Mi-saponin の抗炎症作用

山原 條二, 壬生 寛之, 沢田 徳之助,^{1a)} 藤村 一,^{1b)} 白川 清治, 吉川 雅之, 北川 勲^{1c)}
京都薬科大学,^{1a)} 岐阜大学医学部,^{1b)} 大阪大学薬学部^{1c)}

Anti-inflammatory Effects of Mi-saponin

JOHJI YAMAHARA, HIROYUKI MIBU, TOKUNOSUKE SAWADA,^{1a)} HAJIME FUJIMURA,^{1b)}
KIYOHARU SHIRAKAWA, MASAYUKI YOSHIKAWA and ISAO KITAGAWA^{1c)}

Kyoto College of Pharmacy,^{1a)} Gifu University School of Medicine,^{1b)}
and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University^{1c)}

(Received January 25, 1979)

The anti-inflammatory actions of Mi-saponin, which was isolated from the seeds of *Madhuca longifolia* L. and whose structures are closely related to those of the saponins of Senega and Polygala, were compared with those of two standard drugs, phenylbutazone and β -escin which is the saponin mixture present in the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.

(1) Mi-saponin was found to have anti-edematous action on carrageenin edema and inhibitory actions against increased vascular permeability, cotton pellet granulation and peritonitis-induced inflammatory exudate.

(2) The anti-inflammatory actions of Mi-saponin were nearly equal to those of β -escin, whereas the actions of Mi-saponin were weaker than those of phenylbutazone in general.

(3) In some cases the concurrent use of Mi-saponin with phenylbutazone exerted anti-granulation action stronger than that of the individual compounds.

Keywords—anti-inflammatory effects of saponin; *Madhuca longifolia* L.; Mi-saponin; β -escin; increased vascular permeability; carrageenin edema; cotton-pellet granulation; inflammation exudate induced by peritonitis

既に医薬品として甘草の glycyrrhizin²⁾ やセイヨウトチノキの種子 saponin³⁾ が使用されているが, 近年新しく数種の saponin に抗炎症活性のあることが報告されている.⁴⁾ 著者らもラット carrageenin 足浮腫法で多数の生薬類の抗浮腫作用をスクリーニング試験した結果, セネガ, オンジなどのほかにも saponin 含有生薬に活性のあることを認め, すでに報告した.⁵⁾ また同時にセネガ saponin などと構造類似の Mi-saponin (*Madhuca longifolia* (L.)⁶⁾ MACBRIDZ), 種子にも抗炎症作用のあることを報告した.⁵⁾ 今回はより詳細に Mi-saponin の抗炎症活性の様式を検討するために, 既知の抗炎症活性を有する saponin として β -escin (Sigma 社) および phenylbutazone (以下 P.B. と略記, 藤沢薬工) との比較および併用試験を行なったのでその結果を報告する.

実験方法および材料

1. 急性毒性 体重 18—20 g の dd 系雄性マウスを一群 10 匹として薬物を経口投与し, 投与 72 時間後の致死数から Litchfield-Wilcoxon 法により LD₅₀ を求めた. なお, 水, 餌とも観察期間中は自由に与えた.

2. 毛細血管透過性亢進抑制作用—ラットに対する皮内色素拡散抑制作用 体重約 100 g の Wistar 系 (W 系と略記) 雄性ラットを一群 10 匹として被検薬を経口投与後 60 分に起炎物質として histamine 100 μ g/0.1 ml/site

- 1) Location: a) Misasagi Yamashina-ku, Kyoto, 607, Japan; b) 40 Tsukasamachi, Gifu, 500, Japan; c) 133-1 Yamadakami, Suita, Osaka, 565, Japan.
- 2) H.D. Woidke, J.P. Kayser, K. Hiller, *Pharmazie*, **25**, 133, 213 (1970).
- 3) 相沢義雄, 福井時子, 山田健二, 向後博司, *応用薬理*, **8**, 211 (1974).
- 4) 高木敬次郎, 和漢薬シンポジウム, **10**, 36 (1977).
- 5) 山原 條二, 沢田 徳之助, 木島孝夫, 新谷佳子, *薬誌*, **95**, 1179 (1975).
- 6) a) I. Kitagawa, A. Inada, I. Yosiooka, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **23**, 2268 (1975); b) I. Kitagawa, K. Shirakawa, M. Yoshikawa, *ibid.*, **26**, 1100 (1978).

を腹部皮内に注射し注射後直ちに 5% pontamine sky blue 溶液 0.1 ml/100 g を静脈内注射した。15 分後に動物を殺し、皮膚をはく離し、起炎物質注射部位の青染された部分を dimethylsulfoxide で 7 日間抽出し 630 nm の吸光度から control に対する青染度の阻害率を % で示した。

3. 急性ラット後肢足蹠浮腫抑制作用 体重 140—160 g の W 系雌ラットを用い、一群 10 匹として既報⁶⁾に準じて carrageenin を起炎剤として試験した。

4. Cotton Pellet 法 Winter らの方法に準じて既報⁷⁾により体重 160 g 前後の雄性 W 系ラット一群 7 匹として薬物を 6 日間投与し、7 日目に殺し綿球に附着した肉芽重量を測定した。

5. ラット腹膜炎に対する効果 体重 150—180 g の W 系雌雄ラットを一群 6 匹として既報⁷⁾に準じて mustard を起炎剤とする実験的腹膜炎に対する Mi-saponin の効果を試験した。すなわち薬物投与の 30 分前にすべての動物に 20 ml/kg の水を経口投与し、つづいて薬物を投与した。薬物投与後 30 分に 10% mustard 水懸濁液を 1 ml/kg 腹腔内投与した。効果の判定は mustard 注射後 5 時間にエーテル麻酔下で殺し、直ちに開腹し、腹水を重量既知の脱脂綿に吸水させ重量を測定することによって求めた。実験結果は腹水量および、対照群の腹水量に対する抑制率をもって比較示した。

6. Adjuvant Arthritis (治療効果) 体重 200 g 前後の S.D. 系雄性ラットを一群 8 匹として既報⁷⁾に準じて試験した。すなわち adjuvant 注入後 14 日目に浮腫強度一定の動物のみを選択し、それ以降 21 日間被検薬を毎日経口投与し、浮腫の抑制および secondary lesion における炎症の程度を観察した。被検薬投与最終日に secondary lesion の程度の score を求めて、次式により抑制率を求めた。Secondary lesion の抑制率(%) = $100 - \frac{\text{処置群の平均 score}}{\text{対照群の平均 score}} \times 100$ 。さらに score を求めたのち動物を殺し、Softex により骨の状態を検し、胸腺、脾臓、副腎および腸骨リンパ節の各重量を求めた。本実験に使用した比較対照薬は β -escin P.B., indomethacin (メルク万有) および chlorpheniramine maleate (局方品) などである。Mi-saponin は既報⁹⁾と同様のものとして Mi-saponin A: Mi-saponin B: Mi-saponin C = ca. 5:5:1 の割合で含有する。特に断らない場合はこれらの saponin の混合物を Mi-saponin として示した。

実 験 結 果

1. 急性毒性

Table I に示した様に Mi-saponin は P.B. とほぼ同等の LD₅₀ 値を示し、 β -escin よりも弱かったが有意の差はなかった。Saponin 投与群の死亡例を剖検すると小腸粘膜に充血が認められた以外著明な変化はなかった。

2. 毛細血管透過性亢進抑制作用—ラットに対する皮内色素拡散抑制作用

Table II に histamine で惹起された毛細血管透過性亢進に対する抑制作用を示した。Mi-saponin 100 mg/kg *p.o.* では対照群の約 20% の抑制作用を示し、P.B. よりも強力な作用であった。また Mi-saponin の sapogenol である protobassic acid および prosapogenol 体である Mi-glycoside I 等には有意な抑制作用はみられなかった。比較対照薬の β -escin は Mi-saponin とほぼ同等の効果で、抗 histamine 剤である chlorpheniramine は 20 mg/kg の経口投与でも 71.6% と強い阻害作用を示した。

3. 急性ラット後肢足蹠浮腫抑制作用

Fig. 1-1 に Mi-saponin 単独投与の場合および Mi-saponin と P.B. と併用した場合の抗浮腫作用について示した。 β -Escin および Mi-saponin のそれぞれ単独投与では約 15% 程度の抑制効果で、その作用は P.B. と併用することによって増強されることはなかった。また Mi-saponin A,B 間にも抑制効果に差異はみられなかった (Fig. 1-2)。

TABLE I. Acute Toxicity of Mi-saponin in Mice

Substances	LD ₅₀ (95% C.L.) mg/kg, <i>p.o.</i>
Mi-saponin	450.0 (346.2—585.0)
β -Escin	386.0 (357.4—416.9)
Phenylbutazone	480.0 (342.9—672.0)

7) 山原條二, 沢田徳之助, 藤村 一, 生薬, 28, 83 (1974).

8) 藤村 一, 鶴見介登, 林 元英, 牛島美帆子, 江崎俊治, 鈴木良雄, 伊藤幹雄, 日薬理誌, 63, 43 (1967).

9) J. Yamahara, Y. Takagi, T. Sawada, H. Fujimura, K. Shirakawa, M. Yoshikawa, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 27, 1468 (1979).

TABLE II. Inhibitory Effect of Mi-saponin on Capillary Permeability Enhancement induced by Intradermal Histamine (100 μ g/0.1 ml/site)

Substances	Dose, mg/kg, <i>p.o.</i>	OD at 630 nm Mean $\pm$ S.E.	Inhibitory rate (%)
Control	—	0.2116 $\pm$ 0.0126	
Indomethacin	2.5	0.2464 $\pm$ 0.0126	0
Phenylbutazone	200.0	0.2533 $\pm$ 0.0238	0
Control	—	0.1922 $\pm$ 0.0131	
Mi-saponin	50.0	0.1752 $\pm$ 0.0104	8.8
Mi-saponin	100.0	0.1588 $\pm$ 0.0118	17.4 ^{a)}
Mi-saponin	200.0	0.1331 $\pm$ 0.0163	30.7 ^{b)}
Mi-glycoside I	100.0	0.1895 $\pm$ 0.0292	1.4
Protobassic acid	100.0	0.1826 $\pm$ 0.0146	5.0
β -Escin	100.0	0.1705 $\pm$ 0.0068	11.3 ^{a)}
Chlorpheniramine maleate	20.0	0.0546 $\pm$ 0.0057	71.6 ^{c)}

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$. Average of 10 male rats.

TABLE III. Effect of Mi-saponin and Phenylbutazone (PB) on Granulation by Means of Cotton Pellet Method

Drugs	Daily dose mg/kg <i>p.o.</i>	Body weight (g)			Granulation tissue	
		Initial	Final	Gain	mg dry weight $\pm$ S.E.	Inhibition per cent
Control		148 $\pm$ 2.2	221 $\pm$ 6.4	73	40.8 $\pm$ 2.57	
Mi-saponin	100	148 $\pm$ 4.2	217 $\pm$ 9.1	69	35.9 $\pm$ 1.72	12.0
	200	148 $\pm$ 2.3	219 $\pm$ 7.1	71	33.9 $\pm$ 1.34 ^{a)}	16.9
Mi-saponin + PB	100 + 25	148 $\pm$ 3.0	219 $\pm$ 6.9	71	35.0 $\pm$ 1.92	14.2
	200 + 25	148 $\pm$ 3.2	195 $\pm$ 11.2	47	31.1 $\pm$ 1.60 ^{b)}	23.8
	100 + 50	148 $\pm$ 2.8	216 $\pm$ 10.3	68	29.6 $\pm$ 1.27 ^{c)}	27.5
PB	25	148 $\pm$ 2.3	217 $\pm$ 5.2	69	38.4 $\pm$ 1.53	5.9
	50	148 $\pm$ 2.2	213 $\pm$ 6.7	65	36.4 $\pm$ 1.95	10.8
	100	148 $\pm$ 2.8	221 $\pm$ 6.6	73	27.3 $\pm$ 1.03 ^{c)}	33.1

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$. Average of 7 male rats.

Fig. 1-1. Inhibitory Effect of Mi-saponin, β -Escin and Phenylbutazone (PB) on the Rat Hind Paw induced by Carrageenin (0.5 %, 0.1 ml/rat)

Small number = Inhibitory per cent.
Average of 10 male rats (140–160 g).
— control.

Fig. 1-2. Inhibitory Effect of Mi-saponin A and Mi-saponin B on the Rat Hind Paw induced by Carrageenin (0.75 %, 0.1 ml/rat)

Small number=inhibitory per cent. Average of 10 female rats (130—150 g).
— control.

TABLE IV. Effect of Mi-saponin on the Inflammatory Exudation by Intraperitoneal Mustard Powder in Rats

Drugs	Dose mg/kg, <i>p.o.</i>	Volume of exudate ± S.E. (g)	Inhibitory rate (%)
Control	—	7.35 ± 0.24	—
Mi-saponin	50	6.48 ± 0.34	11.9
	100	5.85 ± 0.22 ^{a)}	20.4
Mi-saponin + PB	50 + 25	6.23 ± 0.34 ^{a)}	15.3
	100 + 25	5.25 ± 0.37 ^{c)}	28.6
PB	25	6.38 ± 0.25 ^{a)}	13.2
	50	5.93 ± 0.34 ^{b)}	19.4

Average of 6 female rats (150—180 g).

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.001$.

4. Cotton Pellet 法

Table III にその結果を示した. 綿球に附着した肉芽量は Mi-saponin 100 mg/kg + P.B. 50 mg/kg の併用投与群に最も少なく, それぞれの単独投与の場合よりも有効な結果を得た. この場合も Mi-saponin A および B 間には抑制効果に差異はみられなかった.

5. ラット腹膜炎に対する効果

Table IV にその結果を示した. Mi-saponin の 50 mg/kg 単独投与では対照群に比較して約 12% 腹水の滲出

が抑制され、さらに増量して投与すると有意に抑制作用が増強され、用量依存性があった。しかし比較対照薬 P.B. と Mi-saponin との併用試験では各々を単独で投与した場合よりも抑制的に働くことはなかった。

6. Adjuvant Arthritis (治療効果)

Table V に炎症の程度の score を求めた結果を阻害率で示した。Mi-saponin は 200 mg/kg *p.o.* の投与でも著明に score を減少させることはなかった。また P.B. との併用においても、P.B. 単独投与以上に score を改善することはなかった。Fig. 2-1 に浮腫率を示したが実線で示した adjuvant 処置足の浮腫は Mi-saponin 単独投与

TABLE V. Curative Effect of Mi-saponin and Phenylbutazone (PB) on the Inflammatory Score in Adjuvant Arthritis and Organ Weight after Arthritis in Rats

Drugs	Daily dose mg/kg <i>p.o.</i>	B.W. gain (g)	Inflam- matory score Inhibition %	Organ weight (mg/100 g, B.W.)			
				Thymus	Spleen	Adrenals	Iliac lymph node
Normal		98.9	—	146 ± 14.7	332 ± 28.5	17 ± 0.4	17 ± 1.0
Control		40.6	0	103 ± 10.2	593 ± 60.3	31 ± 2.1	53 ± 10.0
Mi-saponin	100	21.3	1.0	98 ± 10.4	635 ± 66.5	38 ± 3.3	73 ± 5.8
	200	31.1	19.0	103 ± 14.5	549 ± 60.4	35 ± 2.6	75 ± 13.1
Mi-saponin + PB	200 + 25	67.3	43.8 ^{a)}	118 ± 16.0	400 ± 28.6	23 ± 2.3	46 ± 6.4
PB	25	65.5	59.0 ^{a)}	125 ± 17.1	358 ± 32.9	22 ± 2.0	45 ± 9.2

a) $p < 0.05$. Average of 6 male rats.

Fig. 2-1. Changes in Swelling of Mi-saponin and Phenylbutazone in Adjuvant Arthritis in Rats
— control.

Fig. 2-2. Changes of Mean Body Weight of Mi-saponin and Phenylbutazone in Adjuvant Arthritis in Rats
..... normal; — control.

群において処置対照群よりも抑制的に働くことはなく、P.B. との併用試験においても、P.B. 単独投与の効果以上の作用はなかった。Fig. 2-2 に観察期間中の体重の変化、Table V に胸腺、脾臓、副腎ならびに腸骨リンパ節の重量をそれぞれ示した。体重の変化をみると P.B. 投与群は無処置対照群により似た体重増加曲線を示したのに反し、Mi-saponin 投与群は adjuvant 処置群にほぼ類似の傾向を示した。同様の事が各臓器重量の結果でも言える。すなわち、P.B. 25 mg/kg 投与群では併用、単独いずれの場合とも有意に臓器重量は無処置対照群の値に回復していた。Softex による足部の骨の状態の観察においても前述の Table V の結果をさらに肯定する資料となり、Mi-saponin は adjuvant 関節炎に対して無効であると思われた。

結 論 お よ び 考 察

Saponin の抗炎症作用に関しては β -escin, glycyrrhizin, チャ saponin, キキョウ saponin, サイコ saponin などの報告⁴⁾がある。セネガ、オンジなどに含有される saponin と構造類似の Mi-saponin が carrageenin 浮腫に対して抑制的に作用することから、Mi-saponin の抗炎症作用についてさらに詳細に β -escin などと比較検討した。また P.B. の副作用の一つとして常用量でも浮腫の生じることが知られている。¹⁰⁾ そこで別に報告⁹⁾した様に Mi-saponin は利尿効果も有しているの、P.B. と併用することにより各々単独使用以上に抗炎症作用が増強され、その結果 P.B. の使用量が減じ P.B. 由来の副作用を軽減させることが出来るかもしれないと考え、併用での効果も試験した。その結果 Mi-saponin の急性毒性は P.B. ならびに β -escin とほぼ同等の結果が得られ、また急性炎症モデルの一つである血管透過性を histamine で亢進させその抑制効果に関して試験したところ Mi-saponin は β -escin とほぼ同等で P.B. よりも強力な抑制作用を示したのに反し、Mi-saponin の sapogenol および prosapogenol にはほとんど抑制効果を認めなかった。このことは saponin の構造活性相関を考える点で興味ある問題を示し、今後さらに検討していく予定である。Carrageenin 浮腫法で試験した結果についても Mi-saponin は β -escin とほぼ同等の抑制効果であった。また cotton pellet 法においても Mi-saponin は肉芽の増殖を有意に抑制した。しかし人の関節リュウマチの病態に類似するといわれている慢性炎症疾患モデルである adjuvant 関節炎に対しては Mi-saponin はなんら改善効果を示さなかった事は Vogel¹¹⁾ にも述べている様に saponin の抗炎症作用は比較的炎症の初期の病態モデルに有効であったことから慢性的疾患にはあまり薬効が期待できないのかもしれない。すでに報告⁹⁾した様にうっ血性浮腫あるいは今回試験した実験的腹膜炎の様に腫れをともなる病態モデルには有効である特長を有する様である。さらに予想に反し Mi-saponin と P.B. との併用試験では抗炎症作用が相乗的に表われることはなかった。一般に saponin 単独ではそれほど強い活性は期待出来ないことが多いので、その薬物としての応用として、作用様式の異なる既知薬物との併用で副作用の軽減とか、薬効の拡大という様にある薬物の作用を補完する薬剤としての開発の方向もある様に思われ今後検討したい。また Mi-saponin は Mi-saponin A, B, C の混合物であるが、主 saponin である Mi-saponin A, B を単離して別々に試験したが作用の程度はほぼ同等であった。今回の実験から、Mi-saponin と β -escin とはほぼ同薬効が期待され、同目的の薬物としての開発の可能性が示された。

10) 日本公定書協会, “第 9 改正日本薬局方解説書,” 広川書店, 東京, 1976, p. C 1146.

11) G. Vogel, M.L. Marek, R. Oertner, *Arzneim. -Forsch.*, **18**, 1466 (1968).