薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (4) 244-252 (1992)

実験的肝障害に対する楊梅皮の防護効果¹⁾

太田節子,^a 桜井信子,^a 鴨川 旭,^b 矢口佳克,^a
井上隆夫,^a 篠田雅人*,^a

星薬科大学,^a 聖マリアンナ医科大学^b

Protective Effects of the Bark of *Myrica rubra* SIEB. et ZUCC. on Experimental Liver Injuries¹⁾

Setsuko OHTA,^a Nobuko SAKURAI,^a Asahi KAMOGAWA,^b
Yoshikatsu YAGUCHI,^a Takao INOUE,^a
and Masato SHINODA*,^a

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University,^a 2-4-41,
Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo, 142, Japan and St. Marianna
University School of Medicine,^b 2-16-1, Sugao,
Miyamae-ku, Kawasaki, 213, Japan

(Received November 18, 1991)

The methanol extract from the bark of *Myrica rubra* SIEB. et ZUCC. showed protective effects on liver injuries induced by carbon tetrachloride (CCl_4) and α -naphthylisothiocyanate (ANIT) in rats. In this study, the fractions and some compounds from the bark of *M. rubra* were investigated for the protection against CCl_4 inducing liver injuries in rats.

The active principles for the protection were recognized in two fractions (M-3 and M-5 Fr. 1) obtained from the methanol extract, and one of the active principles in the fraction (M-3) was found to be myricanol 5-O- β -D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside. In addition, these fractions protecting liver injuries induced by CCl_4 showed significant protective effects against cholestasis induced by ANIT.

Keywords—liver injury protection; carbon tetrachloride; *Myrica rubra*; α -naphthylisothiocyanate; cholestasis; myricanol galloyl glucoside; liver injury

肝障害の原因にはウイルス、免疫異常、薬剤その他多くの因子があげられるが、ウイルス性肝炎及び免疫異常による肝障害の動物モデルの作製は困難とされている。しかし、これらの原因による肝臓の反応は四塩化炭素 (CCl_4) 投与によって生じる肝実質細胞障害や α -naphthylisothiocyanate (ANIT) 投与によって生じる胆汁うっ滞などの実験的肝障害の場合と比較的類似している。そこでこれら薬物投与によって作製した動物モデルを応用して、肝障害に対する防護薬剤を開発する方法が一般に行われている。著者らもラットを用いて CCl_4 ²⁾ や ANIT³⁾ による肝障害モデルの作成及びこれらの障害に対する防護薬剤の効力試験法を検討し、報告している。また漢方で肝機能改善効果を期待して用いられている生薬を含む 67 種の生薬のメタノールエキスについて CCl_4 ⁴⁾ と ANIT⁵⁾ による肝障害に対する防護効果を検討した。その結果、 CCl_4 肝障害に対しては黄芩、甘草、金錢草、熊柳、柴胡、丹参、丁字、白芷、扁蓄、楊梅皮、連翹の 11 種が多項目の血清成分の変動

に対して有意に高い防護効力を示した。なかでも楊梅皮は肝実質細胞の障害指標となるいくつかの項目で最も高い防護効力を示した。また ANIT 肝障害に対しては胆管系障害の指標となる総ビリルビンと直接ビリルビンの血清中への漏出において、67 種の生薬メタノールエキスのうち、黄芩、金錢草、熊柳、陳皮、扁蓄と共に楊梅皮に著しく高い防護効力が認められた。そこで本報では CCl_4 及び ANIT による 2 種類の肝障害に強い防護効果を示した楊梅皮に注目し、楊梅皮の分画物及び単離した化合物の CCl_4 肝障害防護効力を測定した。また効力の認められた画分については ANIT による胆汁うっ滞に対する防護効果についても検討した。

実 験 の 部

実験動物 生後 7 週齢、体重 200 ± 10 g の Wistar 系雄性ラット（埼玉実験動物供給所より購入）を 4 日間予備飼育した後、1 群 5 匹として使用した。固形飼料（オリエンタル酵母製）及び水は自由に摂取させた。

使用薬物 CCl_4 は和光純薬特級を、ANIT は Aldrich Chemical Company Inc. 製を用いた。

楊梅皮成分の抽出及び分画 楊梅皮 (30 g, 金原商店から購入) をメタノール (80 ml $\times$ 3) で加熱還流し、抽出液を濃縮後、メタノールエキス (M-01, 6.5 g) を得た。別に楊梅皮 (4 kg) をベンゼン、酢酸エチル、メタノールで順次抽出し、Chart 1 のように分画し、各画分に B-1 から M-5 のように命名した。B-2 から taraxerone, taraxerol, myricadiol など、E-0 から myricitrin, gallic acid など、M-3 から myricitrin, myricanol glucoside, vanillic acid, gallocatechin, myricanol gentiobioside, myricanol 5-O- β -D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside (MGG) などを単離した (Table III).⁵⁾

試料の調製及び投与方法 CCl_4 はオリーブ油 (日本薬局方) 20 v/v% 溶液とした後, 0.3 ml/200 g (CCl_4 0.3 ml/kg) を 24 h 絶食したラットに腹腔内注射し, CCl_4 肝障害モデルを作成した. ANIT は 75 mg/ml の濃度になるようにオリーブ油に溶解し, 0.2 ml/200 g (75 mg/kg) を 24 h 絶食したラットに腹腔内注射し, ANIT 肝障害モデルを作成した. 試料のうち, 水に可溶性の抽出物は水に溶解したのち, 0.4 N NaOH で pH 7.0 に調整した. 水に難溶性の抽出物と, 楊梅皮からすでに抽出されている既知物質は 5% Tween 80 に懸濁し, 15 min 超音波処理した. 試料のうち M-01 は誘発薬物投与前 120 min あるいは 30 min に, その他の試料はすべて誘発薬物投与前 30 min に 1 回, 腹腔内注射した.

採血及び血清成分測定法 前報^{3,4)}に準じ, CCl_4 投与 24 h 後又は ANIT 投与 48 h 後にエーテル麻酔下で腹部下大静脈から採血し, 血清を得た. 血清成分の測定には自動化学分析装置 (TBA-380, 東芝メディカル) を使用し, GOT (glutamate oxaloacetate transaminase) 及び GPT (glutamate pyruvate transaminase) 活性は Karmen 法,⁶⁾ LDH (lactate dehydrogenase) 活性は Wacker 法,⁷⁾ ALP (alkaline phosphatase) 活性は GSCC 法,⁸⁾ LAP (leucine aminopeptidase) 活性は Nagel 法,⁹⁾ T-BIL (total-bilirubin) 及び D-BIL (direct-bilirubin) は Jendrassik 法¹⁰⁾に従った.

肝障害防護効力 ラットを 1 群 5 匹とし, 無処理の正常群, 肝障害誘発薬物 (CCl_4 又は ANIT) を投与した障害群, 試料を投与した後, 肝障害誘発薬物を投与した群のそれぞれについて各群の平均値を次式に代入し, 防護効力 (protective potency) を算出した.

$$\text{防護効力 (\%)} = \frac{\text{障害群} - (\text{試料} + \text{障害})\text{群}}{\text{障害群} - \text{正常群}} \times 100$$

測定結果は 3 群間以上の平均値の比較にはまず分散分析を行い, 平均値内に有意差が存在することを確認し, Student's *t*-test により効果の有無を判定した.

胆汁うっ滞防護効力試験 前報¹¹⁾に準じ, ANIT は 75 mg/ml の濃度になるようにオリーブ油に溶解し, 0.2 ml/200 g (75 mg/kg) を腹腔内注射した.

試料の調製及び投与方法 肝障害防護効力試験の場合と同様に行った.

胆汁採取法並びに流量測定法 ANIT 投与 24 h 後のラットに 10% ウレタン 1.0 g/kg を皮下注射して麻酔した. ラットの四肢を固定し, 腹壁正中線にそって開腹し, ポリエチレンチューブ (0.9×150 mm, Igarashi Ika Kogyo Co., Ltd.) を総胆管に挿入固定し, 手術の影響を除くため 20 min 間自然に流出させて経過を観察した後, 胆汁採取を開始した. 30 min 間隔で経時的に流出する胆汁を採取した. 採取した胆汁の容量をマイクロシリンジで測定し, 分泌胆汁量を肝重量 g 当りに補正し, 1 min 当りの胆汁流量として表した.

胆汁酸測定法 採取開始後 120 min 間に採取した胆汁を集め, その 10 μ l を精製水で 500 倍に希釈した後, 自動化学分析装置 (TBA-380, 東芝メディカル) を用いて酵素比色法¹²⁾ (エンザバイル, 第一化学薬品) により総胆汁酸の濃度を測定し, 胆汁酸濃度と胆汁流量から 1 min 当りの胆汁酸排泄量 (μ mol) を求めた.

胆汁うっ滞防護効力 ラットを 1 群 5 匹とし, 無処理の正常群, ANIT による障害群, 及び試料を投与した後, ANIT を投与した群について, それぞれ測定値の平均を求め, 次式に従い, 試料の防護効力 (%) を算出した.

$$\text{防護効力 (\%)} = \frac{(\text{試料} + \text{障害})\text{群} - \text{障害群}}{\text{正常群} - \text{障害群}} \times 100$$

測定結果は 3 群間以上の平均値の比較にはまず分散分析を行い, 平均値内に有意差が存在することを確認し, Student's *t*-test により効果の有無を判定した.

TABLE I. Protective Effects of MeOH Extracts (M-01) of the Bark of *Myrica rubra* on CCl_4 Induced Liver Injury in Rats

Sample	Dose ^{a)} (mg/kg)	Time ^{a)} (min)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	LAP (IU/l)	T-BIL (mg/dl)	D-BIL (mg/dl)
Nontreated			94 ± 15	15 ± 3	1034 ± 210	309 ± 20	17 ± 2	0.22 ± 0.04	0.09 ± 0.01
CCl_4 control			9275 ± 639 ^{b)}	2090 ± 98 ^{b)}	18753 ± 1210 ^{b)}	635 ± 57 ^{b)}	66 ± 5 ^{b)}	1.37 ± 0.11 ^{b)}	0.63 ± 0.06 ^{b)}
MeOH ext. (M-01)	100	120	2021 ± 225 ^{a)} (79.0)	638 ± 80 ^{d)} (70.0)	5633 ± 1207 ^{a)} (75.6)	306 ± 17 ^{d)} (100.9)	22 ± 3 ^{d)} (89.8)	1.10 ± 0.07 (23.5)	0.46 ± 0.04 (31.5)
	100	30	1661 ± 225 ^{a)} (82.9)	298 ± 46 ^{d)} (86.4)	2226 ± 259 ^{a)} (93.3)	529 ± 77 (32.5)	30 ± 5 ^{c)} (73.5)	0.97 ± 0.05 (34.8)	0.42 ± 0.03 (38.9)
	50	30	1787 ± 197 ^{a)} (81.6)	643 ± 102 ^{d)} (69.7)	4789 ± 1126 ^{a)} (78.8)	438 ± 33 ^{c)} (60.4)	22 ± 3 ^{d)} (89.8)	1.08 ± 0.03 (25.2)	0.48 ± 0.02 (27.8)
	25	30	5547 ± 706 (40.6)	1237 ± 206 (41.1)	13692 ± 1617 (26.8)	451 ± 24 (56.4)	54 ± 4 (24.5)	1.01 ± 0.05 (31.3)	0.49 ± 0.02 (25.9)
	12.5	30	9767 ± 1472 (-5.4)	2044 ± 242 (2.2)	21822 ± 876 (-17.3)	615 ± 109 (6.1)	58 ± 2 (16.3)	1.61 ± 0.16 (-20.9)	0.74 ± 0.06 (-20.3)

a) Each sample was intraperitoneally administered before CCl_4 (0.3 ml/kg, i.p.) treatment in rat.

Values are mean ± S.E. ($n=5$). Values in parentheses indicate protective potencies.

$$\text{protective potency (\%)} = \frac{\text{CCl}_4 \text{ treated group} - (\text{sample} + \text{CCl}_4) \text{ treated group}}{\text{CCl}_4 \text{ treated group} - \text{normal group}} \times 100$$

b) Significantly different from the nontreated group. b) $p < 0.01$ (Student's t -test).

c, d) Significantly different from the CCl_4 treated control group. c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$ (Student's t -test).

結 果

I. 楊梅皮のメタノールエキス (M-01) の肝障害防護効力

楊梅皮のメタノールエキス (M-01) を CCl_4 投与 30 min 前に 12.5—100 mg/kg 投与した時と 120 min 前に 100 mg/kg 投与した時の CCl_4 肝障害防護効力を比較検討し, Table I の結果を得た. CCl_4 0.3 ml/kg 腹腔内投与により, いずれの血清成分も著しい増加を示した. これに対して, M-01 は 50 mg/kg 以上の投与量で GOT, GPT, LDH, ALP, LAP の各血清漏出酵素を強く防護することを認めた. CCl_4 投与前 120 min 投与の場合も前 30 min 投与と同程度の効果を認めた. T-BIL 及び D-BIL に対しては 25 mg/kg 以上で弱い抑制傾向が認められたが, 差の有意性は認められなかった.

II. 楊梅皮から肝障害防護成分の抽出

楊梅皮メタノールエキス (M-01) が CCl_4 肝障害に対して強い防護効力を示したことから, 楊梅皮中の肝障害防護成分の単離を目的として Chart 1 のごとく分離した.

1. 分画物の CCl_4 肝障害に対する防護効力 Chart 1 に示した分画物の CCl_4 肝障害防護効力を比較し, Table II に示した.

ベンゼンエキス (B-0) は ALP にのみ防護効力を示し, T-BIL, D-BIL に対して抑制傾向を示したが, その分画物 B-1, B-2 及び酢酸エチルエキス (E-0) は無効であった. これに対してベンゼン可溶部と酢酸エチル可溶部除去後のメタノールエキス (M-02) は著しく強い防護効果を示し, 楊梅皮の有効成分はこの M-02 に移行することを認めた. この M-02 の水可溶画分より得られた M-2 及び M-3 には強い防護効力が認められた. また M-2 の画分 M-5 は 25 mg/kg の投与量で, 画分中最も高い防護効力を示したが, さらにクロマトグラフィーを行い, 分画した M-5 Fr. 1 にも, 10

TABLE II. Protective Potencies of the Fractions Extracted from the Bark of *Mirica rubra* Shown in Chart 1 on CCl_4 Induced Liver Injuries in Rats

Fraction	Dose ^{a)} (mg/kg)	Protective potency (%)						
		GOT	GPT	LDH	ALP	LAP	T-BIL	D-BIL
Benzene ext. (B-0)	100	14.6	24.0	-12.0	73.9 ^{c)}	19.6	32.5	38.1
B-1	100	2.0	-20.9	-16.4	35.2	2.8	-3.8	11.9
B-2	100	13.3	28.0	-12.7	33.0	3.3	26.3	35.7
EtOAc ext. (E-0)	100	-20.3	-37.3	-46.5	11.9	-13.8	-58.1	-45.2
MeOH ext. (M-02)	100	80.9 ^{c)}	72.1 ^{c)}	69.3 ^{b)}	74.9 ^{b)}	117.2 ^{c)}	37.8	19.4
M-1	100	18.8	-8.7	9.8	25.9	23.0	19.5	30.0
M-2	100	70.3 ^{c)}	66.8 ^{b)}	71.3 ^{b)}	70.9 ^{c)}	72.7 ^{c)}	77.2 ^{b)}	62.2 ^{b)}
	50	1.7	-29.3	-18.6	11.7	10.7	-26.8	-20.0
M-3	50	57.6 ^{c)}	45.9 ^{b)}	44.6	60.4 ^{b)}	73.0 ^{c)}	37.8	30.0
	25	79.9 ^{c)}	69.9 ^{c)}	68.1 ^{c)}	59.5 ^{b)}	72.6 ^{c)}	71.5 ^{b)}	65.2 ^{c)}
	10	31.0	14.6	-10.4	21.8	32.1	-8.5	-6.5
	5	43.2	30.2	17.5	39.7	42.9	15.3	9.7
M-4	50	35.5	21.9	19.0	27.8	27.3	43.5	30.5
M-5	50	85.5 ^{c)}	81.3 ^{c)}	88.2 ^{c)}	69.6 ^{c)}	109.4 ^{c)}	62.2 ^{c)}	50.0 ^{c)}
	25	91.2 ^{c)}	87.3 ^{c)}	92.3 ^{c)}	89.9 ^{c)}	95.3 ^{c)}	89.6 ^{c)}	84.8 ^{b)}
	10	44.7	30.6	15.7	42.9	46.4 ^{b)}	11.9	12.9
	5	10.7	-3.0	-50.0	-15.1	14.3	-33.9	-29.0
M-5 Fr. 1	10	59.8 ^{b)}	59.0 ^{c)}	69.0 ^{c)}	65.5	82.8 ^{c)}	62.3 ^{c)}	44.8 ^{b)}
	5	39.1	12.3	23.8	40.6	37.9	32.8	31.0

a) Each sample was intraperitoneally administered 30 min before CCl_4 (0.3 ml/kg, i.p.) treatment in rat ($n=5$). b, c) Significantly different from the CCl_4 treated control group. b) $p<0.05$, c) $p<0.01$ (Student's t -test).

TABLE III. Protective Potencies of the Compounds from the Bark of *Myrica rubra* on CCl₄ Induced Liver Injuries in Rats

Sample	Dose ^{a)} (mg/kg)	GOT	GPT	LDH	ALP	LAP	T-BIL	D-BIL
Taraxerone	100	3.6	16.4	-12.1	59.6	6.9	16.2	19.4
	50	17.6	11.0	2.6	-14.8	11.1	23.5	18.6
Taraxerol	100	22.8	21.9	28.5	30.5	34.5	40.5	35.5
	50	2.7	28.0	23.6	26.2	16.8	35.5	26.0
Myricadiol	50	8.0	29.3	16.3	-9.4	27.9	21.4	20.9
Myricanol	100	27.2	13.8	4.5	-14.9	27.6	-25.7	-41.9
	50	17.6	33.1	18.2	-2.6	23.3	20.2	15.0
Myricitrin	100	31.5	32.1	9.1	19.1	31.0	2.7	-16.1
	50	25.2	25.3	20.2	7.5	27.0	29.4	17.5
Vanillic acid	100	47.0	39.3	47.6	45.4	55.2	24.3	0.0
	50	46.6	32.2	56.8 ^{c)}	3.2	46.9	57.7 ^{c)}	53.2 ^{c)}
	25	-11.9	-28.0	-24.4	60.9	-18.3	23.8	35.7
Gallic acid	50	22.9	38.8	27.6	17.7	24.3	1.8	-3.2
Myricanol glucoside	50	31.3	50.3 ^{c)}	30.7	21.3	31.4	1.8	-4.4
Galocatechin	10	20.2	-7.8	-10.7	8.6	11.1	-14.0	-6.1
Myricanol	10	7.7	2.4	8.2	22.1	2.8	7.4	-6.5
gentiobioside	5	20.2	-0.8	22.1	-5.3	16.7	14.0	0.0
Myricanol galloyl	10	45.0 ^{b)}	54.8 ^{b)}	54.2 ^{b)}	46.2	54.8 ^{b)}	80.7 ^{c)}	80.6 ^{c)}
glucoside (MGG)	5	6.2	-16.2	-6.2	12.4	11.1	19.3	19.4

a) Each sample was intraperitoneally administered 30 min before CCl₄ (0.3 ml/kg, i.p.) treatment in rat ($n=5$). b, c) Significantly different from the CCl₄ treated control group. b) $p<0.05$, c) $p<0.01$ (Student's t -test).

mg/kg の投与量で強い防護効力が認められた。そこで楊梅皮より既に単離されている成分についても CCl₄ 肝障害防護効力を検討し、Table III の結果を得た。

有効画分 M-3 より単離された MGG に有意な防護効果が認められ、MGG は M-3 の有効成分の 1 つであると確認した。また M-3 から単離された vanillic acid にも抑制傾向が認められたが、その他は無効であった。

2. 胆管系障害に対する防護効力 代表的な胆汁うっ滞誘発薬物である ANIT を投与した群と ANIT を投与する前に楊梅皮メタノールエキス (M-01) を投与した群の胆汁流量の経時変化を Fig. 1 に示した。

胆汁採取開始後の流量は生理的な胆汁の体内循環が遮断されていることなどにより、正常ラットにおいても経時的な減少がみられたが、ANIT 投与群は採取開始直後から、著しい流量の減少あるいはうっ滞を示した。M-01 投与群は胆汁採取開始後 270 min の間、ANIT による胆汁流量の変化を有意に防護した。

Fig. 1. Effect of MeOH Extract (M-01) of the Bark of *Myrica rubra* on Alterations of Bile Flow Induced by ANIT

■, nontreated group; ▲, MeOH extract + ANIT treated group; ●, ANIT treated control group. Data are expressed as mean $\pm$ S.E. ($n=6$). MeOH extract of the bark of *Myrica rubra* (100 mg/kg) was intraperitoneally administered before ANIT (75 mg/kg) i.p. treatment in rat.

TABLE IV. Protective Potencies of Fractions Extracted from the Bark of *Myrica rubra* against Cholestasis Induced by ANIT

Sample	Dose (mg/kg)	Protective Potency (%)	
		Bile flow	Bile acid content
M-3	25	81.0 ^{b)}	73.1 ^{b)}
	10	98.5 ^{b)}	53.5 ^{a)}
M-5	25	62.3 ^{a)}	27.3
M-5 Fr. 1	25	70.3 ^{b)}	59.7 ^{b)}
	10	49.4 ^{a)}	29.5
MGG	10	58.7 ^{a)}	23.2

Each sample was intraperitoneally administered before ANIT (75 mg/kg i.p.) treatment in rat.

$$\text{protective potency (\%)} = \frac{(\text{ANIT+sample}) \text{ treated group} - \text{ANIT treated group}}{\text{normal group} - \text{ANIT treated group}} \times 100$$

a,b) Significantly different from the ANIT treated group at a) $p < 0.05$ and b) $p < 0.01$, respectively ($n=5$).

TABLE V. Protective Potencies of Miricanol Galloyl Glucoside (MGG) and M-5 Fr. 1 Extracted from the Bark of *Myrica rubra* against Alteration of Serum Components Induced by ANIT

Sample	Dose ^{a)} (mg/kg)	Protective potency (%)				
		GOT	GPT	ALP	T-BIL	D-BIL
M-5 Fr. 1	25	42.3 ^{b)}	64.1 ^{c)}	46.8 ^{b)}	73.9 ^{c)}	72.9 ^{c)}
	10	3.6	42.8	12.3	44.0	44.9 ^{b)}
MGG	10	— 2.3	39.8 ^{b)}	16.9	27.3	31.1 ^{b)}
	5	—19.7	9.0	5.6	30.7	35.9 ^{b)}

a) Each sample was intraperitoneally administered 30 min before ANIT (75 mg/kg) treatment in rat.

b,c) Significantly different from the ANIT treated group at b) $p < 0.05$ and c) $p < 0.01$, respectively ($n=5$).

Table IV には CCl_4 肝障害に対して強い防護効力の認められた楊梅皮画分と単離した MGG について、胆汁流量及び胆汁酸排泄量を指標とした ANIT 胆汁うっ滞防護効力を示した。

その結果、ANIT による胆汁流量の減少に対して画分 M-3 が最も高い防護効力を示し、胆汁中の胆汁酸含量の減少も有意に防護した。また M-5 Fr. 1 も M-3 と同様に流量及び胆汁酸含量の減少に有意な防護効果が認められたが、M-5 と MGG は流量の減少のみを防護した。そこで M-5 Fr. 1 と MGG について、ANIT 投与後 48 h の血清成分の変動に対する防護効果についても併せて検討した (Table V)。

その結果、M-5 Fr. 1 は ANIT 投与による GOT, GPT, ALP, T-BIL, D-BIL の増加を有意に防護し、特に T-BIL, D-BIL に対して強い防護効力を示したが、MGG は GPT と T-BIL と D-BIL の変動に対してのみ抑制傾向を示した。

考 察

CCl_4 の急性肝障害は脂肪変性を伴う点でヒトのウイルス性肝炎とは異なるが、¹³⁾ ヒト薬剤性肝障害及び肝硬変に良く似た症状が得られることが知られている。¹⁴⁾

楊梅皮のメタノールエキス (M-01) は 50 mg/kg で CCl_4 投与によって上昇した血清中の GOT, GPT, LDH, ALP, LAP を有意に抑制し、T-BIL, D-BIL に対しては 30—40% の防護効果を示し

たが、有意性は認められなかった。⁴⁾ 本報においても M-01 は 50—100 mg/kg の投与量では同様な効果が得られ、再現性を認めた。また、この時の M-01 はいずれも CCl₄ 投与前 30 min に投与しているのに対し、CCl₄ 投与 120 min 前投与でも十分な防護効果が得られることも認めた (Table I)。M-01 は *in vitro* の実験系において、正常肝のミクロソームの脂質過酸化を指標として検討した場合では CCl₄ による脂質過酸化と、reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) と adenosine 5'-diphosphate (ADP) による脂質過酸化のいずれに対しても、強い抑制作用を示すことが認められている。⁴⁾ また肝ミトコンドリアの脂質過酸化に対しても、強い抑制作用が認められている。⁴⁾ 一方、CCl₄ による肝障害は CCl₄ が肝細胞内で代謝された結果、生じたラジカルが小胞体や細胞膜を過酸化して損傷し、蛋白合成の低下と肝細胞壊死を生じるためといわれている¹⁵⁾ ことから、楊梅皮分画物の CCl₄ 肝障害防護効果の作用機序の 1 つは強い抗酸化作用によると推察される。

また Chart 1 に示すように楊梅皮の有効画分を得る為に極性の低い溶媒から順次抽出した。初めにベンゼン可溶画分 (B-0) と酢酸エチル可溶画分 (E-0) を得、さらにメタノールで抽出し、M-02 を得たが、B-0, E-0 には肝障害防護効力が認められず、M-02 は M-01 と同程度の強い効力が認められた。また myricanol は画分 B-1 より、taraxerol, myricadiol は画分 B-2 より得られているが、⁵⁾ これらは B-1, B-2 画分と共にいずれも無効であった (Table III)。楊梅皮の既知成分として知られている myricetin, myricitrin は強い利尿作用、¹⁶⁾ 血管収縮作用¹⁷⁾ 及び殺菌作用¹⁷⁾ が、myricetin には抗炎症作用¹⁸⁾ があると報告されているが肝障害防護作用についての検討はない。Myricitrin は有効画分 M-02 中に多量に含まれており、M-02 の熱水不溶部である M-1 画分に移行するが、M-1 画分も myricitrin も無効であり、強い肝障害防護効力を示す成分は M-2 と M-3 の 2 つの画分に移行したと考えられる。M-3, M-5 に含まれる配糖体、没食子酸などに防護効果はみられなかった。M-2 とその分画物である M-5 及び M-3 は M-02 に認められなかったビリルビンの漏出に対しても有効であったことから、これらの画分は CCl₄ によって生じる胆管系障害も十分に防護していることが推察された。そこで ANIT による胆汁うっ滞に対する防護作用も検討した (Table IV)。楊梅皮のメタノールエキス (M-01) は ANIT 肝障害による血清成分の変動に対しても強い防護作用を示したが、³⁾ 本報において ANIT による胆汁うっ滞に対しても著しく強い防護作用を示すことを認めた (Fig. 1)。また CCl₄ による血清へのビリルビンの漏出に対しても有効であった M-3, M-5 及び M-5 Fr. 1 のいずれも、ANIT による胆汁流量の減少を防護した。特に M-3 と M-5 Fr. 1 は胆汁中の胆汁酸含量の減少に対しても有意な防護効力を示し、ANIT 特有の胆汁酸の能動輸送に伴う浸透圧性利胆障害を防護した。これらの結果から、M-3 と M-5 Fr. 1 は各々 CCl₄ 肝障害と ANIT 肝障害の 2 種類の障害に有効であることを認めた。また CCl₄ 肝障害に対して M-3 より単離された myricanol gentiobioside は無効であったが、MGG は CCl₄ 肝障害と ANIT による胆汁流量の減少に対する防護効力が認められたことから、MGG は M-3 の有効成分の 1 つと考えられる。しかし MGG は M-3 に比べ効力の減退が認められ、M-3 には MGG 以外の有効成分の存在が示唆された。また M-5 Fr. 2—5 の画分はいずれも収量が微量であったため、効力試験を省略した。M-5 Fr. 1 は CCl₄ 肝障害に対しても、また ANIT による胆汁うっ滞及び血清成分の変動に対しても有効であり、本報において最も有望な画分であるが、薄層クロマトグラフィーなどの結果から、gallic acid, myricanol glucoside, myricitrin などが確認されている。⁵⁾ これらの有効な化合物の投与量はいずれも 50 mg/kg と多く、また M-5 Fr. 1 には MGG, タンニンが含まれていないことなどから、この画分中の微量で強い防護効力を示す未知物質を現在検索中である。

結 語

- 1) 楊梅皮の分画物及び単離された化合物の CCl_4 肝実質細胞障害に対する防護効力を測定した結果, ベンゼン, 酢酸エチル可溶部除去後のメタノールエキスを分画して得た M-3 と M-5 Fr. 1 に各々有効成分が存在することを認めた.
- 2) M-3 の有効成分の 1 つは myricanol galloyl glucoside であることを認めた.
- 3) CCl_4 肝障害に強い防護効力を示した画分 M-3 と M-5 Fr. 1 は ANIT による胆管系障害に対しても有効であることを認めた.

引用文献及び注

- 1) 本研究の一部は日本薬学会第 107 年会で発表, 1987 年 4 月, 京都.
- 2) 太田節子, 熊坂昌子, 篠田雅人, 薬誌, **105**, 866 (1985).
- 3) 熊沢紀子, 太田節子, 涂 修華, 鴨川 旭, 篠田雅人, 薬誌, **111**, 199 (1991).
- 4) 熊沢紀子, 太田節子, 石塚 修, 桜井信子, 鴨川 旭, 篠田雅人, 薬誌, **110**, 950 (1990).
- 5) Y. Yaguchi, N. Sakurai, M. Nagai, T. Inoue, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1419 (1988).
- 6) A. Karmen, F. Wroblewski, J. S. LaDue, *J. Clin. Invest.*, **34**, 126 (1956).
- 7) F. Wroblewski, J. S. LaDue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 210 (1955).
- 8) W. Thefeld, H. Hoffmeister, E. W. Busch, P. U. Koller, *J. Vollmar. Dtsch. Med. Wochenschr.*, **99**, 343 (1974).
- 9) G. Szasz, *Am. J. Clin. Pathol.*, **47**, 5 (1967).
- 10) L. Tendrassik, R. A. Cleghorn, *Biochem. Z.*, **289**, 1 (1936).
- 11) 鴨川 旭, 太田節子, 立木朱美, 熊坂昌子, 篠田雅人, 薬誌, **106**, 709 (1986).
- 12) 真重文子, 山中 学, 臨床化学, **8**, 191 (1978).
- 13) 岡 博, 藤原研司, 尾形晩郎, 代謝, **21**, 1657 (1984).
- 14) R. P. Tamayo, *Hepatology*, **3**, 112 (1983).
- 15) P. B. McCay, E. K. Lai, J. L. Poyer, C. M. DuBose, E. G. Janzen, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2135 (1984).
- 16) 村上千之, 千葉医学会誌, **7**, 842 (1929).
- 17) 赤松金芳, 千葉医学会誌, **8**, 1248 (1930), **11**, 1009 (1933).
- 18) 大塚紘司, 後藤 実, 藤村 一, 第 11 回 和漢薬シンポジウム, 1978, p. 1.