

生薬・マムシの薬理活性研究 (第3報)<sup>1)</sup>  
50%エタノールエキスの実験的肝障害に対する作用森浦俊次\*, 松田秀秋, 久保道徳  
近畿大学薬学部Pharmacological Study on *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE. III.<sup>1)</sup>  
Effect of 50% Ethanol Extract on Experimental Hepatic Injuries

TOSHITSUGU MORIURA,\* HIDEAKI MATSUDA and MICHINORI KUBO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577, Japan

(Received June 24, 1992)

A fifty percent ethanolic extract ([M]) from dried whole bodies of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* was tested for its activity in experimental models of acute and chronic hepatitis. [M] (250 and 500 mg/kg, once daily for 3 d, *p.o.*) inhibited the increase of serum glutamic oxaloacetic transaminase (s-GOT) level in D-galactosamine (GalN)- and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute hepatic rats. [M] showed an inhibitory effect on the increase of serum glutamic pyruvic transaminase (s-GPT) and s-GOT levels in the CCl<sub>4</sub>-induced chronic hepatic rats. It also increased the tissue blood flow rate of liver and promoted the liver regeneration after partial hepatectomy.

**Keywords**—*Agkistrodon blomhoffii blomhoffii*; hepatitis; carbon tetrachloride; D-galactosamine; glutamic oxaloacetic transaminase; glutamic pyruvic transaminase

著者らは生薬・マムシ (*Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE の全身を乾燥したもの) の滋養強壮作用を薬理的に検討し, その50%エタノールエキスに抗胃潰瘍作用<sup>2)</sup>, 初期免疫増強作用<sup>1)</sup>を見出し報告した。

本報ではマムシや蝮蛇 (中国産マムシ *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* で日本産マムシの亜種) の効能に解毒作用など肝臓機能の亢進作用を示すような記載が古くからあることから<sup>3,4)</sup>, 実験的肝障害に対する作用を検討した。

## 実験の部

## 実験材料

実験材料には日本産マムシ *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* BOIE, 日本産アオダイショウ *Elaphe climacophora* BOIE, 日本産シマヘビ *Elaphe quadrivirgata* BOIE の全身を乾燥し粗末としたものを用いた。50%エタノールで20℃, 72時間, 3回抽出し, 得た凍結乾燥エキス (以下それぞれ [M], [A], [S] と略記し, エキス収率は [M]; 10.1, [A]; 7.1, [S]; 10.2% であった) を被験体に供した。実験にはそれぞれの凍結乾燥エキスを用水に懸濁し, ラットに投与する際は体重 100 g 当り 0.2 ml 経口投与した。

対照薬および試薬は D-galactosamine, 1-naphthylisothiocyanate (以下 ANIT と略記する), compound 48/80 (SIGMA), histamine, sodium citrate (キンダ化学), disodium cromoglycate (DSCG, 藤沢薬品), 他の試薬は特級品を用いた。

## 実験動物

Slc-Wistar 系雄性ラットを用いた。飼育環境は温度 23±1℃, 湿度 60±5% の恒温恒湿の飼育室とし, 固形飼料 (ラボ MR ストック, 日本農産) および水道水をもって飼育した。

## 実験方法

## 1) 実験的急性肝障害の誘導

180~200 g のラットに被験体を 1日1回3日間経口投与し, 最終経口投与の1時間後に肝臓障害誘発物質として

CCl<sub>4</sub> 2 ml/kg (p. o.), ANIT (olive oil に溶解) 75 mg/kg (p. o.) あるいは D-galactosamine (生理食塩水に溶解) 400 mg/kg (i. p.) を投与し, 20時間後に pentobarbital sodium (45 mg/kg, i. p., 東京化成工業㈱) 麻酔下に心臓採血し, s-GOT, s-GPT, bilirubin 量を測定した。

## 2) 実験的慢性肝障害の誘導

180~200 g のラットに CCl<sub>4</sub> 0.5 ml/kg (25% olive oil 混和液) を週 2 回, 12週間連続背部皮下投与して慢性肝障害を誘発させた。被験体は CCl<sub>4</sub> 投与開始 3 週間目より 9 週間 1 日 1 回連日経口投与した。CCl<sub>4</sub> 最終投与後 24 時間絶食し, pentobarbital sodium 麻酔下に心臓採血し, s-GOT, s-GPT, alkaline phosphatase (ALP), leucine aminopeptidase (LAP), triglyceride (TG), non esterified fatty acid (NEFA), total protein (TP), total bilirubin (TB) および白血球数を測定した。採血後ただちに肝臓を摘出し, 湿重量の測定後, 肝臓中 hydroxyproline 量を永谷ら<sup>9)</sup> の方法で測定した。また, 肝臓の一部を常法に従ってホルマリン固定, パラフィン包埋, 切薄し, 結合組織が青染されるアザン染色を施し, 光顕的に観察した。

## 3) 血液検査法

血清中 GOT<sup>6)</sup>, GPT<sup>6)</sup>, ALP<sup>6)</sup>, LAP<sup>6)</sup> および TG<sup>7)</sup>, NEFA<sup>8)</sup> を酵素法, TP を Biuret 法<sup>9)</sup>, TB をアルカリアゾビルビン法<sup>10)</sup> による多項目自動分析装置で測定し, 白血球数は Coulter counter にて測定した。

## 4) 膜安定化作用 (*in vitro*)

### 4-1) ラット赤血球膜安定化作用

5%ラット赤血球浮遊液/0.15 M phosphate buffer 3.0 ml に被験体/0.015 M phosphate buffer 懸濁液 3.0 ml を混和し, 37°C, 1 時間加温後氷冷により反応を停止し, 2,500 rpm, 10 分間遠心分離し, 上清の吸光度を 540 nm で測定し, 完全溶血に対する溶血率および被験体処置時の抑制率を求めた。完全溶血は 5%ラット赤血球浮遊液 3.0 ml に 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 3.0 ml を加えたものを用いた。対照薬として sodium citrate を用いた。

### 4-2) ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用

ラット腹腔肥満細胞の調製: ラットからの腹腔肥満細胞の分離は Uvnäs<sup>11)</sup> らの方法に準じて行った。ラットを断頭しゃ血後, ただちに Hanks' 液 (10 U/ml の heparin 含有) 10 ml を腹腔内に注入した。約 90 秒間腹部を静かにマッサージ後, 腹腔内液を採取し, 40% ficoll 溶液に静かに重層し, 室温で 30 分間放置後, 5°C, 1,200 rpm, 10 分間遠心分離を行い, ficoll 層上の肥満細胞を集めた。この肥満細胞はリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.0) に懸濁させ, 遠心分離による洗浄を 4 回繰り返し, 再び PBS に浮遊 (2.9 × 10<sup>6</sup> cells/ml) させた。この浮遊液中の肥満細胞含有率は 85~90% で, 生存率は toluidine blue (0.1%, 50% ethanol 溶液) 染色法で 90% 以上であった。

肥満細胞からのヒスタミン遊離量の測定: 肥満細胞浮遊液 1.8 ml を 37°C, 10 分間 preincubation 後, 被験液 (PBS に溶解あるいは懸濁) 0.1 ml を加え, 5 分間 incubation し, さらに compound 48/80 (最終濃度 10 μg/ml) 0.1 ml を加えて 10 分間 incubation した。氷冷により反応を停止し, 5°C, 1,200 rpm, 5 分間遠心分離後, 上清中のヒスタミン量を Shore<sup>12)</sup> の方法に準じて測定した。すなわち, 上清 0.7 ml に H<sub>2</sub>O 1.4 ml, 1 N NaOH 溶液 0.4 ml, 1% o-phthalaldehyde/methanol 溶液 0.1 ml を加えて 4 分間放置後, 3 N HCl 溶液 0.2 ml で反応を停止させた。反応終了 10 分後に 5°C, 3,000 rpm, 5 分間遠心分離を行い, 上清および沈渣を得た。上清の蛍光は励起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm で測定し, 既知濃度のヒスタミン検量線から上清中ヒスタミン量を求めた。また, 肥満細胞に残存するヒスタミン量は, 沈渣に PBS 2 ml を加え超音波処理, さらに凍結融解法で肥満細胞からヒスタミンを遊離させ, 上記と同様の方法で測定した。Compound 48/80 によるヒスタミン遊離率 (histamine release %) は次式によって求めた。

$$\text{Histamine release \%} = \left\{ \frac{\text{histamine released with compound 48/80} - \text{spontaneously released histamine}}{\text{total histamine}} \right\} \times 100$$

被験体の活性は次式による抑制率で示した。

$$\text{Inhibition \%} = \left\{ \frac{\% \text{ histamine release without test substance} - \% \text{ histamine release with test substance}}{\% \text{ histamine release without test substance}} \right\} \times 100$$

対照薬として DSCG (PBS に溶解) を用いた。

## 5) 肝臓組織血流量の測定

180~200 g のラットを 24 時間絶食後, pentobarbital sodium (45 mg/kg, i. p.) 麻酔下に開腹し, 正中切開により肝臓を引き出し, 大葉の辺縁より 1/3 に白金電極を刺入した。一方, 不関電極を皮膚に固定し, 両者とも amplifier

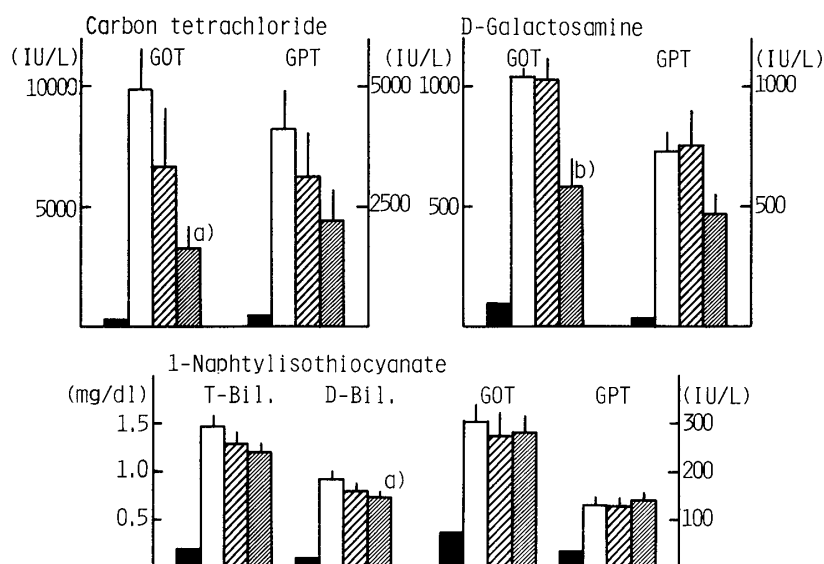


Fig. 1. Effect of 50% Ethanol Extract from Whole Body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* [M] on Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT), Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT), Total-Bilirubin (T-Bil) and Directed-Bilirubin (D-Bil) in the Rats Treated with  $\text{CCl}_4$ , D-Galactosamine and 1-Naphtylisothiocyanate

■, Normal; □, Control; ▨, [M] 250 mg/kg; ▩, [M] 500 mg/kg. Test substance was orally administered 1 h before treatment of  $\text{CCl}_4$  (p.o.), D-Galactosamine (i.p.) or ANIT (p.o.). Each point represents the mean S.E. of 10 rats. Significantly different from the control group, a)  $p < 0.05$ , b)  $p < 0.01$ .

(MT 技研) を介して記録計へ接続した。基準線が安定後、水素ガスを吸入させ、水素ガス濃度半減期 ( $T_{1/2}$ ) を算出した。 $T_{1/2}$  を Fick の原理を応用した下記の Kety の組織クリアランス式に代入して血流量を求めた。

$$\text{血流量 (ml/min/100 g tissue)} = \{0.693/T_{1/2}(\text{min})\} \times 100$$

#### 6) ラット肝再生試験

ラット肝臓の部分切除は Higgins & Anderson の方法<sup>13)</sup> に準じて行った。すなわち、180~200 g のラットをエーテル麻酔し、肝臓の右横隔葉、左横隔葉および左臓側葉の 3 葉 (全肝重量の約 2/3) を切除した。擬手術群として、切除する直前まで手術を行ったラットを 1 群作成した。手術後 1 日目に平均体重の差が少ないように対照群, [M] 投与群, [A] 投与群, [S] 投与群に分け、1 日 1 回 6 日間経口投与した。なお対照群と擬手術群には水を同様に投与した。手術 7 日目に pentobarbitate 麻酔下に、肝臓を生理食塩水で還流洗浄後摘出し、肝臓湿重量を測定して下記の式より切除肝再生率を求めた。

$$\text{切除肝再生率} = \frac{\text{再生総肝重量} - (\text{体重} \times \text{肝重量体重比} - \text{切除肝重量})}{\text{切除肝重量}}$$

ここでの肝重量体重比として擬手術群の 3.27% を用いた。同時に肝臓中 hydroxyproline 量を 2) と同様の方法で測定した。

#### 7) 統計学的処理

実験結果は平均値 ± 標準誤差で表し、有意差検定には Dunnett の検定法を用いた。

### 結果の部

#### 1) 急性肝障害に対する [M] の作用

ラットに  $\text{CCl}_4$  を投与すると s-GOT 値は  $81.7 \pm 3.7$  から  $9850.0 \pm 1603.3$  IU/l に、s-GPT 値は  $40.8 \pm 1.8$  から  $4133.3 \pm 846.7$  IU/l に増加した。また、D-galactosamine により s-GOT 値は  $104.7 \pm 5.9$  から  $1031.0 \pm 45.7$  IU/l に、s-GPT 値は  $39.5 \pm 3.4$  から  $721.6 \pm 65.9$  IU/l に増加した。[M] 500 mg/kg はこれらの薬物による s-GOT 値の上昇に対して有意な抑制効果を示し、s-GPT 値の上昇に対しても抑制する傾向を示した。また、[M] は ANIT による血清中直接 bilirubin 量の上昇を有意に抑制したが、s-GOT, s-GPT 値の上昇に対しては抑制する作用が認められなかった (Fig. 1)。

TABLE I. Effect of 50% Ethanolic Extract from Whole Body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* ([M]) on Several Parameters in the Blood of Rats Treated with CCl<sub>4</sub> for 12 Weeks

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	GOT/GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	LAP (GRU)	T-Bilirubin (mg/dl)	WBC <sup>c)</sup> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )
Normal	—	6	123.0 $\pm$ 11.7 <sup>e)</sup> 41.3 $\pm$ 2.9 <sup>e)</sup>	211.7 $\pm$ 8.0 <sup>e)</sup>	175.8 $\pm$ 4.6 <sup>e)</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>e)</sup>	6.31 $\pm$ 0.39 <sup>e)</sup>
Control <sup>a)</sup>	—	10	984.0 $\pm$ 70.6 366.2 $\pm$ 37.9	678.5 $\pm$ 31.6	390.4 $\pm$ 12.7	0.49 $\pm$ 0.09	10.53 $\pm$ 0.46
[M] <sup>b)</sup>	250	10	886.1 $\pm$ 98.9 328.6 $\pm$ 37.6	654.6 $\pm$ 30.8	353.8 $\pm$ 8.8	0.42 $\pm$ 0.05	9.93 $\pm$ 0.60
	500	10	691.2 $\pm$ 112.4 <sup>d)</sup> 229.7 $\pm$ 37.2 <sup>d)</sup>	494.0 $\pm$ 55.0 <sup>e)</sup>	323.8 $\pm$ 19.6 <sup>d)</sup>	0.33 $\pm$ 0.03	7.40 $\pm$ 0.52 <sup>e)</sup>

Test substance was orally administered daily for 9 weeks from 3 weeks after the first CCl<sub>4</sub> treatment. GOT: Glutamic oxaloacetic transaminase. GPT: Glutamic pyruvic transaminase. ALP: Alkaline phosphatase. LAP: Leucine amino peptidase. WBC: White blood cells. <sup>a)</sup>Control was orally administered water alone. <sup>b)</sup>[M]: 50% ethanolic extract from dried whole body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii*. <sup>c)</sup>Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Significantly different from the control group, <sup>d)</sup> $p < 0.05$ , <sup>e)</sup> $p < 0.01$ .

TABLE II. Effect of 50% Ethanolic Extract from Whole Body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* ([M]) on Liver Weight and Tissue Hydroxyproline of Rats Treated with CCl<sub>4</sub> for 12 weeks

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Liver weight (%)	Hydroxyproline <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )
Normal	—	6	2.45 $\pm$ 0.03 <sup>e)</sup>	190.8 $\pm$ 19.0 <sup>e)</sup>
Control <sup>a)</sup>	—	10	3.78 $\pm$ 0.15	1082.9 $\pm$ 144.1
[M] <sup>b)</sup>	250	10	3.68 $\pm$ 0.10	1031.8 $\pm$ 155.7
	500	10	3.13 $\pm$ 0.19 <sup>d)</sup>	915.4 $\pm$ 105.9

Test substance was orally administered daily for 9 weeks from 3 weeks after the first CCl<sub>4</sub> treatment. <sup>a)</sup>Control was administered water alone. <sup>b)</sup>[M]: see the TABLE I. <sup>c)</sup>Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Significantly different from the control group, <sup>d)</sup> $p < 0.05$ , <sup>e)</sup> $p < 0.01$ .

## 2) CCl<sub>4</sub> による慢性肝障害に対する [M] の作用

ラットに CCl<sub>4</sub> を12週間連続投与すると s-GOT, s-GPT, ALP, LAP, TB, WBC 値が増加した。CCl<sub>4</sub> 投与の3週間後から [M] の投与を開始すると、500 mg/kg 投与群には CCl<sub>4</sub> による s-GOT, s-GPT, ALP, LAP, WBC の上昇を有意に抑制する作用が認められ、TB 値の上昇に対しては抑制する傾向が認められた (TABLE I)。また、CCl<sub>4</sub> の連続投与により肝臓重量の著しい増大が観察されたが、[M] 500 mg/kg の投与によってその増大が有意に抑制された (TABLE II)。さらに、CCl<sub>4</sub> による慢性肝障害に及ぼす [M] の影響を線維増殖を指標に検討した。慢性肝障害の肝切片にアザン染色を施すと、泡沫状の脂肪肝に青く染る線維が著しく増加していた (Fig. 2)。そこで、線維増加の指標として hydroxyproline 量を測定したところ、[M] 投与群にはその増加を抑制する傾向が認められた (TABLE II)。

## 3) [M] の膜安定化作用

[M] 20 および 100  $\mu\text{g/ml}$  はラット赤血球低張溶血に対してそれぞれ4.97, 27.36%の抑制率を示した。またラット腹腔肥満細胞からヒスタミン遊離に対して、[M] 100 および 500  $\mu\text{g/ml}$  はそれぞれ2.70, 62.90%の抑制率を示した (TABLE III)。

## 4) 肝臓組織血流量に対する [M] の作用

[M] 500 mg/kg は、投与60分後にラット肝臓組織血流量を有意に増大させた。また、[M] 250 mg/kg は投与60分後に増大傾向を示した (TABLE IV)。

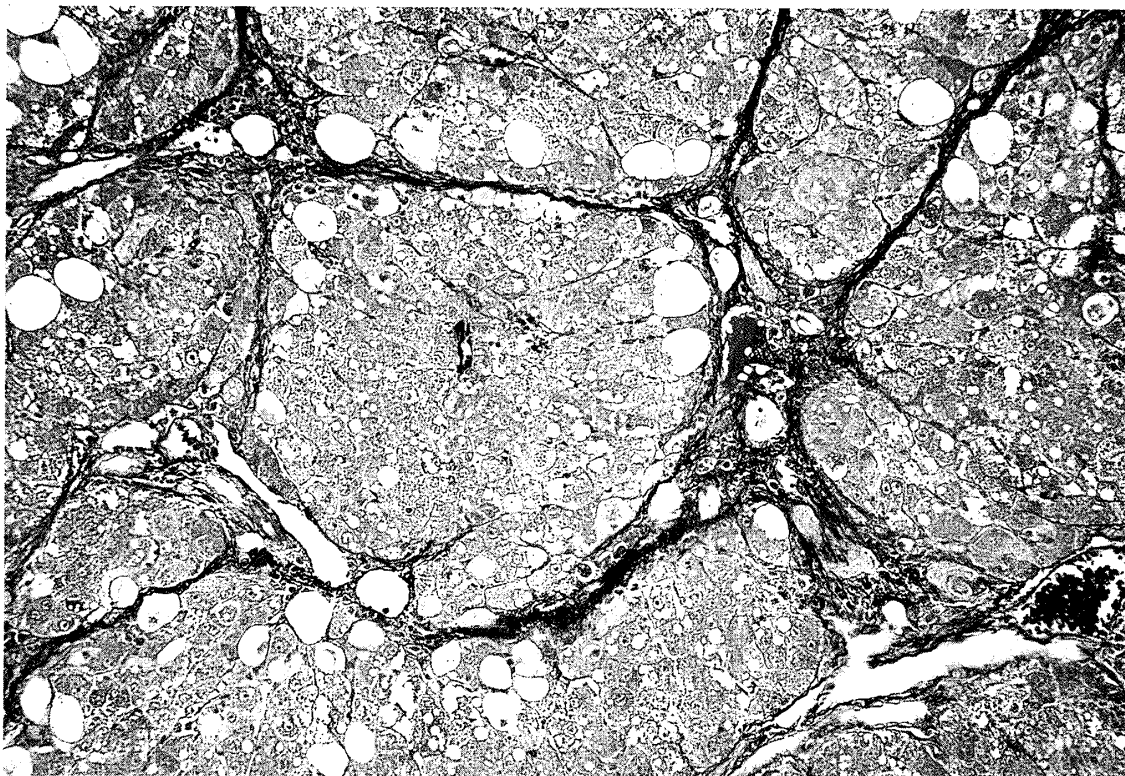


Fig. 2. Liver of  $\text{CCl}_4$ -induced Chronic Hepatitis in Rat (Azan stain,  $\times 125$ )

TABLE III. Effects of 50% Ethanolic Extract from Whole Body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* ([M]), Sodium Citrate and DSCG on Hypotonicity-Induced Hemolysis and Compound 48/80-Induced Histamine Release from Peritoneal Mast Cells of Rat

Treatment	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Hemolysis		Histamine release <sup>c)</sup>	
		Hemolysis %	IR %	Release %	IR %
Control <sup>a)</sup>	—	57.1	—	67.2	—
[M] <sup>b)</sup>	20	54.3	5.0	—	—
	100	41.5	27.4	65.4	2.7
	500	—	—	24.9	62.9
Sodium citrate	500	43.8	23.2	—	—
DSCG	500	—	—	24.7	63.2

IR: Inhibitory rate. <sup>a)</sup> Control was administered 0.015 M phosphate buffer to hemolysis and phosphate buffer saline to histamine release alone. <sup>b)</sup> [M]: see the TABLE I. <sup>c)</sup> Each value represents the mean of 5 experiments.

TABLE IV. Effect of 50% Ethanolic Extract from Whole Body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* ([M]) on Tissue Blood Flow of Liver in Rats

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Blood flow (ml/min/100 g tissue) <sup>c)</sup>	
			30	60 (min)
Control <sup>a)</sup>	—	10	75.53 $\pm$ 8.76	83.15 $\pm$ 3.52
[M] <sup>b)</sup>	250	10	80.94 $\pm$ 9.42	91.68 $\pm$ 2.50
	500	10	80.04 $\pm$ 12.98	99.88 $\pm$ 4.91 <sup>d)</sup>

Test substance was orally administered 1 h before the measurement of tissue blood flow. <sup>a)</sup> Control was administered water alone. <sup>b)</sup> [M]: see the TABLE I. <sup>c)</sup> Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Significantly different from the control group, <sup>d)</sup>  $p < 0.05$ .

TABLE V. Effects of 50% Ethanol Extract from Whole Body of *Agkistrodon blomhoffii blomhoffii* ([M]), *Elaphe climacophora* ([A]) and *Elaphe quadrivirgata* ([S]) on Liver Regeneration Rate in Normal Rats and Tissue Hydroxyproline After Partial Hepatectomy

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of rats	Body weight (g)	Regeneration (%)	Hydroxyproline <sup>c)</sup> ( $\mu$ g/g)
Sham ope.	—	8	210.5 ± 2.8	—	553.88 ± 32.12
Control <sup>a)</sup>	—	10	197.5 ± 3.1	84.81 ± 1.63	628.18 ± 57.76
[M] <sup>b)</sup>	250	10	195.0 ± 2.1	87.36 ± 1.94	558.29 ± 37.24
	500	10	200.0 ± 3.3	88.55 ± 0.56 <sup>f)</sup>	370.76 ± 24.27 <sup>g)</sup>
[A] <sup>c)</sup>	500	10	198.0 ± 2.0	86.96 ± 2.04	520.08 ± 49.12
[S] <sup>d)</sup>	500	10	194.4 ± 4.7	83.43 ± 2.09	469.59 ± 44.62

Test substances were orally administered daily for 6 d after partial hepatectomy and regeneration rate and tissue hydroxyproline content were measured. <sup>a)</sup> Control was administered water alone. <sup>b)</sup> [M]: see the TABLE I. <sup>c)</sup> [A]: 50% ethanol extract from dried whole body of *Elaphe climacophora*. <sup>d)</sup> [S]: 50% ethanol extract from dried whole body of *Elaphe quadrivirgata*. <sup>e)</sup> Each value represents the mean ± S.E. Significantly different from the control group, <sup>f)</sup>  $p < 0.05$ , <sup>g)</sup>  $p < 0.01$ .

##### 5) ラット再生肝に対する [M], [A] 及び [S] の作用

ラット再生肝に対する [M], [A] および [S] の作用は TABLE V に示した. 対照群では全肝臓重量の約 2/3 を摘出後, 7 日間で 84.81% の肝臓が再生されていたが, [M] 500 mg/kg 投与群では 88.55% と有意な再生速度の促進が見られた. さらに, 手術による肝臓中 hydroxyproline 量の上昇に対しても [M] 500 mg/kg は有意な抑制効果を示した. [A], [S] にはいずれの効果も認められなかった.

#### 考 察

本報では, 生薬・マムシの 50% エタノールエキス ([M]) の実験的肝障害に及ぼす影響について検討した.

まず, 小葉中心性壊死を引き起こす  $\text{CCl}_4$ <sup>14-16)</sup>, 間葉系反応を伴った小葉散在性壊死を引き起こす D-galactosamine<sup>17-19)</sup>, 小葉間胆管上皮細胞の変性, 壊死とそれに伴う胆管内腔の閉塞などから胆汁うっ滞が起こり間接的に肝障害を誘発する ANIT<sup>20)</sup> の 3 種を用いて急性肝障害を誘発し, [M] の効果は肝実質細胞損傷の指標となる血清 transaminase 値の変動を指標に検討した. [M] をモデルの誘発 3 日前から経口投与したところ, [M] は 500 mg/kg の用量で  $\text{CCl}_4$  および D-galactosamine による s-GOT 値の上昇を有意に抑制し, s-GPT 値の上昇に対しても抑制傾向を示した. しかし, ANIT による血清 transaminase 値の上昇には影響を及ぼさなかった.

次に,  $\text{CCl}_4$  の反復投与によって誘発した慢性肝炎に対する [M] の効果を検討した.  $\text{CCl}_4$  の反復投与によって肝実質細胞破壊に伴う s-GOT, s-GPT 値の上昇が観察され, さらに肝炎の慢性化に伴う胆管系の異常も総 bilirubin 値の増加や血清 ALP, LAP 値の上昇から推察された. また, 白血球数は肝細胞壊死から炎症性細胞の増加の反映として増加した<sup>21)</sup>. 肝臓においては重量の増大が観察され, さらに, 肝臓内 hydroxyproline 量が正常動物のその約 9 倍に増加し, 組織学的にも肝臓の線維化が観察された. [M] 500 mg/kg は血清中 GOT, GPT, ALP, LAP の上昇, 白血球数の上昇を有意に抑制し, 肝実質細胞の破壊に対する抑制作用が確認された. また, 肝臓重量の増大に対しても有意に抑制したが, 肝臓内 hydroxyproline 量の増加に対しては抑制傾向で肝臓の線維化に対する作用は弱いものであった.

これらのことから, マムシには実験的肝障害を抑制する作用が認められたが, その作用は慢性モデルよりも急性モデルに高い有効性が確認された. また, その作用強度を既に報告されている小柴胡湯あるいは大柴胡湯の経口投与時の抗肝炎活性<sup>22-24)</sup> と比較検討してもほぼ同程度のものといえる.

さらに, [M] の作用機序は急性肝炎モデルに有効性を示したことを考慮して検討した.  $\text{CCl}_4$  誘発肝障害は  $\text{CCl}_4$  が肝細胞ミクロゾーム中の薬物代謝酵素で代謝され,  $\cdot\text{CCl}_3$  となり, 細胞膜構成成分である不飽和脂肪酸の過酸化が生じ, 膜障害を導くとされている<sup>14,15)</sup>. また, ミクロゾーム膜障害の結果, 肝臓内 TG の肝外輸送が妨げられ, その結果, 血中 TG の減少, 肝臓内 TG の増加から脂肪肝が生じるといわれている. D-Galactosamine による肝障害は肝臓内で D-galactosamine が N-acetylgalactosamine に変化し, これを基質として UDP-galactosamine や UDP-N-acetylgalactosamine が生合成され, 肝細胞内の UDP 欠乏から肝細胞膜構造に変化が起こり肝細胞壊死が生じ

る<sup>17,18,25)</sup>。[M]がこれらの肝障害を予防したことは、特定の肝障害誘発化合物に拮抗したと考えるよりも、CCl<sub>4</sub>やD-galactosamineが肝細胞膜を障害することから、その作用機序として細胞膜安定化作用を考えるのが妥当と思われる。阿部ら<sup>26)</sup>や熊沢ら<sup>27)</sup>も実験的肝障害に有効な薬物の検討を細胞膜安定化作用の面から検討し、その一例として低張溶血抑制作用を指標としている。そこで、[M]の肝障害予防作用の機序としての細胞膜安定化作用を低張溶血抑制作用、さらにラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を指標に検討した。その結果、[M]には細胞膜安定化作用が確認され、この作用が[M]の抗肝炎活性の一端を担っていると思われる。

さらに近年、ラットを用いた実験的肝障害における肝血行動態の異常と病態や病因との関係が研究され、慢性的な肝疾患の治癒に血流量の維持や増加が関与していると報告されている<sup>28-30)</sup>。そこで、肝臓組織血流量に及ぼす[M]の影響を検討した。その結果、[M]は経口投与1時間後に肝臓組織血流量を有意に増大させる作用を示した。これも[M]の肝障害に対する改善作用の機序の一つになっていると思われる。

また、一般に肝臓は再生能力のある臓器であり、肝障害の治癒は新しい肝細胞の再生によって行われるとされている。そこで[M]の外科的肝臓部分切除による再生肝に対する影響について検討したところ、[M]は肝再生率を用量依存的に上昇させた。また、再生した肝臓中のhydroxyproline量を測定したところ対照群では、手術の影響と思われる若干の増加が観察され、[M]投与群のhydroxyproline量は有意に低下していた。これは、[M]が肝線維化を伴わない正常な肝再生現象を促進していることの証明であると同時に、炎症時の線維化を抑制する効果を有していることを示している。[M]がCCl<sub>4</sub>による慢性肝炎ラットのhydroxyproline量の増加に対して十分な抑制作用を示さなかったことは、それぞれの実験モデルで惹起される炎症の強度の違いあるいは[M]の投与時期の差異によると考えられる。

一方、藤井ら<sup>31-33)</sup>は日本産のマムシ、アオダイショウ、シマヘビなどについて栄養学的に検討し、これらの蛇類にアミノ酸や蛋白質、ビタミン類が多く含まれていることを報告しており、[M]の再生肝促進作用は栄養学的な効果である可能性がある。そこで、[M]と同時にアオダイショウ、シマヘビの50%エタノールエキスについても再生肝促進作用を検討したが、これらのエキスにはその作用が認められなかった。また、毒蛇であるマムシのみに効果が認められたことから、[M]の薬理活性にマムシ毒の関与が示唆されたが、[M]中のマムシ毒は極めて微量であること(重量あたり約0.01%)、前報<sup>1)</sup>においてマムシを全身、皮、内臓、骨と筋肉に分け初期免疫力増強作用を検討した結果、マムシ毒不含部分に強い活性を認めたことから、マムシ毒以外の成分に[M]の活性本体があるのではないかと推察される。

以上の結果から、[M]は実験的肝障害に対して抑制作用を示し、その作用機序の一端は細胞膜安定化作用、肝臓組織血流量増大作用、再生肝促進作用によると思われるが、詳細は現在不明である。これらの点については今後、有効成分の検索および既存薬物との作用強度、作用動態の比較と併せて検討する予定である。また、この再生肝促進作用が無毒蛇のアオダイショウやシマヘビに認められなかったことからマムシが古来、滋養強壯薬として薬用利用されてきたことを裏付ける結果であろうと思われる。

謝 辞：本研究を行うにあたり、実験材料およびご援助を頂いた㈱阪本漢法製薬に深謝致します。

#### 引用文献及び注

- 1) 森浦俊次, 松田秀秋, 久保道徳, 薬誌, **110**, 341 (1990).
- 2) 久保道徳, 森浦俊次, 牧野琢生, 松田秀秋, 薬誌, **109**, 592 (1989).
- 3) 唐 慎微(編), “重修政和經史證類備用本草”, 人民衛生出版社影印, 北京, 1957, p. 445.
- 4) 小泉清美, “日本醫藥動物”, 丸山舎書店, 東京, 1935, pp. 128-131.
- 5) 永谷康典, 武藤泰章, 佐藤 宏, 飯島昌夫, 薬誌, **106**, 41 (1986).
- 6) H.U. Bergmeyer, F.H. Kreutz, W. Pilz, F.W. Schmidt, H. Büttner, H. Lang, W. Rick, D. Stamm, G. Hillmann, D. Laue, E. Schmidt, G. Szasz, *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, **10**, 182 (1972).
- 7) 植田 寛, *Medical Technology*, **8**, 1041 (1980).
- 8) 板倉弘重, *クリニカルニュース*, **2**, 3 (1981).
- 9) A.G. Gormall, C.S. Bardawill, M.M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- 10) M. Michaëlon, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, **13** (Supple.), 56 (1961).
- 11) B. Uvnäs, I.L. Thon, *Exp. Cell Res.*, **18**, 512 (1959).

- 12) P.A. Shore, A. Burkhalter, V.H. Cohn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182 (1959).
- 13) G.M. Higgins, R.M. Anderson, *Division Experimental Surgery and Pathology*, **20**, 186 (1931).
- 14) 藤沢 洌, 岡部和彦, 田中健一, *日本臨床*, **30**, 211 (1971).
- 15) 長田英輔, *肝臓*, **20**, 261 (1979).
- 16) R.O. Recknagel, *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145 (1967).
- 17) D. Keppler, R. Lesch, W. Reutter, K. Decker, *Experimental and Molecular Pathology*, **9**, 279 (1968).
- 18) D. Keppler, K. Decker, *European J. Biochem.*, **10**, 219 (1969).
- 19) S.K. ElMofty, M.C. Scrutton, A. Serroni, C. Nicolini, J.L. Farber, *Am. J. Pathol.*, **79**, 579 (1975).
- 20) A.M. ElHawari, G.L. Plaa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **48**, 445 (1979).
- 21) 梅津浩平, 湯浅 聡, 須藤敦子, *日薬理誌*, **85**, 185 (1985).
- 22) S. Amagaya, M. Hayakawa, Y. Ogihara, K. Fujiwara, *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **5**, 129 (1988).
- 23) 藤原研司, 太田裕彦, 岡 博, 荻原幸夫, 雨谷 栄, *和漢医薬学会誌*, **5**, 238 (1988).
- 24) S. Amagaya, A. Miyake, Y. Ogihara, K. Fujiwara, *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **5**, 146 (1988).
- 25) D.O.R. Keppler, J. Pausch, K. Decker, *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 211 (1974).
- 26) 阿部博子, 有地 滋, 小田島肅夫, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*, **15**, 216 (1982).
- 27) 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).
- 28) 澤 美彦, 岡上 武, 金岡彦春, 堀 直樹, 伊藤義人, 森 能史, 香川恵造, 加嶋 敬, *肝臓*, **46**, 302 (1990).
- 29) 三枝 信, 渡辺清治, 奥平雅彦, 石井公道, 柴田久雄, *肝臓*, **34**, 708 (1991).
- 30) 澤 美彦, 岡上 武, 伊藤義人, 森 能史, 堀 直樹, 香川恵造, 加嶋 敬, *肝臓*, **34**, 1064 (1990).
- 31) 藤井正美, 高橋真太郎, *薬学研究*, **35**, 39 (1963).
- 32) 藤井正美, 高橋真太郎, *薬学研究*, **35**, 45 (1963).
- 33) 藤井正美, *薬学研究*, **35**, 248 (1963).