMAMOTO
後藤 茂 玉沖 英恒
Shigeru GOTO Hidetsune TAMAOKI
リードケミカル株式会社 研究部
Research Laboratories, Lead Chemical Co.,Ltd.

結 言

生薬は古くから身近な予防および治療薬として内用、外用など様々な投与経路で用いられ、現在でも広く繁用されている。現在市販されている消炎鎮痛パップ剤の中にも鎮痛作用や消炎作用を有する生薬成分を配合しているものが多くある。以前我々の研究グループは、ベラドンナエキスに強い鎮痛作用¹⁾およびセイヨウトチノミエキスに強い消炎作用²⁾を有することを本家庭薬シンポジウムで報告した。

今回我々は、生薬成分としてベラドンナエキスを配合したパップ剤を開発し、消炎および鎮痛作用について同主成分であるサリチル酸グリコールを含有する既存のパップ剤と比較検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 使用動物

生後5、6週齢のWistar/ST系雄性ラットを使用した。ラットはあらかじめ室温23±2℃、湿度50±15%、明暗期12時間（照明時間午前6時～午後6時）に設定されている飼育室で1週間の予備飼育を行った。飼料としてラット用固形飼料（ラボMRストック：日本農産工業株）を、飲水として水道水を自動給水にてそれぞれ自由摂取させた。

表1 被験薬剤の有効成分

被験薬剤	A	B	C
有効成分	サリチル酸グリコール (1.00%) l-メントール (0.3%) ベラドンナエキス (0.2%) セイヨウトチノミエキス (0.5%)	サリチル酸グリコール (1.50%) l-メントール (1.0%) 精油成分 ビタミンE成分	サリチル酸グリコール (1.25%) l-メントール (1.0%) 精油成分 ビタミンE成分

被験薬剤	D	E
有効成分	サリチル酸グリコール (1.00%) l-メントール (0.3%) 生薬成分	インドメタシン (0.5%)

2) 使用薬物

カラゲニン (Picnin-A®厨子化学)

乾燥酵母 (和光純薬工業)

3) 被験薬剤

実験で使用した被験薬剤の有効成分を表1に示す。

2. 実験方法

1) *In vitro* ラット腹部摘出皮膚薬物透過試験

6週齢のラットにペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔下で腹部被毛を剪毛したのち、正中線対称に左右一枚ずつ皮膚を摘出した。摘出した皮膚の真皮側の脂肪、毛細血管などを取り除いて透過試験に供した。37°Cの温水を循環させた透過試験用拡散セルに皮膚を貼り付け、その中央部に被験薬剤を適用し経時的に一定量のレシバー溶液を採取した。採取したサンプル中の薬物量を HPLC で測定し皮膚透過量を算出した。レシバー溶液はタイロード液を用いた。

2) 鎮痛作用 (イースト起炎疼痛抑制作用)

Randall-Selitto 法³⁾に準じて試験を行った。5週齢のラットを1群8匹とし使用した。前日に左後肢足蹠の被毛を電気カミソリで剪毛した。実験当日、左後肢足蹠皮下に20%イースト (Yeast Dried®LOT No. SKM 1019, 和光純薬) / 生理食塩水懸濁液0.1mLを walking pad の一つを通して注入し炎症を惹起させた。炎症惹起2時間後から被験薬剤 (3.5cm×4.0cm) を適用した。適用後1、2、3および4時間後に炎症足の疼痛圧閾値を Analgesy Meter (Ugo-Basile 社製) を用いて測定した。鎮痛係数は各被験薬剤群のそれぞれの時間における疼痛圧閾値の和と無処置群における疼痛圧閾値の和との比で表した。なお、被験薬剤は測定時に取り除き、測定後再び同一の薬剤を適用した。被験薬剤はネット包帯で固定し脱落及び口からの摂取を防止した。

3) 抗炎症作用 (カラゲニン足浮腫抑制作用)

5週齢のラットを1群7匹とし使用した。前日に左後肢足蹠の被毛を電気カミソリで剪毛した。実験当日、水置換法を用いて左後肢足蹠容積を測定した後、同足に被験薬剤を1時間適用した。被験薬剤を除去後、左後肢足蹠皮下に0.5%カラゲニン (Picnin-A®, LOT No. P-18, 厨子化学) / 生理食塩水溶液0.1mLを walking pad の一つを通して注入し炎症を惹起させた。炎症惹起後直ちに被験薬剤を適用した。被験薬剤はネット包帯で固定し、その脱落及び口からの摂取を防止した。起炎後1、3および5時間の足蹠容積を測定し、起炎剤注入前の足蹠容積に対する炎症惹起後の足蹠容積の増加率を浮腫率とした。なお、被験薬剤は測定時に取り除き、測定後再び同一の薬剤を適用した。

3. 統計処理

実験のデータに関する統計処理はすべて Student の t-検定で行った。

結 果

1. *In vitro* ラット腹部摘出皮膚薬物透過試験

急性炎症モデルに対する薬効評価を行う前に、ラット腹部摘出皮膚を用いて各サリチル酸グリコール含有パップ剤の薬物透過性について比較検討した。透過試験の結果を Table 2 および Fig.1 に示す。皮膚適用後サリチル酸グリコールは未変化体のまま、あるいは一部皮膚代謝を受けてサリチル酸に変化して透過する。そこで、皮膚適用後24時間までのサンプル中のサリチル酸グリコールとサリチル酸の総薬物透過量とサリチル酸量のみに分けて結果を示した。その結果、被験薬剤適用後24時間の総透過量はC、B、D、Aの順に高く、その量はそれぞれ4.76, 4.16, 3.04, 2.68

$\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ であった (Fig.1B)。代謝産物であるサリチル酸量はA、C、D、Bの順に高く、その量はそれぞれ2.08, 2.08, 1.97, 1.55 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ であった (Fig.1A)。つぎに、これらの値から総薬物透過量に対するサリチル酸量の割合について求めた (Table 2)。その結果、被験薬剤A (0.78) が最も高く、次いでD (0.65)、C (0.43)、B (0.39) の順であった。

Table 2 Skin Permeation Profile of Glycol salicylate and Salicylic acid through excised Abdominal Rat Skin from Each Poultice

	A poultice	B poultice	C poultice	D poultice
Total (T) ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/24\text{h}$)	2.68 ± 0.54	4.16 ± 0.75	4.76 ± 1.18	3.04 ± 0.13
Salicylic acid (S) ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/24\text{h}$)	2.08 ± 0.42	1.55 ± 0.09	2.08 ± 0.57	1.97 ± 0.08
S / T	0.78	0.39	0.43	0.65

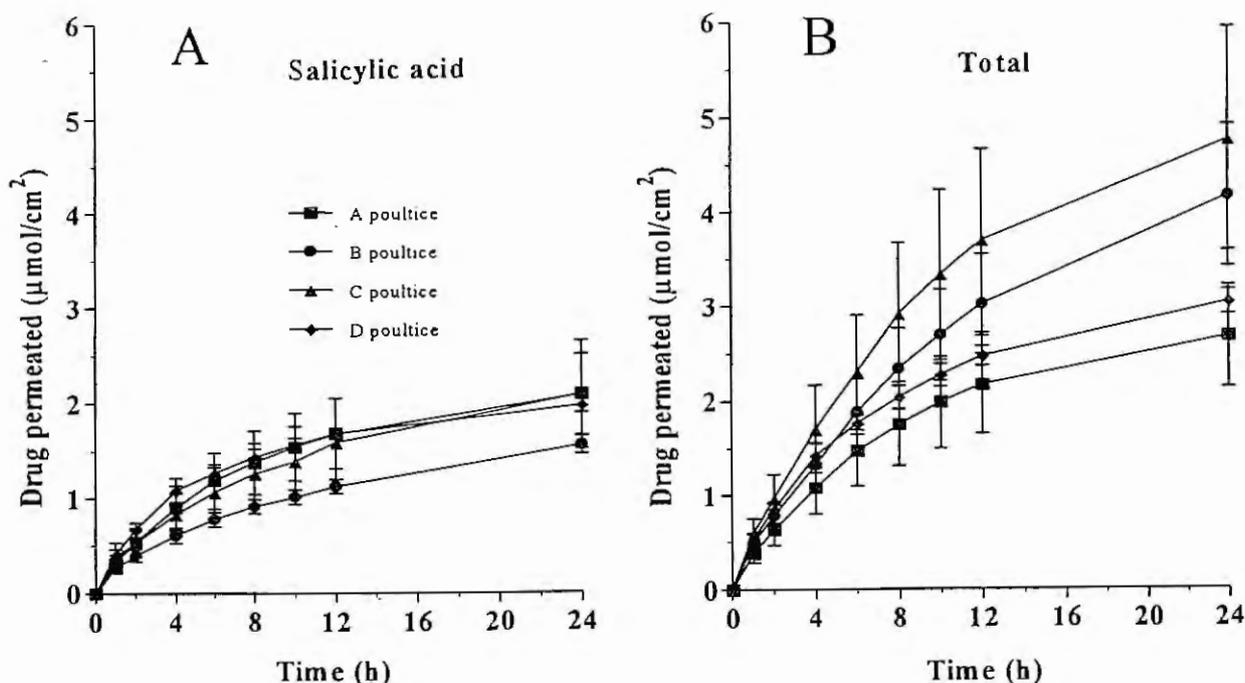


Fig.1 Skin permeation Profile of Glycol salicylate and Salicylic acid through excised abdominal rat skin from each poultice

2. 鎮痛作用

1) イースト起炎疼痛抑制作用

結果を Table 3 および Fig.2 に示す。各被験薬剤適用 4 時間後までの疼痛圧閾値は被験薬剤 A、E、D の順で有意な鎮痛作用を示した。鎮痛係数は、それぞれ 1.25、1.20、1.16 であった。しかし、被験薬剤 B および C には有意な鎮痛作用は認められなかった。

Table 3 Analgesic Effects of Poultice contained Belladonna Extract and Other Poultices on Yeast-induced Hyperalgesia in Rats

Drug	No. of animals	Pain threshold Mean \pm S.E. ($\times 10g$)	Analgesic coefficient	t-test (vs Control)
Control	8	12.2 \pm 0.4	-	-
A poultice	8	15.3 \pm 0.4	1.25	p<0.01
B poultice	8	12.9 \pm 0.3	1.06	N.S.
C poultice	8	13.1 \pm 0.5	1.07	N.S.
D poultice	8	14.2 \pm 0.3	1.16	P<0.01
E poultice	8	14.6 \pm 0.5	1.20	P<0.01

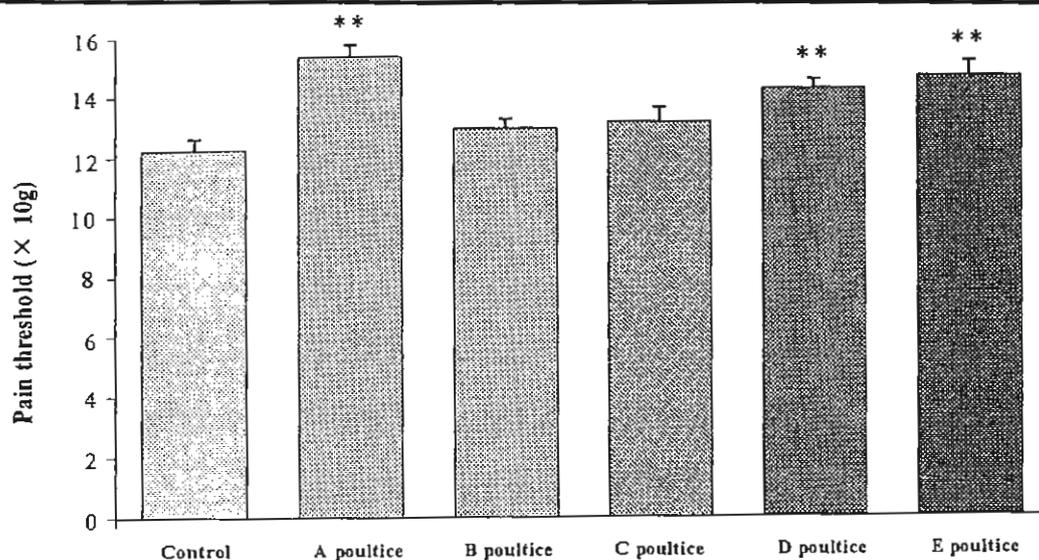


Fig.2 Analgesic Effects of Poultice contained Belladonna Extract and Other Poultices on Yeast-induced Hyperalgesia in Rats . Each value represents the mean \pm S.E. of 8 animals . * * ; p<0.01 vs Control

3. 抗炎症作用

1) カラゲニン足浮腫抑制作用

結果を Table 4 および Fig.3 に示す。カラゲニン投与後 3 時間における被験薬剤 A の足浮腫抑制率は 29.1% と最も強く、ついで、E の 27.0%、B の 20.2% の順で有意な浮腫抑制作用を示した。しかし、被験薬剤 C および D には有意な浮腫抑制作用は認められなかった。

Table 4 Anti-inflammatory Effects of Poultice contained Belladonna Extract and Other Poultices on Rat Hind Paw Swelling induced by Carrageenin

Drug	No. of animals	Ratio of Edema Mean \pm S.E. (%)	Inhibition (%)	t-test (vs Control)
Control	7	57.0 \pm 3.5	-	-
A poultice	7	40.4 \pm 2.9	29.1	p<0.01
B poultice	7	45.5 \pm 3.9	20.2	p<0.05
C poultice	7	53.4 \pm 2.7	6.3	N.S.
D poultice	7	50.5 \pm 2.7	11.4	N.S.
E poultice	7	41.6 \pm 1.8	27.0	P<0.01

The volume of left hind paw was measured at 3hr after the carrageenin injection.

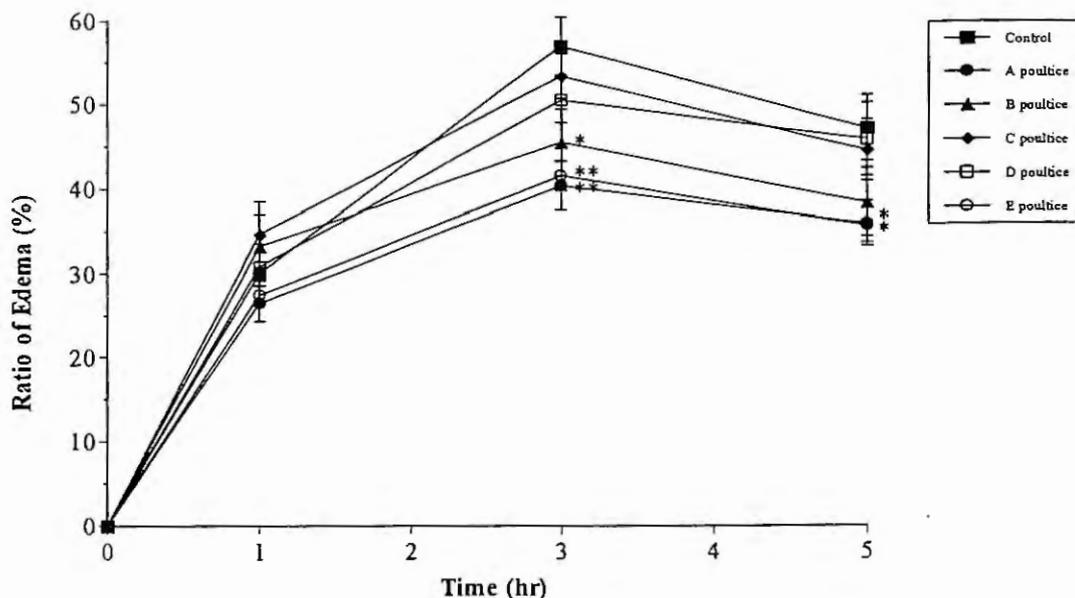


Fig.3 Anti-inflammatory Effects of Poultice contained Belladonna Extract and Other Poultices on Rat Hind Paw Swelling induced by Carrageenin. Each value represents the mean \pm S.E. of 7 animals .
 *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs control

考 察

今回の研究で最初にラット腹部摘出皮膚を用いて、各サリチル酸グリコール含有パップ剤の透過性について検討した。総薬物透過量では薬物含量の高いものほど高い透過性を示し、ベラドンナエキス配合パップ剤（被験薬剤A）が最も低い透過性を示した。ところが、サリチル酸グリコールの皮膚代謝産物であるサリチル酸量では他の被験薬剤とほぼ同等の透過量であった。ベラドンナエキス配合パップ剤中サリチル酸グリコールは皮膚において高い割合でサリチル酸へ変換された。このサリチル酸は消炎鎮痛作用の主体成分であることから、本パップ剤が他のパップ剤に比べて効率的に、かつ有用に薬効を示すことが期待された。

そこで、急性炎症モデルに対するベラドンナエキス配合パップ剤の消炎鎮痛作用について他のパップ剤と比較検討した。まず、イースト起炎疼痛に対する各被験薬剤の鎮痛作用について検討した。その結果、被験薬剤A、E、Dの順に有意な鎮痛作用を示した。ベラドンナエキス配合パップ剤の鎮痛作用は、サリチル酸グリコールを含有する他の被験薬剤と比べるとかなり強力であることが認められた。次に、カラゲニン足浮腫に対する各被験薬剤の抗炎症作用について検討した。その結果、被験薬剤A、E、Bの順に有意な抗炎症作用を示した。ベラドンナエキス配合パップ剤の抗炎症作用は、サリチル酸グリコールを含有する他の被験薬剤と比べると強力であることが認められた。

今回開発したベラドンナエキス配合パップ剤は *in vitro* ラット腹部摘出皮膚薬物透過試験の結果から、消炎鎮痛作用の主体成分であるサリチル酸量が他の被験薬剤と同等にもかかわらず、急性炎症モデルに対して他の被験薬剤より強力な消炎鎮痛作用を示した。これは皮膚透過したサリチル酸の作用以外に、本パップ剤中に含まれるベラドンナエキス中の1-ヒオスチアミンの局所鎮痛作用によるもの、また同剤中に含まれるセイヨウトチノミエキス中エスシンのうっ血改善に伴う血管透過性亢進抑制作用によるものと考えられる。⁴⁾さらに、本パップ剤はインドメタシン含有パップ剤とほぼ同等な消炎鎮痛作用を示した。

以上のことから、ベラドンナエキス配合パップ剤は効率的な、かつ優れた鎮痛作用と抗炎症作用を併せ持つパップ剤であるといえる。

文 献

- 1) 元山貢, 杉林毅宏: ベラドンナエキスの皮膚適用による鎮痛効果, 家庭薬研究, No .4,29-33 (1985)
- 2) 元山貢, 野村明, 杉林毅宏, 森政雄: セイヨウトチノミエキス配合パップ剤の抗炎症効果, 家庭薬研究, No .3,59-62 (1984)
- 3) Randall L . O . and Selitto J . J . : Arch . Int . Pharmacodyn . Ther .111 : 409 (1957)
- 4) 奥田拓男編: 「薬用天然化学—第2版—」 p .146,159 廣川書店 (1992)

各種生体成分のラット肝ミトコンドリア呼吸活性に対する作用

Effects of various agents on rat liver mitochondrial respiration .

折橋正浩 小池淳平 島 雄一郎
Masahiro ORIHASHI Junpei KOIKE Yuitiro SHIMA
木村隆仁 勇伊 実
Takahito KIMURA Minoru YUUI
テイカ製薬株式会社 研究開発本部
Department of Research , Teika Pharmaceutical Co . Ltd .

結 言

市販医薬品に配合されている数多くの植物由来成分の中で、滋養強壮や体質改善を目的として配合されるものは生体の基礎代謝を活性化し、生体本来の持つ代謝能ならびに免疫性を増強して各種の障害を全身レベルで回復させる根本治療的な考え方に基づいて使用されるもので、対症療法的に用いられる多くの医療用医薬品とは基本的な性格を異にすることは明らかであるが、それゆえその薬効の本質を明確にすることは極めて難しい。近年、このような全身レベルの効能は組織あるいは細胞レベルの薬理活性、とりわけ脂質あるいは糖代謝に対する影響や免疫調節機構に対する影響などを検討することにより次第にその作用機序が明確にされようとしてきているが、まだ多くの課題を残している。

我々は細胞の基礎代謝の中でもエネルギー産生に重要な役割を持つミトコンドリアの呼吸能に着目し、動植物由来成分の中でも肝機能障害に対して有効とされる数種の薬物についてラット肝臓のミトコンドリア呼吸能に対する影響を検討した。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 使用動物：Wistar系雄性ラットを用いた。動物は温度 $22^{\circ} \pm 2$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間明暗サイクル（6：00点灯、18：00消灯）の環境下において固形飼料（ラボRストック：日本農産）、水道水を自由摂取させた。

2. 被験薬剤：

ソルコセリル（ソルコバーゼ社）、L-カルニチン（Sigma）、グルタチオン（和光純薬）、タウリン（岩城製薬株式会社）、小柴胡湯（株式会社ツムラ）、茵陈蒿湯（株式会社ツムラ）、甘草湯（鐘紡）、サイコサポニンa（和光純薬）

3. 試 薬

塩化フェニルヒドラジニウム（和光純薬）、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム（和光純薬）、ADPsodium salt（Sigma）

4. 実験方法

1) ミトコンドリアの調製方法¹⁾²⁾

ラットの断頭屠殺後、開腹し肝臓を摘出し、氷冷した isolation medium にて簡単に洗い、次いで小ばさみにて可能な限り細切し、isolation medium を加えてポッター型ホモジナイザーにて約600 rpm でホモジナイズした。

肝臓のホモジネートは Fig.1 に示した手順により調製処理を行いミトコンドリア粗標本を得た。

2) ミトコンドリアの酸素消費量の測定

クラーク型酸素電極と酸素モニターを用いポーログラフ法により溶存酸素量を測定した。基質となるコハク酸はあらかじめ反応液に12.5 mM となるように溶解し、反応槽中には、ミトコンドリア蛋白濃度が0.5~2.0mg/mLとなるように加え、被験薬剤、250 μ M ADPを順次添加しミトコンドリアの酸素消費量を記録した。

酸素の消費量は実験開始時にヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム中に塩化フェニルヒドラジニウムを添加した際に低下する目盛りから以後の実験で消費される酸素量を算出した³⁾。

3) State 3, State 4 及び RCR (Respiratory Control Ratio) の算出

ミトコンドリアの蛋白濃度を Lowry 法により求め、ミトコンドリア蛋白 1 mgあたりの酸素消費速度を算出した。また State 3 / State 4 から RCR を算出した。

4) 被験薬剤の調製方法

ソルコセルルは反応槽中で400 μ g/ml、

L-カルニチン、グルタチオン、タウリンおよびサイコサポニン a は反応液またはエタノールに溶解し反応槽中で 1×10^{-3} M となるように添加した。また、小柴胡湯、茵ちん蒿湯および甘草湯は熱水抽出後その上清を試料とし濃度はエキス量として算出した。

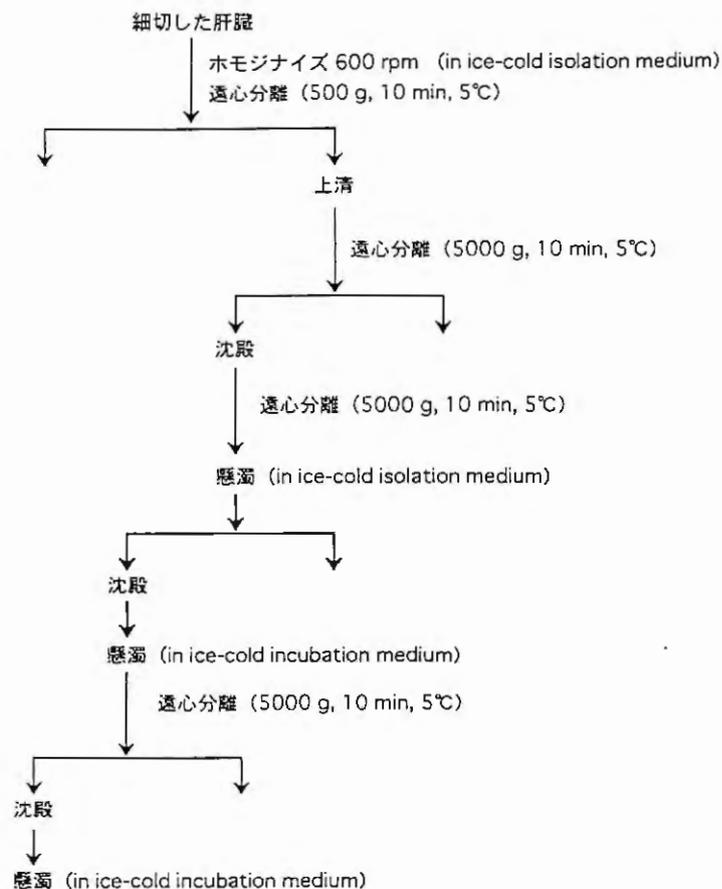


Fig.1 Preparation of mitochondrial fractions

結 果

Fig.2 にラット肝臓ミトコンドリアの呼吸状態を示す代表的な記録を示した。ソルコセルルを添加することにより state 3 の酸素消費速度が亢進し RCR が有意に増加した (Fig.3)。

また小柴胡湯、茵ちん蒿湯では state 4 での酸素消費速度の亢進により RCR が有意に低下した (Fig.4)。小柴胡湯の state 4 の亢進の原因を構成生薬である甘草、サイコサポニン a で検討したところサイコサポニン a で state 4 の急激な亢進が認められた (Fig.5)。

タウリン、L-カルニチン、グルタチオンはミトコンドリアの酸素消費速度に影響を与えなかった。今回の実験結果を Table 1 に一括表示した。

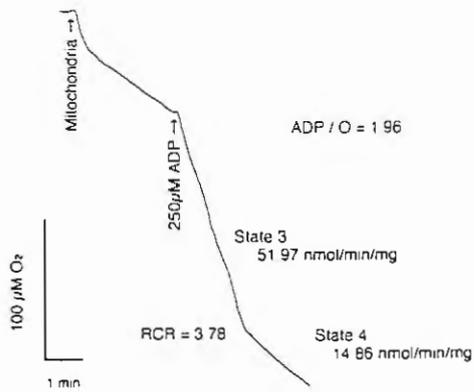


Fig. 2 A typical record showing the respiratory effects of mitochondria isolated from rat liver. Mitochondria were suspended in 600 μ l incubation medium containing 250 mM D-mannitol, 0.2 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM NaCl, 2.9 mM KH₂PO₄, 12.5 mM succinate (PH7.4)

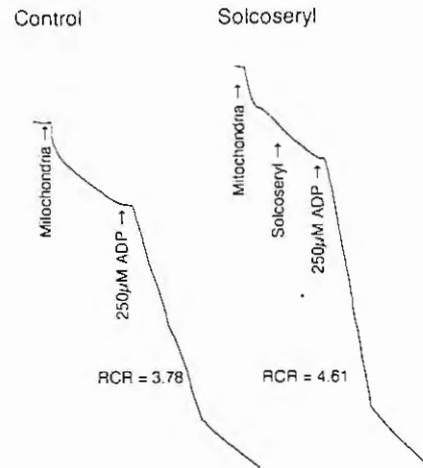


Fig. 3 Effects of solcoseryl on rat liver mitochondrial respiration. Mitochondria suspended in 600 μ l incubation medium containing 250 mM D-mannitol, 0.2 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM NaCl, 2.9 mM KH₂PO₄, 12.5 mM succinate (PH7.4)

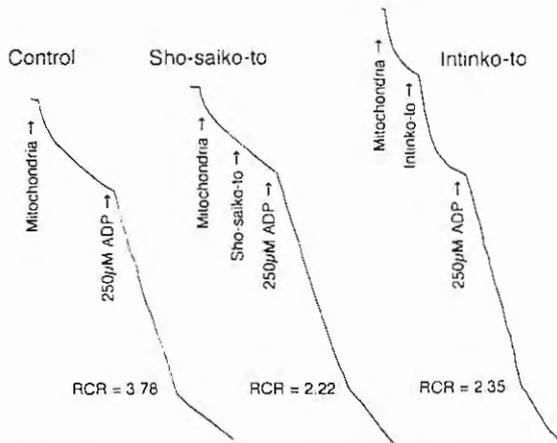


Fig. 4 Effects of Sho-saiko-to and Intinko-to on rat liver mitochondrial respiration. Mitochondria suspended in 600 μ l incubation medium containing 250 mM D-mannitol, 0.2 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM NaCl, 2.9 mM KH₂PO₄, 12.5 mM succinate (PH7.4)

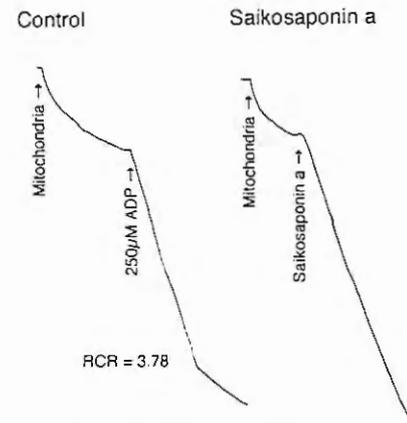


Fig. 5 Effects of saikosaponin a on rat liver mitochondrial respiration. Mitochondria suspended in 600 μ l incubation medium containing 250 mM D-mannitol, 0.2 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM NaCl, 2.9 mM KH₂PO₄, 12.5 mM succinate (PH7.4)

Table 1

Table 1. In vitro effects of various agents on rat liver mitochondrial respiration

Drugs	n	Dose	State 3 nmol/min/mg	State 4 nmol/min/mg	RCR
Control	24	-	51.97 \pm 4.71	14.86 \pm 1.56	3.78 \pm 0.21
Solcoseryl	4	400 μ g/ml	82.20 \pm 3.06**	17.96 \pm 0.98	4.61 \pm 0.17**
L-Carnitine	4	1 \times 10 ⁻³ M	32.08 \pm 0.54**	6.65 \pm 0.63**	4.90 \pm 0.40
Glutathion	4	1 \times 10 ⁻³ M	63.39 \pm 3.21*	18.72 \pm 0.75	3.42 \pm 0.28
Taurine	4	1 \times 10 ⁻³ M	52.74 \pm 1.27	13.34 \pm 1.57	4.23 \pm 0.50
Sho-saiko-to	4	500 μ g/ml	52.56 \pm 2.83	23.96 \pm 1.37**	2.22 \pm 0.20**
Saikosaponin a	4	1 \times 10 ⁻³ M	-	68.00 \pm 2.64**	-
kanzo-to	4	120 μ g/ml	60.22 \pm 2.92	15.35 \pm 1.45	3.97 \pm 0.17
Intinko-to	4	500 μ g/ml	80.97 \pm 3.87**	35.04 \pm 1.31**	2.35 \pm 0.19**

* P < 0.05, ** P < 0.01 (vs. Control) mean \pm S.E.

考 察

ミトコンドリアの酸素消費速度とATPの合成速度、ミトコンドリアの膜腔からのプロトンの流入速度は共役しており、ADPの添加による酸素消費速度はATPの産生速度をそのまま反映する。今回の実験ではミトコンドリアの酸素消費量を測定することによりATP産生能に対する各種生体成分の影響を検討した。

今回の実験で得られたミトコンドリアのRCRは約4、ADP/O比は約2でありほぼ正常な機能を有する標本と考えられた。

組織呼吸賦活薬であるソルコセルルの添加によりstate 3での酸素消費速度の亢進およびRCRの増加が認められた。ソルコセルルの呼吸活性増加作用については既に報告されており⁴⁾⁵⁾⁶⁾、今回の実験では同様の結果が得られた。

また、滋養強壮剤に配合されているタウリン、L-カルニチン、肝機能の改善に用いられるグルタチオンなどはミトコンドリアのRCRに有意な影響は及ぼさなかった。

肝障害等に処方される小柴胡湯や茵ちん蒿湯はstate 4の亢進およびRCRの減少がみられミトコンドリアの呼吸活性を抑制する作用が認められた。小柴胡湯については7種の生薬から構成されているものであるため、それらの有効成分と考えられる甘草とサイコサポニンaについても検討した。その結果サイコサポニンaでstate 4の急激な亢進が認められ、小柴胡湯による変化はサイコサポニンaによる影響が大きいと考えられた。

通常生体ではATPをエネルギー源として各種ポンプが機能し細胞内外のイオンの濃度勾配が維持され、細胞分裂や細胞増殖、乳酸からの糖新生や、脂肪合成が行われており、ATP産生を司るミトコンドリアの呼吸活性に対する影響を検討することは薬物の作用機序を考える上でも重要であると考えられる。今回の実験では肝障害に有効とされている小柴胡湯や茵ちん蒿湯等にはむしろ呼吸活性の抑制作用が認められ、少なくともミトコンドリアの呼吸機能からはその有効性を証明できなかった。一般に小柴胡湯の肝障害改善作用は繊維芽細胞増殖抑制作用⁷⁾⁸⁾と、免疫細胞の賦活作用⁹⁾¹⁰⁾が関与することが報告されており、細胞のエネルギー産生系に対する作用よりは免疫系や細胞間の情報伝達機構に対する作用が重要な機序と考えられた。

今回の実験ではソルコセルル以外にミトコンドリア呼吸活性を上昇させる薬物は認められなかったが、障害組織由来のミトコンドリアについては実験を行っておらず肝障害などの病態を考える上では呼吸能の低下したミトコンドリアを用いた実験についても今後の検討課題と考えられる。

参 考 文 献

- 1) Schneider, W. C. et al. : J. Biol. Chem 176 259~266 (1948)
- 2) 山下義昭ら：日薬理誌 100 11~20 (1992)
- 3) 飯泉新吾ら：新実験化学講座，社団法人 日本化学会編，丸善株式会社，昭和53年6月20日、320~323
- 4) Nakahara, M : Arzneimittel-Forsch., 16 (3) 371 (1966)
- 5) 北島政樹ら：Cyto-protection & biology, Vol. 1 27-38 (1983)
- 6) 長町幸雄ら：新薬と臨床，24 (11) 1850 (1975)
- 7) 飯田吉隆ら：診断と治療75 (12) 2985 (1987)
- 8) 沖田 極ら：消化器科，12 (2) 152 (1990)
- 9) H. Ito et al. : Japan. J. Pharmacol., 41 (3) 307 (1986)
- 10) 溝口靖紘ら：漢方医学，13 (3) 83 (1989)

アカメガシワの薬効に関する研究

Study on Pharmacological effect of Malloti Cortex

上川 浩 篠原 達雄
Hiroshi KAMIKAWA Tatsuo SHINOHARA
ダイト株式会社 研究所
Research Laboratory, Daito Co., LTD

結 言

健胃、整腸作用を有する赤芽柏は古くから民間薬として用いられている。赤芽柏の薬理効果については、これまで抗潰瘍作用あるいは酸分泌に対する作用を主として研究されているが、その作用機序等についてはあまり明らかにされていない。また胃粘膜障害の一因として胃酸が考えられる。我々は種々の和漢薬につき、胃酸分泌の最終段階に重要な役割を担っているプロトンポンプ (H^+ , K^+ -ATPase) に対する作用を検討し、その中でアカメガシワエキス及びチョウジ末が比較的強い阻害作用を示す知見を得た。今回、アカメガシワの *in vivo* における酸分泌に対する作用を、代表的なプロトンポンプインヒビターであるランソプラゾールと比較検討するとともに、 H^+ , K^+ -ATPase に対する作用との関係について検討を行った。また、潰瘍の一因とされる *Helicobacter pylori* に対する作用も併せて検討した。

実 験 の 部

1. 試験動物

体重 3 kg 前後の日本白色種家兎及び 6 週齢の Wistar / ST 系雌性ラットを購入 (いずれも日本エスエルシー) し、室温 $24 \pm 1^\circ C$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗、換気オールフレッシュの飼育室で約 1 週間予備飼育した後、体重減少を認めない健康な動物を試験に供した。

2. 薬 物

アカメガシワエキス及びチョウジ末は日本粉末薬品株式会社より購入したものをを用いた。ランソプラゾール及びソファールコンは市販製剤を粉碎して、シメチジンは自社合成品を用いた。またベルゲニンは標準品 (和光純薬) を、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

3. 実験方法

1) H^+ , K^+ -ATPase 阻害作用の検討

H^+ , K^+ -ATPase 活性の測定は既報¹⁾に準じて行った。

酵素液の調製; 家兎の胃を摘出し、胃底部粘膜を剥ぎ取った。粘膜は直ちに $-80^\circ C$ に凍結して保存し、使用時に解凍して酵素液を調製した。ミクロソーム分画の調製は、粘膜に 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモジネートし、 $0^\circ C$ 、 $12,500 \times g$ 、15 分間遠心分離して上清部を分取した。この液に 88 mM 塩化カルシウム溶液を加え、氷冷下にて 5 分間放置後、 $0^\circ C$ 、 $27,000 \times g$ 、15 分間遠心分離した。沈殿物に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてホモジネートし、再度 $0^\circ C$ 、 $27,000 \times g$ 、15 分間遠心分離した。この操作を 2 度行い、沈殿物に同緩衝液を加えて酵素液とした。尚、酵素液は使用時迄 $-80^\circ C$ で保存した。

酵素活性測定法; 酵素活性測定は Reenstra らの方法²⁾に準じて行った。すなわち 10 mM PIPES-Tris 緩衝液 (pH 7.4) に 5 mM $MgSO_4$ 、0.1 mM ウアブイン、10 mM KCl、酵素液及び試験薬物を加えた反応液 475 μL を $37^\circ C$ 、

10分間プレインキュベートした後、100 mM p-NPP (p-nitrophenylphosphate disodium salt) を25 μ L加えて37°C、30分間インキュベートする。その後1N NaOH 500 μ Lを加えて反応を停止させ、410 nmにおける吸光度を測定した。尚、 H^+ , K^+ -ATPase 活性はKCl 添加時の活性からKCl 非添加時の活性を差し引いて求めた。イオノフォアにより刺激される H^+ , K^+ -ATPase 活性に対する影響；前記の反応液にイオノフォアとしてバリノマイシン40 μ gあるいはナイジェリシン1 μ gを加え、 H^+ , K^+ -ATPase 活性を測定し、イオノフォアを添加しない場合の H^+ , K^+ -ATPase 活性に対する作用と比較した。

2) 胃液分泌の測定方法

Shay らの方法³⁾に準じ、ラットをエーテル麻酔下にて開腹し、幽門部を結紮した。その直後に薬物を投与し、3時間後に胃を摘出して内容物を採取した。内容物は遠心分離して上清部を分取し、液量を測定するとともにペプシン活性、胃酸度を測定した。ペプシン活性はRyleの方法⁴⁾に準じ、胃液0.1mLに0.25M HCl 0.125mL及び2.5%ヘモグロビン溶液0.375mLを加えて37°、10分間インキュベートする。その後4%トリクロロ酢酸2.5mLを加えて反応を停止させ、遠心分離(2000 r.p.m.、5min)して上清部を分取する。上清部につき280 nmの吸光度を測定してペプシン活性を求めた。尚、ペプシン活性は吸光度の変化が0.1を0.031 Uとした。また胃酸度は、胃液1 mLにつき0.1 N NaOHを用いて滴定してその酸度を求め、これに胃液量を乗じて酸分泌量とした。

3) *Helicobacter pylori* に対する作用⁵⁾

10%馬無菌脱繊維血を添加したBrucella Ager (10mL/60mm dish) に所定の濃度になるよう被験薬を加える。これにMcFarland No.1の濃度に調整した*Helicobacter pylori* 菌懸濁液10 μ Lを塗布した後、嫌気ジャー中Campypak plusを入れて微好気条件下で37°で3日間培養した。判定は菌の増殖度合いを4段階(一、+、++、+++)で判定した。

4) 統計処理

得られた結果は、平均値±標準誤差もしくは平均値で示した。また、反応曲線から50%抑制濃度(IC₅₀)を算出するにはプロビット法を用いて行った。また、一部の試験において有意差検定を行う際にはStudentのt検定を用いた。

結 果

1. H^+ , K^+ -ATPase 阻害作用

H^+ , K^+ -ATPase に対してアカメガシワ及びチョウジは用量依存的な阻害作用を示し、そのIC₅₀はそれぞれ7.6 μ g/mL及び12.2 μ g/mLであった。しかしベルゲニンには全く作用は認められなかった。またイオノフォア刺激による H^+ , K^+ -ATPase に対しては両生薬ともほとんど影響を及ぼさなかった。

一方、 H^+ , K^+ -ATPase 阻害薬ランソプラゾールは強力な阻害作用を示し、そのIC₅₀は2.0 μ g/mLであり、イオノフォア刺激による H^+ , K^+ -ATPase に対して無処置のものと比較して強い阻害作用を示した。尚、ヒスタミンH₂阻害薬であるシメチジンにはなんら作用は見られなかった。

2. 酸分泌に対する作用

胃液量に対しては、アカメガシワは十二指腸内投与ではなんら影響を及ぼさず、経口投与ではむしろ胃液量の増加が認められた。一方、静脈内投与では有意な抑制作用が認められた。チョウジは十二指腸内投与及び経口投与では作用はみられなかった。なおランソプラゾールは十二指腸内投与で強い抑制作用を示した (Fig.1)。

胃酸度に対しては、アカメガシワは十二指腸内投与では影響を及ぼさず、経口投与で若干の胃液量の低下が認められた。また静脈内投与では有意な抑制作用が認められた。チョウジは十二指腸内投与及び経口投与では作用はみられなかった。ランソプラゾールには十二指腸内投与で強い抑制作用が認められた (Fig.2)。

ペプシン活性に対しては、十二指腸内投与ではアカメガシワ、チョウジさらにランソプラゾールにも作用は認められなかった。これに対し、経口投与ではアカメガシワ及びチョウジとも用量依存的な抑制作用が認められた。一

方、静脈内投与ではアカメガシワに有意な抑制作用はみられなかった (Fig.3)。

Fig.1 胃液分泌に対する作用

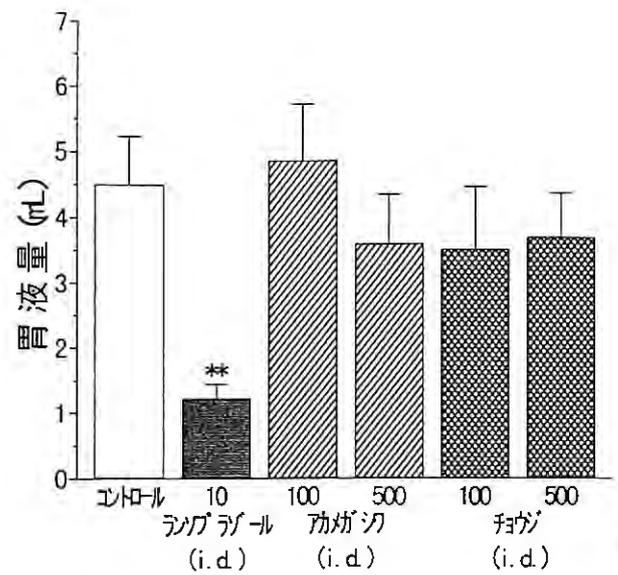
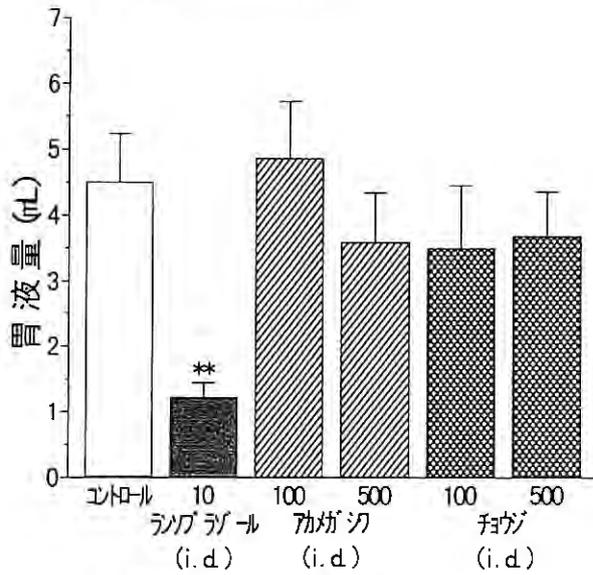


Fig.2 胃酸分泌に対する作用

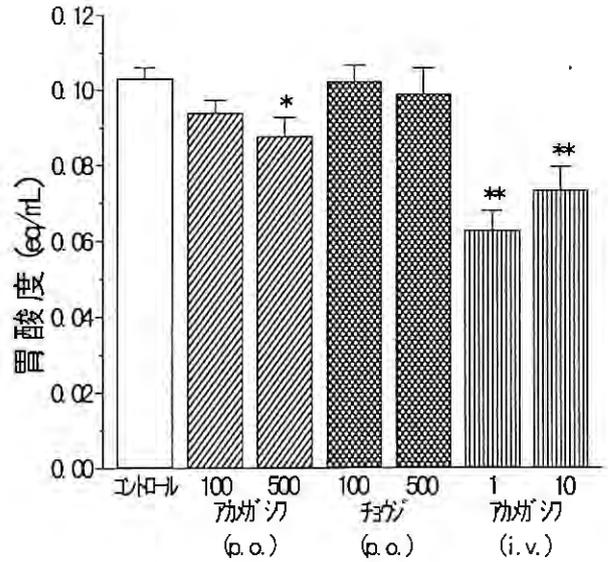
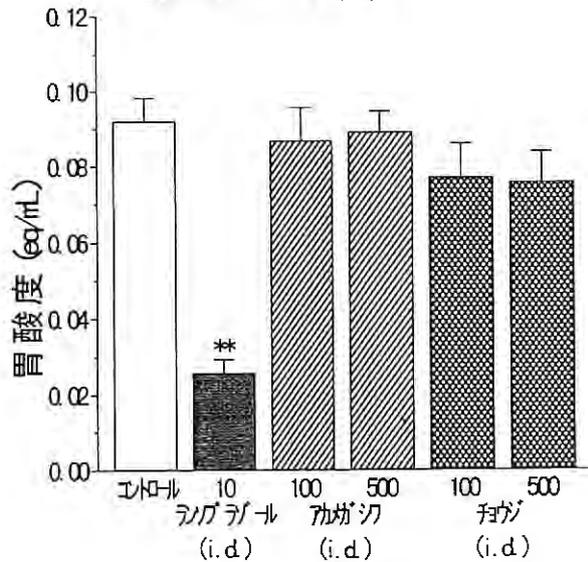
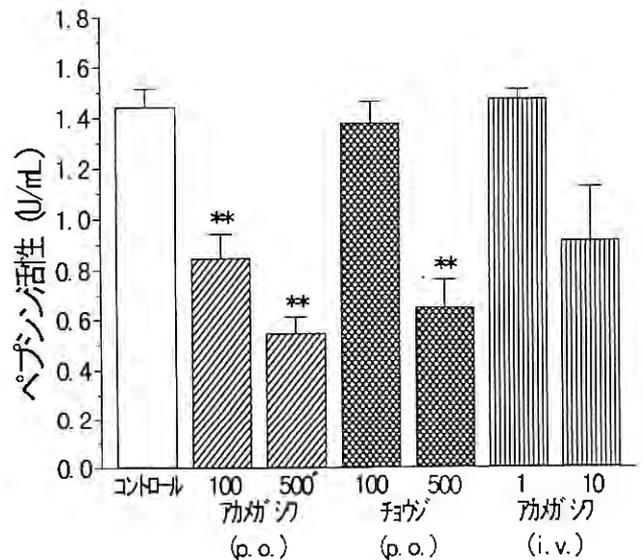
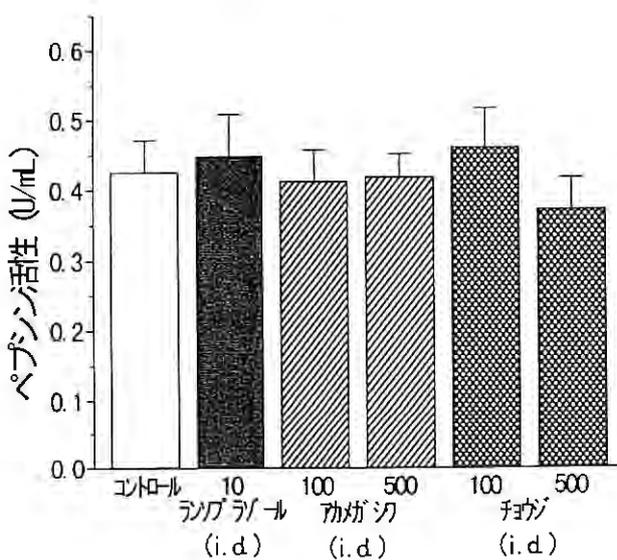


Fig.3 ペプシン活性に対する作用



3. *Helicobacter pylori* に対する作用

Helicobacter pylori の増殖に対して、アカメガシワ及びチョウジとも影響を及ぼさなかった。一方、対照として用いたソファルコンは強い増殖阻害作用を示した。また *Helicobacter pylori* の産成するウレアーゼに対してはアカメガシワ及びチョウジとも抑制傾向を示した（結果は省略）。

考 察

アカメガシワには H^+ , K^+ -ATPase 活性に対する強い阻害作用が認められた。しかし、バリノマイシンやナイジェリシンといったイオノフォアにより刺激される H^+ , K^+ -ATPase 活性に対して、無処置のものと比較してあまり影響を及ぼさなかったことから、これらイオノフォア刺激による H^+ , K^+ -ATPase 活性を強く阻害するランソプラゾールとは、明らかに作用態度が異なるものであった。またアカメガシワの代表的な成分であるベルゲニンには、 H^+ , K^+ -ATPase 活性阻害作用が全くみられなかったことから、アカメガシワの H^+ , K^+ -ATPase 活性阻害作用には、タンニン等のベルゲニン以外の成分が大きく関与しているものと考えられる。

アカメガシワの *in vivo* における酸分泌に対する作用を、代表的なプロトンポンプインヒビターであるランソプラゾールと比較検討したところ、ランソプラゾールが十二指腸内投与で胃液量及び酸度については強い抑制作用を示し、ペプシン活性に対しては作用を示さなかったのに対し、アカメガシワは十二指腸内投与では胃液量、酸度及びペプシン活性に対してなんら作用が認められなかった。経口投与では胃液量をやや増加させたが、酸分泌量には作用はみられず、ペプシン活性を強く抑制した。しかし静脈内投与では胃液量及び酸度ともに有意に抑制し、ペプシン活性に対しては影響を及ぼさなかった。これらのことから、アカメガシワには H^+ , K^+ -ATPase 阻害作用を示す成分が存在し、この作用に基づいて酸分泌阻害作用を示す可能性が示唆されるが、その作用の発現については吸収、代謝が関与すると思われる。またアカメガシワには胃液分泌を亢進し、ペプシン活性を阻害する成分も存在する可能性が示唆された。

文 献

- 1) 篠原達雄, 上川浩; 和漢薬の薬効評価—活性酸素及び H^+ , K^+ -ATPase に対する作用—家庭薬研究16 33-38(1997)
- 2) Reenstra, W. W. and Forte, J. G.; Isolation of H^+ , K^+ -ATPase - containing membranes from the gastric cell, *Methods in Enzymology* .192,151-165(1990)
- 3) Shay, H., Komarov, S. A., Fels, S. S., Maranze, D., Gruentein, M. and Sipler, M.; A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat., *Gastroenterology* 5,43-31 (1945)
- 4) Ryle, A. P.; The porcine pepsins and pepsinogens., *Methods in Enzymology* .19,316-336(1970)
- 5) Imamura, L., Tsuchiya, M., Inada, A., Nakanishi, T. and Kobashi, K.; Inhibition of urease and growth of *Helicobacter pylori* by herb extracts., *Journal of Traditional Medicines* .12,129-136(1995)

各種滋養強壯剤の抗疲労作用

Anti-fatigue Actions of Some Nutritive and Tonic Crude Drugs in Mice

富山県薬事研究会 生物部会
Division of Pharmacology,
Toyama Pharmaceutical Research Association

高尾 直	リードケミカル株式会社
Sunao TAKAO	Lead Chemical Co.,Ltd.
上川 浩	ダイト株式会社
Hiroshi KAMIKAWA	Daito Co.,Ltd.
沢田 聡美	株式会社 廣貫堂
Satomi SAWADA	Kokando Co.,Ltd.
田保 慎一郎	株式会社 廣貫堂
Shin-ichiro TABO	Kokando Co.,Ltd.
永井 喜美	株式会社 延寿堂
Kimi NAGAI	Enjudo Co.,Ltd.
浅水 敬子	明生薬品工業株式会社
Keiko ASAMIZU	Meisei Pharmaceutical Co.,Ltd.
松原 利行	富山県薬事研究所
Toshiyuki MATSUBARA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

和漢薬および配置薬などの中には効能のなかに滋養・強壯と記載されているものが少なくない。これらの薬効については人の主観に頼ることが多く、科学的な評価とはほど遠いと言わざるを得ない。しかし、実験動物を用いた行動薬理学的評価も一部実施されており、只野らの生薬含有ドリンク剤の強壯効果¹⁾、篠原らの淫羊藿配合蟾酥製剤の抗疲労効果²⁾、松田らのマムシと紅参の抗疲労作用³⁾などの幾つかの報告がある。今回、我々はこれらの報告も参考にしながら、実験動物を用いて滋養・強壯作用のうち疲労回復または疲労予防作用を客観的に評価できる松原らの方法⁴⁾を用い、漢方薬の代表的補気剤である十全大補湯、補中益気湯、人参養榮湯およびドリンク剤など各種薬物の有効性について検討した。

実験材料および方法

1. 被験薬物

十全大補湯エキス、補中益気湯エキス、人参養榮湯エキス、人参末、人参熱水抽出エキス（人参エキス）、六神丸、無水カフェイン、滋養強壯ドリンク剤（T社）。

2. 漢方薬エキスの調製

十全大補湯（1日量：オウギ 3g、ケイヒ 3g、ジュクジオウ 3g、シャクヤク 3g、センキュウ 3g、ソウジュツ 3g、トウキ 3g、ニンジン 3g、ブクリョウ 3g、カンゾウ 1.5g）、補中益気湯（1

日量：オウギ 4g, ビャクジュツ 4g, ニンジン 4g, トウキ 4g, サイコ 2g, タイソウ 2g, チンピ 2g, カンゾウ 1.5g, ショウマ 2g, ショウキョウ 1g), 人參養榮湯 (1日量：ジオウ 4g, トウキ 4g, ビャクジュツ 4g, ブクリョウ 4g, ニンジン 3g, ケイヒ 2.5g, オンジ 2g, シャクヤク 2g, チンピ 2g, オウギ 2g, カンゾウ 1g, ゴミシ 1g) の3種類の漢方処方それぞれについて1日量に約300mLの蒸留水を加え、市販の漢方煎じ器 (栃本天海堂) で40分間煎じたのち、ガーゼ3枚を用いて熱時濾過しその濾液を凍結乾燥しエキスを得た。また、人參については、50gを約500mL蒸留水を加え、上記同様の方法により乾燥エキスを得た。収率は、十全大補湯エキス 25%, 補中益気湯エキス 26%, 人參養榮湯エキス 27%, 人參エキス27%であった。

3. 使用動物

ddY系雄性マウスを三協ラボサービス㈱より購入して試験に用いた。なお、試験に用いたときの体重は25~35gであった。

4. 強制水泳限界時間を指標とした抗疲労作用

十全大補湯エキス, 補中益気湯エキスまたは人參養榮湯エキスを粉末飼料に10%の割合で混合し、マウスに2日間または4日間自由に摂食させた。投与期間終了後、マウスの陰囊部に下式から得られた重量の鉛製おもりをセルフィンにより装着し、洗剤 (0.01% 塩化ベンゼトニウム) に約10秒間浸すことにより体表面より空気を充分除去した後、尾が底に届かないまで水を満たした透明バケツ (水温: 25±1°C) にいれて強制水泳を課し、5秒間呼吸ができない状態に陥るまでの時間を測定した。

$$\text{重量負荷 (g)} = [\text{体重}] \times 0.05 + 0.1$$

5. トレッドミル運動負荷時の自発運動量を指標とした疲労回復作用

(1) 被験体の単回投与：Treadmill Simplex II (Columbus, USA) を用い、ベルト速度16m/分、傾斜度14°の条件でマウスに30分間運動負荷を課した直後に、人參エキス, 六神丸または無水カフェインを経口投与した。その15分後にマウスをエコンPCケージに1匹ずつ入れて、東洋産業㈱のSCANET (MV-10) により2分間隔で26分間の自発運動量 (movement-2) を消灯・恒温恒湿条件下 (24±2°C, 55±10%) で測定し、探索行動期間の一部を含む6~16分、および活動安定期の16~26分の自発運動量を求め比較検討した。

(2) 人參末の連続投与：投与に先立ち上記条件のトレッドミル訓練を10分間行い、走行に支障のないマウスを選び、人參末を20%含有する粉末試料を3日間与えた。投与終了後、単回投与と同様に30分間の運動負荷を課した直後から26分間の自発運動量を測定し対照群と比較した。

6. 使用薬物

使用した生薬は池田屋安兵衛商店から購入した。また、六神丸は生物部会でこれまでに種々の薬理作用を検討してきたものを使用した⁵⁾。無水カフェインは和光純薬の試薬を購入して用いた。滋養強壯ドリンク剤は、100mL中にL-アスパラギン酸マグネシウム・カリウム 1000mg, タウリン 500mg, 無水カフェイン 50mg, ニコチン酸アミド 20mg, 硝酸チアミン 2mg, リン酸リボフラビンナトリウム 5mg, 塩酸ピリドキシン 5mgを含有するものを用いた。

実験結果および考察

1. 強制水泳限界時間を指標とした抗疲労作用

上記3種類の漢方薬エキスを10%含有する飼料を自由摂取させ、経時的に水泳限界時間を測定したところ、十全大補湯エキス投与群の2日目および4日目に水泳時間の延長傾向または延長が認められた。一方、他の被験薬投与群では対照群とほとんど差異はなかった (表1)。

2. トレッドミル運動負荷時の自発運動量を指標とした疲労回復作用

トレッドミルによる30分の運動負荷により自発運動量は顕著に減少し、マウスに疲労が顕著にみられた (表2)。

表1 滋養強壯薬のマウス強制水泳限界時間に対する影響

被 験 薬	飼料中濃度	投与期間	動物数	体 重 (g)	強制水泳 限界時間(分)
対 照	0 %	2 日間	8	28.4±1.2	269±160
人参養栄湯エキス	1 0 %		8	28.3±1.3	334±144
十全大補湯エキス	1 0 %		8	28.3±1.2	420±227
補中益気湯エキス	1 0 %		8	28.7±1.4	274±132
対 照	0 %	4 日間	1 1	29.4±1.5	266±166
人参養栄湯エキス	1 0 %		1 1	29.8±1.5	331±101
十全大補湯エキス	1 0 %		1 1	29.4±1.5	423±135*
補中益気湯エキス	1 0 %		1 1	29.8±1.1	332±111

平均値±S D。

*:各投与期間の対照群に対する有意差検定(Student's t-test), P<0.05。

表2 トレッドミル運動負荷のマウス自発運動量に対する影響

処 置	例数	自 発 運 動 量	
		6 ~ 1 6 分	1 6 ~ 2 6 分
対 照	8	2084± 660	1292± 438
30分運動負荷	7	922± 521**	269± 499***

平均値±S D。

** , *** : 対照に対する有意差検定、** , P<0.01; *** , P<0.001。

これらの動物に500, 1,000または2,000mg/kgの人参エキスおよび25mg/kgの六神丸を経口投与しても自発運動量減少は回復せず対照群とほとんど差異はみられなかった(表3)。一方、無水カフェインおよびドリンク剤投与群では顕著に自発運動量が増加した(表3, 4)。

さらに、20%人参末を含有する飼料を3日間投与した動物でも、探索行動後の自発運動量が対照群に比し顕著に多く、抗疲労効果が認められた(表5)。

表3 トレッドミル運動負荷のマウス自発運動量減少に対する各種薬剤の影響

被験体	用量 (mg/kg, po)	例数	自発運動量	
			6~16分	16~26分
溶媒	—	13	879±460	274±287
人參エキス	500	8	1126±563	414±256
人參エキス	1,000	11	930±486	576±439
人參エキス	2,000	10	1029±479	314±386
六神丸	25	4	1232±624	605±527
無水カフェイン	100	4	2844±765 ^{***}	1852±646 ^{***}

平均値±S D。

^{**}, ^{***}: 運動負荷をした溶媒対照に対する有意差検定(Student's t-test)、

^{*}, P<0.05, ^{**}, P<0.01, ^{***}, P<0.001。

表4 トレッドミル運動負荷のマウス自発運動量減少に対するドリンク剤の影響

被験体	用量	例数	自発運動量	
			6~16分	16~26分
溶媒(蒸留水)	20ml/kg	7	886±788	120±114
ドリンク剤(T社)	20ml/kg	10	3036±1058 ^{***}	2059±829 ^{***}

平均値±S D。

^{***}: 溶媒対照に対する有意差検定(Student's t-test)、P<0.001。

表5 トレッドミル運動負荷によるマウス自発運動量減少に対する人參末の3日間混餌投与の影響

検体	飼料中 濃度(%)	用量 (g/kg)	体重 (g)	例数	自発運動量	
					6~16分	16~26分
対照	—	0	34.8±2.1	19	1402±598	471±284
人參末	20	37.3	35.5±2.3	18	1180±952	935±584 ^{**}

平均値±S D。

^{**}: 対照に対する有意差検定, P<0.01。

以上が今回の実験結果であるが、滋養強壯剤が肉体疲労などに用いられていることから、その薬効評価の一つとして急性的な疲労に対する行動薬理学的試験に置き換えてもよいと思われるが、ここで疲労全体について若干考えてみたい。疲労とは、身体的あるいは精神的作業を連続して行うとき、倦怠感、不快感、脱力感などを感じ（自覚的疲労）、作業能力が量的または質的に低下し（他覚的疲労）、生理的機能の低下を示すことをいうが、これらの現象を動物実験で発現させ薬効評価を行うために動物に負荷をかけて疲労度を数値化し、薬物による疲労回復もしくは疲労予防作用を数字の増減で評価することが可能となれば種々の薬剤を比較しその特徴なども明らかにできる。今回の実験では、水泳限界時間および運動負荷時の自発運動量を指標として評価したが、この種の評価法には幾つかの報告があり、只野らの生薬含有ドリンク剤の抗疲労効果についての報告では、強制水泳時の不動時間を指標に疲労回復効果および疲労予防効果を評価している¹⁾。我々もこの方法を検討したが、水中の不動が疲労状態を反映していると解釈することに若干疑問をおぼえた。不動という点では今回用いたトレッドミル運動負荷で走行時間が40分を越えるくらいには電撃刺激グリッド上で動かなくなることが観察され、この状態も肉体疲労の一つの指標となりそうであり今後検討したいと思う。一方、只野らの報告および今回の我々の結果でもみられたことは、カフェインが抗疲労作用があることとなる結果が得られ、中枢興奮作用が抗疲労作用といえるかどうか今後の課題といえよう。さらに疲労には肉体疲労以外に精神疲労もある。これはヒトの精神的な面が大きく関与することからこの疲労回復作用の試験方法はさらに難しいものと思われる。例えばストレス性の胃潰瘍なども一種の精神疲労の発現かもしれない。そうなれば試験方法も多岐に亘らざるを得ず、それぞれの疲労を十分分析し最も適したモデルを用いて薬効評価をする必要があると考えられ今後の課題である。

結 論

滋養強壯薬の行動薬理学的評価を目的として、強制水泳およびトレッドミル運動負荷をマウスに与え、各種検体の抗疲労効果を水泳時間の延長および自発運動量の減少抑制を指標に調べたところ、漢方薬の代表的補気剤の一つである十全大補湯エキスに強制水泳時間の延長効果、さらに無水カフェインを含有するドリンク剤の単回投与および人参末の3日間投与により運動負荷による自発運動量減少の抑制がみられ、疲労予防または疲労回復効果が認められた。

文 献

- 1) 只野 武, 相沢智樹, 浅尾太宏, 穂積雅人, 木皿憲佐: 滋養強壯ドリンク剤の抗疲労効果に関する行動薬理学的研究, 日薬理誌, 100, 423-431 (1992)
- 2) 篠原達雄, 上川 浩, 萩田善一: 淫羊藿配合蟾酥製剤の抗疲労効果, 和漢医薬学雑誌, 13, 260-267 (1996)
- 3) 松田秀秋, 森浦俊次, 寒川慶一, 久保道徳: 生薬・マムシと紅参のラット強制水泳負荷試験における抗疲労作用, 和漢医薬学雑誌, 13, 100-103 (1996)
- 4) 松原利行, 稲垣有香: 抗疲労効果の行動薬理学的評価法の検討, 富山県薬事研究所年報, 24, 29-33 (1997)
- 5) 上川 浩, 篠原達雄, 山本隆二, 寺崎正之, 森田次郎, 松原利行: 六神丸の強心作用とその評価法に関する研究 —ラット摘出心房筋に対する作用—, 家庭薬研究, 9, 44-51 (1990)