実験的肝障害に対するクマヤナギの防護効果¹⁾

佐藤紀子,^a 太田節子,^{*,a} 桜井信子,^a 鴨川 旭,^b
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 Stem of *Berchemia racemosa*
SIEB. et ZUCC. on Experimental Liver Injuries

Noriko SATO,^a Setsuko OHTA,^{*,a} Nobuko SAKURAI,^a
Asahi KAMOGAWA,^b 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 August 2, 1994)

The methanol extract and water extract from the stem of *Berchemia racemosa* (Rhamnaceae) showed protective effects on liver injuries induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and α -naphthylisothiocyanate (ANIT) in rats.

The acetone extract of *B. racemosa* protected the liver injury induced by CCl₄. One of the protective substances was identified as carpusin. Some fractions showed significant protective effects against the liver injury and cholestasis induced by ANIT.

Key words—liver injury; *Berchemia racemosa*; carbon tetrachloride; α -naphthylisothiocyanate; cholestasis

クマヤナギ (*Berchemia racemosa* SIEB. et ZUCC.) はクロウメモドキ科のつる性落葉低木で、その茎葉は民間薬として健胃、整腸の他、胆石症に利用されている。²⁾ 中国においても、*B. floribunda* などいくつかの同属植物が黄疸の治療に用いられていることより、³⁾ 肝疾患に対する効果が期待された。

我々は、天然物の中から肝疾患治療薬物を開発する目的で、67種の生薬について四塩化炭素 (CCl₄) 及び α -naphthylisothiocyanate (ANIT) を用いた実験的肝障害に対する防護効果を検討し、CCl₄ 肝障害に対して11種、ANIT 肝障害に対して9種の生薬が有効であり、クマヤナギは、両肝障害に強い防護効果を示すことを認めた。⁴⁾

前報⁴⁾の1次スクリーニングではクマヤナギのメタノールエキスについて検討した。本報ではCCl₄ 及び ANIT 肝障害に対しクマヤナギのメタノールエキス及び水エキスの有効投与量、投与時間の検討を行い、各種分画物及び単離された成分の防護効果を検討することにより、有効成分の検索を行った。

実験の部

クマヤナギの抽出及び分画 クマヤナギは金原市兵衛商店より購入した。

水エキス——クマヤナギ (30 g) を水 (100 ml, 各 1 h, 3 回) で煮沸し, 合した抽出液を減圧乾燥後, 水エキス (1.0 g) とした。水エキスはアンバーライト XAD-2 クロマトを行い, 水溶出部 A (0.09 g) とメタノール溶出部 B (0.64 g) を得た。B は Sephadex LH-20 を用いてさらに B-1 (0.16 g), B-2 (0.27 g), B-3 (0.13 g), B-4 (0.07 g) の 4 つの分画した。

メタノールエキス I——クマヤナギ (200 g) をメタノール (500 ml, 各 3 h, 4 回) 加熱還流し, 合した抽出液を減圧乾燥後, メタノールエキス I (10 g) とした。

ヘキサン, アセトン, メタノールエキス II 及びその分画——クマヤナギ (3 kg) を前報⁵⁾ のようにヘキサン, アセトン, メタノールで順次抽出し, ヘキサンエキス (9 g), アセトンエキス (23 g) 及びメタノールエキス II (129 g) を得た。アセトンエキスはシリカゲルクロマトを行い, Fr. 1 (1.8 g), Fr. 2 (0.045 g), Fr. 3 (1.7 g), Fr. 4 (3.8 g), Fr. 5 (9.5 g) を得た。Fr. 2 を CHCl_3 -MeOH (15:1) で再結晶し, carpusin (22.5 mg), mp 213, 214°C を得た。Carpusin は標本と比較し同定した。⁶⁾ メタノールエキス II は酢酸エチル可溶部 (4.4 g) と不溶部 (119 g) に分画した。酢酸エチル不溶部は水に溶解しアンバーライト XAD-2 クロマトを行い, 水溶出部 C (75 g) 及びメタノール溶出部 D (29 g) を得た。D を Sephadex LH-20 でクロマトを行い, Fr. a (1.02 g), Fr. b (0.33 g), Fr. c (0.46 g), Fr. d (0.74 g), Fr. e (3.64 g) を得た (Chart 1)。

Chart 1

実験動物 生後7週齢、体重200g前後のWistar系雄性ラット（埼玉実験動物供給所より購入）を1群5匹として使用した。固形飼料（オリエンタル酵母製）は自由摂取させたが、肝障害誘発薬物投与24h前及び採血24h前は絶食させた。飲料水は採血時まで自由摂取させた。

1. CCl₄ 及び ANIT 肝障害防護効力試験 試料の調製及び投与方法——CCl₄ は和光純薬工業製を、ANIT は Sigma 製を用いた。CCl₄ はオリーブ油（日本薬局方）で20%溶液としたものを、1.5 ml/kg (CCl₄ 0.3 ml/kg) 腹腔内投与し、ANIT は75 mg/kg をオリーブ油で溶解し、経口投与することにより実験的肝障害を誘発した。クマヤナギ分画物は、各々水に溶解又は懸濁し、0.4N NaOH で pH 7 に調整後、誘発薬物投与前又は後に腹腔内投与した。

採血及び血清成分測定法——CCl₄ 投与24h後あるいはANIT投与48h後にエーテル麻酔下で腹部大静脈より採血を行った。得られた血清中の GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), GPT (glutamate pyruvate transaminase), LDH (lactate dehydrogenase), ALP (alkaline phosphatase), LAP (leucine aminopeptidase), T-BIL (total-bilirubin) 及び D-BIL (direct-bilirubin) は自動化学分析装置 (TBA-380, 東芝メディカル) を用いて測定した。

肝障害防護効力——無処置の正常群、肝障害誘発薬物を投与した障害群及び肝障害誘発薬物と試料を併用した群のそれぞれの血清成分測定値の平均値を次式に代入し、防護効力 (protective potency) を算出した。なお、効果の有無は Student's *t*-test により判定した。

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

病理組織学的検査——採血後直ちに摘出した肝臓を、常法によりホルマリン固定し、パラフィン包埋した。その薄切標本をヘマトキシリン-エオジン染色に付して、検鏡した。

2. ANIT 胆汁うっ滞防護効力試験 試料の調製及び投与方法——ANIT 75 mg/kg をオリーブ油で溶解し、ラットに腹腔内投与した。クマヤナギ分画物は肝障害防護効力試験の場合と同様に調製し、投与した。

胆汁採取法及び流量測定法——ANIT 投与24h後、10% ウレタン (1.0 g/kg, s.c.) 麻酔下で総胆管にポリエチレンチューブ (0.9×150 mm, Igarashi Ika Kogyo Co., Ltd.) を挿入した。手術の影響を除くため、カニキュレーション30min後より胆汁採取を開始し、30minごとに240min間胆汁を採取した。マイクロシリッジにより胆汁流量を測定し、肝重量グラム当たり補正し、1min当たりの胆汁流量 (μl/g liver/min) として表した。

胆汁酸測定法——採取開始後120min間に採取した胆汁を精製水で500倍希釈した後、自動化学分析装置 (TBA-380) を用いて、酵素比色法 (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1min当たりの胆汁酸排泄量 (μmol/g liver/min) として表した。

胆汁うっ滞防護効力——無処理の正常群、ANITを投与した障害群、及びANITを投与する前に試料を投与した群について、それぞれの測定値の平均を求め、次式に従い試料の防護効力を測定した。

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

結 果

1. クマヤナギ水エキスとメタノールエキス I の肝障害防護効力

クマヤナギ水エキス 500 mg/kg を CCl₄ あるいは ANIT 投与 30 min 前に腹腔内投与した時、水エキスは CCl₄ により血清中に著しく増加する GOT, GPT, LDH, ALP, LAP の各酵素を抑制し、著しく高い防護効力を示した。また ANIT 肝障害に対しても GPT, T-BIL 及び D-BIL に有意な効力が認められ、GOT と LDH に抑制傾向が見られた。

またメタノールエキス I 15—1000 mg/kg を CCl₄ 投与 30 min 前に投与した場合、250, 500 mg/kg の投与群はほとんどすべての測定項目に高い効力を示し、30—500 mg/kg 投与の間に用量依存的な効果が認められた。1000 mg/kg 投与群では 30, 120 min 前投与はいずれも有効であったが、ビリルビンの増加に対しては無効であった。

Table 1. Protective Effects of H₂O Extract and MeOH Extract I of *Berchemia racemosa* on CCl₄ or ANIT Induced Liver Injuries in Rats

	Dose (mg/kg)	Time ^{a)} (min)	Protective potency (%) ^{b)}							
			GOT	GPT	LDH	ALP	LAP	T-BIL	D-BIL	
CCl ₄ induced liver injury										
H ₂ O ext.	500	b. 30	92.9 ^{d)}	91.0 ^{d)}	94.4 ^{d)}	86.7 ^{d)}	89.3 ^{d)}	34.1	23.8	
MeOH ext. I	1000	b. 120	59.0	53.1	65.0	118.9 ^{d)}	145.5 ^{c)}	6.0	−1.9	
	1000	b. 30	80.3 ^{c)}	70.1 ^{d)}	73.5	133.6 ^{d)}	177.3 ^{d)}	4.8	−3.7	
	500	b. 30	83.8 ^{d)}	72.1 ^{c)}	82.0 ^{d)}	28.0	85.0 ^{d)}	46.5 ^{d)}	37.2 ^{c)}	
	250	b. 30	83.1 ^{d)}	61.0 ^{c)}	78.2 ^{d)}	57.6 ^{d)}	75.2 ^{d)}	64.0 ^{d)}	55.8 ^{d)}	
	125	b. 30	62.5 ^{d)}	51.8 ^{c)}	47.3 ^{c)}	−28.8	29.7 ^{c)}	48.8 ^{d)}	39.5 ^{c)}	
	60	b. 30	64.2 ^{d)}	46.4	59.0 ^{d)}	−23.9	40.6 ^{d)}	61.6 ^{d)}	53.5 ^{d)}	
	30	b. 30	56.7 ^{c)}	40.4	50.9	17.1	48.5	42.5	42.1	
	15	b. 30	31.8	40.9	36.9	−11.2	27.6	−10.0	−21.1	
ANIT induced liver injury										
H ₂ O ext.	500	b. 30	42.0	67.3 ^{d)}	34.3	11.7	—	56.3 ^{d)}	58.4 ^{d)}	
MeOH ext. I	1000	b. 120	85.8 ^{d)}	88.8 ^{d)}	296.2 ^{c)}	124.8 ^{d)}	—	75.7 ^{d)}	77.2 ^{d)}	
	1000	b. 30	96.8 ^{d)}	98.4 ^{d)}	27.8	138.4 ^{d)}	—	87.1 ^{d)}	92.8 ^{d)}	
	500	b. 120	58.3	65.3 ^{c)}	68.0	51.6	—	75.1 ^{d)}	75.4 ^{d)}	
	500	b. 30	100.4 ^{d)}	101.0 ^{d)}	98.9 ^{d)}	104.4 ^{c)}	—	99.9 ^{d)}	100.7 ^{d)}	
	250	b. 120	98.6 ^{d)}	90.1 ^{d)}	130.6 ^{d)}	219.8	—	96.3 ^{d)}	96.3 ^{d)}	
	250	b. 30	55.8 ^{c)}	64.7 ^{d)}	87.3 ^{c)}	40.1 ^{c)}	—	80.8 ^{d)}	81.4 ^{d)}	
	125	b. 30	36.8	56.0 ^{c)}	52.4	54.0	—	80.8 ^{d)}	81.5 ^{d)}	
	60	b. 30	−5.6	38.4	−37.5	27.9	—	33.5	30.7	
	500	a. 30	71.6 ^{c)}	89.5 ^{d)}	72.5	74.3 ^{d)}	—	90.2 ^{d)}	90.3 ^{d)}	
	500	a. 120	71.3 ^{c)}	82.0 ^{d)}	87.8 ^{c)}	57.6 ^{c)}	—	91.7 ^{d)}	91.8 ^{d)}	

a) Each sample was intraperitoneally administered before (b) or after (a) CCl₄ (0.3 ml/kg, i.p.) or ANIT (75 mg/kg, i.p.) treatment in rat.

b) Protective potency(%) = $\frac{(\text{CCl}_4 \text{ or ANIT group}) - (\text{sample} + \text{CCl}_4 \text{ or ANIT group})}{(\text{CCl}_4 \text{ or ANIT group}) - (\text{normal group})} \times 100$ Each

value showed the protective potency at 24 h after CCl₄ treatment or 48 h after ANIT treatment. Significant difference from CCl₄ or ANIT control. c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$. Nontreated values (mean $\pm$ S.D.); GOT 86 $\pm$ 4, GPT 24 $\pm$ 1, LDH 611 $\pm$ 188, ALP 389 $\pm$ 54, LAP 21 $\pm$ 1, T-BIL 0.26 $\pm$ 0.05, D-BIL 0.13 $\pm$ 0.03. CCl₄-treated values (mean $\pm$ S.D.); GOT 8247 $\pm$ 486, GPT 1640 $\pm$ 418, LDH 15177 $\pm$ 1863, ALP 553 $\pm$ 30, LAP 54 $\pm$ 3, T-BIL 1.06 $\pm$ 0.05, D-BIL 0.53 $\pm$ 0.05. ANIT-treated values (mean $\pm$ S.D.); GOT 1835 $\pm$ 330, GPT 1027 $\pm$ 163, LDH 2809 $\pm$ 677, ALP 1822 $\pm$ 267, T-BIL 9.99 $\pm$ 0.67, D-BIL 7.40 $\pm$ 0.48.

また, ANIT 肝障害に対しては, メタノールエキス I 60—1000 mg/kg の用量を腹腔内投与した結果, 250—1000 mg/kg の投与量で ANIT 投与 120 min 前, 30 min 前のいずれの投与時期においても, すべての測定項目において高い効力が認められ, 特に 500 mg/kg の 30 min 前投与群は ANIT 肝障害を完全に防護し, 正常群に近い値を示した. また ANIT 投与の 30 min 及び 120 min 後投与においても強い抑制効果が認められた (Table 1).

また ANIT により誘発される胆汁うっ滞に対するメタノールエキス I の効果を経時的に測定し, Fig. 1 に示した. 正常群においても, 生理的な胆汁の体内循環を遮断したことにより胆汁流量の経時的減少がみられたが, 胆汁採取 24 h 前 ANIT 投与群では, 胆汁流量測定開始直後から, 正常群と比較して著しい減少が認められた. ANIT 投与 30 min 前にメタノールエキス I 250 mg/kg を腹腔内投与した場合, ANIT による胆汁流量減少を抑制し, 正常群に近い値を示し, 明らかに ANIT 胆汁うっ滞防護作用を有することが認められた. そこで Table 2 には胆汁流量及び胆汁酸排泄量を指標とした時の水エキスとメタノールエキス I の効果を防護効力で示した. 水エキス, メタノールエキス I は胆汁流量の減少を有意に抑制し, 高い防護効力が認められた. また, 水エキスは胆汁中の胆汁酸排泄量の減少も有意に防護し, メタノールエキス I は抑制傾向を示した. なお, メタノールエキス I 250 mg/kg と 500 mg/kg 単独投与時の胆汁流量及び胆汁酸排泄量は, 250 mg/kg 投与群がそれぞれ $0.38 \pm 0.18 \mu\text{l/g} \cdot \text{liver}/\text{min}$, $0.05 \pm 0.04 \mu\text{mol}/\text{min}$, 500 mg/kg 投与群がそれぞれ $0.62 \pm 0.01 \mu\text{l/g} \cdot \text{liver}/\text{min}$, $0.11 \pm 0.01 \mu\text{mol}$ であり, 正常群の胆汁流量 $0.57 \pm 0.02 \mu\text{l/g} \cdot \text{liver}/\text{min}$, 0.12 ± 0.12

Fig. 1. Effect of the MeOH Extract of *Berchemia racemosa* on Alterations of Bile Flow Induced by ANIT

●—●, nontreated; ○—○, MeOH extract I+ANIT treated group; ●--●, ANIT treated control group. MeOH extract (250 mg/kg, i.p.) was intraperitoneally administered 30 min before ANIT (75 mg/kg, i.p.) treatment in rats.

Table 2. Protective Potencies of H₂O Extract and MeOH Extract I of *Berchemia racemosa* against Cholestasis Induced by ANIT

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	Protective potency (%) ^{b)}	
		Bile flow	Bile acid excretion
H ₂ O ext.	400	39.7 ^{d)}	33.4 ^{d)}
	200	70.0 ^{c)}	38.6 ^{d)}
MeOH ext. I	500	85.1 ^{c)}	42.5
	250	71.7 ^{c)}	11.1

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

b) Protective potency (%) = $\frac{(\text{sample} + \text{ANIT group}) - (\text{ANIT group})}{(\text{normal group}) - (\text{ANIT group})} \times 100$ Significant difference from ANIT control. c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$.

Table 3. Protective Effects of the Fractions (B-1—B-4) of H₂O Extract from *Berchemia racemosa* Shown in Chart 1 on ANIT Induced Liver Injury in Rats

Fraction ^{a)}	Dose (mg/kg)	Protective potency (%)				
		GOT	GPT	ALP	T-BIL	D-BIL
XAD-2 H ₂ O eluate (A)	50	-11.9	24.3	19.3	35.9 ^{b)}	35.2 ^{b)}
XAD-2 MeOH eluate (B)	50	-2.7	48.1 ^{c)}	7.3	8.0	6.8
B-1	10	6.6	23.2	27.0 ^{b)}	14.2	15.4
B-2	10	-39.3	5.8	0.8	-12.6	-15.9
B-3	10	-110.1	-21.8	-18.4	-15.0	-2.1
B-4	20	9.4	44.0 ^{c)}	1.8	10.8	26.0

a) Each sample intraperitoneally administered 30 min before ANIT treatment (75 mg/kg *p.o.*) in rat. Significant difference from ANIT control. b) $p < 0.05$, c) $p < 0.01$. Nontreated values (mean $\pm$ S.D.); GOT 133 $\pm$ 4, GPT 29 $\pm$ 4, ALP 389 $\pm$ 5, T-BIL 0.23 $\pm$ 0.04, D-BIL 0.12 $\pm$ 0.05. ANIT-treated values (mean $\pm$ S.D.); GOT 1104 $\pm$ 77, GPT 799 $\pm$ 59, ALP 1513 $\pm$ 72, T-BIL 7.75 $\pm$ 0.63, D-BIL 0.53 $\pm$ 0.05.

$\mu\text{mol/min}$ と比較して有意な増加は認められず、クマヤナギ単独投与による胆汁流量及び胆汁酸排泄促進（利胆）作用はみられなかった。

2. 水エキス各分画物の ANIT 肝障害防護効力

水エキスより得られた分画物 A, B 及び B の分画物を ANIT 投与 30 min 前に腹腔内投与した結果, GPT, ビリルビン, ALP にのみ有意性が認められた。しかし, いずれも分画する前の水エキスと同程度の強い効力を示す画分は得られず, 分画を行うことによる効力の分散がみられた (Table 3)。

3. CCl₄ 肝障害に対する各分画物の防護効果

クマヤナギを Chart 1 のように分画して得た試料について CCl₄ 投与 30 min 前に腹腔内投与した時の防護効果を Table 4 に示した。ヘキサンエキスは GOT にやや抑制傾向を示した。アセトンエキス 100 mg/kg 投与群は ALP を除くすべての測定項目に高い防護効力が認められた。メタノールエキス II は LDH, T-BIL 及び D-BIL のみ弱いながら有意な防護効力が認められた。さらに, アセトンエキスから得られた Fr. 1—5 の画分のうち Fr. 2 は他の画分に比べ, 著しく少ない投与量で有意な抑制効果が認められた。また Fr. 1 の GOT, Fr. 4 の D-BIL 及び Fr. 5 の GOT に有意性がみられたがその他の項目において有意な効力は認められなかった。また, メタノールエキス II の分画物のうち酢酸エチル可溶部に弱い効果が認められたが, この画分は TLC 上, アセトンエキスに含まれている成分とほぼ同様であった。その他の画分については抑制傾向を示すものの有意性は認められなかった。

また, 有効性を示したアセトンエキス Fr. 2 の投与群の HE 染色した肝組織像を鏡検した結果, CCl₄ 単独投与群 (Fig. 2a) では肝小葉中心性壊死及び炎症性細胞の浸潤がみられたが, アセトンエキスの Fr. 2 (0.75 mg/kg) を CCl₄ 投与 30 min 前に投与した群では (Fig. 2b) 中心性壊死巣は認められず, 炎症性細胞も CCl₄ 単独投与群に比べ著しく少なかった。

4. ANIT 肝障害に対する各分画物の防護効果

クマヤナギ各分画物の ANIT 肝障害に対する防護効力を Table 5 に示した。ヘキサンエキスはビリルビンに対して有効であったが, その他の測定項目には無効であった。一方, CCl₄ 肝障害に有効であったアセトンエキスは無効であったが, メタノールエキス II は GPT, ALP 及びビリルビンに有効性が認められた。メタノールエキス II の分画物について検討した結果, メタノール溶出部 D は ALP 以外のすべての測定項目に有意性が認められ, 有効成分の移行が確認

Table 4. Protective Effects of *Berchemia racemosa* on CCl₄ Induced Liver Injury in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	LAP (IU/l)	T-BIL (mg/dl)	D-BIL (mg/dl)
Nontreated		120 ± 8	19 ± 5	1284 ± 216	387 ± 61	18 ± 2	0.27 ± 0.05	0.12 ± 0.04
CCl ₄ control		12682 ± 1335 ^{b)}	1880 ± 99 ^{b)}	22430 ± 1459 ^{b)}	656 ± 15 ^{b)}	63 ± 2 ^{b)}	1.07 ± 0.07 ^{b)}	0.47 ± 0.03 ^{b)}
Hexane ext.	40	7085 ± 255 (44.6)	1497 ± 299 (20.6)	17555 ± 2005 (23.1)	839 ± 177 (-68.0)	53 ± 6 (22.2)	0.95 ± 0.18 (15.0)	0.43 ± 0.08 (11.4)
Acetone ext.	100	1884 ± 1039 ^{d)} (86.0)	318 ± 128 ^{d)} (83.9)	5032 ± 3370 ^{d)} (82.3)	556 ± 36 ^{c)} (37.2)	27 ± 5 ^{d)} (80.0)	0.57 ± 0.15 ^{c)} (62.5)	0.31 ± 0.06 ^{c)} (45.7)
Fr. 1	20	6263 ± 1156 ^{c)} (51.1)	1644 ± 390 (12.7)	12782 ± 2103 (45.2)	703 ± 79 (-17.5)	48 ± 2 ^{c)} (33.3)	1.05 ± 0.24 (2.2)	0.57 ± 0.11 (-27.3)
Fr. 2	0.75	6267 ± 1531 ^{c)} (51.1)	627 ± 215 ^{d)} (67.3)	15718 ± 51 (31.7)	678 ± 33 (-8.2)	48 ± 2 ^{c)} (33.3)	0.74 ± 0.14 ^{c)} (41.3)	0.38 ± 0.10 (25.7)
Fr. 3	20	7268 ± 1126 (43.1)	1750 ± 290 (16.8)	13168 ± 2774 (43.8)	722 ± 67 (-24.5)	51 ± 6 (26.3)	0.71 ± 0.12 (44.4)	0.38 ± 0.06 (27.2)
Fr. 4	20	6024 ± 869 ^{c)} (53.0)	1132 ± 108 (40.2)	13993 ± 1686 (39.9)	657 ± 45 (-0.3)	56 ± 3 (15.6)	0.54 ± 0.12 ^{c)} (66.7)	0.30 ± 0.06 ^{d)} (50.0)
Fr. 5	40	6451 ± 1214 ^{c)} (49.6)	1396 ± 162 (26.0)	10631 ± 1559 (55.8)	789 ± 40 (-49.3)	50 ± 3 (28.9)	0.89 ± 0.11 (22.2)	0.55 ± 0.07 (-22.7)
MeOH ext. II	100	11159 ± 513 (12.1)	1981 ± 256 (-5.4)	17763 ± 453 ^{c)} (22.1)	710 ± 77 (-20.1)	56 ± 2 (15.6)	0.81 ± 0.04 ^{c)} (32.5)	0.35 ± 0.02 ^{c)} (34.3)
EtOAc sol.	100	6980 ± 667 ^{c)} (45.4)	1149 ± 176 (39.3)	20405 ± 2234 (9.6)	520 ± 50 (50.6)	48 ± 2 ^{c)} (33.3)	0.70 ± 0.06 ^{c)} (46.3)	0.29 ± 0.01 ^{c)} (51.4)
EtOAc insol.	100	9761 ± 2332 (23.3)	1405 ± 210 (25.5)	17824 ± 3352 (21.8)	523 ± 39 ^{c)} (49.4)	58 ± 5 (11.1)	0.78 ± 0.06 ^{c)} (36.3)	0.30 ± 0.03 ^{c)} (48.6)
H ₂ O eluate (C)	50	8811 ± 1626 (30.8)	1150 ± 193 (39.2)	19445 ± 3278 (14.1)	608 ± 87 (17.8)	54 ± 5 (20.0)	0.83 ± 0.18 (30.0)	0.33 ± 0.06 (40.0)
MeOH eluate (D)	50	8349 ± 1174 (34.5)	1330 ± 146 (29.6)	21675 ± 2339 (1.2)	570 ± 73 (32.0)	63 ± 9 (0.0)	0.92 ± 0.15 (18.8)	0.36 ± 0.05 (31.4)

a) Each sample was intraperitoneally administered before CCl₄ treatment (0.3 ml/kg, i.p.) in rat. Values are the means ± S.D. (n = 5)

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. c) p < 0.01. d) p < 0.05.

Significantly different from the CCl₄ treated control group. c) p < 0.05, d) p < 0.01.

Fig. 2. Liver Morphology 24 h after CCl_4 Treatment (H. E. Stain, $\times 200$)

a) CCl_4 (0.3 ml/kg, i.p.)-treated control; b) Fr. 2 of acetone extract from *Berchemia racemosa* (0.75 mg/kg, i.p.) + CCl_4 treated.

された。さらにこの画分から得られた Fr. a—e の効力を検討した結果、Fr. a の 20 mg/kg 投与群と Fr. e の 50 mg/kg 投与群にやや抑制傾向が認められたのみであった。

また ANIT 肝障害に有効性の認められたメタノールエキス II の分画物の ANIT 胆汁うっ滞防護効果を検討した結果、酢酸エチル不溶部及びそのメタノール溶出部 D は、ANIT による胆汁流量の減少を有意に防護した。また、ANIT 肝障害には有効性を示さなかった酢酸エチル不溶部の水溶出部 C においても同程度の胆汁うっ滞防護効力が認められた。

5. 数種の成分の CCl_4 及び ANIT 肝障害防護効力

クマヤナギより単離された成分について、 CCl_4 及び ANIT 肝障害防護効力を検討し、Table 6 に結果を示した。2-Benzyl-2,4,6,4'-tetraoxygenated 3(2H)-benzofuranone の誘導体である carpusin⁶⁾ は 0.75 mg/kg の投与量で CCl_4 肝障害に有効性を示したことから Fr. 2 の有効成分の 1 つであることを認めた。しかし、用量依存的な効果は得られなかった。クマヤナギから初めて単離された tetrahydrofuranoid lignan である berchemol⁹⁾ 及び β -sitosterol は、いずれも防護効果は認められなかった。また山崎ら⁷⁾ が得た 2,6-dimethoxybenzoquinone は 10 mg/kg の投与量で抑制傾向は示すものの、有意性は見られなかった。Naphtho- γ -pyrone の diglucoside である rubrofusarin 6- β -gentiobioside は、 CCl_4 及び ANIT によるいずれの肝障害に対しても無効であった。

Table 5. Protective Effects of *Berchemia racemosa* on ANIT Induced Liver Injury in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	T-BIL (mg/dl)	D-BIL (mg/dl)
Nontreated		126 ± 10	27 ± 3	665 ± 253	403 ± 110	0.25 ± 0.08	0.17 ± 0.06
ANIT control		2180 ± 523 ^{b)}	909 ± 18 ^{b)}	2275 ± 1152 ^{b)}	1314 ± 70 ^{b)}	7.91 ± 0.76 ^{b)}	6.02 ± 0.74 ^{b)}
Hexane ext.	40	2050 ± 648 (6.3)	681 ± 188 (25.9)	2258 ± 496 (1.1)	1229 ± 102 (9.3)	4.77 ± 0.94 ^{c)} (41.0)	3.72 ± 0.74 ^{c)} (39.3)
Acetone ext.	100	3221 ± 1073 (-50.7)	986 ± 282 (-8.7)	3967 ± 1732 (-105.1)	1355 ± 309 (-4.5)	6.59 ± 1.93 (17.2)	4.99 ± 1.34 (17.6)
MeOH ext. II	100	1414 ± 674 (37.3)	498 ± 234 ^{c)} (46.6)	1424 ± 440 (52.9)	946 ± 264 ^{c)} (40.4)	3.15 ± 2.06 ^{d)} (62.1)	2.51 ± 1.62 ^{d)} (60.0)
EtOAc sol.	100	2610 ± 720 (-20.9)	1034 ± 434 (-14.2)	3008 ± 1294 (-46.6)	1537 ± 114 (-24.5)	8.11 ± 3.08 (-2.6)	6.17 ± 2.30 (-2.6)
EtOAc insol.	100	1597 ± 507 (28.4)	455 ± 87 ^{d)} (51.5)	2045 ± 662 (14.3)	1071 ± 174 ^{c)} (26.7)	5.75 ± 0.89 (28.2)	4.41 ± 0.61 (27.5)
H ₂ O eluate (C)	50	1765 ± 382 (20.2)	813 ± 202 (10.9)	1718 ± 652 (34.6)	1266 ± 114 (5.3)	8.19 ± 1.48 (-3.7)	6.37 ± 0.61 (-6.0)
MeOH eluate (D)	50	1173 ± 62 ^{c)} (49.0)	395 ± 6 ^{d)} (58.3)	1302 ± 138 ^{c)} (59.4)	1210 ± 116 (11.4)	3.34 ± 1.14 ^{d)} (59.7)	2.60 ± 0.84 ^{d)} (58.5)
Fr. a	20	1662 ± 142 ^{c)} (25.2)	691 ± 87 (24.7)	1731 ± 139 (33.8)	1251 ± 342 (6.9)	6.06 ± 1.03 (24.1)	4.49 ± 0.61 (26.1)
	5	2093 ± 277 (4.2)	646 ± 89 (29.8)	2689 ± 348 (-25.7)	1260 ± 35 (5.9)	7.98 ± 1.51 (-0.9)	5.93 ± 1.06 (1.5)
Fr. b	10	1936 ± 211 (11.9)	757 ± 65 (17.2)	2236 ± 277 (2.4)	1334 ± 207 (-2.2)	7.03 ± 0.63 (11.5)	5.20 ± 0.54 (14.1)
	5	2560 ± 349 (-18.5)	687 ± 63 (25.2)	4695 ± 1189 (-150.3)	1184 ± 46 (14.3)	7.93 ± 0.87 (-0.3)	6.09 ± 0.58 (-1.2)
Fr. c	10	2149 ± 117 (1.5)	965 ± 108 (-6.3)	2603 ± 246 (-20.4)	1359 ± 197 (-4.9)	6.97 ± 0.62 (14.6)	4.71 ± 0.39 (22.4)
	5	2242 ± 431 (-3.0)	692 ± 156 (24.6)	2289 ± 277 (-0.9)	1202 ± 149 (12.3)	5.59 ± 0.95 (30.3)	4.32 ± 0.75 (29.0)
Fr. d	10	1983 ± 315 (9.6)	783 ± 163 (19.4)	2283 ± 336 (-0.5)	1364 ± 210 (-5.5)	8.66 ± 0.11 (-9.8)	6.35 ± 0.08 (-5.7)
	5	1754 ± 366 (21.2)	572 ± 121 (38.2)	1935 ± 350 (21.1)	1124 ± 198 (20.9)	5.01 ± 0.41 (37.8)	3.79 ± 0.29 ^{c)} (38.1)
Fr. e	50	1777 ± 71 (19.6)	451 ± 8 ^{c)} (51.9)	1934 ± 193 (21.2)	1256 ± 101 (6.4)	6.92 ± 0.40 (12.9)	5.24 ± 0.30 (13.3)
	20	1964 ± 586 (10.5)	678 ± 239 (26.2)	2352 ± 1113 (-4.8)	1142 ± 32 (18.9)	6.16 ± 3.10 (22.9)	4.45 ± 2.15 (26.8)

a) Each sample was intraperitoneally administered before ANIT treatment (75 mg/kg, *p.o.*) in rat. Values are the means ± S.D. (*n* = 5)

Protective potency (%) = $\frac{\text{ANIT treated group} - (\text{sample} + \text{ANIT})\text{treated group}}{\text{ANIT treated group} - \text{normal group}} \times 100$ b) Significantly different from the nontreated group. c) *p* < 0.01. d) Significantly different from the ANIT treated control group. c) *p* < 0.05, d) *p* < 0.01.

考 察

肝疾患治療薬の1次スクリーニング法として既に試験法を確立しているタイプの異なる2種の *in vivo* の実験系を採取した。^{4,8)} CCl₄ は肝の薬物代謝酵素である P-450 によって代謝され、トリクロロメチルラジカル (·CCl₃) となり、このラジカルの連鎖反応により肝細胞膜脂質の過酸化が生じ、肝壊死に至る肝実質細胞障害型の肝毒物であると言われ再現性の良いことで汎用

Fig. 3. Protective Effects of Fractions of MeOH Extract on ANIT Induced Cholestasis in Rats

Each value represents the mean $\pm$ standard deviation ($n=5$). a) Significant difference with respect to the nontreated group. $p < 0.01$. b) Significant difference with respect to the control ANIT group. $p < 0.01$.

Table 6. Protective Potencies of Some Compounds from *Berchemia racemosa* on CCl_4 or ANIT Induced Liver Injuries in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	Protective potency (%)						
		GOT	GPT	LDH	ALP	LAP	T-BIL	D-BIL
CCl ₄ induced liver injury								
Carpusin	5	30.9	−11.3	22.4	−20.6	5.3	11.1	−4.5
	1.5	6.1	2.5	4.9	−19.0	−22.2	−8.9	−13.1
	0.75	51.1 ^{b)}	67.3 ^{c)}	31.7	−8.2	33.3 ^{b)}	41.3 ^{b)}	25.7
	0.375	2.0	−1.0	−16.2	55.3	2.3	−7.6	−13.2
Berchemol	3	−17.4	−11.0	−57.9	−43.4	−27.3	−32.9	−18.2
	1	31.6	31.7	22.8	24.0	25.5	28.9	16.2
β-Sitosterol	10	−11.3	−20.3	−55.0	−67.9	6.9	−54.1	−48.3
2,6-Dimethoxy- benzoquinone	10	45.8	33.4	50.1	10.5	51.6	11.3	−20.0
	2	−5.5	0.5	−19.4	42.6	0.0	−12.7	−11.4
Rubrofusarin 6-β- gentiobioside	5	16.2	13.2	7.4	18.3	16.3	−10.7	−18.8
	1	15.8	8.6	0.6	27.4	11.6	−3.8	−7.2
	0.2	−2.2	−25.5	8.6	−15.9	8.7	15.5	3.7
ANIT induced liver injury								
Rubrofusarin 6-β- gentiobioside	1	−11.5	−7.4	−68.7	16.5	—	13.1	17.4

a) Each sample was intraperitoneally administered 30 min before CCl_4 (0.3 ml/kg, i.p.) or ANIT (75 mg/kg, i.p.) treatment in rat. Each value showed the protective potency at 24 h after CCl_4 treatment or 48 h after ANIT treatment. Significant difference from CCl_4 or ANIT control. b) $p < 0.05$, c) $p < 0.01$.

されている。⁹⁾ 本実験では、 CCl_4 投与後肝実質障害マーカーである GOT, GPT 等の逸脱酵素が血液中に急増し、その値は正常値の約 100 倍となり、肝所見も肝細胞の腫張、類洞の狭小化による小葉中心帯の肝細胞壊死を示し、激しい急性肝障害の様相を呈している (Table 4, Fig. 2a)。一方、ANIT は CCl_4 と同様に薬物代謝酵素により代謝された後、活性化物質となり、胆管上皮細胞の壊死脱落等を起こし、胆汁うっ滞の症状を呈する胆管系障害型の肝毒物とされ、胆汁中に排泄されるべきビリルビンや胆管上皮細胞に存在する ALP 等の酵素が血液中に流出される

と言われている。¹⁰⁾ 本報においても特に ALP, ビリルビンの上昇は CCl₄ と比較すると著しく高く, 肝実質系障害と胆管系障害の違いを示している (Table 5). しかし, CCl₄ と ANIT は, それぞれ肝実質細胞のみ, あるいは胆管系細胞のみに障害を誘発するのではなく, CCl₄ は胆管系細胞にも障害を与え, 同様に ANIT によっても肝実質細胞に障害を起こすとも言われている.^{8,11)}

そこで, 前報⁴⁾においてクマヤナギのメタノールエキスは CCl₄ 及び ANIT の両肝障害に有効性を認めたことから, それぞれの肝障害を抑制する共通な有効成分が存在するのか, あるいは異なる成分がそれぞれ防護しているかについて検討した. またクマヤナギの粗エキスについて, さらに詳しく検討を行うためにメタノールエキス及び水エキスの有効投与量, 投与時期の検討及び有効成分の検索を行った. その結果, 水エキスは CCl₄ 及び ANIT 肝障害を抑制し, 特に CCl₄ 肝障害に対しては, メタノールエキス I と同程度の高い防護効力を示し, 煎剤としての有用性の根拠を示した. またメタノールエキス I は CCl₄ 肝障害に対し, 250, 500 mg/kg 投与が最も高い効力を示し, 適量であることを認めた. また ANIT 肝障害に対しても 500 mg/kg 投与は 30 min 前投与で ANIT 肝障害を完全に防護し, さらに ANIT 投与 30, 120 min 後投与の場合も著しく高い効果を示したことより, 予防効果のみでなく治療効果も期待される.

また, ANIT による著しい胆汁うっ滞に対しても両エキスともに防護効果を示し, 胆汁中の胆汁酸排泄量の減少に対しても抑制効果を示し, ANIT による胆管系障害を巾広く抑制することを認めた. またヘキサン, アセトン, メタノールと順次分画した結果, CCl₄ 肝障害に対してはヘキサン不溶部から得たアセトンエキスが, ANIT 肝障害に対してはメタノールエキス II 及びその分画物が有効であり, それぞれの障害を防護する成分が明らかに異なることが示唆された. また有効成分の検索ではアセトンエキスのシリカゲルクロマトから得られた 5 つの分画物のうち, Fr. 2 の主成分である *carpusin* に CCl₄ 肝障害に対する有意な抑制効果が認められた. 一方, ANIT 肝障害に有効性を示したメタノールエキス II 及びそれを分画した酢酸エチル不溶部と, そのメタノール溶出部 D にも効力が認められた. このメタノール溶出部 D は ANIT 肝障害により生ずる胆汁流量減少をも防護し, ほぼ正常値に近い量が流出したことから, 活性成分はこの画分に存在すると考えられた. この画分には *rubrofusarin* 6- β -*gentiobioside*, 二量体バニリン酸配糖体である *berchemolide*,¹²⁾ *kaempferol*, (+)-*catechin* などの成分が確認されている. しかし, この画分をさらに 5 つに分画すると, 効力が分散する傾向がみられ, 有効成分の確認には至らなかった.

なお, 両肝障害に有効性を示した画分の単独投与を検討した結果, アセトンエキスは GOT 154 $\pm$ 14, GPT 19 $\pm$ 5, LDH 1718 $\pm$ 107, ALP 636 $\pm$ 89, LAP 34 $\pm$ 4, T-BIL 0.22 $\pm$ 0.05, D-BIL 0.14 $\pm$ 0.05, *carpusin* は GOT 145 $\pm$ 34, GPT 17 $\pm$ 1, LDH 1581 $\pm$ 620, ALP 700 $\pm$ 38, LAP 33 $\pm$ 1, T-BIL 0.29 $\pm$ 0.12, D-BIL 0.19 $\pm$ 0.09, メタノール溶出部 D は GOT 164 $\pm$ 17, GPT 15 $\pm$ 1, LDH 2040 $\pm$ 407, ALP 586 $\pm$ 57, LAP 37 $\pm$ 2, T-BIL 0.23 $\pm$ 0.08, D-BIL 0.15 $\pm$ 0.07 であり, 正常ラットに影響を及ぼされないことが認められた.

アセトンエキスから単離された *carpusin* に CCl₄ 肝障害を抑制する作用が認められたが, その他の成分はいずれも無効であった. *Carpusin* は 2 種のグラム陽性菌 *Streptococcus faecalis* R と *Staphyrococcus aureus* R に対して, 抗菌活性が認められているが,¹³⁾ 肝障害に対する防護作用は本報において初めて明らかにされた. しかし, *carpusin* 単独ではアセトンエキスほど強い防護効力を示さず, 有効投与量の巾も狭いことから *carpusin* 以外の有効成分の存在も考えられ, これら数種の成分の相互作用によって強い効力を発揮することが示唆された.

以上の結果よりクマヤナギは CCl_4 及び ANIT による肝実質細胞障害, 胆管系障害に対し, 100% 近い防護効力を示し, 胆汁うっ滞に対しても著効を示し CCl_4 肝障害と ANIT 肝障害の 2 種の肝障害に対して著しく強い防護効果を示し, その有効画分は各々異なることを認めた. また有効成分の 1 つは *carpusin* であることを認めたが, その他有効画分については一般に生薬の薬理作用が分画を進めると効力が分散し, 単一成分では説明できないのと同様に, 効力の分散が認められた. しかしクマヤナギの肝障害に対する防護効果は他の生薬に比べて極めて高く, 肝障害防護薬として有望な生薬であることを認めた.

引用文献及び注

- 1) 本研究の一部は, 日本生薬学会第 36 年会で発表, 1989 年 10 月, 熊本.
- 2) 岡田 稔, 布目慎勇, 寺林 進, 三木英二編, “原色牧野和漢薬草大図鑑,” 北隆館, 東京, 1988, p. 293.
- 3) 上海科学技術出版社, (株) 小学館編 “中薬大辞典,” 東京, 1977.
- 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); 熊沢紀子, 太田節子, 涂 修華, 鴨川 旭, 篠田雅人, 薬誌, **111**, 199 (1991).
- 5) Sakurai N., Nagashima S., Kawai K., Inoue T., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3311 (1989).
- 6) Inoue T., Nagashima S., Ohta S., Shinoda M., Sakurai N., *Planta Med.*, **56**, 120 (1990).
- 7) Inoshiri S., Sasaki M., Hirai Y., Khoda H., Otuka H., Yamasaki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1333 (1986). 今回, pyrogallol から合成した.
- 8) 鴨川 旭, 太田節子, 立木朱美, 熊坂昌子, 篠田雅人, 薬誌, **106**, 709 (1986).
- 9) MaCay P. B., Lai E. K., Poyer L., DuBose C. M., Janzen E. G., *J. Biol. Chem.*, **259**, 2135 (1984).
- 10) Eliakinn, M., Eisner M., Unger H., *Bull. Res. Cytochem.*, **7**, 1253 (1959).
- 11) Steiner J. W., Baglio C. M., *Lab. Invest.*, **12**, 765 (1963).
- 12) Sakurai N., Kobayashi M., Shigihara A., Inoue T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 851 (1992).
- 13) Mathew J., Rao A. V. S., Rambhav S., *Current Sci.*, **53**, 576 (1984).