UDC 612.397 : 616.36-003.82-085 : 582.536

305. 小林忠之： 沢瀉 (*Alisma plantago* L.) 成分の抗脂肪肝作用^{*1}(脂質代謝に関する研究 第3報^{*2})Tadayuki Kobayashi : Studies on Lipid Metabolism. III. Lipotropic
Effect of *Alisma plantago* L. ("Takusha") Extract.(Research Laboratories, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.^{*3})

The extract obtained from *Alisma plantago* L. was examined for anti-fatty liver activity on rat fatty liver caused by low-protein diet. It was found that the more purified (1·1·1·1) fraction had stronger effect than the extracted component (I) and that the fraction (1·1·1·1) + choline corresponding to the amount of component (I) had anti-fatty liver effect equal to that of (I). Comparative examination on the standard sample of the component (1·1·1·1) with choline and lecithin showed that they had approximately equal anti-fatty liver activity. Component (1·1·1·1) and lecithin showed stronger anti-fatty liver activity when added with a small quantity of choline (in 0.01% dose which in itself showed no activity) than when used alone. The effect of component (1·1·1·1) on the amount of cholesterol, ratio of free and total cholesterol, phospholipid, and cholesterol lipid ratio in the serum and liver during examination of anti-fatty liver activity was examined in comparison with those of choline and lecithin, and it was found that the component (1·1·1·1) is a new substance, different in biological activity from choline or lecithin.

(Received June 6, 1960)

低蛋白食, 高脂肪食, アルコール中毒, ガス中毒その他の食餌あるいは薬物によつて起こる脂肪肝が生体にとつて種々の代謝に重要な肝臓の機能を低下させ, 慢性化すれば肝硬変に移行することが家兎, 鶏の実験あるいは人体で認められている。抗脂肪肝剤の効果は脂肪性肝硬変の前段階である脂肪肝の時期までであつて, 肝硬変の特徴である線維増殖, 結節性肥大, 高度の機能障害などが見られるようになると, 周囲の肝細胞の脂肪浸潤を除去しうるにすぎない。この意味で脂肪肝の治療は肝硬変に移行する前に行なわれねばならず, また予防が重要な問題となる。正常肝は 3~5%の脂質を含有し, そのうち約 2% はリン脂質, 約 0.5% はコレステロール, 約 1.0% は中性脂肪であるが, 脂肪肝では脂質の蓄積が 30% 以上にも達し, コレステロールやリン脂質も増加するが, その主体は中性脂肪である。その成因としては食餌から吸収された脂質あるいは末梢から動員された脂質の肝への移行, 肝の脂質処理能の低下, 肝内合成促進などが想定されている。食餌性脂肪肝を防止する因子として早くからコリン, レシチン, メチオニン, イノシトールなどが知られ, lipotropic factor (抗脂肪肝因子) と名付けられて相互の関係, 作用機序などにつき実に多数の研究がある¹⁻⁴⁾。しかし生薬成分の効果に関するものは見当たらない。著者は第1報⁵⁾で均一系シロネズミによる抗脂肪肝作用検定の可能性を, 前報^{*2}でこの方法による二, 三の生薬抽出物とくに沢瀉抽出物の抗脂肪肝効果を報告し, 沢瀉抽出物が既知のレシチン, コリンと化学的に異なることを示した。本報においては沢瀉抽出物の生物学的作用の特徴を明らかにするために行なつた諸試験のうちコレステロール添加低蛋白基礎飼料 No. 22⁵⁾で飼育した際の脂肪肝とそれに随伴する血清および肝中脂質の異常に対する影響およびコレステロール無添加低蛋白基礎飼料 No. 23⁵⁾で飼育した際の脂肪肝の予防, 治療効果につき既知抗脂肪肝剤と比較検討した成績を報告する。

*1 本研究の要旨は日本薬学会近畿支部例会で発表 (昭和 35 年 3 月)。

*2 本研究は, 荒蒔義知: 脂質代謝に関する研究 (Y. Aramaki: Studies on Lipid Metabolism) の一部である。第2報: 本誌 80, 1456(1960)。

*3 Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) J. H. Ridout, C. H. Best, et al.: Biochem. J. 58, 297, 301, 306 (1954).

2) G. T. Passananti, et al.: J. Nutr. 66, 55(1958).

3) A. E. Harper: Am. J. Clin. Nutr. 6, 197(1958).

4) V. A. Drill: Ann. N.Y. Acad. Sci. 57, 655(1954).

5) 小林: 本誌 80, 1448(1960)。

実験方法および実験材料

生後3週のSD系雄シロネズミを第1報⁵⁾の低蛋白基礎飼料で飼育し、生薬抽出物をそれぞれの濃度に混合投与し、10日あるいは20日後の血中および肝中の組成を分析した。肝中粗脂肪量は第1報⁵⁾の方法で測定し、血中および肝中のコレステロールは遊離型をSchönheimer-Sperry法^{6,7)}、総コレステロールをAbell等⁸⁾の方法で測定した。リンはKing⁹⁾の方法によつて測定しその25倍をリン脂質量とした。また中性脂肪はHandel等¹⁰⁾の方法によつて測定した。

実験材料

沢瀉抽出物^{*4} T (I), T (I・2・I), T (I・2・I・I), T (I・I・I・I), 大豆レシチン^{*5} (林および和光製), 卵黄レシチン^{*6} (和光), イノシトール, V.B₁₂, choline chloride.

実験群

1. 1群8匹のシロネズミを用い、T (I), T (I・I・I・I) およびコリンの抗脂肪肝作用を比較した。飼料にはNo. 22を用い、10日間飼育。
2. 1群6匹のシロネズミを用い T (I), T (I・2・I), T (I・2・I・I), T (I・I・I・I), T (I・I・I・I)+コリン, コリン, およびシトステロールの抗脂肪肝作用を比較。飼料はNo. 22で、10日間飼育。
3. 1群6匹のシロネズミを用い T (I・I・I・I), T (I・I・I・I)+コリン, 卵黄レシチン, 大豆レシチン2種 (林, 和光), 和光レシチン+コリン, およびコリンの抗脂肪肝作用, 血中脂質に対する影響を比較。飼料はNo. 22で、10日間飼育。
4. 1群6匹のシロネズミを用い T (I・I・I・I), 大豆レシチン (和光), 卵黄レシチン (和光), およびコリンの抗脂肪肝作用を比較。飼料にはコレステロールを含まないNo. 23を用い、20日間飼育。
5. 1群6匹のシロネズミを用い No. 23 飼料で20日間飼育して脂肪肝をつくり、これに対する治療効果につき T (I・I・I・I), V.B₁₂, イノシトール, 大豆レシチン, 卵黄レシチン, およびコリンを比較。

実験成績および考察

1. T (I), T (I・I・I・I), およびコリンの抗脂肪肝作用の用量作用曲線はFig. 1に示す通りである。T (I・I・I・I)の曲線がT (I)のそれにくらべてねていることがわかる。この差はT (I)の中にはコリンが微量含まれ相乗効果を示していることを暗示する。コレステロール添加による脂肪肝に対してコリンが0.1%添加のレベルでこれを正常値にまで改善することはT (I・I・I・I)に優る点である。

Fig. 1.
Lipotropic Effect of Takusha Extract
compared with Choline Chloride

SD-strain, 3 week-old, ♂ rat,
1 Group: 8 rats,
Feeding for 10 days.

2. T (I), T (I・2・I), T (I・2・I・I), T (I・I・I・I), T (I・I・I・I)+コリン 0.00273%添加, 大豆レシチン, シトステロール, およびコリンの用量作用曲線はFig. 2に示す通りである。T (I・2・I・I)は無効に近く, T (I・2・I)もほとんど作用がない。これに含まれるコリンがきわめて少なく, 最少有効量以下であることがわかる。T (I)は有効である。T (I・I・I・I)の強い作用はこのものがかなり精製された段階のものであることを示す。T (I・I・I・I)に無作用量のコリンを加えると相乗効果が見られる。レシチンはT (I・I・I・I)とほぼ等力価と思われる。コリン

6) R. Schönheimer, W.M. Sperry: J. Biol. Chem. **106**, 745(1934).

7) W.M. Sperry, M. Webb: *Ibid.* **187**, 97(1950).

8) L.L. Abell, *et al.*: *Ibid.* **195**, 357(1952). 9) E.J. King: Biochem. J. **26**, 292(1932).

10) E.V. Handel, D.B. Zilversmit: J. Lab. Clin. Med. **50**, 152(1957).

*4 沢瀉抽出物の相互関係は第2報 Chart 1 参照。

*5 P の測定値から算出されたレシチン含量は 林: 38.4%, 和光: 66.5%。

*6 P の測定値から算出されたレシチン含量は 91.5%。

の作用はこの時は比較的弱く、正常値まで脂肪量を下げることができなかつた。シトステロールは1%のレベルではあまり作用がなく、2%でかなりの効果を現わした。これはコレステロールの吸収阻害によつて作用したものと推定される。

Fig. 2.

Lipotropic Effect of Takusha Extract and other Lipotropic Agents

SD-strain, 3 week-old, ♂ rat, 1 Group: 6 rats, Feeding for 10 days.

- 1 T (I), 2 T (1.1.1.1), 3 T (1.2.1), 4 T (1.2.1.1), 5 T (1.1.1.1)+Choline chloride, 0.1% 0.00273%
6 Lecithin, 7 Choline chloride, 8 Sitosterol

3. Fig. 3-1 に示すように T (1.1.1.1) にコリンを添加した場合の相乗効果が再び認められる。卵黄レシチンはリン含量が高いだけに大豆レシチンより有効なことが明らかに示されている。コリンの効果は少量ではあまり強くなく、T (1.1.1.1)+コリンに劣っているが、大量においてやはり最もすぐれていることを示した。血清コレステロールに対する影響は Fig. 3-2 に示す通りである。コリンが血中コレステロールを上げている点が注目される。この成績はシロネズミ¹¹⁾、猿¹²⁾、および鶏¹³⁾ について見られる文献の成績とよく一致する。レシチンがコリン様の作用を示さないことはその化学的類似性から奇異の感をいだかせるが、著者の家兎についての粥状硬化症の場合でも同じようなことが見られた*7。T (1.1.1.1) はレシチン同様にコレステロールを低下させるが、これに無作用量のコリンを加えた時これをさらに低下させることが注目される。以上の事実は T (1.1.1.1) の新物質であることを暗示している。血清リン脂質は Fig. 3-3 に示す。T (1.1.1.1) がコリン、レシチンと異なり用量作用曲線は見られなかつたが、微量でリン脂質を低下させていることが注目される。T (1.1.1.1)+コリンが適当に T (1.1.1.1) の低下作用を緩和していることはきわめて興味あるところである。T (1.1.1.1) は粥状硬化症にも有効な抗脂肝剤ではないかと思う。肝コレステロールは Fig. 3-4 に示す。血清のコレステロールを上昇させたコリン

Fig. 3-1.

Lipotropic Effect of Takusha Extract and Various Lecithins

SD-strain, 3 week-old, ♂, 1 Group: 6 rats, Feeding for 10 days.

- (•) Choline chloride
(△) Soya lecithin (Hayashi)
(▲) Soya lecithin (Wako)
(○) Egg lecithin (Wako)
(×) T. ext. (1.1.1.1)
(⊠) Soya lecithin (Wako) + Choline chloride 0.01%
(⊗) T. ext. (1.1.1.1) + Choline chloride 0.01%

11) G. F. Wilgram, *et al.*: *Circulation Res.* 5, 111(1957).

12) G. V. Mann, *et al.*: *J. Exptl. Med.* 98, 195(1953).

13) J. Stamler, *et al.*: *Circulation* 2, 714(1950).

*7 第7報に報告予定。

Fig. 3-2.
Serum Total Cholesterol

Fig. 3-3.
Serum Phospholipid

Fig. 3-4.
Liver Total Cholesterol

Fig. 3-5.
Liver Phospholipid

が肝のそれを下げている。T (1・1・1・1) はその点ではコリンに類する。レシチンが肝コレステロールを上げていることは、T (1・1・1・1) とレシチンとが異なつたものであることを示す一つの証拠になる。肝のリン脂質に対する影響を Fig. 3-5 に示した。単味のコリン、レシチンは低下作用を示し、T (1・1・1・1) はきれいな用量作用曲線を

もつてリン脂質を上昇させているが、これはレシチン、コリンと明らかに異なる点である。レシチン+コリンが T (1・1・1・1) 類似の作用を示すことは興味深い。脂質代謝の研究はまだまだ今後の課題が残されていると感じさせる。以上の成績を要約すれば Table I のようになる。Table I に明らかなように T (1・1・1・1) は新しい抗脂肪肝物質と思われる。

Table I. Change of Cholesterol and Phospholipid Levels in Serum and Liver of Rats fed with Low Protein Diet supplemented with Various Lipotropic Agents

Supplement	Cholesterol		Phospholipid	
	Serum	Liver	Serum	Liver
Choline	increase	decrease	increase	decrease
Lecithin	decrease	increase	increase	decrease
Takusha extract (1・1・1・1)	decrease	decrease	decrease	increase

4. 低蛋白だけで起こる脂肪肝に対する T (1・1・1・1), 大豆レシチン, 卵黄レシチン, およびコリンの抗脂肪肝作用を Fig. 4 に示す。この種の脂肪肝において T (1・1・1・1) はコリンに優るとも劣らない。レシチンとくに卵黄レシチンは作用がかなり弱い。

Fig. 4.
Lipotropic Effect of Takusha
Extract and Lecithin

SD-strain, 3 week-old, ♂
1 Group : 6 rats,
Feeding for 20 days.

- (•) Choline chloride
- (▲) Soya lecithin (Wako)
- (○) Egg lecithin (Wako)
- (×) T. ext. (1・1・1・1)

5. 上記脂肪肝に対する治療効果を Fig. 5 に示す。この場合 20 日間の飼育で脂肪量が 6% に達しなかつたが、治療効果をみる事ができた。V. B₁₂ の効果は 30γ% で発揮され、このものが最少有効量の点で比較されるならば最も有効なものといえる。イノシトールはただ一回だけの投与で見たので、他のものとの比較はできないが、かなり有効でレシチンに優るのではないかと思う。T (1・1・1・1), コリンはこの点でも V. B₁₂ について有効のように思う。

Fig. 5.
Curative Test of Various
Lipotropic Agents

- 1 Negative control
- 2 Choline chloride 0.03%
- 3 T. ext. 0.03%
- 4 Soya lecithin 0.3 %
- 5 Vitamin B₁₂ 30 γ%
- 6 Soya lecithin 1.0 %
- 7 Egg lecithin 0.3%, 1.0 %
- 8 T. ext. (1・1・1・1) 0.3 %
- 9 Inositol 0.3 %
- 10 Choline chloride 0.3%, 1.0 %
- 11 T. ext. (1・1・1・1) 1.0 %
- 12 Normal diet

Feeding under low protein diet with

Deficient of lipotropic substance	Addition of lipotropic substance
---	--

結 論

1. 沢瀉 (*Alisma plantago* L.) から分離した抽出物の低蛋白飼育による脂肪肝に対する抗脂肪肝作用は標準品のコリン、大豆レシチンに優るとも劣らない。

2. 抗脂肪肝作用検討時の血清中および肝中の脂質を分析した結果コリン、レシチンはまったく異なる作用物質であることが示された。すなわち沢瀉の有効成分は文献未知の新しい物質と思われる。

本研究に当たり御鞭撻を賜った研究所長 桑田 智博士、第2部長 立岡末雄博士、第4部長 金沢謙一博士、主任研究員 田中邦喜博士に謹謝致します。また有益な御助言を戴いた後藤 実博士、抽出実験に協力された森本 浩博士、木全清一氏ならびに生物実験に協力された松村晴希、安井清子両氏に深謝致します。

武田薬品工業株式会社研究所

UDC 612.397 : 616.36-003.82-085 : 582.536

306. 小林忠之： 沢瀉 (*Alisma plantago* L.) 成分の生物学的検討*¹ (脂質代謝に関する研究 第4報*²)

Tadayuki Kobayashi: Studies on the Lipid Metabolism. IV. Several Biological Criteria of *Alisma plantago* L. ("Takusha") Extract.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*³)

Some examinations were made on the biological activity of the component (1-1-1-1) from *Alisma plantago* L. and following facts were found:

- 1) Acute toxicity, LD₅₀, is 780 mg./kg. by intravenous injection and 1270 mg./kg. by intraperitoneal injection in mice, but no death occurred on oral administration of 4000 mg./kg.
- 2) Subacute toxicity was tested by feeding the rats on a diet added with 0.1% or 1.0% of the component (1-1-1-1) but there was no marked change in body weight increase, weight of various organs, or amount of liver fats after 2.5 months.
- 3) This component (1-1-1-1) of *Alisma plantago* L. was found to alleviate lipemia caused by fat administration but it was not possible to prove the presence of a clearing factor in the plasma.

(Received June 6, 1960)

前報*² で沢瀉成分に抗脂肪肝作用があり、しかもそれが既知のコリン、レシチン、メチオニン、V.B₁₂ などと異なることが化学的にも生物学的にも証明された。そこでこの新しい抗脂肪肝物質の急性、亜急性毒性、およびシロネズミの脂血症清澄作用についてしらべた。

実験方法

急性毒性は健康な ddT 系生後4週の雄ハツカネズミを1群6匹とし、静脈、腹腔内、経口投与して中毒症状および致死量 (LD₅₀) をしらべた。亜急性毒性は SD 系生後3週の雄雌シロネズミの生長および臓器に対する影響をしらべ、血清中および肝中の脂質値について検討した。つぎに成熟 SD 系雌シロネズミに綿実油 6 cc/rat を経口投与して起こる脂血症が沢瀉抽出物の腹腔内投与によつて清澄化されるか否かをしらべた。

実験成績および考察

急性毒性 ddT 系生後4週ハツカネズミ1群6匹を用い尾静脈、腹腔、経口投与して LD₅₀ を Litchfield, Wilcoxon 法¹によつて計算した。急性中毒症状は静脈注射では呼吸麻痺によつて即死し、腹腔内投与で

*¹ 本研究の要旨は日本薬学会近畿支部例会で発表 (昭和 35 年 3 月)。

*² 本研究は、荒蒔義知：脂質代謝に関する研究 (Y. Aramaki: Studies on Lipid Metabolism) の一部である。第3報：本誌 80, 1460(1960)。

*³ Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) J. T. Litchfield, F. Wilcoxon: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 96, 99(1949).