薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (11) 1167—1170 (1980)

キンミズヒキ *Agrimonia pilosa* LEDEB. の成分研究 (第 1 報)
n-Hexane 可溶性酸性画分の生物活性について

越浦良三, 宮本謙一, 高田善則, 桐山典城
北陸大学薬学部¹⁾

Studies on the Constituents of *Agrimonia pilosa* LEDEB. I. Biological
Activities of the Acidic Fraction Soluble in *n*-Hexane of the Roots

RYOZO KOSHIURA, KENICHI MIYAMOTO, YOSHINORI TAKADA, and NORIKI KIRIYAMA
Hokuriku University School of Pharmacy¹⁾

(Received May 12, 1980)

On preliminary examination of the constituents and antitumor study on *Agrimonia pilosa* LEDEB. by using HeLa cells, Ehrlich ascites carcinoma, and whole blood of rat, the acidic fraction soluble in *n*-hexane showed strong cytotoxic effect, hemo-agglutinability, and hemolytic action in the absence of protein.

Keywords—*Agrimonia pilosa* LEDEB.; cytotoxic effect; hemo-agglutinability; hemolytic action; acidic fraction; *n*-hexane soluble fraction; HeLa cells; Ehrlich ascites carcinoma; blood of rat

キンミズヒキ (*Agrimonia pilosa* LEDEB., Rosaceae) は、中国において龍牙草または仙鶴草とも称され、古くより利尿, 止痢, 止血, 殺菌, 駆虫, 消毒, 消炎等の目的で、民間治療薬, 漢方薬として広く用いられてきた。²⁾ また、本草綱目³⁾ には、その主治が、癌腫にあるとの記載も見ることが出来、現代中国においても癌治療の処方に組み込まれている。⁴⁾ さらに、近年、本邦においても、佐藤ら⁵⁾ は生薬類の抗腫瘍性スクリーニングテストにおいて、仙鶴草水エキスが培養ヒト子宮頸癌 (JTC-26) に選択毒性を有することを報告している。一方、キンミズヒキの成分研究についても数多くの報告があり、^{6a-e)} その薬効の多くは、5—10% 程度含有される、カテコール系タンニン⁷⁾ によるものであらうとされている。^{6a-e)} また、大和ら^{8a-e)} は、本生薬地下部より agrimonolide を単離し、これが収れん作用物質の 1 つであるとしている。

著者らは、生薬の抗腫瘍性スクリーニングテストにおいて、キンミズヒキの既知成分とは異なると考えられる抽出画分に、興味ある生物活性を認めたので報告する。抗腫瘍性の検討は、HeLa 細胞を用いたコロニー形成法、および、Ehrlich 腹水癌細胞を用いた *in vitro-in vivo* 法によって行われ、その活性の程度を有効成分分離の指標とした。すなわち、福井県勝山市近郊の山野で採取されたキンミズヒキの乾燥根について、Chart 1 に示す抽出分離を行ったところ、ether 抽出部 (III) に強いコロニー形成抑制効果が認められ、また III の 12.5 μ g/ml で処

1) Location: Kanagawa-machi, Kanazawa 920-11, Japan.

2) 江苏新医学院編“中藥大辞典,” 上冊, p. 665; 赤松金芳“新訂和漢薬,” 医歯薬出版, 1970, p. 378.

3) 李 時珍“本草綱目,” 商務印書館, 卷 16, p. 116.

4) 近藤宏二“現代中国の癌医療,” 自然社, 1977, p. 95.

5) 佐藤昭彦, 中野陽典, 田口鉄男, 和漢薬シンポジウム記録 (第 12 回), 1979, 56.

6) a) 田辺 俊, 西川 浩, 日本細菌学雑誌, 9, 475 (1954); b) 高橋三雄, 藤多哲朗, 薬誌, 75, 1567 (1955); c) 江田昭英, 岐阜医紀, 5, 617 (1958); d) M. Yamato, *Kumamoto Pharm. Bull.*, 5, 330 (1962); e) 木村雄四郎, 滝戸道夫, 山内 盛, 薬誌, 88, 1355 (1968).

7) 東 丈夫, 溝淵貫一, 名越規郎, 生薬, 10, 2 (1956); 東 丈夫, 溝淵貫一, 名越規郎, 中井得之, 生薬, 10, 29 (1956).

8) a) 大和正利, 薬誌, 78, 1086 (1958); b) T. Koyama, M. Yamato, S. Ideguchi, *Kumamoto Pharm. Bull.*, 5, 334 (1962); c) M. Yamato, K. Hashigaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 200 (1976).

[]: IC₅₀ (μg/ml), 50% inhibition concentration of colony forming ability of HeLa cells.

Chart 1. Isolation of Cytocidal Constituents from *Agrimoniae* Root

理した Ehrlich 腹水癌細胞を移植したマウスは、対照に比して 32% 生存日数が延長し、25 μg/ml では、5 例中 4 例が 60 日以上延命する等、Ehrlich 腹水癌細胞に対しても強い細胞障害作用が認められた。また、Ehrlich 腹水癌細胞を用いた *in vitro-in vivo* 実験において、細胞の凝集反応を観察したので、以後赤血球に対する影響をも併せて観察した。さらに、III を塩基性部、中性部、酸性部に分離したが、塩基性部は極く微量のため、本研究の対象から除外された。次に、これらの各部を、*n*-hexane 可溶部と不溶部に分離する操作を行ったが、この抽出過程において、ether 可溶性酸性部 (VII)、そしてこれに続く *n*-hexane 可溶部 (VIII) に、HeLa 細胞のコロニー形成抑制効果、赤血球凝集作用、および、溶血作用等の生物活性が集束された。そこで、VIII についてシリカゲル-カラムクロマト (c.c.) を行い、CHCl₃ で溶出し、fraction (fr.) 1—12 に分けたところ、その生物活性について、Table I に示される結果を得た。すなわち、コロニー形成抑制効果は、fr. 4—6 に、赤血球凝集作用については、fr. 3 および、fr. 4 に特に強い活性が認められた。また、溶血作用は fr. 3—11 に渡り広範囲に認められた。しかしながら、これらの活性は、牛血清、または、アルブミン添加により、著しく減弱するか若しくは消失した。一方、このような活性成分を有する *n*-hexane 可溶性酸性部は、根部の他、葉、茎、種子においても、それぞれ、収率 0.38%、0.10%、0.55% で得られるが、根部以外の材料では葉緑素が混入するので、根部を用いた。

以上の如く、キンミズヒキの *n*-hexane 可溶性酸性部は、強い細胞障害作用物質、および細胞凝集作用物質、ならびに、これらが溶血作用を併有するか、または、溶血作用物質を含有することが明らかとなった。さらに、

TABLE I. Biological Activities of Fractionated Samples from Acidic Fraction Soluble in *n*-Hexane (IX) of *Agrimoniae* Root

Fraction No.	IC ₅₀ ^{a)} (μ g/ml)		Hemo-agglutination ^{b)}		Hemolysis ^{c)} (A_{540})	
	serum —	serum +	serum —	serum +	serum —	serum +
IX	1.5	>100	+++	—	0.80	0.19
1	>100		—	—	0.21	0.14
2	>100		—	—	0.37	0.14
3	1.3		+++	—	0.85	0.19
4	0.49		+++	—	0.73	0.21
5	0.47	39.4	++	—	0.73	0.19
6	0.47		++	—	0.83	0.21
7	1.2		++	—	0.76	0.19
8	6.8		++	—	0.77	0.16
9	12.5		++	—	0.76	0.19
10	9.6		++	—	0.91	0.21
11	19.0		++	—	0.83	0.19
12	52.2		±	—	0.20	0.18
Tannic acid	10.5	26.0	—	—	0.24	0.24
Con A	>100	>100	++	+	0.17	0.16
Saponin	11.0	97.9	—	—	0.99	1.11
1% DMSO			—	—	0.17	0.15
PBS			—	—	0.15	0.16

a) 50% inhibition concentration of colony forming ability of HeLa cells.

b) Symbols indicate the degree of hemoagglutination after 1 hr at 18°, —: no or few cell aggregates, ±: 5—10 cell aggregates, +: 10—20 cell aggregates, ++: 20—50 cell aggregates, +++: more than 50 cell aggregates.

c) Absorbancy at 540 nm after 12 hr at 37°.

d) Each fraction was contacted with cells in 10% calf serum free (serum —) or containing (serum +) medium.

これらの物質は全て、強い蛋白結合性を有することが判明した。これらの活性成分はタンニンあるいはサポニン様物質、または, concanavaline aggrutinin (Con A) の如く、植物蛋白とは溶媒親和性を異にするものであり、c.c. による fr.3—6 は、粗製画分ではあるが、その IR スペクトル、および、NMR スペクトルは, agrimonolide^{8a-c)} のそれとも明らかに異なった。本研究の抽出法によれば, agrimonolide は、おそらく *n*-hexane 不溶性酸性部 (IX) に含有されるものと考えられる。

以上の実験結果より、キンミズヒキ中には、従来報告された生理活性物質とは異なる物質が含有されていることが示唆され、これらの生理活性物質もまた、キンミズヒキの薬効の一端に関与しているものと考えられる。これらの活性物質の単離、構造については、現在検討中であり、また、近年、中国において、仙鶴草より、駆條虫作用を有する agrimol 類を得たとの報告がみられる⁹⁾ が、これらとの異同についても近々報告の予定である。

実験の部

原料 福井県勝山市近郊の山野で採取されたキンミズヒキを乾燥後、粉碎して用いた。

キンミズヒキ根の抽出 粉碎したキンミズヒキ根 1 kg を、MeOH 4 l で 5 時間熱抽出、冷後ろ過、ろ液を減圧下濃縮して MeOH エキス (I, 138 g) を得た。I に水および ether を加え、不溶物 (II, 9.3 g) をろ別。ろ液は分離後、ether 層を溶媒留去して、ether エキス (III, 8.7 g) を得、水層からは水を留去して IV を得た。III を ether-10% HCl 水溶液で振盪抽出し、水層より塩基性部を得るも極く微量のため実験には供されなかった。Ether 層を、次いで、10% NaOH 水溶液で抽出し、ether 層からは中性部 (V, 1.75 g) を得、これをさらに、*n*-hexane 可溶部 (VI, 1.65 g)、および、不溶部に分離した。水層を、HCl で酸性にした後、ether 抽出、溶媒留去して VII (6.50 g) を得、これを、*n*-hexane 可溶部 (VIII, 1.40 g)、および、不溶部 (IX, 3.76 g) に分離した。

9) 陳 仲良, 朱 大元, 王 洪斌, 黄 宝山, 奏 国伟, 化学学报, **36**, 35 (1978); 李 良泉, 郑 亚平, 虞 佩琳, 李 英, 盖 元珠, 王 德生, 陳 一心, 化学学报, **36**, 43 (1978).

さらに, VIII (1.00 g) については, シリカゲル-カラムクロマト (c.c.) を行い, CHCl_3 で溶出, 溶出液を 20 ml ずつ分取し, fr. 1—12 を得た.

被検液の調製 各エキスは, 水に難溶のものが多いため, 使用直前に少量の dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解され DMSO の最終濃度が 1% となるように medium 中に添加された. また, 対照薬としての, tannic acid, saponin (以上, 和光純薬製), concanavaline aggrutinin (ConA, 丸善石油より購入) は, pH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) に溶解された.

抗腫瘍実験 1) コロニー形成法——HeLa/C₃ 細胞を, 仔牛血清 10% 含有 Eagle's minimum essential medium (MEM) (増殖 medium) に約 5×10^3 cells/ml となるように調整し, 35 mm plastic petri dish に 2 ml まき, 24 時間後, 各種濃度のエキスを含有する Eagle's MEM, または, 10% 仔牛血清か, 1% 牛血清アルブミン (fraction V) のいずれかを含む Eagle's MEM に medium 交換後, 37° にて 2 時間 incubation し, Hanks' 液にて洗浄後, 再び増殖medium 中, 37° の CO₂ incubator 中, 3 日間培養した. コロニー数は Crystal Violet で染色, 計数され, その効果性は, エキス無添加対照に対して, コロニー形成を 50% 阻止する濃度 (IC₅₀) にて判定された.

2) Ehrlich 腹水癌細胞を用いた *In Vitro-In Vivo* 試験法——既報¹⁰⁾ の方法に従って, 癌細胞 (2×10^6 cells/ml) と各種濃度のエキスを 37° にて 90 分間接触させた後, その 0.5 ml (1×10^6 cells) ずつを, 1 群 5 匹の ddy 系雌マウスの腹腔内に移植し, マウスの生存状況を 60 日間観察し, 各群動物の平均生存日数を対照群のそれと比較した.

ラット赤血球におよぼす影響 1) 赤血球凝集反応——ヘパリン加ラット血液を PBS にて約 50 倍に希釈し, これに各エキス (100 $\mu\text{g/ml}$) を添加し, ガラス製マイクロプレート上, 室温 (18°) にて顕微鏡下観察した. 凝集塊が 5 ケ以下の赤血球よりなるもの: —, 5—10 ケのもの: ±, 10—20 ケのもの: +, 20—50 ケのもの: ++, 50 ケ以上の赤血球からなる凝集塊を形成するもの: +++ と判定された.

2) 溶血反応——上記希釈ラット血液に, エキス (100 $\mu\text{g/ml}$) 添加後, 37° にて 24 時間に渡り観察し, 2500 rpm で遠心後, 上清を 540 nm にて比色し, 溶血の度合いを対照の吸光度 (A_{540}) と比較した.

謝辞 本研究遂行にあたり, 植物の採取, 鑑定について有益な御助言を戴いた, 本学生薬学教室, 富森 毅教授, また, 植物の採取ならびに, 機器分析等で御協力戴いた, 北陸製薬中央研究所の諸氏に深謝致します.

10) 宮本謙一, 早苗富士子, 越浦良三, 土屋 隆, 沢西啓之, 指田春喜, 薬誌, **97**, 1150 (1977).