ラット後肢カラゲニン誘発浮腫に対する *Tinospora crispa* 抽出物の抑制作用 (第一報)

東野 英明*, 鈴木 有朋*, 田中 康雄**, Krisana Pootakham***

近畿大学医学部薬理学教室*, (同)薬学部生薬学教室**,

タイ国チェンマイ大学薬学部生薬学教室***

(1992年5月28日)

要約: ツヅラフジ科のタイ産植物 *Tinospora crispa* (T.c.) に強い抗炎症作用を見出した。タイ国チェンマイ大学で栽培して収穫した T.c. の幹部分の50%メタノール抽出物 (10 mg/kg, p.o.) は, 1%カラゲニン 0.1 ml のラット足蹠への皮下注射によって生ずる4時間後の浮腫を38%抑制した。50%メタノール抽出物より再分画した n-ブタノール易溶性画分は, 他の分画の水易溶性画分やエチルエーテル易溶性画分より抗浮腫作用は強く, 経口投与で用量依存性の浮腫形成抑制作用を示した (1 mg/kg:21%, 3 mg/kg:36%, 10 mg/kg:51%, 30 mg/kg:62%)。n-ブタノール易溶性画分 (10 mg/kg) について, 経口投与以外に皮下投与と腹腔内投与を実施したが, それぞれ47%, 43%, 54%の抑制率を示し, 投与経路間に大きな差異が認められなかった。また, 同画分の 3 mg/kg の皮下投与 (抑制率59%) は, 50 mg/kg (s.c.) のヒドロコルチゾン (抑制率85%) や 10 mg/kg (s.c.) のインドメサシン (抑制率72%) に及ばなかったものの, 250 mg/kg (s.c.) のスルピリン (抑制率61%) や 10 mg/kg (s.c.) のジフェンヒドラミン (抑制率65%) と比肩できるほどの抗浮腫作用を示した。さらに, 同画分はウサギの LPS 誘発発熱を解熱させ, マウスの酢酸腹腔内投与法による鎮痛試験において 10 mg/kg の皮下投与は, 100 mg/kg (s.c.) のスルピリンや 1 mg/kg (s.c.) の塩酸モルヒネに匹敵する作用をも示した。したがって, T.c. に含まれる n-ブタノールに易溶な物質は, 強い抗浮腫作用以外に, 鎮痛, 解熱作用をも合わせ持つ消化管からも吸収され易い中等度の非極性物質で, 抗炎症薬として臨床応用も可能な化合物であろうと推定した。

緒 言

タイ国は熱帯から亜熱帯に位置するため多種類の植物資源に恵まれており, その中には既知の薬物に優る薬効を持つ薬用植物もあるのではないかと想像される。その中でまたまた試みた抗炎症の実験でツヅラフジ科の *Tinospora crispa* (T.c.) が強い作用を示すことを発見した。

T.c. は, 東南アジア原産のつる性植物で, 薬用植物として東南アジア各国において幅広く用いられてきた。

Perry¹⁾ は, 東南アジア各地でキニーネの代用薬としてマラリアの際の解熱や, 痛風やリウマチの治療, それに

腰痛や虫刺症に用いられていることを報告している。

これらの伝統的な臨床応用と, ラットのカラゲニンによる足蹠浮腫に対する抑制効果から判断されるような抗炎症作用とが関連している可能性も考えられる。

そこで T.c. より50%メタノール液を用いて抽出物を得, さらにエチルエーテル, n-ブタノール, 水にそれぞれ易溶な分画を取り出し, T.c. の抗炎症作用物質の性状を検した。

実験方法

1. 被験薬草と成分の抽出

被験薬草として, チェンマイ大学農学部で栽培された T.c. の幹部分 (φ1~1.5 cm) を用いた。幹をハサミで細片化し, 温風 (40~60℃) で乾燥した後粉末化した。その粉末状試料に50%メタノール-水液を加え, 数日間浸漬

*〒589 大阪狭山市大野東377-2

**〒577 東大阪市小若江3-4-1

***Chiang Mai, 50002, Thailand

して得た濾液を40℃以下で減圧乾固して得た残渣を50%メタノール抽出物とし、それよりエチルエーテル易溶画分、n-ブタノール易溶画分、水易溶画分を調製した。操作手順および各画分の収量を上に示す。

これらの画分を、10%ポリエチレングリコール 400 (PEG) と10% エタノールを含む生理食塩水に溶解し、主として胃ゾンデによる経口投与により動物に投与した。

薬草抽出物以外の被験薬物には市販のスルピリン、ヒドロコチゾン、ジフェンヒドラミン、インドメタシン、塩酸モルヒネを用いた。

2. ラット足蹠浮腫法による抗炎症作用の測定

抗炎症作用は、Wistar 系雄性ラット (6~12週齢、体重180~250 g、日本チャールズリバー) を用いて足蹠浮腫法で測定した。すなわち、被験薬草抽出物を主として胃ゾンデにより経口投与し、20分後にラット後肢足蹠皮下に1%カラゲニン0.1 mlを皮下注射して、浮腫容積測定装置 (TK-101, ユニコム社製) により外踝部位までの足蹠容積を測定した。浮腫量の測定は原則としてカラゲニン注射2、4時間後に行ったが、一部は1、3時間後にも行った。

浮腫の程度は、次式の浮腫率で算出し、さらに数回におよぶ各実験結果を総合して理解するために、非投与群との比で表わして得た。

$$\text{浮腫率 (Et)} = (V_t - V_o) / V_o \times 100 (\%)$$

V_o : 浮腫誘発前容積, V_t : 浮腫誘発後容積

すなわち、各実験での非投与対照群の4時間値の浮腫率 (Ec4) に対する各被験薬投与例の各時間後の浮腫率の割合 ($Et/Ec4 \times 100 (\%)$) を算出して統計処理した。

3. 解熱作用の測定

白色家ウサギ (3~6月齢、体重2.5~3.0 kg、日本SLC) を首かせ式ウサギ固定器に固定し、発熱物質として大腸菌エンドトキシン (LPS, Sigma) 0.05 mg/kg を耳静脈より注入した。その2時間後に、T.c. のn-ブタノール易溶画分の溶解液を腹腔内投与し、30分毎にサーミスタ式温度計を用いて直腸温を測定して90分後の値をコントロール群と比較した。

4. 鎮痛作用の測定

鎮痛作用の測定は、酢酸腹腔内投与法を用いて行った。すなわち、被験薬液をマウス (4~8週齢、体重30~34 g、日本クレア) の皮下に注射して20分後に、0.6%酢酸含有生理食塩水液を0.1 ml/10 g 体重の割合で腹腔内投与し、その5分後より15分間に見られる writhing (よじり運動) 回数を数えて比較した。

5. 統計処理

本実験における有意差の検定は、Student の対応のない場合の t 検定を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意とした。

実 験 結 果

1. T.c. 50%メタノール抽出物の抗浮腫作用 (図1A)

T.c. の50%メタノール抽出物は、カラゲニン刺激後4時間においてラット足蹠浮腫を用量依存的に抑制し、

Fig. 1 Inhibitory effect of *Tinospora crispa* (T.c.) extract on the carrageenin-induced foot pad edema in rats. Each point represents the mean $\pm$ S.E., and the numbers of experiments are shown in parentheses. A: Dose-related effect of the 50% methanol extract. The extract was administered p.o. 20 min before carrageenin injection. The inhibitory effect at 10 and 30 mg/kg was significant 4 hr after the injection of carrageenin. B: Effect of three fractions obtained from the 50% methanol extract. Each fraction (10 mg/kg) was administered p.o. at 20 min before carrageenin injection. Numbers of experiments varied from 25 to 52. C: Dose-related effect of the n-butanol-soluble fraction. This fraction at 3, 10 and 30 mg/kg (p.o.) inhibited significantly the formation of edema 4 hr after injection of carrageenin.

その抑制度は、3, 10, 30 mg/kg の経口投与群においてそれぞれ、16%, 38%, 77%であった。

2. T.c. 50%メタノール抽出物よりの3分画の抗浮腫作用 (図1B)

T.c. の50%メタノール抽出物が用量依存的に強い抗浮腫作用を示したので、同抽出物より分画したエチルエーテル易溶画分、n-ブタノール易溶画分、水易溶画分 (各 10 mg/kg) の経口投与による抗浮腫作用を調べた。その結果、投与後2時間で水易溶画分は強い浮腫抑制効果を示さなかったが、n-ブタノール易溶画分およびエーテル易溶画分は有意な浮腫抑制作用を示した ($P < 0.001$)。投与後4時間では、各分画とも有意な浮腫抑制を示し、その抑制度はコントロール群と比べてn-ブタノール易溶画分では51% ($P < 0.001$)、エチルエーテル易溶画分では32% ($P < 0.01$)、水易溶画分では28% ($P < 0.05$)であった。また、n-ブタノール易溶画分とエチルエーテル易溶画分間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

次に、n-ブタノール易溶画分の抗浮腫作用の用量依存

性を調べたところ (図1C)、T.c. のn-ブタノール易溶画分 (3, 10, 30 mg/kg, p.o.) は、カラゲニン誘発後4時間のラット足蹠浮腫を用量依存的に抑制し、その抑制度は、1, 3, 10, 30 mg/kg 投与量でそれぞれ21%, 36%, 51%, 62%であった。

3. T.c. n-ブタノール易溶画分の投与法の差による抗浮腫作用の比較

n-ブタノール易溶画分の 10 mg/kg を腹腔内、経口、皮下へ投与したところ、カラゲニン誘発後4時間においてそれぞれ54%, 47%, 43%の抑制を示し、どの投与法でも優れた浮腫抑制作用が認められた。

4. T.c. n-ブタノール易溶画分と既存薬との抗浮腫作用の比較 (図2)

T.c. のn-ブタノール易溶画分に強い浮腫形成抑制作用が認められたため、T.c. のn-ブタノール易溶画分と既存薬とで抗浮腫作用を比較した。各薬物を皮下注射した場合のカラゲニン誘発4時間後の各群 ($n=6$) における浮腫率の平均値を図2に示す。T.c. のn-ブタノール

Fig. 2 Inhibitory effect of T.c. n-butanol-soluble fraction and other drugs on the carrageenin-induced foot pad edema in rats. sulp., sulpyrine; diphen., diphenhydramine; indo., indomethacin; hydro., hydrocortisone. Each column with a bar represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$). Each dose of drugs was given subcutaneously 10 min before injection of carrageenin. The T.c. n-butanol-soluble fraction (3 mg/kg) inhibited the formation of edema to the same degree as 250 mg/kg sulpyrine and 10 mg/kg diphenhydramine.

Fig. 3 Anti-pyretic effect of T.c. n-butanol-soluble fraction on LPS-induced pyresis in rabbits. Solutions containing each dose of the fraction were given intraperitoneally 2 hr after i.v.-injection of 0.05 mg/kg LPS in rabbits, and the rectal temperature was measured 90 min after administration of the solution. Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n=3$).

易溶画分 (3 mg/kg) はヒドロコチゾン (50 mg/kg) や非ステロイド性抗炎症薬のインドメタシン (10 mg/kg) には及ばなかったものの、非ステロイド性抗炎症薬のスルピリン (250 mg/kg) や抗ヒスタミン薬のジフェンヒドラミン (10 mg/kg) と比肩できるほどの抗浮腫作用を示した。

5. LPS 発熱ウサギに対する T.c. n-ブタノール易溶画分の解熱作用 (図3)

家兎に大腸菌エンドトキシン (LPS) 0.05 mg/kg を耳静脈に注射して2時間後、T.c. のn-ブタノール易溶画分 (1, 3, 10 mg/kg) を腹腔内投与して90分後にウサギの直腸温度を測定した。その結果、図3に示すごとく生理食塩水投与群では $41.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$ となったのに対し、有意差はなかったものの、T.c. のn-ブタノール易溶画分の1, 3, 10 mg/kg 投与群では体温の平均値をそれぞれ0.5, 0.8, 0.7°C下降させた。

6. T.c. のn-ブタノール易溶画分と既存薬との鎮痛作用 (酢酸腹腔内投与法) の比較 (図4)

0.6%酢酸液 (0.1 ml/10 g 体重) の腹腔内への投与5分後から15分間に起こったマウスの writhing 回数の平

均値は、生理食塩水皮下注射群の 34.5 ± 5.1 回に対し、T.c. (10 mg/kg) 群は 10.3 ± 3.0 回と、塩酸モルヒネ (1 mg/kg) やスルピリン (100 mg/kg) と同程度にまで抑制した。

考 察

T.c. の50%メタノール抽出物、およびそれより分画したエチルエーテル、n-ブタノール、水易溶画分のカラゲニン誘発浮腫に対する抑制作用実験から、T.c. 中に存在する抗浮腫作用物質はn-ブタノールに可溶性が高く (図1B)、用量依存性の作用を示したこと (図1C) から、T.c. のn-ブタノール易溶画分には浮腫形成抑制作用を持つ特異的作用物質が存在することが明らかとなった。さらに、同画分はLPS発熱ウサギの体温を下降させ (図3)、解熱性鎮痛薬のスルピリンや低用量のモルヒネに近い鎮痛作用をも有していた (図4)。

したがって、本実験よりツヅラフジ科のタイ国産植物T.c. に強い抗浮腫作用があることが確認された。この抗浮腫作用物質は、n-ブタノールに可溶性が高く、皮下・経口・腹腔内の3投与経路間で大きな差が見られなかったことから、血管壁や消化管壁の双方から吸収され易く、また肝などで代謝されにくい極性の弱い物質であると推定された。その抗浮腫作用を既存薬と投与量を勘案して比較してみると、非ステロイド性抗炎症薬のスルピリンやインドメタシン、それに抗ヒスタミン薬のジフェンヒドラミンと比肩しうる効果が得られた。

ウサギにおける解熱作用は、ウサギで弱い解熱作用が報告されていたこと²⁾や、間欠熱の治療に使用されているとの報告¹⁾を再確認させるものであった。

鎮痛作用に関しては、東南アジア諸国での痛風やリウマチ、腹痛や腰痛の治療の報告¹⁾があるが、本実験でのマウス酢酸腹腔内投与法による鎮痛試験の結果 (スルピリンや低用量のモルヒネと比肩しうる効果) はそれを裏づけるものかもしれない。その他、T.c. には、眼炎の際の湿布や洗浄、軽い外傷や掻痒部の湿布剤としての用途が報告されている¹⁾。浮腫抑制の他、解熱や鎮痛効果も有していることより、T.c. は、解熱・鎮痛・消炎作用を合わせ持つ総合的な抗炎症作用薬の可能性が高くなった。

T.c. には血糖降下作用もあるとの報告^{3,4)}もあるが、我々の正常ラットを用いた急性および慢性投与実験において、著しい血糖降下作用は認められなかった。

T.c. のn-ブタノール易溶画分には解熱・鎮痛作用を合わせ持つ抗浮腫作用物質が含有されていることが判明

Fig. 4 Antagonistic effect of T.c. n-butanol-soluble fraction and other drugs on the writhing response of mice to 0.6% acetic acid injected i.p. Each drug was given subcutaneously 20 min before injection of acetic acid solution, and the number of writhing movements for 15 min from 5 min after acetic acid injection was measured. Each column with a bar represents the mean $\pm$ S.E. (n=12).

し、既存薬との作用比較とその3作用よりシクロオキシゲナーゼ阻害作用を介しているのではないかと想像されるが、依然その本態(化合物および作用機序)が不明である。T.c. からピクロレチン、ベルベリン、カランビン¹⁾や、ボラベトサイドA, B, ボラベトールA, B^{5,6)}、チノツペライド、フェルロイルチラミン⁷⁾が単離されているが、薬理作用との関連性が明らかではない。

今後、薬理作用の観察を基に精製作業を続け、有用な薬用植物として利用する道を拓きたい。

謝辞: この研究は近畿大学とタイ国チェンマイ大学との間の学術協力協定に基いて行われたものである。両校の関係者の方々に礼を申し上げ、両国に良い結果がもたらされるよう祈ります。また、この実験に終始協力下さった農学部の上野美智君に深謝いたします。

文 献

- 1) Perry, L.M.: *Tinospora crispa* (L.) Miers. In Medical Plants of East and Southeast Asia, Edited by Perry, L.M., p. 268~269, MIT Press, Massachusetts (1980)
- 2) Messmer, Von M.K.: *Tinospora tuberculata*

(Lamk) Beumee, eine. Indonesische Fieberdroge. Pharm. Acta Helv. **30**, 65~68 (1960)

- 3) Noor, H. and Ashcroft, S.J.H.: Antidiabetic effects of *Tinospora crispa* in rats. J. Ethnopharmacol. **27**, 149~161 (1989)
- 4) Noor, H., Hammonds, P., Sutton, R. and Ashcroft, S.J.H.: The hypoglycaemic and insulinotropic activity of *Tinospora crispa*: studies with human and rat islets and HIT-T15 B cells. Diabetologia **32**, 354~359 (1989)
- 5) Fukuda, N., Yonemitsu, M., Kimura, T., Hachiyama, S., Miyahara, K. and Kawasaki, T.: Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. II. New diterpenoids, Borapetoside A and Borapetol A. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **33**, 4438~4444 (1985)
- 6) Fukuda, N., Yonemitsu, M. and Kimura, T.: Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. III. New diterpenoids, Borapetoside B and Borapetol B. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **34**, 2868~2872 (1986)
- 7) Fukuda, N., Yonemitsu, M. and Kimura, T.: Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. I. N-trans- and N-cis-feruloyl tyramine, and a new phenolic glucoside, Tinotuberide. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **31**, 156~161 (1983)

Abstract—Inhibitory effects of Siamese *Tinospora crispa* extracts on the carrageenin-induced foot pad edema in rats (the 1st report). Hideaki HIGASHINO*, Aritomo SUZUKI*, Yasuo TANAKA** and Krisana POOTAKHAM*** (*Department of Pharmacology, Kinki University School of Medicine, Osaka-Sayama 589, Japan; **Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Higashi-Osaka 577, Japan and ***Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50002, Thailand). *Folia pharmacol. japon.* **100**, 339~344 (1992)

The naturally occurring *Tinospora crispa* (T.c.) at Chiang Mai in Thailand has been found to inhibit carrageenin-induced foot pad edema. Compared with the control group, oral administration of the 50% methanol extract (10 mg/kg) from its stems inhibited the edema by 38% in volume, which was induced 4 hr after stimulation by carrageenin in rats. This inhibitory effect on edema formation has been most significant in the n-butanol soluble fraction compared with the ethyl ether- or water-soluble ones, and the action of the n-butanol fraction has been observed in a dose-dependent manner in the range of 1 to 30 mg/kg, p.o. Administration of this fraction by the s.c., or i.p. route also inhibited the carrageenin-induced edema formation to the same degree as that by the oral route. The 3 mg/kg, s.c. dosage of the fraction corresponds roughly to 250 mg/kg sulpyrine and 10 mg/kg diphenhydramine, s.c. Moreover, the fraction administered i.v. also reduced LPS-induced fever in rabbits, and had an antagonistic effect equivalent to 100 mg/kg sulpyrine and 1 mg/kg morphine hydrochloride (in i.p.-administration). The comprehensive anti-inflammatory substance(s) contained in T.c. stems are moderately non-polar compounds soluble in n-butanol and absorbable from both walls of the gut and vessels. The usefulness of a modified dosage of this plant extract for clinical treatment of various types of inflammation is highly suggested.