生薬の生物活性成分に関する研究 Streptozotocin による病態モデルを用いた山茱萸抗糖尿病活性成分の検討¹⁾

山原條二,^{*}^{2a)} 壬生寛之,^{2a)} 沢田徳之助,^{2a)} 藤村 一,^{2b)}
滝野晋吾,^{2c)} 吉川雅之,^{2c)} 北川 勲^{2c)}
京都薬科大学,^{2a)} 岐阜大学医学部,^{2b)} 大阪大学薬学部^{2c)}

Biologically Active Principles of Crude Drugs. Antidiabetic Principles of Corni Fructus in Experimental Diabetes induced by Streptozotocin

JOHJI YAMAHARA,^{2a)} HIROYUKI MIBU,^{2a)} TOKUNOSUKE SAWADA,^{2a)} HAJIME FUJIMURA,^{2b)}
SHINGO TAKINO,^{2c)} MASAYUKI YOSHIKAWA,^{2c)} and ISAO KITAGAWA^{2c)}
Kyoto College of Pharmacy,^{2a)} Misasagi Yamashina-ku, Kyoto, 607, Japan Gifu University
School of Medicine,^{2b)} 40, Tukasamachi, Gifu, 500, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Osaka University,^{2c)} 133-1, Yamadakami, Suita, 565, Japan

(Received July 5, 1980)

Antidiabetic activity of Chinese prescription "Hachimi-Gan" was studied by using diabetic rats induced by streptozotocin. Changes in water consumption, urine volume, blood and urinary glucose were studied in order to examine the activity. "Hachimi-Gan" exhibited the antidiabetic activity, while the boiling water extract of "Hachimi-Gan" was ineffective. Among the components of crude drugs of "Hachimi-Gan," the ether extract of Corni Fructus (The seed of *Cornus officinalis*) was found to be potent for these diabetes rats. Fractionation of the ether extract revealed that ursolic acid showed the antidiabetic activity and oleanolic acid decreased the amount of water consumption and urine volume.

Keywords—Chinese prescription "Hachimi-gan"; antidiabetic activity; Corni Fructus (the seed of *Cornus officinalis*); ursolic acid; oleanolic acid; streptozotocin induced diabetic rats

“八味丸”は排尿異常や口渴などを指標としてしばしば糖尿病にも使用されてきている漢方方剤³⁾である。八味丸の有効性に関する薬理学的研究としては、木村⁴⁾らによって実験的糖尿病に対する報告がなされているが、その有効成分については未だ明らかにされていない。我々は八味丸の抗糖尿病活性成分を明らかにする目的で streptozotocin による病態モデルを用いて検討した。Streptozotocin は実験動物に容易に口渴、多尿、高血糖、および高尿酸などを発症させることが可能であり、現在最も賞用されている糖尿病発症物質である。今回、この streptozotocin を用いる病態モデルによる生物試験を八味丸、八味丸構成生薬、およびその抽出エキス等について行ったところ、八味丸構成生薬の一つである山茱萸のエーテルエキスに活性が認められた。さらに山茱萸エーテルエキスについて活性を指標として分離精製したところ oleanolic acid, ursolic acid に有効性が認められた。以下その結果を報告する。

実験材料および実験方法

八味丸構成生薬は附子を除きいずれも大阪市場品（高砂薬業）を用い、粉末とした後 100 メッシュの篩を通したものを使用した。附子は加工附子末（三和生薬製）を使用した。八味丸の処方構成生薬の混合比は文献記載の用量³⁾にしたがった。また八味丸水製乾燥エキスは常法にしたがい次のように作成した。試料 1 日分に水 500 ml を加え、ビーカー中 45 分間約半量となるまで煎じる。粕を去った後、60° 以下で減圧濃縮後、凍結乾燥して八味丸水製乾燥エキスを得る。山茱萸は次のように分画した。山茱萸 3 kg を細断し、エーテル 5 l で 10 時間冷浸する。ろ過してエーテル抽出液を得、また残渣は新たにエーテル 5 l を加え 10 時間冷浸する。同様の操作を計 3 回行い、得られるエーテル抽出液を合し、溶媒留去して山茱萸エーテルエキス（以下 COE と略称する）18 g

を得る。つぎに COE 18 g を少量の酢酸エチル-メタノール混合溶媒に溶解し、シリカゲル (Merck, 70—230 メッシュ, 50 g) にまぶした後赤外線ランプを照射して乾燥させる。これを 2 kg のシリカゲルを充填したカラムに層積し、クロロホルム、クロロホルム-メタノール混合溶媒 (50: 1—20: 1) で溶出し、分画 COE-fr-1 4 g, COE-fr-2 11 g, および COE-fr-3 2 g を得る。分画 COE-fr-2 11 g を前述の方法でシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 1 kg, クロロホルム-メタノール混合溶媒) を行なう。クロロホルム-メタノール (50: 1) 溶出部 (1.12 g) をエタノールで結晶化し、無色針状晶 (mp 305—308°) として oleanolic acid を得る。さらにクロロホルム-メタノール (50: 1) で溶出した分画 (7.64 g) をメタノールから結晶化し、無色微細結晶 (mp 282—285°) として ursolic acid⁵⁾ (5.2 g) を得た。さらにクロロホルム-メタノール (20: 1) 溶出部をエタノールから結晶化して無色微細結晶 (mp 246—248°) として 2 α -hydroxyursolic acid (0.5 g) を得た。Oleanolic acid, ursolic acid は標品と赤外線吸収スペクトル (日立赤外分光光度計 G-3 型, KBr), 薄層クロマトグラフィー (Pre-coated TLC plate silica gel 60F-254) および混融によって同定した。また 2 α -hydroxyursolic acid はその物理化学的データおよび誘導体の諸データを文献値⁶⁾と比較することによって同定することができた。抗糖尿病作用の試験方法は体重 200 g 前後の Wistar 系雄性ラットを 1 群 10 匹用いて次のように行なった。45 時間絶食後 streptozotocin (Sigma 社, 以下 STZ と略記) 50—65 mg/kg を静脈内注射し、1 時間後第 1 回目の被検薬物を経口投与した。2 日目, 3 日目は午前 10 時と午後 6 時にそれぞれ 1 日 2 回投与し、最終投与は 4 日目の午前 10 時に行なった。最終投与後 3 時間経過した後、腹部大静脈から採血を行なった。なお試料はアラビアゴム末と懸濁させてラットに投与した。また実験開始 3 日目の 19 時から代謝ケージにラットを 20 時間入れ、飲水量, 尿量を測定した。効果の判定は飲水量, 尿量, 血糖値および尿糖値から行なった。血糖値および尿糖値は glucose oxidase peroxidase 法によって行なった。

実 験 結 果

1) 八味丸および八味丸構成生薬の抗 STZ 糖尿病作用の検討

八味丸, 八味丸水エキス, および八味丸構成生薬投与による飲水量, 尿量, 血糖値および尿糖値への影響について検討した。その結果飲水量においては STZ 糖尿病ラットでは正常ラットの約 2.6 倍の飲水量となっているが, 八味丸および山茱萸投与群においては有意に改善されることが判明した。しかし八味丸水エキス, 山茱萸以外の構成生薬は無効であった。尿量, 血糖値および尿糖値においても同様の結果が得られた (Table I-1,2)。

TABLE I-1. Effect of Hachimigan (八味丸) on Water Consumption and Urine Volume in STZ (65mg/kg, *i.v.*)-induced Diabetic Rats

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	Water consumption (ml/20 hr) mean $\pm$ S.E.	Urine volume (ml/20 hr) mean $\pm$ S.E.
Control (untreated)	—	17.6 $\pm$ 5.8	6.2 $\pm$ 2.7
Control (treated)	—	46.4 $\pm$ 5.0	38.6 $\pm$ 8.0
Hachimigan (extract)	2000	45.1 $\pm$ 3.3	35.9 $\pm$ 5.2
Hachimigan (powder)	2000	30.4 $\pm$ 3.6**	24.7 $\pm$ 6.5
Corni Fructus (powder)	2000	23.3 $\pm$ 2.8*****	22.2 $\pm$ 3.2
Dioscoreae Rhizoma (powder)	2000	63.0 $\pm$ 4.3	38.9 $\pm$ 6.8
Alismatis Rhizoma (powder)	2000	53.7 $\pm$ 6.7	35.8 $\pm$ 3.8
Moutan Cortex (powder)	2000	48.3 $\pm$ 5.5	40.5 $\pm$ 4.9
Remanniae Radix (powder)	2000	56.4 $\pm$ 5.9	40.6 $\pm$ 5.2
Hoelen (powder)	2000	50.1 $\pm$ 4.5	37.1 $\pm$ 4.7
Cinnamomi Cortex (powder)	2000	48.1 $\pm$ 4.8	40.7 $\pm$ 4.9
Aconiti Tuber (processed powder)	2000	50.1 $\pm$ 5.6	36.7 $\pm$ 3.6

Each value represents the mean $\pm$ S.E. obtained from 10 rats.

Values significantly different from control are indicated by * (student's test $p < 0.05$);

** ($p < 0.02$); *** ($p < 0.01$); **** ($p < 0.002$); ***** ($p < 0.0001$).

The compound to be tested was administered per orally twice a day for a period of 3 days starting 1 hr after STZ injection.

TABLE I-2. Effect of Hachimigan (八味丸) on Blood Glucose and Urine Glucose in STZ (65 mg/kg, *i.v.*)-induced Diabetic Rats

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	Blood glucose (mg/dl) mean $\pm$ S.E.	Urine glucose (mg/20 hr urine) mean $\pm$ S.E.
Control (untreated)	—	107.8 $\pm$ 17.3	0.0
Control (treated)	—	470.0 $\pm$ 21.3	4733.7 $\pm$ 389.5
Hachimigan (extract)	2000	506.5 $\pm$ 30.1	3817.0 $\pm$ 673.1
Hachimigan (powder)	2000	383.4 $\pm$ 16.9***	2531.8 $\pm$ 351.3*****
Corni Fructus (powder)	2000	393.3 $\pm$ 28.7*	2553.0 $\pm$ 205.1*****
Dioscoreae Rhizoma (powder)	2000	427.8 $\pm$ 48.3	4355.1 $\pm$ 569.1
Alismatis Rhizoma (powder)	2000	468.5 $\pm$ 70.3	5007.4 $\pm$ 579.3
Moutan Cortex (powder)	2000	537.3 $\pm$ 71.9	4855.1 $\pm$ 560.0
Rehmanniae Radix (powder)	2000	453.1 $\pm$ 78.5	4709.1 $\pm$ 512.8
Hoelen (powder)	2000	460.5 $\pm$ 50.1	5040.6 $\pm$ 671.1
Cinnamomi Cortex (powder)	2000	511.9 $\pm$ 67.1	5211.6 $\pm$ 420.5
Aconiti Tuber (processed powder)	2000	458.7 $\pm$ 67.1	5003.7 $\pm$ 456.0

For expressions, see Table I-1.

TABLE II-1. Effect of Corni Fructus on Water Consumption and Urine Volume in STZ (50 mg/kg, *i.v.*)-induced Diabetic Rats

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	Body weight (g) gain	Water consumption (ml/20 hr) mean $\pm$ S.E.	Urine volume (ml/20 hr) mean $\pm$ S.E.
Control (untreated)	—	22.0 $\pm$ 3.1	10.2 $\pm$ 1.2	8.2 $\pm$ 0.3
Control (treated)	—	9.7 $\pm$ 2.6	50.0 $\pm$ 3.2	36.7 $\pm$ 3.0
COE	1000	5.1 $\pm$ 5.6	41.3 $\pm$ 6.4	24.3 $\pm$ 2.3***
COE-fr-1	500	5.0 $\pm$ 2.3	37.9 $\pm$ 5.8	27.9 $\pm$ 4.6
COE fr-2	500	3.9 $\pm$ 4.0	13.8 $\pm$ 3.4*****	13.5 $\pm$ 1.9*****
COE fr-3	500	5.0 $\pm$ 5.3	35.9 $\pm$ 6.3	26.8 $\pm$ 4.4

Average of 10 rats.

For expressions, see Table I-1.

TABLE II-2. Effect of Corni Fructus on Blood Glucose and Urine Glucose in STZ (50 mg/kg, *i.v.*)-induced Diabetic Rats

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	Blood glucose (mg/dl) mean $\pm$ S.E.	Urine glucose (mg/20 hr urine) mean $\pm$ S.E.
Control (untreated)	—	81.7 $\pm$ 1.0	0.0
Control (treated)	—	403.8 $\pm$ 36.6	2916.8 $\pm$ 55.4
COE	1000	356.9 $\pm$ 18.3	1722.7 $\pm$ 281.8***
COE-fr-1	500	416.4 $\pm$ 38.2	1957.7 $\pm$ 225.4***
COE fr-2	500	227.2 $\pm$ 25.3***	978.2 $\pm$ 167.8*****
COE fr-3	500	392.5 $\pm$ 28.5	2525.2 $\pm$ 537.0

Average of 10 rats. For expressions, see Table I-1.

2) 山茱萸エーテルエキス (COE) 中の抗 STZ 糖尿病作用成分の検討

八味丸水エキスに有効性が認められないことから、脂溶性分画に活性成分の存在することが推定される。そこで有効生薬である山茱萸の脂溶性成分分画 COE, COE-fr-1, COE-fr-2 および COE-fr-3 について検討した。そ

TABLE III-1. Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on Water Consumption and Urine Volume in STZ (50 mg/kg, *i.v.*)-induced Diabetic Rats

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	Water consumption (ml/20 hr) mean $\pm$ S.E.	Urine volume (ml/20 hr) mean $\pm$ S.E.
Control (untreated)	—	20.7 $\pm$ 0.9	12.0 $\pm$ 0.4
Control (treated)	—	67.3 $\pm$ 4.9	62.2 $\pm$ 3.8
Tolbutamide	100	74.0 $\pm$ 7.8	63.6 $\pm$ 6.0
Ursolic acid	500	29.8 $\pm$ 3.6*****	24.3 $\pm$ 4.0*****
Oleanolic acid	500	40.5 $\pm$ 5.2*****	34.7 $\pm$ 3.4*****

Average of 10 rats. For expressions, see Table I-1.

TABLE III-2. Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on Blood Glucose and Urine Glucose in STZ (50 mg/kg, *i.v.*)-induced Diabetic Rats

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	Blood glucose (mg/dl) mean $\pm$ S.E.	Urine glucose (mg/20 hr urine) mean $\pm$ S.E.
Control (untreated)	—	128.2 $\pm$ 3.9	0.0
Control (treated)	—	513.2 $\pm$ 35.4	3013.3 $\pm$ 404.2
Tolbutamide	100	498.1 $\pm$ 17.5	3589.4 $\pm$ 425.4
Ursolic acid	500	294.2 $\pm$ 37.2*****	1175.5 $\pm$ 249.2*****
Oleanolic acid	500	491.5 $\pm$ 33.6	2465.1 $\pm$ 303.3

Average of 10 rats. For expressions, see Table I-1.

の結果 CO-E に抗 STZ 糖尿病作用がいずれの実験項目にもみられ、その活性は COE-fr-2 に集約されることが判明した。しかし、COE および COE-fr-2 に表に示したように体重の減少傾向がみられた (Table II-1,2)。

3) Oleanolic Acid および Ursolic Acid の抗 STZ 糖尿病作用

COE-fr-2 の主成分である oleanolic acid, ursolic acid の抗 STZ 糖尿病作用について検討した。その結果 ursolic acid は有効であったが、oleanolic acid は飲水量および尿量の増加を抑制した。比較対照薬 tolbutamide は無効であった (Table III-1,2)。

結 論 お よ び 考 察

八味丸は約 2000 年以前から繁用されて来ている漢方方剤であり、その薬効を今日の視点から考察すると糖尿病に相当する症状にも有効と考えられる。また八味丸が実験的糖尿病に有効であるとの報告⁹⁾がなされているが、その有効成分はまだ明らかとされていない。そこで STZ 病態モデルを用いて検討した結果、八味丸構成生薬の 1 つである山茱萸の含有成分の ursolic acid に抗糖尿病活性が、oleanolic acid に飲水量および尿量の増加を抑制する効果がそれぞれ認められた。これら ursolic acid および oleanolic acid はいずれも脂溶性成分であり、熱水では抽出困難と考えられる。このことは八味丸水エキ스가本病態モデルに対して無効であった結果とよく一致する。八味丸水エキスについて製造法等、製剤上問題が含まれていると思われる。一方、民間薬として連銭草 (*Glechoma hederacea* L. var. *grandis* (A. GRAY)) が糖尿病に使用される場合があるが、連銭草には約 2% oleanolic acid が含有⁷⁾されており、これが作用成分の 1 つではないかと考えられる。一方、oleanolic acid, ursolic acid がどのような作用機序で、効果を示すのかは現在のところ不明であるが、STZ 糖尿病や alloxan 糖尿病においては動物の飼料を制限することによっても糖尿病⁹⁾の改善が見られることから摂食阻害作用等の観点からも考慮する必要がある。また八味丸は今回用いた STZ 病態モデルのような若年型の糖尿病に使用されるよりも老人型の糖尿病の場合に使用されることが多く実験モデルについてもさらに検討が必要である。八味丸の薬効を今回の結果のみで判断することは危険と考えられ、さらに自然発生モデルなどの種々の糖尿病モデルを用いて多角的な検討を行なっている。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第100年会で発表, 東京, 1980年4月.
- 2) Location: a) *Misasagi Yamashina-ku, Kyoto, 607, Japan*; b) *40, Tukasamachi, Gifu, 500, Japan*; c) *133-1, Yamadakami, Suita, 565, Japan*.
- 3) 厚生省薬務局監修, “一般用漢方処方の手引,” 薬業時報社, 東京, 1975, p. 210.
- 4) 木村正康, 和漢薬シンポジウム集録, **1**, 14 (1967).
- 5) 遠藤 徹, 田口平八郎, 薬誌, **93**, 30 (1973).
- 6) A.T. Glen, W. Lawrie, J. Molean, M. El-Garby Younes, *J. Chem. Soc (C)*., **1967**, 510.
- 7) 東京生薬協会編, “新常用和漢薬集,” 南江堂, 東京, 1973, p. 140.
- 8) 山原條二, 未発表データ.
- 9) 宇井理生, 蛋白質核酸酵素臨時増刊, **24**, 14 (1979).

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (1) 90-93 (1981)

フラン誘導体の研究 (第11報¹⁾) ニトロフラン誘導体の抗腫瘍性試験

臼井敏直

城西大学薬学部²⁾Studies on Furan Derivatives. XI.¹⁾ Test for Antitumor Activity of Nitrofuran Derivatives

TOSHINAO USUI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,²⁾
1-1 Keyakidai, Sakado-shi, Saitama 350-02, Japan

(Received August 5, 1980)

Preliminary examination of antitumor screening of 20 nitrofuran derivatives was carried out with mice bearing Ehrlich ascites tumor. Among these compounds, 2-[β -(5-nitro-2-furyl)ethynyl]-furan (**1**) and 3-(5-nitro-2-furyl)-2-phenyl-quinoxaline 1,4-dioxide (**14**) exhibited a fair antitumor activity.

Keywords—nitrofuran derivatives; 2-substituted 5-nitrofuran derivatives; anti-tumor activity; Ehrlich ascites tumor; total packed cell volume method

近年ニトロフラン誘導体の変異原性³⁾ および発癌性⁴⁾ に関する報文が多く見受けられ, このような生物活性を誘起する本態は一般にニトロフラン環のニトロ基が還元的に代謝された活性物質であろうと考えられている. 事実その活性代謝物は DNA, RNA, タンパク質, および脂質と結合しうる事が示された.⁵⁾ このような高分子への活性代謝物の取込みに注目すれば, ニトロフラン類は癌細胞に対しても何らかの毒性を示すものと推察される. 一方ニトロフラン誘導体の制癌作用は, Friedgood 等⁶⁾ により初めて示され, 我国では水野等⁷⁾ が一連のフラン誘導体のスクリーニング試験を行った. その後にもニトロフラン誘導体の制癌性に関する報告が見受けられる.⁸⁾

著者等はこれまで α -substituted β -(5-nitro-2-furyl)vinylamine 類を主原料とし, 各種のニトロフラン誘導体の合成, および抗菌性について報告してきた.^{1,9)} 今回は, 構造と制癌性, および抗菌性と制癌性との関係を知るため, 20 種のニトロフラン誘導体の Ehrlich 腹水癌に対する一次スクリーニング試験を行ったので報告する.