

牡丹皮の研究(第3報)¹⁾

牡丹皮の抗炎症作用(その1)

有地 滋^{2a)}, 久保道徳^{2a)}, 松田秀秋^{2a)}, 谿 忠人^{2a)}津永佳世子^{2b)}, 吉川雅之^{2b)}, 北川 勲^{2b)}近畿大学東洋医学研究所^{2a)}, 大阪大学薬学部^{2b)}Studies on MOUTAN CORTEX (III)¹⁾

On Anti-inflammatory Activities (Part 1)

SHIGERU ARICHI,^{2a)} MICHINORI KUBO,^{2a)} HIDEAKI MATSUDA,^{2a)} TADATO TANI,^{2a)}KAYOKO TSUNAGA,^{2b)} MASAYUKI YOSHIKAWA^{2b)} and ISAO KITAGAWA^{2b)}*The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University^{2a)}**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University^{2b)}*

(Received June, 7, 1979)

In traditional Chinese medicine, "Mudanpi" (*Paeonia moutan* SIM., root cortex) is one of the most important crude drugs, and is used particularly for the treatment of female genital inflammatory diseases. In this work, the anti-inflammatory effects of 70% MeOH extract of "Mudanpi" and of various fractions derived therefrom were examined. The 70% MeOH extract inhibited the arthritis induced by Freund's complete adjuvant in rat, and the glycosidic fraction containing no paeonol which is a major component of "Mudanpi", inhibited blood platelet agglutination, and showed anti-plasminogen and anti-plasmin activities.

The fact that "Mudanpi" significantly inhibited autoimmune and/or allergic inflammation is in good accord with the clinical applications of "Mudanpi" practised in traditional Chinese medicine.

第1報³⁾で報告したごとく、牡丹皮は古来漢方用法的に駆瘀血剤と称され、月経不順、産後の諸病等の女性性器炎症性疾患、腰痛、打撲等の外傷性炎症、虫垂炎等の腹部化膿性および炎症性疾患等に用いられ、金匱要略⁴⁾の桂枝茯苓丸、温経湯、八味腎気丸、大黃牡丹湯をはじめ多くの漢方処方中に配剤されてきた漢薬である。

牡丹皮の含有成分に関しては paeonol とその配糖体⁵⁾ および芍薬との共通成分であるモノテルペン配糖体の paeoniflorin など⁶⁾ が報告されている。また最近北川ら⁷⁾ により配糖体分画の精査が行なわれている。

牡丹皮の薬理学的研究に関しては Bose ら⁸⁾ は paeonol に止血作用のあることを報告し、大味谷ら⁹⁾ は paeonol の弱い筋弛緩作用を報告している。その後、原田ら¹⁰⁾ は牡丹皮の主成分である paeonol に、マウスの自発運動の抑制作用、Hexobarbital 睡眠延長作用、鎮痛作用、下熱作用、抗痙攣作用、胃液分泌抑制作用、子宮自動運動抑制作用

1) 第2報: 文献 7) なお本論文に関連した内容は日本生薬学会第25年会(福岡, 1978年)で発表した。

2) Location: a) 380 Nishiyama, Sayama-cho, Minamikawachi-gun, Osaka, 589; b) 133-1, Yamada-kami, Suita, Osaka, 565.

3) 久保道徳, 谿 忠人, 小曾戸 洋, 木村善行, 有地 滋, 生薬, **33**, 155(1979).

4) "明刊影印金匱要略", 第2版, 燎原, 東京, p. 67, 177, 182, 199(1973).

5) 刈米達夫, 高橋三雄, 高石清和, 薬誌, **76**, 920(1956).

6) 柴田承二, 稲葉 実, 相見則郎, 生薬, **20**, 37(1966).

7) 北川 勲, 吉川雅之, 津永佳世子, 谿 忠人, 生薬, **33**, 171(1979).

8) P. K. Bose, P. B. Sen and K. Chakravarti, *Ann. Biochem. Exp. Med.*, **5**, 1(1945).

9) 大味谷輝男, 藤竹信英, 日薬理誌, **49**, 84(1953).

10) a) 原田正敏, 山下厚子, 薬誌, **89**, 1205(1969); b) 原田正敏, 山下厚子, 油田正樹, 薬誌, **92**, 750(1972).

用などのあることを報告している。また paeonol の抗炎症作用としてカラゲニン、デキストラン、酢酸浮腫の抑制、血管透過性亢進の抑制があり、持続性浮腫炎症としてマスタードによる浮腫に対する抑制作用が認められたが、濾紙ペレットによる肉芽腫の抑制効果はなかったとしている。また牡丹皮の paeonol を除いた水エキスにはカラゲニン浮腫、血管透過性抑制作用は認められないと報告されている^{10b)}。

江田ら¹¹⁾は牡丹皮の抗炎症作用を免疫、アレルギーの面から検討し、アルコールエキスに抗補体作用とショック症状の抑制作用およびアルサス反応抑制作用のあることを明らかにしている。

さらに太田ら¹²⁾は牡丹皮が虫垂炎の治療に用いられることから、paeonol の虫垂炎起炎菌に対する発育阻止作用を報告し、消炎作用に寄与していると報告している。また牡丹皮の薬効成分とみなされる paeonol の吸収、排泄実験も行われている¹³⁾。

以上のごとく牡丹皮の抗炎症作用に関する詳細な報告があるが、牡丹皮が桂枝茯苓丸、八味丸のように煎液ではなく粉末として直接内服され、酒で服用する用法指示^{3,14)}があることや、江田らの実験結果からアルコールエキスにも強い活性が認められていることから、牡丹皮の 70% メタノール抽出エキス (以下 **M** と記す) について、各種抗炎症実験を行なった。さらに、Chart 1 のごとくに分画し各 fraction⁷⁾ について一部の抗炎症作用を検討した結果、paeonol 以外の成分にも有効性があることを確認した。

また抗炎症作用の実験モデルとして、原田ら^{10b)}の方法の他に、江田ら^{11b)}の補体系に関与する活性が認められていることから、免疫系の関与した抗炎症作用のモデルとしてアジュバント関節炎に対する作用を検討した結果、**M** に顕著な抗炎症作用が認められた。さらに、慢性的に炎症をもつと自己免疫疾患がおこり、補体系が生体に攻撃的に働き、アルサス反応や血小板凝集反応が引き起こされ、微小血栓の形成などの作用が発現されることから¹⁵⁾牡丹皮の血小板凝集抑制作用を検討した。また生体の炎症反応の機序の 1 つとして抗原抗体複合体が時には Hageman 因子を活性化し、プラスミノゲンからプラスミンの産生を引き起こし、その結果放出される酵素やペプチドが組織障害に働くといわれていることから¹⁶⁾、**M** およびその分画について、プラスミノゲン、プラスミンに対する阻害作用についても検討した。

実験の部

実験材料: 奈良県産牡丹皮 (*Paeonia moutan* SIM. の根皮) を 70% MeOH で 3 回加熱抽出したエキス (以下 **M** という) および Chart 1. の方法⁷⁾ により得た paeonol, **W**, **B**, **Bf 2**, **Bf 2-a**, **Bf 2-b**, **Bf 2-c** を実験材料に用いた。**Bf 2-a**, **Bf 2-c** はそれぞれ benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin を主成分とする分画である。

実験動物: 動物は Wistar 系雄性ラット, ddY 系雌性マウスを用いた。飼育環境は 21°, 60% の恒温恒湿の部屋

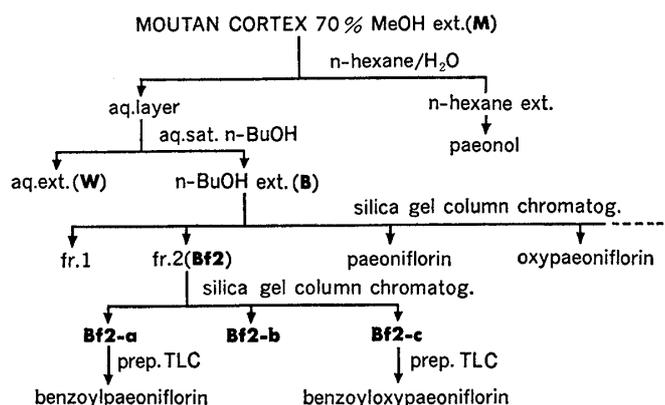


Chart 1.

11) a) 江田昭英, 勝田栄二, 渡辺茂勝, 水野瑞夫, 日薬理誌, **66**, 366(1970); b) 江田昭英, 永井博式, 第8回和漢薬シンポジウム記録, p. 13(1974).

12) 太田達男, 三橋 進, 佐伯慶隆, 若林清重, 生薬, **14**, 100(1960).

13) 横山俊夫, 早瀬幸俊, 相川 広, 小高愛親, 宮本貞一, 森 陽, 応用薬理, **13**, 457(1977).

14) 久保道徳, 谿 忠人, 森山健三, 有地 滋, 石田定廣, 薬局, **30**, 375(1979).

15) 菊地浩吉編, “医科免疫学”, 南江堂, 東京, 1978, p. 289.

16) 文献 15), p. 273.

で飼育した。

実験方法: 1. カラゲニン浮腫におよぼす作用: 140~160 g のラットを1群7匹用い、1% カラゲニン生理食塩液 0.05 ml/rat を後肢足蹠皮下に注射し、発生する浮腫を容積法で1, 2, 3, 4, 5時間後まで経時的に測定し、浮腫率を下記の式より算出した。

$$\text{浮腫率(\%)} = \frac{E_T - E_C}{E_C} \times 100$$

E_T は起炎物質投与後の浮腫を起こした足の容積

E_C は起炎物質投与前の正常な足の容積

被検体はカラゲニン液注射1時間前に経口投与した。なお対照薬物に indomethacin 10 mg/kg を用いた。

2. マウス腹腔内色素滲出におよぼす作用: Whittle¹⁷⁾ の方法に準じた。20~25 g のマウスを1群10匹用い、被検体を経口投与1時間後に4% pontamine sky blue 生理食塩液 10 ml/kg を尾静脈内注射し、15分後に1% 酢酸生理食塩液 10 ml/kg を腹腔内注射し、さらに20分後に首脱臼により致死させ、腹腔内に滲出した色素を生理食塩液で洗い集め、全量10 ml とし、590 nm で滲出した色素量を求めた。なおこの際色素測定液には1N-NaOH 0.1 ml を加えた。

3. ラット肉芽腫形成におよぼす作用: Hicks¹⁸⁾ の方法に準じた。140~160 g のラットを1群7匹用い、エーテル麻酔下で重量50 mg の滅菌綿球をラット背部の両側皮下に消毒処置下で1つずつ移植し、形成される肉芽腫を8日目に綿球とともに摘出し、湿重量および乾燥重量を測定した。被検体は植え込み日から毎日1回7日間連続経口投与した。なお対照薬物に cortisone 20 mg/kg を用いた。

4. アジュバント関節炎におよぼす作用: a) 予防作用; 高木ら¹⁹⁾ の方法に準じた。140~160 g のラットを1群7匹用い、Freund's complete adjuvant をラット後肢足蹠皮下に0.1 ml/rat 注射した。発生する浮腫を容積法で隔日に21日間測定し、浮腫率を算出した。被検体は毎日1回21日間連続経口投与した。また体重を隔日に21日間測定した。なお対照薬物に phenylbutazone 50 mg/kg を用いた。

b) 治療作用; 予防作用と同様に浮腫を形成せしめ9日目に良好な浮腫を形成したラットを1群7匹用い、11日目より21日後まで隔日に容積法で測定した。被検体は10日目より21日後まで毎日1回連続経口投与した。

5. 鎮痛作用: Whittle¹⁷⁾ の方法に従い、酢酸 writhing 法を用いた。20~25 g のマウスを1群10匹用い、0.7% 酢酸生理食塩液を10 ml/kg 腹腔内注射し、発生するマウスの stretching を痛覚の指標として酢酸注射10分後より10分間計数した。被検体は酢酸液注射1時間前に経口投与した。なお対照薬物に aminopyrine 50 mg/kg を用いた。

6. 血小板凝集抑制作用: a) 血小板の調整; 体重200 g 前後のラットをエーテル麻酔下に心臓より採血し、5 U/ml のヘパリンを1/10量加えた。この血液を1,000 rpm, 10分遠心分離し、上清を platelet-rich plasma (以下 PRP とする) とした。さらに沈渣を3,000 rpm, 30分遠心分離し、上清を platelet-poor plasma (以下 PPP とする) とした。

b) 血小板凝集抑制試験: 血小板凝集メーター (理化電機社製: Husm System Platelet Aggregometer) を使用し、中西ら²⁰⁾ の方法に準じて血小板凝集による吸光度の変化を経時的に記録した。すなわち0.2 ml の PRP に最終濃度1000 µg/ml の被検液および対照溶媒 dimethylsulfoxide を10 µl 加えて攪拌を開始し1分後に最終濃度0.5 µM の ADP 生理食塩液を5 µl 加え吸光度の変化を記録した。

7. プラスミノーゲン, プラスミンに対する活性化阻害作用: a) 試料の調整; 被検体は最終濃度0.001~10.0 mg/ml になるように Noren²¹⁾ のリン酸緩衝液に溶解もしくはタッチミキサーにて懸濁させた。

b) フィブリン平板の作製; Noren ら²¹⁾ の方法に準じ、1% アガロース溶液を加熱溶解した後、40° に冷却後フィブリンノーゲン (プラスミノーゲン含有が166 mg/100 ml, プラスミノーゲン除去が200 mg/100 ml) を加えた。この溶液を10 ml ずつ試験管に分注し、トロンビン溶液 (100 NIHU/ml) 0.1 ml を分注した後、シャーレ (径9 cm) に注ぎ、プラスミノーゲン含有およびプラスミノーゲン除去のフィブリン平板を作製した。

17) B. A. Whittle, *Brit. J. Pharmacol.*, **22**, 246(1964).

18) R. Hicks, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2**, 581(1969).

19) 高木敬次郎, 李殷芳, 薬誌, **92**, 961(1972).

20) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, **90**, 564(1970).

21) I. Noren, G. Ramstrom and P. Wallen, *Haemostasis*, **4**, 110(1975).

22) T. Astrup and S. Mullertz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 345(1952).

c) 阻害活性の測定; i) プラスミノーゲン活性化阻害の測定; Astrup ら²²⁾の方法に準じ, 被検液 0.1 ml にウロキナーゼ溶液 (100 U/ml) 0.1 ml を混ぜ, 30分後プラスミノーゲン含有フィブリン平板の穴に 20 μ l ずつ注入了。31 $^{\circ}$, 20時間放置後フィブリン溶解面積を測定し, ウロキナーゼによってプラスミノーゲンがプラスミンに活性化される量を溶解面積の比率から算出した。抑制率はウロキナーゼにより示される溶解面積との比から 50% 抑制量を ID₅₀ (mg/ml) で示した。

ii) プラスミン阻害の測定; Astrup ら²²⁾の方法に準じ, ウロキナーゼ, プラスミノーゲン混液 (100 U/1 mg/1 ml) を 28 $^{\circ}$, 30分反応させ, ウロキナーゼ, プラスミン混液とした溶液 0.1 ml を被検液 0.1 ml に加え攪拌した。30分後プラスミノーゲン除去フィブリン平板の穴に混合液を 20 μ l ずつ注入し, 37 $^{\circ}$, 18時間放置した。プラスミン活性をフィブリン溶解面積として測定し, 抑制率を同量のウロキナーゼ, プラスミン混液による溶解面積との比から 50% 抑制量を ID₅₀ (mg/ml) で示した。

結 果

1. カラゲニン浮腫におよぼす作用: カラゲニン液をラット後肢足蹠皮下に注射した場合 3 時間後に 68% の最大浮腫率を示した。M を経口投与すると Fig. 1 に示すごとく 1,000 mg/kg で 21% の抑制率が認められた。また Chart 1 の方法により得た W, B, Bf 2 の分画では Fig. 2 に示すごとく 500 mg/kg で共に約 30% の抑制率が認められた。これらの分画には 500 mg/kg で 43% の抑制率のある paeonol^{10b)} は含まれておらず, paeonol 以外にも抗炎症活性を有する成分の存在が推定される。

2. マウス腹腔内色素滲出におよぼす作用: 結果を TABLE I に示すごとく M の投与量の増加に伴って色素の漏出が抑制され, M の 500 mg/kg で 29% の抑制率が認められた。

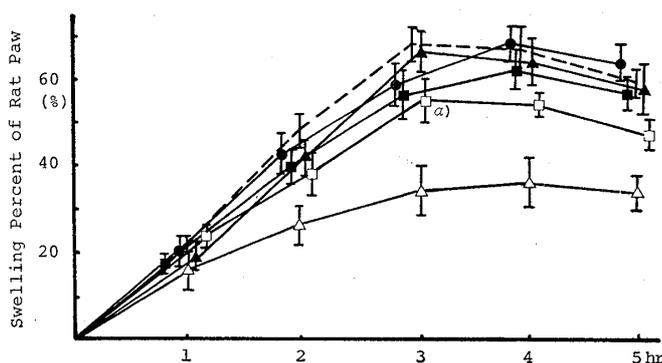


Fig. 1. Anti-inflammatory Effect of M on Carrageenin Edema of the Rat Hind Paw

●, M (50 mg/kg); ■, M (200 mg/kg); ▲, M (500 mg/kg); □, M (1000 mg/kg); ---, control; △, indomethacin (10 mg/kg).

a) $p < 0.05$.

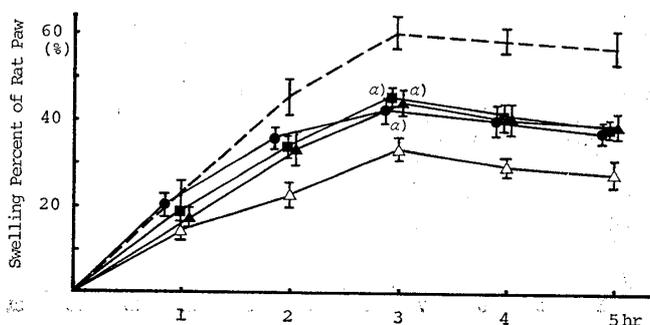


Fig. 2. Anti-inflammatory Effects of W, B and Bf 2 on Carrageenin Edema of the Rat Hind Paw

■, W (500 mg/kg); ●, B (500 mg/kg); ▲, Bf 2 (500 mg/kg); ---, control; △, indomethacin (10 mg/kg).

a) $p < 0.01$.

TABLE I. Inhibitory Effect of **M** on Increased Capillary Permeability in Mice

Compound	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Amount of P. S. B. ^{a)} dry Exuded ($\mu\text{g}/\text{animals}$)
Control		15	459 \pm 30
M	50	15	433 \pm 40
M	200	15	400 \pm 40
M	500	15	326 \pm 46 ^{b)}
Cortisone	20	15	226 \pm 26

^{a)} pontamine sky blue: 4% sol., 10 ml/kg, i.v.

^{b)} $p < 0.05$.

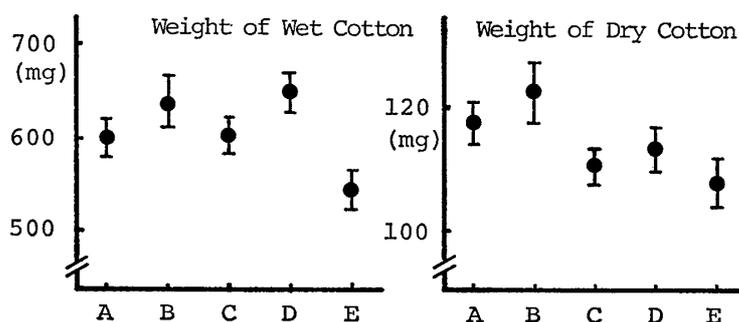


Fig. 3. Effect of **M** on the Cotton Pellet Granuloma in Rats

A, **M** (50 mg/kg); B, **M** (200 mg/kg); C, **M** (500 mg/kg); D, control; E, cortisone (20 mg/kg).

3. ラット肉芽腫形成におよぼす作用: 原田ら^{10b)}が濾紙ペレットによる肉芽腫形成抑制作用が paeonol がないと報告しているが、今回の実験においても Fig. 3 に示すごとく、**M**を経口投与した結果、綿球の湿重量および乾燥重量共に抑制作用は認められなかった。

4. アジュバント関節炎におよぼす作用: a) 予防作用; ラットに Freund's complete adjuvant を皮内注射すると Fig. 4 に示したように5日目にピークを示す一次炎症と10日目以後にあらわれてくる二次炎症が認められた。**M**を毎日1回21日間連続経口投与すると一次炎症および二次炎症共に500 mg/kg で有意 ($p < 0.001$) の抑制作用が認められ、その作用は phenylbutazone 50 mg/kg より有効であった。なお体重の抑制は **M** 21日間連続経口投与で Fig. 5 に示すごとく認められなかった。

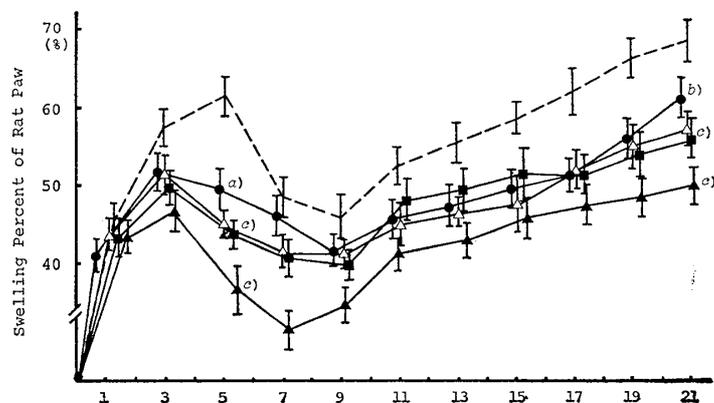
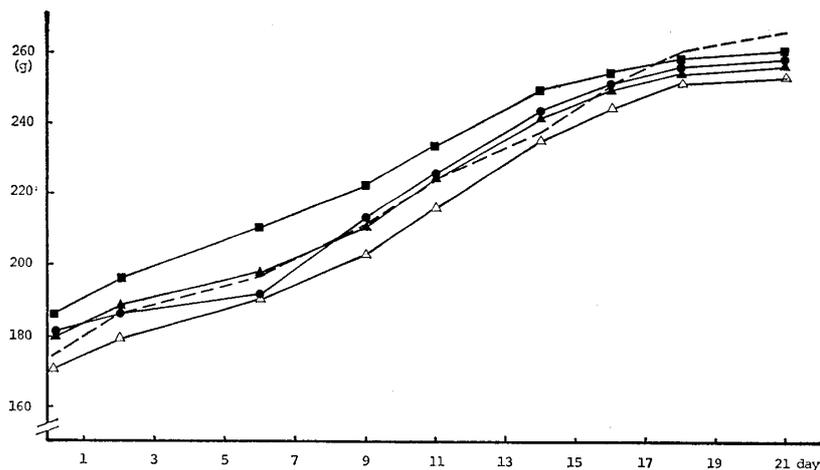


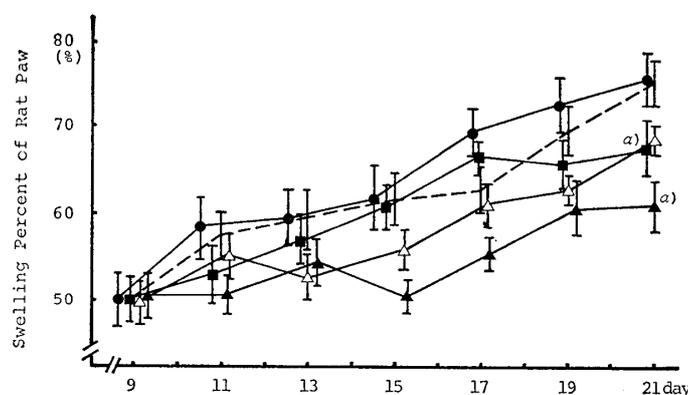
Fig. 4. Preventive Effect of **M** on the Swelling of the Paw Treated with Adjuvant in Rats

●, **M** (50 mg/kg); ■, **M** (200 mg/kg); ▲, **M** (500 mg/kg); ---, control; ▽, phenylbutazone 50 mg/kg.

^{a)} $p < 0.05$; ^{b)} $p < 0.01$; ^{c)} $p < 0.001$.

Fig. 5. Effect of **M** on Body Weight Change in Adjuvant Arthritis

●, **M** (50 mg/kg); ■, **M** (200 mg/kg); ▲, **M** (500 mg/kg);
 ---, control; △, phenylbutazone (50 mg/kg).

Fig. 6. Effect of Medical Treatment of **M** on the Swelling of the Paw Treated with Adjuvant in Rat

●, **M** (50 mg/kg); ■, **M** (200 mg/kg); ▲, **M** (500 mg/kg);
 ---, control; △, phenylbutazone (50 mg/kg). ^{a)} $p < 0.05$.

b) 治療作用: 予防作用と同様に浮腫を形成せしめ10日目より **M** を毎日1回21日間連続経口投与した。その結果を Fig. 6 に示すごとく 500 mg/kg で有意 ($p < 0.05$) の抑制作用が認められ、その作用は phenylbutazone 50 mg/kg より有効であった。

5. 鎮痛作用: 原田ら^{10b)} は paeonol 1.0 g/kg 経口投与で有意の鎮痛効果を認められたと報告しているが、今回の結果では TABLE II に示すごとく、**M** には鎮痛作用は認められなかった。

6. 血小板凝集抑制作用: ADP の血小板凝集作用および **M**, paeonol, さらに配糖体分画である **Bf 2**, **Bf 2-a**, **Bf 2-b**, **Bf 2-c** による血小板凝集抑制作用を Fig. 7 に示した。0.5 μ M の ADP は血小板を著しく凝集した。1分後に最大凝集を示し、以後解離が認められる。被検液を注入した場合、**Bf 2-a** (benzoylpaeoniflorin を主成分とする分画)、**Bf 2** に顕著な抑制作用が認められ、次いで paeonol, **Bf 2-b**, **Bf 2-c** に抑制作用が認められた。

7. a) プラスミノゲン活性化阻害作用; 本結果を TABLE III に示すごとく、**M** に最も強い阻害作用が認めら

TABLE II. Analgesic Activity of **M** in Writhing Symptom

Compound	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	No. of writhing (for 10 min)
Control		p.o.	10	20 \pm 1.9
M	100	p.o.	10	16 \pm 1.6
M	200	p.o.	10	16 \pm 2.8
Aminopyrine	50	p.o.	10	9 \pm 2.7

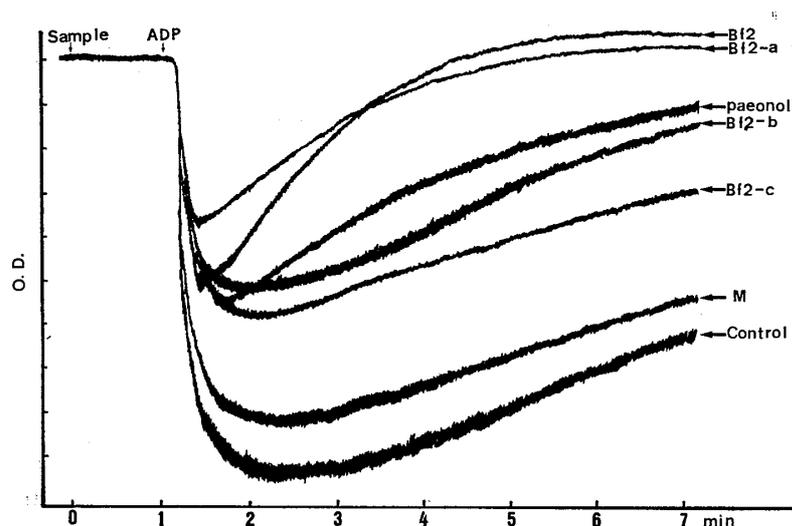


Fig. 7. Inhibition Activities of **M**, **Bf 2**, **-a**, **-b**, **-c** and paeonol on Platelet Aggregation induced by ADP in Platelet-rich Plasma.

TABLE III. Inhibitory Effects of **M**, **Bf 2**, **Bf 2-a**, **Bf 2-b**, and **Bf 2-c**, on the Plasminogen and Plasmin Activity

Compound	Plasminogen (ID ₅₀ mg/ml)	Plasmin (ID ₅₀ mg/ml)
M	0.9	0.5
Paeonol	—	—
Bf 2	13	40
Bf 2-a	—	—
Bf 2-b	63	16
Bf 2-c	5	13
Trasylol	0.01	0.01

れ、次いで **Bf 2-c**, **Bf 2**, **Bf 2-b** に認められ、paeonol, **Bf 2-a** には阻害作用が認められなかった。

b) プラスミン阻害作用; 本結果を TABLE III に示すごとく **M** に最も強い阻害作用が認められ、次いで **Bf 2-c**, **Bf 2-b**, **Bf 2** に認められ paeonol, **Bf 2-a** には阻害作用が認められなかった。

結論および考察

1. 初期炎症のモデルであるカラゲニン浮腫に対して牡丹皮中の paeonol に抗炎症作用があり paeonol 除去水エキスには認められないことが報告されている^{10b)}。今回、牡丹皮の 70% メタノールエキス (**M**) の中で paeonol を含まない水溶性 (**W**)、および配糖体 (**B**) 分画にもカラゲニン浮腫に抑制作用が認められた。このことから牡丹皮には paeonol 以外にも抗炎症作用成分のあることが確認できた。

2. **M** には毛細血管透過性抑制作用が認められたが肉芽腫形成におよぼす抑制作用についてはほとんど無効であった。すなわち、**M** にはグルココルチコイド様作用は期待できないものと推定できる。

3. 慢性炎症のモデルであるアジュバント関節炎に対し **M** の 500 mg/kg の投与量において phenylbutazone 50 mg/kg より強い消炎作用が認められた。牡丹皮のアルコールエキスの消炎メカニズムの一つとして、すでに江田ら^{11b)}により補体系抑制作用が証明されている。さらに今回の実験により、牡丹皮の配糖体分画に炎症系に関与する血小板凝集抑制作用が認められ、またプラスミノゲン、プラスミンに対する阻害作用も認められたことから牡丹皮の抗炎症作用はこのような生体の免疫、アレルギー的な反応系に関与するものと考えられる。

なお、血小板凝集抑制作用は benzoylpaeoniflorin を主成分とする分画に活性が認められ、またプラスミノゲン、プラスミンに対する阻害作用は benzoyl-oxypaeoniflorin を主成分とする分画に paeonol よりも強い活性が認められた。これらの作用は 70%メタノールエキスにも認められるため今後牡丹皮中の他の活性成分についても検討していく予定である。