

[原著] サイコサポニンの作用に関する研究

林 良 明\* \*\*

(昭和51年7月16日受付)

要 旨

saikosaponin は久保田らにより *Bupleurum falcatum* L. から抽出、構造決定された数種の saponin 成分である。今回 saikosaponin の抗炎症作用、蛋白、糖質、脂質代謝作用につき Sprague-Dawley 系ラットで検討を加えた。その結果、抗炎症作用では cotton pellet 法で著明な抗肉芽作用を示し、granuloma pouch 法では軽度の抗滲出作用を示した。蛋白代謝では [<sup>14</sup>C] ロイシンからの蛋白生合成の亢進を、糖質代謝ではグルコース腹腔内投与後の肝グリコーゲンの増量を示した。脂質代謝では高コレステロール食摂取後の血清コレステロール、中性脂肪、リン脂質値の上昇阻止を示し、さらに腹腔内注射した [4-<sup>14</sup>C] コレステロールの血中消失速度の促進と糞便中への排泄増加を示した。また、肝では [<sup>14</sup>C] 酢酸からの総脂質、コレステロール生合成の亢進も認められた。なお saikosaponin 投与により副腎重量の減少や溶血作用は認められなかった。以上の検討に用いた saikosaponin のうち活性を示したものは saikosaponin a および d であり、その活性部分は aglycon であることを明らかにした。

Keywords: サイコサポニン, ミシマサイコ, 抗炎症作用, 蛋白代謝, 糖質代謝, 脂質代謝

略語一覧: T.C.A.: trichloroacetic acid

ミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* L.) の根は古来より和漢薬として胸脇苦満、往来寒熱、腹中痛、黄疸などに繁用されている<sup>1)</sup>。柴田<sup>2)</sup>らは、このミシマサイコの根から粗サポニンを抽出し、高木<sup>3, 4)</sup>らは、その薬理作用として鎮痛、鎮静、解熱、ストレス潰瘍の抑制、肉芽腫と浸出液の抑制などがあることをラットの実験から明らかにした。またサイコサポニンの化学構造が久保田<sup>5)</sup>らにより決定された。ミシマサイコの根には saikosaponin a, c, d がそれぞれ、3:2:2の割合で含まれており、その基本構造は五環性トリテルペンと2ないし3個の糖であることが明らかにされた。この saikosaponin a, d は酸性試薬に不安定でそれぞれ saikosaponin b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> となり、saikosaponin a, c, d, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> の

aglycon は、おのおの saikogenin F, E, G, A, D と命名された<sup>6)</sup>。(Fig. 1)

今回の実験では、これら saikosaponin およびそれらの sapogenin を用いて抗炎症作用<sup>7, 8)</sup> および蛋白、糖質、脂質代謝<sup>9)</sup>作用ならびに saikosaponin の排泄様式につきラットを用いて検討した。さらに saikosaponin の化学構造の中で生物活性にあずかる残基がどれかを決定し、これらの作用発現と化学構造との関係<sup>8)</sup>につき考察を試みた。

実験方法

すべての実験で体重 180 g~200 g の Sprague-Dawley 系雌ラットを用いた。

\* 千葉大学医学部第2内科教室 (主任: 熊谷 朗教授)

\*\* 国保松戸市立病院内科

YOSHIAKI HAYASHI: Studies on the Actions of Saikosaponin.

The 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, July 16, 1976.

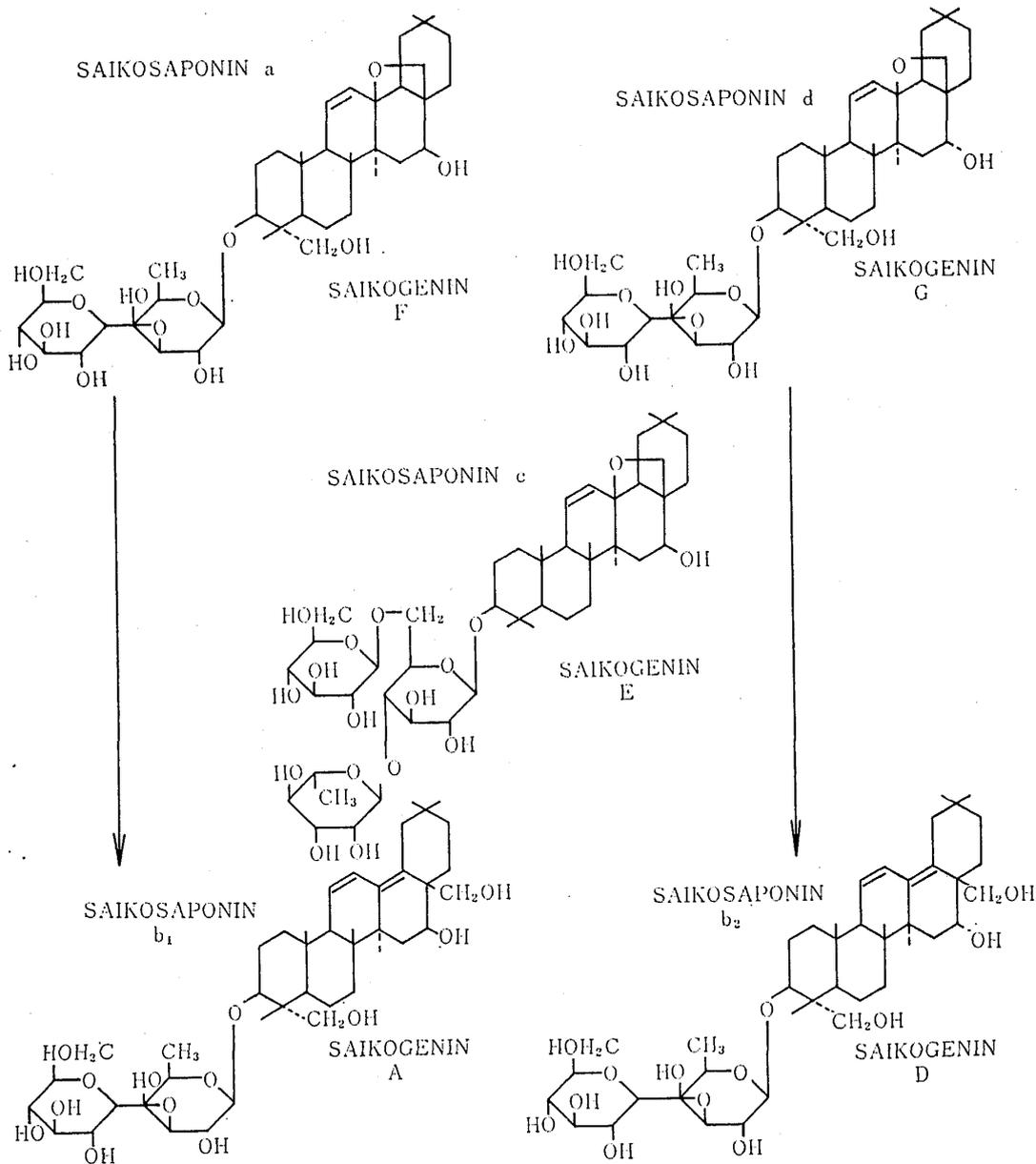


Fig. 1. Chemical structures of saikosaponins and saikogenins.

### 1. 抗炎症作用の測定

a. granuloma pouch 法: ラットをエーテル麻酔し、背中正中線の皮下に 20 cc の窒素ガスを注射し皮下嚢腫を形成し、さらに 5% クロトン油を 1 ml 注入した<sup>10)</sup>。その後、ラット体重 100 g 当たり、saikosaponin mixture (a, c, d=3:2:2) 0.1 mg, 1 mg, 3 mg を 7 日間筋注した。一部の実験においては体重 100 g 当たり saikosaponin mixture 10 mg を polyethylene tube で胃内へ 7 日間経口投与した。さらに作用の比較のために prednisolone 0.3 mg を 7 日間筋注した。対照には生理的食塩水を筋注し、全例に感染予防としてセファロリジン 10 mg を 7 日間筋注した。最後の saikosaponin

投与後、15 時間してラットをと殺し、皮膚切開し皮下嚢腫内の滲出液量と両側の副腎重量を測定した。統計的意義は Student t test により検討した。P-value が 0.05 以上をもって有意差なしとした。

b. cotton pellet 法: ラットをエーテル麻酔し、両側背部の皮下にそれぞれ  $50 \pm 1$  mg の綿球を 2 個入れ皮膚を縫い合わせた<sup>11)</sup>。その後、ラット体重 100 g 当たり saikosaponin mixture 1 mg 筋注、5 mg を経口で 8 日間あるいは saikosaponin a 0.3 mg, saikosaponin c 0.2 mg, saikosaponin d 0.2 mg を 5 日間筋注した。一部の実験では体重 100 g 当たり saikosaponin a 1 mg, b<sub>1</sub> 1 mg, b<sub>2</sub> 1 mg, d 1 mg とそのほぼ等モルに当たる saikogenin F 0.6 mg, A 0.6 mg, D 0.6 mg を 7 日間

筋注した。さらに dose-response の実験で体重 100 g 当たり saikosaponin a & d (66:34) 0.1 mg, 0.3 mg, 1 mg, 3 mg を 7 日間筋注した。対照は生食, 感染予防にはセフェロリジン 10 mg を連日筋注した。体重を実験前後で測定した。最後の saikosaponin 注射後 15 時間してラットをと殺して採血し, 綿球を中心にして形成された肉芽組織をとり出し, 50°C, 12 時間乾燥後, 総肉芽重量をはかり, はじめの綿球重量を減じた値を肉芽重量とした<sup>11)</sup>。両側の副腎重量とヘマトクリット値を測定した。

## 2. 代謝作用の測定

a. [U-<sup>14</sup>C]-leucine からの肝蛋白合成: ラット体重 100 g 当たり saikosaponin 0.2 mg あるいは 2 mg を 4 日間筋注し, 対照は生食を用いた。最後の注射後 6 時間してラットをと殺し肝をとり出し生食で灌流し 100 mg の肝スライスを作成し, 0.125  $\mu$ Ci の [U-<sup>14</sup>C]-leucine (比活性 198 mCi/mmole), 0.8  $\mu$ mole の Cold leucine と 20  $\mu$ moles の glucose を含む 2 ml の  $\frac{M}{10}$  Krebs-Ringer-phosphate buffer (pH 7.4) 中で incubation した。incubation は Dubnoff metabolic shaking incubator を用いて 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> のガス相で, 37°C, 1 時間行なった。incubation 後, 2 ml の 20% T.C.A. solution を incubation mixture に入れ, その沈澱物を 10% T.C.A. で 5 度洗滌し, さらに acetone, acetone-ether, ether で洗滌し<sup>12)</sup>, その沈澱物を 2 ml の 0.5 N KOH で処理した。その 0.1 ml を methanol 0.3 ml と scintillator-solvent<sup>23)</sup> 10 ml に混ぜ, 液体シンチレーションカウンターで radioactivity を測定した。クエンチングは external standard method で補正した。蛋白合成は 1 時間当たり, mg 蛋白当たりとりこまれた [<sup>14</sup>C] leucine を dpm として表現した。肝蛋白量は Lowry 法<sup>14)</sup>により牛血清アルブミンを標準として測定した。

b. 肝グリコーゲン量: ラット体重 100 g 当たり saikosaponin 0.2 mg あるいは 2 mg を 4 日間筋注した。4 日目の saikosaponin 筋注前 18 時間は絶食にし, 最後の saikosaponin 筋注と同時に腹腔内に 300 mg の glucose を注射し, その 4 時間後にラットをと殺した。肝をとり出し生食で灌流後さらに 5 度生食で洗滌した。肝のグリコーゲン量は Abder-Akker と Smith および Dreywood 法によった<sup>15, 16)</sup>。

c. ラット肝における [U-<sup>14</sup>C] glucose の利用:

[<sup>14</sup>C] CO<sub>2</sub> への酸化と脂質合成: ラット体重 100 g 当たり saikosaponin 0.1 mg あるいは 1 mg を 7 日間筋

注したあとラットをと殺した。100 mg の肝スライスを作成し Warburg フラスコを用いて 1  $\mu$ Ci の [U-<sup>14</sup>C]-D-glucose (比活性 4.8 mCi/mmole) と 20  $\mu$ mole の cold glucose を含む 2 ml の  $\frac{M}{10}$  Krebo-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) 中で incubation した。副室に 0.4 ml の 8 M KOH をあらかじめ入れ, フラスコ内を O<sub>2</sub> で充満し Dubnoff shaking incubator で 37°C, 2 時間 incubation した。incubation の最後に 0.2 ml の 1 N HCl をフラスコの側室から incubation mixture に注入した。副室内の KOH 溶液の一部から [<sup>14</sup>C] CO<sub>2</sub> の radioactivity を測定した。また脂質合成をみるため Potter glass homogenizer に 10 ml の chloroform-methanol (2:1) を入れ incubation mixture を homogenize し, 濾過の後,  $\frac{1}{5}$  量の水と 3 ml の methanol-water-chloroform (47:46:3) で 2 度ずつ洗滌した。抽出物を蒸発乾固し再び chloroform-methanol (1:1) で溶かし, total lipid radioactivity を測定した。また cholesterol の定量には, incubation mixture を 5% alcohol 性 KOH 溶液で 65°C, 2 時間鹼化し, その不鹼物を常法に従い n-hexane 抽出, digitonin 処置で cholesterol digitonide を沈澱させ, これを methanol に溶かして radioactivity を測定した<sup>17, 18)</sup>。

d. 血清脂質: ラットを 20% cholesterol と 1% cholic acid を含んだ高コレステロール食で 9 日間飼育した。高コレステロール食にしたあと 4 日目から体重 100 g 当たり saikosaponin mixture 1 mg, あるいは, それぞれ 0.3 mg の saikosaponin a, c, d, saikogenin F, E, G を 6 日間筋注した。最後の注射後 6 時間でラットをと殺し採血した。cholesterol, triglycerides, phospholipids の定量はそれぞれ, Leffler<sup>19)</sup>, Fletcher<sup>20)</sup>, Haeflmyer<sup>21)</sup> の法により行なった。

e. [<sup>14</sup>C] cholesterol の血中消失と [<sup>14</sup>C] bile acid および [<sup>14</sup>C] sterol の糞便中排泄: ラット体重 100 g 当たり saikosaponin mixture 0.6 mg, saikosaponin a, c, d あるいは saikogenin F, E, G を 0.2 mg ずつ 7 日間筋注した。5 日目の注射後 6 時間で体重 100 g 当たり 0.5  $\mu$ Ci の [4-<sup>14</sup>C] cholesterol (比活性 33.5 mCi/mmole) を腹腔内注射し 48 時間後にラットをと殺し採血した。

血清 0.5 ml に含まれる cholesterol を肝 cholesterol と同様に抽出し, その radioactivity を測定した。

また同様に saikosaponin 1 mg を 7 日間筋注し, その 5 日目に [4-<sup>14</sup>C] cholesterol を腹腔内注射し, その後 48 時間で集めた糞便を同量の水で homogenize し, 10 倍量の hot ethanol で炊き, total-<sup>14</sup>C を測定し

た。この ethanol extraction を  $\frac{1}{5}$  量の 10 N KOH で 120°C, 1 時間鹼化したあとその不 鹼化物を n-hexane で抽出し, 3  $\beta$ -OH-sterol を digitonine 沈澱させた<sup>22)</sup>。不 鹼化物抽出後, 水層を濃 塩酸で pH 1 とし, 胆汁酸を 4 回 ethyl-ether で抽出し, 5 回の水洗後測定した。注射した [4-<sup>14</sup>C] cholesterol の糞便中排泄率は,

$$\frac{\text{Feces 中の各分割の radioactivity}}{\text{注射した [4-}^{14}\text{C] cholesterol の radioactivity}} \times 100 (\%) \text{ と}$$

してあらわした。

f. [<sup>14</sup>C] 酢酸からの肝脂質とコレステロール合成:

ラット体重 100 g 当たり saikosaponin 1 mg を 7 日間筋注後, ラットをと殺した。100 mg の肝スライスを作り 2 ml の  $\frac{M}{10}$  Krebs-Ringer-phosphate buffer (pH 7.4) と 5  $\mu$ Ci の [1-<sup>14</sup>C] sodium acetate (比活性 45.4 mCi/mmole), 5  $\mu$ mole の cold sodium acetate および 20  $\mu$ mole の glucose で incubation した。incubation は 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, 37°C で 2 時間行なった。総脂質, コレステロール測定は前述の方法で行なった。

### 3. サイコサポニンの排泄経路

specific activity 0.045  $\mu$ Ci/10 mg の [<sup>14</sup>C] saikosaponin a & d (66:34) をラット臀部に筋注後, 7 日間にわたり糞便と尿を metabolic cage で 1 日づつ集め,

糞便は 10 倍量の ethanol を入れ 60°C, 10 時間加温後, 尿はその一部分から radioactivity を測定し, 糞便と尿へのサイコサポニンの経時的排泄を観察した。

## 実 験 成 績

### 1. 抗炎症作用

#### a. 抗滲出作用 (granuloma pouch 法)

saikosaponin 0.1 mg では対照の 8.0  $\pm$  1.3 ml と有意差はなかったが, saikosaponin 1 mg と 3 mg の筋注では, それぞれ 3.7  $\pm$  1.2 ml と 2.4  $\pm$  1.0 ml と嚢腫内の滲出液は減少した。10 mg の経口投与は 1 mg 筋注とほぼ同じ効果を示した。predonisolone 0.3 mg 筋注では滲出液は認められなかったが, 副腎重量の減少は著明であった。saikosaponin 投与による副腎重量の減少は認められなかった (Table 1)。

#### b. 抗肉芽作用 (cotton pellet 法)

saikosaponin 1 mg の 8 日間筋注では predonisolone 0.25 mg の 8 日間筋注とほぼ同じ効果があり, 強力なる抗肉芽作用を示した。5 mg の経口投与でも軽度の抗肉芽作用が認められた。なお predonisolone 投与による副腎重量の減少は著明であったが saikosaponin 投与による副腎重量の減少, ヘマトクリット値や体重の変化は認められなかった (Table 2, a)。また saikosaponin

Table 1. Anti-inflammatory effect of saikosaponins in comparison with predonisolone by granuloma pouch method in female rats.

Group	Number of rats	volume of exudate	adrenal weight
Control	8	8.0 $\pm$ 1.3* 100%	73 $\pm$ 6*
Saikosaponins			
intramuscular injection 0.1 mg/100 g b.w. <sup>+</sup> /day $\times$ 7 days	5	6.7 $\pm$ 1.3** 84%	59 $\pm$ 5**
1 mg/100 g b.w./day $\times$ 7 days	5	3.7 $\pm$ 1.2*** 46%	62 $\pm$ 5**
3 mg/100 g b.w./day $\times$ 7 days	5	2.4 $\pm$ 1.0**** 30%	68 $\pm$ 6**
Saikosaponins			
oral administration 10 mg/100 g b.w./day $\times$ 7 days	5	3.3 $\pm$ 0.7*** 40%	75 $\pm$ 5**
Predonisolone			
intramuscular injection 0.3 mg/100 g b.w./day $\times$ 7 days	5	0 $\pm$ 0***** 0%	36 $\pm$ 3*****

+ body weight of rat. \* Mean  $\pm$  standard error. \*\* Non-significant.

\*\*\* P < 0.05. \*\*\*\* P < 0.01. \*\*\*\*\* P < 0.001.

Table 2. Anti-inflammatory effect of saikosaponins by cotton pellet method in female rats.

Group	Number of rats	Body weight initial→terminal	Dry weight of granuloma mg (No++)	Adrenal weight	Ht (%)
a) Saikosaponin mixture (a:c:d=3:2:2) and Predonisolone					
Control	7	196→201±5* +5	150.3±7.0(12)*	52±1*	51±2*
Saikosaponins i.m. <sup>+++</sup> 1 mg/100 b.w./day×8 days	5	195→189±6** -6	62.0±3.1(9)****	52±3**	47±2**
Saikosaponins oral administration 5 mg/100 g b.w./day×8 days	5	197→195±5** -2	114.7±8.3(9)****	50±2**	50±1**
Predonisolone i.m. 0.25 mg/100 g b.w./day×8 days	5	200→172±4**** -28	54.7±3.8(8)****	31±1****	50±2**
b) Saikosaponin a, c, and d					
Control	5	182→188±4* +6	83±6(9)*	62±2*	
Saikosaponin a i.m. 0.3 mg/100 g b.w./day×5 days	5	192→196±5** +6	51±3(10)****	61±2**	
Saikosaponin c i.m. 0.2 mg/100 g b.w./day×5 days	5	180→192±5** +12	75±5(10)**	58±2**	
Saikosaponin d i.m. 0.2 mg/100 g b.w./day×5 days	5	184→200±6** +16	45±3(7)****	67±3**	
c) Saikosaponin and thier Sapogenins					
Control	5	138→175±9.6* +37	72±4.6(10)*		
i) Saikosaponin a i.m.					
1 mg/100 g b.w./day×7 days	5	146→173±2.0** +27	52±5.9(10)***		
Saikosaponin b <sub>1</sub> i.m. 1 mg/100 g b.w./day×7 days	5	143→172±5.9** +29	64±5.9(10)**		
Saikosaponin b <sub>2</sub> i.m. 1 mg/100 g b.w./day×7 days	5	144→172±2.1** +28	71±5.3(10)**		
Saikosaponin d i.m. 1 mg/100 g b.w./day×7 days	4	148→168±4.9** +20	45±2.9(8)****		
ii) Saikogenin F i.m.					
0.6 mg/100 g b.w./day×7 days	5	133→157±5.2** +24	42±2.8(10)****		
Saikogenin A i.m. 0.6 mg/100 g b.w./day×7 days	5	132→169±4.4** +37	59±2.9(10)***		
Saikogenin D i.m. 0.6 mg/100 g b.w./day×7 days	5	127→157±4.1** +30	69±6.0(10)**		

++ Number of cotton pellets. +++ Intramuscular injection. \* Mean±standard error.

\*\* Non-significant. \*\*\* P&lt;0.05. \*\*\*\* P&lt;0.01. \*\*\*\*\* P&lt;0.001.

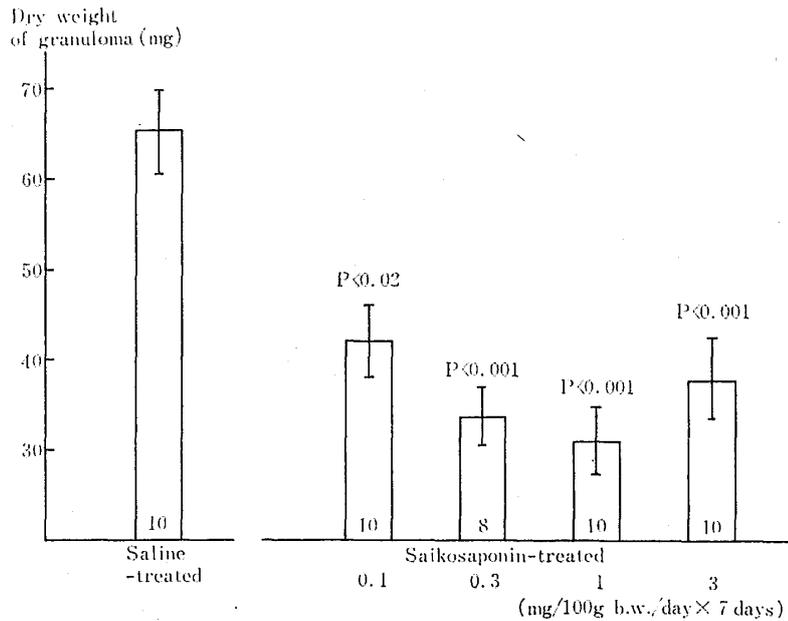


Fig. 2. Effect of saikosaponins a & d (66:34) administration on cotton pellet granuloma.

Experimental values were expressed as Mean±standard error. Figures in the column indicate number of cotton pellets used. Saline and saikosaponins were intramuscularly injected.

a 0.3 mg, c 0.2 mg, d 0.2 mg の 5 日間筋注では saikosaponin a, d がそれぞれ対照の 61%, 54% と減少したが, saikosaponin c では減少は認められなかった (Table 2, b)。さらに saikosaponin a, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, d の各 1 mg, saikogenin F, A, D の各 0.6 mg の 7 日間筋注では saikosaponin a, d がそれぞれ 52 mg, 45 mg と対照の 72 mg に比し減少し, saikogenin F, A もそれぞれ 42 mg, 59 mg と減少を示し, saikosaponin b<sub>1</sub> もわずかに減少傾向を示したが, saikosaponin b<sub>2</sub>, saikogenin D では減少が認められなかった (Table 2, c)。つぎに saikosaponin a & d (66:34) の投与量と抗肉芽作用の関係をみると dose-response の curve を描き, 対照の 66 mg に比し, saikosaponin 0.1 mg, 0.3 mg と増量すると, それぞれ 44 mg, 37 mg と肉芽形成が抑えられ, saikosaponin 1 mg で 32.9 mg と最も強い抗肉芽作用を示した。さらに投与量を 3 mg に増量してもその作用は増強しなかった (Fig. 2)。

## 2. 代謝作用

### a. [<sup>14</sup>C] leucine からの肝蛋白合成

saikosaponin 0.2 mg では対照と有意差がなかったが, saikosaponin 2 mg の 4 日間筋注では対照の約 1.4 倍の肝蛋白合成の亢進が認められた (Table 3)。

### b. 肝グリコーゲン量

saikosaponin 0.2 mg の 4 日間筋注で対照の 2 倍以

Table 3. Effect of saikosaponins on protein synthesis from [U-<sup>14</sup>C] leucine by rat liver.

Group	Number of rats	Protein synthesis from leucine (dpm/mg protein/hour)
Control	6	14998.4±1444.8*
Saikosaponins		
intramuscular injection		
0.2 mg/100 g b.w./day × 4 days	6	14069.6±1823.2**
2 mg/100 g b.w./day × 4 days	6	20812.0±1788.8***

One hundred mg of liver slices was incubated in 2 ml of  $\frac{M}{10}$  Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.125 uCi of [U-<sup>14</sup>C] leucine (specific activity 198 mci/mole), 0.8 μ moles of cold leucine and 20 μ moles of glucose.

\*\*Non-significant. \*\*\*P<0.05.

上, 2 mg 筋注で 4 倍以上の肝グリコーゲン量の増加を認めた (Table 4)。

### c. ラット肝における [U-<sup>14</sup>C] glucose の利用:

#### [<sup>14</sup>C] CO<sub>2</sub> への酸化と脂質合成

saikosaponin 投与による CO<sub>2</sub> 生成に変化はなかったが, 総脂質, コレステロール合成ともに saikosaponin 1 mg の 7 日間筋注で対照に比し約 2 倍近くの増加を認めた。しかし saikosaponin 0.1 mg 筋注では増加を認

Table 4. Effect of saikosaponins on glycogen content of rat liver.

Group	Number of rats.	Liver glycogen (mg/g wet liver)
Saikosaponins	6	0.90±0.12*
intramuscular injection 0.2 mg/100 g b.w./day ×4 days	7	1.95±0.34**
2 mg/100 g b.w./day ×4 days	7	3.95±0.52***

Rats, which had been fasted for 18 hours, were intraperitoneally injected with 300 mg glucose.

\*Mean±standard error \*\*P<0.05 \*\*\*P<0.01

めなかった (Table 5)。

#### d. 血清脂質

Table 6 に示すように 血清コレステロールは対照の 160±6 mg/dl に比し saikosaponin mixture 1 mg では, 133±6 mg/dl と上昇を阻止し, またそれぞれ 0.3 mg 筋注の saikosaponin a が 141±2 mg/dl, saikosaponin d が 131±7 mg/dl, saikogenin F が 130±7 mg/dl, saikogenin G が 137±5 mg/dl と上昇の阻止を認めたが, saikosaponin c, saikogenin E では無効であった。

e. [<sup>14</sup>C] cholesterol の血中消失と [<sup>14</sup>C] bile acid および [<sup>14</sup>C] sterol の糞便中排泄

Table 5. Effect of saikosaponins on utilization of [U-<sup>14</sup>C] glucose in vitro in rat liver.

Group (Number of rats)	[U- <sup>14</sup> C] glucose converted to		
	[ <sup>14</sup> C] CO <sub>2</sub>	Total lipids (dpm/mg protein/hour)	Cholesterol
Control (6)	89.1±5.5*	16.5±2.2*	1.9±0.2*
Saikosaponins			
intramuscular injection 0.1 mg/100 g b.w./day×7 days (6)		22.0±3.3**	2.6±0.2**
1 mg/100 g b.w./day×7 days (6)	86.9±3.3**	30.8±5.5***	3.6±0.4***

One hundred mg of liver slices was incubated in 2 ml of  $\frac{M}{10}$  Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) containing 1  $\mu$ Ci of [U-<sup>14</sup>C] glucose (specific activity 4.8 mCi/mmol) and 20  $\mu$  moles of cold glucose in Warburg flasks.

\* Mean±standard error. \*\* Non-significant. \*\*\* P<0.05.

Table 6. Effect of saikosaponins and their sapogenins on plasma lipid levels of rats fed a high cholesterol diet.

	Number of rats	Cholesterol mg/dl	Triglycerides mg/dl	Phospholipids mg/dl
Control	5	160±6*	85±5*	142±5*
Saikosaponin a 1 mg/100 g/d. 6 d.	5	133±6****	65±5***	122±4***
Saikosaponins 0.3 mg/100 g/d. 6 d.	5	141±2***	55±4****	123±4***
Saikosaponin c //	5	152±5**	76±8**	132±5**
Saikosaponin d //	5	131±7***	56±4****	123±4***
Saikogenin F //	5	130±7***	42±5****	108±9***
Saikogenin E //	5	165±9**	82±4**	144±5**
Saikogenin G //	5	137±5***	58±4****	122±4***

\* Mean±standard error \*\* Non-significant \*\*\* P<0.05 \*\*\*\* P<0.01  
\*\*\*\*\* P<0.001

Fig. 3 に示すように saikosaponin mixture 0.6 mg, saikosaponin a 0.2 mg, saikosaponin d 0.2 mg の筋注でいずれも血中 [ $^{14}\text{C}$ ] cholesterol の radioactivity の低下作用が認められるが, saikosaponin 0.2 mg では無効であった。また saikogenin F 0.2 mg, saikogenin G 0.2 mg でも低下作用が認められたが, saikogenin E は無効であった。すなわち saikosaponin a, d, saiko-

genin F, G はいずれも血中コレステロール消失促進作用を有していた。[ $^{14}\text{C}$ ] cholesterol 注射後 48 時間で集められた糞便中への排泄をみると saikosaponin 1 mg 筋注群では対照に比し, total  $^{14}\text{C}$ , bile acids, Non-saponifiable materials,  $3\beta\text{-OH sterols}$  のいずれも 1.5 倍, 1.6 倍, 1.7 倍, 1.8 倍の増加が認められた (Table 7)。

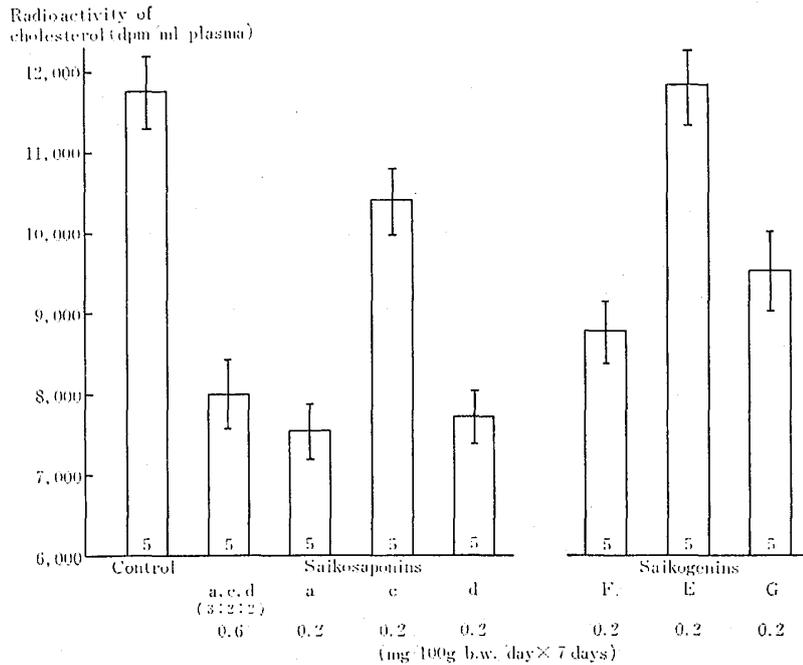


Fig. 3. Effect of saikosaponins and their sapogenins on elimination of intraperitoneally injected [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] cholesterol from plasma.

Blood was taken 48 hours after intraperitoneal injection of  $0.5\ \mu\text{Ci}$  of [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] cholesterol (specific activity  $33.5\ \text{mCi/m mole}$ .) Figures in the column indicate number of rats used. Experimental values were expressed as Mean  $\pm$  standard error.

Table 7. Effect of saikosaponins on fecal excretion of intraperitoneally administered [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] cholesterol.

Group	Number of rats	Excretory rate of injected [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] cholesterol into feces for 48 hrs as: (%)			
		Total $^{14}\text{C}$	Bile acids	Non-Sapon.	$3\beta\text{-OH-sterols}$
Control	5	$21.6 \pm 2.1^*$	$10.4 \pm 1.3^*$	$6.8 \pm 0.6^*$	$4.9 \pm 0.4^*$
Saikosaponins					
intramuscular injection					
1 mg/100 g b.w./day $\times$ 7 days	5	$32.8 \pm 3.5$ $P < 0.05$	$16.8 \pm 1.1$ $P < 0.05$	$11.1 \pm 0.9$ $P < 0.01$	$8.8 \pm 0.6$ $P < 0.01$
Rate of increase					
by saiko. treatment					
(control: 1)		1.5	1.6	1.7	1.8

Six hours after the 5th injection of saikosaponins,  $0.5\ \mu\text{Ci}$  of [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ] cholesterol (specific activity  $33.5\ \text{mCi/m mole}$ ) was intraperitoneally injected per 100 g body weight of rat.

\* Mean  $\pm$  standard error

Table 8. Effect of saikosaponins on hepatic lipogenesis and cholesterogenesis in vitro from [ $^{14}\text{C}$ ] acetate.

	Number of rats	Synthesis from acetate		Liver cholesterol content (mg/g)
		Total lipids (dpm/mg protein/2 hrs)	cholesterol (dpm/mg protein/2 hrs)	
Control	6	682.0 $\pm$ 44.0*	101.2 $\pm$ 4.4*	2.1 $\pm$ 0.2*
Saikosaponins intramuscular injection 1 mg/100 g b.w./day $\times$ 7 days	6	968.0 $\pm$ 44.0***	154.6 $\pm$ 6.6****	2.3 $\pm$ 0.3**

One hundred mg of liver slices was incubated in 2 ml of  $\frac{M}{10}$  Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) containing 5  $\mu\text{Ci}$  of [ $^{14}\text{C}$ ] sodium acetate (specific activity 45.4 mCi/mmole), 5  $\mu$  moles of cold sodium acetate and 20  $\mu$  moles of glucose.

\* Mean $\pm$ standard error. \*\* Non-significant. \*\*\*  $P < 0.01$ . \*\*\*\*  $P < 0.001$ .

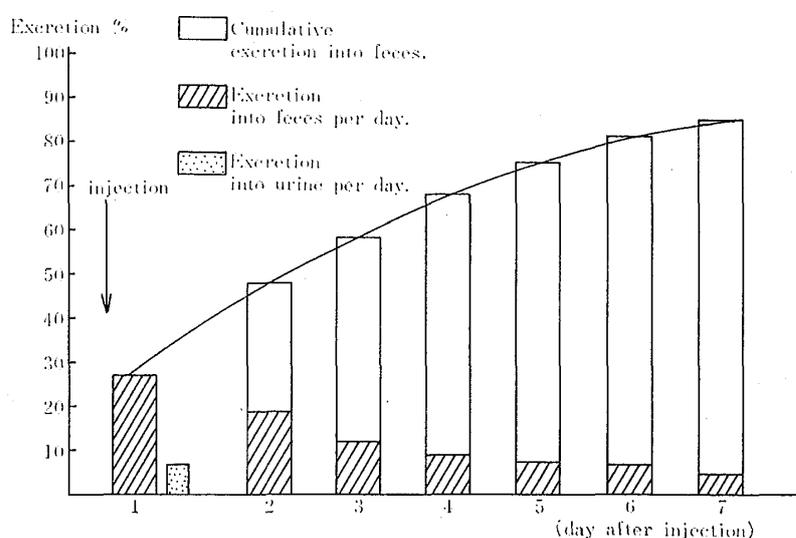


Fig. 4. Cumulative excretion of saikosaponins a and d into feces and urine.

A mixture of saikosaponins a and (66:34) (specific activity 0.45  $\mu\text{Ci}/10$  mg) was injected intramuscularly.

#### f. [ $^{14}\text{C}$ ] 酢酸からの肝脂質とコレステロール合成

全体の肝のコレステロール含量は変化をみないが、 [ $^{14}\text{C}$ ] 酢酸からの総脂質とコレステロール合成は対照に比し約 1.5 倍の亢進を認めた (Table 8)。

#### 3. サイコサポニンの排泄経路

[ $^{14}\text{C}$ ] saikosaponin a & d の経時的排泄は糞便中排泄が 2 日目で約 50%, 1 週間で 80% 以上であり, 尿中では 1 日目に約 8%, その後は痕跡程度であった (Fig. 4)。

#### 考 察

saikosaponin の抗炎症作用は, 滲出期にも軽度の作用が認められたが, 特に肉芽形成期では, 副腎皮質ホルモンに匹敵するほど強力な抗肉芽作用が認められた。

経口投与では筋注投与の約 10 倍量が必要であり, これは消化管での吸収がよくないためか, あるいは胃酸の作用等により, 一部がより活性の少ない物質に変化させられるためとも考えられる。

Prednisolone 投与では強力な抗炎症作用があるが, 副腎重量の減少も著明であった。これに反し, saikosaponin 投与では副腎重量の減少は認められず, この点からは副腎皮質ホルモンを介しての作用であるとは考え難い。

代謝作用では [ $^{14}\text{C}$ ] leucine からの肝蛋白合成亢進やグルコース腹腔内投与後の肝グリコーゲン量の増加とともに, [ $^{14}\text{C}$ ] acetate からの肝総脂質やコレステロール合成がたかまっているにもかかわらず, 血清コレステロールは低下を示し, しかも肝全体のコレステロール量には変化がなかった。この原因として saikosaponin に

よる血中コレステロール消失速度の亢進、胆汁酸や $3\beta$ -OH-sterolとしての胆汁、糞便中排泄増加作用によることが明らかにされた。すなわち、saikosaponinの血中コレステロール低下作用の機序は、甲状腺機能亢進症や甲状腺剤投与時にみられると同様に、コレステロール生合成亢進を上まわるコレステロールの分解排泄の増加によるためと推定される。また $[^{14}\text{C}]$  saikosaponinの排泄は一週間で糞便中へ大部分が排泄され、尿中へは極く一部分が排泄されるのみであり、腸肝循環の存在を思わせた。

今回の実験から抗炎症作用、脂質代謝作用を示すものは、saikosaponin a および d と saikogenin F および G であり、無効なものは saikosaponin c と saikogenin E であった。すなわち、saikosaponinの活性には糖部分のない saikogenin が大きく関与しており、特にその構造上の差異をみると $4\alpha\text{-CH}_2\text{OH}$ をもつ saikogenin F および G が活性を示しているのに反し、これのない saikogenin E が活性を示さない点から、少なくとも、この $4\alpha\text{-CH}_2\text{OH}$ の存在が作用発現に重要な役割りを演じているものと考えられる。

従来、ミシマサイコは和漢薬として胸脇苦満を証とする肝、胆疾患に主に使われてきたが、今回のラットの実験からも saikosaponin の抗滲出、抗肉芽、肝臓蛋白合成亢進、高コレステロール食摂取後の血清脂質の上昇阻止作用などが実証され、しかも副腎抑制や溶血作用などの副作用もない点から、その臨床的応用として慢性の肝炎や高脂血症に対する効果も期待される。

稿を終るにあたり、終始、ご懇篤なご指導とご校閲を賜った第二内科教室の熊谷朗教授、山本昌弘助教授に厚く御礼申し上げます。(本論文は学位審査論文であり、要旨は昭和47年第6回和漢薬シンポジウムにおいて発表した。)

#### SUMMARY

Saikosaponin, which was isolated from *Bupleurum falcatum* L. and whose structure was determined by Kubota et al, showed the anti-inflammatory actions in the experiments.

Strong anti-granulomatous actions were observed by cotton pellet method and weak anti-exudative actions were obtained by granuloma pouch method. Saikosaponin also showed some metabolic actions. Protein synthesis as judged

by  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  leucine incorporation in liver slices and glycogen contents in the liver were increased by the drugs, while oxidation of  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  glucose in the liver was not changed. Elevation of plasma levels of cholesterol, triglycerides and phospholipids by cholesterol feeding was reduced. The elimination of intraperitoneally injected  $[4\text{-}^{14}\text{C}]$  cholesterol from plasma was accelerated and fecal excretion of total $^{14}\text{C}$  including  $[^{14}\text{C}]$  bile acids and  $[^{14}\text{C}]$  neutral sterols was increased. Hepatic lipogenesis and cholesterologenesis from  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$  acetate were stimulated.

No statistically significant changes in body weight, adrenal weight and hematocrit values by saikosaponin administrations were observed. Over 80 percent of intraperitoneally injected  $[^{14}\text{C}]$  saikosaponin was excreted in feces in 7 days, while trace amount was excreted in urine. Saikosaponins a, d and respective aglycons, but not c and its aglycon, had either anti-inflammatory or metabolic actions. It is conceivable, therefore, that aglycon portions of saikosaponin a and d, which have the  $4\alpha\text{-CH}_2\text{OH}$ , are essential structures for the biological actions.

#### 引用文献

- 1) 難波恒雄, 谿 忠人: サイコの紹介とその歴史代謝 10 (臨時増刊号), 205-213, 1973.
- 2) 柴田承二, 北川 勲, 高橋ルミ子, 藤本治宏: 東洋薬物の化学的研究 (第14報) ミシマサイコ属植物の成分について その1 薬誌 86, 1132-1137, 1966.
- 3) 高木敬次郎, 柴田 丸: 柴胡の薬理学的研究 (第2報) Crude Saikosides の抗炎症その他の薬理作用 薬誌 89, 1367-1378, 1969.
- 4) 柴田 丸: 柴胡の薬理学的研究 (第3報) Crude Saikosides の薬理作用と柴胡の臨床効果との関連性 薬誌 90, 398-404, 1970.
- 5) Kubota, T. and Hinoh, H.: The constitution of saponins isolated from *bupleurum falcatum* L. Tetrahedron letters 3, 303-306, 1968.
- 6) 武田健一: サイコの化学成分 代謝 10 (臨時増刊号), 214-224, 1973.
- 7) Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y.:

- Structure and action of saikosaponins isolated from *bupleurum falcatum* L. I. Anti-inflammatory action of saikosaponins. *Arzneim. Forsch.* 25, 1021-1023, 1975.
- 8) 林 良明, 山本昌弘, 牧野英一, 板谷喬起, 鈴木豊, 大島仁士, 熊谷 朗: Saikosaponins の構造と抗炎症及び代謝作用 第6回和漢薬シンポジウム記録 72-76, 1972.
- 9) Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y.: Structure and action of saikosaponins isolated from *bupleurum falcatum* L. II. Metabolic actions of saikosaponins, especially a plasma cholesterol-lowering action. *Arzneim. Forsch.* 25, 1240-1243, 1975.
- 10) Selye, H.: II. Adrenocortical physiology. The diseases of adaptation: Introductory Remarks. *Recent Progr. Hormone Res.* 8, 117-142, 1953.
- 11) Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W.: Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *J. Pharm. Exper. Therap.* 141, 369-376, 1963.
- 12) Means, A. R. and Hall, P. F.: Effect of FSH on protein biosynthesis in testes of the immature rat. *Endocrinology* 81, 1151-1160, 1967.
- 13) Tye, R. and Engel, J. D.: Liquid scintillation counting of carbon-14 in aqueous digests of whole tissues. *Anal. Chem.* 37, 1225-1227, 1965.
- 14) Lowry, O. H., Rosefrough, N. J., Farr, A. L. and Kandall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 15) Abdel-Akher, M. and Smith, F.: The repeating unit of glycogen. *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 994-996, 1951.
- 16) Dreywood, R.: Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18, 499, 1946.
- 17) Yamamoto, M., Takeuchi, N., Kotani, S. and Kumagai, A.: Effects of glycyrrhizin and cortisone on cholesterol metabolism in the rat. *Endocrinol. Japon.* 17, 339-348, 1970.
- 18) Yamamoto, M. and Yamamura, Y.: Changes of cholesterol metabolism in the ageing rat. *Atherosclerosis* 13, 365-374, 1971.
- 19) Leffler, H. H., Sundermann, F. W. and Sundermann, Jr. F. W.: Lipids and the steroid hormones in clinical medicine. J. B. Lippincott Co, Philadelphia, 18, 1960.
- 20) Fletcher, M. J.: A Colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta.* 22, 393-397, 1968.
- 21) Hoeflmayer, J.: *Phosphatid. Med. Ernaehr.* 7, 1-5, 1966.
- 22) Siperstein, M. D., Jayko, M. E., Chaikoff, L. and Dauben, W. G.: Nature of the metabolic products of  $^{14}\text{C}$ -cholesterol excreted in bile and feces. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81, 720-724, 1952.
-