薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (4, 5) 253-258 (1991)

生薬・ウワウルシの薬理学的研究 (第3報¹⁾) 免疫性炎症における

Arbutin と Indomethacin の併用効果

松田秀秋,^{*,a} 田中孝幸,^b 久保道徳^a

近畿大学薬学部,^a 第一製薬株式会社^b

Pharmacological Studies on Leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) SPRENG. III.¹⁾

Combined Effect of Arbutin and Indomethacin on Immuno-inflammation

Hideaki MATSUDA,^{*,a} Takayuki TANAKA,^b and Michinori KUBO^a

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,^a 3-4-1, Kowakae,

Higashiosaka, Osaka 577, Japan and Daiichi Seiyaku Co., Ltd.,^b

3-14-10, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo 103, Japan

(Received January 10, 1991)

A study was carried out to examine the combined effect of arbutin isolated from the leaves of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) SPRENG. (Bearberry leaf) and indomethacin on Type IV allergic reaction-induced immuno-inflammation, carrageenin-induced edema and adjuvant-induced arthritis. Contact dermatitis caused by picryl chloride (PC-CD) and sheep red cell delayed type hypersensitivity (SRBC-DTH) was not inhibited by the oral application of arbutin at 2 divided doses immediately before and 16 h after the application, but arbutin at dose of 50 mg/kg 24 h after the application rapidly decreased the swelling of PC-CD. Arbutin (*p.o.*) plus indomethacin (*s.c.*) showed inhibitory effect on the swelling of PC-CD and SRBC-DTH stronger than that of indomethacin alone. When arbutin (*p.o.*) and indomethacin (*s.c.*) in a given portion were simultaneously administered, the inhibitory effect was more potent than that of indomethacin alone in both carrageenin-induced edema and adjuvant-induced arthritis.

These results suggest that arbutin may increase the inhibitory action of indomethacin on PC-CD, SRBC-DTH, carrageenin-induced edema and adjuvant-induced arthritis, but further investigations are required to understand the mechanism involved.

Keywords—*Arctostaphylos uva-ursi*; Bearberry leaf; arbutin; indomethacin; inflammation; type IV allergic reaction

生薬・ウワウルシはウワウルシ (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) SPRENG.) の葉を乾燥したもので、ヨーロッパでは主に感染性泌尿器疾患の治療薬として用いられ、さらに気管支炎、極毒による皮膚炎、捻挫などのアレルギー及び炎症性疾患に用いられている。²⁾ 前報^{1,3)}ではウワウルシの薬効を解明する目的で、塩化ピクリル誘発接触性皮膚炎 (PC-CD) 誘発免疫性炎症に及ぼす影響を検討したところ、その 50% メタノール抽出エキスを治療効果が認められた。さらに、50% メタノール抽出エキスあるいはウワウルシから単離した arbutin とステロイド剤を併用投与すると、ステロイド剤の PC-CD の腫脹を予防及び治療する効果が著しく高まることを見出した。³⁾ しかし、arbutin によるステロイド剤の効果増強作用はステロイド剤に特有のものか、あるいはこの増強作用は非ステロイド性抗炎症剤においても発揮されるのかは明確ではない。

そこで、IV 型アレルギーによる免疫性炎症モデルに PC-CD 及びヒツジ赤血球誘発遅延型過敏反応 (SRBC-DTH) を用い、炎症モデルにカラゲニン誘発浮腫、アジュバント関節炎を用い、非ステロイド性抗炎症剤には indomethacin を用いて arbutin と非ステロイド性抗炎症剤の併用効果を検討した。

本 論

I. PC-CD に及ぼす Arbutin と Indomethacin の併用効果

1. 予防効果 PC-CD に及ぼす arbutin と indomethacin の単独及び併用時の効果は Table I に示した。Arbutin を誘発直前及び誘発 16 時間後の 2 回経口投与したが, arbutin 10, 50 mg/kg 投与群には PC-CD の腫脹を抑制する作用が認められなかった。Indomethacin 10 mg/kg を誘発 16 時間後に 1 回皮下投与した群には PC-CD の腫脹を有意に抑制する作用が認められたが, 1 mg/kg の投与量ではその作用が認められなかった。

併用効果に関しては, arbutin 50 mg/kg と indomethacin 1, 10 mg/kg を併用投与すると, indomethacin 単独投与時の抑制効果が有意に増強された。

2. 治療効果 PC-CD に対する arbutin 及び indomethacin について単独及び併用効果を検討し, その結果は Fig. 1 に示した。Arbutin 50 mg/kg 単独経口投与群には PC-CD の腫脹を有意に消腫させる作用が認められたが, 5 mg/kg 投与群にはその作用が認められなかった。Indomethacin は 10 mg/kg (s.c.) の投与量で PC-CD の腫脹を若干消腫させる傾向が認められたが, 1 mg/kg (s.c.) の投与量ではその作用が認められなかった。

次に, 併用効果に関しては単独で抑制作用を示さない arbutin 5 mg/kg (p.o.) と indomethacin 1 あるいは 10 mg/kg (s.c.) を併用投与すると, PC-CD の腫脹を有意に抑制した。

II. SRBC-DTH に及ぼす Arbutin と Indomethacin の併用効果

1. 予防効果 SRBC-DTH に及ぼす arbutin, indomethacin の影響は Table II に示したごとく, arbutin 10, 50 mg/kg (p.o.) 投与群には SRBC-DTH を抑制する作用が認められなかった。Indomethacin 10 mg/kg (s.c.)

TABLE I. Preventive Effects of Arbutin and Indomethacin and Their Combined Use on Picryl Chloride-Induced Contact Dermatitis (PC-CD) in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Ear swelling (%)
Control			81.8±6.4
Arbutin	10	p.o.	80.5±7.8
	50	p.o.	78.4±6.3
Indomethacin	1	s.c.	79.5±4.8
	10	s.c.	63.6±2.7 ^{a)}
Indomethacin+arbutin	1+50	s.c.+p.o.	30.0±1.8 ^{b)}
	10+50	s.c.+p.o.	17.0±3.0 ^{c)}

Arbutin was orally administered immediately before and 16 h after the application, and ear swelling percentage was measured 24 h after the application. Positive control agent, indomethacin was subcutaneously administered 16 h after the application. Control was orally administered water and subcutaneously administered saline. Each value represents the mean±S.E. of 12 mice. Significantly different from the control group, a) $p<0.05$. Significantly different from the indomethacin 1 mg/kg group, b) $p<0.01$. Significantly different from the indomethacin 10 mg/kg group, c) $p<0.01$.

TABLE II. Preventive Effects of Arbutin and Indomethacin and Their Combined Use on Sheep Red Cell Delayed Type Hypersensitivity in Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Ear swelling (%)	Inhibition (%)
Control			61.8±4.5	
Arbutin	10	p.o.	60.5±4.8	2.1
	50	p.o.	57.4±3.9	7.1
Indomethacin	1	s.c.	63.6±7.3	—
	10	s.c.	26.8±4.3 ^{a)}	57.4
Indomethacin+arbutin	1+50	s.c.+p.o.	26.6±4.5 ^{b)}	59.0
	10+50	s.c.+p.o.	18.6±8.0 ^{c)}	69.9

Arbutin was orally administered immediately before and 16 h after the application, and ear swelling percentage was measured 24 h after the application. Positive control agent, indomethacin was subcutaneously administered 16 h after the application. Control was orally administered water and subcutaneously administered saline. Each value represents the mean±S.E. of 12 mice. Significantly different from the control group, a) $p<0.05$. Significantly different from the indomethacin 1 mg/kg group, b) $p<0.01$. Significantly different from the indomethacin 10 mg/kg group, c) $p<0.05$.

Fig. 1. Combined Effects of Arbutin and Indomethacin on Picryl Chloride-Induced Contact Dermatitis (PC-CD) in Mice

A) --○--, control; --■--, arbutin 5 mg/kg; --▲--, arbutin 50 mg/kg. B) --○--, control; --□--, indomethacin 1 mg/kg; --△--, indomethacin 10 mg/kg. C) --○--, control; --□--, indomethacin 1 mg/kg + arbutin 5 mg/kg; --△--, indomethacin 10 mg/kg + arbutin 5 mg/kg.

Arbutin was orally administered 24 h after the application. Positive control agent, indomethacin was subcutaneously administered 24 h after the application. Control was orally administered water and subcutaneously administered saline. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 12 mice. Significantly different from the control group, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$. Significantly different from the indomethacin 1 or 10 mg/kg group, c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$.

Fig. 2. Combined Effects of Arbutin and Indomethacin on Sheep Red Cell Delayed Type Hypersensitivity (SRBC-DTH) in Mice

A) --○--, control; --■--, arbutin 5 mg/kg; --▲--, arbutin 50 mg/kg. B) --○--, control; --□--, indomethacin 1 mg/kg; --△--, indomethacin 10 mg/kg. C) --○--, control; --□--, indomethacin 1 mg/kg + arbutin 5 mg/kg; --△--, indomethacin 10 mg/kg + arbutin 5 mg/kg.

Arbutin was orally administered 24 h after the application. Positive control agent, indomethacin was subcutaneously administered 24 h after the application. Control was orally administered water and subcutaneously administered saline. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 12 mice. Significantly different from the control group, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$. Significantly different from the indomethacin 1 or 10 mg/kg group, c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$.

TABLE III. Effects of Arbutin, Indomethacin and Their Combined Use on Carrageenin-Induced Edema in Rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Swelling %	
			2	3 (h)
Control (water)		<i>p.o.</i>	52.7±1.9	61.3±3.2
Arbutin	10	<i>p.o.</i>	48.4±2.5	62.6±3.9
	50	<i>p.o.</i>	51.2±2.0	63.0±3.9
Control (water)		<i>p.o.</i>	50.9±1.4	59.2±1.1
Control (saline)		<i>s.c.</i>	51.2±4.6	62.7±3.7
Arbutin	50	<i>p.o.</i>	49.4±1.4	58.9±0.8
Indomethacin	1	<i>s.c.</i>	31.1±1.4 ^{b)}	43.9±0.8 ^{b)}
	10	<i>s.c.</i>	18.2±1.7 ^{b)}	23.5±0.9 ^{b)}
Indomethacin+arbutin	1+10	<i>s.c.+p.o.</i>	34.8±1.9	40.5±1.3
	1+50	<i>s.c.+p.o.</i>	15.2±0.8 ^{d)}	27.3±1.7 ^{c)}
Control (water)		<i>p.o.</i>	52.6±2.4	62.7±3.4
Arbutin	50	<i>p.o.</i>	49.7±1.5	60.4±2.9
Indomethacin	1	<i>p.o.</i>	42.7±3.4 ^{a)}	47.2±3.4 ^{a)}
	10	<i>p.o.</i>	24.3±4.2 ^{b)}	29.4±2.4 ^{b)}
Indomethacin+arbutin	1+10	<i>p.o.+p.o.</i>	40.3±2.4	42.1±3.4
	1+50	<i>p.o.+p.o.</i>	27.3±2.2 ^{d)}	30.4±1.8 ^{c)}

Arbutin was orally administered 1 h before the injection of carrageenin. Indomethacin was subcutaneously injected 30 min or orally administered 1 h before the injection of carrageenin. Each value represents the mean±S.E. of 8 rats. Significantly different from the control group, a) $p<0.05$. Significantly different from the indomethacin 1 mg/kg group, b) $p<0.01$. Significantly different from the indomethacin 10 mg/kg group, c) $p<0.05$. Significantly different from the indomethacin 10 mg/kg, d) $p<0.01$.

投与群には SRBC-DTH を有意に抑制する作用が認められたが、1 mg/kg (*s.c.*) の投与量では抑制作用が認められなかった。

併用効果に関しては、arbutin 50 mg/kg (*p.o.*) と indomethacin 1 mg/kg を併用投与すると、indomethacin 1 mg/kg (*s.c.*) 単独投与時の効果に比して抑制効果が有意に増強された。

2. 治療効果 SRBC-DTH に対する arbutin 及び indomethacin について単独及び併用効果を検討し、その結果は Fig. 2 に示した。Arbutin 5, 50 mg/kg (*p.o.*) 単独投与群には SRBC-DTH の腫脹を早く消腫させる作用が認められなかった。Indomethacin は 10 mg/kg (*s.c.*) の投与量で抑制傾向が認められたが有意ではなかった。

併用効果に関しては arbutin 5 mg/kg (*p.o.*) と indomethacin 1, 10 mg/kg (*s.c.*) を併用投与すると、indomethacin 1, 10 mg/kg (*s.c.*) 単独投与時の効果に比して消腫効果が有意に増強された。

III. カラゲニン浮腫に及ぼす Arbutin と Indomethacin の併用効果

カラゲニン浮腫に及ぼす arbutin, indomethacin の影響は Table III に示した。Arbutin 10, 50 mg/kg (*p.o.*) 投与群にはカラゲニン浮腫を抑制する作用が認められなかった。ラットに indomethacin 10 mg/kg を経口あるいは皮下投与すると浮腫は有意に抑制された。しかし、indomethacin 1 mg/kg 投与群には有意な抑制作用が認められなかった。

併用効果に関しては、arbutin 50 mg/kg の経口投与と indomethacin 1 mg/kg の経口あるいは皮下投与と併用すると、indomethacin 1 mg/kg 単独投与時の効果に比して抑制効果が有意に増強された。

IV. アジュバント関節炎に及ぼす Arbutin と Indomethacin の併用効果

Fig. 3 に示したごとく、adjuvant をラットの尾部及び右後肢足蹠皮内に投与すると、右後肢は 5 日後に浮腫が最大（一次炎症）になり以後若干消腫したが、11 日後からは浮腫がさらに増大（二次炎症）した。Arbutin 10, 50 mg/kg (*p.o.*) 投与群には一、二次炎症を抑制する作用が認められなかった。Indomethacin 0.2, 1 mg/kg (*s.c.*) 投与群にはアジュバント関節炎を有意に抑制する作用が認められた。

併用効果に関しては indomethacin 0.2 mg/kg (*s.c.*) に arbutin 10, 50 mg/kg (*p.o.*) を併用投与すると indo-

methacin 単独投与時の抑制率が arbutin の併用によって増加した。

なお、実験期間中のラット体重の変動及び胃内の肉眼的観察を行ったが特記すべき所見は観察されなかった。

考 察

本研究では、生薬・ウワウルシの主要成分である arbutin の IV 型アレルギー及び炎症モデルにおける非ステロイド性抗炎症剤 indomethacin との併用効果について検討した。IV 型アレルギー反応による免疫性炎症に及ぼす影響は PC-CD 及び SRBC-DTH にて検討した。Arbutin を誘発直前及び誘発 16 時間後の 2 回経口投与したが、PC-CD 及び SRBC-DTH の腫脹に対して抑制作用を示さなかった。しかし、誘発後腫脹が最大になる頃の 24 時間後に arbutin を経口投与すると、arbutin は PC-CD の腫脹を早く治癒させたが、SRBC-DTH に対してその効果が見い出せなかった。この相違点については現在不明である。

次に、このモデルにおける arbutin と indomethacin との併用効果を検討した。まず、予防実験において、indomethacin は 10 mg/kg (s.c.) の投与量で PC-CD あるいは SRBC-DTH の腫脹に対して有意な抑制作用を示したが、1 mg/kg では抑制作用が認められなかった。そこで、単独で予防効果を持たない indomethacin 1 mg/kg (s.c.) に arbutin 50 mg/kg (p.o.) を併用投与すると、indomethacin 単独の抑制効果が有意に増強され、PC-CD におけるそれらの作用強度は indomethacin 10 mg/kg 単独投与したときの効果のほぼ 2 倍に匹敵した。また、SRBC-DTH においては indomethacin 10 mg/kg 単独投与時の効果にほぼ匹敵した。換言すれば、indomethacin 1 mg/kg に arbutin 50 mg/kg を併用投与することによって indomethacin の効果が 10—20 倍高まったことになる。この arbutin の効果は治療実験においても認められた。

さらに、arbutin による indomethacin の抗炎症活性を増強させる効果は急性炎症モデルとしてカラゲニン誘発急性浮腫に対する影響にて検討し、慢性炎症モデルに対する影響はアジュバント関節炎にて検討した。その結果、arbutin は単独では急性及び慢性炎症モデルに対して抑制効果を示さなかったが、indomethacin と併用投与すると、indomethacin の皮下あるいは経口投与による抗炎症効果を相乗的

Fig. 3. Combined Effects of Arbutin and Indomethacin on Adjuvant-Induced Arthritis in Rats

A) --○--, control; --■--, arbutin 10 mg/kg; --▲--, arbutin 50 mg/kg. B) --○--, control; --□--, indomethacin 0.2 mg/kg; --△--, indomethacin 1 mg/kg. C) --○--, control; --□--, indomethacin 0.2 mg/kg + arbutin 10 mg/kg; --△--, indomethacin 0.2 mg/kg + arbutin 50 mg/kg.

Arthritis was induced by an intradermal injection of the complete adjuvant (0.05 ml) containing 10 mg of the heat-killed *Mycobacterium butyricum* in 1 ml of Bayol F, as an adjuvant agent into the tail and right hind paw of rats. Arbutin was administered in 21 daily oral doses starting on the day of injection of the adjuvant and indomethacin was administered subcutaneously. Control was orally administered water and subcutaneously administered saline. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 10—13 rats. Significantly different from the control group, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$. Significantly different from the indomethacin 0.2 mg/kg group, c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$.

あるいは相加的に増強させる作用が認められた。

以上のことから, arbutin は indomethacin と併用投与すると PC-CD 及び SRBC-DTH の予防及び治療実験において indomethacin の抑制効果を増強させ, 炎症モデルにおいても indomethacin の効果を増強させる作用が認められた。一方, indomethacin はその副作用として胃障害が惹起されることがある。Arbutin は indomethacin の抗炎症効果を増強させたが, その副作用も増強させるかは重大な問題である。この点についてはアジュバント関節炎の実験において体重の変動, 胃障害を指標に検討したが, 特記すべき所見は認められなかった。しかし, 今後さらに詳細な再検討を必要とするところであろう。いずれにしてもウワウルシの主要成分の arbutin は IV 型アレルギー反応や炎症反応の関与する疾患に対してステロイド剤^{4,5)}あるいは非ステロイド性抗炎症剤と併用すれば有用な治療手段になりうるものと思われる。

実 験 の 部

実験材料 スペイン産ウワウルシ (*Arctostaphylos uva-ursi*) の乾燥葉から前報¹⁾の方法で得た arbutin を被験体に供した。

実験動物 Slc: ICR 系雌性マウス (16—18 g, SPF) 及び Jcl: SD 系雌性ラット (170—190 g, SPF) を用いた。飼育環境は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 50—60%, 12 時間明/12 時間暗のサイクルの飼育室で, 市販の固形飼料を用い, 自由に水を摂取させ, 購入後実験に供するまで一週間予備飼育した。

実験方法 a) 塩化ピクリル誘発接触性皮膚炎 (PC-CD) の誘導——前報¹⁾に記した Asherson, Ptak の方法⁴⁾に従って行った。なお, 被験体の投与方法は予防効果を検討する際には誘発の直前及び 16 時間後の 2 回投与し, 治療効果を検討する際は誘発後 24 時間後に 1 回投与した。

b) ヒッジ赤血球誘発遅延型マウス足蹠浮腫反応 (SRBC-DTH) の誘導——前報¹⁾に記した方法に従って行った。なお, 被験体の投与方法は a) に記した方法で行った。

c) カラゲニン浮腫の誘導——前報³⁾に記した方法に従って行った。なお, 被験体は誘発の 30 分前あるいは 1 時間前に 1 回投与した。

d) アジュバント関節炎の誘導——前報³⁾に記した方法に従って行った。なお, 被験体は誘発日から連日投与した。

e) 統計学的処理——実験結果は平均値±標準誤差であらわし, 有意差検定は Student's *t*-test を適用した。

引 用 文 献

- 1) 第2報: 松田秀秋, 中田晴香, 田中孝幸, 久保道徳, 薬誌, **110**, 68 (1990).
- 2) A. Krochmal, C. Krochmal, "A Guide to the Medicinal Plants," The New York Times Book Co., New York, 1973, p. 44.
- 3) 久保道徳, 伊藤正明, 中田晴香, 松田秀秋, 薬誌, **110**, 59 (1990).
- 4) G. L. Asherson, W. Ptak, *Immunology*, **15**, 405 (1968).