薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (9) 997-1003 (1984)

鼈の研究 (第1報) スッポン抽出物のマウス細小血管に対する効果について

難波恒雄,^{*,a} 服部征雄,^a 竹花美博,^a 荒山久美子,^a

松繁克道,^b 木村郁子,^c 木村正康^c

富山医科薬科大学和漢薬研究所,^a 千葉大学薬学部,^b 富山医科薬科大学薬学部^c

Studies on Soft-Shelled Turtles. I. Effects of Various Fractionated Extracts from *Trionyx Sinensis* WIEGMANN on Isolated Mesenteric Veins in Mice

TSUNEO NAMBA,^{*,a} MASAO HATTORI,^a YOSHIHIRO TAKEHANA,^a KUMIKO ARAYAMA,^a
KATSUMICHI MATSUSHIGE,^b IKUKO KIMURA^c and MASAYASU KIMURA^c

Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University,^a

2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba

University,^b 1-33, Yayoicho, Chiba 260, Japan and Faculty of Pharmaceutical

Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University,^c

2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan

(Received April 16, 1984)

Powdered whole bodies, internal organs, flesh and shell of soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis* WIEGMANN) were extracted with 60% ethanol, and fractionated by gel filtration. By pharmacologically sequential bioassay on the isometric tension in isolated mouse mesenteric veins, we obtained three types of fractions which showed (1) a contraction by itself, (2) a potentiation of and (3) an inhibition of noradrenaline (NA)-induced contractions. The third fraction was further fractionated by ion exchange chromatography into two components which inhibited the NA-induced contraction in a non-competitive mode or in a mixed type of competitive and non-competitive modes.

Keywords—soft-shelled turtle; *Trionyx sinensis*; isolated mouse mesenteric vein; contraction; inhibition; potentiation

スッポンは、中国において「鼈 (ベツ)」と称し、非常に古くから食物や薬物として利用されてきた。²⁾ 特にスッポン類の背甲を乾燥した「鼈甲 (ベッコウ)」は『神農本草経』の中品に収載され、心腹の癥瘕や熱を解し、また経閉時の腹痛、腰痛の治療薬とされている。³⁾ また『名医別録』には「鼈肉 (ベツニク)」が収載され、内臓諸器官の異常を治し、気力を益し、不足を補う薬とされており、食品としても保温、精力増強効果があるとされている。⁴⁾ その他唐代以降、脂、頭、頭血、卵、爪、胆などあらゆる部分を薬用としている。⁵⁾

しかし、これらの薬効の本体については全く不明で、化学的および薬理学的研究はほとんどなされていない現状である。

本研究では、特にスッポン類の保温効果に着目し、細小血管の収縮効果および弛緩拡張効果を対象に、スッポン全体、臓器、肉、甲羅粉末から得た各分画の作用を薬理学的に検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

実験材料

台湾産養殖シナスッポン *Trionyx (Amyda) sinensis* WIEGMANN をそのままあるいは内臓、肉、甲羅に分け、凍結粉碎し 200 mesh 以下の微粉末としたものを用いた。

試料の調製

1. スッポン全体からの調製 B-11, B-110——スッポン全体の粉末 B-1 200 g に ether 400 ml を加え、室温下、攪拌しながら2時間抽出した。この操作を2回行った後、さらに ether 400 ml を加え24時間冷浸した。抽出液を合せ、減圧濃縮し油状物質 B-110 50 g を得た。また残渣から ether を除き脱脂スッポン末 B-11 150 g を得た。

B-112, BA-111, BB-111——脱脂スッポン末 B-11 140 g に 60% EtOH 400 ml を加え, 37°C, 2 時間抽出した. 遠心分離 (4000 rpm, 30 分, 20°C) により 60% EtOH 可溶画分 BA-111, 不溶画分 B-112, および両層の中間をなす油状物質を中間画分 BB-111 とした. これらは, 減圧濃縮後 (37°C 以下), あるいは直接, 凍結乾燥によりそれぞれ 19.1 g, 110 g, 5.6 g の収量で得た.

BAA-111, BAO-111, BAP-111——60% EtOH 可溶画分 BA-111 17 g を約 5 g ずつ Sephadex G-25 (ファルマシア) カラム (6.0×80 cm) に負荷した後, 水で溶出させフラクションコレクターを用いて 15 ml ずつ分取した. 270 nm およびフェノール試薬 (Folin Ciocalteu Reagent, 和光純薬工業) の発色による 750 nm の吸光度をモニターとして溶出順に, 高分子画分 BAP-111, 低分子画分 I BAA-111, 低分子画分 II BAO-111 に分け (Fig. 2 参照), 凍結乾燥を行った. BA-111 17 g から BAP-111 10.5 g, BAA-111 3.69 g, BAO-111 181 mg を得た.

BA-112, BB-112——B-112 100 g に水酸化バリウム ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 252 g, 水 400 ml を加え 67°C 2 時間反応させた. 2 N H_2SO_4 で中和し, 遠心分離により硫酸バリウムの沈澱を除いた. この上澄に EtOH を加え, 60% EtOH 溶液とした後, 80°C, 1 時間還流した. 遠心分離により可溶画分, 不溶画分に分け, それぞれ凍結乾燥により BA-112 22.1 g, BB-112 3.3 g を得た.

BAA-112, BAO-112, BAP-112——BA-112 20 g はさらに 5 g ずつに分け Sephadex G-25 カラム (6.0×80 cm) に負荷し, 試料 BAA-111, BAO-111, BAP-111 の調製と同様の操作により高分子画分 BAP-112 18 g, 低分子画分 I BAA-112 900 mg, 低分子画分 II BAO-112 181 mg を得た (Fig. 2 参照).

BAM-1, BAM-2——数十回の繰り返し操作から得た BAA-111 と BAO-111 を合せ BAM-1 62.7 g とした. このうち 30 g を 5 g ずつに分け再び Sephadex G-25 カラム (8.0×78 cm) を用いゲル濾過を行い BAP-2 (溶出の早いもの), BAM-2 (溶出の遅いもの) に分画し, それぞれ凍結乾燥により 13.5 g, 11.5 g を得た.

IR 120-1, IR 120-2——BAM-2 0.95 g を Amberlite IR 120B 陽イオン交換カラム (1.8×18 cm, H^+ 型) に負荷し水 150 ml, 50% EtOH 150 ml, 10% アンモニア溶液 250 ml の順に洗い流した. 水と 10% アンモニア溶液により着色物質が溶出した. これらを濃縮後, 凍結乾燥し, 水溶出画分 IR 120-1 0.20 g, アンモニア溶出画分 IR 120-2 0.14 g を得た.

IR 400-1, IR 400-2——BAM-2 1 g を Amberlite IR-400 陰イオン交換樹脂カラム (1.8×18 cm, OH^- 型) に負荷しカラムを水 150 ml, 50% EtOH 150 ml で洗い, 最後に 1 N HCOOH 250 ml で洗い流した. 着色物質のほとんどが水で溶出し, わずかな着色物質がギ酸で溶出した. ギ酸溶出画分は水を加え数回減圧濃縮した. 各々を凍結乾燥し水溶出画分 IR 400-1, 0.48 g, ギ酸溶出画分 IR 400-2 0.39 g を得た.

2. スッポン肉からの調製 B-21——スッポン肉を凍結粉碎したもの 50 g を ether 500 ml に懸濁し, 時々振り混ぜながら 37°C, 4 時間抽出した. 抽出物を濾過し, 残渣はさらに CHCl_3 -MeOH (2:1) 混液 450 ml と 37°C 2 時間加温後, 室温, 一晚放置した. これを濾過し, 残渣を再び CHCl_3 -MeOH (2:1) 450 ml で 37°C 6 時間抽出した. 不溶物を濾取, 乾燥後, 脱脂スッポン肉粉末 B-21 を得た.

B-210, B-212, BA-211, BAA-211, BAO-211, BAP-211——脱脂スッポン肉粉末 15 g に $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 22.8 g, 水 60 ml を加え攪拌しながら 65°C, 2 時間保った. 2 N H_2SO_4 で中和後, 沈澱を遠心分離にて除去, 上澄を減圧濃縮し, 凍結乾燥により淡褐色粉末 B-210 を得た. これを水 10 ml, EtOH 30 ml の混液に懸濁し 80°C, 10 分間加熱攪拌した後, 0°C で一晚放置した. 上澄と下層の油状物質を分離し, それぞれ溶媒を減圧留去後, 凍結乾燥して上澄から BA-211 1.0 g, 下層から B-212 2.1 g を得た. BA-211 500 mg を Sephadex G-25 カラム (5.6×80 cm) に負荷し, 水で溶出, 10.8 ml ずつ分取した. フラクション 50—100 を集め減圧濃縮後, 凍結乾燥し BAP-211 203 mg を得た. 同様にフラクション 101—130, フラクション 131 以降から, それぞれ BAA-211 153 mg, BAO-211 44 mg を得た.

3. スッポン内臓からの調製 B-31——スッポンの内臓を凍結粉碎したもの 50 g をスッポン肉粉末の場合と同様に脱脂し B-31 を得た.

B-310, BA-312, B-312——脱脂スッポン内臓粉末 B-31 15 g に $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 22.8 g, 水 60 ml を加え攪拌しながら 65°C, 2 時間反応した. 2 N H_2SO_4 で中和, 遠心分離により沈澱を除き, 上澄を濃縮後, 凍結乾燥し淡褐色物質 B-310 7.0 g を得た. これを再び水 10 ml に溶解, EtOH 30 ml を加え, 80°C 10 分間加熱攪拌した. 室温一晚放置後, 遠心分離により上層の EtOH 可溶画分 BA-312 と下層の油状物質 B-312 に分け, それぞれ濃縮, 凍結乾燥により前者を 2.6 g 後者を 1.1 g の収量で得た.

4. スッポン甲羅からの調製 BA-411, BB-411——スッポン甲羅粉末 45 g に水 300 ml を加え, 100°C, 6 時間加熱した. 放冷後, 遠心分離により可溶性画分 BA-411 12.0 g と不溶性画分 BB-411 29.1 g を得た.

薬理活性の検定法

ddY 系マウス (♂, 7—9週令, 28.5—38 g) の摘出した腸間膜静脈を管状のまま, 5 ml の Krebs 液 (mm: NaCl 122.0, KCl 5.9, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 15.5, glucose 11.5) 中に荷重 85—100 mg をかけて, U ゲージ (新興通信工業, UL-2-240) に懸垂した. Krebs 液は 37°C に保温し, 95% O₂+5% CO₂ の混合ガスを通気した. 発生する張力は U ゲージ, アンプ (三栄測器, Biophysigraph 180 system), 直流アンプ (三栄測器, 6L5) を経て, ペンレコーダー (三栄測器, Rectigraph 8S) 上に記録した. 用いた薬物は *dl*-noradrenaline 注射液 (NA, 三共) で, 10 ng/ml—10 µg/ml を 50 µl ずつ累積的に反応槽内に投与した. スッポン画分は水溶液又は水性懸濁液として, 5分間前投与した. 単独収縮作用を示す分画の場合は累積的に投与した.

結 果

試料の分画

Fig. 1 に示すように脱脂したスッポン粉末および肉, 内臓粉末は 60% EtOH で抽出し, 可溶画分と不溶画分に大別し, 可溶画分はさらにゲル透過により高分子画分, 低分子画分 I および II に分離した. また不溶画分は林らの方法^{8,9)}に準じて水酸化バリウムで水解後, 中和, さらに 60% EtOH で抽出した. 一方, スッポン粉末から得た 60% 可溶の低分子 I および II は再び合せゲル透過を行った後, 陽イオンおよび陰イオン交換樹脂による分画を行った.

マウス腸間膜静脈に対する作用

マウス腸間膜静脈は非常に細く, かつ柔らかく, 大動物の細小血管に類似する点がみられるので実験に用いた. また生理的状态で, 血管支配神経の主な化学的伝達物質である NA を用いて収縮させ, その収縮反応に及ぼす効果を検討した.

スッポンの全体, 肉, 内臓の粉末から得た各分画についての NA 収縮抑制反応のデータを Table I に示した. ここで最大収縮反応の抑制 % と ED'_{50}/ED_{50} 即ち各分画共存下の NA 曲線の ED'_{50} と不在下の ED_{50} の比が示されている. $ED'_{50}/ED_{50} \div 1$ で最大反応が抑制されている場合は非競合的拮抗を示し, $ED'_{50}/ED_{50} > 1$ で, 最大反応が抑制されない場合は競合的拮抗を示す. $ED'_{50}/ED_{50} > 1$ で最大反応も抑制される場合は混合型拮抗を意味

Fig. 1. Fractionation Procedures of Powdered Whole Bodies of Soft-Shell Turtles (*Trionyx sinensis* WEIGMANN)

TABLE I. Inhibitory Effects of Various Fractions from Soft-shelled Turtles on the Noradrenaline Induced Contraction in Isolated Mesenteric Veins of Mice

Samples	n^a	Concentration (mg/ml)	Inhibition ^b (%)	ED'_{50}/ED_{50}^c
Whole bodies				
B-1	2	0.5	-2.5	1.5
—hot water extract	2	0.5	8.9	1.0
B-11	1	0.5	0	2.0
—B-110	1	0.5	30.0	2.0
—BA-111	3	0.5	37.0 ± 2.3	1.8 ± 0.6
—BAP-111	3	0.5	26.7 ± 5.9	2.2 ± 0.2
—BAA-111	3	0.5	42.9 ± 10.3	2.3 ± 0.8
—BAO-111	3	0.5	68.8 ± 9.6	4.9 ± 2.6
—BB-111	3	0.5	4.3 ± 1.6	1.2 ± 0
—B-112	3	0.5	9.4 ± 6.8	1.0 ± 0.3
—BB-112	2	0.5	19.6	2.3
—BA-112	1	0.5	0	2.0
—BAP-112	2	0.5	-6.3	1.2
—BAA-112	1	0.5	30.0	2.0
—BAO-112	1	0.5	0	1.0
<hr/>				
BAA-111—BAM-1	5	0.5	50.2 ± 6.9	1.9 ± 0.5
BAO-111—BAM-2	5	0.5	25.0 ± 5.7	1.9 ± 0.2
—IR120-1	5	0.1	15.6 ± 4.5	1.2 ± 0.1
—IR120-2	5	0.5	72.0 ± 7.2	3.9 ± 0.9
—IR400-1	5	0.5	-12.0 $\pm$ 3.5	1.3 ± 0.1
—IR400-2	4	0.5		5.7 ± 0.7
	3	1.0	33.6 ± 5.8	10.2 ± 1.8
<hr/>				
Flesh				
B-2	2	0.5	22.2	2.0
B-21	1	0.5	10.0	1.0
—B-210	1	0.5	50.0	1.0
—BA-211	3	0.5	45.1 ± 6.6	2.1 ± 0.4
—BAP-211	3	0.5	-6.9 ± 7.7	1.3 ± 0.2
—BAA-211	3	0.5	24.6 ± 3.9	1.7 ± 0.5
—B-212	2	0.5	32.2	1.4
—BA-212	1	0.5	20.0	3.0
<hr/>				
Internal organs				
B-3				
B-31				
—B-310				
—B-312				
—BA-312	3	0.5	29.0 ± 6.5	3.9 ± 0.7

^a) n : number of experiments. ^b) percent inhibition for the NA-induced maximum contraction. ^c) ED_{50} : 50% contractile dose in the NA dose-responses curve. ED'_{50} ; ED_{50} in the presence of the extracts administrated before 5 min.

Fig. 2. Sephadex G-25 Elution Profiles of 60% EtOH Soluble Fractions

Fig. 3. Typical Data Showing the Effects of Soft-Shell Turtle Powder Extracts in Isolated Mesenteric Veins of Mice

10 ng/ml (1), 30 ng/ml (2), 0.1 μ g/ml (3), 0.3 μ g/ml (4), 1 μ g/ml (5), 3 μ g/ml (6) and 10 μ g/ml (7) noradrenaline (NA) were cumulatively administered. Control (C) means the administration of distilled water. a: Increasing effects of 0.5 mg/ml IR 120-2 fraction on the NA-induced contraction. b: Contractile responses induced by 0.01, 0.1 and 1 mg/ml IR 400-1 fraction cumulatively administered. c: Inhibitory effects of 0.5 mg/ml IR 120-1 fraction on the NA-induced contraction. d: The same effect of 0.5 mg/ml IR 400-2 fraction as c.

する。一方、最大反応が増加された場合は負号をつけてある。

スッポン粉末エキスの場合 (Table I の破線より上の最上段の欄) 低分子画分 I BAA-111 および II BAO-111 が最も強い抗 NA 作用を示し、混合型の拮抗パターンを示した。

スッポン肉粉末から得た分画の場合 (Table I の下から二段目の欄), Ba(OH)₂ 処理-60% EtOH 可溶画分 BA-211 が最も強い抗 NA 作用を示し、やはり混合型を示した。

スッポン内臓粉末から得た分画の場合 (Table I の最下段の欄), Ba(OH)₂ 処理-60% EtOH 可溶画分 BA-312 が抗 NA 作用を示した。

甲羅粉末から得た BA-400 画分 0.5 mg/ml に単独収縮作用, 抗 NA 作用, NA 反応増強作用はなかった。

以上, スッポン粉末からの分画 BAO-111 が肉や内臓粉末からの分画 BA-211 や BA-312 よりも抗 NA 作用が強いという結果が得られたので, BAA-111, BAO-111 をさらに分画して得た IR 120-1, IR 120-2, IR 400-1, IR 400-2 の 4 分画について検討を加えた。

まず, これらの画分の作用の典型的データを Fig. 3 a—d に示す。

Fig. 4. Cumulative log Concentration-Contraction Curves for NA with (●) or without (○) 0.5 mg/ml IR 120-2 Fraction (Means $\pm$ s.e., $n=5$)

Note that this fraction increased the intrinsic activity of NA.

Fig. 6. Cumulative log Concentration-Contraction Curves for NA with (●) or without (○) 0.1 mg/ml or 0.5 mg/ml IR 120-1 Fraction (Means $\pm$ s.e., $n=5-10$)

Note that this fraction inhibited non-competitively the NA-induced contraction.

Fig. 5. Cumulative log Concentration-Contraction Curves for IR 400-1 Fraction

Isometric contractions are expressed as a percentage of the maximal contraction by NA (means $\pm$ s.e., $n=5$).

Fig. 7. Cumulative log Concentration-Contraction Curves for NA with (●) or without (○) 0.5 mg/ml or 1.0 mg/ml IR 400-2 Fraction (Means $\pm$ s.e., $n=3-12$)

Note that this fraction shifted the NA curve in a mixed type of competitively and non-competitively inhibitory patterns.

IR 120-2 0.5 mg/ml の前投与で NA の最大反応が明らかに増強された (Fig. 3a, 4). しかし低濃度側の NA に対しては、むしろ抑制作用を示したが理由は不明である. NA 反応増強作用についてはスポン粉末の高分子画分 BAP-112, 肉粉末の高分子画分 BAP-211 にのみ作用がみられた (Table I).

IR 400-1 の 0.01, 0.1, 1.0 mg/ml の累積的用量で収縮反応が得られた (Fig. 3b, 5).

IR 120-1 0.1, 0.5 mg/ml の 5 分間前投与により濃度依存的に NA が拮抗された (Fig. 3c, 6). この分画はスポン粉末画分 BAO-111 より, NA 最大反応の抑制がやや強く, 非競合型拮抗を示した.

IR 400-2 の 0.5, 1.0 mg/ml の 5 分間前投与により, 濃度依存的に NA が拮抗された (Fig. 3d, 7). IR 120-1 の場合と違って混合型拮抗を示した.

考察および結論

スポン粉末からマウス腸間膜静脈の NA 収縮作用を増強する画分と, 抑制する画分と, 単独で収縮作用を示す画分の 3 種類の活性画分を分離できた. さらに抑制作用を示す画分が競合非競合の混合型であるものと, 非競合的なものとに分離された. 前者は血管において NA と同一作用点で拮抗している成分を含む可能性が示唆された. 林らはオットセイの肉の酵素および水酸化バリウム水解物からカロペプチドを抽出し, 家兎の眼底血管などの拡張作用を報告した.⁷⁾ 著者らはスポン粉末をこれに準じた方法で分画したが, 血管収縮抑制作用を生じ

た分画はペプチド (高分子画分に溶出される) ではなく低分子であった。高分子画分には血管の NA 収縮増強作用があり, 別の画分には血管収縮作用が認められた。

謝辞 スッポン材料の提供および研究費の一部を援助された岩谷産業株式会社に感謝する。また本研究の一部を分担した垣内信子博士 (富山医科薬科大学和漢薬研究所) に感謝する。

引用文献および注

- 1) 本研究の一部は日本生薬学会第 29 年会 (1982, 講演要旨集 p. 24) および日本薬学会第 103 年会 (1983, 講演要旨集 p. 267) において発表した。
- 2) 鼈の史的考察に関してはすでに日本薬学会第 102 年会 (1982, 講演要旨集 p. 104) において発表した。
- 3) 森立之重輯, “神農本草経,” 卷中, 群聯出版社, 上海, 中国古典医学叢刊本 1955, p. 77.
- 4) 唐慎微等編, 岡西為人, 難波恒雄, 李煥榮考訂, “経史證類大観本草,” 第 21 卷, 国立中国医薬研究所, 新店 (台湾), 1971, p. 478.
- 5) 李 時珍著 “本草綱目,” 卷 45, 介部, 人民衛生出版社, 北京, 1963, pp. 1406—1409.
- 6) 特許公報, 昭 43—1970, 昭 44—1283.
- 7) T. Hayashi, T. Otsuka, S. Aikawa, H. Hoshino, *Keio J. Medicine*, **15**, 227 (1966).