

HPLCにおける六神丸のブフォステロイド (第二報)

-市販製剤のブフォステロイドの定量-

Analysis of Bufosteroids in Rokusingan by High Performance Liquid Chromatography
- Quantitative analysis of Bufosteroids in drugs on market -

富山県薬事研究会分析部会 - センソ配合製剤の分析法バリデーション分科会 -

Division of Analytical Chemistry
Toyama Pharmaceutical Research Association

俣野 豊 Yutaka Matano	カネボウ株式会社 Kanebo, Ltd.
荒木 安子 Yasuko Araki	カネボウ株式会社 Kanebo, Ltd.
永井 喜美 Kimi Nagai	株式会社延寿堂 Enjudo Co., Ltd.
宮崎 由夏 Yuka Miyazaki	株式会社廣貫堂 Kokando Co., Ltd.
市井 満美子 Mamiko Ichii	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
松平 薫 Kaoru Matsuhira	大協薬品工業株式会社 Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
松田 和歌子 Wakako Matsuda	第一薬品株式会社 Daiichi Medicine Co., Ltd.
炭谷 七恵 Nanae Sumitani	明生薬品工業株式会社 Meisei Pharmaceutical Co., Ltd.
横田 洋一 Yoichi Yokota	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

本研究会では、六神丸等のセンソ配合製剤の分析法を確立することを最終目的として、種々の検討を行っており、これまでに、HPLCにおいて六神丸の構成生薬であるジンコウの成分がブフォステロイドの定量に影響を与えることを明らかにした¹⁾。そこで、本年度は、ジンコウ成分とセンソのブフォステロイド(プファリン、シノプファギン及びレジブフォゲニン)との分離について検討を行い、六神丸中のブフォステロイドの新たな分析法について検討し、市販センソ配合製剤への応用についても考察した。

実 験

1. モデル製剤の定量

(1) 試料

(株)延寿堂より入手した各生薬を用いてモデル製剤を作成した(表1)。

(2) 標準品

和光純薬工業(株)製 生薬試験用ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン標準品

(3) 検量線

ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンそれぞれ約20mgを精密に量り、アセトニトリルを加えて溶かし、正確に100mLとし、標準原液とした。標準原液1、2、2.5、4、5mLを正確にとり、それぞれ薄めたアセトニトリル(1→2)を加えて正確に50mLとし、検量線用試料溶液とした。

(4) 抽出条件の検討

モデル製剤約192mgに、抽出溶媒として、それぞれ薄めたメタノール(3→10)、(1→2)、(7→10)、薄めたアセトニトリル(3→10)、(1→2)、(7→10)及び移動相を30mL加えて振とう抽出し、正確に50mLとし、日局センソの成分含量測定法におけるメタノール還流抽出法と比較した。また、抽出時間を15、30、60分とし、遠心分離した後、上澄液をろ過して試料溶液とした。それぞれ10 μ LをHPLCに注入し、ブフォステロイド各成分のピーク面積を比較した。

(5) 添加回収

ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンそれぞれ約20mgを精密に量り、アセトニトリルを加えて正確に100mLとし、標準原液とした。混合試料約172mgを精密に量り、ブファリン及びレジブフォゲニン標準原液は1、2、2.5、4、5mL、シノブファギン標準原液は2、4、5、8、10mLをそれぞれ加え、薄めたアセトニトリル(1→2)を加えた後、15分間振り混ぜ、薄めたアセトニトリル(1→2)で正確に50mLとし、添加回収用試料溶液とした。

(6) 試料調製

混合試料約172mg及びセンソ約20mgを精密に量り、薄めたアセトニトリル(1→2)30mLを加えて15分間振り混ぜ、薄めたアセトニトリル(1→2)を加えて正確に50mLとし、遠心分離した後、上澄液をろ過して試料溶液とした。別にブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンそれぞれ約20mgを精密に量り、アセトニトリルを加えて正確に100mLとし、各標準原液とした。この液をそれぞれ2.5mL、5mL、2.5mLを正確にとり、薄めたアセトニトリル(1→2)を加えてそれぞれ正確に50mLとし、標準溶液とした。

表1 モデル製剤の処方
(mg)

センソ	20	
ジャコウ	20	↑
ニンジン	20	混
ジンコウ	20	
ユウタン	20	合
ゴオウ	20	
サリチル酸	10	試
寒梅粉	20	
米の粉	40	料
薬用炭	2	↓
計	192	172

(7) HPLC条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：300nm）

カラム：TSK-gel ODS-120A 4.6mm I.D.×250mm

カラム温度：30℃付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル／酢酸（100）混液（10：10：1）

流量：1.0mL/min

注入量：10μL

2. 市販のセンソ配合剤の分析

(1) 試料

表2 市販センソ配合剤11種（A～K）を入手し、実験に用いた。

製品	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1粒平均質量(mg)	14.7	5.15	5.09	5.95	5.83	4.79	5.11	13.5	4.81	7.19	8.70
1日最大服用量(粒)	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1日量中センソ質量(mg)	3.3	3.0	3.5	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0	5.0	3.0	5.0

(2) 標準品

和光純薬工業(株)製 生薬試験用ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン標準品

(3) 試料調製

市販のセンソ配合剤20粒をとり、その質量を精密に量り、1粒の平均質量を算出した後、センソ約20mgに相当する粒数をとり、その質量を精密に量り、薄めたアセトニトリル（1→2）30mLを加えて15分間超音波照射した後、15分間振り混ぜ、薄めたアセトニトリル（1→2）を加えて正確に50mLとし、遠心分離した後、上澄液をろ過して試料溶液とした。別にブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン約20mgをそれぞれ精密に量り、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に100mLとし、各標準原液とした。この液をそれぞれ2.5mL、5mL、2.5mLを正確にとり、薄めたアセトニトリル（1→2）を加えてそれぞれ正確に50mLとし、標準溶液とした。

(4) HPLC条件

1. モデル製剤の定量 (7) HPLC条件に同じ

結果及び考察

1. モデル製剤の定量

(1) 特異性

図1に示したように、各構成生薬との分離挙動について検討した。HPLC条件のうち、カラム温度30℃及び移動相に水／アセトニトリル／酢酸（100）混液（10：10：1）の条件において、各生薬の妨害は認められず、また、ジンコウとの分離も良好であった。

また、図2にはモデル製剤及びセンソブランクとの特異性について検討した結果を示した。

図2より明らかなように、本分析条件において、他の構成成分は、ブフォステロイドの分析には影響がないことが認められた。

図1 各構成生葉のクロマトグラム

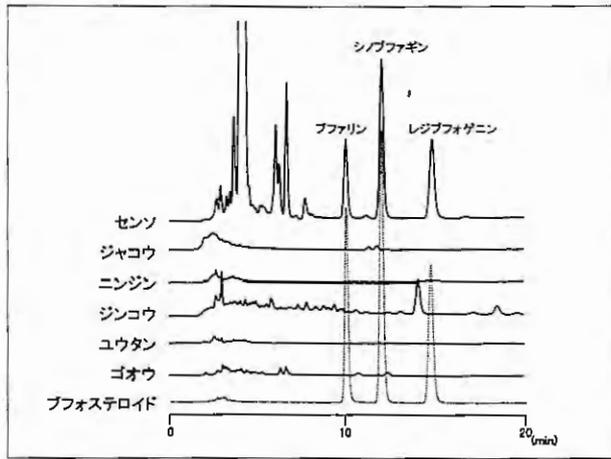
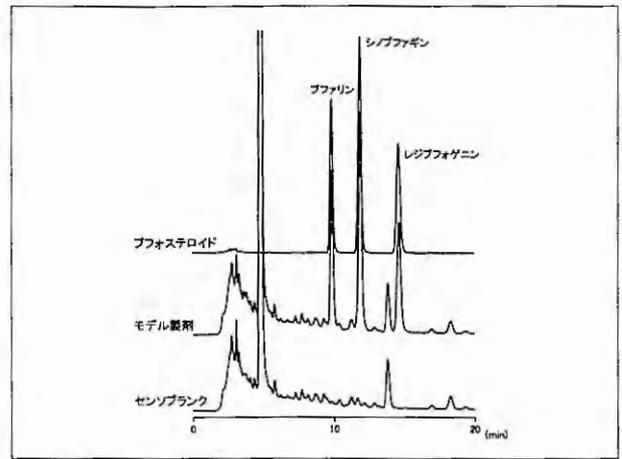


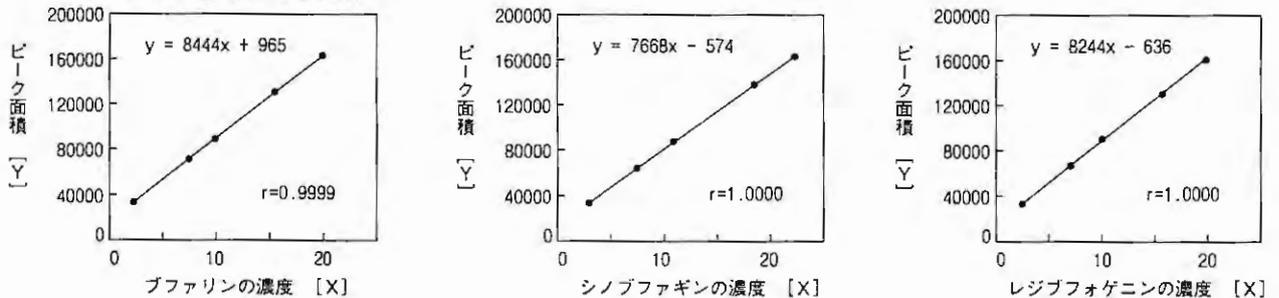
図2 モデル製剤及びセンソブランクのクロマトグラム



(2) 検量線

図3に示したように、本試験条件ではブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンは濃度 $4 \mu\text{g/mL} \sim 20 \mu\text{g/mL}$ の範囲で、濃度(X)とピーク面積(Y)にはほぼ原点を通る直線性を示すことを確認した。

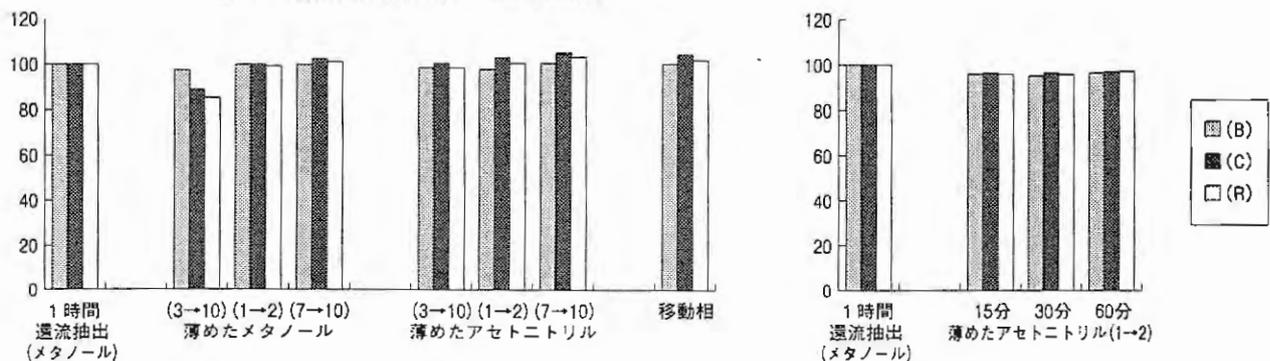
図3 各成分の検量線



(3) 抽出条件の検討

図4に示したように、日局センソの成分含量測定法に記載の加熱還流抽出(メタノール、1時間)で得られたピーク面積を100として、各抽出溶媒及び各抽出時間での抽出効率を比較した。その結果、薄めたメタノール(1→2)、(7→10)、薄めたアセトニトリル(3→10)、(1→2)、(7→10)及び移動相を用いたとき、加熱還流抽出とほぼ同様の値を示し、このうち汎用性があり、移動相に近い薄めたアセトニトリル(1→2)を用いて抽出時間を検討したところ、15~60分とも差が認められなかったことから、抽出時間は15分振とう抽出とした。

図4 抽出溶媒及び抽出時間の検討



(4) 添加回収

混合試料を用いて2社間で添加回収実験を行った結果、低濃度では若干妨害がみられたが、それ以外ではいずれの成分、濃度においてもほぼ100%の回収率が得られた(表3)。

表3 各濃度における添加回収率(%)

濃度(μg/mL)	ブファリン(B)	シノブファギン(C)	レジブフォゲニン(R)
3.96(B) 7.06(C) 3.86(R)	110.3 112.2	115.6 116.3	103.6 98.8
7.92(B) 14.1(C) 7.72(R)	105.5 106.9	108.0 108.1	101.5 99.5
9.90(B) 17.7(C) 9.65(R)	102.2 105.4	104.0 107.0	99.5 99.6
15.8(B) 28.3(C) 15.4(R)	100.2 103.0	101.0 104.6	98.9 99.6
19.8(B) 35.3(C) 19.3(R)	102.3 101.2	103.1 102.5	101.6 98.3

(5) モデル製剤の定量

参加各社で六神丸モデル製剤についてブフォステロイドの分析を行った。

各社共、ほぼ同様の定量値を示し、変動係数も4%以下と施設間の再現性も良好であった(表4)。

表4 モデル製剤に用いたセンソ中のブフォステロイド含量(%)

	ブファリン(B)	シノブファギン(C)	レジブフォゲニン(R)	センソ中ブフォステロイド(%)
V社	0.174 (1.68)	0.465 (4.50)	0.242 (2.35)	(8.42)
W社	0.166 (1.62)	0.489 (4.75)	0.227 (2.20)	(8.56)
X社	0.168 (1.63)	0.479 (4.65)	0.249 (2.42)	(8.69)
Y社	0.168 (1.65)	0.468 (4.54)	0.245 (2.38)	(8.55)
Z社	0.174 (1.69)	0.468 (4.54)	0.246 (2.39)	(8.62)
%RSD	2.2	2.1	3.6	1.2

1.66(B)
4.31(C)
2.30(R)
8.28*

()内はセンソ中含量に換算した値

*モデル製剤に用いたセンソ中のブフォステロイド含量(%)

2. 市販センソ配合製剤中のブフォステロイドの定量

市販のセンソ配合製剤11種につき参加各社で測定した結果を表5に、その代表的なクロマトグラムを図5に示した。いずれの試料もブフォステロイドのピーク形状は良好で、ジンコウ由来のピークとの分離も良好で、同一製剤では各社ともほぼ同様の値を示した。さらに、製剤中の含量を、使用センソ中の含量に換算した結果、6~13%とセンソの品質にはバラツキが認められた。

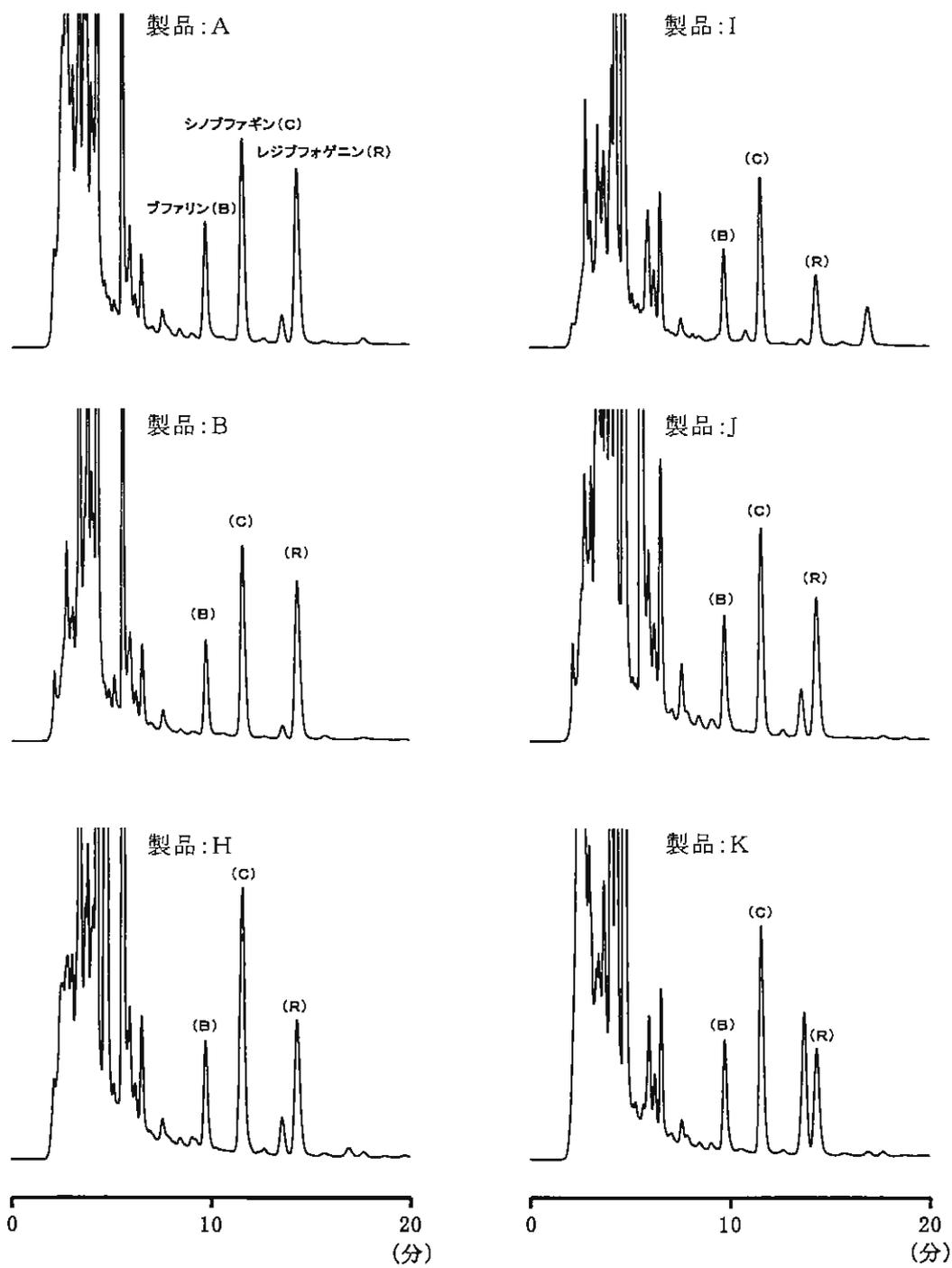
表5 市販センソ配合製剤中のブフォステロイド（1日量）の含量

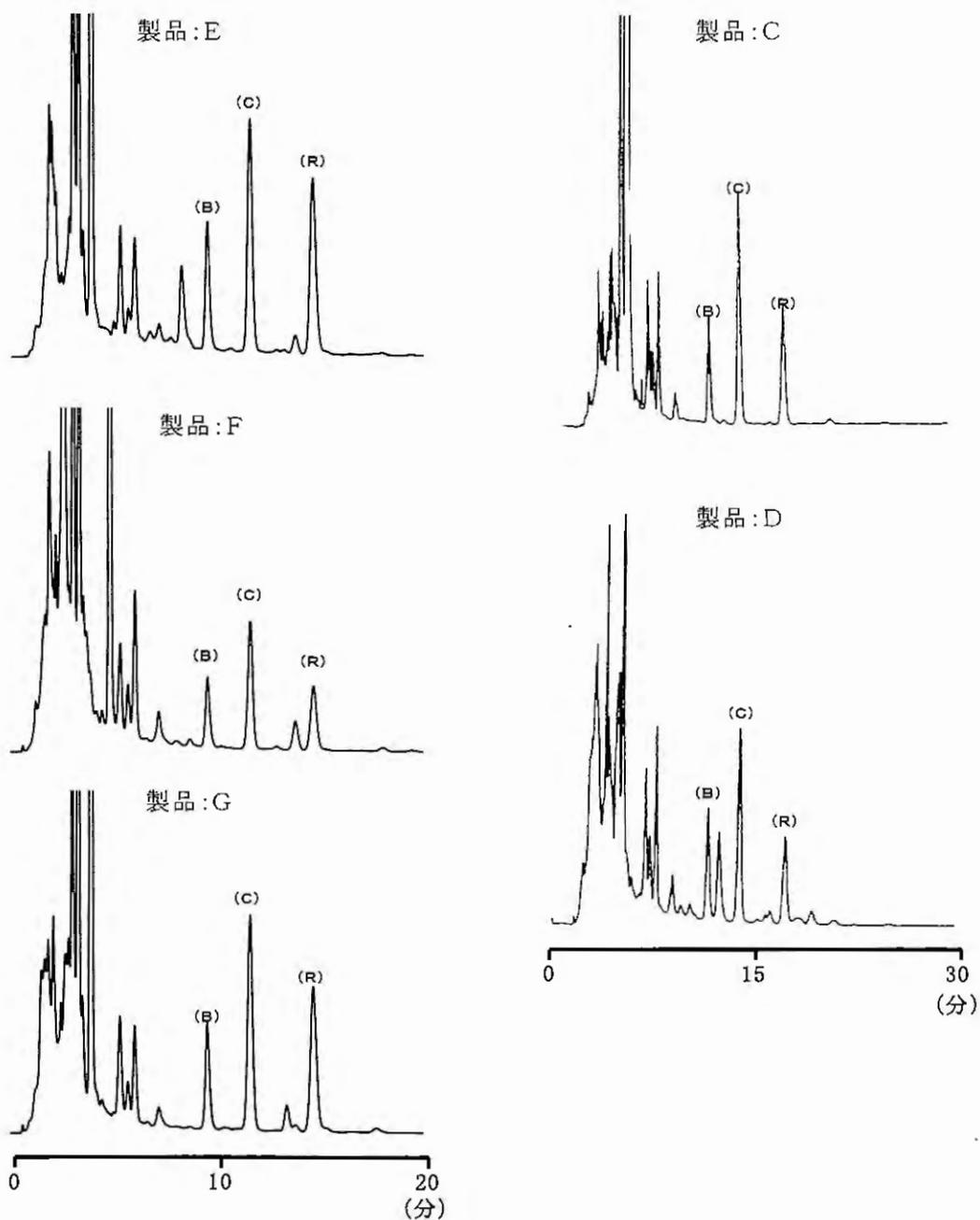
(μg , n=3, 右側は平均値)

製 品	ブファリン(B)		シノブファギン(C)		レジブフォゲニン(R)		センソ中ブフォステロイド(%)*	
A	52.9	57.0	127.7	129.1	122.8	121.3	9.19	9.31
	60.2		127.2		119.0		9.28	
	57.9		132.3		122.0		9.46	
B	38.0	38.5	102.9	103.4	91.9	92.2	7.76	7.81
	37.0		104.0		92.0		7.77	
	40.6		103.5		92.9		7.90	
C	59.3	60.3	166.4	165.2	98.5	97.3	9.26	9.22
	61.3		164.9		96.2		9.22	
	60.3		164.4		97.1		9.20	
D	60.4	70.7	165.9	163.9	95.8	93.8	8.05	8.21
	71.7		163.1		85.2		8.00	
	80.0		162.7		100.4		8.58	
E	91.8	95.8	220.8	226.6	186.9	191.9	12.5	12.9
	102.4		227.8		195.1		13.1	
	93.2		231.2		193.8		13.0	
F	52.0	53.2	121.2	122.5	69.8	70.8	6.08	6.16
	52.8		121.7		71.2		6.14	
	54.9		124.6		71.5		6.27	
G	76.0	77.2	206.0	207.7	157.2	157.7	11.0	11.1
	76.6		207.6		157.3		11.0	
	79.1		209.6		158.6		11.2	
H	78.0	74.5	278.5	270.8	145.8	142.0	10.0	9.75
	72.9		257.7		137.2		9.36	
	72.5		276.3		143.0		9.84	
I	66.0	67.8	155.8	155.9	78.0	75.2	6.00	5.98
	70.8		156.0		73.2		6.00	
	66.5		156.0		74.5		5.94	
J	47.3	47.0	123.9	116.1	62.3	75.0	7.78	7.94
	47.7		112.3		80.4		8.01	
	46.0		112.3		82.4		8.02	
K	81.8	79.9	216.8	216.3	109.0	110.8	8.15	8.14
	79.3		215.1		113.3		8.15	
	78.8		217.0		110.3		8.12	

*センソ中含量に換算した値

図5 各種市販製剤のクロマトグラム





まとめ

今回、センソ指標成分であるブフォステロイドの定量法として、HPLC法を用いた方法を確立することができた。また、市販製剤に応用した場合、他の配合生薬中成分が若干影響することも考えられたが、今回検討したほとんどの製剤で分析が可能であり、汎用性のある分析法と考えられた。

参考文献

- 1) 永井, 俣野, 荒木, 宮崎, 市井, 佐々木, 松平, 松田, 横田: HPLCにおける六神丸のブフォステロイドの分析 (第一報), 家庭薬研究, 第22号, 23-28 (2003)

白朮の抗肥満作用に関する成分及び機序の解析

Analysis of Constituents and Mechanism on Anti-obese Action of Atractylodis
Rhizoma(Byakujutsu)

松原利行 高橋 敏 鈴木英世
Toshiyuki MATSUBARA Satoshi TAKAHASHI Hideyo SUZUKI

富山県薬事研究所
Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

肥満は糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症、脂肪肝などの生活習慣病の危険因子であり、その予防あるいは治療は臨床的に極めて重要である。現在、肥満の治療には、食事・運動・薬物・外科的療法が用いられており、そのなかで、最も臨床的によく用いられているのは、食事療法と運動療法であるが、これらを6-8週間続けても体重減少が認められない場合には食欲抑制剤（例えばmazindol、diethylpropion、sibutramineなど）やリパーゼ阻害剤のオルリスタット併用が試みられる。これらの薬剤のうち、日本で唯一臨床使用が認められているマジンドールは、薬理的には主として視床下部にある食欲中枢に作用し、摂食行動を抑制するといわれ¹⁻⁴⁾、食事療法及び運動療法の補助療法として、高度肥満症に対し有用性が認められている。しかしながら、マジンドールには習慣性があり安全性に問題があることからその使用はBMIが35以上の高度肥満に限定され、更に使用後数週間で薬物耐性が見られるといわれている。また、先般中国から輸入された痩せ薬では4名が死亡し、多くの人が重篤な症状を発症し社会問題にもなった。これらのことから一日も早く有効性が高く安全な抗肥満薬の開発が期待されている。

我々は既に、漢方生薬の白朮がマウスにおいて体重増加を抑制するとともに、1ヶ月間の反復投与毒性試験を実施したところ、安全性においても全く問題が無いことを報告した⁵⁾。そこで更に本報において白朮中の有効成分および体重抑制の機序を検討し若干の知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物

6週令d d Y系雄性マウスを三協ラボサービス(株)より購入し実験に供した。

2. 被験体の調製

1) 白朮粉末混合飼料の調製

白朮粉末は、池田屋安兵衛商店より購入した刻み生薬(LotNo.10325)を粉碎器(Cyclotec 1093 Sample Mill)を用いて粉末とした。これを粉末飼料(日本農産工業、ラボMRストック)に3%及び4.5%の割合で混合し、白朮粉末混合飼料を調製した。

2) 白朮ヘキサンエキスの調製と分画

図1に示すように白朮をヘキサンで抽出し、そのエキスをヘキサン及び酢酸エチルで分画し、A、B、C、D、Eの5つの画分を得た。

3. マウスへの投与と体重、摂餌量、飲水量、胃内容物の測定

白朮粉末混合飼料は、毎日5匹分(40g)ずつガラス製給餌器(夏目製作所)に入れて投与し、1群5匹でエコンPCケージ(日本クレア)を用いて飼育し、ケージは週2回交換した。水は水道水を自由摂取させ、毎日ほぼ同じ時刻(9:30)に、体重、摂餌量及び飲水量を測定した。また、ヘキサンエキス、5種類の画分及びアトラクチロンについては1% Tween80に懸濁して強制経口投与した後同様に飼育し毎日体重等を測定した。さらに、胃内容物の重量を測定する場合は、最終の体重測定をしたのち飼料及び水を取り除き13:10頃より屠殺後胃を摘出し大彎より切開し、胃内容物を取り出し秤量した。

4. 精巣周囲脂肪組織、血漿トリグリセリド及び総コレステロールの測定

白朮投与後1週間目に、エーテル麻酔下眼窩静脈叢より採血し、さらに屠殺後ただちに精巣周囲脂肪組織を摘出し、副辜丸を除いて脂肪組織の重量を測定した。一方、ヘパリン処理した血液は5000rpmで10分間遠心分離(KUBOTA 3615型)して血漿を得たのち、自動血液生化学分析装置の富士ドライケム3000(富士写真フィルム株)を用いて血漿トリグリセリド及び総コレステロールを測定した。

5. 摘出胃底平滑筋収縮に対する影響

1) セロトニン収縮に対するヘキサンエキスの影響

マウスを頸部脱臼により屠殺し、直ちに胃を摘出したのち、胃底部を切り離し大彎に沿って切開しその周辺部を切開面に沿って幅2mmに切り取り縦走筋標本を作製した。標本は混合ガスを通気した37℃のTyrode液の入った30mLのorgan bath中に約0.5gの負荷をかけて懸垂した。収縮張力は、isometric transducer及び張力アンプを介してレコーダーに記録した。 10^{-6} Mセロトニンにより安定した収縮高が得られたのち、各種濃度の白朮ヘキサンエキスを3分間プレインキュベートしたのち、再度 10^{-6} Mセロトニンを適用し前収縮を100%としてその抑制率を求めた。

2) 2日間の白朮混餌投与後のセロトニン収縮

4.5%白朮粉末を含む飼料又は通常粉末飼料を2日間投与したのち前述と同様の方法で胃底平滑筋標本を作製し、収縮刺激剤としてセロトニンを累積的に適用し、白朮投与群と対照群の濃度反応曲線を比較検討した。

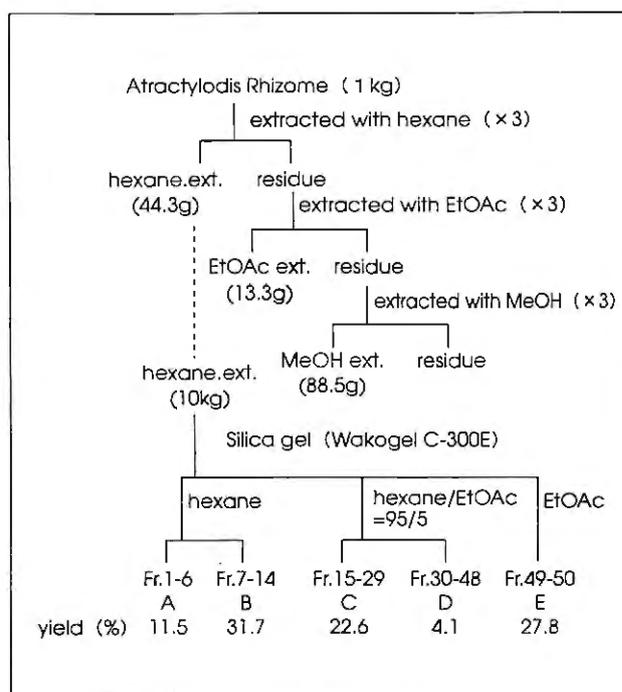


図1 白朮の抽出及び分画

6. 肥満マウスにおける白朮とマジンドールの体重抑制作用の比較

1) 実験動物

I C R系雌性マウス（体重20g前後）を三協ラボサービス(株)より購入し、固形飼料（船橋農場、MM-3）で5日間以上予備飼育したのち実験に供した。

2) Goldthioglucose(G T G)投与肥満マウスの作製

Goldthioglucose(G T G、Sigma社製)を投与容量が10mL/kgとなるように生理食塩水に溶解し、0.6g/kgの用量で腹腔内投与した。さらに20日間固形飼料（船橋農場、MM-3）で予備飼育し、G T G非投与マウスに比べ体重増加の著しい動物を選抜し、G T G投与肥満マウスとして以下の実験に供した。

3) 薬物混合飼料の調製とマウスへの投与

マジンドール混合飼料は、サノレックス™（1錠中マジンドール0.5mgを含有）を乳鉢で粉碎し、マジンドールの含有量が0.01%となるように粉末飼料に混合した。白朮粉末は、刻み生薬(LotNo.160302)を粉碎器で粉末とし、これを3%となるように粉末飼料に混合し、白朮粉末混合飼料とした。薬物混合飼料は、毎日約40gずつガラス製給餌器に入れて投与し、1群4匹でエコNPCケージを用いて上述の方法と同様に飼育し、毎日体重、摂餌量および飲水量を測定した。

4) 旁子宮脂肪組織（Perimetrial adipose tissue、PAT）重量の測定

被検飼料投与後1週間目に頸椎脱臼により屠殺し、開腹後ただちに旁子宮脂肪組織を摘出し秤量した。

7. 使用した薬物

セロトニン・クレアチニン硫酸塩（和光純薬）、メチセルジド・マレイン酸塩(Sigma-Aldrich)を購入するとともに、栄養液は市販試薬を用いて調製した。

8. 統計処理

対照群と投与群の2群間の比較においてはStudentのt検定、その他の実験では一元配置法による分散分析のちDunnnettの多重比較検定を用いて有意差の有無を検討した。

実験結果

1. 体重に対する影響

36g前後のマウスに3%または4.5%の白朮粉末含有飼料を1週間与えたところ、1日目には高用量で2.6g、低用量では1.5gの用量依存的な体重減少が見られ、これらの減少は若干回復したものの7日間維持された（図2）。

2. 摂餌量及び飲水量に対する影響

摂餌量については、対照群は6.2-7.0g/匹/日、3%白朮粉末投与群は4.5-5.9g/匹/日、4.5%白朮粉末投与群は3.6-5.5g/匹/日であり、体重減少に対応して摂餌量の減少が見ら

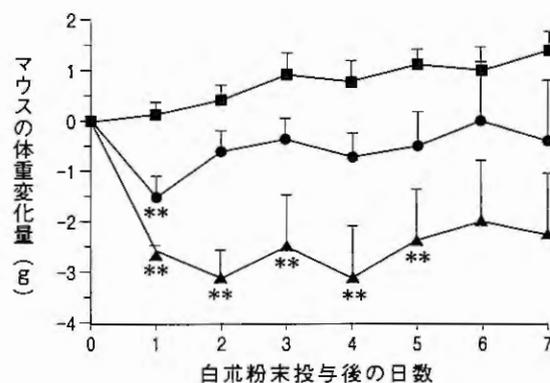


図2 白朮粉末の1週間混餌投与のマウス体重に対する影響

■：対照、●：白朮3%、▲：白朮4.5%
各点は5例の平均値±SE
** P<0.01 vs control (Dunnnett's test)

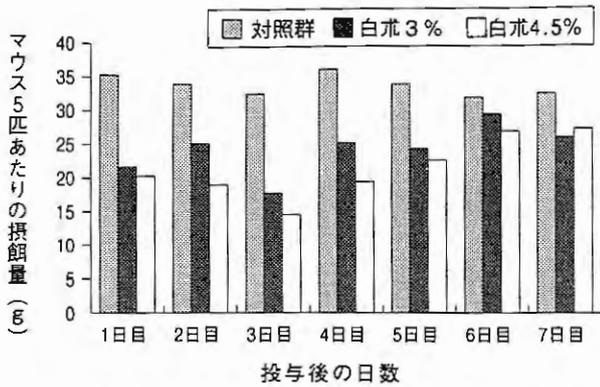


図3 マウスに白朮粉末を1週間混餌投与したときの摂餌量

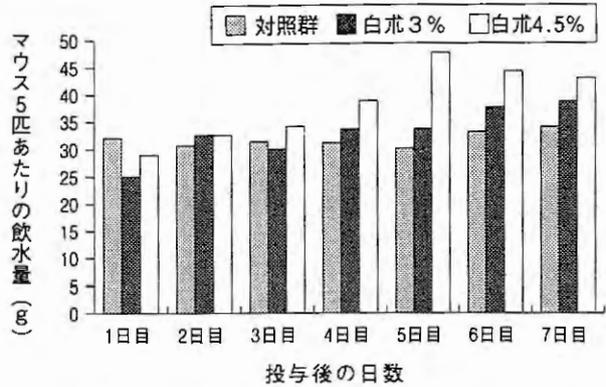


図4 マウスに白朮粉末を1週間混餌投与したときの飲水量

れた(図3)。摂餌量の減少は投与開始後数日間顕著であったが、6日目、7日目には対照群とほとんど差が認められなくなった。しかしながら、体重はこの間も低下したままであり、投与開始後の変化が継続している傾向が見られた。なお、摂餌量より計算した白朮粉末の投与量は高用量群で4.5-6.9g/kg/dayとなった。

飲水量については、摂餌量減少時にも対照群と差が見られなかったが、5日目以降白朮投与群で増加した(図4)。

3. 精巣周囲脂肪組織重量、血漿トリグリセリド及び総コレステロールに対する影響

白朮粉末投与群において用量依存的に精巣周囲脂肪組織重量及び血漿トリグリセリドの減少が見られたが、総コレステロールに対してはほとんど影響がなかった(表1)。

4. 白朮ヘキササンエキスの体重に対する影響

白朮ヘキササンエキスの500mg/kg及び1500mg/kgを1回経口投与した時、白朮粉末投与と同様に体重の減少及び摂餌量の減少がみられた(表2)。なお、これらの変化は2日目には回復もしくは回復傾向を示した。

5. 白朮ヘキササンエキスの5種類の画分の体重に対する影響

白朮ヘキササンエキスを5つに分画し、それぞれについて体重などについて検討したところ、Fr.B投与群において顕著な体重減少がみられた(表3)。

表1 雄性マウスにおける白朮1週間混餌投与の精巣周囲脂肪量および血中脂質に対する影響

群	脂肪量(g)	TG(mg/dl)	CHO(mg/dl)
対照	0.55±0.11	279±126	126±20
白朮3%	0.39±0.12	200±53	157±16
白朮4.5%	0.32±0.13*	119±34*	126±18

Mean value±SD(N=5). *:P<0.05 vs control.

表2 白朮ヘキササンエキスの2日間経口投与の体重及び摂餌量に対する影響

群	用量(mg/kg)	体重変化量(g)		摂餌量
		1日目	2日目	
対照(1%Tween80)		0.26±0.70	0.40±0.31	6.7
Hex-ext	500	-0.82±0.92	0.46±1.22	5.0
Hex-ext	1500	-1.66±1.65*	-1.30±1.09*	3.2

Mean value±SD(N=5). *:P<0.05 vs control.
摂餌量: g/day/mouse

表3 白朮ヘキササンエキスの5種類の画分を2日間経口投与したときのマウスの体重及び摂餌量に対する影響

群	用量(mg/kg)	体重変化量(g)	摂餌量
対照(1%Tween80)		1.02±0.92	6.48
Fr.A	500	1.18±0.30	6.02
Fr.B	150	-1.83±1.45**	4.00
Fr.C	500	0.28±0.94	4.94
Fr.D	500	1.34±0.42	6.60
Fr.E	500	1.52±0.48	6.26

Mean value±SD(N=5). **:P<0.01 vs control.
摂餌量: g/day/mouse、Fr.B: アトラクチロン

6. アトラクチロン及びそれ以外の画分の体重に対する影響

Fr.Bにはアトラクチロンが多く含有されることがわかったので、アトラクチロン又はそれ以外の成分をすべて併せたものをマウスに経口投与して体重などに対する影響を調べた。アトラクチロン50mg/kg及び150mg/kgは用量依存的に体重を減少させるとともに、白朮粉末でみられた食欲抑制も認められた(表4)。

7. 胃内容物重量に対する影響

白朮粉末がマウスにおいて体重減少及び食欲抑制を惹起することが明らかとなったが、その時の剖検により胃内容物の顕著な増加が認められた(表5)。

胃内に食物の貯留が見られたことからその原因を調べるために以下の実験を行った。

8. マウス摘出胃底平滑筋収縮に対する影響

1) セロトニン収縮に対するヘキサノエキスの影響

10^{-6} Mセロトニンによる収縮反応を、ヘキサノエキスの 10^{-5} 、 3×10^{-5} 、 10^{-4} 及び 3×10^{-4} g/mLは濃度依存的に抑制した(図5)。

2) 2日間の白朮混餌投与後のセロトニン収縮

4.5%白朮粉末に2日間曝されたマウス胃底平滑筋について、セロトニンにより惹起される収縮反応を対照群と比較検討したところ、白朮投与群の濃度反応曲線が対照群のものより右にシフトしており、セロトニンにより惹起される収縮が抑制されることが明らかとなった(図6)。

表4 白朮に含有されるアトラクチロンおよび
その他画分のマウス体重に対する影響

被検体	用量 (mg/kg, po)	体重変化量(g)	
		1日目	2日目
対照群	-	0.30±0.25	0.72±0.52
アトラクチロン	50	-0.30±0.49	0.74±0.57
アトラクチロン	150	-0.82±0.56**	-0.34±0.69*
その他画分	1800	0.23±0.38	0.98±0.79

Mean±SD(n=5). *:P<0.05,
**:P<0.01 vs control(Dunnett's test).

表5 白朮粉末の混餌投与2日目における
雄性マウスの体重変化および胃内容物量

群	体重(g)	体重変化量(g)	胃内容物量(g)	摂餌量(g)
対 照	47.3±2.6	0.40±0.72	0.23±0.04	6.2
白朮3%	45.7±3.2	-2.34±1.07**	0.43±0.08	4.6
白朮4.5%	43.6±2.4	-3.54±0.73**	0.74±0.28**	2.1

Mean value±SD(N=5).
**:P<0.01 vs control(Dunnett's test).

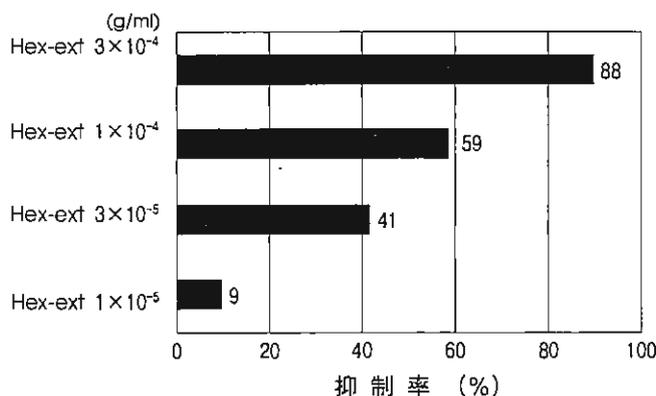


図5 マウス胃底平滑筋における
白朮ヘキサノエキスのセロトニン収縮抑制作用
各カラムは3または4例の平均値を示す

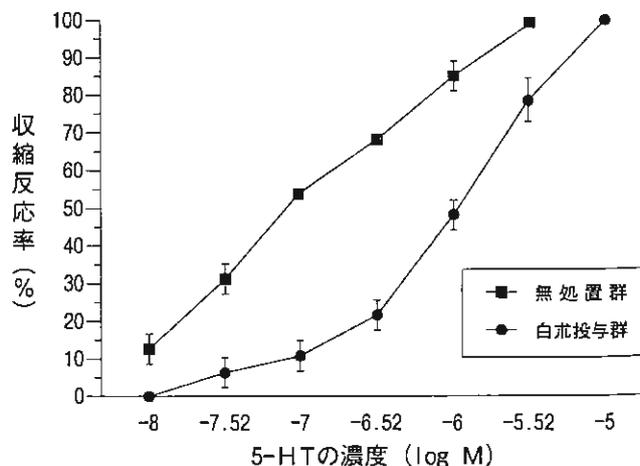


図6 白朮混餌投与後のセロトニンによる胃底平滑筋収縮
各点は3または4例の平均値±SEを示す

9. 抗セロトニン剤メチセルジドの体重に対する影響

メチセルジドを10mg/kgずつ1日2回腹腔内投与したところ、体重の抑制と胃内容物の貯留が認められた。一方、摂餌量についてはほとんど影響がなかった(表6)。

10. 白朮とマジンドールの体重抑制作用の比較

摂餌量については、対照群は6.0-7.8(g/匹/日)、G T G肥満群は7.3-8.8(g/匹/日)、マジンドール投与群は5.8-7.3(g/匹/日)であり、マジンドール投与群はG T G肥満群に比べ少ない傾向を示したが、大きな差は認められなかった。白朮粉末投与群の摂餌量は投与開始時から3日目まで2.5-2.8(g/匹/日)と著しく減少した。マジンドールおよび白朮粉末はともにG T G肥満マウスの体重の減少若しくは増加抑制を惹起したが、それらの作用は白朮粉末投与群の方がより顕著であった(表7)。さらに、白朮粉末投与による血漿トリグリセライドおよび旁子宮脂肪組織重量の減少もしくは減少傾向が認められたが、マジンドール投与群ではこれらの変化はみられなかった。

表6 メチセルジド(10mg/kg、1日2回ip)2日間投与後のマウスの体重および胃内容物量

群	体重変化(g)	胃内容物量(g)
対照	0.80±0.30	0.51±0.10
メチセルジド	0.06±0.53*	0.82±0.31

Mean value±SD(N=5). *:P<0.05 vs control.

表7 Goldthioglucoase肥満マウスにおける白朮およびマジンドール1週間混餌投与の体重および旁子宮脂肪量に対する影響

群	体重(g)	体重変化量(g)	脂肪量(g)
通常(Normal)	30.1±1.1**	1.10±1.02**	0.57±0.17**
対照(Control)	42.9±4.5	6.63±1.20	2.11±0.37
0.01%マジンドール	38.8±2.8	1.75±2.17**	2.02±0.41
3%白朮	36.8±4.6	-0.58±2.34**	1.45±0.59

Mean value±SD(N=4). **:P<0.01 vs control.

用量:マジンドール 15-20mg/kg, 白朮 2-5g/kg

考 察

今回漢方生薬の白朮がマウスの体重を顕著に抑制することに関与する成分について検討した。白朮のヘキサン抽出エキスを5つの画分に分画したところ、白朮の主成分であるアトラクチロンの画分(Fr. B)にその作用が顕著にみられ、その他の画分ではほとんど作用がみられなかった。そこでアトラクチロン単独で調べたところ、ヘキサンエキスでみられた作用が含有率(約13%)から考えられる相当量で同様にみられ、白朮の作用にはアトラクチロンが深く関与していることが明らかとなった。

一方、体重抑制の機序についても今回胃内容物の貯留の観点から若干検討した。胃内に餌が貯留する原因については幾つか考えられるが、まず胃の収縮運動の低下、幽門から十二指腸への送り出しの障害、そして腸管輸送能の低下などが考えられる。胃の収縮機序については副交感神経系の関与がまず考えられるが、白朮のヘキサンエキスはアセチルコリンの収縮をわずかに抑制した程度でそれほど顕著なものではなかった(未発表データ)。胃の収縮にセロトニンが関与していることから、胃底標本におけるセロトニン収縮に対する白朮のヘキサンエキスの作用を調べたところ90%近い抑制率を示した。また、白朮粉末の投与後に摘出した標本でセロトニン収縮が減弱しており、胃の収縮運動に影響している可能性が示唆された。このようにセロトニン収縮抑制が白朮の体重抑制に関与している可能性が考えられたので、抗セロトニン薬として強力な作用を有するメチセルジドを投与したところ、ヘキサンエキスと同様に体重抑制がみられたことから白朮の抗肥満作用に抗セロトニン作用が関与している可能性も考えられる。

今回、抗肥満薬としてはわが国の臨床で唯一使用されているマジンドールと比較したところ、白朮の方が食欲抑制及び体重減少いずれも強力であった。マジンドールの作用機序は、摂食中枢である視床下部腹内側核及び視床下部外側野への直接作用及び神経終末におけるモノアミンの再吸収抑制作用を介した摂食抑制及び消化吸收抑制さらに消費エネルギー促進(グルコース利用、熱産生促進)をもたらすことにより肥満症を是正するとされる。白朮については現在このような作用について検討していないので、これらの観点からも考える必要があるかと思われるがこの点については今後の課題である。

文 献

- 1)大南宏治, 松岡栄子, 高橋 因, 奥田拓道, 清水大三郎: Goldthioglucose(GTG)投与肥満マウスにおよぼすMazindolの作用, 日薬理誌, 83, 123-132 (1984)
- 2)永井克也, 森 勉, 大倉 実, 辻本久敏, 中川八郎: Mazindolの行動及び代謝に対する薬理作用, 日薬理誌, 83, 133-145 (1984)
- 3)藤本一眞, 坂田利家, 荒瀬高一, 筒井浩一郎, 福嶋正孝: Mazindol第三脳室内投与後の食事パターン及び体内化学物質の変動について, 日薬理誌, 83, 425-432 (1984)
- 4)井上修二, 江川正人, 佐藤 忍: 視床下部腹内側核破壊ラットに対するMazindolの作用, 日薬理誌, 83, 441-449 (1984)
- 5)松原利行, 高橋 敏: 白朮の抗肥満作用と経口亜急性毒性試験, 富山県薬事研究所年報, 30, 5-11 (2003)