

鶏血藤 *Spatholobus subrectus* DUNN の血小板凝集におよぼす影響¹⁾

西尾 孝^{*,a}, 岩崎智美^a, 小早川純子^a,
松本克彦^a, 守安正恭^b

兵庫県立東洋医学研究所^a, 神戸薬科大学生薬化学教室^b

Effect of “Ji-xue-teng” (鶏血藤: *Spatholobus subrectus* DUNN, Leguminosae) on Platelet Aggregation¹⁾

Takashi Nishio^{*,a}, Tomomi Iwasaki^a, Junko Kobayakawa^a,
Katsuhiko Matsumoto^a, Masataka Moriyasu^b

^aInstitute for Oriental Medicine, Hyogo, 1-1-1 Higashidaimotsu-cho,
Amagasaki, Hyogo 660-0828, Japan

^bKobe College of Pharmacy, 4-19-1 Motoyamakita-machi,
Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan

(Received April 24, 2000)

The chinese crude drug “Ji-xue-teng(stems of *Spatholobus subrectus* DUNN, Leguminosae)” was studied for its effect on the human platelet aggregation induced by ADP or collagen.

It showed a strong inhibitory activity on both primary and secondary wave aggregation of human platelet induced by ADP, and a significant inhibitory effect on collagen-induced human platelet aggregation. Its methanol-soluble fraction was the most effective.

HPLC analysis suggested that the active compounds were condensed tannins.

Keywords : Ji-xue-teng ; *Spatholobus subrectus* DUNN, Leguminosae ; platelet aggregation ; condensed tannins

血栓症および血栓形成を伴う疾患は、死因ならびに罹病率の面においても、近年特に注目されている疾患群である。血栓形成による動脈閉塞は、心筋梗塞や脳梗塞などの主要臓器の虚血性病変を起し、また、糖尿病性網膜症や腎性、糸球体腎炎などの微小循環系病変の発生進展に関与している。そのうち、狭心症や心筋梗塞等の虚血性心疾患は血小板凝集によって引き起こされる血栓形成に起因していると考えられている。漢方医学においてもこれらの疾病に用いられる処方があり、その構成生薬の血液凝固・線溶系や血小板凝集におよぼす作用についていろいろと報告されている²⁾。

そこで、著者らは、臨床において漢方薬を服用することを前提とし、生薬の熱水抽出エキスならびにその成分の血液凝固・線溶系および血小板凝集におよぼす影響について研究し報告している³⁾。

鶏血藤は、『本草綱目拾遺』に「鶏血藤膠」と

して収載されている⁴⁾。鶏血藤は、漢方医学において理血薬中の活血薬に分類されている生薬で、補血と活血祛風により循環状態を改善し鎮痛するとされ、補血、強壯、鎮痛薬として、月経不調、腰膝の疼痛、リウマチ、手足の麻痺などに用いられている⁵⁾。これらについての報告⁶⁾は、いくつか見られるが、市場において、基原植物の異なる生薬が、多数、鶏血藤として流通している。最近、難波らは、市場品 15 種類の鶏血藤の基原植物を判別した⁷⁾。

そこで、今回、市場品のうち、鶏血藤 (*Spatholobus subrectus* DUNN, Leguminosae の茎を乾燥したもの) の熱水抽出エキスの血小板凝集におよぼす影響について検討し、さらに鶏血藤中の分画成分が血小板凝集におよぼす影響について検討を加えたので報告する。

材料および方法

1. 試料

今回、実験に用いる鶏血藤について顕微鏡観察を行った。その結果をFig. 1に示した。

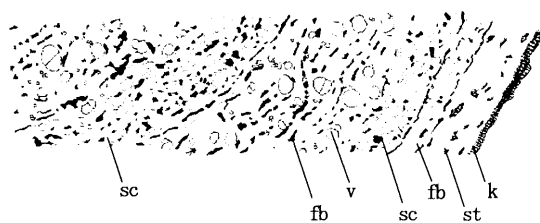


Fig.1 Diagrams Illustrating Transverse Sections of Stem of *Spatholobus subrectus*

fb : fibre bundle, k : cork layer, cork cell, sc : secretory cell, st : stone cell, v : vessel

コルク層は、十数層で、一次皮部に数個の石細胞からなる石細胞群が散在している。その内側に環状に配列した繊維群がある。そこから内側は師部、木部が交互に層をなしている。師部には大きな油細胞と繊維群があり、木部には大小さまざまな道管が単独または2～3個で不規則に散在し、木部繊維群がある。いずれの繊維群にも結晶細胞列をとまなっている。これらの点から、実験に用いた鶏血藤の基原植物は、*Spatholobus subrectus* DUNN, Leguminosae であることが判別された。

鶏血藤60gに蒸留水200mlを加え、還流器を取り付け直火で1時間還流器抽出後、熱時濾過し、その濾液を凍結乾燥し試料として粗エキス約6.1gを得た。

2. ヒト血小板凝集抑制活性測定

1) ヒト多血小板血漿 (PRP) 調整法⁸⁾

3. 8%クエン酸ナトリウム1/10容を添加したヒト新鮮血を1000rpm, 10分間遠心分離して、上澄みを採取し、これをPRPとした。血球を含む沈澱層をさらに3000rpm, 10分間遠心して、上澄みに寡血小板血漿 (PPP) を得た。PRP中の血小板数を自動血小板計数装置 (Platelet Counter PL-100, Sysmex社) を用いて測定し、PPPで希釈し血小板数を20～35万に調整し、それを被験血漿とした。

ヒト新鮮血は、20～36歳の健康な男女で、2週間以内に解熱鎮痛剤などの薬を服用していない者から得た。

2) 測定法⁸⁾

①鶏血藤熱水抽出粗エキスの血小板凝集抑制活性測定法

自動血小板凝集計 (Hema Tracer 1, NKK社) を用い、装着されているキュベットに被験血漿250μlと試料溶液20μlを入れて攪拌し、これに凝集のインデューサーとしてコラーゲンまたはADP溶液を20μl添加し、凝集挙動を透過率の時間的変化として観察した。対照として試料の代わりに蒸留水を用いて同様に測定し、その対照の凝集率に対する比で表し抑制率とした。

②鶏血藤粗分画の血小板凝集抑制活性測定法

Hema Tracer 1を用い、キュベットに被験血漿250μlと50%DMSOに溶解した粗分画試料溶液5μlを入れて攪拌し、これに凝集のインデューサーとしてADP溶液を20μl添加し、凝集挙動を透過率の時間的変化として観察した。対照として試料の代わりに50%DMSOを用いて同様に測定し、その対照の凝集率に対する比で表し抑制率とした。

実験に用いたPRPは、インデューサーに対する反応性を一定化するためADP溶液の終濃度を1～3μMの範囲に、コラーゲン溶液の終濃度は0.5～2.0μg/mlの範囲において最大凝集を示すPRPのみを用いた。測定に用いるインデューサー溶液の濃度は、最大凝集を示す、最小濃度とした。

どちらの測定法においても、PRPの個体差による反応性の違いを考慮し、異なる3人より得たPRPに対して測定を行い、同様の結果が得られるかを検討した。測定は、同一PRPに対して2重測定し、その平均値を抑制率とした。

3. 鶏血藤の粗分画

1の方法により得た熱水抽出エキス2000.6mgに、エーテル200mlを加えよく振倒し、濾過後、もう一度エーテル200mlを加え同様の操作を行った。その後、順次クロロホルム、アセトン、メタノール、水の順で同様にを行い、その可溶部の溶媒を減圧留去し粗分画を得た。

4. 鶏血藤の分析

1) 試料溶液の調整

メタノール分画をメタノールに溶解して試料とした。

2) HPLC条件: ポンプは, HPLC用ポンプ 660E (ウォーターズ社), 検出器は, フォトダイオードアレイ検出器 991 (ウォーターズ社). カラムは, Mightysil RP-18 (4.6mm X 150 mm). 移動相として, 0.2M NaClO₄/CH₃CN (90 : 10 → 40 : 60; 25分) を用い, 流速は, 2ml/min で行った.

結果

1. 鶏血藤の熱水抽出エキスのヒト血小板凝集におよぼす影響

Fig. 2はコラーゲンを, Fig. 3はADPをインデューサーに用いて, 鶏血藤の一つのPRPに対する血小板凝集への作用の結果を示した. 両図とも縦軸は, 血小板凝集に伴って起こる透過率の変化のコントロールに対する抑制の比を%で表示した. 横軸は, 試料の終濃度を表示した.

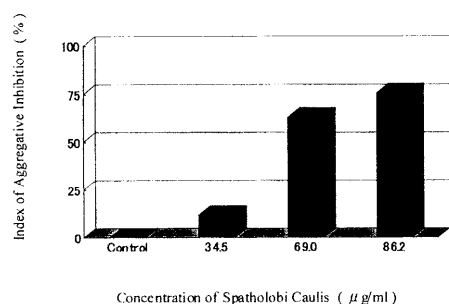


Fig.2 Relation between Spatholobi Caulis's Concentration and Inhibitory Behavior of Platelet Aggregation by Collagen

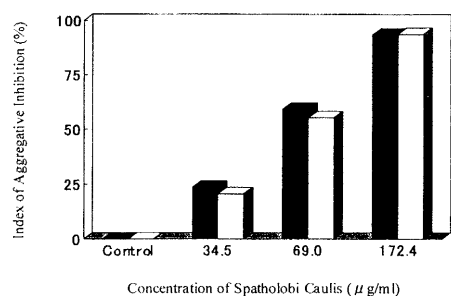


Fig.3 Relation between Spatholobi Caulis's Concentration and Inhibitory Behavior of Platelet Aggregation by ADP

■ Primary aggregation □ Secondary aggregation

インデューサーにコラーゲンおよびADPを用いた両者とも, 鶏血藤の熱水抽出エキスは, 異なる3つのPRPに対して血小板凝集を濃度依存的に抑制した.

2. 鶏血藤の粗分画のヒト血小板凝集におよぼす影響

鶏血藤の熱水抽出エキス (2000.6 mg) から, エーテル分画 (2.2 mg), クロロホルム分画 (17.4 mg), アセトン分画 (178.5 mg), メタノール分画 (1525.6 mg), 水分画 (274.1 mg) を得た.

この分画操作において, 少量しか得られなかったエーテル分画, クロロホルム分画以外の分画について, ヒト血小板凝集におよぼす影響を検討した.

Fig. 4に各分画のインデューサーにコラーゲンをを用いた時のヒト血小板凝集におよぼす影響の結果の一つを示した. 縦軸は, 血小板凝集抑制率を示した. 粗エキスおよび各分画の終濃度は, 182 μg/mlとなっている.

粗エキスより抑制活性が上がっている分画は, メタノール分画であった.

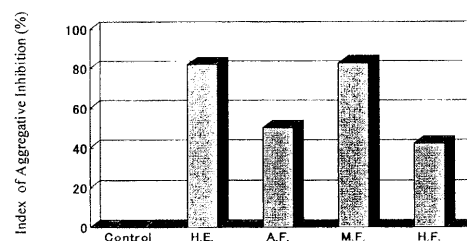


Fig.4 Comparison on inhibition of platelet aggregation by Spatholobi Caulis's fraction

Control: Distilled water; H.E.: H₂O Extract; A.F.: Acetone Fraction; M.F.: Methanol Fraction; H.F.: H₂O Fraction

3. 鶏血藤のメタノール分画の分析

Fig. 5に鶏血藤のメタノール分画のクロマトを示した.

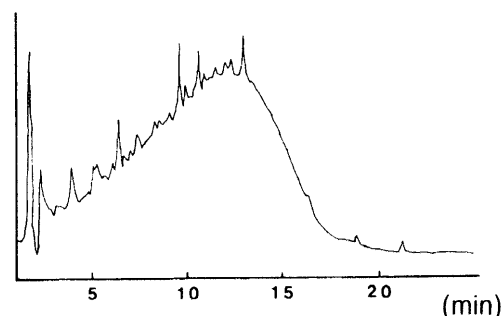


Fig.5 Chromatogram of the Methanol Fraction from Spatholobi Caulis's Extract

280 nmの吸収において、図のような幅広いブロードなピークの上にいくつかのピークの乗っているクロマトグラムを示した。また、ブロードな所の何点かの部分でUVの吸収を測定した。その結果、270 nm付近に吸収の極大を示す、非常に似た吸収パターンを示したことから、これらの化合物は、フェノール基を有していると考えられた。

また、鶏血藤には、縮合型タンニンの構成単位の一つである(-)-epicatechinが、含まれている⁹⁾ことから、タンニンの可能性が示唆されたので、以下の確認試験を行った。

(1) 塩化第二鉄試薬による確認試験¹⁰⁾：汚緑色の沈殿を生成した。

(2) アントシアニン生成試験¹¹⁾：塩酸との加熱により、紅色を呈した。

(3) バニリン-塩酸試液による確認試験¹⁰⁾：橙赤色を示した。

考察

今回、市場品の鶏血藤の基原植物が判別されたことから、鶏血藤 (*Spatholobus subrectus* DUNN, Leguminosae) の熱水抽出エキスのヒト血小板凝集におよぼす影響について検討した。

鶏血藤が、コラーゲンによるヒト血小板凝集を、86.2 μ g/mlの添加により75%以上抑制し、ADPによるヒト血小板凝集も、172.4 μ g/mlの添加により、一次・二次凝集共に90%以上抑制したことから、強い血小板凝集抑制作用を有することが認められた。

さらに、鶏血藤の分画により、活性の上がったメタノール分画のHPLCより、タンニンの可能性が考えられ、また、(-)-epicatechinの含有の報告⁹⁾があることから、確認試験を行った。その結果、(-)-epicatechinを一つの構成単位として含む縮合型タンニンの混合物が多く含まれていることが示唆された。また、(-)-epicatechinについては、腸管より吸収されることや強い血小板凝集抑制作用を有することが報告されている¹²⁾。

以上のことから、鶏血藤の血小板凝集を抑制する成分の大部分は、縮合型タンニンと考えられる。

しかし、今回の実験は、*in vitro*のものであり、鶏血藤の縮合型タンニンが、そのまま腸管吸収されるのか、また *in vivo*においても同様の作用を示すのかは不明である。

謝辞

本研究の実施にあたり、顕微鏡観察により鶏血藤の基原植物を判別していただいた(株)栃本天海堂の多田一郎、山本豊両氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) この論文の要旨の一部は日本生薬学会第45回年会(仙台, 1998年9月)において発表。
- 2) T. Okuyama, S. Shibata, M. Hoson, T. Kawada, H. Osada and T. Noguchi, *Planta Med.*, **132**, 171 (1986); S. Kuo, C. Teng, J. Lee, F. Ko, S. Chen and T. Wu, *Planta Med.*, **56**, 164 (1990)
- 3) 西尾 孝, 奥川 斉, 加藤 篤, 橋本庸平, 松本克彦, 藤岡晨宏, 生薬, **41**, 271 (1987); 西尾 孝, 大谷昌子, 中本智美, 奥川 斉, 松本克彦, 守安正恭, 加藤 篤, 和漢医薬誌, **11**, 156 (1994)
- 4) 難波恒雄, “和漢薬百科図鑑 [II]”, 保育者, 大阪, 1996, p. 170.
- 5) 神戸中医学研究会, “漢薬の臨床応用”, 医歯薬出版, 東京, 1991, p. 258.
- 6) 渡辺和夫, 矢野真吾, 王 昌恩, 名取信策, 藤本康雄, 和漢医薬誌, **2**, 268 (1985)
- 7) D. Chen, G. Xu, L. Xu and T. Namba, *Nat. Med.*, **51**(1), 4 (1997)
- 8) G. V. R. Born, *Nature*(London), **194**, 927 (1962); J. R. O'Brien, *J. Clin. Path.*, **15**, 452 (1962)
- 9) M. Lin, S. Li, Y. Ebizuka and U. Sankawa, *Zhongcaoyao*, **20**(2), 53 (1989)
- 10) 川崎敏男, 西岡五夫, “天然薬物化学”, 廣川書店, 東京, 1997, p. 124.
- 11) 奥田拓男, 化学の領域, **35**(4), 28 (1981)
- 12) T. Unno, K. Kondo, H. Itakura and T. Takeo, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(12), 2066 (1996)