

牡丹皮の研究(第6報)¹⁾
抗血栓形成作用について(その1)久保道德^{2a)}, 松田秀秋^{2a)}, 泉 佐和^{2a)}, 谿 忠人^{2b)}
有地 滋^{2b)}, 吉川雅之^{2c)}, 北川 勲^{2c)}近畿大学薬学部^{2a)}, 近畿大学東洋医学研究所^{2b)}, 大阪大学薬学部^{2c)}Studies on MOUTAN CORTEX (VI)¹⁾
Inhibitory Effects on the Intravascular Coagulation (Part 1)MICHINORI KUBO,^{2a)} HIDEAKI MATSUDA,^{2a)} SAWA IZUMI,^{2a)} TADATO TANI,^{2b)}
SHIGERU ARICHI,^{2b)} MASAYUKI YOSHIKAWA^{2c)} and ISAO KITAGAWA^{2c)}*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,^{2a)}*
The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University,^{2b)}
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University^{2c)}

(Received August 8, 1981)

Seventy percent methanol extract (**M**) of Moutan Cortex (root cortex of *Paeonia moutan* S.M., Paeoniaceae, used in Chinese medicine) was found to prevent the decrease of blood platelet and fibrinogen involved in the process of disseminated intravascular coagulation (DIC) induced by endotoxin in rat.

Effect of some of its constituents, Paeonol, which is a major component of **M**, and two other monoterpene glucosides, benzoylpaeoniflorin and benzoyloxypaeoniflorin on blood platelet aggregation was studied in vitro: they inhibited endotoxin-, collagen- and ADP-induced blood platelet coagulation.

血管内血栓症候群 (DIC 症候群) は心臓, 脳, 肺などで血栓による血管腔の狭窄, 閉塞のため虚血性病変や硬塞を生じ, それらの臓器の機能障害を招来する疾病である。その成因については肝炎, 腎炎, リウマチ等の慢性炎症, 糖尿病, ガン, 動脈硬化症, 高脂血症, エンドトキシンショック等があげられている。

このような血液の凝固系-線溶系の異常で, 発現する DIC 症候群は, 漢方医学の「瘀血」という病態の一側面があると考えられる。

漢方用薬の牡丹皮は, 桂枝茯苓丸, 大黃牡丹皮湯など駆瘀血方剤に配剤されてきた生薬であり³⁾, 牡丹皮にも血栓症に対する予防および治療効果が期待できる。そこでラットを用いて実験的血栓症を誘発し, 牡丹皮の抽出エキスおよび各種含有成分の予防および治療効果を検討した。

実験的血栓症を短時間で誘発する病態モデルとして, 誘発剤に腸内細菌等由来のエンドトキシンを用いる方法⁴⁾がある。人における血栓症もエンドトキシンによるものが多いとされている⁵⁾。

- 1) a) 日本生薬学会第25年会(福岡, 1978年10月)および第14回和漢薬シンポジウム(富山, 1980年8月)で一部発表した。b) 第5報: 谿 忠人, 勝城忠久, 松田秀秋, 久保道德, 吉川雅之, 北川 勲, 生薬, **34**, 299(1980)。
- 2) Location: a) 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577; b) 380, Nishiyama, Sayama-cho, Minamikawachi-gun, Osaka 589; c) 1-6, Yamada-oka, Suita, Osaka 565。
- 3) 久保道德, 谿 忠人, 小曾戸洋, 木村善行, 有地 滋, 生薬, **33**, 155(1979)。
- 4) a) R. C. Lillehei, J. K. Longerbeam and J. H. Bloch, *Am. J. Cardiol.*, **13**, 599(1963); b) C. W. Borden and W. H. Hall, *N. Engl. J. Med.*, **245**, 760(1951); c) R. P. Gilbert, *Physiol. Rev.*, **23**, 609(1960)。
- 5) 早坂 滉, 秋山守丈, 医学のあゆみ, **109**(13), 809(1979)。

このエンドトキシンによる実験的血栓症で惹起された血小板数およびフィブリノーゲン量の減少，プロトロンビン時間の延長，フィブリン分解産物 (FDP) の増加に対して，牡丹皮の 70% MeOH エキス (経口投与) は改善作用のあることが明らかとなった。

また，これらの *in vitro* の実験に加えて，牡丹皮の作用機序解明のため，牡丹皮の含有成分を用いて，ラットおよび人血小板凝集に対する作用，抗トロンビン作用，人全血の凝固に対する作用，ウロキナーゼによるプラスミノゲン活性化に対する作用を *in vitro* で検討した。さらに赤血球はエンドトキシンの直接の仲介者としての働きはないが，その傷害により ADP を放出し，凝固あるいは血小板凝集を促進するといわれている⁹⁾ ことから，牡丹皮成分の赤血球膜安定化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* Sims. の根皮) を 70% MeOH で 3 回加熱抽出したエキス (以下 **M** と略す) および Chart 1 の方法⁷⁾ により得た paeonol. 水溶性分画 (**W**)，配糖体分画 (**B**)，paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin を実験材料に用いた。

実験動物

動物は Wistar 系雄性ラットを用いた。飼育環境は $21 \pm 2^\circ$ ，60% の恒温恒湿の部屋で飼育した。

実験方法

1. 実験的血栓症に対する作用：Schoendorf ら⁸⁾ の方法に準じた。すなわち Westphal 法⁹⁾ により精製されたエンドトキシン (*Escherichia coli* 055 : B 5, DIFCO 社) 0.1 mg/kg を被検体経口投与 1 時間後にラット尾静脈に注射し，4 時間後に心臓から採血した。

全自動血球計数器 (Coulter Counter Model S-Plus, Coulter 社) による血小板数，トロンビン時間法¹⁰⁾ (Clotek, Plyland 社) によるフィブリノーゲン量，光電比色方式 (Coag-A-Mate Dual-Channel, General-Diagnostics : Warnen-Lambert 社) によるプロトロンビン時間，およびラテックス凝集反応 (FDPL Test U, 帝国臓器) による血中 FDP 量を測定した。

2. 血小板凝集抑制作用：a) ラット血小板の調整：体重 300 g 前後のラットをエーテル麻酔下に心臓から採血し，50 U/ml ヘパリンを 1/10 量加えた。この血液を 1200 rpm，10 分間遠心分離し，上層を platelet-rich plasma (PRP) とした。さらに下層を 3000 rpm，30 分間遠心分離し，上層を platelet-poor plasma (PPP) とした。

b) 人血小板の調整：健康成人から採血し，1.9% クエン酸ナトリウム生理食塩水を 1/10 量加えた。この血液をラット血小板と同様にして PRP, PPP を作成した。

c) 血小板凝集抑制試験：血小板凝集メーター (Husm System Platelet Aggregometer; 理化電機社) を使用し，Born ら¹¹⁾ の方法に準じた。すなわち 0.2 ml の PRP に被検液あるいは対照溶媒 dimethylsulfoxide (DMSO) を

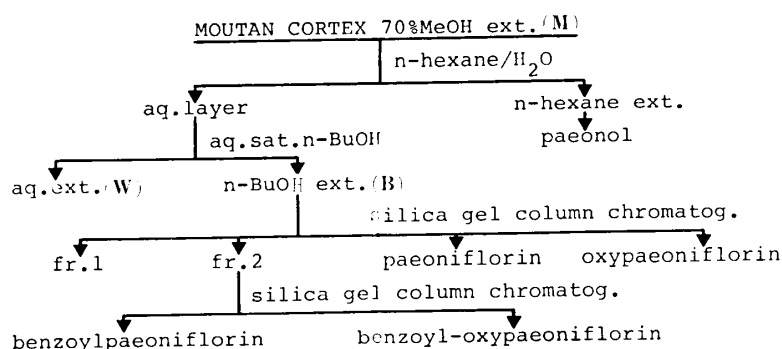


Chart 1.

6) 山中 學，醫學のあゆみ，109(13)，734(1979)。

7) 北川 勲，古川雅之，津永佳世子，谿 忠人，生薬，33，171(1979)。

8) T. H. Schoendorf, M. Rosenberg and F. K. Beller, *Am. J. Path.*, 65, 51(1971)。

9) O. Westphal, O. Lüderitz and F. Bister, *Z. Naturforsch.*, 7b, 148(1952)。

10) A. J. Quick, "Hemorrhagic Diseases," 1st Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1957, p. 379.

11) G. V. R. Born and M. J. Cross, *J. Physiol.*, 168, 178(1963)。

10 μ l 加えて攪拌を開始し、1分後に血小板凝集剤を加えて凝集による吸光度 (600 nm) の変化を経時的に記録した。なお血小板凝集剤にはラット血小板を用いた場合は 1 mg/ml のエンドトキシン, 0.05 μ M の ADP, 1.5 mg/ml のコラーゲンを、人血小板を用いた場合は 0.005 μ M の ADP, 1.5 mg/ml のコラーゲンを、

3. 抗トロンビン作用: 0.15 M-NaCl-0.05 M Tris acetate 緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 0.5% 牛フィブリノーゲン液に、被検液あるいは対照溶媒 DMSO を 0.1 ml 加え、1分後に最終濃度 0.2 U/ml トロンビン 0.1 ml を加え、室温 (25~30°) で凝固時間を測定した。

4. 人全血の凝固に対する作用: Chandler¹²⁾ の方法による Chandler's loop 法で測定した。すなわち 3 $\times$ 270 mm のプラスチックのチューブに人新鮮血 1 ml, 被検液あるいは対照溶媒 DMSO 0.1 ml, 0.25 M CaCl₂ 0.1 ml を注入し、室温で30分間、12 rpm で回転後の血栓重量を測定した。

5. 線溶系に対する作用: a) フィブリン平板の作製: Noren ら¹³⁾ の方法に準じ、1% アガロース溶液を加熱溶解した後、40° に冷却後フィブリノーゲン (166 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 U/ml) 0.1 ml を分注した後、シャーレに注ぎ、プラスミノゲン含有フィブリン平板を作製した。

b) 測定法: Astrup ら¹⁴⁾ 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 分後にプラスミノゲン含有フィブリン平板の穴に 20 μ l ずつ注入した。31°, 20時間放置後フィブリン溶解面積を測定し、抑制率を求めた。

6. 赤血球膜安定化作用: Glenn ら¹⁵⁾ の方法に準じ、加熱による赤血球の溶血に対する被検体の抑制作用を測定した。体重 200 g 前後のラットから採血し、1,500 rpm, 15分間遠心分離し、沈渣として赤血球を得た。この赤血球を 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、5% 赤血球懸濁液とした。この赤血球懸濁液 3.8 ml に 0.2 ml の被検液あるいは対照溶媒 DMSO を加え、53° の水浴中で加熱した。20分後に氷水中で急冷し、3,000 rpm, 15分間遠心分離後、上層を 540 nm で吸光度を測定した。

結 果

1. 実験的血栓症に対する作用

ラット尾静脈内にエンドトキシンを注入すると、血小板数、フィブリノーゲン量が著しく減少し、プロトロンビン時間が延長し、FDP 量が増加し実験的血栓症の検査像が認められた。M をエンドトキシン静注 1時間前に経口投与すると TABLE I に示したごとく、M の投与量の増加に伴って血小板数の減少、フィブリノーゲン量の減少、プロトロンビン時間の延長が抑制され、2000 mg/kg 投与群においては有意差が認められた。しかし FDP 量の増加に対しては、M には抑制傾向が認められたが、有意ではなかった。

2. 血小板凝集抑制作用

a) エンドトキシンによるラット血小板凝集に対する作用: ラット血小板を 1 mg/ml のエンドトキシンで処理すると、約 30 秒で最大凝集 (一次凝集) を示し、2分後にはかなり解離するが、再び徐々に凝集 (二次凝集) する曲線

TABLE I. Effects of M on the Endotoxin-Induced Intravascular Coagulation

	Blood platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Fibrinogen (mg/dl)	Prothrombin time (sec)	FDP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
normal control	63 $\pm$ 5	137 $\pm$ 8	19.9 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.0
diseased control	45 $\pm$ 3	97 $\pm$ 5	23.2 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.1
M 500 mg/kg	50 $\pm$ 6	89 $\pm$ 7	24.7 $\pm$ 1.2	0.4 $\pm$ 0.0
M 1000 mg/kg	55 $\pm$ 8	108 $\pm$ 14	22.6 $\pm$ 1.6	0.4 $\pm$ 0.0
M 2000 mg/kg	61 $\pm$ 3 ^{a)}	132 $\pm$ 6 ^{c)}	20.2 $\pm$ 0.6 ^{b)}	0.4 $\pm$ 0.0

a) $p < 0.005$

b) $p < 0.001$

c) $p < 0.0005$

12) A. B. Chandler, *Lab. Invest.*, 7(2), 110(1958).

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

14) T. Astrup and S. Mullertz, *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 346(1952).

15) E. M. Glenn, B. J. Bowman and J. C. Koslowski, *Biochem. Pharmacol. Suppl.*, 27(1968).

を示した (Fig. 1).

エンドトキシン注入 1 分前に被検体を注入すると、一次凝集に対して 500 μ g/ml の paeonol, benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin に顕著な抑制作用が認められ、oxypaeoniflorin にも弱い抑制作用が認められたが、paeoniflorin には抑制作用が認められなかった。

二次凝集に対してはいずれの被検体にも抑制作用は認められなかった。

b) ADP によるラット血小板凝集に対する作用：ラット血小板に 0.05 μ M の ADP を作用させると、血小板は著しく凝集し、3 分後に最大凝集を示し、以後はほとんど解離しない凝集曲線が認められた (Fig. 2).

ADP 注入 1 分前に被検体を注入すると、1,000 μ g/ml の **M** は最大凝集時で約 20% の抑制作用が認められ、以後若干の解離促進作用が認められた。牡丹皮成分では、paeonol に顕著な抑制作用が認められ、また配糖体の benzoylpaeoniflorin に抑制作用が認められた。

c) コラーゲンによるラット血小板凝集に対する作用：ラット血小板に 1.5 mg/ml のコラーゲンを作用させると、

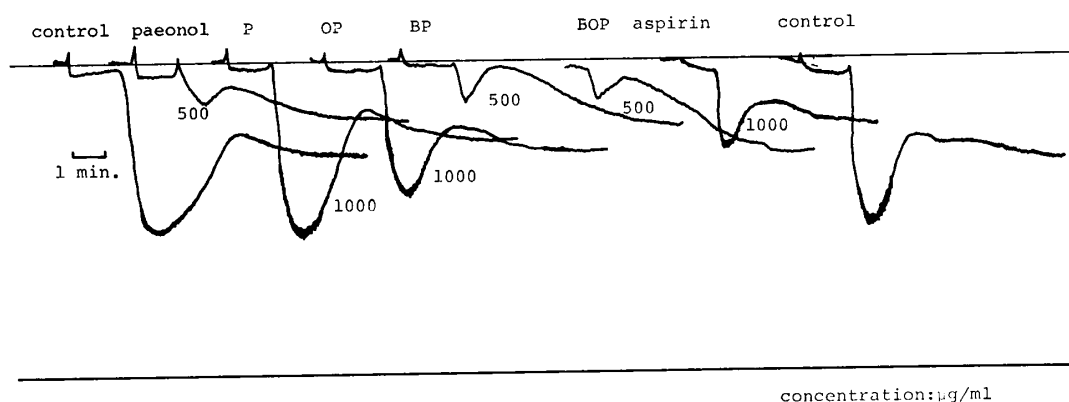


Fig. 1. Inhibitory Effects on Endotoxin-Induced Blood Platelet Aggregation (Rat)

P, paeoniflorin; OP, oxypaeoniflorin; BP, benzoylpaeoniflorin; BOP, benzoyl-oxypaeoniflorin.

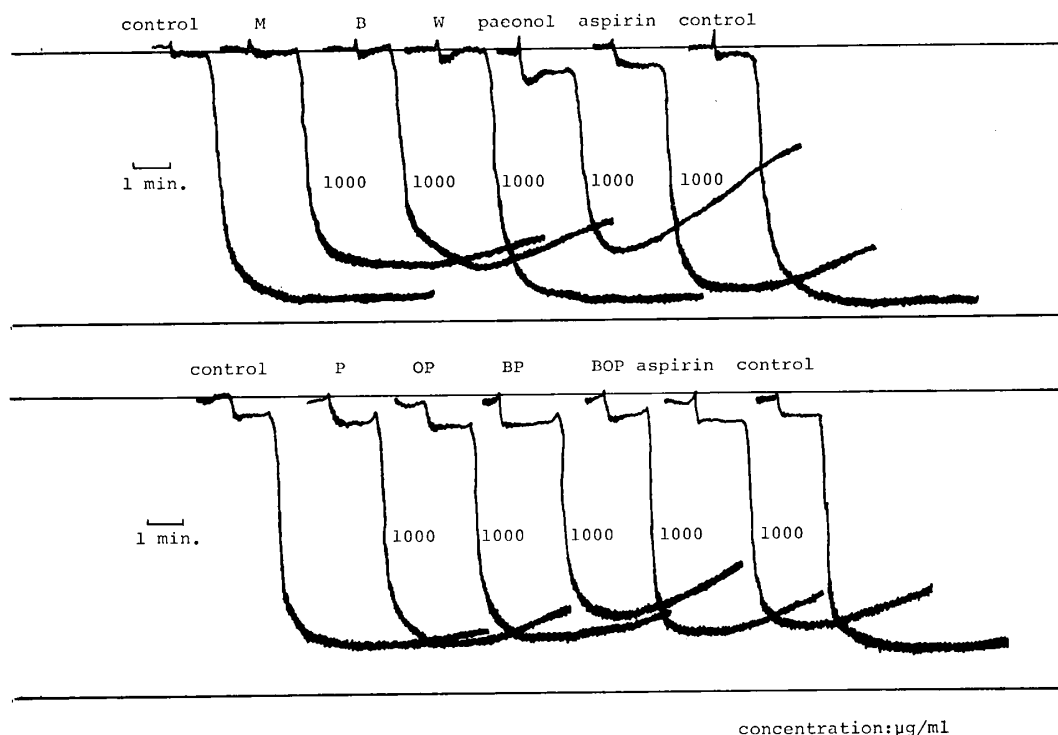


Fig. 2. Inhibitory Effects on ADP-Induced Blood Platelet Aggregation (Rat)

P, paeoniflorin; OP, oxypaeoniflorin; BP, benzoylpaeoniflorin; BOP, benzoyl-oxypaeoniflorin.

ADP による血小板凝集よりゆるやかな凝集曲線が認められた (Fig. 3).

コラーゲン注入 1 分前に被検体を注入すると, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の **M** に弱い抑制作用, **B** に顕著な抑制作用が認められた。

牡丹皮成分では, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の paeonol に顕著な抑制作用が認められた。 **B** から得た配糖体の中では, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin に顕著な抑制作用が認められた。 ついで oxypaeoniflorin にも若干抑制作用が認められたが, paeoniflorin には抑制作用は認められなかった。

d) ADP による人血小板凝集に対する作用 : 0.005 μM の ADP による人血小板凝集曲線はラット血小板凝集曲線とほぼ同様の曲線を示した (Fig. 4)。

被検体を ADP 注入 1 分前に注入すると 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の paeonol, benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin に顕著な抑制作用が認められた。

e) コラーゲンによる人血小板凝集に対する作用 : Fig. 5 に示したごとく, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の paeonol, benzoylpaeoniflorin に抑制作用が認められた。

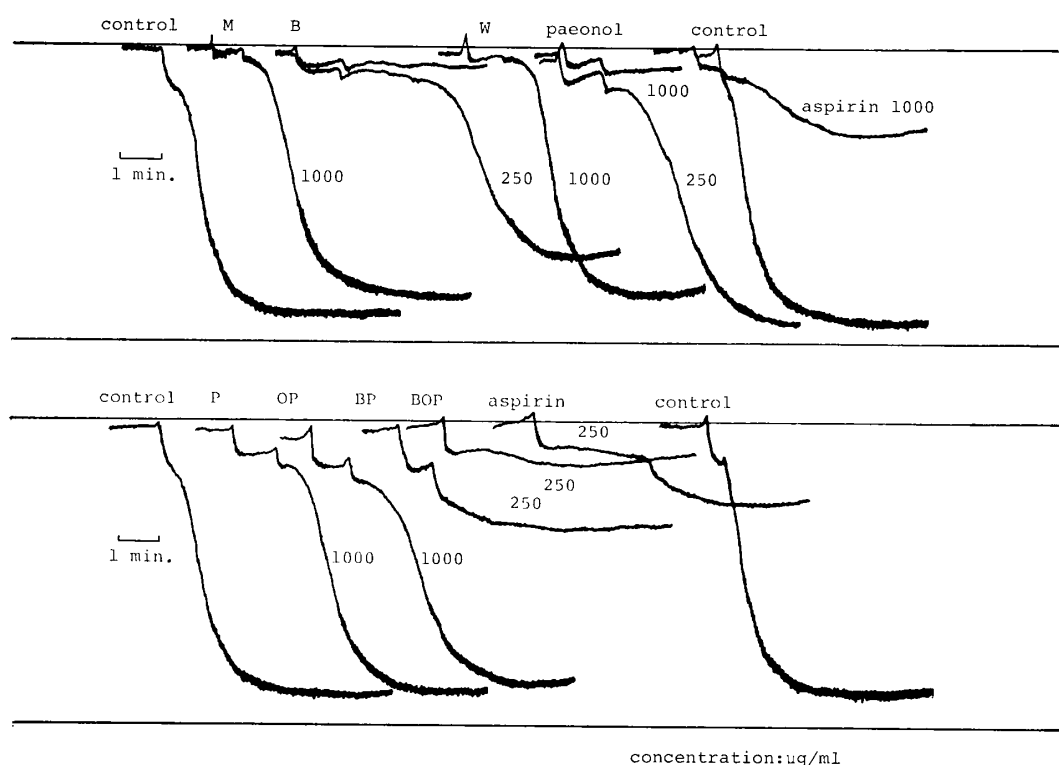


Fig. 3. Inhibitory Effects on Collagen-Induced Blood Platelet Aggregation (Rat)
P, paeoniflorin; OP, oxypaeoniflorin; BP, benzoylpaeoniflorin; BOP, benzoyl-oxypaeoniflorin.

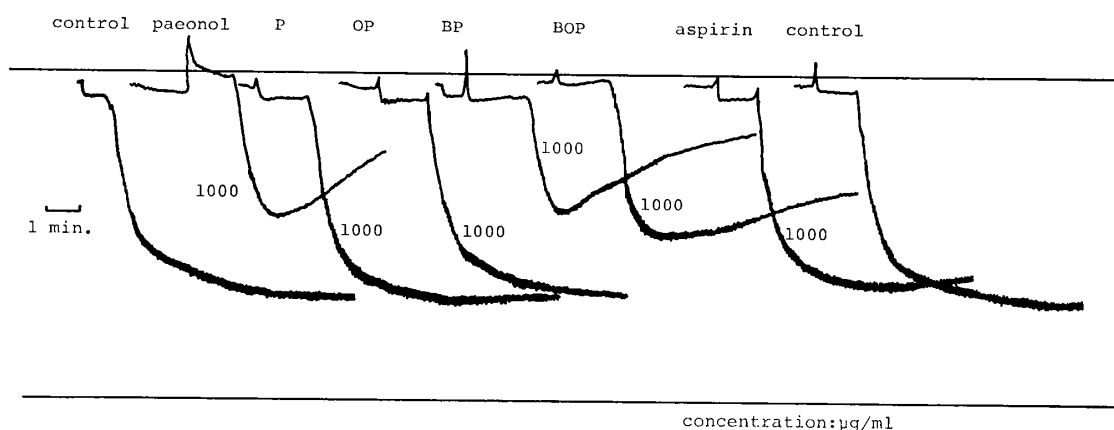


Fig. 4. Inhibitory Effects on ADP-Induced Blood Platelet Aggregation (Human)
P, paeoniflorin; OP, oxypaeoniflorin; BP, benzoylpaeoniflorin; BOP, benzoyl-oxypaeoniflorin.

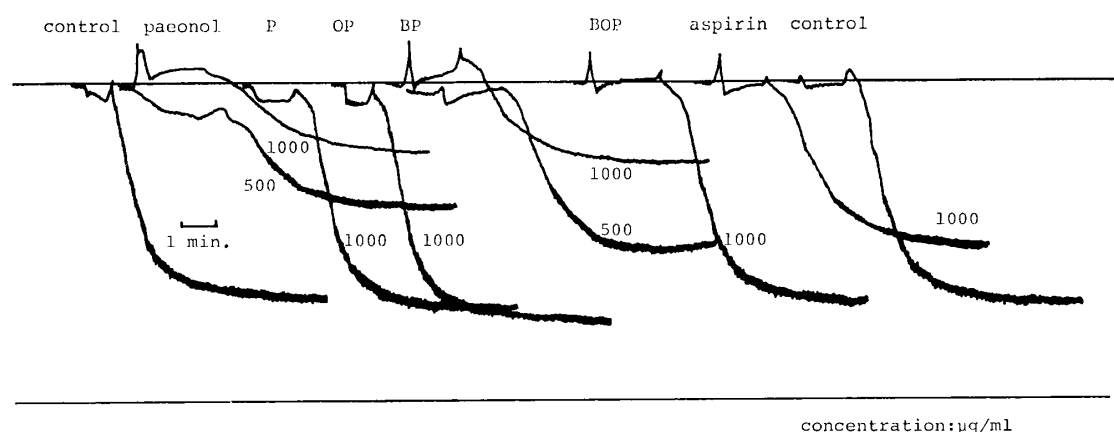


Fig. 5. Inhibitory Effects on Collagen-Induced Blood Platelet Aggregation (Human)
P, paeoniflorin; OP, oxypaeoniflorin; BP, benzoylpaeoniflorin; BOP, benzoyl-oxypaeoniflorin.

3. 抗トロンビン作用

0.2 U/ml のトロンビンはフィブリノーゲン液を 231 ± 5 秒で凝固させ、この系に 10 U/ml のヘパリンを共存させると 281 ± 6 秒に凝固時間が延長した (TABLE II).

トロンビン注入 1 分前に 1,000 µg/ml の被検液を注入すると、**M** は 171 ± 4 秒で凝固し、凝固時間の短縮が認められた。分画部では paeonol に 257 ± 11 秒、**B** に 600 秒以上の凝固時間を認め、有意な延長作用が認められた。**B** から得た配糖体では paeoniflorin (262 ± 10 秒)、oxypaeoniflorin (260 ± 10 秒) に有意な凝固時間の延長が認められた。benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin には延長傾向が認められたが有意ではなかった。

4. 人全血の凝固に対する作用

人新鮮血 1 ml を室温、12 rpm、30 分間回転させると約 39 mg の凝固血が形成された (TABLE III).

1,000 µg/ml の被検液を注入しておくと、**M** に凝固血の過形成が認められた。分画部では **B** にまったく凝固血の形成が認められなかった。また paeonol, paeoniflorin に凝固抑制作用は認められなかった。

5. 線溶系に対する作用

フィブリン平板法で検討し、TABLE IV にその結果を示した。10 mg/ml の benzoyl-oxypaeoniflorin に 19.8%, benzoylpaeoniflorin に 10.9% と弱い抗プラスミン作用が認められた。

6. 赤血球膜安定化作用

Fig. 6 に示したごとく、**M** に 500 µg/ml で約 67% の赤血球膜安定化作用が認められた。分画部では **B** に、

TABLE II. Effects on Clotting Time of Fibrinogen

	Final conc.	Clotting time (mean $\pm$ S. E.)
Control (DMSO)	1,000 (µg/ml)	231 ± 5
M	1,000	171 ± 4
W	1,000	190 ± 3
B	1,000	$600 <^d$
Paeonol	1,000	257 ± 11^b
Paeoniflorin	1,000	262 ± 10^c
Oxypaeoniflorin	1,000	260 ± 10^a
Benzoylpaeoniflorin	1,000	248 ± 14
Benzoyl-oxypaeoniflorin	1,000	240 ± 2
Heparin	10 (U/ml)	281 ± 6^d

^{a)} $p < 0.05$

^{b)} $p < 0.02$

^{c)} $p < 0.005$

^{d)} $p < 0.0001$

TABLE III. Inhibitory Effects on Thrombus Formation

	Final conc.	Thrombus weight
Control (DMSO)		39.8 (mg)
M	1,000 ($\mu\text{g/ml}$)	60.5
W	1,000	52.3
B	1,000	0.0
Paeonol	1,000	38.5
Paeoniflorin	1,000	36.0

TABLE IV. Effects on Anti-Fibrinolytic System in Fibrin Plate

	Inhibitory percentage (%)		
	10	1.0	0.1 (mg/ml)
Paeoniflorin	0.3	1.0	0.0
Oxypaeoniflorin	3.0	0.0	0.0
Benzoylpaeoniflorin	10.9	4.1	1.1
Benzoyl-oxypaeoniflorin	19.8	3.2	0.4

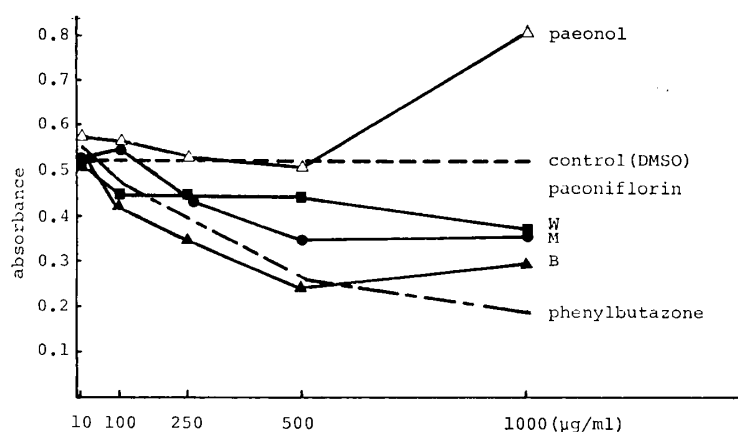


Fig. 6. Stabilizing Effects on Heat-Induced Hemolysis

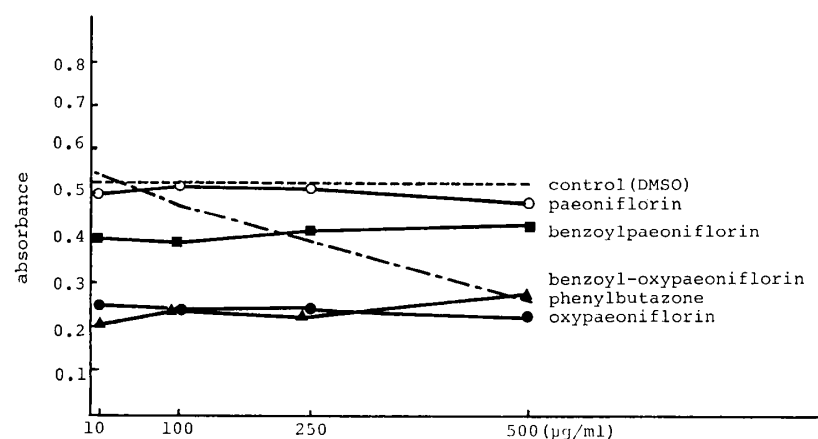


Fig. 7. Stabilizing Effects on Heat-Induced Hemolysis

phenylbutazone とほぼ同程度の安定化作用が認められ、**W**にも弱い安定化作用が認められた。paeonol には安定化作用が認められなかった。

B から得た配糖体では Fig. 7 に示したごとく、10 μ g/ml の oxypaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin に顕著な安定化作用が認められた。

結論および考察

牡丹皮は第1報³⁾で報告したごとく、古来漢方用法的に駆瘀血剤として用いられ、種々の炎症性疾患の治療に応用されてきた漢薬である。このことから第3報¹⁶⁾では牡丹皮の抗炎症作用について検討し、とくに自己免疫疾患の慢性的な炎症に対する有効性を認めている。

一方、牡丹皮が駆瘀血剤として用いられるという観点から、血液の凝固系-線溶系に対しても生理活性があることが予想される。漢方医学の「瘀血」という病態の一面は、エンドトキシンによって惹起される血小板凝集、血管内皮細胞障害などによる血栓、虚血、出血症状が含まれると考えられる^{5,17)}。このことから、すでに血小板凝集抑制作用、プラスミノゲン、プラスミンに対する阻害作用について牡丹皮の分画を用いて *in vitro* で検討した¹⁶⁾。今回、*in vivo* の系で血栓症に対する予防および治療作用について薬理学的に検討した。また、血液の凝固系-線溶系に対する *in vitro* の実験系は牡丹皮から単離され化合物を用いて検討した。

1. エンドトキシンにより誘起された実験的血栓症に対して、牡丹皮の 70% MeOH エキス (**M**) は血小板数の減少、フィブリノーゲン量の減少、プロトロンビン時間の延長、FDP 量の増加に対して改善作用が認められた。とくに血小板数およびフィブリノーゲン量の減少に対して、**M** に有意な改善作用が認められた。

2. **M** の *in vivo* における実験的血栓症の改善作用の作用機序の解明を目標として、まず血小板凝集に対する作用を検討した。

血管内に注入されたエンドトキシンは血小板を直接凝集させ、また血管壁を損傷し、コラーゲンを露出させ¹⁷⁾、これに血小板が粘着、凝集すると血小板中の ADP が放出され、これによってさらに著しい凝集作用を示す。

このような過程で、血小板が凝集するので、凝集剤にエンドトキシン、コラーゲン、ADP を用いてラット血小板凝集に対する作用を検討した。その結果、paeonol および配糖体分画 (**B**) から得た benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin にアスピリンよりも強い抑制作用が認められた。

また人血小板を用いて検討した結果、ラット血小板とほぼ同様な結果が得られた。

3. またエンドトキシンは内因性および外因性凝固機序を活性化し、トロンビンを産生し、フィブリノーゲンを凝固させる。そこで牡丹皮の分画および含有成分の抗トロンビン作用を検討した。その結果、paeonol および paeoniflorin, oxypaeoniflorin に有意な凝固延長作用（抗トロンビン作用）が認められ、benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin に延長傾向が認められた。

4. 人全血を用いた血液凝固に対しては、配糖体分画 (**B**) に強い作用を認め、その作用は、2. 3. の結果によるものと思われる。

5. 線溶系に対する作用をフィブリン平板法で検討した。第3報¹⁶⁾では benzoyl-oxypaeoniflorin を含む分画にプラスミノゲン活性化阻害作用、抗プラスミン作用を認めたが、今回活性分画の主成分である benzoyl-oxypaeoniflorin を用いて検討したが、弱い抗線溶活性しか認められなかった。

6. 赤血球膜安定化作用は oxypaeoniflorin benzoyl-oxypaeoniflorin および benzoylpaeoniflorin に強い安定化作用が認められた。

以上のことから牡丹皮に実験的血栓症に有効性を認め、牡丹皮の薬効の一面を証明し得た。またその作用機序は paeonol 配糖体分画 (**B**) とくに benzoylpaeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin の血小板凝集抑制作用、抗トロンビン作用および赤血球膜安定化作用による抗血栓形成作用によることが明らかになった。

16) 有地 滋, 久保道德, 松田秀秋, 谿 忠人, 津永佳世子, 吉川雅之, 北川 勲, 生薬, **33**, 178(1979).

17) R. W. Colman, S. J. Robby and J. D. Minna, *Amer. J. Med.*, **52**, 679(1972).