

薬理作用の free radical 変化に基づく解析

—とくに *Scutellaria baicalensis Georgi* および
Bupleurum falcatum Linn. を中心として—

金沢大学医学部病理学第二講座(主任：石川大刀雄教授)

細野 八郎

(昭和48年4月4日受付)

Scutellaria baicalensis (黄芩) 及び *Bupleurum falcatum* (柴胡) は東洋医学 (漢方医学) の主要薬として頻用されており、その薬理作用についても多くの報告がある。

諸種の薬物試験や臨床使用経験から、*Scutellaria* は上腹部のつかえ感、腹痛、下痢、解熱、*Bupleurum* には解熱、消炎、治肝作用¹⁾ のあることが知られている。また、熊崎の動物実験によれば、*Scutellaria* には胆汁排泄促進作用^{2)~4)}、利尿作用⁵⁾、緩下作用⁶⁾ がみられ、その他の研究者によっても、粥状動脈硬化防止作用⁷⁾、解毒作用⁸⁾⁹⁾、毛細血管透過性抑制作用¹⁰⁾、抗アセチルコリン作用¹⁰⁾、抗アナフィラキシー作用¹¹⁾¹²⁾、実験的喘息抑制作用¹³⁾ などが報告されている。

また、*Bupleurum* については、高木らによる詳細な、一連の薬理実験がある。それによると、柴胡の粗サポニン分画には、マウス Climbing test, hexobarbital 催眠延長試験、条件回避反の結果から、鎮静作用¹⁴⁾¹⁵⁾、鎮痛作用¹⁴⁾¹⁵⁾、下熱作用^{14)~18)}、鎮咳作用¹⁴⁾¹⁵⁾、ある種の浮腫、肉芽増生と色素透過性亢進の抑制¹⁴⁾¹⁵⁾、ストレス潰瘍予防¹⁴⁾¹⁵⁾、腸管内容物移動促進¹⁴⁾¹⁵⁾、排尿促進或は抑制及び散瞳或は縮瞳¹⁴⁾¹⁵⁾、一過性の血圧下降¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁹⁾、及び心拍数減少¹⁴⁾¹⁵⁾、などの作用がある。また、小島らによると、チフスワクチン、エタノール、有機リン製剤による肝障害に効ありとの報告もある²⁰⁾。

これらの報告にもある如く、両生薬は、東洋医学のみではなく、現代医学的にも興味あるものと云えよう。

一方、これら薬物の有効成分抽出の努力も行なわれ、*Scutellaria* の alcohol extract の主成分は Flavone 化合物で、Baicalin, Baicalein, Woogon-

in などが分離され^{21)~23)}、また、*Bupleurum* からは Saikogenin A, B, C, D, E 及び Sapogenin など諸種の化合物が抽出され^{24)~30)}、その有効成分の化学的性質、作用機作の解析が試みられている¹⁴⁾¹⁵⁾。

一般に生体に薬物を投与し、その作用機作を解析するには、投与薬物の各臓器細胞、さらには、細胞内小器官、例えばミトコンドリア、ミクロゾームなどに対する親和性、あるいは、その諸機能に対する作用などに就いての情報が必要であろう。

この点に注目し、比較的良好に薬理効果が知られ、臨床的に肝臓に親和性があると考えられ、生薬学的に品質の保証された *Radix Scutellaria*, *Radix Bupleurum* の水抽出物を用いて、正常ラット肝細胞のミトコンドリアの呼吸機能 (酸化的リン酸化系、電子伝達系)、ミクロゾームの代謝活性、ことにそれらの free radical に及ぼす影響、さらに成熟ラットにこれら薬物を投与し、薬物の細胞内とりこみ、ミトコンドリア、ミクロゾームなどへの親和性について検索、いくつかの新知見を得たので、次に述べることとする。

実験材料及び実験方法

I. ミトコンドリアの分離

ラット肝臓からのミトコンドリアの分離は、Hogboom-Schneider 法に改良を加えた Packer らの変法³¹⁾ に従った。正常ウイスター系成熟ラット、または薬物投与したラットを無麻酔下で斬首、泻血し、すみやかに開腹して肝臓を取り出し、あらかじめ氷冷下に保存した sucrose I 液 (0.25M sucrose, 0.1 mM EDTA, 0.01M Tris-HCl buffer, pH7.2) 中

Action Mechanism of Chinese Medicine and Its Pharmacological Analysis from the Variation of Free Radical. Using *Scutellaria baicalensis Georgi* and *Bupleurum falcatum Linn.* Hachiro Hosono, Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

で細切し、血液を除くために数回洗滌した（以後の操作はすべて $0^{\circ}\sim 4^{\circ}$ で行なった）。ついで細切肝臓の約5倍量の sucrose I 液を加え、Potter-Elvehjem 型ガラスホモジナイザー、テフロンホモジナイザーを用いて約5分間ホモジナイズした。この20%ホモジネートを50g、7分間遠心し、その上清を sucrose II 液 (0.34M sucrose, 0.1mM EDTA, 0.05M Tris-HCl buffer, pH7.2) に重層し、700g、10分間遠心し、血球、核、その他の粗大球雑物を除去した。この上清を5000g、10分間遠心し、比較的顆粒の大きいミトコンドリア分画を得た。得られたミトコンドリア分画を sucrose I 液に浮遊させ、6000g、10分間、7000g、10分間遠心洗滌後、sucrose III (0.25M sucrose, 0.01M Tris-HCl buffer, pH7.2) に suspend し、9000g、10分間遠心したものをミトコンドリア分画とした。この分画を200mg Wet weight/ml になる様に sucrose III 液に再浮遊させ、 0°C に保存して、種々の実験に用いた。なお、このミトコンドリア浮游液の蛋白質は Lowry 法³²⁾により定量すると、20mg protein mit/ml に相当する。

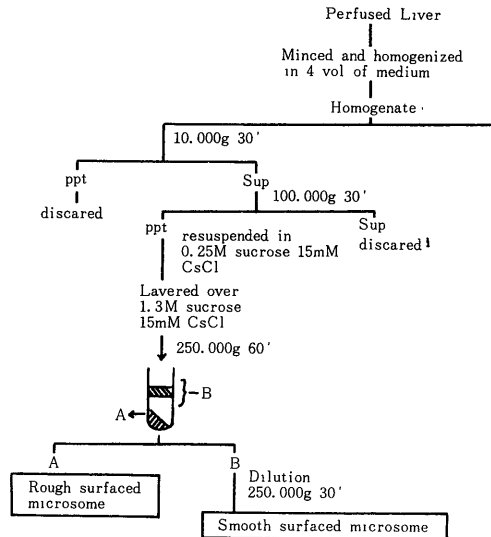
このように調整されたミトコンドリアは後述のオキシメーターによって、呼吸機能に異常のないことを確認した。

II. ミクロゾームの分離

肝ミクロゾームの分離方法には幾つかの方法が報告されているが、種々の検討の結果、本実験では Dallner の CsCl-Mg 法³³⁾で分離した。(図1)

成熟ウィスター系ラットを15~24時間絶食後、無麻酔下で斬首、瀉血し、すみやかに開腹して、あらかじめ氷冷下に保存した0.9%食塩水で血液を十分に灌流除去した。灌流した肝臓を氷冷下（以後の操作はすべて $0^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行なった）に保存した 0.25M sucrose 中で細切し、2~3回洗滌して、残余の血液を除去した。この細切した肝組織に約5倍量の 0.25M sucrose 液を加え、Potter-Elvehjem 型ガラスホモジナイザー、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、9000g、30分間遠心し、核、細胞膜片、ミトコンドリア、リゾチームを除去した。この上清を日立65P型超遠心機で、100,000g、60分間遠心して半透明の赤いミクロゾームの沈澱を得た。さらに得られたミクロゾーム分画を、0.25M sucrose, 15mM CsCl 液に再浮遊させ、1.31M sucrose, 15mM CsCl 液上に重層し、250,000g、60分間遠心し、粗面小胞体（沈澱物）と滑面小胞体（密度差 sucrose 界面浮游物）に分画した。

図1. ラット肝ミクロゾームの分画法。



また、粗面小胞体、滑面小胞体は共に、10mM Tris-HCl buffer pH7.5 に suspend し、氷冷下に保存して（蛋白質15~20mg protein/ml）、実験に供した。この得られた粗面及び滑面小胞体について、グルコース-6-リン酸加水分解酵素活性を測定し、その純度の規準とした。即ち、0.2Mグルコース-6-リン酸 0.1ml, 0.1Mマイレン酸緩衝液0.2ml, pH6.8, にミクロゾーム300 μg protein/ml 0.2ml を加えて混和し、 37°C 1時間インキュベートし、10% trichloroacetic acid (TCA) を加えて反応を阻止した後、3000rpm 5分間遠心し、その上清の無機燐の定量によって、グルコース-6-リン酸加水分解酵素活性を決定した。

III. Mg ATPase 活性の測定

Medium A (2.0 μM ATP, 1.0 μM Mg⁺⁺, 5.0 μM K⁺, 58.0 μM Na⁺, 10.0 μM CN⁻, 0.1 μM EDTA, 9.2 μM Tris-HCl buffer, pH7.5) と medium B (2.0 μM ATP, 1.0 μM Mg⁺⁺, 10.0 μM CN⁻, 0.1 μM EDTA, 144 μM Tris-HCl buffer pH7.5) の各々0.3mlに2.5mg protein/ml のミクロゾーム（あるいは柴胡、黄芩などを加えたミクロゾーム）、0.2mlを加え、よく振盪、混和し、1時間インキュベートした後、10%トリクロ酢酸で反応を止め、3000rpm、5分間遠心して得た上清についてATPから酵素的に遊離した無機燐の定量を行なった。

無機燐の定量はグルコース-6-リン酸加水分解酵素活性におけると同様に Bonting の方法³⁴⁾に従った。即ち上記の得られた上清1.5mlに、4%FeSO₄, 1%

モリブデン酸アンモニの1.15N-H₂SO₄ 1.5mlを加え、発色したモリブデンブルーを光電比色計で比色定量した。

IV. ミトコンドリアの呼吸機能の測定

ミトコンドリア呼吸機能は Chance, 萩原等の考案による半閉鎖式回転白金電極法³⁵⁾³⁶⁾を用いたオキシメーターによって測定した。図2はその概略図で、反応容器(1.0×1.0×2.0cm, 容量2.0ml)に, medium (0.25M sucrose, 0.02M KCl, 0.1mM EDTA, 1.0mM MgCl₂ Tris-HCl buffer pH7.2)を満し, 陽-陰極間に0.7Vの電圧を追加した。この場合に流れる電流は, medium中の容存酸素張力に比例する。室温25°Cで反応液に容存する酸素量を, 490mμatoms/mlとし, ミトコンドリアの各呼吸状態における酸素消費は電流値の減少から容易に換算することができる。

V. 差スペクトルによるマイクロゾームのP₄₅₀の測定

マイクロゾームのP₄₅₀の同定には日立365型=波長自記分光光度計を用い, 波長300mμ~600mμまでをスキヤニングした。マイクロゾーム0.3mg/mlをハイドロサルフェイトで還元後, CO gasを約30秒間通気したものを sample とし, referenceには未処理のmicrosomeを用い, その差スペクトルを自記記録し, 450mμにおける吸光度の差からP₄₅₀の量を測定した。

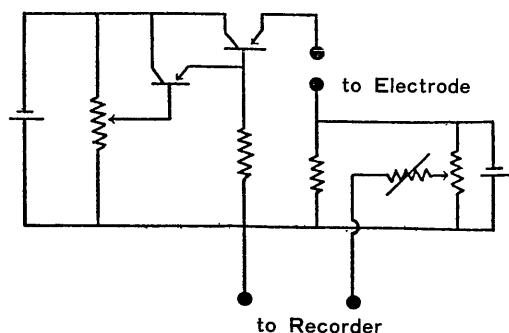
VI. 電子スピン共鳴吸収(ERS)による free radical の測定

free radicalの測定には日本電子製JES-ME-3Xを用い, 測定条件は小田島らの方法³⁷⁾に従った。

1. マイクロ波

クライストロンの周波数は9400MC/秒(波長3.0cm)でX帯を用いた。但し, 温度加変装置を用いた場合は約9150MC/秒である。

図2. 酸素電極法の Block diagram.



2. 測定磁場掃引範囲

この実験系では主に2900gaussを中心に, ±1000gaussの磁場掃引および free radicalの磁氣的性質の測定のために, 3270gauss±100gaussの磁場掃引を行なった。また磁場マーカーとしてMnOを用いた。その他, modulation, power, 掃引時間等は小田島らの方法³⁸⁾を参考にした。特殊な測定を行なったものについては, その都度条件を記入する様にした。

3. 資料管および測定温度

石英硬性ガラス製の内径0.45cmの資料管を用い, あらかじめ異常信号のないことを確かめた。測定温度は附属の温度可変装置を用い, 主に-80°Cで測定した。

4. 波形の解析および free radical 濃度の測定

電子スピン共鳴装置で記録される微分波形から容易にg値, ΔHmslが計算される。また free radical濃度を決定するために, 得られた微分波形を積分波形に変換し, その面積をあらかじめ free radical量の決まった資料と対比して, 相対的 free radical量を算出した。

VII. 黄芩, 柴胡エキスの調整

臨床的に使用されている黄芩(Scutellaria baicalensis Georgiの根茎), 柴胡(Bupleurum falcatum Linnの根茎)をそれぞれ, 1.0gに対して約20mlの蒸留水を加え, 100°Cで10分間抽出し, 不溶物を濾過し, 更に蒸留水を加えて最終的に20mlとして, 以下の実験に用いた。この薬の濃度決定は困難であるが, in vitroでのミトコンドリア呼吸に対する呼吸解放濃度をもって規準とした。

VIII. 正常ラットへの黄芩, 柴胡の投与

黄芩エキス, 柴胡エキスを上記の方法で調整し, 正常ラットに経口的に投与した。投与量はそれぞれ, 1日当り5.1mg/250gRat, 8.0mg/250gRatに相当し, それぞれ, 投与後, 1, 2, 4週間後に屠殺し, そのミトコンドリア, マイクロゾームについて各種の実験を行なった。

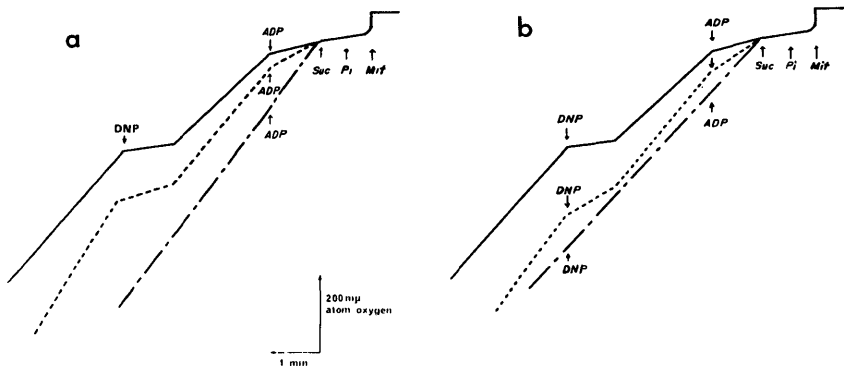
実験結果

I. 黄芩, 柴胡のミトコンドリアに対する作用

1. ミトコンドリア呼吸状態に対する作用

図3は正常ラット肝組織より得られたミトコンドリアに対する黄芩, 柴胡の作用をオキシメーターによって検討したものである。正常ラット肝ミトコンドリア(state I呼吸)に, 3mM Pi(state II呼吸), 呼吸基質である6mM succinate(state IV呼吸)を順次添加すると酸素消費は次第に増加する。さらにADP(この例では600μmol)を加えると酸素消

図3. 正常ラット肝ミトコンドリアに対する作用.



a : Scutellaria の影響. — ; ミトコンドリアのみ,
 ; Scutellaria 50 μ l添加, - - ; 100 μ l添加.
 b : Bupleurum の影響. — ; ミトコンドリアのみ,
 ; Bupleurum 50 μ l添加, - - ; 100 μ l添加.

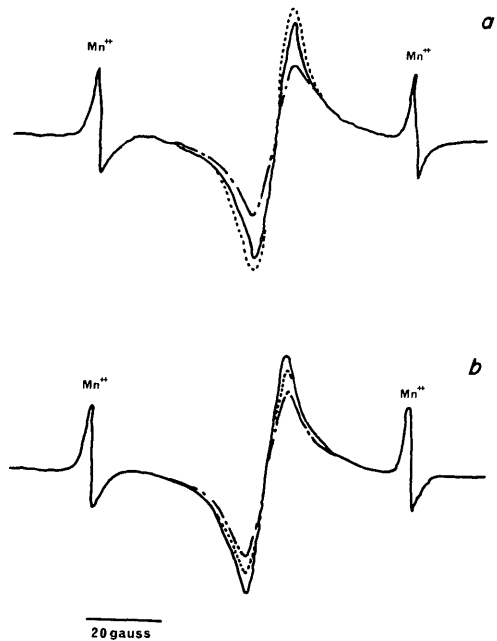
費は急激に増大し、State III 呼吸に移行する。ADPが消費しつくされると呼吸は再び state IV 状態となり、この間に消費された酸素量と加えたADP量からADP/O比が計算される (ADP/O = 1.85)。また、呼吸調節率(RCI)は state III/state IV で示され、この場合は4.0であった。

正常ラット肝ミトコンドリアに50 μ lの黄芩を添加した例では(図3-a), State IV 呼吸状態における酸素消費は増加し, ADP添加による酸素消費も増加し, 従って, そのADP/O比, RCIは共に低下するADP/O = 1.3, RCI = 3.2)。さらに100 μ l黄芩添加例では, State IV 呼吸の酸素消費は急激に増大し, ADP添加によるIII呼吸状態の移行は認められず, いわゆる脱共役の状態になる。図3-bは同様に柴胡について観察したもので, 50 μ l柴胡では, ADP/O比 1.3, RCI = 2.1, 100 μ lでは, 明らかに uncoupling 作用を示している。

2. ミトコンドリアの free radical に対する作用

正常ラット肝ミトコンドリアを電子スピン共鳴吸収装置で測定すると, 磁場3270gaussを中心に特有な吸収波形(図4)が認められる。小田島ら³⁰⁾によると, この吸収波形はミトコンドリアの free radical に由来するもので, g 値2.0046, ΔH_{msl} 9.5gauss, mg. protein あたりの free radical 量は, 正常ラット肝ミトコンドリアでは, $6.35 \pm 0.1 \times 10^{13}$ であり, これは呼吸状態, 膜を中心とした能動透過に重要な役割を果すものである。

図4. 正常ラット肝ミトコンドリア free radical の変化.



a : Scutellaria 添加.
 — ; ミトコンドリアのみ,
 ; 40 μ l,
 - - ; 100 μ l.

図5は正常ラット肝ミトコンドリアに黄芩柴胡を作用させ、その作用濃度と free radical の変化との関係を示したものである。即ち、正常肝ミトコンドリア (6.0mg. protein 量) に黄芩、柴胡をそれぞれ 20 μ l, 40 μ l, 100 μ l, 200 μ lを加え (100 μ l以上は un-coupling 作用), 1分間インキュベートし、液体窒素温度で凍結後、ESR吸収を測定したものである。図5からも明らかな様に、黄芩、柴胡ともに40 μ l (呼吸機能低下量, ADP/O比, RCIの低下) では free radical の軽度の低下が認められるにすぎないが、100 μ l では free radical の著明な減少が認められ、黄芩では、さらに添加量を増加させても free radical の減少は認められない。然し、柴胡では添加量に比例して free radical は直線的に減少する。

正常ラット肝ミトコンドリアの ESR signal は、free radical に由来する $g=2.0046$ のすどい吸収波形のみであるが (図6), 黄芩、柴胡を作用させると、図6, 7, 8, に示す様に新しい吸収波形が出現する。即ち、ミトコンドリアに黄芩を作用させると (図7), Gm 2820 gauss, Gm 2970 gauss, Gm 3170 gauss, Gm 3350 gaussに、柴胡を作用させると (図8), Gm 2580 gauss, Gm 2900 gauss, Gm 3

図5. 正常ラット肝ミトコンドリアの Scutellaria, Bupleurum 添加による free radical への影響.

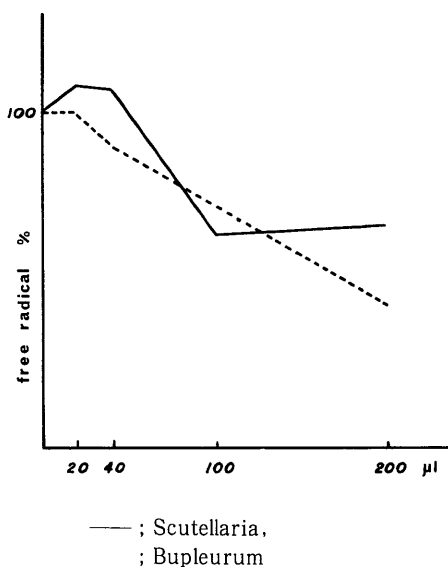


図6. 正常ラット肝ミトコンドリア, Scutellaria 及び Bupleurum の ESR signal.

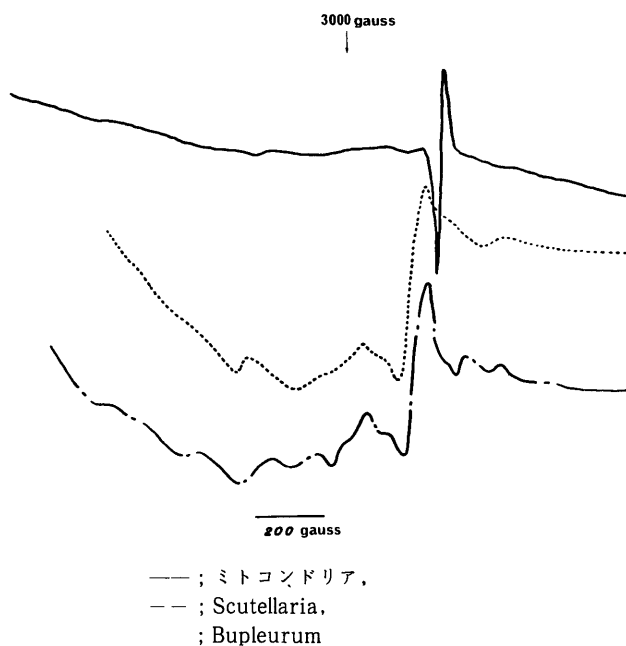


図7. 正常ラット肝ミトコンドリアの Scutellaria 添加による ESR signal の変化.

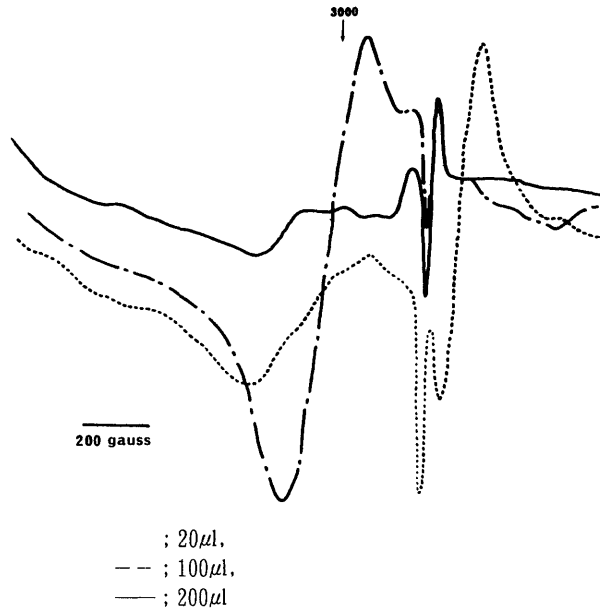


図8. 正常ラット肝ミトコンドリアの Bupleurum 添加による ESR signal の変化.

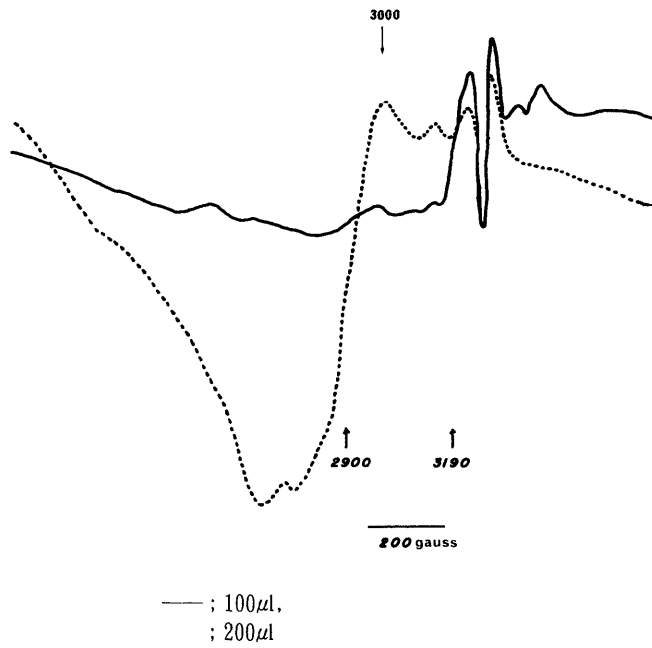
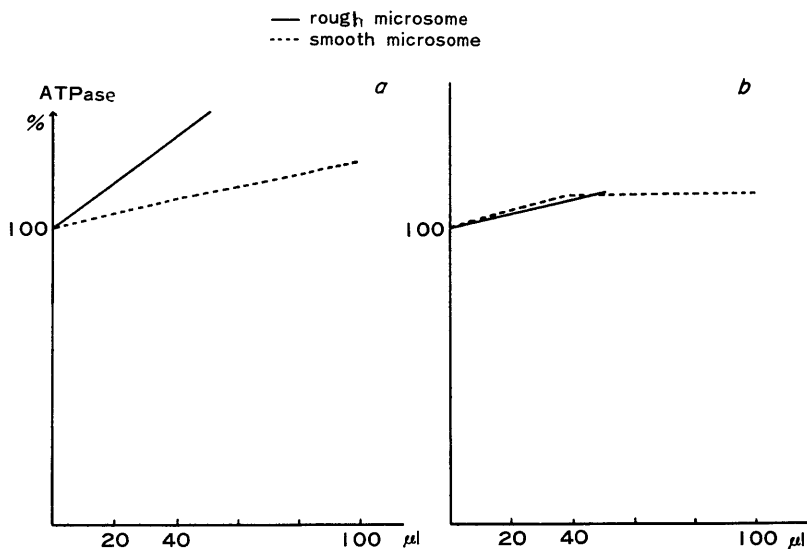


図9. 正常ラット肝ミクロゾーム ATPase 活性の変化.



a) Bupleurum 添加,
b) Scutellaria 添加

190 gaussにそれぞれ新しい signal が認められる。図6で見る様に、Gm 3190 gaussは黄芩、柴胡に共通に観察される。

II. 黄芩、柴胡の正常肝ミクロゾームに対する作用

1. ミクロゾーム ATPase 活性に対する作用

粗面小胞体、滑面小胞体について、黄芩、柴胡の濃度変化に対する ATPase 活性の変化を検討した。

図9からも明らかな様に、粗面、滑面小胞体の ATPase 活性は黄芩、柴胡によって活性化される。とくに柴胡は粗面小胞体 ATPase 活性を特異的に増加させる。

2. ミクロゾームの free radical に対する作用

正常ラット肝ミクロゾームには (図10), $g=2.004$ $\Delta Hmsl$ 10~12gaussの free radical に由来する吸収波形が存在するが、その濃度は極めて少なく、 10^{12} spin/mg以下である。然し、ミクロゾームに黄芩を作用させると、free radical は著明に増加し、 g 値は2.0058, $\Delta Hmsl$ 6.0gaussのするどい吸収波形が得られる。柴胡でも同様にミクロゾームの free radical の吸収波形は増大するが ($g=2.006$, $\Delta Hmsl$ 7.0gauss), 図からも明らかな様に、その増加率は黄芩に比して遥かに小さい。さらにミクロゾームを分画して、粗面、滑面小胞体についての作用をみると、表1に示される様に正常では滑面小胞体に free radical の信号は認め難いが、黄芩、柴胡の添加によ

図10. 正常ラット肝ミクロゾームの free radical に対する影響.



a) ミクロゾームの free radical,
b) Scutellaria 100 μ l添加,
c) Bupleurum 100 μ l添加.

て, free radical は増加し, 特に黄芩の効果が著明である. この様な結果は, これらの薬物がミクロゾーム分画の, 特に滑面小胞体に特異的に作用することを示している.

さらに磁場2000~4000gaussにおけるESR測定では(図11), 黄芩添加では2900gaussを中心とするESR吸収波形がみとめられる. また図12にみられるように, 柴胡20 μ l添加では2900gaussを中心に巾広い吸収波, 100 μ l添加では, この巾広い波形は消失する. この様な波形は何れも不安定で, 薬物添加量による変化が著しい.

3. 黄芩, 柴胡のミクロゾームの電子伝達系に対する作用

上記の結果はこれら薬物がミクロゾーム滑体小胞体に作用し, その電子状態を変化させることを示している.

ミクロゾームに電子伝達系の基質であるNADHを作用させると, free radical は増加する(g 値は2.0041, ΔH_{msl} 16.3). 即ち, この反応系には radical

反応を含むことを示している(図13, 表2).

この様な反応系に黄芩, 柴胡を加えると, free radical はさらに増加する. この場合 g 値の変化はないが, ΔH_{msl} 値は著明に減少する(図13, 表2).

ミクロゾームに黄芩を添加すると, free radical は著明に増加し, ΔH_{msl} は6.6と減少する. これにNADHを添加しても, その量はほとんど変化しない. これは黄芩投与による free radical 量の増加が大きく, NADHの変化が不明確化したものと考えられる.

柴胡を添加したミクロゾームでは, その intensity は18.9, ΔH_{msl} 6.6で, ほぼ2.5倍の増加である. 図13からも明らかなように, この電子伝達系における free radical は黄芩, 柴胡の添加によって, その性質が変化する. 即ち, 黄芩, 柴胡はこの電子伝達系に直接関与しているものと考えられる.

4. 黄芩, 柴胡のミクロゾームP₄₅₀に対する作用

ミクロゾームのもう一つの電子伝達系について, P₄₅₀を中心を検討した.

表1 正常ラット肝ミクロゾームの free radical intensity

	free radical intensity	
	rough-microsome	smooth-microsome
microsome	7.0	—
microsome+ Scutellaria	11.2	127.7
microsome+ Bupleurum	16.9	24.2

図11. Scutellaria (100 μ l) 添加による正常ラット肝ミクロゾームの ESR signal の変化.



ミクロゾームを還元して、その差スペクトルを観察すると(図14), 555m μ , 423m μ , 408m μ に吸収がみられる。還元ミクロゾームにさらにCOを結合させると、新たに450m μ に吸収があらわれ、いわゆるP₄₅₀と呼ばれるヘム蛋白に由来する吸収である。

この様な条件で、フェノバルビタールを添加すると、450m μ の吸収は増加し、黄芩を加えるとさらに増加の傾向がみられる(図15)。

この様なP₄₅₀を中心とした反応系について free radical を検討した。ミクロゾームをNa₂S₂O₄で還元し、CO結合を行なっても、その free radical には

殆んど変化しない。さらに、この系にフェノバルビタールを添加しても、free radical には著しい変化はみとめられなかった。この系に黄芩を添加すると、P₄₅₀自体は、free radical に直接関与しない(図16)ことから、黄芩は、基質からP₄₅₀までの反応系に関与していることを示唆している。

III. 黄芩, 柴胡の in vivo における作用

成熟ウイスター系ラットに黄芩(5.1mg/day), 柴胡(8.0mg/day)をそれぞれ経口的に約4週間連続投与し、1, 2, 4週間目に主として肝細胞を中心し、細胞形態学的変化、分画したミトコンドリアにお

図12. Bupleurum 添加による正常ラット肝ミクロゾームの ESR signal の変化。

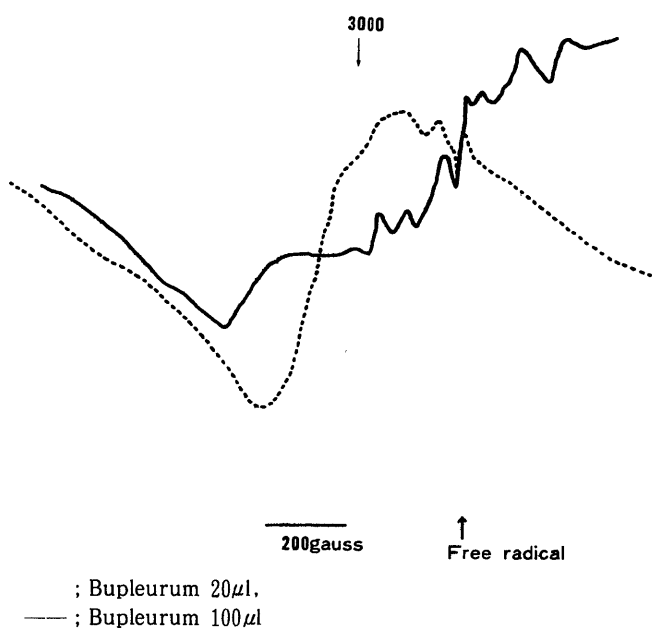
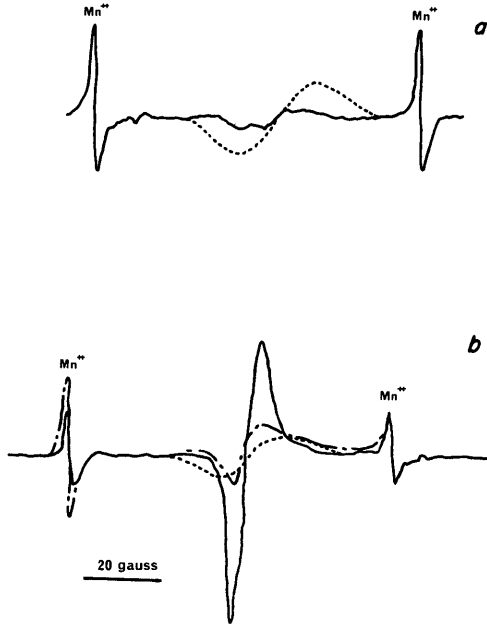


表2 正常ラット肝ミクロゾームの free radical intensity 及び Δ Hmsl と NADH, Scutellaria, Bupleurum との関係

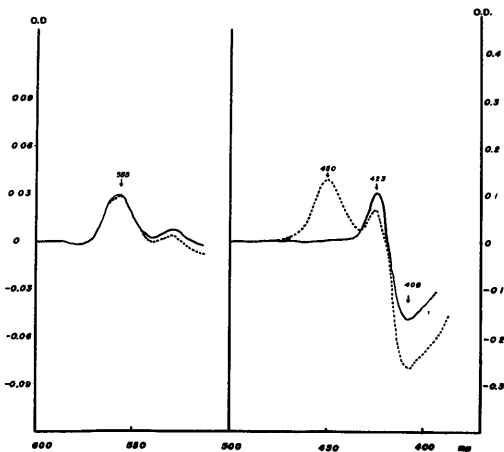
	free radical intensity	Δ Hmsl
microsome	—	—
microsome+NADH	7.7	16.3
microsome+Scutellaria	90.8	6.6
microsome+NADH+Scutellaria	90.8	6.6
microsome+Bupleurum	9.2	5.3
microsome+NADH+Bupleurum	18.9	6.6

図13. 正常ラット肝ミクロゾームの電子伝達系に対する Scutellaria, Bupleurum の作用.



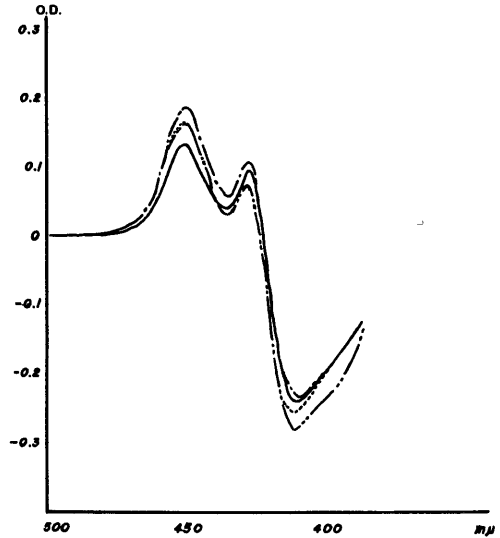
a) — ; ミクロゾームのみ,
 ; NADH添加
 - - ; NADH添加,
 — ; NADH, Scutellaria 添加,
 - - ; NADH, Bupleurum 添加

図14. 差スペクトルによる正常ラット肝ミクロゾームのP450.



— ; microsome + Na₂S₂O₄,
 ; microsome + Na₂S₂O₄ + CO

図15. 薬剤添加による正常ラット肝ミクロゾームのP450の変化.



— ; Na₂S₂O₄, CO添加,
 ; フェノバルビタール, Na₂S₂O₄, CO添加,
 - - ; フェノバルビタール, Scutellaria, Na₂S₂O₄,
 CO添加,
 — ; Scutellaria, Na₂S₂O₄, CO添加

ける呼吸機能(電子伝達系, 酸化的磷酸化系), ミクロゾームにおける ATPase 活性, 電子伝達能について検討した.

黄芩, 柴胡を投与したウイスター系ラット肝臓では, 光学顕微鏡的に何れの時期についても形態学的変化はみとめられなかった. また, ミトコンドリアについても, 2週間投与例で, 僅かにADP/0比の低下, RCIの変動などがみられたが, 何れも有意の差ではない.

ミクロゾームにおける ATPase 活性についてみると, 黄芩, 柴胡投与例では, 1, 2週間で粗面小胞体における活性化が著明であるが, 滑面小胞体についてみると, 非投与例との間に有意の差は認められない(図17).

図18は黄芩投与例におけるESR共鳴吸収を測定したものであるが, 投与一週間目以降, Gm2670, 2820, 3080, およびg=2.000に相当する free radical の増加が観察される. 然し, 4週間目では free radical が増大するが(図19), 柴胡投与例では, 投与2週間目に, Gm=3080gaussを中心とした吸収波形が出現し, またg=2.004に相当する free radical の

図16. 薬剤添加による正常ラット肝ミクロゾームP450
反応系の free radical の変化.

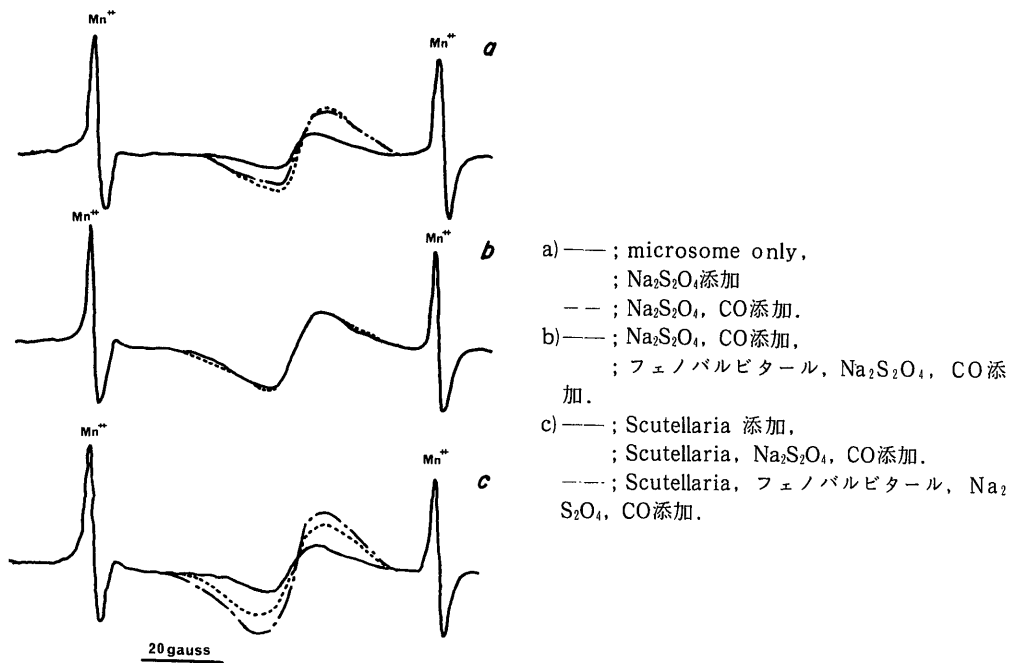


図17. 経口投与後のラット肝ミクロゾーム ATPase 活性の変化

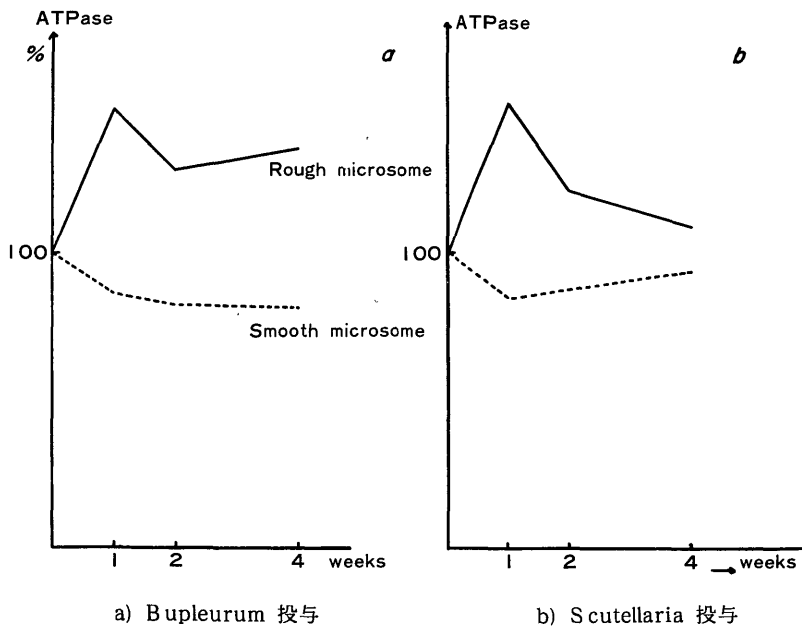


図18. Scutellaria 投与ラット肝細胞分画の ESR signal.

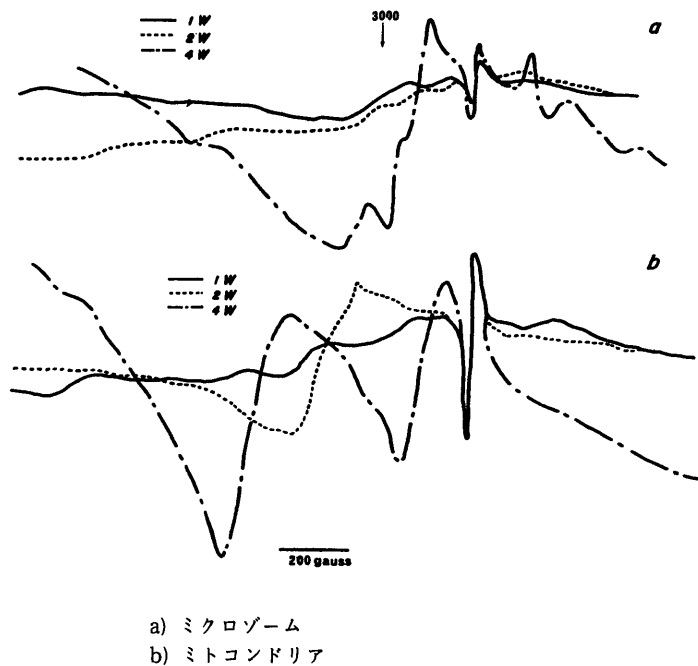


図19. 経口投与後のラット肝マイクロゾームの ESR signal の変化.

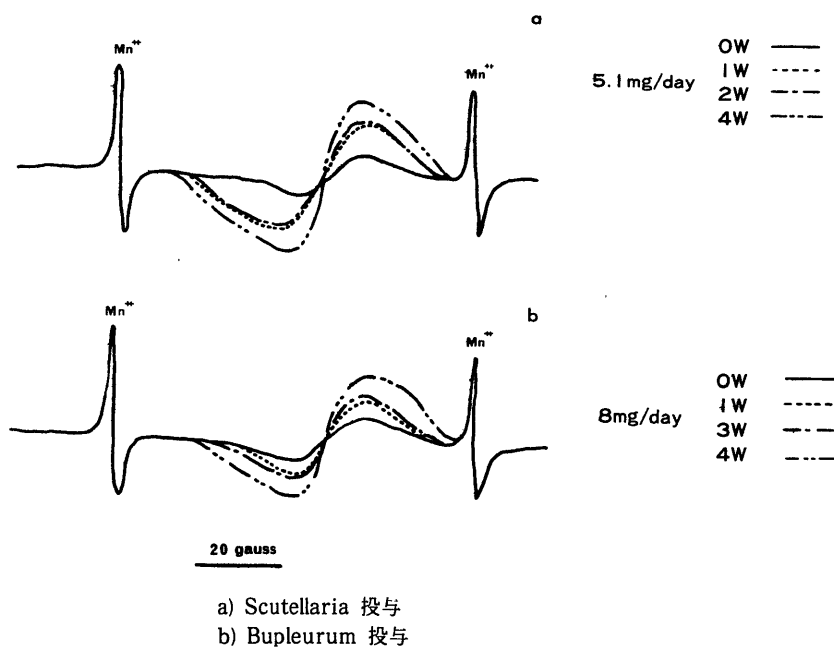


図20. Bupleurum 投与ラット肝ミトコンドリアの ESR signal の変化.

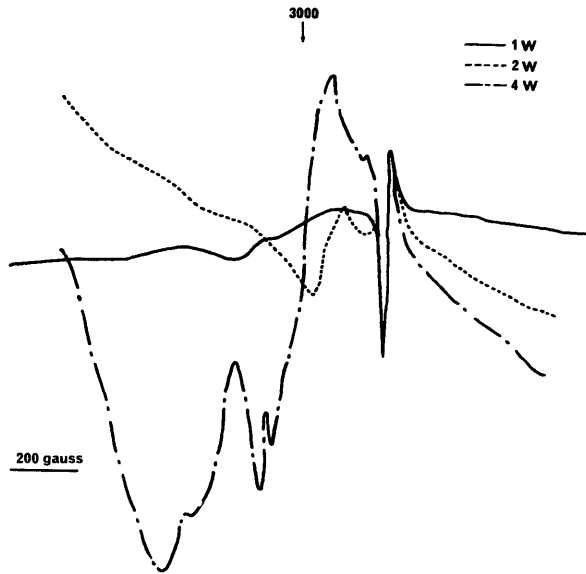
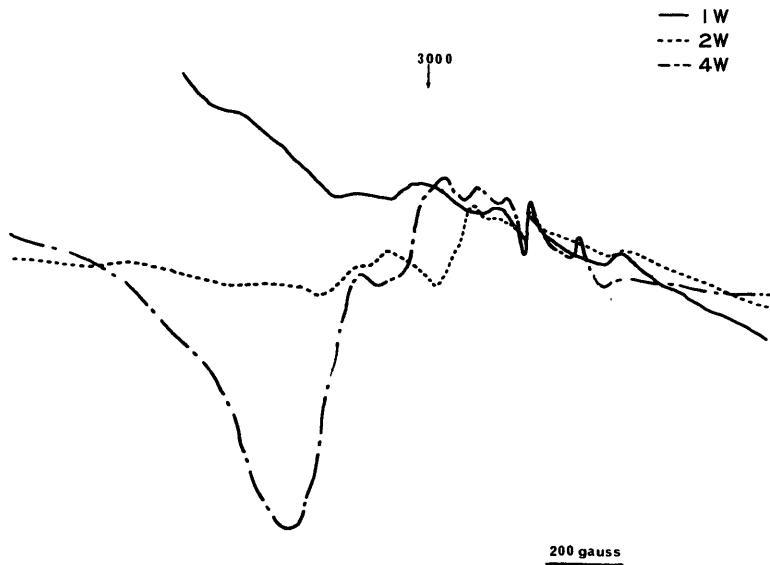


図21. Bupleurum 経口ラット肝マイクロゾームの ESR signal の変化.



増大が認められる。4週間投与例では2580, 2800, 3000の吸収波が観察され(図20, 図21), $g = 2.004$ の free radical が, さらに増大する傾向を示す(図19).

総括及び考察

Scutellaria baicalensis Georgi, *Bupleurum falcatum* Linn, は古くから東洋医学の重要な治療薬として用いられ, その臨床治療効果についても多くの報告があるが, その作用機作についてはなお不明の点が

多い。

一方、これら薬物の有効成分抽出の努力も行なわれ、*Scutellaria* からは Baicalin, Baicalein, Wogonin など、主に Flavone 系化合物が分離され、また、*Bupleurum* からは Saikogenine A, B, C, D, E および Sapogenin など諸種の化合物が抽出され、これらの化学的性質、薬理作用の解析が試みられている。しかし、これらの有効成分と *Scutellaria* や *Bupleurum* そのものの薬理作用の間に必ずしも一定の相関々係がみとめられていない。

このような研究方法は、これまで、薬理作用機作解析の最も普通の手段であるが、生体に薬物を投与し、その作用機構を解析するためには、さらに投与薬物の細胞、さらには細胞内小器官であるミトコンドリア、ミクロゾームなどに対する親和性、その諸機能に対する作用について解析する必要がある。

この点を考慮し、*in vitro*, *in vivo* におけるラット肝細胞ミトコンドリアおよびミクロゾームの代謝活性を中心に、*Scutellaria*, *Bupleurum* の作用、とくに、電子スピン共鳴吸収法の導入によるその作用機作解析法の確立を試みた。

黄芩、柴胡共に、ある一定量以上では正常ラット肝ミトコンドリアに作用し、その呼吸機能を障害し、いわゆる uncoupling 状態に導く。この状態で、ミトコンドリアの free radical は減少するが、DNP などによる uncoupling 状態に比し、減少度は少ない³⁷⁾。また2000~4000gaussの掃引では、種々の新しい ESR 吸収波が観測される。この波形は *in vivo* においてもみとめられるが、ミトコンドリアの電子伝達系や酸化的磷酸化系とは直接の関与はみとめられない。この signal についての解析は、量子化学的にも電子スピン共鳴吸収の解析でもなお明らかではない。しかし、他の多くのミトコンドリアによる実験から、おそらくミトコンドリア膜における変化と考えられる。何れにしても、黄芩、柴胡はミトコンドリアに親和性があり、特異的に interaction するものであろう。

多くの細胞内代謝活性に関与するミクロゾーム分画に対する作用についてみると、*Scutellaria*, *Bupleurum* は共にその ATPase を活性化するが、とくに *Bupleurum* は粗面ミクロゾームの ATPase を特異的に活性化する。このような結果は *Scutellaria* および *Bupleurum* はミクロゾーム膜の能動透過に関与していることを示している。

正常ラット肝ミクロゾーム（粗面および滑面）についての ESR 吸収測定では、free radical の吸収波形

は極めて小さく、正常ではかりに存在してもかなり少量 (10^{12} spin concentration/mg. protein of microsome 以下) であろうと推定される。

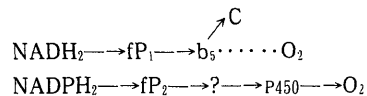
このミクロゾーム分画に黄芩を作用させると、 $g = 2.0058$, $\Delta H_{msl} 6.8$ gauss の極めて鋭い、free radical に由来する ESR signal が観測される。とくに表 1 で明らかのように滑面ミクロゾームにおける free radical の増加が著明である。柴胡を作用させた場合にも同じように、ミクロゾームの free radical の増加がみとめられるが、黄芩に比してはるかに少ない。また、粗面、滑面に対しても黄芩にみられるような特異性はみとめられない。黄芩、柴胡自体には、free radical による吸収波は観測されておらず、この free radical はミクロゾームとこれら薬物の相互作用によって生じたものである。

この free radical に由来する ESR 吸収波は、 g 値、 ΔH_{msl} 値から明らかにミトコンドリアにおける吸収波とは異質のものであり、その発生機序に相違のあることを示している。

また、ミクロゾームに黄芩、柴胡を添加した場合、磁場2000~4000gaussに出現する新しい ESR 吸収波は、ミクロゾーム蛋白質量や添加する薬物の量によって多彩である。この ESR 吸収波の意味についてはなお不明であるが、ミトコンドリアにおいてみとめられた信号と近似することから、恐らくミクロゾーム膜系が関与しているものと考えられる。何れにしても、添加量によるこれら ESR 吸収波の多彩性は、薬物投与における dosis に関連して検討すべきものであろう。

次にミクロゾームにおける free radical の役割が問題である。

肝ミクロゾームには下に示すように b_5 を含む系と P_{450} を含む系の二つの異なった電子伝達系が存在する。



これら二つの代謝過程についての病態生理学的意義はなお明らかでないが、 P_{450} の系は生体における薬物代謝に関与すると考えられている。

ミクロゾームに電子伝達系の基質である NADH_2 を作用させると、図13にみられるように free radical による信号は明らかに増大し、この電子伝達系は radical 反応を含むことを示している。このような基質存在下で黄芩、柴胡を作用させると、free radical はさらに増大し、図13および表2でみられるように波形の性質が変化する。従って、黄芩、柴胡はこの

電子伝達系の radical 反応に直接関与することが明らかである。

一方、P450を含む系についてみると、図14、図15のように差スペクトルによるマイクロゾームP450はフェノバルビタールによって増加するが、同じ材料によるESR吸収波の測定では、図16にみられるように、free radical の増大はみとめられず、P450の量と free radical の濃度とは直接関係はないと考えられる。しかし、この系に、黄芩を作用させると、free radical の濃度およびその性質の変化がみとめられることから、黄芩の作用部位はP450以外の電子伝達系に作用すると考えられる。

以上の *in vitro* における実験から、黄芩、柴胡は細胞小器官であるミトコンドリアおよびマイクロゾームに親和性があり、とくにマイクロゾームに特異的に作用し、膜能動透過、あるいはその代謝を活性化するものである。

成熟ウイスター系ラットに黄芩 (5.1mg/day)、柴胡 (8.0mg/day) を経口的に連続投与し、1週、2週および4週目に、それぞれについて肝細胞の形態学的変化、ミトコンドリア呼吸能 (電子伝達系、酸化的磷酸化系) およびマイクロゾームにおける代謝活性、ATPase 活性について検討した。

黄芩、柴胡を投与したウイスター系ラット肝臓では、何れの時期についても形態学的な変化はみとめられない。また、ミトコンドリアの呼吸能 (電子伝達系、酸化的磷酸化系) も正常で、投与と各期についても有意の差はなく、*in vitro* における呼吸障害作用はみとめられない。ESR共鳴による吸収波測定では、free radical は全く正常と同様であるが、磁場2000~4000 gauss 掃引では、*in vitro* においてみられたように、新しい信号が出現する (吸収波は *in vitro* と *in vivo* で全く同じではないが)。黄芩、柴胡もミトコンドリアには親和性があるが、その呼吸活性には全く関与せず、また、*in vivo* における投与ではそれを障害することはないと考えてよい。

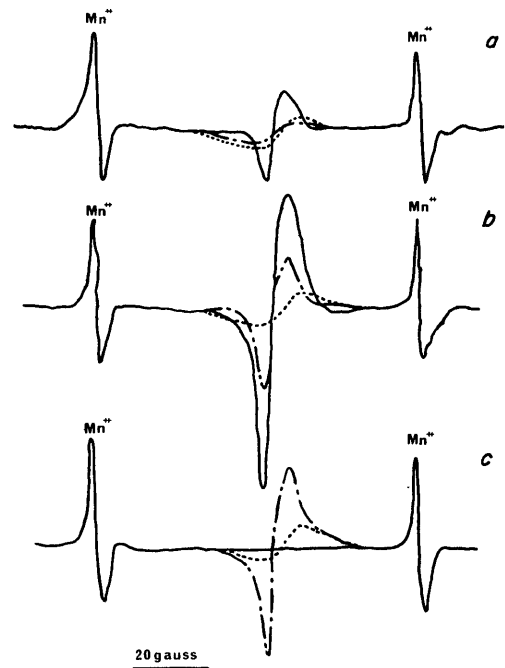
薬物投与例におけるマイクロゾーム分画についてみると、*in vitro* と同様に、粗面マイクロゾームにおける ATPase の活性化が著明であるが、滑面小胞体では非投与例との間に有意の差はみとめられない。

ESR共鳴吸収によるマイクロゾーム代謝活性の測定では、黄芩投与一週間後より、free radical は増加し、4週間目で極大となる。柴胡投与例でもほぼ同様の傾向を示す。従って黄芩、柴胡は *in vivo* においても、*in vitro* と同様にマイクロゾームの代謝を活性化すると考えられる。

しかし、磁場2000~4000 gauss における信号は、投与量によって著しく異なり、また *in vitro* における吸収波とも必ず一致しない。

これらの吸収波に関しては、量子化学的にも電子スピン共鳴吸収の解析からも不明の点が多く、また、細胞生物学的意義についても解析が望まれる。しかし、何れにしても、これらの信号がミトコンドリアでみとめられたと同様に *in vitro* と *in vivo* で明らかに異なること、投与量、投与時期によっても著しい相違を示すことは、投与薬物の親和性、dosis を考える上で重要な指標となることはもちろんであるが、その他の諸機能についても、同様な解析をする必要があることを示唆している。

図22. Scutellaria 及びその抽出物 Baicalin, Bicalein 添加による正常ラット肝マイクロゾーム free radical の変化 (*in vitro* 反応)。



- a) —; Baicalin,
 ; microsome,
 - -; microsome + Bicalin
 b) —; Bicalcin,
 ; microsome,
 - -; microsome + Baicalin
 c) —; Scutellaria,
 ; microsome,
 - -; microsome + Scutellaria

また *Scutellaria* よりの抽出物である Baicalein $C_{15}H_{10}O_5$, Baicalin $C_{12}H_{10}O_{11}$ は、そのもの自体 free radical を有していて、マイクロゾームと radical 反応を行うと考えられる結果が得られているが、これは黄芩自体の作用とは異なるものであろうと考えられる(図22)。この結果は、有効成分の抽出によって薬理作用が変化したことを示すものであり、この点について、なお検討を行なっている。

結 論

東洋医学的に興味のある *Scutellaria baicalensis* Georgi (黄芩), *Bupleurum falcatum* Linn (柴胡) の薬理作用の解析の試みとして、これら薬物のラット肝細胞のミトコンドリア呼吸機能(酸化的磷酸化系, 電子伝達系), ミクロゾームにおける ATPase 活性, 電子伝達系におよぼす影響を中心に, in vitro, in vivo で検討した。

1. 黄芩, 柴胡は共に分画された正常ラット肝ミトコンドリアの呼吸機能に作用し, 大量添加では電子伝達系と酸化的磷酸化系を脱共役した。

2. また, その電子スピン共鳴吸収では, 黄芩作用の場合, Gm 2820, 2970, 3170, 3350 gauss に, 柴胡作用の場合, Gm 2580, 2900, 3190 gauss に, それぞれ新しい吸収波形がみとめられた。また, ミトコンドリアに由来する free radical は減少するが, これは呼吸機能における uncoupling の状態と一致する。

3. 黄芩, 柴胡は, ミクロゾームの粗面, 滑面小胞体に作用し, ATPase 酵素活性を活性化した。

4. 黄芩, 柴胡は, 薬物代謝に関与すると考えられる滑面小胞体に特異的に作用する。正常滑面小胞体には free radical による signal は確証出来ないが, 黄芩, 柴胡の添加によって著明な free radical の出現がみられた。

5. 黄芩を正常ラット肝から分画したマイクロゾームに作用させると, 磁場2910 (2.25) および3270 gauss を中心とした free radical の増大が認められた。

6. DPNHを基質とするマイクロゾーム電子伝達系の反応では, free radical の増加がみられるが, 黄芩, 柴胡は共に, この電子伝達系を活性化した。

7. 薬物代謝に関与する P_{450} についてみると, フェノバルビタール, 黄芩添加で free radical が著明に増大した。

8. 黄芩, 柴胡を1, 2, 4週間投与したウイスター系ラット肝臓では, 光顕的に異常所見は全くみと

められなかった。

9. また, ミトコンドリア分画についての呼吸機能, 電子スピン共鳴吸収による信号に異常はみとめられなかった。

10. ミクロゾーム分画では, 粗面小胞体の ATPase 活性を活性化した。

11. また, 電子スピン共鳴吸収についてみると, in vitro における実験と同様の signal が観測され, 黄芩, 柴胡のマイクロゾーム親和性が確認された。

12. $g=2.0046$ を中心とした free radical が著明に増大するが, とくに黄芩による増加が著しく, 電子伝達系活性化が推定された。

謝 辞

稿を終るに当り, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授に深く感謝いたします。また多大なる御教示, 御指導をいただきました小田島肅夫助教授に厚く謝意を表します。さらに有益なる御助言並びに御協力をいただきました福田鎮雄助手, 北川恵子さん, 貴重なる生薬を提供していただきました武田製薬京都農園の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 細野史郎・三宅悦子: 日東洋医学会誌, 21, 1(1970).
- 2) 熊崎平蔵: 岐阜医大紀, 6, 94 (1958).
- 3) 熊崎平蔵: 岐阜医大紀, 6, 153 (1958).
- 4) 熊崎平蔵: 岐阜医大紀, 6, 164 (1958).
- 5) 熊崎平蔵: 岐阜医大紀, 6, 352 (1958).
- 6) 熊崎平蔵: 岐阜医大紀, 6, 372 (1958).
- 7) 青沼 繁・三村 務・樽谷正朗: 薬学誌, 77, 1 303 (1957).
- 8) 久保木憲人・斉藤和子: 薬局, 13, 1011(1962).
- 9) 久保木憲人・永田 稔: 薬局, 14, 968 (1963).
- 10) 江田昭英・坂井公子: 日薬理誌, 62, 50(1966).
- 11) 江田昭英・永井博式・和田 浩: 日薬理誌, 66, 194 (1970).
- 12) 江田昭英・永井博式・和田 浩: 日薬理誌, 66, 237 (1970).
- 13) 江田昭英・永井博式・和田 浩: 日薬理誌, 66, 471 (1970).
- 14) 高木敬次郎・柴田 丸: 薬学誌, 89, 712(1969).
- 15) 高木敬次郎・柴田 丸: 薬学誌, 89, 1367 (1969).
- 16) 柴田 丸: 薬学誌, 90, 398 (1970).
- 17) 近藤東一郎: 日薬物誌, 7, 296 (1928).
- 18) 細野史郎・坂口 弘・内炭精一: 日東洋医学会誌, 9, 171 (1959).

- 19) 小国正夫 : 四国医誌, **14**, 4 (1959).
- 20) 小島喜久男・肥後 勇・木下利夫・小川幸男 : 日東洋医学会誌, **6**, 5 (1956).
- 21) 柴田桂太 : Acta Phytochim., **1**, 105 (1923).
- 22) 服部静夫 : 日化学誌, **50**, 725 (1929).
- 23) 服部静夫 : 日化学誌, **51**, 472 (1930).
- 24) 柴田承二・北川 勲・高橋ルミ子・藤本治宏 : 薬学誌, **86**, 1132 (1966).
- 25) Shibata, S., Kitagawa, I. & Fujimoto, H. : Chem. Pharm. Bull., **14**, 1023 (1966).
- 26) Shibata, S., Kitagawa, I. & Fujimoto, H. : Chem. Pharm. Bull., **16**, 641 (1968).
- 27) Aimi, N. & Shibata, S. : Tetrahedron Letters, 4721 (1966).
- 28) Kubota, T., Tonami, F. & Hinoh, H. : Tetrahedron Letters, 701 (1966).
- 29) Kubota, T. & Hinoh, H. : Tetrahedron Letters, 4725 (1966).
- 30) Kubota, T. & Hinoh, H. : Tetrahedron Letters, 5045 (1966).
- 31) Packer, L., Utsumi, K. & Mustafa, M. G. : Arch. Biochem. Biophys., **117**, 381 (1966).
- 32) Lowry, O. H., Rosenbough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 33) Dallner, G. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., suppl. 166 (1963).
- 34) Bonting, S. L. : Arch. Biochem. Biophys., **95**, 416 (1961).
- 35) Chance, B. & Williams, G. R. : J. Biol. Chem., **217**, 383 (1955).
- 36) Hagihara, B. : Biochem. Biophys. Acta, **46**, 134 (1961).
- 37) 小田島肅夫・阿部博子・米沢恵子・宮本悦子・石川大刀雄 : Symposia Cell Biol., **22**, 217 (1971).
- 38) Odashima, S., Abe, H. & Ishikawa, T. : in preparation.

Abstract

From the olden time, *Scutellaria bicalensis* and *Bupleurum falcatum* have been used in the Chinese medical science as an important medicine. However, their pharmacological action mechanisms have not been clearly explained yet. As an attempt at the analysis of their medicinal actions, their effects on the respiratory functions of mitochondria (oxidative phosphorylation and electron transfer systems) and on the microsomal electron transfer system and ATPase activities were discussed in this paper.

1. Water extracts of radix *Scutellaria* and of radix *Bupleurum*, both interacted with respiratory function of isolated rat-liver mitochondria. The electron transfer system and oxidative phosphorylation system were uncoupled by a mass addition of them. Under these conditions, the free radical of mitochondria was decreased, however the degree of decrease was less in a comparison with an uncoupling state by DNP. Moreover, several new absorption waves of ESR were observed between 2000 and 4000 gauss. From our many other results, it was suggested that these new waves corresponded to the change of mitochondrial membrane.

2. Both *Scutellaria* and *Bupleurum* interacted with rough and smooth surfaced microsome, and activated their ATPase activities. No free radical was observed in normal rat-liver microsome, however a distinct free radical appeared by the addition of *Scutellaria* or *Bupleurum*. The microsomal electron transfer system which utilized NADH as the substrate was activated by the addition of *Scutellaria* or *Bupleurum*, furthermore the free radical was also increased. In the P_{450} system, the free radical was clearly increased by the addition of *Scutellaria*.

3. After *Scutellaria* or *Bupleurum* was administered orally to a rat, the effects on the respiratory functions of liver mitochondria were not observed during 4 weeks. On the microsomal fraction, ATPase activity of rough surfaced microsome was activated by these treatments. Moreover, in the ESR absorption waves of microsome, new signals like *in vitro* experiments were observed by a long-term administration of *Scutellaria* or *Bupleurum*. The free radical of microsome was also increased greatly by *Scutellaria*. Therefore, these results indicated that *Scutellaria* and *Bupleurum* had affinity to microsome and activated the electron transfer system.

As reported in this paper, the action mechanism of Chinese medicines was analyzed by a biophysical method *i.e.* Electron Spin Resonance.
