漢方薬 BG-102, 103, 104 剤の薬理作用機序

——特に白血球細胞膜磷脂酵素活性および活性酸素に及ぼす抗炎症作用——

丹 羽 鞆 負*

Action mechanism of Chinese herbs, BG-102, 103 and 104——with special reference to their effects on membrane phospholipid enzyme activities of human leukocytes and oxygen radicals generated—— The action mechanism of three kinds of Chinese herbs, BG-102, BG-103 and BG-104 was investigated. The activity of methyltransferase and phospholipase A₂ of human *in vitro* leukocyte membranes which induce cell activation, and ethanolamine base-exchange activity which has been recently found to be a precursor of transmethylation were assessed. Further, the effect of the drugs on lipooxygenase activity of rat basophilic leukemia cells, prostaglandin release from human leukocytes and oxygen radicals (O₂⁻, H₂O₂, OH[•], chemiluminescence) generated in both neutrophils and xanthine-xanthine oxidase system. The results revealed that although any drug did not change the activity of methyltransferase, phospholipase A₂ or ethanolamine-exchange of healthy human leukocytes, increased activity of these three enzymes induced by the addition of opsonized-zymosan (for neutrophils) or Con A (for lymphocytes), or found in the acute stages of the patients with various inflammatory disorders such as Behçet's disease, RA, bacterial infections, etc. was reduced to near the basal levels. Three herbs also decreased all oxygen radicals generated in two oxygen radical generating systems. On the other hand, lipooxygenase activity or prostaglandin release was not affected by any of these Chinese herbs. These findings suggest that these drugs are effective in subsiding the excited situations of inflammatory cells, stabilizing the inflammatory cell membranes and that they have oxygen radical scavenger activity and act as anti-inflammatory agents.

Yukie Niwa*

*Niwa Institute for Immunology

key word: oxygen radicals, anti-inflammatory action, leukocyte membrane, phospholipid enzyme activity, anti-tumor action

近年、西洋医学のいちじるしい進歩は、その反面で、その副作用から医原病の問題を生じた。その結果、薬理効果がそれほど顕著ではなくても、副作用の少ない漢方薬や健康食品を愛用するむきも多く、これらの natural medical products を使用する患者の数は、最近とみに増加している。しかしながら、漢方薬の薬理作用については、化学的に合成された西洋医学のそれに比し、詳細な解明の得られないものが多い。漢方薬の持つ、“異病同治”(一つの薬剤が発生病理の異なる多くの疾患に同時に有効とされる)また“同病異治”(同一疾患であるのに、その使用した薬剤が有効な症例と有効でない症例がある)のほか、薬剤の薬理作用の分析についても、単品の作用でなく数多くの剤の“相乗作用”で解決しようとする非科学的な傾向があり、正しい漢方薬理作用の解明が必要とされている。

筆者らは、最近、臨床的によく使用されている十数種

の漢方薬や、臨床的に有効な、ある種の自然食品について、その活性酸素(oxygen radicals, OR)に対する影響を検索したところ、強力な scavenger(捕捉除去)作用が証明され、さらに、この作用は加熱や内服(胃液の処理)によって増強され、したがって、その効果は薬剤中に含有される superoxide dismutase (SOD), catalase などの高分子の酵素類によるものではなく、自然植物, natural products 中に含有される flavonoids, α -tocopherol, tannin, polyphenol 類などの低分子化合物によるものであろうことを報告¹⁾した。

最近、BG-102, 103, 104剤とよばれる漢方剤(珀全有限公司、板橋市台北県)が台湾で多くの疾患に使用され、本邦でもその姉妹方剤 BG-101 剤について、動物実験でその抗腫瘍効果を証明した報告²⁾もみられる。これら3種の漢方薬には、さらに広く抗炎症効果、抗アレルギー効果が期待されていることから、筆者は、細胞膜の流動性をもたらす膜 phospholipid 酵素活性をはじめ、膜の流動性の亢進に引きつづいて起こる一連の炎症細胞の活性

* 丹羽免疫研究所

化および炎症反応惹起過程に及ぼすこれら3種の方剤の影響を検索した。すなわち、細胞内外膜の外転 (translocation) により、phosphatidylethanolamine (PE) より phosphatidylcholine (PC) に変化させ、細胞膜の粘度を低下させ、流動性を亢進させ、PC よりさらに arachidonic acid を産生し、arachidonic acid cascade を始動させ、それにより OR 産生をはじめ、lysosomal enzyme 分泌、食食、chemotaxis、リンパ球の抗原への反応など種々の炎症を惹起させる。好中球、リンパ球細胞膜の transmethylation³⁻⁶⁾、および phospholipase A₂ 活性を、ヒト白血球を使用して測定し、さらに arachidonic acid cascade で産生される発熱、疼痛、腫脹などに関与する PGE₂ の分泌と、痒み、喘息などのアレルギー反応に関与する lipooxygenase 活性 (lipooxygenase のみは rat basophilic leukemia cell を使用) も測定し、これら薬剤の影響を調べることにした。

さらに、筆者らは、近年、transmethylation に利用される PE を産生する precursor 的な反応として、同じく炎症細胞膜の ethanolamine base-exchange reaction の存在を報告^{7,8)}してきたが、これら3種の方剤の ethanolamine exchange activity への影響も調べ、また、近年、発癌の promoter^{9,10)}をはじめ、非常に強力な炎症因子で、Behçet 病¹¹⁾、関節リウマチ¹²⁾をはじめ、多くの炎症疾患¹³⁻¹⁹⁾の発症機序の一因として考えられてきた OR に対する影響も調べた。そして、BG-102, 103, 104 剤の、それぞれの有する薬理作用を、一部ではあるが明らかにし、その作用機序を科学的に正しく理解するための一助とすることにした。

方法

(1) 被検薬剤と材料

台湾の珀全有限公司製造で山進商事(福岡)より提供された水溶性の漢方剤 BG-102, 103, 104 剤を、BG-102 は、1 ml 中 0.3 mg, BG-103 と BG-104 は 0.6 mg 含有のものを ×1 とし (ほぼ therapeutic concentration)、それぞれ ×1/10, ×1, ×10 の濃度のものを、下記の好中球、リンパ球の各酵素、各 OR、PGE₂ 産生系に添加し、各剤の dose dependent な影響を調べた。

(2) transmethylation および phospholipase A₂ 活性の測定

ヒト白血球 methyltransferase 活性は、丹羽らの方法²⁰⁾により、白血球を超音波 24 watt 10 sec で sonify し、10×10⁴g の超遠心を行い、microsome fraction を収獲し、200 μg の蛋白含有膜成分を使用し、S-adenosyl-L-[methyl-³H]-methionine ([³H]-SAM) と反応させ、chloroform-methanol で脂質成分を抽出し、scintillation counter (Packard, USA) で methyl-[³H] の取り込み量を測定することにより計算した(詳細は文献^{20,21)}参照)。

この microsomal fraction に [³H]-SAM を添加して発生した methylation で、果たして実際、内膜の PE から、PMME, PDME を経て外膜を形成する PC が形成され、さらに lyso-PC (L-PC) への further metabolism が起こっているかを確認するため、作成された膜の phospholipids に [³H]-SAM を加えて得られた資料に含まれるメチル化の反応産物の分析を二次元 TLC を用いて行った。一次元に、chloroform: acetone: methanol: CH₃COOH: aq (5:2:1:1:0.5)、二次元に n-propanol: propionic acid: chloroform: aq (3:2:2:1) という展開溶媒を使用し、測定した。

phospholipase A₂²¹⁾は、同量の膜成分に 10 μl (0.5 μCi) β-[1-¹⁴C] arachidonyl-L'-stargl-L-α-phosphatidylcholine ([1-¹⁴C]-PC) を加え、30°C でよく攪拌し、30°C で 90 分反応させ、4°C の chloroform: methanol 液 (2:1) を加えて反応を停止させ、1 分間攪拌した後、3000×g で 5 分間遠沈し、chloroform 層を取り出し、真空ポンプで chloroform を蒸発させ、残渣を数滴の chloroform: methanol 液で溶解した。そして、一次元の TLC (petroleum ether/diethyl ether/acetic acid, 80/30/1) に展開し、遊離した β-[¹⁴C] arachidonic acid 展開部位と [1-¹⁴C]-PC 展開部位をメスで削り取り、それぞれガラスバイアルに入れ、universal gel 5 ml を加え、各位置に展開して結合していた [¹⁴C] を scintillation counter で測定し、下記の式で遊離した arachidonic acid の % で phospholipase A₂ 活性をあらわした。

$$\frac{\text{isolate } \beta\text{-}[^{14}\text{C}]\text{arachidonic acid}}{\beta\text{-}[^{14}\text{C}]\text{arachidonyl PC} + \text{isolated } \beta\text{-}[^{14}\text{C}]\text{arachidonic acid}} \times 100$$

(3) ethanolamine-base-exchange 活性の測定

膜成分収獲時に、筆者らの transmethylation の測定に用いた原法^{20,21)}より若干 modify した方法を用いた^{7,8)}。

すなわち、超音波で sonify する前に、0.25 M sucrose に浮遊した好中球またはリンパ球に、1 mM EGTA および 10 mM 2-mercaptoethanolamine (2ME) を加えておいてから、上記の条件で細胞を sonify し、microsomal fraction 作成後、50 μg 蛋白含有膜成分、3 mM CaCl₂, 50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.5), 0.25 mM EGTA, 2.5 mM 2ME, 62.5 mM sucrose に 10 μM MH³-ethanolamine (2μCi), (Amersham) を最終 total volume が 0.2 ml になるように調節して、standard assay mixture を作成し、30°C 30 分反応させる。ついで、0.25 N-HCl 0.6 ml を加えて反応を停止させ、chloroform-methanol (1:2) 溶液 3 ml 加え、1.5 分振盪し、1% KCl 1 ml と、さらに chloroform 1 ml を加え、3,000 rpm 5 秒間遠心し、リン脂質含有 chloroform 層を得る。ついで、methanol に溶解した 0.5% KCl 2 ml を chloroform 層

に添加し、60~80°C の乾燥器中に約 1 時間入れ、chloroform を dry up し、リン脂質成分の抽出を行い、同位元素を標識したそれぞれのリン脂質の base (^3H -ethanolamine) が、リン脂質に結合した picomoles 量を liquid scintillation spectrometer で測定する。すなわち、増減剤 ユニバーサルゲルを加え、scintillation counter にかかけ、lipid と結合した同位元素の base を毎分 1 mg 蛋白当りの結合量としてあらわした。

(4) PGE_2 の測定

1 mg/ml opsonized zymosan 刺激ヒト好中球、または 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A 刺激ヒトリンパ球より分泌される PGE_2 量を測定したが、前もって被検薬剤を 10 分間各細胞と incubate した。

PGE_2 測定は、Dray ら²²⁾の方法に従って行った。すなわち、刺激された各細胞が分泌した PGE_2 含有溶液中の PG fractions を ethylacetate で抽出し、抽出物中に混入している ethylacetate を蒸発除去する。そして、siliconized glass conical tube 中の各 PG 含有成分を窒素ガスで乾燥させた後、benzoate: ethylacetate: methanol=60:40:2 の比率で作成した溶媒で、PG 含有成分を抽出し、窒素ガスで乾燥させた後、抗- PGE_2 血清 (Institute Pasteur Production, Paris) を使用し、radioimmunoassay で測定した。

(5) lipoyxygenase 活性の測定

10% FCS を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) に 75 units/ml penicillin と 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin とともに rat basophilic leukemia cells を 37°C 7% CO_2 incubator で培養し、この leukemia cells の細胞膜を sonify し、その sonicates 中に含有される arachidonate 5-lipoyxygenase 活性によって、 $[1-^{14}\text{C}]$ arachidonic acid より産生される 5-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid (5-HETE) をその major reaction product として測定し、5-lipoyxygenase 活性を知る用法を用いた^{23~26)}。

すなわち、培養 leukemia cells を収穫し、洗浄後、10% ethylene glycol と 1 mM EDTA 含有 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 中に 2×10^7 cells/ml となるように調節して浮遊さす。この細胞浮遊液を Branson Sonifier (model 185) で、20 KHz で 30 秒間 sonify し、ついで、105,000 $\times g$, 60 分間遠心し、その上清 (cytosol solution) を、Sephacrose 4B の column で吸着し抽出する。かかる操作の結果、35~40 nmol/min/mg protein の lipoyxygenase 活性が得られ実験に際しては、2 mM CaCl_2 と 2 mM ATP を添加し、その活性を強化した。この lipoyxygenase 活性含有 solution と被検薬剤であるおのおの BG 剤を 5 分間 pre-incubation した後、文献に従い^{24~26)} reaction products の定量を行った。

(6) 活性酸素(OR)に対する影響

1 mg/ml opsonized zymosan 刺激健康人好中球、および xanthine-xanthine oxidase 系において、4 種の OR (O_2^- , H_2O_2 , $\text{OH}^\bullet$, chemiluminescence) を産生させた。好中球系での OR 産生法であるが、対象症例の静脈血より好中球を文献¹⁷⁾に従い分離収穫し、5% glucose 含有の Krebs Ringer phosphate (KRPG) (ただし chemiluminescence 測定時には、無色 Hanks 液を使用した) に浮遊させ、好中球 medium を作製した。

好中球は、Ficoll-Hypaque gradient density 法により好中球含有層を収穫し、さらに、好中球含有層を被検血清と分子量 17×10^4 の 6% dextran 生理食塩水で希釈(最終濃度 1%)して処理し、0.876% NH_4Cl で混入赤血球を溶血させた。好中球刺激に使用した zymosan は、文献^{11,12)}に従い、前もって被検血清で opsonize した。OR 産生能測定に関しては、すでに詳述し^{18~21)}ているので要点のみを略記する。

まず、OR のうち、 O_2^- は cytochrome C の還元により、Beckman の spectrophotometer (波長 550 nm) で、 H_2O_2 は、peroxidase を加え、scopoletin の H_2O_2 による蛍光減少度を蛍光分光光度計 (日立 MPF 4 型) によって (excitation 370 nm emission 460 nm) それぞれ測定した。

$\text{OH}^\bullet$ に関しては、 α -keto-methiolbutyric acid (KMB) を加え、エチレングス (C_2H_4) の産生を日立ガスクロマトグラフにより定量し、 $\text{OH}^\bullet$ に換算した。また、chemiluminescence (CL) については、厳重な遮光のもとに、液体シンチレーションカウンター (Packard, Illinois, USA) を用い、co-incidence を off にして測定した。好中球を使用しない cell-free の xanthine-xanthine oxidase 系 OR 産生は、50 ml 生食に溶解した 13.5 mg hypoxanthine 0.1 ml と、2.3 ml 生食に溶解した 50 mM EDTA 0.05 ml、および 0.72 u xanthine oxidase 0.1 ml を混合し、この混合液 0.1 ml を、さらに 2 ml potassium phosphate buffer に希釈溶解し OR を産生させた。

なお、lipoyxygenase の測定には rat basophilic leukemia cells を使用し、methyltransferase, phospholipase A_2 , prostaglandin E_2 の測定には、正常人ヒト好中球とリンパ球を、また、活性酸素の測定には、やはり健康人の好中球を使用した。また、methyltransferase, phospholipase A_2 , および base-exchange 活性測定には、5 例の健康人好中球およびリンパ球のほか、急性期にある 4 例の Behçet 病 (男性 3 例, 28~41 歳, 女性 1 例, 35 歳), 5 例の関節リウマチ患者 (全員女性 29~50 歳) と 3 例の細菌感染患者 (全員男性, 19~45 歳) 計 12 例の患者好中球およびリンパ球を使用した。

なお、一部の実験に記載したとおり、好中球・リンパ

図1 BG 剤の好中球 transmethylation, phospholipase A_2 および base-exchange 活性に及ぼす影響

(○) : a 軸の methyltransferase(MT)活性(p mol/min/mg protein)

(●) : b 軸の phospholipase A_2 (PLA $_2$)活性(% release)

(×) : c 軸の ethanolamine-base-exchange 活性(p mol/min/mg protein)

..... : 正常人未刺激好中球のそれぞれの酵素活性の変化

—— : 急性炎症患者12例の好中球の平均の酵素活性の変化

各値の standard error of mean(SEM)は、8~13%以内を示した。図の煩雑さを防ぐため、SEM は図に記載しないことにした。

図2 BG 剤のリンパ球 transmethylation, phospholipase A_2 および base-exchange 活性に及ぼす影響

(○) : a 軸の methyltransferase(MT)活性(p mol/min/mg protein)

(●) : b 軸の phospholipase A_2 (PLA $_2$)活性(% release)

(×) : c 軸の ethanolamine-base-exchange 活性(p mol/min/mg protein)

..... : 正常人未刺激リンパ球のそれぞれの酵素活性の変化

—— : 急性炎症患者12例のリンパ球の平均の酵素活性の変化

各値の standard error of mean (SEM)は、8~13%以内を示した。図の煩雑さを防ぐため、SEM は図に記載しないことにした。

球と被験薬剤との preincubation time を今回行った各実験系で、すべて10分としたが、予備実験にてこの至適時間が確認されたものである。ただし、ある実験系では、20分とかの異なった時間でも10分の preincubation と同等または、それより若干より好適と思われる時間もあったが、一応、今回の実験系では10分と統一して行った。

結果

(1) methyltransferase, phospholipase A_2 , base-exchange 活性への影響

BG-102, 103, 104 剤いずれも正常ヒト好中球およびリンパ球の細胞膜 methyltransferase, phospholipase A_2

および ethanolamine base-exchange activity に対して、有意な変化を与えなかった(すべて $P > 0.05$) (図1, 2)。

しかしながら、opsonized zymosan で刺激した好中球および Con A で刺激したリンパ球膜の亢進した transmethylation, phospholipase A_2 , base-exchange 活性や、急性期にある Behçet 病, RA, 細菌感染患者などの上昇した好中球・リンパ球のこれら3種の酵素活性は、それぞれ有意に dose-dependent に低下させ、無刺激正常人の細胞のそれぞれの値の近くまで復帰させた (図1, 2)。3剤中 BG-103 剤に、このような刺激白血球膜正常化(安定化)への作用がもっとも強力に認められ、BG-102 剤に比較的に軽微に存在することが知られた。

(2) lipoxigenase 活性および PGE $_2$ 分泌への影響

表 1 BG 剤の lipoxxygenase 値および prostaglandin E₂ (PGE₂) 分泌に及ぼす影響

Conc. of the drugs	lipoxxygenase (cpm × 10 ⁻²)	PGE ₂ (pgr/33 × 10 ⁴ cells)	
		好 中 球	リンパ球
BG-102	× 1/10	6.9 ± 1.9	38.4 ± 8.9
	× 1	7.2 ± 2.0	26.2 ± 7.8
	× 10	35.2 ± 10.6	28.1 ± 8.2
BG-103	× 1/10	39.3 ± 9.3	24.4 ± 10.9
	× 1	6.9 ± 2.1	36.2 ± 8.0
	× 10	6.7 ± 1.7	26.0 ± 10.9
BG-104	× 1/10	6.7 ± 1.7	39.5 ± 7.8
	× 1	6.8 ± 1.9	25.2 ± 7.6
	× 10	36.8 ± 10.1	24.1 ± 8.0
control	× 1/10	7.0 ± 2.0	38.9 ± 9.3
	× 1	6.7 ± 1.8	36.2 ± 10.7
	× 10	6.9 ± 1.7	24.0 ± 10.4
control (対照)は、薬剤未添加の値を示す。		37.1 ± 8.1	26.3 ± 8.9
		24.6 ± 8.2	

control(対照)は、薬剤未添加の値を示す。

basophilic leukemia cells の lipoxxygenase activity および正常人ヒト PGE₂ 分泌に対しては、本剤は、有意な変化を与えなかった(いずれも $P > 0.05$)(表 1)。特に PGE₂ に対しては、非常に標準偏差値が高いことが特徴的であった。lipoxxygenase 値は、rat の培養腫瘍細胞であり、また、PGE₂ 値は、白血球を zymosan, Con A で刺激しないと十分な分泌がみられないこと、また PGE₂ 値は急性炎症患者も標準偏差値が高く、健康人のそれと有意差が認められなかった(図表省略)ため、前項の methyltransferase などの測定におけるような、未刺激、刺激による値の差、または健康人、炎症患者の値の差の実験は行えなかった。

以上より、これら 3 種の方剤に抗アレルギー作用および cyclooxygenase 抑制作用は存在せぬと考えられた。

(3) 活性酸素(OR)に対する影響

本剤は、その therapeutic dose(×1)を中心に、好中球系および xanthine-xanthine oxidase 系で産生される 4 種(3 種)の OR を、それぞれ有意に、dose-dependent に低下させた(図 3, 4)。この OR 低下作用は、BG-102 剤に最も強力で、104 剤に比較的軽微に認められた。好中球系のみならず、cell-free の xanthine-xanthine oxidase 系での OR も低下させたことは、これら方剤は好中球の metabolism を抑制するのではなく、産生された OR を捕捉消去する scavenger 作用を有しているといえ、したがって、これら 3 剤、特に BG-102, 103 剤には抗炎症作用が期待できる。なお、xanthine-xanthine oxidase 系での chemiluminescence は、実験系に myeloperoxidase やハロゲン化合物の contamination がみられないため、産生されないことが知られている²⁷⁾ため行わなかった。

なお、詳細なデータは、次回の臨床編(投稿予定)にゆずるが、上記の methylation や phospholipase A₂ 活性

や好中球 OR 産生能の亢進を示していた Behçet 病などをはじめとする炎症患者で、これら方剤内服により、(臨床経過の好転とともに)これら phospholipid 酵素活性や OR 値が正常化を示すのを経験している。

考 察

BG-102, 103, 104 剤(製剤名: BG-102, 品山茶, BG-103 剤, B 茶, BG-104 剤, TT 茶)は、本邦ではまだ医薬品としての漢方薬の認可は受けていないが、台湾では、BG-101 剤²⁾などとともに抗動脈硬化剤、抗炎症剤²⁾、種々の内臓疾患の治療薬や抗癌剤などとして広く使用されている。

本邦で、これらの漢方剤の姉妹製品で抗癌剤として使用されている BG-101 剤(BG-104 剤にその成分は似る)が、*vitro* の実験で mouse の腹腔癌を実際に抑制した報告²⁾もみられ、その薬理作用の解明を待たれている漢方剤の一つであった。もちろん、今回の筆者の実験は、その抗癌作用を含むこれら 3 剤の漢方薬の持つすべての作用機序を解明したものではないが、今回の実験結果、3 剤とも正常な白血球の細胞膜の膜現象(membrane associated events)には影響を与えないが、急性炎症患者や bioactive stimulants(opsonized zymosan や Con A)で刺激亢進状態にある白血球細胞膜の transmethylation や phospholipase A₂ 活性をはじめ、ethanolamine base-exchange activity も抑制・正常化させる作用の証明されたことは示唆に富む現象といえる。

筆者は、近年、ヒト白血球膜の methyltransferase や phospholipase A₂ 活性の測定法を、臨床患者で可能にし^{20, 21)}、SLE, RA, Behçet's 病、細菌感染の急性期では、白血球細胞膜のこれら phospholipid 酵素活性が亢進していることを報告した^{21, 25)}。Hirata ら³⁻⁶⁾が、transmethylation(や phospholipase A₂ 活性化)が、細胞膜内外膜の PE→PC への外転により、膜の viscosity が低下し、その流動性が亢進し、arachidonic acid の産生を招き、arachidonic acid cascade が回転し、chemotaxis, 食食、OR やライソゾーム酵素の産生、リンパ球の反応性の亢進、血小板の凝集や炎症過程の促進がもたらされ、炎症の源になることを報告したが、筆者らのこの報告^{21, 25)}は Hirata らの仮説を裏づけたものであった。このことから、今回の実験は、BG-103 剤をはじめとする 3 剤の漢方薬が、正常な炎症細胞膜には作用しないが、異物、細菌、ウイルスなどの侵入により、細胞が異常に刺激され、励起状態になると、これを抑制・正常化させる作用を有し、このような細胞膜における酵素的反応は、炎症細胞に限局されず、生体の多くの細胞の activation(活性化)にも transmethylation, phospholipase A₂ 活性が関与していることが知られており、これら 3 剤は、炎症細胞を含め広く生体の細胞の励起状態を正常に

図3 BG剤の好中球系 oxygen radical(活性酸素)産生に及ぼす影響

(○) : a軸における O_2^- 産生(μ mol/min/ 10^6 cells)

(△) : b軸の H_2O_2 産生(p mol/min/ 2.5×10^6 cells)

(●) : c軸の $OH\cdot$ 産生(p mol/min/ 2.0×10^6 cells)

(×) : d軸の chemiluminescence(CL)産生(CPM $\times 10^4$ /min/ 5×10^6 cells)

各値の standard error of mean(SEM)は、8~13%以内を示した。図の煩雑さを防ぐため、SEMは図に記載しないことにした。

図4 BG剤の xanthine 系 oxygen radical(活性酸素)産生に及ぼす影響

(○) : a軸における O_2^- 産生(μ mol/min)

(△) : b軸の H_2O_2 産生(p mol/min)

(●) : c軸の $OH\cdot$ 産生(p mol/min)

各値の standard error of mean(SEM)は、8~13%以内を示した。図の煩雑さを防ぐため、SEMは図に記載しないことにした。

復させ、細胞膜の安定化に寄与する薬剤といえる。

そして、さらに、興味あることは、筆者が、最近この炎症細胞の動的機能、すなわち、種々の炎症の mediators 産生の源^{3~6)}といわれている transmethylation の、さらにその前駆的役割を ethanolamine base-exchange reaction が果たしていることを示唆し^{7,8)}、Behçet 病、RA などの急性炎症患者白血球膜の ethanolamine base-exchange activity が methyltransferase や phospholipase A_2 活性とともに亢進していることを報告⁸⁾したが、この BG-102, 103, 104 剤が methylation や phospholipase A_2 のみならず、ethanolamine base-exchange の亢進も *in vitro* で抑制したことは、この筆者の ethanolamine base-

exchange に関する仮説^{7,8)}を支持するものといえる。

以上のように、BG 系の 3 剤が、膜現象で(励起状態にある)もっとも proximal な (ethanolamine base-exchange), methylation, phospholipase A_2 活性を抑制したため、arachidonic acid 産生につづいて起こる PGE_2 の産生や lipoxygenase の活性も、炎症患者では抑制するのではないかと推測されたが、ヒト白血球の PGE_2 分泌は、炎症患者では標準偏差値が高く、有意な PGE_2 分泌の増加が認められず、正常ヒト白血球の PGE_2 分泌実験しか行わず、また、rat の basophilic leukemia cell の lipoxygenase に対しても、めだつた影響が得られなかった。

表 2 3種のBG剤中の含有生薬成分

	生薬成分
BG 102	牛黄・板藤・若苓皮・黄連・黄柏・金線連
BG 103	桑葉心・茯苓・含風草・牛黄・大黄・滑石
BG 104	茯苓・檳榔・牛黄・大黄・滑石

もちろん、正常白血球 PGE_2 分泌にも、本剤は有意な効果が認められず、arachidonic acid 産生より distal な arachidonic acid cascade の反応には、これら BG 系薬剤は顕著な影響を与えないことが知られた。このことは、これら BG 剤には、一般のインドメサシン、アスピリンをはじめとする西洋医学の抗炎症剤にみられる抗炎症効果(cyclooxygenase 活性抑制作用)と、(lipoxygenase 活性を介した histamine release による)アレルギー反応を抑制する抗アレルギー作用は存在しないといえる。しかしながら、近年、食細胞の産生する非常に強力な炎症惹起因子として注目されてきた活性酸素(OR)を、これら3種の方剤はいちじるしく抑制している。すなわち、活性酸素(OR)は、近年もっとも強力な炎症因子として注目され、食細胞やその他血管内あるいは各臓器で異常に高値に産生された場合、Behçet 病¹¹⁾、川崎病の冠動脈閉塞¹⁴⁾、Dühring 氏皮膚炎¹⁷⁾、RA の関節腔¹²⁾、SLE の血管や各組織¹⁶⁾、PSS、Crohn 病、潰瘍性大腸炎、皮膚筋炎をはじめ²⁹⁻³¹⁾、さらに最近、脳、心血管障害^{18,19)}、脳血栓、心筋梗塞や、かつ頭部外傷、胃潰瘍、糖尿病³²⁾などの発生病理と非常に密接な関係有していることが報告されてきており、また発癌^{9,10)}の promoter としてもクローズアップされてきている。

このような強力な炎症惹起因子で、多くの疾患の発生病理と関連する OR を、捕捉消去する scavenger 作用も認められたことは注目に値する。

また、OR は、やはり近年発癌の promoter^{9,10)}として多くの報告がみられ、これら BG 剤には、(今回の実験で直接癌細胞に対する制癌作用の実験は行っていないが、OR の除去作用が強力に認められたことから)、癌に対しては、長期常用することにより、発癌予防に推賞されうと考えられる。制癌作用としては、今回の検索で膜の安定化という漠然とした結果しか得られなかったが、励起状態の細胞を抑制正常化し、かつ、生体で組織障害性の非常に強力な OR を捕捉消去することが明らかになったことから、抗炎症剤として臨床応用されることも有望な適用の一つと考えられる。

今回検査した3種のBG剤中に含有される生薬成分を表示すると、表2にみられるごとくである。それぞれの方剤に含有されているそれぞれの成分の、従来より知られている薬理作用から、今回明らかにされた3種のBG剤の薬理作用を関連づけてみると、まず、BG-104

剤について、茯苓に細胞膜の強化作用が、檳榔種には過酸化(OR や過酸化脂質と考えてよい)を分解する作用が、大黄には、消炎作用のあることが知られていることなどと、今回得られた消炎作用、炎症細胞膜の安定化などの作用が関連づけられる。また、ヨクイニン³³⁾のような例外もあるが、一般に漢方剤のような植物の葉よりなる natural products には、既述のように flavonoids, α -tocopherol, tannin, polyphenol, vit-C など多くの低分子の antioxidants が多量に含有されていて、これらが相乗作用として非常に強力な OR 除去作用を発揮することを、筆者は報告してきている¹⁾。

3剤の方剤にみられた OR 除去作用は、これら成分の生薬(植物)中に含まれた flavonoids をはじめとする低分子の物質によるものと考えられる。これらのことを考え合わせると、今回の実験の結果、明らかにされた3剤の漢方の薬理作用は、従来から経験論的に考えられていたこれらの薬剤の有している作用を、科学的にある程度裏づけたといえる。今回試験管で実験した薬剤は、その個々の生薬成分としては、その大部分は健康保険の適用になっている生薬であるが、その組み合わせが、健保適用の基準とされている漢方のふい書物(傷寒論など)や経験に存在しないため、健保の薬剤として適用になっていない。しかしながら、これら3剤の方剤は、台湾では有効な臨床効果が得られており、筆者の今回の実験結果からも、強力な OR 除去作用や炎症細胞膜の安定化など科学的な知見も得られている。したがって、健保適用になってない生薬の組み合わせでも、今後、これら3剤のように、既存の多くの生薬を工夫し、組み合わせることにより、優秀な薬剤が生れる可能性があるといえる。

文 献

- 1) Niwa, Y., Miyachi, Y.: Anti-oxidant action of natural health products and Chinese herbs. *Inflammation* 10: 79-91, 1986.
- 2) 新宮正久: 漢方薬 BG-101剤の抗癌作用の検討。第43回日本癌学会総会, 1984.
- 3) Hirata, F., Axelrod, J.: Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Sci.* 209: 1082-1090, 1980.
- 4) Hirata, F., Corcoran, B.A., Venkatasubramanian, K., Sciffmann, E.: Chemoattractants stimulate degradation of methylated phospholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2640-2643, 1979.
- 5) Crews, F.T., Morita, Y., Hirata, F., Axelrod, J., Siraganian, R.P.: Phospholipid methylation affects immuno-globulin E-mediated histamine and arachidonic acid release in rat leukemic basophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 42-49, 1980.

- 6) 横山三男, 丹羽鞆負: 細胞膜の動態と炎症—食細胞(主として好中球)の“Jekyl and Hyde”反応について—, 最新医学 37: 734-744, 1982.
- 7) Niwa, Y., Taniguchi, S.: Phospholipid base exchange in human leukocyte membranes: Quantitation and correlation with other phospholipid biosynthetic pathways. Arch. Biochem. Biophys. 250: 345-357, 1986.
- 8) Niwa, Y., Sakane, T., Ozaki Y., Kanoh, T., Taniguchi, S.: Phospholipid base-exchange activity in the leukocyte membranes of patients with inflammatory disorders. Am. J. Pathol. 1987, (in press).
- 9) 永田親義: 発がんにおける 活性酸素の 役割, “がん発生の機構”サイエンス社, 1982, p 118-125.
- 10) Michelson, A.M., Buckingham, M.E.: Effect of superoxide radicals on myoblast growth and differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58: 1079-1086, 1974.
- 11) Niwa, Y., Miyake, S., Sakane, T., Shingu, M., Yokoyama, M.: Auto-oxidative damage in Behçet's disease-endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. Clin. Exp. Immunol. 49: 247-255, 1982.
- 12) Niwa, Y., Sakane, T., Shingu, M., Yokoyama, M.M.: Effect of stimulated neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis on lymphocytes—a possible role of increased oxygen radicals generated by the neutrophils. J. Clin. Immunol. 3: 228-240, 1983.
- 13) 丹羽鞆負, 横山三男: シンポジウム “感染とその生体反応(4) SLE および Behçet 病などの疾患にみられる auto-oxidative damage について”, 日内誌, 71: 21-25, 1982.
- 14) Niwa, Y., Sohmiya, K.: Enhanced neutrophilic functions in mucocutaneous lymph node syndrome, with special reference to the possible role of increased oxygen intermediate generation in the pathogenesis of coronary thromboarteritis. J. Pediatrics 104: 56-60, 1984.
- 15) Niwa, Y., Somiya, K., Michelson A.M., Puget, K.: Effect of liposomal-encapsulated superoxide dismutase on active oxygen-related human disorders. A preliminary study. Free Rad. Res. Commun. 1: 137-153, 1985.
- 16) Niwa, Y., Sakane, T., Shingu, M., Miyachi, Y.: Role of stimulated neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus in tissue injury, with special reference to serum factors and increased active oxygen species generated by neutrophils. Inflammation 9: 163-172, 1985.
- 17) Niwa, Y., Sakane, T., Shingu, M., Yanagida, I., Komura, J., Miyachi, Y.: Neutrophil-generated active oxygens in linear IgA bullous dermatosis. Arch. Dermatol. 121: 73-78, 1985.
- 18) Burton, K.P., McCord, J.M., Ghai, G.: Myocardial alterations due to free-radical generation. Am. J. Physiol. 247: H776-783, 1984.
- 19) McDonald, R.J., Berger, E.M., White, C.W., White, J.G., Freeman, B.A., Repine, J.E.: Effect of superoxide dismutase encapsulated in liposomes or conjugated with polyethylene glycol on neutrophil bactericidal activity *in vitro* and bacterial clearance *in vivo*. Am. Rev. Respir. Dis. 131: 633-637, 1985.
- 20) Niwa, Y., Sakane, T., Taniguchi, S.: Phospholipid transmethylation in the membrane of human neutrophils and lymphocytes. Arch. Biochem. Biophys. 234: 7-14, 1984.
- 21) Niwa, Y., Sakane, T., Yamamoto, S., Kano, T., Taniguchi, S.: Methyltransferase and phospholipase A₂ activity in membranes of neutrophils and lymphocytes from patients with bacterial and viral infections. Inflammation 9: 53-65, 1985.
- 22) Dray, F., Charbonnel, B., Maclof, J.: Radioimmunoassay of prostaglandins F_a, E₁ and E₂ in human plasma. Eur. J. Clin. Invest. 5: 311-318, 1975.
- 23) Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., Horie, T., Watanabe-Kohno, S.: Flavonoids: Potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 116: 612-618, 1983.
- 24) Yoshimoto, T., Miyamoto, Y., Ochi, K., Yamamoto, S.: Arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocyte with activity for 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid. Biochim. Biophys. Acta 713: 638-646, 1982.
- 25) Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O.: Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. J. Biol. Chem. 251: 2629-2636, 1976.
- 26) Ochi, K., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Taniguchi, K., Miyamoto T.: Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 258: 5754-5758, 1983.
- 27) Niwa, Y., Sakane, T., Miyachi, Y.: Dissociation of the inhibitory effect of dapsone on the generation of oxygen intermediates—in comparison with that of colchicine and various scavengers. Biochem. Pharmacol. 33: 2355-2360, 1984.
- 28) Niwa, Y.: Neutrophil activation and their release of mediators from the cells. Proceedings of the XVIth International Congress of Rheumatology, ILAR '85. (ed. Brooks, P.M., York, J.R.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1985, p 51-56.
- 29) Michelson, A.M.: Oxygen radicals. Agents Actions (suppl.) 11: 179-201, 1982.
- 30) 丹羽鞆負: SOD, 特集/炎症と抗炎症療法—最近の話題. 医学と薬学 14: 55-67, 1985.
- 31) 丹羽鞆負, 宗宮教壹: 生体の活性酸素と superoxide dismutase に関連した 疾患群および その治療について, 最新医学 39: 339-356, 1984.
- 32) Grankvist, K., Marklund, S., Täljedal, I.-B.:

Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. Nature 294: 158-160, 1981.

33) 丹羽靱負, 宮地良樹, 今村貞夫, 河村甚郎, 朝田

康夫: ヨクイニンの薬理作用機序の検討—活性酸素及び白血球細胞膜リン脂質酵素活性に及ぼす影響—, 皮膚科紀要 81: 321-331, 1986.