

向神経性天然薬物の探索におけるマウス拘束水浸ストレス潰瘍法の応用¹⁾山崎幹夫, 代田 寛
千葉大学生物活性研究所²⁾**Application of Experimental Stress Ulcer Test in Mice for the Survey of
Neurotropic Naturally Occurring Drug Materials¹⁾**

MIKIO YAMAZAKI and HIROSHI SHIROTA

Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University²⁾

(Received December 5, 1980)

Protective effect of 66 crude drugs on stress-induced ulcer in mice was examined. Of the drugs tested, Onji, Chimo, Tarakonpi, Bukuryo, Hange, Bushi, Kikyokon, Kōhon, Karokon, Rensense, Hamajisha, Sanzukon and Kujin, were found to have significant protective effect, some having effect comparable to that of certain tranquilizers.

Onji, Chimo and Tarakonpi were effective when administered intraperitoneally (i.p.) and per os (p.o.). The effect of Sanzukon (and matriline) was more prominent when given p.o. than when given i.p., while Hamajisha, Rensense, Kōhon and Kikyokon were more effective when administered i.p.

Acetazolamide inhibited carbonic anhydrase, while matriline did not inhibit the activity thereof matriline probably protects stress-induced ulcer by depressing central nerve system.

和漢生薬の薬効については古来より伝承等による知識が蓄積され、またさまざまな立場から薬効が新しく検討され、有効成分の探索が行なわれてきた。しかし薬効の解析において生薬類の多くは温和なしかもはなはだしく複雑な作用を現わすため、有効成分の探索分離には常に著しい困難をともなってきた。今回われわれは生薬類の有効成分の探索において、とくに向神経作用を有する成分の探索を目的とした場合、マウス拘束水浸ストレス潰瘍の抑制を指標とする試験法が効果的に用いうることを認め、成書、文献等において鎮静作用ありとされた生薬の何種類かが本法において著効を示し、chlorpromazine 等に匹敵する効力を発揮することを認めたので報告する。

生薬としては、古来鎮静の目的に用いられたとされる遠志、連銭草、知母、茯苓、半夏、当帰、川芎、山梔子、釣藤鉤、大棗、辛夷、白朮、蒼朮、酸棗仁、カミツレ等、鎮痛、鎮痙に用いられた苦参、山豆根、芍薬、木通、石菖根、葛根、藁本等の他、健胃薬とされる生薬類を中心に集め、合計66種を供試した。拘束水浸によるマウス実験ストレス潰瘍法は、矢野らの方法³⁾に準拠し、夕刻より翌朝まで18時間、ddy 系雌マウスの拘束水浸を 25° で行ない、各生薬の熱水抽出エキ스는拘束水浸の30分前に経口（以下 p.o. と略）腹腔内(i.p.)投与等により与えた。1群には原則として8~10匹のマウスを用い、水浸終了後、腺胃部の出血巣の長径の総和 (ulcer index=U. I.) を求め、潰瘍抑制率を対照との比較により算出した。供試生薬66種とそれらについて得られた結果を TABLE I に示した。

体重 kg あたり生薬 5g に相当するエキスを経口投与した場合、潰瘍の形成を40%以上有意に抑制した生薬は13種、遠志、知母、連銭草、茯苓、半夏、附子、山豆根、苦参、タラ根皮、浜千舎、瓜呂根、桔梗根、藁本であった。これらのうち前5者については、従来鎮静生薬として用いられたものであり、山豆根、苦参、タラ根皮、浜千舎等が、鎮痛健胃等の目的に用いられたと記述されていることは興味深い。山豆根、苦参については主成分である matriline および

- 1) 本研究の一部は日本薬学会 100 年会(東京, 1980年 4 月) および第 3 回天然薬物の開発と応用シンポジウム(東京, 1980年 8 月) で発表。
- 2) Location: 8-1, Inohana-1-chome, Chiba, 280.
- 3) S. Yano and M. Harada, *Jap. J. Pharmacol.*, **23**, 57(1973).

TABLE I. Protective Effect of Crude Drugs against Stress Ulcer in Mice

	Crude drug	Dose ^{a)} (mg/kg, p. o.)	No. of mice	Protection (%) ^{b)}
Akamegashiwa	<i>Mallotus japonicus</i> , Cortex	545	8	12
Iwajisha	<i>Conandron ramondoides</i> , Heraa	650	8	21
Uikyo	Foeniculi Fructus	962	7	23
Enmeisō	Isodonis Herba	505	8	38*
Ōgi	Astragali Radix	973	7	4
Ōgon	Scutellariae Radix	1,600	8	6
Ōbaku	Phellodendri Cortex	850	8	13
Ōren	Coptidis Rhizoma	735	8	20
Onji	Polygalae Radix	1,415	8	87***
		78 (i.p.)	5	94***
Kakkon	Puerariae Radix	1,183	8	30*
Kamitsure	Chamomillae Flos	1,102	10	21
Karokon	Trichosanthis Radix	1,090	7	77***
Kanzō	Glycyrrhizae Radix	1,589	10	14
Kantōkon	<i>Tussilago farfara</i> , Rhizoma	1,090	8	23
Kissōkon	Valerianae Radix	1,261	8	22
Kikyokon	Platycodi Radix	1,966	10	20
		467 (i.p.)	5	74**
Kikka	Chrysanthemi Morifollii Flos	1,009	8	14
Kyonin	Armeniacae Semen	926	8	-15
Kujin	Sophorae Radix	523	10	64**
		523 (i.p.)	7	12
Kumayanagi	<i>Berchemia racemosa</i> , Lignum	420	8	11
Keihi	Cinnamomi Cortex	216	7	4
Gennoshōko	Geranii Herba	982	8	-2
Kōhon	<i>Ligisticum jeholense</i> , Rhizoma	1,050	8	29*
		1,050 (i.p.)	5	83***
Goshuyu	Evodiae Fructus	1,244	8	-3
Saiko	Bupleuri Radix	743	8	14
Saishin	Asiasavi Radix	787	8	24
Sanzashi	Crataegi Fructus	2,902	8	23
Sanshishi	Gardeniae Fructus	1,477	7	18
Sanzukon	Sophorae subprostratae Radix	938	10	93***
		938 (i.p.)	6	60*
Sansōnin	Zizyphi Spinosi Semen	839	10	15
Shisoyō	Perillae Folium	1,077	9	34
Shakuyaku	Paeoniae Radix	2,029	8	30*
Shazenshi	Plantaginis Semen	696	9	24
Shōkyo	Zingiberis Rhizoma	766	8	12
Shin-i	Kobus Flos	1,173	8	10
Sekishōkon	<i>Acorus gramineus</i> , Rhizoma	740	8	21
Sekkoku	Dendrobii Herba	330	8	25
Senkyu	Cnidii Rhizoma	1,508	10	32
Senpukuka	Inulae Flos	830	8	3
Sōkyo	Gleditsiae Fructus	587	8	14
Sōjyutsu	<i>Atractylodis lanceae</i> Rhizoma	1,858	8	7
Taisō	Zizyphi inermi Fructus	3,398	9	24
Takusha	Alismae Rhizoma	1,163	8	19

TABLE I. Protective Effect of Crude Drugs against Stress Ulcer in Mice

	Crude drug	Dose ^{a)} (mg/kg, p.o.)	No. of mice	Protection(%) ^{b)}
Tarakonpi	Araliae Cortex	1,230	6	87***
		142 (i.p.)	5	90***
Chōji	Caryophilli Flos	675	8	14
Chimo	Anemarrhenae Rhizoma	1,590	8	62***
		1,590 (i.p.)	7	95***
Chotōkō	<i>Uncaria rhynchophylla</i> (prickle)	660	6	12
Tennanshō	Arisaematis Rhizoma	1,080	8	27
Tōgashi	<i>Benincasa cerifera</i> , Fructus	417	8	38*
Tōki	Angelicae Radix	1,940	8	20
Bakumandō	Ophiopogonis Tuber	3,235	8	19
Kakobe	<i>Stellaria media</i> , Herba	1,280	8	37
Bashōkon	<i>Musa basjoo</i> , RHIZOMA	839	8	28*
Hamajisha	<i>Tetragonia expansa</i> , Herba	2,824	10	75***
		1,412	9	55***
		706	10	20
		623 (i.p.)	9	97***
		312 (i.p.)	8	70***
		156 (i.p.)	8	62***
		623 (s.c.)	8	74***
Hange	Pinelliae Tuber	722	10	42*
Byakushi	<i>Angelica dahuricae</i> , Radix	1,868	7	24
Byakujyutsu	Atractylodes Rhizoma	1,860	10	2
Bukuryo	Hoelen	365	10	44*
		265 (i.p.)	8	12
Bushi	Aconiti Tuber	1,523	7	63***
Bōi	Sinomenii Caulis et Rhizoma	465	8	23
Bōkon	Imperatae Rhizoma	801	8	26**
Borei	Osteae Testa	84	7	19
Mokutsu	Akebiae Caulis	440	8	26*
Ryukotsu	Os Draconis	10	7	13
Rensenso	<i>Glechoma hederacea</i> subsp. <i>grandis</i> Herba	1,698	8	44**
		1,266 (i.p.)	8	95***
Renniku	Nelumbinis Fructus	1,107	8	0

^{a)} indicated weight of extract after freeze dried (equivalent to 5g of crude drugs)

^{b)} Protection (%) = $\frac{\text{U.I. (control)} - \text{U.I. (sample)}}{\text{U.I. (control)}} \times 100$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

oxymatrine に著効が認められた。山原ら⁴⁾によっても matrine を含有するフラクションがラットのストレス潰瘍形成を抑制したとの報告があり、山豆根、苦参の活性成分として matrine に作用のあったことが認められている。本法ではすでに CPZ, diazepam および meprobamate の抑制効果が認められているのでさらに 2,3 のトランキライザーに適用したところ、TABLE II に示すごとく chlorpromazine が 5 mg/kg (i. p.) で 80%, haloperidol が 2 mg/kg (i. p.) で 40%, 10 mg/kg (i. p.) で 53%, diazepam が 25 mg/kg (皮下 (s. c.)) で 71%, 50mg/kg (s. c.) で 93% の抑制率を示した。ちなみに前記生薬の抑制率は遠志 (p. o.) 87%, (i. p.) 94%, 山豆根 (p. o.) 93%, 苦参 (p. o.) 64%, タラ根皮 (p. o.) 87%, 浜千舎 (i. p.) 97%, 連銭草 (i. p.) 95% 等を示した。

propranolol, haloperidol 等の抗 catecholamine 作用薬はいずれも潰瘍形成抑制傾向を示し, α -methyl-*p*-tyrosine,

4) 山原條二, 金真理子, 沢田徳之助, 藤村 一, 生薬, 28, 33(1974).

TABLE II. Protective Effect of Tranquilizers against Stress Ulcer in Mice

Drug	Dose (mg/kg)	No. of mice	Protection (%)
Chlorpromazine	5 (i.p.)	5	80***
	5 (p.o.)	7	70**
Haloperidol	2 (i.p.)	8	40
	10 (i.p.)	8	53**
Reserpine	2.5 (s.c.)	8	13
	5 (s.c.)	8	3
Diazepam	25 (s.c.)	7	71***
	50 (s.c.)	8	93***
Meprobamate	100 (i.p.)	8	24
	200 (i.p.)	5	59**

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

TABLE III. Effect of Several Neurotropic Drugs against Stress Ulcer in Mice

Drug	Dose (mg/kg) i.p.	No. of mice	Protection (%)
Propranolol	50	8	52**
Apomorphine	2	8	-16
L-Dopa	50 (s.c.)	8	-52*
α -Methyl- <i>p</i> -tyrosine	100 ^{a)}	5	46*
5-Hydroxytryptophan	50 ^{b)}	8	47*
<i>p</i> -Chlorophenylalanine	200 $\times$ 3 days	8	-26
Pargyline	100	10	59**
	100 (s.c.)	7	70***
Isocarboxazid	50	8	41*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ^{a)} 120 min before immersion^{b)} 90 min before immersion

α -methyl-dopa のように catecholamine レベルの低下に働く薬物も抑制を示した。一方、L-dopa の投与や, dopamine agonist として知られる apomorphine 等は, 潰瘍の形成を促進させた。この傾向を serotonin 関連作用薬について調べると serotonin 生合成の前駆体である 5-hydroxytryptophan 投与によっては抑制の傾向, 一方 serotonin 生合成阻害剤である *p*-chlorophenylamine 投与では悪化の傾向が認められたが serotonin receptor site に作用する薬物による影響については明確な結果は得られなかった。また, monoamine oxidase inhibitor(MAOI) として知られる pargyline は, 100 mg/kg (i. p.) で 59%, 同量(s.c.)で 70%の抑制率, isocarboxazid は, 50 mg/kg (i. p.) で 47%の抑制率を示した。その他 harmine, harmaline の作用は顕著には認められず tranylcypromine は小用量では抑制, 大用量では潰瘍形成の促進傾向が認められた。以上の結果をまとめると TABLE III のようになる。

興味あることに本法によるストレス潰瘍の抑制には遠志, 知母, タラ根皮のエキスを除いて投与法の違いによる著しい差が見られ (TABLE IV), たとえば浜千舎, 連銭草, 蘘本, 桔梗根エキスは i. p. 投与で 70% をこえる抑制率を示すのに対して p. o. では 55% 以下を示すにすぎず, 山豆根エキスは逆に i. p. で 60%, p. o. では 93% の抑制率を示した。山豆根に見られた傾向は新鮮なクララ根より分離した oxymatrine, matrine によってもまったく同様に認められた。

試みに chlorpromazine, acetazolamide と oxymatrine についての潰瘍抑制率を比較した結果は Fig. 1 に見られるごとく chlorpromazine が p. o., i. p. 投与ともに著効を示したのに対し, acetazolamide と oxymatrine はともに p. o. 投与においてより有効であり, i. p. においては効果は約 1/2 に止まった。このような類似性に加えて Pakanaev ら⁵⁾によれば oxymatrine は亜鉛と複合体を形成することが認められており, acetazolamide が亜鉛含有酵素である

5) Yu.I., Pakanaev and G. Komoeva, *Nauch. Tr. Bukhar Gos. Pedagog. Inst.*, 68(2), 23(1967).

TABLE IV. Protection Ratio of Several Crude Drugs, Matrine and Oxymatrine Administered by Different Route against Stress Ulcer in Mice

Drug	Dose (mg/kg)		Protection (%)	
	p. o. ^{a)}	i. p.	p. o.	i. p.
Hamajisha	1,412	623	55	97
Rensenso	1,698	1,266	44	95
Kohon	1,050	1,050	29	83
Kikyokon	1,966	467	20	74
Onji	1,415	78	87	94
Chimo	1,590	1,590	62	95
Tarakonpi	1,230	142	87	90
Sanzukon	938	938	93	60
Kujin	523	523	64	12
Matrine	50	50	94	69
Oxymatrine	50	50	91	51

^{a)} Indicated weight of extract after freeze dried (equivalent to 5 g of crude drugs)

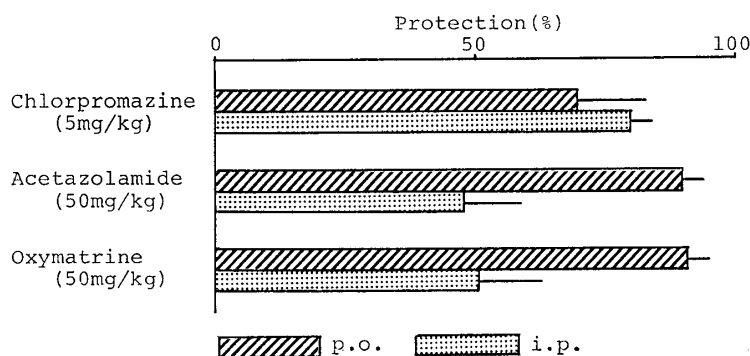


Fig. 1. Protection of Stress Ulcer in Different Route of Administration

carbonic anhydrase とその活性中心で強く結合すること⁶⁾を考えあわせると, oxymatrine によってもやはり同様の作用機構によって carbonic anhydrase の活性阻害が行なわれ, その結果, 胃酸の生成が低下することが予想された. 酵素阻害実験は Wilbur と Anderson の方法⁷⁾に従って, マウス胃ホモゲネートを用いて実施した. しかし carbonic anhydrase 活性に対する oxymatrine の作用は 10^{-4} g/ml でもほとんど阻害が認められず, それに対し, acetazolamide は IC_{50} を 5.2×10^{-10} g/ml と算定され, 両者は別の作用機構を有することが判明した. oxymatrine および matrine の薬理活性としては明らかな中枢抑制を含む興味ある知見を認めており, その作用機作についてはさらに検討を続行中である.

ストレス潰瘍の原因には種々要因が考えられ, その発生機作には不明の部分も少なくない. また本法において観察される潰瘍抑制のすべてが向神経性成分の作用によるとは断定できない. 現に山原らは本法(ラットによる)を胃腸疾患の病態モデルの一つとして生薬類に適用している⁴⁾. しかし今回の探索において著効を示した生薬類には TABLE I にも示したように従来より鎮静を目的として利用されてきたものが多く著効を示し, またそれらの多くがトランキライザーとして有用な chlorpromazine 等との比較においても興味ある高抑制率を示した (TABLE II) 事実は本法が胃腸疾患モデルとしてのみでなく向神経性天然薬物素材の組織的探索において有意義に応用しうることを強く示唆するものと思われる.

現在, 浜千舎, 連銭草, タラ根皮等, 本法において顕著な活力を示した生薬の有効成分の分画を行ないつつあり, その結果については別に報告したい.

6) J.E. Coleman, *J. Biol. Chem.*, **242**, 5212 (1967).

7) K.M. Wilbur and N.G. Anderson, *J. Biol. Chem.*, **176**, 147 (1948).

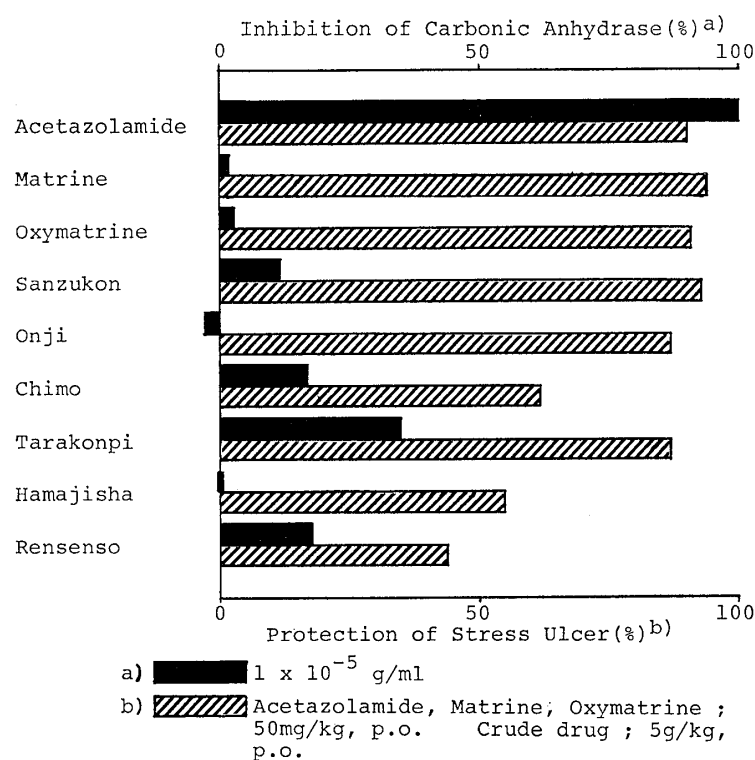


Fig. 2. Inhibition of Carbonic Anhydrase of Stomach (Homogenate, *in vitro*) and Protection of Stress Ulcer in Mice

実験の部

実験材料

1. 供試生薬とエキスの調製：生薬 (TABLE I) は主として市販品を用い一部は龍角散 K. K. より譲与をうけた。熱水抽出エキスは粗切生薬 50 g に約 10 倍量の精製水を加えて 2 回加熱抽出し、両濾液を合し 100 ml まで濃縮して調製し凍結保存して用時供試した。matrine, oxymatrine は, S. Okuda *et al.* の方法⁸⁾に従い新鮮なクララ (昭和55年6月に千葉市郊外にて採集) の根から抽出精製し供試した。

2. 実験動物：ストレス潰瘍法には ddy 系雌性マウス (6 週齢体重 20~25 g), carbonic anhydrase 活性測定には ddy 系雄性マウス (5 週齢体重 20~25 g) を使用した。

実験方法

1. 拘束水浸ストレス潰瘍法：矢野らの方法³⁾に準拠し、原則として 1 群 8~10 匹とし、水浸 30 分前に生薬熱水抽出エキス 0.1 ml/10 g body weight (生薬 5 g/kg に相当) を主として経口投与し、金網ケージに拘束したうえ 18 時間の水浸を施した。ストレス負荷後摘出胃をホルマリン固定し、腺胃部に発生した出血巣の長径の総和 (U. I., mm) を測定し、対照との比較から抑制率 protection ratio を算出した。有意差検定は *t* 検定によった。

$$\text{Protection Ratio (\%)} = \frac{\text{U. I. (control)} - \text{U. I. (sample)}}{\text{U. I. (control)}} \times 100$$

なお生薬以外の薬物については、主として腹腔内もしくは皮下投与した以外は同様である。

2. carbonic anhydrase 活性の測定：原則として Wilbur と Anderson の方法⁷⁾に従った。すなわち ddy 系マウスの胃を摘出し、20 倍量の 0.25 M-sucrose を加えてホモゲネートを調製し、その 10,000 × g 20 分の上清をさらに 300 倍希釈したものを酵素溶液とした。活性測定は 0°C で行ない veronal buffer (pH 8.15) 2 ml と酵素溶液 1 ml を混合して 30 秒後、2 ml の CO₂ 飽和水を加え、攪拌しながら pH 8.15 から 6.3 に至るまでの時間を測定し次式により activity unit = A. U. を算出し、阻害率を求めた。なおたん白質の定量は Biuret 法によった。

$$\text{Activity Unit (A. U.)} = (T_0 - T) / T / \text{mg protein}$$

8) S. Okuda, I. Murakoshi, H. Kamata, Y. Kashida, J. Haginiwa and K. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 482 (1965).

T_0 : reaction time for uncatalyzed reaction

T : reaction time for catalyzed reaction

$$\text{Inhibitory Ratio(\%)} = \frac{\text{A. U. (control)} - \text{A. U. (sample)}}{\text{A. U. (control)}} \times 100$$

謝 辞 ストレス潰瘍法の実施につきご助言を賜った本学薬学部 原田正敏教授, 矢野真吾助教授に感謝します.
本研究の一部は理化学研究所ライフサイエンス研究助成金によったものであり感謝します.