桃仁の研究 (第2報) 桃仁の水抽出成分の薬理作用

有地 滋,^a 久保道德,^a 谿 忠人,^a 中村秀雄,^{*,b} 元吉 悟,^b
石井勝美,^b 今津千恵子,^b 世戸康弘,^b 門河敏明,^b
永本典生,^b 難波健輔,^b 西村温樹^b

近畿大学東洋医学研究所,^a 大日本製薬株式会社総合研究所^b

Studies on Persicae Semen. II. Pharmacological Activity of Water Soluble Compositions of Persicae Semen

SHIGERU ARICHI,^a MICHINORI KUBO,^a TADATO TANI,^a HIDEO NAKAMURA,^{*,b}
SATORU MOTOYOSHI,^b KATSUMI ISHII,^b CHIEKO IMAZU,^b YASUHIRO SETO,^b
TOSHIAKI KADOKAWA,^b NORIO NAGAMOTO,^b KENSUKE NANBA,^b
and HARUKI NISHIMURA^b

*The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University,^a 380, Nishiyama,
Sayama-cho, Minamikawachi-gun, Osaka, 589, Japan and Research
Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.,^b 33-94,
Enoki-cho, Suita, Osaka, 564, Japan*

(Received April 30, 1985)

Effects of protein compositions of Persicae semen on inflammation, allergy and blood coagulation were investigated in experimental animals. Tohnin sen is lyophilized powder of boiling water extracts of Persicae semen, and PR-A and PR-B (mol. wt.=about 300 000 and 10 000, respectively) are proteins purified from the water extracts.

(1) PR-A and PR-B showed strong inhibitory activity on hind paw edema induced by carrageenin in rats, and their potency ($ED_{50}=1.08$ and 0.100 mg/kg, *i.v.*, respectively) was superior to or comparable to that of indomethacin and much stronger than that of Tohnin sen. (2) PR-A (2.5 mg/kg, *i.p.*), PR-B (0.5 mg/kg, *i.p.*) and Tohnin sen (300 mg/kg, *p.o.*) produced a significant inhibition of granuloma formation induced by felt-pellet implantation in rats; the activity of PR-B was approximately comparable to that of indomethacin (1—2 mg/kg, *p.o.*). (3) When injected into the carboxymethyl cellulose pouch, PR-B (0.1 to 10 mg/pouch) enhanced exudation of serum protein; PR-B but not PR-A, unlike indomethacin, enhanced leucocyte emigration. (4) PR-A, PR-B or Tohnin sen did not show any significant inhibitory activity on vascular permeability and on adjuvant arthritis; and also PR-B did not potentiate the anti-arthritic action of prednisolone. (5) PR-A and PR-B (10 mg/kg, *i.p.* each), like indomethacin, did not show any inhibitory activity on passive cutaneous anaphylaxis and on delayed type hypersensitivity in mice. (6) Tohnin sen (100 mg/kg, *p.o.*) and PR-B (20 mg/kg, *i.p.*) did not influence on the blood coagulation time and on erythrocyte absorption from the tissue with internal hemorrhage, respectively, in rats. (7) PR-A and PR-B showed anti-writhing activity at doses of until 5 and 0.1 mg/kg, *i.v.*, respectively, in mice, and the anti-writhing ED_{50} -value of Tohnin sen was 43.3 mg/kg, *p.o.*

These results demonstrate that PR-A, PR-B and Tohnin sen have anti-edema, anti-granulation and anti-writhing activities, and that their pharmacological profile was dissimilar to that of non-steroidal anti-inflammatory drugs such as indomethacin.

Keywords—Persicae semen; anti-inflammatory protein; carrageenin hind paw edema; granuloma formation; analgesic; anti-inflammatory; anti-allergy; blood coagulation

緒 言

東洋医学では「証」という独特の病態診断法に基づいて漢方薬が処方されており、その重要な「証」の1つに

「瘀血証」がある。「瘀血症」は、現象的には末梢循環障害によるうっ血状態と推察される症候群であると考えられている。¹⁾ 臨床的に瘀血として捉えられるものとして、他覚的に顔面の汚色、細絡 (vascular spider)、皮膚粘膜の紫斑点、爪甲の紫色、歯齦の暗赤色、内出血、腹部圧痛、のぼせ、いらいらなどがある。瘀血の誘因としては、外傷、手術、出血、炎症など各種の器質的・機能的異常が挙げられており、瘀血と免疫、炎症、血液凝固系との係わりも推察されている。しかし、現在迄のところ、「瘀血症」に関する西洋医学的解明が十分になされているわけではない。

「瘀血証」に対する治療を目的に使われる漢方薬、すなわち、「駆瘀血薬」として種々の方剤がある。これらの方剤に使用される生薬は、桃仁、当帰、川芎、芍薬、牡丹皮、沢瀉など数多くある。これらの駆瘀血方剤又は生薬の有効成分の薬理学的性質が明らかになることは、逆に「瘀血証」の解明にとって有意なことでもある。代表的な駆瘀血生薬の1つである桃仁の有効成分に関する研究はこれまでにみなされており、抗炎症作用を有する成分も報告されている。^{2,3)} このような事実に基づいて、抗炎症活性を有する成分を見出す目的で桃仁の有効成分の研究を行った。その結果、桃仁の有機溶媒抽出分画には顕著な抗炎症活性を見出すことが出来なかった。しかし、煎じることに近い方法、すなわち、水抽出法で得た成分の中で蛋白性成分が強力な抗浮腫活性を有することを見出した。⁴⁾ そこで、桃仁を含む方剤の臨床服用形態に対応させた桃仁の熱水抽出物、並びに水抽出性成分である蛋白性成分について、炎症、アレルギー、痛み及び血液凝固に対する作用について検討したので報告する。

実験方法及び材料

I. 急性炎症 1. ラット Carrageenin 足蹠浮腫⁵⁾——体重 110—130 g の Wistar 系雄性ラットの右側後肢足蹠皮下に 1% carrageenin を注射して足蹠浮腫を惹起した。Carrageenin の注射直前及び注射後 2 及び 3 時間に足容積を水置換法により測定した。被検体は 0.5% トラガント水溶液に懸濁して経口投与するか、又は、生理食塩水に溶解して carrageenin 注射 1 時間前に静脈内投与した。Carrageenin 注射 3 時間後において、vehicle 投与対照群の平均足蹠腫脹率より 25% 以上低い腫脹率を示したラットを有効とみなし、その有効率から Litchfield and Wilcoxon 法⁶⁾ に従い抗 carrageenin 浮腫の ED₅₀ 値を算出した。Vehicle 投与対照群の有効ラットは、320 匹中 4 匹であった。

2. マウス酢酸誘発血管透過性⁵⁾——Std: ddY 系雄性マウス (体重 23—30 g) に 0.5% Evan's blue 10 ml/kg を静脈内投与し、その直後に 0.6% 酢酸 0.25 ml/マウスを腹腔内投与した。色素の注入 30 分後に頸椎を脱臼し、開腹したのち生理食塩水 5 ml で腹腔内を洗浄し、洗液に蒸留水を加えて全量を 10 ml とした。この洗液を 2 500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の色素量を 610 m μ の吸光度で測定した。被検体は色素注入 30 分前に経口投与した。

3. ラット CMC Pouch 法による白血球遊走及び蛋白浸出⁷⁾——体重 150—190 g の Wistar 系雄性ラットの背部皮下に空気 5 ml を注入し、空気嚢を作製した。翌日、空気嚢の中に生理食塩水に溶解した 2% carboxymethyl cellulose (CMC) 水溶液 5 ml を注入した。CMC 注入 6 時間後に CMC pouch 内液を 0.2 ml 採取し、0.1 ml は白血球数の算出に、残りの 0.1 ml は蛋白質の定量に使用した。なお、蛋白質の定量は Lowry の方法⁸⁾ に従った。被検体は CMC 水溶液に溶解して局所投与した。

II. 亜急性・慢性炎症 1. ラット Felt-Pellet 肉芽腫形成⁹⁾——体重 170—190 g の Wistar 系雄性ラットを使用した。Hexobarbital Na 麻酔下にラットの背部皮下に 35 $\pm$ 1 mg の滅菌 felt-pellet を 2 個植え込み、その 5 日後に肉芽腫を摘出した。摘出した肉芽腫は 65°C で 48 時間乾燥し、各乾燥肉芽腫重量より 35 mg を差し引き、felt-pellet 1 個当たりの肉芽腫重量とした。被検体は手術直後より 1 日 1 回 5 日間腹腔内又は経口投与した。

2. ラット Adjuvant 関節炎⁹⁾——体重 190—220 g (8 週齢) の Jcl: SD 系雌性ラットを使用した。乾燥ヒト型結核菌の死菌 (H₃₇R_v) をメノウ乳鉢で微粉化したのち軽鉱物油 (Bayol F) にて 1% 懸濁液を調製した。これをアンブルに封入後オートクレーブにて滅菌し adjuvant として使用した。この adjuvant 0.06 ml を尾根より約 3 cm 離れたラットの尾に皮内注射して adjuvant 関節炎を惹起した。被検体は、adjuvant 注射 3.5 時間前に 1 回及び注射の翌日から 1 日 1 回 3 週間に亘り経口投与した。関節炎症状は、後肢足容積を経日的に測定するとともに、adjuvant 注射 2 及び 3 週間後に次の基準に従って重症度をスコアづけした。両耳介、右前肢、左前肢、右後肢及び左後肢の 5 部位についてそれぞれ 0 (正常)—4 (最も重症) の 5 段階で評価し、その合計点 (20 点満点) をもって関節炎指数とした。

III. 鎮痛作用⁹⁾ 体重 18—22 g の Std: ddY 系雌性マウスを使用した。5% ethanol 中 0.03% phenylquinone 液の 0.1 ml/10 g をマウス腹腔内に注射後 5—20 分の 15 分間 writhing 症状の数を計測した。被検体は、

phenylquinone 注射 30 分前に経口又は静脈内投与した。

IV. 抗血液凝固作用 Lee-White 法を小動物用に改良した毛細管法により試験した。体重 250—350 g の Wistar 系雄性ラットを使用した。Hexobarbital Na 麻酔下にラットの頸静脈より 1 ml syringe (テルモシリンジツベルクリン) を用いて約 0.3 ml 採血した。採血は被検体最終投与後 1 時間から 5 時間目まで 1 時間おきに 5 回行った。採血した血液をプラスチック容器に移し、ヘマトクリット管に吸収させた。血液をヘマトクリット管の上部まで吸収した時から、約 30 秒おきにヘマトクリット管を下部より少しずつ折り、内部の血液が糸を引くようになるまでの時間を測定して血液凝固時間とした。被検体は 1 日 1 回 7 又は 14 日間連続経口投与した。

V. 赤血球吸収作用 体重 180—200 g の Wistar 系雄性ラットに、 ^{59}Fe Blutal (大日本製薬) 1.8 ml/ラット (13.5 μCi) を静脈内投与した。 ^{59}Fe Blutal 投与 28 日後にラットを ether 麻酔下に心臓採血した。採血した血液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離して ^{59}Fe 標識赤血球を得た。この時の ^{59}Fe Blutal の赤血球への取り込み率は約 50% であった。

実験台に厚さ 3 mm のゴム板を敷き、その上に Wistar 系ラット (60—100 g) の右側後肢を置き、その足蹠部に鉄製カップ状円筒 (直径 4 cm, 重さ 280 g) を 30 cm の高さより落して一部内出血を伴う打撲浮腫を惹起した。¹⁰⁾ 打撲 1 時間後に 0.1 ml の ^{59}Fe 標識赤血球を右側後肢足蹠皮下の内出血部位に注入した。 ^{59}Fe 標識赤血球を注入した直後及び 2, 5, 24, 29, 48, 53, 72 時間後に γ 線シンチレーションカウンターを用い右側後肢の ^{59}Fe 放射活性を測定した。被検体は実験前日まで 1 日 1 回 7 日間腹腔内投与し、 ^{59}Fe 標識赤血球注入 1 時間前及び注入 5, 24, 29, 48 及び 53 時間後に静脈内投与した。

VI. 抗アレルギー作用 1. 受身皮膚アナフィラキシー (PCA)¹¹⁾——体重 130—160 g の Wistar 系雄性ラットを使用した。ラットの腹部 2 ケ所に抗 egg albumin マウス抗血清の希釈液 0.1 ml を皮内注射し、その 48 時間後に 2 mg の egg albumin を含む 0.5% Evan's blue 溶液 1 ml を尾静脈内に注射した。色素の注射 30 分後にラットを撲殺し、腹部皮膚を剝離したのち色素斑の面積を測定した。2 ケ所の色素斑の測定値の平均値を各ラットの反応値とした。被検体は色素の注射 5 分前に静脈内投与した。

2. Oxazolone 誘発接触皮膚炎¹¹⁾——体重 20—23 g の Jcl: ICR 系雄性マウスを使用した。マウスの剪毛腹部に ethanol に溶解した 0.5 w/v% oxazolone (Sigma) 0.1 ml を 1 ml syringe を使用して塗布した。感作 5 日後の午前中に、右側耳介皮膚の両面に acetone に溶解した 0.5 w/v% oxazolone 10 μl ずつを micropipette (10 μl) を使用して塗布した。その 24 時間後にマウスをエーテル麻酔死させ、oxazolone challenge 部位の耳介の一部分を円型 (直径 5.5 mm) にパンチ切除してその重量を測定した。耳介の腫脹率は、左側 (正常) 耳介の対応部分の重量を対照として算出した。被検体は oxazolone challenge 15 分前に腹腔内投与した。

VII. 急性致死毒性 体重 20—25 g の ddN 系雌性マウスを使用した。被検体静脈内投与後 1 週間一般症状並びに致死症状を観察した。

VIII. 被検化合物及び使用薬物 被検体である桃仁煎 (Tohnin sen), crude protein, PR-A 及び PR-B の調製方法の詳細は前報⁴⁾ に述べられている。桃仁煎は粉碎した中国産桃仁を熱水抽出し、その滲液の凍結乾燥粉末である。甘味と苦味を有する水溶性の褐色粉末である。粉碎桃仁をアセトン、次いでメタノールで抽出し、その残渣の水可溶性成分の凍結乾燥粉末が crude protein, そしてさらに精製して得た分子量約 300000 の蛋白性成分が PR-A で、分子量約 10000 の蛋白性成分が PR-B である。PR-A は、等電点 4.8—5.0, 水溶性の白色単純蛋白である。PR-B は、等電点 4.90—4.95, 水溶性で含硫アミノ酸が多い淡黄色の蛋白である。比較対照薬として使用した薬物は以下のごとくである: aspirin, indomethacin, prednisolone, diphenhydramine 及び warfarin。

実 験 結 果

I. 抗炎症作用

1. Carrageenin 足蹠浮腫に対する抑制作用 PR-A 及び PR-B は、1 mg/kg 前後の静脈内投与で強い活性を示し、抗浮腫 ED_{50} 値は、PR-A が 1.08 mg/kg, *i.v.*, PR-B が 0.100 mg/kg, *i.v.* であった (Table I)。PR-A の効力は、経口及び静脈内投与による indomethacin の効力に近く、一方、PR-B は静脈内投与による indomethacin の効力よりも強力であった。PR-A 及び PR-B の効力は桃仁煎に比べて著しく強力であった。

Crude protein は経口単回投与では無効であったが、1 日 1 回 7 日間経口投与で前処置した場合、弱いながらも有意な抗浮腫作用が認められた。

なお、両成分の活性が高分子蛋白質による非特異的作用に基づく可能性を懸念して、ウシ血清アルブミン 80 mg/kg を静脈内投与したが、ウシ血清アルブミンには抗浮腫活性が認められなかった (抑制率 -11.2%, $n=5$)。

TABLE I. Effect of PR-A, PR-B and Crude Protein on Carrageenin-Induced Hind Paw Edema in Rats

Fraction	Route	Dose (mg/kg)	n	Hind paw swelling				ED ₅₀ in mg/kg (95% confidence limits)
				2 h		3 h		
				Mean (%) ±S.E.	Inhibition (%)	Mean (%) ±S.E.	Inhibition (%)	
PR-A	i.v.	0	32	64.1±1.9		66.1±2.0		1.08 (0.496—2.34)
		0.25	10	51.8±1.9 ^{b)}	19.2	55.1±2.4 ^{b)}	16.6	
		0.5	15	45.0±2.9 ^{b)}	29.8	51.7±2.8 ^{b)}	21.8	
		1	15	44.2±2.2 ^{b)}	31.0	48.4±2.2 ^{b)}	26.8	
		2.5	5	42.4±2.8 ^{b)}	33.9	46.4±2.4 ^{b)}	29.8	
		5	5	41.0±2.0 ^{b)}	36.0	43.2±3.6 ^{b)}	34.6	
PR-B	i.v.	0	24	63.1±2.3		65.3±2.4		0.100 (0.050—0.201)
		0.1	10	48.0±4.4 ^{b)}	23.9	51.3±4.5 ^{b)}	21.4	
		0.25	10	41.9±3.1 ^{b)}	33.6	44.6±2.8 ^{b)}	31.7	
		0.5	10	38.4±2.0 ^{b)}	39.1	38.7±2.5 ^{b)}	40.7	
		1	5	32.2±4.7 ^{b)}	49.0	31.3±4.0 ^{b)}	52.1	
Crude protein	p.o. ^{c)}	0	5	67.7±3.2		69.9±2.4		
		80	6	58.7±2.8	13.3	59.3±3.0 ^{a)}	15.2	
Tohnin sen	i.v.	0	8	76.9±2.4		77.5±2.4		
		20	4	54.7±2.6 ^{b)}	28.9	56.5±2.7 ^{b)}	27.1	
		160	5	40.6±3.4 ^{b)}	47.2	50.3±2.3 ^{b)}	35.1	
Indomethacin	p.o.	0	7	61.1±2.5		64.0±2.5		3.13 (2.14 —4.56)
		1	10	57.9±1.7	5.2	60.0±1.5	6.2	
		2	10	49.2±2.5 ^{b)}	19.5	50.9±2.5 ^{b)}	20.5	
		4	10	45.0±1.6 ^{b)}	26.4	46.8±1.3 ^{b)}	26.8	
		6	10	42.3±1.7 ^{b)}	30.8	44.1±1.3 ^{b)}	31.1	
		8	5	36.3±1.1 ^{b)}	40.6	36.9±1.1 ^{b)}	42.3	
	i.v.	0	8	73.8±3.9		67.5±3.6		
		0.4	5	65.7±3.3	11.0	60.1±3.0	11.0	
		0	8	66.0±3.8		68.4±3.7		
		1	5	42.0±1.8 ^{b)}	36.4	43.9±1.6 ^{b)}	32.3	

a) 0.01 < p < 0.05 and b) p < 0.01 significantly different from each control group. c) repeated administration once daily for 7 d.

2. 血管透過性亢進抑制作用 桃仁煎及び crude protein は、1, 10 及び 100 mg/kg の経口及び静脈内投与で酢酸刺激による腹腔内への色素漏出を抑制しなかった (図表なし). そこで1日1回7日間連続経口投与したところ、桃仁煎は1及び10 mg/kg/d で有意な抑制作用を示したが、100 mg/kg/d では明確な作用を示さず、その作用は用量依存的ではなかった (Table II). Crude protein は、いずれの投与量でも有意な抑制作用を示さなかったが、1 mg/kg/d での抑制率が最も大であった. Crude protein に明確な活性が認められなかったことから、PR-A 並びに PR-B については充分な検討を行わなかったが、100 mg/kg の静脈内投与では両成分ともに無効であった (図表なし).

3. Adjuvant 関節炎に対する作用 ラット尾皮内に adjuvant を注射すると、注射後10日頃から四肢の関節が腫れ始め、その腫脹は3—4週間後に最大となった. Adjuvant の注射3.5時間前から被検体を1日1回21日間連続経口投与して予防効果を調べた. 桃仁煎 (160 mg/kg/d) 及び crude protein (80 mg/kg/d) とともに、後肢の腫れに対して影響を及ぼさなかった. さらに、adjuvant 病の症状の強さを表わす関節炎指数でみても両被検体には活性を認めなかった.

次に、adjuvant 関節炎に対する治療効果を調べる目的で、adjuvant 注射21日後から1日1回7日間被検体を腹腔内投与したが、桃仁煎 (160 mg/kg/d) 及び crude protein (80 mg/kg/d) とともに治療効果を示さなかった (図

表なし).

4. Prednisolone の抗 Adjuvant 関節炎作用に及ぼす PR-B の影響 Crude protein に明確な抗 adjuvant 関節炎作用が認められなかったことから、精製蛋白性成分のうち的一方、すなわち、抗浮腫活性がより強かった PR-B が prednisolone の抗 adjuvant 関節炎作用を増強する作用を有するか否かについて検討した. Fig. 1 に示すごとく、PR-B は、2 mg/kg/d の 21 日間腹腔内投与で後肢腫脹に対して作用を示さなかった. 関節炎指数でみても同様に無効であった.

そこで、prednisolone の中等度有効量 (1 mg/kg/d, p.o.) と同時に PR-B 2 mg/kg/d を腹腔内投与して、ステロイドの作用に対する増強作用を調べたが、PR-B には増強作用が認められなかった (Fig. 1).

5. 肉芽腫形成抑制作用 PR-A 及び PR-B をラットに 1 日 1 回 5 日間腹腔内投与して、felt-pellet 誘発肉芽腫形成に対する抑制作用を検討した. PR-A は 2.5, 5 及び 10 mg/kg/d の投与量で有意な肉芽腫形成抑制作用を示し、その作用は用量依存的であった. 一方、PR-B は、0.5, 1 及び 10 mg/kg/d の投与量で有意な抑制作用を示したが、0.5 mg/kg/d の投与が最も強く、その作用に用量依存性が認められなかった (Table III). 1 mg/kg/d 前後の投与量での効力は、indomethacin 1—2 mg/kg/d 経口投与の効力に匹敵した. なお、桃仁煎は 300 mg/kg/d の経口投与で有意な抑制 (抑制率 19.2%, $p < 0.01$) 作用を示した (図表なし).

6. 白血球遊走及び血清蛋白浸出に及ぼす影響 ラット背部皮下に作製した CMC pouch 内に被検体を局所投与して、白血球遊走並びに血清蛋白浸出に対する影響を検討した.

TABLE II. Effect of Tohnin Sen and Crude Protein on Acetic Acid-Induced Vascular Permeability in Mice

Fraction	Dose mg/kg/d p.o.	n	Dye leakage	
			Mean (μ g) $\pm$ S.E.	Inhibition (%)
Tohnin sen	0	9	86.8 $\pm$ 4.5	
	1	7	58.3 $\pm$ 5.2 ^{b)}	32.8
	10	8	73.1 $\pm$ 2.9 ^{a)}	15.7
	100	10	76.6 $\pm$ 3.8	11.8
Crude protein	0	13	73.1 $\pm$ 4.5	
	1	11	63.1 $\pm$ 5.3	13.6
	10	12	66.0 $\pm$ 5.9	9.7
	100	12	66.5 $\pm$ 3.8	9.1
Indomethacin	0	9	61.6 $\pm$ 6.1	
	0.1	10	56.1 $\pm$ 5.3	8.9
	0	8	48.0 $\pm$ 3.2	
	0.25	10	42.8 $\pm$ 4.0	10.9
	0	9	61.6 $\pm$ 6.1	
	0.5	10	42.1 $\pm$ 2.9 ^{a)}	31.7
	0	8	48.0 $\pm$ 3.2	
	1	9	31.1 $\pm$ 2.5 ^{b)}	35.2

a) $0.01 < p < 0.05$ and b) $p < 0.01$ significantly different from each control group.

Fig. 1. Effect of PR-B on Adjuvant-Induced Arthritis in Rats

a) $0.01 < p < 0.05$ and b) $p < 0.01$ significantly different from each control group.
() number of rats used.

TABLE III. Effect of PR-A and PR-B on Felt-Pellet Induced Granuloma Formation in Rats

Fraction	Dose mg/kg/d <i>i.p.</i>	<i>n</i>	Body weight		Dry granuloma weight	
			Mean (g) before/final	Change (%)	Mean (mg) ±S.E.	Inhibition (%)
PR-A	0	18	178/213	19.7	44.0±1.19	
	1	7	185/211	14.1	39.8±2.13	9.5
	2.5	7	182/208	14.3	35.7±1.58 ^{b)}	18.9
	5	12	175/208	18.9	36.3±1.30 ^{b)}	17.5
	10	7	180/206	14.4	34.0±1.29 ^{b)}	22.7
PR-B	0	13	176/211	19.9	44.8±1.37	
	0.5	7	180/215	19.4	35.3±1.05 ^{b)}	21.2
	1	11	177/208	17.5	37.8±1.00 ^{b)}	15.6
	10	6	172/204	18.6	38.2±1.91 ^{a)}	14.7
Indomethacin	(0) ^{c)}	17	177/222	25.4	52.6±1.90	
	(1)	19	177/222	25.4	47.5±1.46 ^{a)}	9.7
	(2)	22	171/224	31.0	45.3±1.58 ^{b)}	13.9
	(4)	16	176/190	8.0	35.4±1.49 ^{b)}	32.7

a) 0.01 < *p* < 0.05 and b) *p* < 0.01 significantly different from each control group. c) *p.o.*

TABLE IV. Effect of RP-A and PR-B on Leucocyte Emigration and Protein Exudation Induced by CMC in Rats

Fraction	Dose mg/pouch	<i>n</i>	Counts of leukocyte (×10 ⁶ /ml)		Protein level (mg/ml)	
			Mean±S.E.	Inhibition (%)	Mean±S.E.	Inhibition (%)
PR-A	0	5	14.2±2.45		7.9±0.29	
	0.1	5	17.9±2.62	— 26.1	8.8±0.30	—11.4
	1	5	18.3±1.73	— 28.9	9.3±0.26 ^{b)}	—17.7
	10	5	16.6±2.45	— 16.9	10.8±0.70 ^{b)}	—36.7
PR-B	0	5	10.9±1.91		8.7±0.32	
	0.1	5	16.4±3.10	— 50.5	9.0±0.61	— 3.4
	1	5	25.6±1.91 ^{b)}	—135.0	10.0±0.61	—14.9
	10	5	19.4±2.63 ^{a)}	— 78.0	11.6±0.26 ^{b)}	—33.3
Indomethacin	0	5	16.9±2.06		6.7±0.36	
	0.1	5	10.2±2.02 ^{a)}	39.6	5.8±0.21	13.4
	0.4	5	10.4±1.24 ^{a)}	38.5	5.9±0.41	11.9
	1.6	5	11.0±1.18 ^{a)}	34.9	5.7±0.14 ^{a)}	14.9
Bovine serum albumin	0	5	12.5±1.35		9.6±0.15	
	0.1	5	10.0±0.74	20.0	8.7±0.48	9.4
	1	5	13.8±1.03	— 10.4	8.9±0.14 ^{b)}	7.3
	10	5	13.6±1.01	8.8	10.6±0.22 ^{b)}	—10.4

a) 0.01 < *p* < 0.05 and b) *p* < 0.01 significantly different from each control group.

PR-A 及び PR-B は、0.1, 1 及び 10 mg/pouch の投与量で血清蛋白浸出を用量依存的に促進した。一方、白血球遊走に対しては、PR-A は明確な作用を示さなかったが、PR-B は、1 及び 10 mg/pouch の投与量で遊走を有意に促進した。PR-B 1 mg/pouch の促進率は 135% であった (Table IV)。Indomethacin は、0.1, 0.4 及び 1.6 mg/pouch の投与量で、血清蛋白浸出に対して抑制傾向を示し、用量依存性はみられないが、白血球遊走を有意に抑制した。

なお、両成分の活性が、高分子蛋白質による非特異的作用に基づく可能性を懸念して、ウシ血清アルブミンについて検討したが、白血球遊走には影響せず、また、血清蛋白浸出に対しては 10 mg/pouch の高用量でも約 10%

の促進率であった (Table IV).

II. 鎮痛 (抗 Writhing) 作用

PR-A 及び PR-B とともに 5 mg/kg 迄の静脈内投与量でマウス phenylquinone writhing に対して有意な抑制作用を示した. PR-B は 0.1 mg/kg の投与でも有意な抑制作用を示したが, 40 mg/kg 迄の投与量範囲では明確な用量依存性が認められず, 且つ, 最大抑制率は 60% 前後であった (Fig. 2). 低用量における PR-B の効力は, 経口投与の indomethacin に匹敵する強さであった. 桃仁煎は経口投与で有意な抗 writhing 作用を示し, その ED_{50} は 43.3 (23.8—78.5) mg/kg, *p.o.* であった (図表なし).

III. 抗アレルギー作用

1. 受身皮膚アナフィラキシーに及ぼす影響

マウス IgE 抗体によるラット 48 時間 PCA に対して PR-A 及び PR-B は 10 mg/kg の静脈内投与で明確な作用を発現しなかった. Indomethacin は 32 mg/kg の経口投与で無効であったが, diphenhydramine は 320 mg/kg の経口投与で有意な抑制作用 (抑制率 44.4%, $p < 0.01$) を示した (図表なし).

2. Oxazolone 接触皮膚炎に及ぼす影響 耳介への oxazolone challenge により惹起する耳介浮腫に対して PR-A 及び PR-B は 10 mg/kg の腹腔内投与で明確な作用を示さなかった. Indomethacin は 2 mg/kg の経口投与で無効であった (図表なし).

IV. 赤血球の吸収に及ぼす影響

ラット後肢足蹠を打撲して軽度の内出血を伴った打撲浮腫を作製した. その出血部位に ^{59}Fe で標識したラット赤血球を注入し, 足蹠の放射活性の消失から注入部位からの赤血球の吸収量を測定した. 赤血球は徐々に吸収され, 打撲 3 日後では約 50% が吸収された (Fig. 3).

Fig. 2. Effect of PR-A and PR-B on Phenylquinone-Induced Writhing in Mice

a) $0.01 < p < 0.05$ and b) $p < 0.01$ significantly different from each control group. $n=6$ and $17-19$ for each dose and control, respectively.

Fig. 3. Effects of RP-B on Absorption of ^{59}Fe -Labelled Erythrocytes from Rat's Paw with Traumatic Edema

PR-B or saline was administered intraperitoneally to rats 1 h before and 5, 24, 29, 48 and 53 h after a subcutaneous injection of ^{59}Fe -labelled rat's erythrocytes into the foot pad with traumatic edema.
() number of rats used.

PR-B 2 及び 20 mg/kg を ^{59}Fe 標識赤血球の注入 1 時間前及び注入後 5, 24, 29, 48 及び 53 時間に静脈内投与したが, PR-B は赤血球の吸収に対して明確な作用を示さなかった. Indomethacin (4 mg/kg, p.o.) も明確な作用を示さなかった (Fig. 3).

V. 血液凝固に及ぼす影響

キャピラル法で測定すると正常ラットの血液凝固時間は 150—250 秒間であった. 血液凝固阻止薬である warfarin は 1 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間経口投与することにより, 血液凝固時間を約 2 倍 ($p < 0.01$) に延長させた. この実験条件で, 桃仁煎は, 1, 10 又は 100 mg/kg を 1 日 1 回 7 又は 14 日間連続経口投与したが, 血液凝固時間に影響を及ぼさなかった. 桃仁煎が無効であったため, PR-A 及び PR-B については検討しなかった.

VI. 急性致死毒性

PR-A は 1000 ($n=3$) 又は 1600 ($n=5$) mg/kg をマウスに静脈内投与したが死亡例がみられず, また, 特に顕著な一般症状も認められなかった. PR-B は, 800 mg/kg ($n=2$) では死亡例を認めなかったが, 1600 mg/kg ($n=5$) では投与 1 週間後に 1 匹死亡した. 生存例に特に顕著な一般症状を認めなかった.

考 察

漢方方剤の一般的服用形態に近い型, すなわち, 桃仁の熱水抽出物である桃仁煎には, 抗炎症作用並びに抗 writhing (鎮痛) 作用が認められた. 桃仁煎には, 蛋白質, 糖, 脂肪, 少量の amygdalin などが含まれるが, crude protein に桃仁煎と比べて同等以上の活性が認められたことから, その活性は蛋白性成分に基づくことが推察された.

精製された蛋白性成分, PR-A 及び PR-B には著明な抗浮腫活性が認められた. 特に, PR-B の作用は用量反応関係が明確であり, その最大効果並びに投与量でみた効力は indomethacin よりも優れた. Crude protein と比較した活性の増大は著しく, 精製に基づく増大を遙かに上回るものであった. この点は, 精製操作により非天然の物質に変換したのか, それとも抑制物質が除去されたためであるのかは現段階では明らかではない. 化学的には, この活性成分を得ることに再現性は確認出来たが, 活性は lot 間で変動した.

PR-B は, PR-A とともに, 抗肉芽腫形成作用をも示した. しかし, indomethacin などの酸性の非ステロイド性抗炎症薬とは相違して, adjuvant 関節炎に対しては無効であり, また, 酢酸誘発血管透過性亢進に対しても明確な抑制作用を示さなかった. さらに, これらは, indomethacin とは相違して, 白血球遊走を促進した. したがって, PR-B は, PR-A とともに, 酸性の非ステロイド性抗炎症薬とは異なった作用機序に基づいて抗炎症作用を発現するであろうことが推察される. 鎮痛作用に関しては, phenylquinone writhing 法でしか検討していないが, 血管透過性亢進抑制作用が認められないことを考えると, PR-B 及び PR-A に鎮痛作用があると推察される.

「瘀血」は末梢循環障害に基づく一種のうっ血状態と推定されているところから, 「駆瘀血薬」には血液凝固系に作用して末梢循環を改善する作用, あるいは, 出血により組織に滞留している血液を吸収除去する作用などがある可能性を考えることも出来よう. しかし, 正常ラットの血液凝固並びに出血部位からの赤血球吸収を PR-B は抑制しなかった. さらに, 「瘀血」の誘因として免疫・アレルギー反応の関与も推察されているが, 今回行った I 型並びに IV 型アレルギー反応に対して PR-B あるいは PR-A は抑制作用を示さなかった. ただ, 両蛋白性成分は, 白血球の遊走を促進する作用があったことから, 多くの lectin にみられるごとく, 免疫応答系を賦活する作用を有することも考えられるが, 免疫応答系に関しては現段階で結論を出すことは出来ない.

精製蛋白分画については未検討であるが, 少なくとも crude protein は経口投与で抗浮腫活性を示さなかった. このことは, 臨床での投薬経路が経口であることから, 蛋白性成分が桃仁の有効成分であると考えるときに問題となる. 静脈内投与で胃酸分泌抑制活性を示す糖蛋白の urogastrone は十二指腸内投与で無効であるが, 油-水乳剤とすると十二指腸内投与でも活性を発現するとの報告がある.¹²⁾ 桃仁の約 50% は脂肪成分であり,⁴⁾ 臨床服用時の桃仁煎液中には当然脂肪成分が混在していると推察される. そのために, 臨床服用時には有効成分がある程度消化管から吸収されるかも知れない. この点は今後の研究課題である.

「瘀血証」は, 病理組織学的に明確になっているわけではなく, また, 西洋医学的疾患名との対応に関しても必ずしも明らかではない. しかし, 「瘀血証」を治す漢方薬「駆瘀血方剤」は確かに存在する. したがって, 「駆瘀血方剤」の薬理作用を明らかにすることは, 「瘀血証」を西洋医学的に捉える上で有力な助けになるであろう. この

意味において代表的な駆瘀血生薬である桃仁の有効成分に関する今回の知見は、多くの駆瘀血生薬の成分研究が不十分である現在、「瘀血」の研究に資料を提供することにおいても有意であると考ええる。

以上、臨床使用の実際に対応させて抽出した成分である桃仁煎には、抗浮腫作用、抗肉芽腫形成作用及び抗 writhing 作用が認められ、そして、桃仁の水抽出蛋白性成分には静脈内又は腹腔内投与で indomethacin に匹敵する抗浮腫作用、抗肉芽腫形成作用及び抗 writhing 作用が認められた。この水抽出蛋白性成分には、局所適用で白血球遊走促進作用が認められたが、adjuvant 関節炎抑制作用、内出血組織からの赤血球の吸収促進作用、副腎皮質ステロイドの抗炎症作用の増強作用、即時型及び遅延型アレルギー抑制作用は認められなかった。これらの薬効パターンから、蛋白性成分の抗炎症作用は、従来の酸性非ステロイド性抗炎症薬とは相違した新しい作用機序に基づいて発現するであろうことが推察される。

引用文献

- 1) 熊谷 朗, 治療学, **10** (suppl.), 5 (1983).
- 2) 岡田雄作, 有地 滋, 若園房雄, 和漢薬シンポジウム, **6**, 77 (1972).
- 3) 大塚恭雄, 原田正敏, 木村正康, 高木敬次郎編, “和漢薬物学,” 南山堂, 東京 1982, p. 297.
- 4) 有地 滋, 久保道德, 谿 忠人, 永本典生, 難波健輔, 野口秀人, 中村秀雄, 宇野 準, 西村温樹, 生薬学, 投稿中.
- 5) 中村秀雄, 横山雄一, 元吉 悟, 世戸康弘, 門河敏明, 清水當尚, 日薬理, **79**, 509 (1982).
- 6) J. T. Litchfield, F. Wilcoxon, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99 (1949).
- 7) 石川 浩, 新延信吉, 鶴藤 丞, 薬誌, **88**, 1472 (1968).
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 9) 中村秀雄, 石井勝美, 今津千恵子, 元吉 悟, 横山雄一, 世戸康弘, 清水當尚, 日薬理, **79**, 493 (1982).
- 10) 中村秀雄, 元吉 悟, 世戸康弘, 今津千恵子, 門河敏明, 清水當尚, 薬誌, **103**, 667 (1983).
- 11) 中村秀雄, 元吉 悟, 石井勝美, 世戸康弘, 清水當尚, 日薬理, **76**, 595 (1980).
- 12) R. Hori, K. Okumura, K. Inui, N. Nakamura, A. Miyoshi, T. Suyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1974 (1977).