

崇城大学学位論文

葛花抽出物の「酒毒」に対する薬理学的研究

平成29年度

山崎 律

葛花抽出物の「酒毒」に対する薬理学的研究

山崎 律

**Pharmacological Studies of the Extracts from Puerariae Flos on  
the “Shudoku”, Alcoholic Intoxication Symptoms**

Takashi Yamazaki

**January, 2018**

## **Pharmacological Studies of the Extracts from Puerariae Flos on the “Shudoku”, Alcoholic Intoxication Symptoms**

Takashi Yamazaki

Puerariae Flos is the dried flower of *Pueraria lobata* or *Puerariae thomsonii* (Leguminosae), which is a climbing herb growing throughout East and South Asia. It is known to be rich in isoflavonoids and triterpenoid saponins, and to have a counteracting effect on drinking. "Kakkakaiseito", a typical of Chinese herbal medicine consisting of a mixture of Puerariae Flos and some other herbs, has been traditionally utilized in Chinese medicine for the treatment of the “Shudoku”, a variety of symptoms induced by excessive consumption of alcoholic beverages. Although triterpenoid saponin components contained in two types of Puerariae Flos have no remarkable differences between the both, isoflavonoid components contain different in the above two types of Puerariae Flos. Puerariae Flos originated from *Pueraria thomsonii* includes mainly tectoridin, tectorigenin, glycitein, on the other hand, Puerariae Flos originated from *Pueraria lobata* contains mainly genistin, genistein, and irrisolidone. Despite chemical studies were performed on both types of Puerariae Flos, only few pharmacological studies were conducted to evaluate the effect of Puerariae Flos against alcoholic intoxication symptoms.

The purpose of present study is to evaluate some pharmacological activities of extract from Puerariae Flos originating from *Pueraria thomsonii* against alcoholic intoxication symptoms.

### **Extract preparations:**

Beverages containing an aqueous extract from Puerariae Flos were manufactured in our laboratory so that the subjects were easy to take the extracts of Puerariae Flos prior to the clinical studies. By contrast, the extract (Thomsonide) containing large amounts of isoflavonoid and triterpenoid saponin, was obtained from Puerariae Flos *via* Diaion HP-20 column chromatography using water and 99.5% ethanol prior to the experimental studies.

First, the clinical study was designed to evaluate the pharmacological activities of the extracts from Puerariae Flos on alcoholic metabolism in human as follows.

**1) Effect of the extract from the dried flower of *Pueraria thomsonii* on alcoholic metabolism in human:**

We have investigated the effects of beverages of the extract from the dried flower of *Pueraria thomsonii* on blood ethanol and acetaldehyde levels in humans with consumption of 21.5% alcohol solution. As a result, it was showed that beverage including Puerariae Flos, given orally to humans, had an effect on increasing the elimination rate constant of acetaldehyde.

Then, the experimental study was conducted to evaluate some pharmacological activities of Thomsonide against alcoholic intoxications as follows.

**2) Effect of Thomsonide against alcohol-induced lethality and acute hepatic injury in mice:**

We have investigated the preventive effects of Thomsonide against alcohol-induced lethality and acute hepatic injury in mice. As a result, Thomsonide had anti-lethal and hepatoprotective properties.

**3) Evaluation of the pharmacological activity of Thomsonide on the gastrointestinal tracts:**

We have investigated the effect of Puerariae Flos on alcoholic disorders in the gastrointestinal system. As a result, Thomsonide inhibited ethanol-induced gastric lesions in rats. Furthermore, Thomsonide increased the production of PGE<sub>2</sub> and 6-ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub> , a stable metabolite of PGI<sub>2</sub>, in the gastric mucosa, and protective effect of Thomsonide against ethanol-induced gastric lesions was attenuated by pretreatment with indomethacin. Also, Thomsonide revealed significant effect on gastrointestinal transit in intact mice. Thus, it was suggested that Thomsonide had the gastroprotective effect which might be related to the cytoprotective activity of endogenous prostaglandins, and had a gastrointestinal prokinetic effect.

**4) Effects of Thomsonide on impairment of passive avoidance behavior in mice:**

The effects of Thomsonide on ethanol-induced learning and memory impairment and scopolamine-induced amnesia have been investigated. As a result, Thomsonide exerted an ameliorating effect on the impairment of both memory registration and memory retrieval induced by ethanol. Thomsonide also improved the scopolamine-induced impairment of memory registration in passive avoidance behavior in mice.

Consequently, the result of the clinical study suggested that a modest promotive effect of the extract from *Puerariae Flos* on elimination of blood acetaldehyde might possibly mitigate the acetaldehyde toxicity, such as flushing, palpitation, headache, *etc.*, associated with excessive consumption of alcoholic beverages. Besides, the results of experimental studies demonstrated that Thomsonide may have anti-lethal, hepatoprotective, gastroprotective, gastroprokinetic, and anti-amnesic properties against alcoholic intoxication symptoms. Furthermore, the results of the present study indicated that the effects of the extract from *Puerariae Flos* against alcoholic intoxication symptoms might be due to isoflavonoids and triterpenoid saponins contained in *Puerariae Flos*. The present study clearly demonstrated that the extract from *Puerariae Flos* exhibited a protective effect against alcoholic intoxication symptoms, and these results supported the belief that *Puerariae Flos* is useful for counteracting the effect of alcohol consumption.

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) Yamazaki T., Hosono T., Matsushita Y., Kawashima K., Someya M., Nakajima Y., Narui K., Hibi Y., Ishizaki M., Kinjo J., Nohara T., Pharmacological Studies on Puerariae Flos IV: Effects of *Pueraria thomsonii* Dried Flower Extracts on Blood Ethanol and Acetaldehyde Levels in Humans, *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, **XXII**, 23-28 (2002).
- 2) Yamazaki T., Yaguchi M., Nakajima Y., Hosono T., Niiho Y., Hibi Y., Kinjo J., Nohara T., Effects of an Aqueous Extract of Puerariae Flos (Thomsonide) on Impairment of Passive Avoidance Behavior in Mice, *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 244-248 (2005).
- 3) Yamazaki T., Nakajima Y., Kinjo J., Nohara T., The Protective Effect of a Puerariae Flos Extract (Thomsonide) against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats, *Pharmacology and Pharmacy*, **7**, 208-215 (2016).

## 略語表

本論文では以下の略語を用いる。

ADH	:alcohol dehydrogenase
ALDH	:acetaldehyde dehydrogenase
ALT	:alamine amino transferase
ANOVA	:analysis of variance
AST	:aspartate aminotransferase
CMC-Na	:carboxymethyl cellulose sodium salt
COX	:cyclooxygenase
CYP	:cytochrome P-450
<i>l</i> -dopa	:3-(3,4-Dihydroxyphenol)-L-Alamine
ELSD	:evaporated light scattering detector
FAD	:flavin adenine dinucleotide
GCP	:good clinical practice
Glc	:glucose
$\gamma$ -GTP	: $\gamma$ -glutamyl transpeptidase
HCO-60	:polyoxyethylene-(60)-hydrogenated castor oil
HPLC	:high performance liquid chromatography
MAOS	:microsome acetaldehyde-oxidizing system
MEOS	:microsome ethanol-oxidizing system
L-MTCA	:L-2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid
NAD	:nicotinamide adenine dinucleotide

PGs :prostaglandins

POP :pyruvate oxidase from *pediococcus* species

Rha :rhamnose

TCA :tricarmonic acid

TOOS :N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium salt,  
dihydrate

Tween 80:polyoxyethylene sorbitan monolaurate 80

Xyl :xylose



## 目次

序論	1
第1章 葛花抽出と安全性	3
第1節 葛花トムソナイドの作製：抽出の検討	3
第2節 葛花の一般薬理作用と安全性	9
第2章 アルコール代謝に関する検討	14
第1節 ヒト血中アルコール及びアセトアルデヒド濃度に対する葛花抽出物の影響	15
第2節 考察	21
第3章 アルコール中毒に対する検討	23
第1節 急性アルコール中毒に対する救命効果	23
第2節 考察	27
第4章 アルコール性肝障害の病態と治療	29
第1節 急性アルコール誘発性肝障害に対する影響	29
第1項 マウスの急性アルコール性肝障害モデルの作製	30
第2項 急性アルコール性肝障害に対する葛花トムソナイドの影響	34
第2節 考察	37
第5章 葛花抽出物の消化管機能に及ぼす影響	41
第1節 葛花抽出物の胃粘膜損傷に対する影響	41
第1項 正常ラットのアルコール誘発性胃粘膜損傷に対する影響	42
第2項 胃粘膜プロスタグランジン含量に及ぼす影響	45
第3項 インドメタシン前処置ラットにおけるアルコール誘発性胃粘膜損傷に対する影響	46
第2節 葛花抽出物の消化管輸送能に及ぼす影響	50
第1項 正常マウス消化管輸送能に対する影響	51
第2項 消化管輸送能低下マウスに対する影響	52
第3節 考察	54
第6章 アルコール記憶障害に関する検討	57

第1節 エタノール誘発性記憶学習障害に対する葛花の影響	58
第1項 エタノール誘発性記憶登録障害に対する 葛花トムソナイドの影響	58
第2項 エタノール誘発性記憶呼び出し障害に対する 葛花トムソナイドの影響	60
第2節 Scopolamine 誘発性記憶障害に対する 葛花トムソナイドの影響	63
第3節 考察	66
総括	68
引用文献	70
謝辞	80

## 序 論

葛は東南アジアに幅広く自生する蔓性のマメ科に属する植物で、主に日本国内に分布する *Pueraria lobata* (WILLD.) OHWI を起源とするものと、中国に多く分布する *Pueraria thomsonii* BENTHUM を起源とするものが存在している。特に、*Pueraria lobata* の根、葛根は「神農本草経」はもとより日本薬局方にも収載されている生薬で、代表的漢方薬である「葛根湯」は葛根に加えて、その他いくつかの生薬の配合により解熱等<sup>1,2)</sup>の目的で感冒の治療に用いられている。その葛根中には Puerarin, Daidzin, Daidzein 等のイソフラボノイドが含まれており<sup>3-7)</sup>、主成分である Daidzein には腸管収縮作用<sup>8,9)</sup>、並びにパパベリン様作用等<sup>10,11)</sup>の薬理作用を有することがすでに明らかとなっている。また、葛根イソフラボノイドには脳及び冠状動脈血流増加作用<sup>12)</sup>をはじめ、 $\beta$ -受容体遮断作用<sup>13)</sup>、血糖低下作用<sup>14,15)</sup>、エストロゲン様作用<sup>16,17)</sup>の存在が示唆されており、中医学においては葛根が高血圧、虚血性心疾患の治療に用いられていることも報告されている<sup>12,13)</sup>。一方、葛の花は葛花と称し、「胃を醒し渴きを止め、酒毒を解す」と中薬大辞典に記載されているように、二日酔い時への適用、すなわち消酒効果を期待した用いられ方がなされている。特に、葛花が配合されている「葛花解醒湯」は、「酒毒」を解く効果を持った漢方処方として知られている<sup>18)</sup>。中医学や漢方の分野ではアルコール摂取によって生じる不快、頭痛、心悸亢進、酩酊、発汗、嘔吐、食欲不振などの二日酔いに相当する諸種症状を呈する症候群を「酒毒」とよび、葛花の作用に関する記載には、「酒毒に効く」、「消酒効果」といったようにアルコールの解毒作用が記されている。本来、アルコールは生体のあらゆる臓器や組織に対して非特異的な作用を有し、肝臓、脾臓、胃腸をはじめとする消化器の障害、脳・神経系の障害、循環器系障害、造血系障害等、多くの疾病の誘因物質と考えられることから、アルコール研究は臨床医学の分野では古くから、多くの研究者が関心を持っているテーマの 1 つとな

っている。また、アルコールは人類の歴史とともに始まって以来、人間関係の潤滑油としてその需要が増大しつつある中で、飲酒による臓器障害は生活習慣病を誘発させる原因の1つともなっているため、アルコール性肝障害、アルコール中毒、アルコール依存症といったアルコール障害に関する臨床研究も盛んに行われている。一方、我々が日常において頻繁に遭遇する飲酒に伴って生じる悪酔い、二日酔い等の諸種症状を示す一過性の症候群、すなわち「酒毒」は疾患にまでは至らない故に、「アルコール研究」としては扱われず、わずかに一般大衆薬の分野で話題となっているにすぎない。本論文ではアルコール研究の中でも二日酔い、すなわち中医学における「酒毒」というものに着目し、アルコールの代謝、急性アルコール中毒に対する救命、肝保護作用、アルコールによる消化管障害改善作用、記憶学習の改善という側面から「酒毒」に対する葛花の効果を薬理学的に検証した。

## 実験動物

すべての動物は(株)日本 SLC より購入し、実験開始までは空調のきいた飼育室(室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、昼夜照明 7:00~19:00)でケージにて飼育し、水と普通固形飼料 (F-2, 船橋ファーム)を自由に摂取させた。すべての動物実験は日本薬理学会で規定した実験動物の飼育と使用ガイドラインに従って行われた。また、すべての実験操作は、(株)太田胃散実験動物倫理委員会より承認が得られた計画に従って行われた。

## 臨床試験

ヒトを対象とした臨床試験は平成9年3月27日付厚生省令第28号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(GCP)及び関連する規制を参考にし、メディカルアドバイザー承認下で(株)太田胃散が作成した臨床試験計画書、説明文、同意書に従って行われた。

## 本 論

### 第 1 章 葛花抽出と安全性

葛は古来より葛粉として食用とされ広く多くの人々に親しまれている。その根「葛根」は清涼、発汗、解熱薬とされ、特に「葛根湯」は応用範囲の広い漢方方剤として重用されている。葛根には Puerarin, Daidzin, Daidzein といったイソフラボノイド成分を多く含み、これが薬効の本体であるとされている(Figs. 1~5)。一方、葛の花、「葛花」の主な薬効は「酒毒」を解す、酒を消す、嘔逆吐酸、酒による胃の障害を治すといったように、葛根とは異なり二日酔いに纏わる多くの諸種症状に適応する用いられ方がなされている。また近年では脂質低下作用、内臓脂肪抑制作用などに基づくダイエットの為の健康食品としても脚光をあびている<sup>19)</sup>。葛花にも多くのイソフラボノイド<sup>20,21)</sup>やトリテルペノイドサポニン<sup>22,23)</sup>が含まれており、これらの成分が「酒毒」に対して多くの作用を示す可能性が推察されている(Fig. 2~4)。葛花の効能を評価するには、その薬効の本体と考えられるこれらの成分に富んだ抽出物を得ることが必要不可欠であり、我々は葛花からイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンを多く含む抽出物を産出する方法を考案し、さらに得られた抽出物の薬効評価を行うに先立ち一般薬理作用を評価した結果、安全性についても確認した。

#### 第 1 節 葛花トムソナイドの作製：抽出の検討

乾燥した葛花（クズ *Pueraria thomsonii* BENTHUM）150 kg に 15~20 倍量の熱湯を加え、90~95℃で 1~2 時間、かき混ぜながら抽出した後、金網（300 メッシュ）汙過し、抽出液を濃縮、その後噴霧乾燥し、約 40 kg の乾燥エキスを得た（収率 26.7%）。ついで当該エキス末 40 kg を 5~7 倍量の温湯で再溶解し、不溶部を高速遠心分離で除き、予めエタノール、次いで水でステンレス管に充填した吸着樹脂（HP-20; 200 kg）に負荷させて目的物を吸着させ、水洗後、うす

めたエタノール (7→10~8→10) 約 600 L で目的物を溶離した。目的物画分を約 70  $\mu\text{m}$  で濾過した後、減圧下で約 1/3 量まで濃縮、当該濃縮液を噴霧乾燥し、褐色で特異な臭いのある粉末抽出物約 6 kg を得た (収率約 4%)。この抽出物を「葛花トムソナイド (Thomsonide)」と命名した。

#### イソフラボノイドとトリテルペノイドサポニンの確認

Niiho ら<sup>24)</sup>の方法に準じ、蒸発光散乱検出器 (ELSD)による液体クロマトグラフィ (HPLC)を用いて葛花トムソナイド中のイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンの同時定量を行った。すなわち、トムソナイド 20 mg を 80% エタノール溶液 6 mL に溶解し、これをメンブランフィルター(ミリポア製)で濾過したものを分析用試料とした。

試料溶液は、カラムヒーター (U-620, Sugai), ポンプ (CCPM-II, Tosoh), ELSD 検出器 (Model 300s, SofTA, USA) を装備した HPLC で定量を行った。

#### (HPLC の分析条件)

カラム C<sub>18</sub> 逆相カラム (COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-PAQ 250mm×3mm i.d., Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)

噴霧温度 40°C

蒸発温度 60°C

移動相 :

グラジエント

溶液 A trifluoroacetic acid (TFA): water = 0.05:100

溶液 B acetonitrile:water:TFA=150:100:0.05

溶液 A 100% + 溶液 B 0% (0 min) → 溶液 A 17% + 溶液 B 83% (3 min) → 溶液 A 0% + 溶液 B 100% (45 min)

流速 0.5 mL/min

サンプル量 10  $\mu$ L

各々ピークの保持時間は、イソフラボノイドについては 6-Hydroxygenistein 6,7-di-*O*-glucoside (19.4 min), Glycitin (20.2 min), Tectorigenin 7-*O*-xylosyl glucoside (21.4 min), Tectoridin (22.4 min), Glycitein (26.5 min), Tectorigenin (29.6 min), トリテルペノイドサポニンについては、Soyasaponin I (35.4 min), Kaikasaponin III (37.0 min)であり、各化合物の存在を確認した (Fig. 1)。

トムソナイドの定量は各成分の標準品を用いて検量線を作成し、各イソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンの値を算出した。

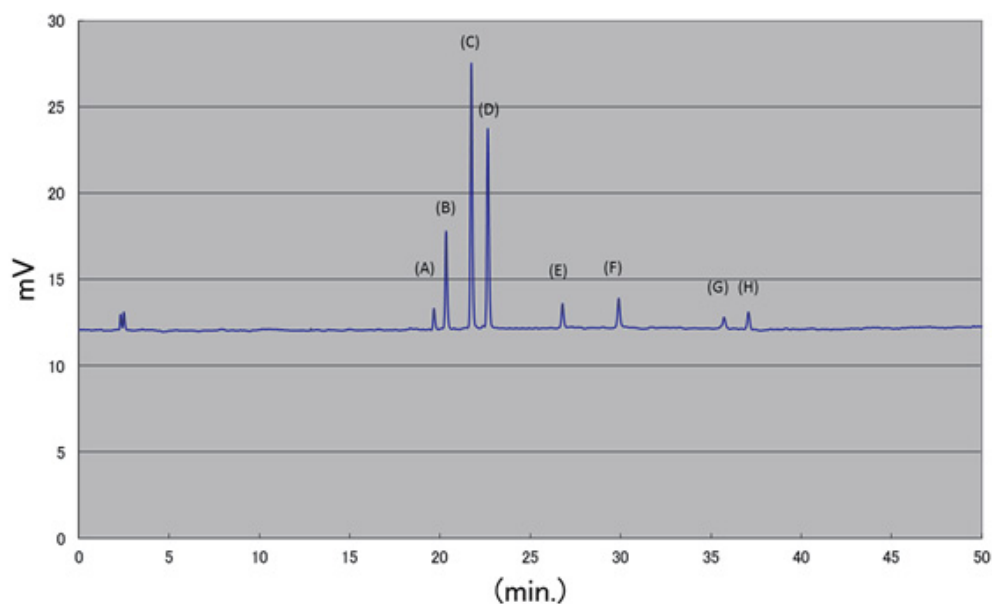


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Thomsonide

- (A) 6-Hydroxygenistein 6,7-di-*O*-glucoside
- (B) Glycitin
- (C) Tectorigenin 7-*O*-xylosylglucoside
- (D) Tectoridin
- (E) Glycitein
- (F) Tectorigenin
- (G) Soyasaponin I
- (H) Kaikasaponin III

葛花から抽出して作製した葛花トムソナイドの複数のサンプルを定量した結果、サンプル中のイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンの含量は、葛花トムソナイド 100mg 中に 6-Hydroxygenistein 6,7-di-O-glucoside は 3.986~5.483 mg、Glycitin は 2.909~6.542 mg、Tectorigenin 7-O-xylosylglucoside は 11.835~15.109 mg、Tectoridin は 5.817~7.634 mg、Glycitein は 0.933~2.386 mg、Tectorigenin は 2.220~2.396 mg、Soyasaponin I は 0~3.713 mg、Kaikasaponin III は 2.034~3.214 mg の範囲であった (Table 1)。

Table 1. Concentration of Isoflavonoids and Triterpenoid Saponin in the Sampled Pueraria Flos.

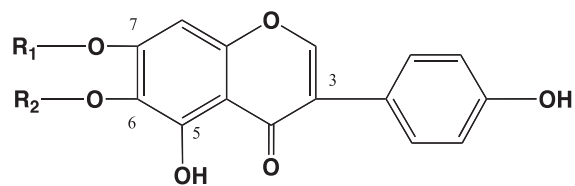
No. of Specimen	Lot. 0057011	Lot.0060411	Lot.0046709	Lot.9954111
Concentration	mg/100 mg	mg/100 mg	mg/100 mg	mg/100 mg
	(3)	(3)	(3)	(3)
(A)	5.26±0.81	5.48±0.64	4.27±0.77	3.99±0.92
(B)	2.91±0.66	3.10±0.54	5.44±1.05	6.54±1.48
(C)	13.88±2.21	15.11±1.28	13.51±2.40	11.84±2.78
(D)	5.83±1.08	6.20±1.03	7.63±1.79	5.82±1.51
(E)	0.93±0.13	0.97±0.25	1.74±0.43	2.39±0.88
(F)	2.40±0.53	2.38±0.47	2.22±0.52	2.34±0.53
(G)	1.71±0.77	ND	1.67±0.23	3.71±1.21
(H)	2.28±0.49	2.14±0.44	2.03±0.32	3.21±0.80

- (A) 6-Hydroxygenistein 6,7-di-O-glucoside
- (B) Glycitin
- (C) Tectorigenin 7-O-xylosylglucoside
- (D) Tectoridin
- (E) Glycitein
- (F) Tectorigenin
- (G) Soyasaponin I
- (H) Kaikasaponin III

ND not detected.

The data are expressed as mean±standard deviation. Numbers in parentheses are number of measurements.



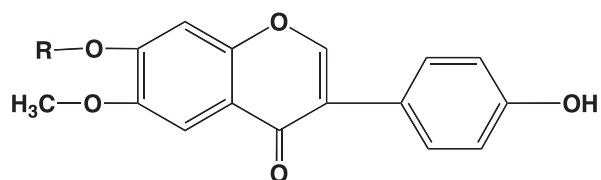


Tectorigenin: R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

Tectoridin: R<sub>1</sub>=glc; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

Tectorigenin: 7-*O*-xyloxyglucoside: R<sub>1</sub>=glc (2←1) xyl; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

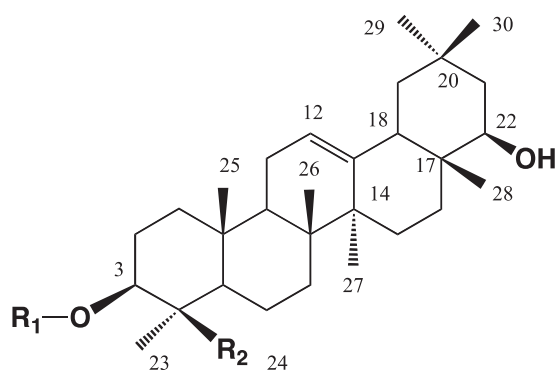
6-Hydroxygenistein 6,7-di-*O*-glucoside: R<sub>1</sub>=glc; R<sub>2</sub>=glc



Glycitein: R=H

Glycitin: R=glc

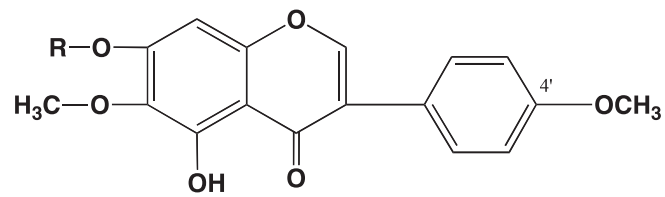
Fig. 2. Isoflavones Isolated from Dried Flowers of *Pueraria thomsonii*



Soyasaponin I: R<sub>1</sub>=glc A (2←1) gal (2←1) rha; R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>OH

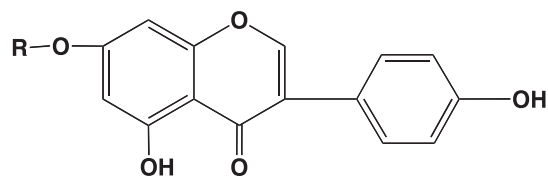
Kaikasaponin III: R<sub>1</sub>=glc A (2←1) gal (2←1) rha; R<sub>2</sub>=H

Fig. 3. Triterpenoid Saponins Isolated from Dried Flower of *Pueraria thomsonii*



Irisolidone: R=H

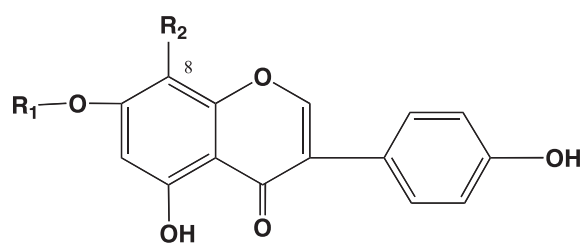
Kakkalide: R=glc (6←1) xyl



Genistein: R=H

Genistin: R=glc

Fig. 4. Isoflavonoid Isolated from Dried Flowers of *Pueraria lobata*



Daidzein: R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H

Daidzin: R<sub>1</sub>=glc; R<sub>2</sub>=H

Puerarin: R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=glc

Fig. 5. Isoflavonoid Isolated from Root of *Pueraria lobata*

## 第2節 葛花抽出物の一般薬理作用と安全性

葛はマメ科 (Leguminosae)の植物で全国各地の日当たりのよい林や土手に生える多年性蔓性の草本で、その根葛根を「葛根湯」、その花葛花は「葛花解醒湯」として漢方処方用いられている。一方、葛は秋の七草の1つでもあり、葛の根を圧搾して水洗いし沈殿したものを精製して得られる「葛澱粉」は別名「葛粉」とも呼び、一般的に食用として幅広く用いられている。特に葛粉に砂糖を加えて水で溶き暖めて作った「葛湯」は流動食、介護食などとして昔から消化のよい飲み物として親しまれてきた。従って葛植物は非常に安全性の高い素材と考えられるが、本節では「葛花」の薬効を検討するにあたり、薬理作用及び毒性の面からあらためて行動薬理を主体とした一般薬理試験を実施し、葛花の一般薬理作用と毒性の発現する用量を推定することにより、葛花抽出物の安全性を確認した。

### 一般薬理試験

#### 実験方法

ddY系6週齢雄性マウス9匹を使用した。マウス8匹に第1節で得られた葛花トムソナイドを投与可能な最大量(マウスで経口投与可能な量の2倍量)10g/kgを、さらに残り1匹へ対照群として溶媒1%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)溶液を経口投与し、Irwin<sup>25)</sup>の行動観察表を参考にして投与後約60分間、その後断続的に3時間まで行動観察し、さらに72時間後の生死を確認した。なお、試料はすべて1% CMC-Na溶液に懸濁し、マウスの体重10gあたり0.2 mLの割合でラット用経口ゾンデを用いて経口投与した。

#### 実験結果

マウスへ投与する容量が多い為、対照マウス、葛花トムソナイド投与マウス

ともに、投与直後一過性の自発運動の抑制を示す傾向を示し、特に葛花トムソナイド 10 g/kg を投与したマウスでは投与後数分で顕著な自発運動 (Spontaneous Activity)の抑制が見られ、約 1 時間にわたり継続した。同時に、行動的側面については、認知力について受動性 (Passivity)の抑制が、気分については身繕い (Grooming) の消失、運動性については探索行動の抑制が認められた(Table 2A)。 その間、神経学的側面及び自律神経的側面について確認したがいずれも正常であった。その後葛花トムソナイド投与 1 時間過ぎごろより神経学的側面では 5 例に振戦 (Tremor)、2 例に攣縮 (Twitch)ときわめて一過性ではあるが、やや中枢興奮の徴候を示していた。また、8 例中 1 例に体姿勢異常 (Body Posture)とよろめき歩行 (Staggering Gait)、3 例に異常歩行 (Abnormal Gait)といった運動協調障害の徴候が観察された。また反射面では、耳介反射 (Pinna Reflex)の消失も観察された(Table 2B)。さらに自律神経性側面では、葛花トムソナイド投与マウス 2 例に呼吸 (Respiratory Rate) の興奮、4 例に立毛 (Piloerection)などの交感神経興奮様の一般徴候が観察された(Table 2C)。 その後 3 時間ほどでこれらの症状も改善し正常状態に戻り、行動的側面においても正常動物と同様身繕いを示すまでに回復した。さらに、72 時間における死亡例も認められなかった。 一方、通常の投与量である葛花トムソナイド 500 mg/kg の用量では正常動物の行動と変わらず、上述の中枢興奮様、交感神経興奮様反応はいっさい見られなかった。すなわち、葛花トムソナイドは最大投与可能な用量である 10g/kg でさえも一般薬理作用から推察して、中枢神経抑制又は一過性の興奮に起因する薬理作用が観察されたが、3 時間ほどで回復し、その作用は一過性の毒性によるものと考えられ、葛花トムソナイドの行動的側面、神経学的側面、自律神経性側面における薬理作用から推察し、きわめて安全性の高いことが示唆された。

Table 2A. Pharmacological Activity in Behavioral Profile 1-3 h after Overdose of Thomsonide Administration in Mice

Symptom	Symptom /	Total Number
(Behavioral Profile)		
a. Awareness		
1) Alertness	Normal	
2) Visual Placing	Normal	
3) Passivity	Depression	8/8
4) Stereotypy	Not Observed	0/8
-----		
b. Mood		
1) Grooming	Depression	8/8
2) Vocalization	Not Observed	0/8
3) Restlessness	Not Observed	0/8
4) Irritability, Aggression	Not Observed	0/8
5) Fearfulness	Normal	
-----		
c. Motor Activity		
1) Reactivity (Exploratory response)	Depression	0/8
2) Spontaneous Activity	Depression	8/8
3) Touch Response	Normal	
4) Pain Response	Normal	

Table 2B. Pharmacological Activity in Neurological Profile 1-3 h after Overdose of Thomsonide Administration in Mice

Symptom	Symptom /	Total Number
(Neurological Profile)		
a. CNS Excitation		
1) Startle Response	Normal	
2) Straub Tail	Not Observed	0/8
3) Tremor	Observed	5/8
4) Twitch	Observed	2/8
5) Convulsion	Not Observed	0/8
-----		
b. Motor Incoordination		
1) Body Posture	Abnormal	1/8
2) Limb Position	Normal	
3) Staggering Gait	Observed	1/8
4) Abnormal Gait	Observed	3/8
5) Righting Reflex	Normal	
-----		
c. Muscle Tone		
1) Limb Tone	Normal	
2) Grip Strength	Normal	
3) Body Tone	Normal	
4) Abdominal Tone	Normal	
-----		
d. Reflex		
1) Pinna Reflex	Not Observed	1/8
2) Corneal Reflex	Normal	
3) Ipsilateral Flexor Reflex	Normal	

Table 2C. Pharmacological Activity in Autonomic Profile 1-3 h after Overdose of Thomsonide Administration in Mice

Symptom	Symptom /	Total Number
(Autonomic Profile)		
a. Eye Symptom		
1) Pupil Size	Normal	
2) Palpebral Opening	Not Observed	0/8
3) Exophthalmos	Not Observed	0/8
-----		
b. Secretion Symptom		
1) Urination	Not Observed	0/8
2) Salivation	Not Observed	0/8
-----		
c. Others		
1) Writhing	Not Observed	0/8
2) Piloerection	Observed	4/8
3) Hypothermia	-----	
4) Skin Color	Normal	
5) Heart Rate	-----	
6) Respiratory Rate	Observed	2/8

## 第2章 アルコール代謝に関する検討

葛花 (*Puerariae Flos*) はマメ科 (*Leguminosae*) のクズ (*Pueraria lobata* (WILLD.) OHWI, 又は *Pueraria thomsonii* BENTHUM) の花部を乾燥した生薬で、昔から酒による酔いを解く効能があると云われている。「葛花解醒湯」は葛花をはじめ、白豆蔻、縮砂(砂仁)、木香、青皮、茯苓、陳皮、猪苓、人参、白朮、神麴、沢瀉、乾姜によって構成されている漢方処方、中薬大辞典<sup>13)</sup>によると、飲酒過多による嘔吐痰逆、心神煩乱、胸膈痞寒、手足の震え、飲食の減少、小便不利の治療に用いられ、また葛花に加え、黄連、滑石、粉草から構成されている漢方処方である「葛花清熱丸」は飲酒による積熱があり、脾臓と胃が毒で傷つけられ、嘔血吐血、発熱煩渴、小便赤少がある場合に用いられるとの記載がある。このように葛花は他の生薬との配合により伝統的に二日酔い改善の目的で用いられてきた。葛花の中で主に国内で産出される *Pueraria lobata* 由来のイソフラボノイドには、Genistin, Genistein, Irisolidone が挙げられるのに対して、中国、台湾で産出される *Pueraria thomsonii* に含有するイソフラボノイドには Tectoridin, Tectorigenin, Glycitein 等があり、葛花の種類によりそれぞれ含有するイソフラボノイドの種類に違いがみられている<sup>26)</sup>。新甫らは、*Pueraria lobata* を起源とした葛花中に含まれるイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンのうち前者がマウスの血中アルコール、アセトアルデヒド及びケトン体の濃度を低下させること<sup>27)</sup>、また後者がアルコール代謝異常を改善することを報告している<sup>28)</sup>。一方、*Pueraria thomsonii* を起源とする葛花については国内市場では広く流通しているもののイソフラボノイド含有成分の相違からその薬効についてはほとんど確認されていない。本章では *Pueraria thomsonii* 由来の葛花エキスのヒトの血中アルコール代謝に及ぼす影響について検討し、薬理的に考察した。



## 第1節 ヒト血中アルコール及びアセトアルデヒド濃度に対する葛花抽出物の影響

### 試料の調製

葛花 (*Pueraria thomsonii* BENTHUM) エキスを(株)三国より購入した。被験者が服用しやすいように 2 種類の葛花エキスのドリンク剤を以下のごとく作製した。原生薬 4 g 又は 12 g を含む葛花エキスに香料約 50 mL を加えよく混合し 60°C に加温した。この溶液へ予め溶解しておいた polyoxyethylene-(60)-hydrogenated castor oil (HCO-60) を添加しさらに 10 分間混合した。混合した溶液を 50°C 以下に放冷後エタノール 0.4 mL に溶解した hydroxybenzoic acid (paraven) 3 mg 及び sodium benzoate 30 mg を加え濾過した後、液量を 50 mL に調製し容器に充填し葛花エキスのドリンク剤 (DPT) を作製した。さらに、葛花エキスを香料に置き換えた Placebo の溶液も同様に作製した。DPT 中に葛花 4 g を含むものを DPT-L, 葛花 12 g を含むものを DPT-H と命名した。なお、DPT-L 中にはイソフラボノイドとして Glycitein 3.58 mg, Tectorigenin 3.62 mg, Tectoridin 15.83 mg, Tectorigenin 7-O-xylosylglucoside 16.03 mg, DPT-H 中には Glycitein 10.16 mg, Tectorigenin 10.57 mg, Tectoridin 45.72 mg, Tectorigenin 7-O-xylosyl-glucoside 45.87 mg をそれぞれ含有することを、液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析により確認した。

### 被験者

12 名 (男性 8 名、女性 4 名) の人が臨床試験に参加した。被験者の平均年齢と平均体重はそれぞれ  $32.5 \pm 2.4$  歳、 $63.9 \pm 3.9$  kg であった。臨床試験の目的について各被験者へ十分に説明した上で、試験参加への同意書をいただいた。本臨床試験の実施は同和病院メディカルアドバイザーの永山医師により承認された。なお、臨床試験をはじめるにあたり被験者には開始 36 時間前より飲酒や

投薬を避けていただいた。

## スケジュール

試験はいずれも午前 9 時から午後 6 時の間に行なわれた。12 人の被験者を 3 人ずつ 4 つのグループに振り分け、第 1 回目の試験では第 1 群と第 2 群は Placebo 群に、第 3 群と第 4 群は DPT-L 服用群と DPT-H 服用群にそれぞれ割り付けた。その後一週間の間隔を置き、第 2 回目の試験が行なわれた。第 2 回目の試験では第 1 群と第 2 群はそれぞれ DPT-L 服用群と DPT-H 服用群に、第 3 群と第 4 群は Placebo 群に割り付けた。被験者には試験開始 12 時間前より絶食してもらい、試験開始前にまず採血が行われた。試験開始とともに Placebo 液あるいは DPT 溶液を服用してもらい、60 分後にウイスキー(山崎 21.5%アルコール含有、サントリー(株))を水で 2 倍に薄めた水割りの溶液 200 mL を 15 分間で服用してもらった。その後水割り服用 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、及び 8 時間後に前腕静脈より採血が行なわれた。

## 血中アルコール及びアセトアルデヒド濃度の定量

各被験者からの採血は真空採血管 (Venoject II; VP-P073, テルモ) により行われた。血液 1 mL を 1 M の過塩素酸溶液 1 mL の含まれる遠心管へ添加しよく混和後、4°C, 3000 r.p.m. で 10 分間遠心分離を行った。得られた上清 0.9 mL を取り、内部標準液として 100 µg/mL の 1-propanol 1 mL を含んだバイアル瓶へ入れ、バイアルクリンパを用いたに、テフロン性シリコン栓で密封した。サンプル中のアルコール及びアセトアルデヒド濃度の定量は、split/spitless injector (SPL-G9, Shimadzu), headspace sampler (HSS-2B, Shimadzu), キャピラリーカラム (PEG-20M, 0.53 mm × 25 m × 3 µm, Chemical bonded, 東京化成(株)), FID 検出器及びデータ解析装置 (Chromatopac Model C-R4AX, Shimadzu) を装備したガスクロマトグラフィー (Model GC-9A, Shimadzu) を使用した。

(ガスクロマトグラフィーの分析条件)

キャリアガス	ヘリウム
カラム温度	60°C
シリンジ温度	90°C
バイアル温度	90°C
バイアル保温時間	30 min
検出器温度	120°C

### データの解析

アルコール及びアセトアルデヒドの血中濃度曲線を作成し、Placebo 群と比較した。またさらに、速度論的指標として、各人のアルコール及びアセトアルデヒドの消失速度定数を算出し、Placebo 群と比較した。なお、消失速度定数は対数濃度-時間曲線の消失推移部分の直線性より算出した。得られたデータは平均±標準誤差で表し、それぞれの Placebo 群と DPT 服用群間で Student の *t* 検定により有意差検定を行った。

### 結果

Placebo 群における血中アルコール濃度は服用後 1 時間でピークに達し、その後直線的に減少する傾向を示していた。血中アルコールピーク時の濃度は DPT-L の Placebo 群で  $0.64 \pm 0.06$  mg/mL, DPT-H の Placebo 群で  $0.67 \pm 0.05$  mg/mL であった。一方、葛花エキス (DPT) 服用群における血中アルコール濃度は服用後 30 分でピークに達し、その時の血中アルコール濃度は DPT-L 群で  $0.64 \pm 0.08$  mg/mL, DPT-H 群で  $0.66 \pm 0.07$  mg/mL であった。DPT-L 群、DPT-H 群ともに各時間帯でのそれぞれの Placebo 群との間で有意差は認められなかった。血中アセトアルデヒド濃度は Placebo 群ではいずれもアルコール服用後 30 分でピーク

に達し、その後徐々に減少する傾向を示していた。血中アセトアルデヒドピーク時の濃度はDPT-LのPlacebo群で $2.63 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ 、DPT-HのPlacebo群で $2.51 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$ であった。一方、DPT服用群におけるピーク時の血中アセトアルデヒド濃度はDPT-L群では $2.33 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$ 、DPT-H群では $2.63 \pm 0.45 \mu\text{g/mL}$ であり、アルコール濃度と同様にDPT-L群、DPT-H群ともに各時間帯でのそれぞれのPlacebo群との間で有意差は認められなかった(Table 3)。さらに、速度論的パラメーターとして消失速度定数を算出すると、DPT-Lに関しては、Placebo群のアルコールの消失速度定数は $0.49 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ でDPT-L服用群では $0.77 \pm 0.21 \text{ h}^{-1}$ であった。また、DPT-Hに関しては、Placebo群でアルコールの消失速度定数は $0.57 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ 、DPT-H服用群では $0.49 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ であった。DPT-L、DPT-H服用群ともにアルコールの消失速度定数はPlacebo群との間で有意差は認められなかった。一方アセトアルデヒドの消失速度定数は、DPT-LではPlacebo群で $0.26 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ 、DPT-L服用群で $0.43 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ とPlacebo群に比べてDPT-L服用群ではアセトアルデヒドの消失速度定数は有意な増加が認められた。またDPT-HではPlacebo群で $0.30 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ 、DPT-H服用群で $0.39 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ とDPT-L服用群の場合と同様、Placebo群に比べてDPT-H服用群ではアセトアルデヒドの消失速度定数は有意な増加が認められた(Table 4)。すなわち、DPTの服用でアルコールの消失速度定数については変化が見られなかったが、アセトアルデヒドの消失速度定数は増加することが示唆され、葛花エキスは血中アセトアルデヒドの消失を促進することが確認された。

Table 3. Effects of *Puerariae thomsonii* Extracts on Blood Levels of Ethanol and Acetaldehyde

		Blood Concentration				
		Ethanol (mg/mL)		Acetaldehyde ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		N	Placebo	Treated	Placebo	Treated
0.5 h	DPT-L	6	$0.58 \pm 0.05$	$0.64 \pm 0.08$	$2.63 \pm 0.51$	$2.33 \pm 0.52$
0.5 h	DPT-H	6	$0.60 \pm 0.06$	$0.66 \pm 0.07$	$2.51 \pm 0.33$	$2.63 \pm 0.45$
1.0 h	DPT-L	6	$0.64 \pm 0.06$	$0.63 \pm 0.06$	$2.35 \pm 0.50$	$2.32 \pm 0.30$
1.0 h	DPT-H	6	$0.67 \pm 0.05$	$0.62 \pm 0.05$	$2.39 \pm 0.42$	$2.46 \pm 0.26$
2.0 h	DPT-L	6	$0.53 \pm 0.06$	$0.56 \pm 0.09$	$1.99 \pm 0.36$	$2.10 \pm 0.27$
2.0 h	DPT-H	6	$0.55 \pm 0.06$	$0.58 \pm 0.06$	$2.01 \pm 0.18$	$2.34 \pm 0.17$
4.0 h	DPT-L	6	$0.22 \pm 0.06$	$0.17 \pm 0.06$	$1.68 \pm 0.29$	$1.56 \pm 0.47$
4.0 h	DPT-H	6	$0.19 \pm 0.03$	$0.20 \pm 0.04$	$1.39 \pm 0.29$	$1.52 \pm 0.37$
6.0 h	DPT-L	6	$0.05 \pm 0.02$	$0.04 \pm 0.02$	$0.57 \pm 0.05$	$0.54 \pm 0.07$
6.0 h	DPT-H	6	$0.03 \pm 0.02$	$0.04 \pm 0.02$	$0.44 \pm 0.08$	$0.51 \pm 0.07$
8.0 h	DPT-L	6	0	0	$0.42 \pm 0.07$	$0.40 \pm 0.06$
8.0 h	DPT-H	6	$0.13 \pm 0.01$	0	$0.38 \pm 0.03$	$0.45 \pm 0.14$

DPT-L=DPT (50 mL) with 4 g of *Pueraria thomsonii*.

DPT-H=DPT (50 mL) with 12 g of *Pueraria thomsonii*.

N=number of subjects.

Table 4. Effects of *Pueraria thomsonii* Extracts on Elimination Rate Constants of Blood Ethanol and Acetaldehyde

		Elimination Rate Constant ( $\text{h}^{-1}$ )			
		Ethanol		Acetaldehyde	
	N	Placebo	Treated	Placebo	Treated
DPT-L	6	$0.49 \pm 0.06$	$0.77 \pm 0.21$	$0.26 \pm 0.02$	$0.43 \pm 0.07^*$
DPT-H	6	$0.57 \pm 0.06$	$0.49 \pm 0.04$	$0.30 \pm 0.02$	$0.39 \pm 0.03^*$

DPT-L=DPT (50 mL) with 4 g of *Pueraria thomsonii*.

DPT-H=DPT (50 mL) with 12 g of *Pueraria thomsonii*.

\*  $p < 0.05$  = Significant differences from Placebo using Student's unpaired  $t$ -test

N=number of subjects.

## 第2節 考察

すでに述べたように、イソフラボノイドを豊富に含む葛花は、古くから酒の毒を消す消酒効果、すなわち漢方でいうところの「酒毒」の改善に用いられてきた。*Pueraria lobata*の花から抽出したイソフラボノイド画分がマウスの血中アルコール及びアセトアルデヒドの濃度を抑制したという報告<sup>27)</sup>に対して、本研究で使用した*Pueraria thomsonii*由来の葛花抽出物では、ヒトの血中アルコール濃度もアルコールの消失速度定数もなんら影響を及ぼさず、アルコール代謝においては*Pueraria lobata*由来の葛花の作用と一致しなかった。この点について、*Pueraria lobata*と*Pueraria thomsonii*の含有される成分の相違<sup>26)</sup>、あるいはヒトとマウスとのアルコールに対する感受性の違いが、結果の不一致に影響しているものと推察される。しかし、本研究では、葛花抽出物の血中アセトアルデヒド消失速度定数の増加作用が確認された。すなわち、*Pueraria thomsonii*由来の葛花はヒトの血中アセトアルデヒドの消失を促進させることが示唆された。アセトアルデヒドから酢酸への酸化は主に肝細胞のミトコンドリアあるいは原形質内に局在するアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒されることが知られている<sup>29)</sup>。一方 Watanabe らは<sup>30)</sup>肝臓のマイクロゾームに存在するアルデヒド酸化酵素がアルデヒドからカルボン酸への酸化を触媒し、しかもこの酵素が Cytochrome P-450 ; P-450 (CYP) 群に相当することを解明した。さらに Kunitoh らは<sup>31)</sup>P-450 (CYP) 2E1 がマイクロゾームのアセトアルデヒド酸化系における重要な酵素であることを見いだした。P-450 (CYP) は多くの化合物によって誘導されやすいことが知られている。飯樋らは<sup>32)</sup>多種類の大豆味噌がラットの P-450 (CYP) の活性を増加させることを報告している。さらに、Kishida らは<sup>33)</sup>Daizein, Genistein などの大豆イソフラボノイドのアグリコンが肝臓のマイクロゾームにおける P-450 (CYP) を誘導させ、マウスのアセトアルデヒドによる致死を軽減させることを報告している。また中島らは<sup>26)</sup>*Pueraria thomsonii* が Tectorigenin, Glycitein などの Daizein に似た構造を持ったイソフラボノイドのア

グリコンを含有していることを報告している。以上の見解を合わせて考えると、本研究結果で示唆された葛花の血中アセトアルデヒド消失速度定数に対する促進作用は、*Pueraria thomsonii* に含有されるイソフラボノイド アグリコンが肝マイクロゾームの P-450 (CYP) を誘導させることによって生じた結果である可能性が推察される。一方、Gimenez らは Genistein が利尿及びナトリウム利尿を誘発させ、その結果腎臓の血管抵抗を減少させること<sup>34)</sup>、また Daizein の代謝物である Equal がナトリウム利尿効果から糸球体濾過率を増加させることを報告しており<sup>35)</sup>、Genistein や Equol は腎臓膜の Na/K/Cl 相互輸送系に対して阻害作用のあることが示唆されている。これらの見解を合わせて考察すると、葛花の血中アセトアルデヒド消失促進作用は、含有するイソフラボノイドが糸球体濾過率を増加させ、アセトアルデヒドの尿中へのクリアランスを増加させた可能性も推察される。すなわち、葛花抽出物のヒト血中アセトアルデヒドの消失促進作用はイソフラボノイドによるアセトアルデヒド代謝促進作用、あるいはアセトアルデヒドの排泄促進作用に由来することが推察された。本研究で見いだされた葛花が血中アセトアルデヒドの消失を促進するという事実は、飲酒に伴って生じる顔面紅潮、動悸、頭痛などのアセトアルデヒド毒性の緩和につながるとともに、「酒毒」に対する葛花の効果の一端が明らかとなった。



### 第3章 アルコール中毒に対する検討

アルコールはどの時代でも、社会生活を営む上での潤滑油と考えられ、多くの人が親しんできた嗜好品の1つである。一方で、アルコールは皮膚や粘膜の消毒薬としての局所作用に加えて、あらゆる組織に対して非特異的な作用を持ち合わせている為、治療としての価値には限界があり、逆に障害の一因となっている。特にアルコールは中枢神経を抑制する作用を持ち合わせている為、大量の飲酒に伴い血中アルコール濃度が高値となって生じる、いわゆる急性アルコール中毒時には酩酊を誘発する。急性アルコール中毒の治療には、電解質喪失の補充、アチドーシス、糖代謝異常や低栄養状態の改善に加えて、肝保護、循環不全対策の目的で輸液によるビタミン類の補充等が適用されている<sup>36)</sup>。また動物実験においては、マウスの急性アルコール中毒に対してアラニンやシステインなどのアミノ酸が救命効果を示すことが報告されている<sup>37)</sup>。さらに、アルコールは心筋や脳内各部位で、神経伝達物質の遊離を促進的あるいは抑制的に作用すること<sup>38)</sup>から、神経薬理の分野でも着目され、アルコール致死を予防改善する薬物の研究が行われている<sup>39)</sup>。葛花がマウスの血中アルコール濃度を低下させること、また第2章で明らかにしたように、葛花がヒトの血中アセトアルデヒドの消失を促進するといった事実に基づき、本章では急性アルコール中毒に対する葛花の救命効果を検討することにより、中医学や漢方の分野で示唆されている葛花の「酒毒に対する消酒効果」の一端を薬理学的に検証した。

#### 第1節 急性アルコール中毒に対する救命効果

##### 材料

葛花トムソナイド (Lot. 9954111)

第1章で抽出作製した葛花トムソナイドを使用した。

イソフラボノイド含量； (mg/Thomsonide 100 mg)

6-Hydroxygenin 6,7-di- <i>O</i> -glucoside	3.99
Glycitin	6.54
Tectorigenin 7- <i>O</i> -xylosylglucoside	11.84
Tectoridin	5.82
Glycitein	2.39
Tectorigenin	2.34

トリテルペノイドサポニン含量；

Soyasaponin I	3.71
Kaikasaponin III	3.21

## 実験方法

ddY 系 7 週齢雄性マウスを実験に使用した。一晚 (15-20 時間) 絶食したマウスへ、葛花トムソナイドを投与し、その後生理食塩水に溶解した 25%エタノール 7.5 g/kg を腹腔内へ投与し、以降 1 時間ごとに 6 時間まで、その後は 1 日ごとに 7 日まで動物の生死を観察した上で、生存率を算出し対照群と比較した。葛花トムソナイドは 1% CMC-Na に懸濁しエタノール投与 60 分前に体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で経口投与した。なお、対照群は 1% CMC-Na を投与した。

## 実験結果

25%エタノール 7.5 g/kg をマウスへ投与すると投与後 1 時間で生存率 55%と約半数が死亡し、さらに 24 時間後には 5%、2 日目には全数死亡が観察されたが、葛花トムソナイド 125 mg/kg 投与群では 1 時間後で生存率 75%、24 時間後で 15%、3 日目に全数死亡、250 mg/kg 投与群では 1 時間後で 55%、24 時間後で 20%、6 日目に全数死亡と、対照群に比べて救命及び延命効果を示していた。さらに葛花トムソナイド 500 mg/kg 投与群では 1 時間で生存率 85%と対照群に比べて有意な増加が観察され、さらに 24 時間後の生存率が 30%でその後生存率

の低下は見られたものの 7 日目の生存率は 5%と全数死亡には至らなかった (Table 5)。このように、各時間における生存率は対照群と比べて高い値を示していることが示唆された。一方、生存期間の長さを比較すると、エタノール投与後 1 時間目から 7 日目までの観察期間において、葛花トムソナイド 125~500 mg/kg 各群の生存率を対照群と比較すると、この期間内ではいずれの群においても対照群に比べて有意な生存率の増加が認められた (Generalized Wilcoxon 法)。

Table 5. Protective Effect of Thomsonide against Ethanol Induced Lethality

Times	Thomsonide							
	Control		125 mg/kg		250 mg/kg		500 mg/kg	
	Survival		Survival		Survival		Survival	
	/Total	Percent	/Total	Percent	/Total	Percent	/Total	Percent
0h	20/20	100%	20/20	100%	20/20	100%	20/20	100%
1h	11/20	55%	15/20	75%	11/20	55%	17/20	85% *
2h	8/20	40%	9/20	45%	10/20	50%	14/20	70%
3h	8/20	40%	8/20	40%	8/20	40%	13/20	65%
4h	7/20	35%	8/20	40%	7/20	35%	12/20	60%
5h	6/20	30%	8/20	40%	7/20	35%	12/20	60%
6h	5/20	25%	8/20	40%	7/20	35%	11/20	55%
1d	1/20	5%	3/20	15%	4/20	20%	6/20	30%
2d	0/20	0%	1/20	5%	1/20	5%	3/20	15%
3d	0/20	0%	0/20	0%	1/20	5%	1/20	5%
6d	0/20	0%	0/20	0%	0/20	0%	1/20	5%
7d	0/20	0%	0/20	0%	0/20	0%	1/20	5%

Each values indicate survival rate of mice after ethanol injection.

\*  $p < 0.05$  (Chi-square test) Significantly different from Control.

Survival curves in each of thomsonide groups were significantly different from Control group by generalized Wilcoxon test.

## 第2節 考察

葛花の「酒毒に対する消酒効果」を裏付ける試みとして急性アルコール誘発性致死に対する葛花トムソナイドの影響について検討を行った。

マウスへアルコール 7.5 g/kg を投与することにより 1 時間ではほぼ半数が 24 時間では生存率わずか 5% に低下したのに対して葛花トムソナイドを前処置することにより生存率をほぼ用量依存的に上昇させ、葛花トムソナイドはアルコール致死に対する救命及び延命効果を示していた。アルコールは生体内ではアルコールデヒドロゲナーゼ又はカタラーゼ、CYP2E1 等により酸化されアセトアルデヒドへ、さらにアルデヒドデヒドロゲナーゼにより酢酸へと代謝されることが知られている<sup>40)</sup>。中でもアルコールの中間代謝産物アセトアルデヒドは非常に毒性が強く、顔面紅潮 (Flushing)、頭痛、吐き気、頻脈、などをはじめとする不快な症状を招く<sup>41)</sup>。俺は、アルコールによる酔いには大脳抑制麻痺による「心地よい酔い」と交感神経系の過剰反応状態による「不快な酔い」とが混在しており、前者がアルコール本来の薬理作用によるもので、後者の「不快な酔い」はアセトアルデヒドの交感神経刺激作用により生ずるものであり、これを「悪酔い」と定義し「二日酔い」と区別した。すなわち、「悪酔い」はエタノールの代謝によって生じたアセトアルデヒドによるもので、高アセトアルデヒド血症が悪酔いの症状を誘発させる本体であるのに対して、二日酔いはこの悪酔いの症状に加え、アルコールによる食道炎・胃炎、利尿、電解質異常、アチドーシスなどが混在したものであると述べている<sup>42)</sup>。アセトアルデヒドは副腎を刺激しカテコールアミンを放出すること<sup>43)</sup>により Flushing をはじめ頻脈、吐き気を誘発することに加えて、肺や心血管系に対して障害をもたらすことから、アルコール性心筋症の要因でもあり、飲酒によってもたらされる障害の1つともなっている<sup>44,45)</sup>。従ってマウスの急性アルコール中毒による致死の主な原因は高アセトアルデヒド血症によるものと考えられ、葛花トムソナイドがマウスのアルコール致死に対して救命効果を示した結果は、第2章で述べた

血中アセトアルデヒド消失促進作用に起因するとともに、この事実は高アセトアルデヒド血症の改善が急性アルコール中毒の改善につながることを裏付けていることが明らかとなった。本研究で得られた結果から、葛花の血中アセトアルデヒド消失促進作用が、高アセトアルデヒド血症を改善させ、急性アルコール中毒に対して救命効果を示したことは、漢方で言う「酒毒に対する消酒効果」の一端を裏付けることを示唆するものである。一方アルコールによる毒性は、高アセトアルデヒド血症の他に 24 時間以降の致死については、主に肝機能の障害が大きく関与している。須田らは<sup>37)</sup>マウスにアルコールを投与した際に、投与後 3 日以降でも血清 Aspartate Aminotransferase (AST)の上昇とともに肝組織において中心静脈周囲の肝細胞の著しい変性、腫大と脂肪変性が観察され、システインをはじめとするいくつかのアミノ酸や有機酸の組み合わせが、アルコール投与 5 日以降でのマウスの生存率を増加させることを報告している。本研究においても、アルコール投与 1 時間目から 7 日目までの期間において葛花トムソナイド各群ともに生存率の有意な上昇を示し、特に 500 mg/kg の用量ではアルコール投与 7 日目で対照マウスを上回る生存率を示した点は、葛花トムソナイドの肝保護作用を示唆するものである。これらの点については第 4 章に記載する。

## 第4章 アルコール性肝障害の病態と治療

中医学や漢方の分野における「酒毒に対する消酒効果」は葛花が持つ最も特徴的な作用といえる。第2章では葛花のアルコール代謝に関する研究から、葛花のヒト血中アセトアルデヒド消失促進作用を明らかにした。また福田ら<sup>46)</sup>も葛花水性エキスが血中アルコール、アセトアルデヒド値を微弱ながら抑制することをすでに報告している。アルコールの代謝は肝機能と密接な関わりがあるとともに、アルコールの大量摂取に伴う栄養障害やアルコールの代謝産物が、肝機能障害を誘発することが示唆されており<sup>47)</sup>、「酒毒に対する消酒効果」を謳っている葛花がアルコールによる肝機能障害の改善に寄与することが予測される。*Pueraria lobata* 由来の葛花については、含有されるイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンがマウスの血中アルコール、アセトアルデヒド、ケトン体の濃度を抑制するとともに四塩化炭素及び高脂肪食誘発性肝障害の発生を抑制することが報告されており、肝保護作用を有することがすでに明らかとなっている<sup>28)</sup>。第4章では葛花の「酒毒に対する消酒効果」の意義をさらに深める為に、アルコールによる急性肝障害に対する *Pueraria thomsonii* 由来の葛花の影響について検討した。

### 第1節 急性アルコール誘発性肝障害に対する影響

アルコール摂取が多くの臓器の中で特に肝臓に対して悪影響を及ぼすことはすでによく知られた事実である。中でも肝硬変の発症は、近年ではC型肝炎ウイルスによるものと云われているものの、アルコールの消費量に比例して発生率が上昇することから、アルコールの大量摂取が主な原因であることが疫学的に明らかとなっている<sup>48)</sup>。アルコール摂取が脂肪肝を経て肝障害、さらには肝硬変症に至るプロセスを、動物実験を通じて明らかにさせる試みが多くの研究者によって行われてきたが、いずれも不成功に終わっている。その理由は、元来ヒト以外の動物ではアルコールを好まず、アルコールの大量投与が不可能で

ある為、栄養障害や他臓器への影響もあり、肝硬変症にまで至るモデルはヒヒを用いた長期摂取において成立しているのみである<sup>49)</sup>。一方、マウスやラットなどの小動物では、肝硬変は生じないものの、急性的にアルコールを大量摂取することにより Aspartate Aminotransferase (AST)/Alanine Aminotransferase (ALT) の上昇、低蛋白血症、血清浸透圧の上昇等アルコールの代謝によってもたらされる影響が肝機能への障害として反映されることが示唆されている<sup>50,51)</sup>。本章では急性アルコール中毒に対して救命効果を示した第3章での結果を基に、二日酔い時に伴って生じる肝機能の低下を反映した実験モデルを想定し、まず、第1項では急性アルコール性のマウス肝機能障害モデルを作製し、肝機能の marker である血清 AST/ALT を指標に、その障害を予防改善させる主な標準的 被験薬の作用を確認し、第2項ではこのモデルを用いて葛花トムソナイドの作用について検討を行った。

## 第1項 マウスの急性アルコール性肝障害モデルの作製

### 被験薬

リボフラビン:Riboflavin (和光純薬製 Lot. SDN1030)

アスコルビン酸:L(+)-Ascorbic Acid (和光純薬製 Lot. SDP7689)

システイン:L-Cysteine (SIGMA 製 Lot. 117F-0161)

### 実験方法

急性アルコール性肝障害モデル作製にあたり、仁平<sup>50)</sup>、並びに原田ら<sup>51)</sup>の方法を参考に、ddY系10週齢雄性マウスを実験に使用した。8時間絶食したマウスへ被験薬物を投与後25%エタノール5g/kgを腹腔内へ投与した。エタノール投与15時間後にマウスを屠殺し、血液を採取した後遠心分離(5000 r.p.m.×10 min)を行い、血清を分離し血清中のAST/ALT活性を測定した。本肝障害モデル



に対する被験薬物には標準薬として生体内酸化還元反応及び抗酸化作用に寄与するビタミン剤であるリボフラビン並びにアスコルビン及び含硫アミノ酸であるシステインを用いその作用を確認した。これら被験薬は生理食塩液に溶解し体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で、エタノール投与 30 分前に腹腔内へ投与した。Control 群は被験薬物の代わりに生理食塩液を投与し、また正常群は被験薬物及びエタノールの代わりに生理食塩液を投与した。なお、AST/ALT 活性は POP・TOOS 法(トランスアミナーゼ C II - テストワコー; 和光純薬)で測定し、Control 群と比較した。

## 実験結果

### 1. リボフラビンの作用

エタノールの投与により AST は正常値  $251.75 \pm 30.93$  mU/mL から  $497.19 \pm 55.45$  mU/mL へ、ALT は  $26.37 \pm 2.83$  mU/mL から  $151.63 \pm 18.24$  mU/mL へと有意な上昇が認められた。リボフラビンの前処置では、AST は 50 mg/kg 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ、 $448.42 \pm 43.19$  mU/mL、 $333.70 \pm 35.94$  mU/mL、ALT は 50 mg/kg 及び 100 mg/kg 投与群でそれぞれ、 $108.72 \pm 13.21$  mU/mL、 $90.04 \pm 15.62$  mU/mL と、AST 及び ALT 活性の抑制がみられた。特に 100 mg/kg 投与群では対照群に比べて AST, ALT 活性ともに有意な抑制が認められた(Table 6)。

### 2. アスコルビン酸の作用

生理食塩水のみを投与したマウスの血清 AST 及び ALT はそれぞれ  $312.97 \pm 42.97$  mU/mL, 及び  $35.91 \pm 2.37$  mU/mL を示していたが、エタノール投与により  $514.13 \pm 42.05$  mU/mL, 並びに  $150.37 \pm 14.07$  mU/mL まで上昇し、AST、ALT ともに有意な上昇を示していた。このような AST/ALT の上昇したマウスにアスコルビン酸を前処置すると、50 mg/kg 投与群では AST 並びに ALT はそれぞれ  $479.33 \pm 34.35$  mU/mL,  $134.79 \pm 13.73$  mU/mL, 100 mg/kg 投与群で  $487.85 \pm 53.28$

mU/mL, 並びに  $115.86 \pm 11.74$  mU/mL, 200 mg/kg 投与群では  $446.14 \pm 37.78$  mU/mL, 並びに  $100.56 \pm 8.11$  mU/mL とほぼ用量依存的に低下する傾向を示していた。特に ALT について、200 mg/kg 投与群では対照群と比較して有意な抑制が認められた (Table 7)。

### 3. システインの作用

生理食塩水のみを投与したマウスの血清 AST/ALT は、それぞれ  $228.44 \pm 56.15$  mU/mL, 並びに  $15.07 \pm 3.76$  mU/mL であったが、対照群としてエタノールを投与すると、AST, 並びに ALT の値は、それぞれ  $421.59 \pm 47.22$  mU/mL, 並びに  $167.16 \pm 12.63$  mU/mL まで上昇し、特に ALT については生理食塩水を投与したマウスに比べて有意差が認められた。システインを前処置すると血清 AST 活性は、システイン 100 mg/kg 投与群では  $483.56 \pm 68.27$  mU/mL, 200 mg/kg 投与群では  $431.25 \pm 44.25$  mU/mL, 400 mg/kg 投与群ではそれぞれ  $371.63 \pm 58.24$  mU/mL と対照群とほとんど違いは見られなかったが、血清 ALT 活性については、システイン 100 mg/kg 投与群で  $107.29 \pm 13.35$  mU/mL, 200 mg/kg 投与群では  $135.35 \pm 27.14$  mU/mL, 400 mg/kg 投与群では  $98.61 \pm 13.58$  mU/mL と抑制する傾向が見られた。特にシステイン 100 mg/kg 投与群、並びに 400 mg/kg 投与群では対照群と比較して有意な低下が認められた (Table 8)。

Table 6. Effects of Riboflavin on Serum AST and ALT Activity 15 h after Ethanol Injection in Mice

		AST (karmen)	ALT (karmen)
Normal	10	251.75 ± 30.93 **	26.37 ± 2.83 **
Control	11	497.19 ± 55.45	151.63 ± 18.24
Riboflavine			
50mg/kg	11	448.42 ± 43.19	108.72 ± 13.21
100mg/kg	11	333.70 ± 35.94 *	90.04 ± 15.62 *

\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)  
Significantly different from Control.

Table 7. Effects of Ascorbic acid on Serum AST and ALT Activity 15 h after Ethanol Injection in Mice

		AST (karmen)	ALT (karmen)
Normal	9	312.97 ± 42.97 *	35.91 ± 2.37 **
Control	9	514.13 ± 42.05	150.37 ± 14.07
Ascorbic acid			
50mg/kg	12	479.33 ± 34.35	134.79 ± 13.73
100mg/kg	12	487.85 ± 53.28	115.86 ± 11.74
200mg/kg	12	446.14 ± 37.78	100.56 ± 8.11 *

\*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)  
Significantly different from Control.

Table 8. Effects of Cysteine on Serum AST and ALT Activity 15 h after Ethanol Injection in Mice

		AST (karmen)	ALT (karmen)
Normal	9	228.44 ± 56.15	15.07 ± 3.76 **
Control	9	421.59 ± 47.22	167.16 ± 12.63
Cysteine			
100mg/kg	9	483.56 ± 68.27	107.29 ± 13.35 *
200mg/kg	9	431.25 ± 44.25	135.35 ± 27.14
400mg/kg	9	371.63 ± 58.24	98.61 ± 13.58 *

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)  
Significantly different from Control.

## 第2項 急性アルコール性肝障害に対する葛花トムソナイドの影響

### 試料

葛花トムソナイド (Lot. 9954111)

### 実験方法

第1項の方法に従いマウスの急性アルコール性肝障害モデルを作製した。すなわち、8時間絶食したマウスへ葛花トムソナイドを経口投与後25%エタノール5g/kgを腹腔内へ投与し、エタノール投与15時間後にマウスを屠殺し、血液を採取した。採取した血液は遠心分離(5000 r.p.m. × 10 min)を行い、血清を分離し上述に従い血清中のAST/ALT活性を測定し、Control群と比較した。葛花トムソナイドは1% CMC-Naに懸濁し体重10gあたり0.1 mLの割合でエタノ

ール投与 60 分前に経口投与した。Control 群は被験薬物の代わりに 1% CMC-Na を投与し、また正常群は被験薬物の代わりに 1% CMC-Na を、エタノールの代わりに生理食塩液を投与した。

## 実験結果

溶媒のみを経口投与したマウスの血清 AST 並びに ALT は AST が  $325.21 \pm 40.75$  mU/mL、ALT が  $26.34 \pm 3.50$  mU/mL であった。一方、エタノールを投与すると、血清 AST は  $595.10 \pm 109.04$  mU/mL、血清 ALT は  $114.49 \pm 13.96$  mU/mL まで上昇する傾向がみられた。特に ALT については有意な上昇が認められた。葛花トムソナイドはこのような上昇した AST/ALT を用量依存的に抑制する傾向がみられた。AST については葛花トムソナイド 125 mg/kg で  $417.45 \pm 38.53$  mU/mL, 250 mg/kg 投与群で  $413.42 \pm 24.38$  mU/mL, 500 mg/kg 投与群で  $303.34 \pm 22.56$  mU/mL とほぼ用量依存的に抑制する傾向がみられた。特に 500 mg/kg 投与群では対照群に比べて有意な抑制が認められた。また血清 ALT についても同様に、葛花トムソナイド 125 mg/kg 投与群で  $133.19 \pm 21.02$  mU/mL, 250 mg/kg 投与群で  $124.31 \pm 12.41$  mU/mL, 500 mg/kg 投与群では  $69.94 \pm 5.30$  mU/mL を示していた。特に 500 mg/kg 投与群では対照群に比べて有意差が認められた (Table 9)。

Table 9. Effects of Thomsonide on Serum AST and ALT Activity 15 h after Ethanol Injection in Mice

		AST (mU/ml)	ALT (mU/ml)
Normal	10	325.21 ± 40.75	26.34 ± 3.50 **
Control	10	595.10 ± 109.04	114.49 ± 13.96
Thomsonide			
125 mg/kg	10	417.45 ± 38.53	133.19 ± 21.02
250 mg/kg	10	413.42 ± 24.38	124.31 ± 12.41
500 mg/kg	10	303.34 ± 22.56 *	69.94 ± 5.30 **

\*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)  
Significantly different from Control.

## 第2節 考察

葛花の「酒毒に対する消酒効果」を裏付ける研究の一環としてマウスのアルコールによる肝機能障害モデルを作製し、生体内酸化還元反応及び抗酸化作用に関与するビタミンであるリボフラビン、アスコルビン酸並びに含硫アミノ酸であるシステインの効果を確認した上で、この障害モデルに対する葛花トムソナイドの作用について検討を行った。

アルコールの酸化にはアルコールデヒドロゲナーゼ (Alcohol Dehydrogenase; ADH)－アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (Acetaldehyde Dehydrogenase; ALDH)代謝系、カタラーゼ代謝系に加えてマイクロゾームエタノール酸化系 (Microsome Ethanol-Oxidizing System; MEOS)と呼ばれる誘導型の薬物代謝酵素 Cytochrome P450 代謝系の3つの代謝系が存在している。このうちアルコール代謝のおよそ80%以上を担っているADH－ALDH代謝系においては、アルコールがアセトアルデヒドを経て酢酸へと酸化される過程で、NADが補酵素として必要とされる。このNADはアルコールの酸化によって産生されたNADHの再酸化によってもたらされたものであることから、この機能を担っている肝のミトコンドリア内の電子伝達系はアルコールの酸化にとって重要な役割を担っている。

Toppingらは<sup>52)</sup>アルコールは解糖系及びTCA cycleの抑制とともに糖新生を誘発することを報告している。即ち、アルコールの酸化に必要なNADはTCA cycleを介さずシャトル機構を介して直接ミトコンドリア内の電子伝達系により供給される為、その結果栄養障害をもたらすと同時にNAD供給に必要なNADH酸化能の低下を招き、電子伝達系の機能障害を誘発する。これが、アルコールによる肝機能障害の主要因と考えられている<sup>53)</sup>。また、同時にTCA cycleの低下が、脂肪酸 $\beta$ 酸化の抑制を招き肝のトリグリセライドの蓄積、すなわち脂肪肝が誘発される<sup>54)</sup>。さらに、組織学的にはこの段階で肝臓の中心静脈周囲に繊維化を発症し<sup>55)</sup>、場合によっては門脈圧亢進による肝血流量低下及び浮腫産生か

ら肝細胞の風船化をきたし、胆汁うっ滞、白血球の浸潤へ発展し肝障害へと進行していくことが示唆されている<sup>56)</sup>。Lieber<sup>57)</sup>によれば、脂肪肝、中心静脈周囲繊維化の段階では血清生化学的パラメーターにおいて AST/ALT,  $\gamma$ -GTP, Alkaline Phosphatase 等の肝機能の marker は軽度上昇する程度にすぎず、脂肪肝を発症したヒトの場合でも AST/ALT の上昇が認められるのは約 50%にすぎないと報告されている。本研究で行った、アルコール投与後のマウス血清 AST/ALT の結果でも、正常マウスに比べてアルコール投与マウスでは血清 ALT の有意な上昇は認められたが、AST については平均値において上昇はみられたものの、すべての結果で正常値に比べて有意な上昇には至らなかった。従って、主に血清 ALT 活性の抑制傾向を指標に葛花トムソナイドの薬効を評価した。

標準薬として投与したりボフラビンがアルコールによる血清 ALT の上昇を有意に抑制した結果は、投与されたりボフラビンが活性型である FAD となりこれがミトコンドリア内の電子伝達系を補うことで、機能障害を回復させたことが、アルコールによる肝障害の改善につながったものと推察されるとともに、アルコールの摂取によりリボフラビンが消費され血中リボフラビン濃度が低下するという Kim ら<sup>58)</sup>の報告を間接的に裏付ける結果となった。

一方 ADH-ALDH 代謝系以外 (Non-ADH 系)のアルコール酸化の過程ではカタラーゼが関与する際の過酸化水素、MEOS 代謝系において産生されるフリーラジカル等いずれもこれらが多くの組織に障害をもたらすことが広く知られている<sup>59)</sup>。アスコルビン酸はアルコール投与で生じたアセトアルデヒドによる心筋の障害を改善し、この作用はアスコルビン酸のラジカルスカベンジャーとしての機能に由来することから<sup>60)</sup>、Physicians' Desk Reference 1974 年版<sup>61)</sup>では、エタノールとジスルフィラムによる重篤な作用やアルコール症の処置として大量のアスコルビン酸が推奨されている。この点を考慮すると、アスコルビン酸は MEOS 代謝系等で発生したフリーラジカルを除去することにより肝機能の障害を改善する可能性は否定できない。今回アルコール誘発性の肝機能障害に対し



てアスコルビン酸は上昇した ALT 活性をほぼ用量依存的に抑制する傾向を示し、200 mg/kg の用量では対照群と比べて有意差が認められた。このことは、アルコール代謝の結果産生されたフリーラジカルをアスコルビン酸が除去することによって肝機能の改善につながったものと推察される。

またアルコール誘発性肝障害は、蛋白の代謝障害も原因であることが知られている。Baraona ら<sup>62)</sup>は、アルコールの代謝産物であるアセトアルデヒドが肝微小管の主要成分であるチューブリン蛋白と結合し、チューブリンの重合を阻害し、その結果肝細胞内に分泌蛋白の貯留を誘発し、これが肝細胞の水腫化をきたすことを報告している。遊離のスルフィドリル基を持つ含硫アミノ酸、システインは、アセトアルデヒドと結合し、環状のヘミアセタール構造を有する L-2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid (L-MTCA) を産生し、さらにこの L-MTCA はシステインとともにアセトアルデヒドによって誘発される多くの障害を改善することが報告されている<sup>63,64)</sup>。この点を考慮すると、システインがアルコールによる血清 ALT 上昇を抑制したのは、投与したシステインがアセトアルデヒドを無毒化し、アセトアルデヒドによる蛋白代謝障害を抑制し、肝障害を緩和させたものと思われる。

さらに、葛花トムソナイドもこれら標準薬同様にアルコールによって上昇した AST/ALT の上昇を抑制し、アルコールによる肝機能障害を軽減することが示唆された。標準薬として用いたリボフラビン、アスコルビン酸、システインがアルコールによる肝障害を抑制したように、急性アルコール性肝障害の予防又は治療する際には、電子伝達系の機能障害の改善、組織障害をもたらすラジカルの除去、有毒物質アセトアルデヒドの排除等、一連の原因となる過程を阻害又は排除することが必要不可欠であり、このような点から葛花トムソナイドの作用を観察すると、まず第 1 にはアセトアルデヒドの消失促進作用が関与するものと考えられる。さらに、Lee ら<sup>65)</sup>が報告しているように、葛花に含有されるイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンの中でも Tectrigenin、並び

に Kaikasaponin III は抗酸化作用を持ち合わせており、Streptozotocin 誘発性糖尿病ラットに対して血糖上昇の抑制、血清及び肝臓内の脂質過酸化の抑制を示すことから、アルコール誘発性肝障害時上昇した AST/ALT を葛花トムソナイドが抑制したことは、葛花トムソナイドに含まれる Tectrigenin や Kaikasaponin III の抗酸化作用がラジカルの除去へ波及したものと推察される。また、サイコサポニンが副腎皮質からコルチコステロンの分泌を促すことにより肝障害を改善するという報告で知られるように<sup>66)</sup>、トリテルペノイドサポニンにも肝機能改善作用を有することがすでに明らかとなっているとともに、本研究のアルコール誘発性の肝障害の軽減には、Kinjo ら<sup>23)</sup>が明らかにしているように葛花トムソナイドに含まれるトリテルペノイドサポニン、Soyasaponin I の抗補体作用が影響していることもその要因の1つと考えられる。すなわち、葛花トムソナイドはアルコールが肝障害を誘発する一連の過程で、アセトアルデヒド消失促進作用に加えて、Tectrigenin, Kaikasaponin III 由来の抗酸化作用によるラジカル除去、Soyasaponin I による抗補体作用が相互的に働くことによりその障害を緩和させるとともに、これらの結果は「酒毒」に対する消酒効果の意義をさらに明らかにすることができた。

## 第5章 葛花抽出物の消化管機能に及ぼす影響

アルコールは人類始まって以来人々の生活に密着し、各地域ごとの文化や伝統とともに歩んできた歴史を持っている。特にアルコール飲料は古来より多くの人々が愛用してきた嗜好品であるとともに、食欲増進剤としての役割も担っている。その反面、過度のアルコール摂取が消化管粘膜に対して障害をもたらすといった有害作用も持ち合わせており、大酒家が日常体験する二日酔い時の胸焼け、胃もたれ、むかつき等の症状はその典型といえる。

一方、中薬大辞典<sup>13)</sup>の「酒毒」に対する葛花の薬能には「食欲不振、嘔逆吐酸、吐血、腸風下血を治す」と記されているように、葛花はアルコールによる消化管障害時の症状の改善にも効果を示すものと期待されている。本章では、消化管における「酒毒」に対する葛花の作用を明らかにするとともに、葛花抽出物の胃粘膜保護機能と運動機能について薬理的に考察した。

### 第1節 葛花抽出物の胃粘膜損傷に対する影響

すでに述べたように、葛花は漢方処方「葛花解醒湯」に代表される生薬で、神能本草綱目<sup>67)</sup>には「酒毒を解す」、「酒を飲んでも酔わぬ」と記されているように、二日酔いの諸種症状に用いられていた。一方、過度の飲酒が胃粘膜傷害を誘発することもよく知られているけれども、消化管における葛花の薬理的な検討はほとんどなされていない。本研究ではアルコール誘発性胃粘膜傷害に対する葛花抽出物の作用を評価するとともに、胃粘膜保護に重要な役割を担っている胃粘膜のプロスタグランジンとの関連についても記述した。

#### 試料の調製

葛花トムソナイド (Lot.9954111)

Tween 80 と 1% CMC-Na (1:19)の混液に懸濁し体重 100 g あたり 0.5 mL の割合で経口投与し、用量 100, 200, 400 mg/kg となるように調製した。

Geranylgeranylacetone: Teprenone (和光純薬株 Lot. CDN0816)

Tween 80 と 1% CMC-Na (1:19)の混液に懸濁し体重 100 g あたり 0.5 mL の割合で経口投与し、用量 20 mg/kg となるように調製し以下の実験に使用した。

## 第 1 項 正常ラットのアルコール誘発性胃粘膜損傷に対する影響

### 実験方法

24 時間絶食し、水のみを与えた SD 系雄性ラットを実験に使用した。Robert ら<sup>68)</sup>の方法に準じ、トムソナイド 100, 200, 400 mg/kg 及び比較対照薬としてテプレノン 20 mg/kg をラットへ経口投与し、1 時間後に 99.5% エタノール 1 mL を経口投与した。エタノール投与 1 時間後ラットをエーテルで致死させ胃を摘出した。摘出した胃は胃内へ 2% ホルマリン溶液 10 mL を注入した後、胃全体を 2 % ホルマリン溶液へ 10 分間浸した。その後胃を大湾に沿って切開し水道水で洗浄後、濾紙上に広げ 10 倍の実体顕微鏡下で個々の胃における胃粘膜損傷の長さの総和を計測し、対照群と比較した。なお、対照群はトムソナイドの代わりに Tween 80 と 1% CMC-Na (1:19)の混液を同量経口投与した。

### 実験結果

エタノール投与 1 時間後のラット胃粘膜上にはうっ血をともなった浸食性の粘膜病変が観察された(Fig.6A)。この病変はトムソナイド又はテプレノンの前処置により著しく減少した(Fig.6B, Fig.6C)。対照ラットの胃粘膜損傷の長さは  $109.10 \pm 8.29$  mm であったのに対して、トムソナイドは 100, 200, 400 mg/kg でそれぞれ  $90.60 \pm 14.73$  mm,  $64.70 \pm 7.93$  mm,  $24.90 \pm 6.91$  mm とほぼ用量依存的に胃粘膜損傷の長さを減少させ、特に 200 mg/kg 以上の用量で対照群に比べて有意な抑制が認められた。また、テプレノン 20 mg/kg 投与群の胃粘膜損傷の長さは  $42.80 \pm 10.57$  mm であり同様に対照群と比べて有意な抑制が認められた

(Table 10)。すなわち、トムソナイドはテプレノン同様にエタノール誘発性の胃粘膜損傷に対して胃粘膜保護作用を有することが示された。



Fig. 6A. Gross Appearance of Gastric Mucosa 1 h after Ethanol Administration in Rat Pretreated with Vehicle  
Erosive congestion was observed in the fundus.



Fig. 6B. Gross Appearance of Gastric Mucosa 1 h after Ethanol Administration in Rat Pretreated with Thomsonide at a Dose of 400 mg/kg  
Thomsonide reduced the erosive congestion.



Fig. 6C. Gross Appearance of Gastric Mucosa 1 h after Ethanol Administration in Rat Pretreated with Teprenone at a Dose of 20 mg/kg  
Teprenone reduced the erosive congestion.

Table 10. Effects of Thomsonide and Teprenone on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Intact Rats

	N	Gastric lesions (mm)	Inhibition (%)
Vehicle	10	109.10 ± 8.29	
Thomsonide			
100 mg/kg	10	90.60 ± 14.73	16.96
200 mg/kg	10	64.70 ± 7.93 **	40.70
400 mg/kg	10	24.90 ± 6.91 **	77.18
Teprenone			
20 mg/kg	10	42.80 ± 10.57 **	60.77

\*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Dunnet's multiple range test)  
Significantly different from Vehicle.

## 第2項 胃粘膜プロスタグランジン含量に及ぼす影響

### 実験方法

Harada ら<sup>69)</sup>の方法に準じ、24 時間絶食し、水のみを与えた Wistar 系雄性ラットを実験に使用した。トムソナイド 200 及び 400 mg/kg をラットへ経口投与し、4 時間後ラットをエーテルで致死させ、ただちに胃を摘出した。摘出した胃は、大湾に沿って切開し氷冷した生理食塩水で洗浄後幽門部を切り取り、重量測定後 0.1 M 磷酸緩衝液 ( $10^{-5}$ M インドメタシン含有) 6 mL でホモジネートした。ホモジネート溶液は塩酸 1.5 mL を加えた後、遠心分離 (12000 g×20 分、4°C) を行い、得られた上清を蟻酸メチルで抽出した。抽出液は遠心エバポレーターで乾燥後、その抽出液中の Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及び 6-Keto Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-Keto PGF<sub>1α</sub>) 含量を測定した。なお、対照群はトムソナイドの代わりに Tween 80 と 1% CMC-Na (1:19) の混液を同量投与した。PGE<sub>2</sub>、及び 6-Keto PGF<sub>1α</sub> の定量は ELISA 法によるキット (Cayman Chemical Company) を使用した。

### 実験結果

溶媒投与ラットの胃粘膜 PGE<sub>2</sub> 及び 6-Keto PGF<sub>1α</sub> 含量はそれぞれ  $50.23 \pm 5.81$  ng/g、 $385.38 \pm 112.08$  ng/g を示していた。トムソナイドの投与により胃粘膜の PGE<sub>2</sub> 含量は 200 mg/kg 投与群で  $90.92 \pm 9.25$  ng/g、400 mg/kg 投与群で  $90.82 \pm 6.30$  ng/g を示し、ともに溶媒投与群に比べて有意な増加が認められた。また 6-Keto PGF<sub>1α</sub> 含量も、トムソナイド 200 mg/kg 投与群で  $847.16 \pm 74.71$  ng/g、400 mg/kg 投与群で  $980.08 \pm 69.39$  ng/g と溶媒投与群に比べて有意な増加が認められた (Table 11)。

以上の結果、葛花トムソナイドは胃粘膜の PGE<sub>2</sub> 並びに 6-Keto PGF<sub>1α</sub> 含量を増加させることが示唆された。



Table 11. Effects of Thomsonide on PGE<sub>2</sub> and 6-Keto PGF<sub>1α</sub> Content of Gastric Mucosa in Rats

	N	PGE <sub>2</sub> (ng/g)	6-Keto PGF <sub>1α</sub> (ng/g)
Vehicle	8	50.23 ± 5.81	385.38 ± 112.08
Thomsonide			
200 mg/kg	8	90.92 ± 9.25 **	847.16 ± 74.41 **
400 mg/kg	8	90.82 ± 6.30 **	980.08 ± 69.39 **

\*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Dunnet's multiple range test)

Significantly different from Vehicle treated group.

### 第3項 インドメタシン前処置ラットにおけるアルコール誘発性胃粘膜損傷に対する影響

第2項で述べたように、葛花トムソナイドは胃粘膜 PGE<sub>2</sub> 並びに PGI<sub>2</sub> の代謝産物 6-ketoPGF<sub>1α</sub> 含量を増加させることが明らかとなった。この事実は、第1項で示した葛花トムソナイドの胃粘膜保護作用が胃粘膜プロスタグランジン増加作用に由来することを示唆している。この点を明らかにする為に、本項では、プロスタグランジン合成酵素である Cyclooxygenase の阻害剤であるインドメタシンを前処置したラットに対する葛花トムソナイドの胃粘膜保護作用を検討した。

#### 実験方法

24 時間絶食し、水のみを与えた SD 系雄性ラットを実験に使用した。ラットへインドメタシン 10 mg/kg を皮下投与し、30 分後にトムソナイド又は、標準薬としてテプレノンを経口投与し、さらに 1 時間後に 99.5% エタノール 1 mL を経口投与した。エタノール投与 1 時間後ラットをエーテルで致死させ胃を摘出



した。摘出した胃は胃内へ2%ホルマリン溶液10 mLを注入した後、胃全体を2%ホルマリン溶液へ10分間浸した。その後胃を大湾に沿って切開し水道水で洗浄後、濾紙上に広げ10倍の実体顕微鏡下で個々の胃における胃粘膜損傷の長さの総和を計測し、対照群と比較した。なお、インドメタシンはTween 80と生理食塩水(1:19)の混液に懸濁し、体重100 gあたり0.5 mLの割合で投与し、対照群はトムソナイドの代わりにTween 80と1%CMC-Naの混液を経口投与した。

## 実験結果

インドメタシン前処置後エタノールを投与したラットでも胃粘膜の病変が観察された(Fig.7A)。インドメタシン前処置後トムソナイドを投与したラットのエタノール投与後の胃粘膜病変ではわずかな改善が観察され(Fig. 7B)、その胃粘膜損傷の長さは、200 mg/kg投与群では $107.30 \pm 17.41$  mm、400 mg/kg投与群では $78.00 \pm 13.7$  mmと対照ラットの $115.90 \pm 14.05$  mmに比べて抑制する傾向はみられたが、有意差は認められなかった。また比較対照薬として用いたテプレノン 20 mg/kg投与群でも胃粘膜病変はわずかに抑制され(Fig. 7C)、その胃粘膜損傷の長さは $79.60 \pm 9.45$  mmと対照群ラットに比べ抑制する傾向はみられたもののトムソナイドと同様に有意差は認められなかった(Table 12)。すなわち、インドメタシンの前処置によりエタノール誘発性胃粘膜損傷に対するトムソナイド及びテプレノンの効果は減弱することが示された。

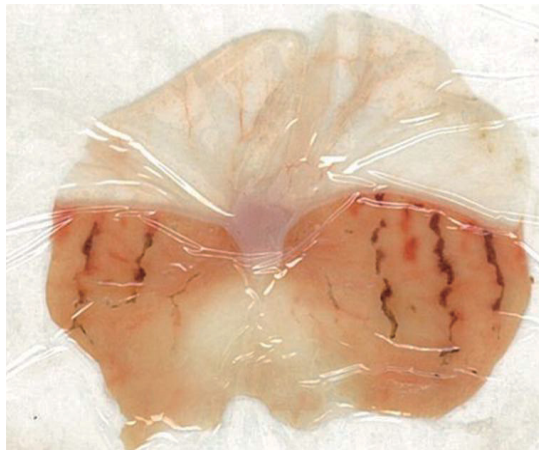


Fig. 7A. Gross Appearance of Gastric Mucosa 1 h after Ethanol Administration in Rat Pretreated with Vehicle Following Indomethacin Pretreatment  
Hemorrhage and erosion were observed in the fundus.



Fig. 7B. Gross Appearance of Gastric Mucosa 1 h after Ethanol Administration in Rat Pretreated with Thomsonide at a Dose of 400 mg/kg Following Indomethacin Pretreatment.

Protective effects of thomsonide against ethanol-induced gastric lesions were markedly diminished by indomethacin pretreatment.



Fig. 7C. Gross Appearance of Gastric Mucosa 1 h after Ethanol Administration in Rat Pretreated with Teprenone at a Dose of 20 mg/kg Following Indomethacin Pretreatment.

Protective effects of teprenone, as well as thomsonide, against ethanol-induced gastric lesions were markedly diminished by indomethacin pretreatment.

Table 12. Effects of Thomsonide and Teprenone on Ethanol-induced Gastric Lesions in Indomethacin-pretreated Rats

	N	Gastric Lesions (mm)	Inhibition (%)
Vehicle	10	115.90 ± 14.05	
Thomsonide			
200 mg/kg	10	107.30 ± 17.41	7.42
400 mg/kg	10	78.00 ± 13.70	32.70
Teprenone			
20 mg/kg	10	79.60 ± 9.45	31.32

Not significantly different from Vehicle.

## 第2節 葛花抽出物の消化管輸送能に及ぼす影響

過度の飲酒が胸焼け、胃もたれ等の症状を誘発させることは日常によく遭遇することで、その原因はアルコールによる急性胃炎又は食道炎によるものであることがすでに明らかとなっている<sup>42)</sup>。さらに、アルコールによる食道粘膜の傷害に加えて、食道の機能障害による胃酸や胆汁の逆流や下部食道括約筋圧の低下<sup>70)</sup>がこれらの症状を悪化させていることも多くの研究者により報告されている。また、アルコールは実験動物やヒトにおいて胃排泄時間を延長させること<sup>71,72)</sup>も報告されており、その原因はアルコールの胃運動抑制作用によるものと考えられている<sup>57)</sup>。このような症状の改善には胃、食道内容の pH 低下防止や下部食道括約筋圧上昇による逆流防止の目的で、制酸剤、酸分泌抑制剤、消化管運動賦活剤などが処方されている<sup>57)</sup>。本節では、アルコールの消化管運動機能障害に対する改善効果として「酒毒」に対する葛花の作用を適用することを試み、第1項では正常マウスの消化管輸送能に対する影響、第2項では輸送能低下マウスに対する影響について検討を行った。なお、消化管輸送能低下は、マウスにおいてアルコールでは均一な結果が得られず、モデルとしては成り立たなかったことから、胃運動抑制モデルを想定し、*l*-Dopa による消化管輸送能低下モデルを用いて検討した。

### 試料の調製

葛花トムソナイド(Lot.9954111)

5%アラビアゴム溶液に懸濁し 6.25~400 mg/kg の用量で体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で経口投与するように調製した。

3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-Alanine; *l*-Dopa (和光純薬株)

Tween 80 と生理食塩液 (1:19)の混液に懸濁し 300 mg/kg の用量で体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で皮下投与するように調製し、以下の実験に使用した。

## 炭素末溶液

炭素末を 5% アラビアゴム溶液に懸濁し、5% 炭素末溶液を体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で経口投与するように調製し、以下の実験に使用した。

## 第 1 項 正常マウス消化管輸送能に対する影響

### 実験方法

16 時間絶食したマウスへ葛花トムソナイド 6.25, 25, 及び 100 mg/kg を経口投与し、5 分後に 5% 炭素末を経口投与した。炭素末投与 20 分後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺しただちに胃から盲腸までを摘出して全小腸の長さで炭素末の移動した長さを計測し、小腸の長さに対する炭素末の移動した長さの割合として消化管輸送率を算出した。対照群は葛花トムソナイドの代わりに 5% アラビアゴム溶液を投与した。

### 実験結果

葛花トムソナイドの代わりに 5% アラビアゴムを投与した対照マウスの消化管輸送率は  $57.32 \pm 2.75\%$  であったのに対して、葛花トムソナイドを投与すると 6.25 mg/kg 投与群で  $64.25 \pm 2.58\%$ 、25 mg/kg 投与群で  $78.31 \pm 3.13\%$ 、100 mg/kg 投与群で  $76.32 \pm 4.11\%$  と消化管輸送率を増加する傾向が示唆された。とくに 25 mg/kg 以上の用量では対照群と比較して有意な増加が認められた (Table 13)。

Table 13. Effect of Thomsonide on Gastrointestinal Transit Rate in Mice.

	N	Gastrointestinal Transit Rate (%)
Vehicle	17	57.32±2.75
Thomsonide		
6.25 mg/kg	9	64.25±2.58
25 mg/kg	9	78.31±3.13**
100 mg/kg	8	76.32±4.11**

\*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)  
Significantly different from Control.

## 第 2 項 消化管輸送能低下マウスに対する影響

### 実験方法

16 時間絶食したマウスへ *l*-Dopa 300 mg/kg を皮下投与後、25 分後に葛花トムソナイド 25, 100, 400 mg/kg を経口投与し、さらに 5 分後に 5% 炭素末を経口投与した。炭素末投与 20 分後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺しただちに胃から盲腸までを摘出して全小腸の長さ、炭素末の移動した長さを計測し、小腸の長さに対する炭素末の移動した長さの割合として消化管輸送率を算出した。対照群は葛花トムソナイドの代わりに 5% アラビアゴム溶液を経口投与し、正常群は *l*-Dopa の代わりに Tween 80 と生理食塩液 (1:19) の混液を皮下投与した。

### 実験結果

*l*-Dopa 300 mg/kg を皮下投与すると、消化管輸送率は正常群の 54.13±3.05%か

ら  $36.72 \pm 2.87\%$ へと有意な低下が認められた。このような輸送能の低下したモデルにおいて、葛花トムソナイドの影響を検討したところ、葛花トムソナイド 25 mg/kg 投与群では  $48.38 \pm 3.51\%$ 、100 mg/kg 投与群では  $56.13 \pm 5.60\%$ 、400 mg/kg 投与群では  $60.78 \pm 4.59\%$ とほぼ用量依存的に低下した輸送率を回復する傾向がみられた。特に 100, 及び 400 mg/kg 投与群では、対照群に比べて有意な増加が認められた(Table 14)。

Table 14. Effect of Thomsonide on Gastrointestinal Transit Rate in *l*-Dopa 300 mg/kg (s.c.) Treated Mice

	N	Gastrointestinal Transit Rate (%)
Normal	11	$54.13 \pm 3.05^{**}$
Control	11	$36.72 \pm 2.87$
Thomsonide		
25 mg/kg	8	$48.38 \pm 3.51$
100 mg/kg	8	$56.13 \pm 5.60^{**}$
400 mg/kg	8	$60.78 \pm 4.59^{**}$

\*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)  
Significantly different from Control.

### 第3節 考察

「酒毒」すなわち二日酔いの諸種症状の中には、頭痛頭重、倦怠感、などととも、吐き気、胸焼け、胃部不快感、軟便など消化器系に関連した症状発現が多く見られている。その原因は主にアルコールの消化管粘膜への直接刺激による高浸透圧性食道炎、胃炎の発生によるものと考えられている<sup>42)</sup>。葛花の薬能で「酒の毒を消す消酒効果」を謳っているその言葉の中には、アルコールの消化管粘膜傷害に対する保護的な作用を意味している可能性が推察される。大量のアルコールが胃粘膜障害を誘発することについては広く知られているが、葛花の消化管粘膜に対する作用についての研究報告は見あたらない。本研究では主にこの点に着目し、葛花トムソナイドの胃粘膜保護作用について評価するとともに、その他消化管機能への影響についても検討した。

まず、アルコールによるラット胃粘膜直接刺激に対する影響について、葛花トムソナイドはこの胃粘膜損傷を100~400 mg/kgの用量でほぼ用量依存的に抑制することが示唆され、標準薬として用いたテプレノンと同様に薬理的に葛花の胃粘膜保護作用が確認された。また、葛花トムソナイドはラットの胃粘膜のプロスタグランジン含量に対して、胃粘膜 PGE<sub>2</sub>、並びに 6-Keto PGF<sub>1α</sub> 含量を対照ラットに比べて有意に増加させた。さらに、アルコール誘発性胃粘膜損傷に対する葛花トムソナイド及びテプレノンの改善作用は Cyclooxygenase (COX) 阻害剤であるインドメタシンの前処置により減弱した。国内で開発された抗潰瘍薬であるテプレノンは<sup>73)</sup>エタノール誘発性胃粘膜損傷を抑制し<sup>74)</sup>、また Cyclooxygenase-2 (COX-2)の誘導により胃粘膜の PGE<sub>2</sub> 含量を増加させること<sup>75)</sup>がすでに明らかとなっており、本研究で示唆された事実とほぼ一致した。Robertらは<sup>68)</sup>酸分泌抑制作用とは別にプロスタグランジンには胃粘膜保護作用を有する性質があり、これを「Cytoprotection」という言葉で表現し、プロスタグランジンにはエタノールをはじめ多くの浸食性の薬物などによる消化管粘膜の傷害に対して保護的作用を示すことが知られるようになった。Arakiらは<sup>76)</sup>内因



性の PGE<sub>2</sub> は EP<sub>1</sub>-receptor を介して胃粘膜保護作用を有することを報告し、この「Cytoprotection」の作用は PGE<sub>2</sub> に由来するものであることが明らかとなり、テプレノンをはじめとした多くの抗潰瘍薬でも胃粘膜の PGE<sub>2</sub> を増加させる作用を持ち合わせている。これらの点を考慮すると、葛花トムソナイドがテプレノン同様にアルコール誘発性胃粘膜損傷を抑制し、また胃粘膜 PGE<sub>2</sub> 含量を増加させたことから葛花トムソナイドの胃粘膜保護作用は胃粘膜で増加した内因性の PGE<sub>2</sub> の Cytoprotective な作用によることが明らかとなった。また、葛花トムソナイドは PGI<sub>2</sub> の安定的代謝産物である 6-Keto PGF<sub>1α</sub> の含量を増加させたことから、葛花トムソナイドには胃粘膜の PGI<sub>2</sub> の増加作用を有することも明らかとなった。PGI<sub>2</sub> は食後の血清ガストリン濃度を増加させる<sup>77)</sup>とともに胃粘膜の血流を増加させることが示唆されている<sup>78)</sup>。これらの点を考慮すると、アルコール誘発性胃粘膜損傷に対する葛花トムソナイドの保護効果は PGE<sub>2</sub> による Cytoprotection の作用に加えて、胃粘膜の 6-Keto PGF<sub>1α</sub> の前駆体である PGI<sub>2</sub> の含量を増加させ、胃粘膜血流を増加させることにより胃粘膜保護効果を示したものと考えられる。葛花に含まれる Soyasaponin I のような Oleanene-type Triterpenoid saponin にはアルコール誘発性胃粘膜損傷に対して保護作用を示すことがすでに明らかとなっている<sup>79)</sup>。さらに、Oleanolic acid には COX-2 を介した PGE<sub>2</sub> の遊離を促進させる作用のあることも示唆されている<sup>80)</sup>。以上の事実を考え合わせると、葛花トムソナイドの含有成分である Soyasaponin I が COX-2 の誘導を介し胃粘膜の PGE<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> を増加させることにより、アルコール誘発性胃粘膜傷害から胃粘膜を保護したものと推察される。Cytoprotective な作用を持ち合わせている葛花トムソナイドが、アルコール誘発性胃粘膜損傷を抑制したことは、二日酔い時における吐き気、胸焼け、胃部不快感の症状改善につながることを意味し、葛花の消化器系における「酒毒に対する消酒効果」が、本研究により薬理的に明らかとなった。また、葛花トムソナイドは 25~100 mg/kg の用量で正常マウスの消化管輸送能を増加させるとともに、*l*-Dopa によ

り胃運動の低下したマウスの輸送能を 25~400 mg/kg の用量で改善する作用を示し、葛花トムソナイドには消化管運動亢進作用を持ち合わせていることも明らかとなった。アルコールは胃内容物排泄時間を遅延させることが知られており、Phaosawasdi ら<sup>81)</sup>によるとアルコールの胃運動抑制作用に由来するものであると推察されている。さらにこの効果は胃内容物中のアルコール濃度に依存するとされており、低濃度では促進するもののある一定濃度以上の高濃度では胃内容物排泄時間を遅延させ、二日酔い時の「胃もたれ」、「むかつき」の症状を誘発させる原因ともなっている<sup>82)</sup>。葛花トムソナイドがマウスの消化管輸送能を亢進させた本研究における新たな知見は、葛花トムソナイドが胃運動低下による胃内容物排泄低下に対して、改善する作用を持ち合わせており、このことが二日酔い時の「胃もたれ」や「むかつき」の症状の改善につながる可能性を示唆するものである。葛花の消化器系における「酒毒」に対する消酒効果は、胃粘膜 PG 含量の増加に基づく Cytoprotection, 及び胃粘膜血流増加作用に加えて、消化管輸送能亢進作用に由来した効果の複合により裏付けられたものであることが、本研究により明らかとなった。

## 第6章 アルコール記憶障害に関する検討

飲酒による酩酊は主としてアルコールの中樞神経系への作用が大きく影響している。アルコールは麻酔薬と類似の作用を示すが、麻酔薬よりも発揚期が長く、初期の段階ではみかけ上ある種の興奮作用が生じる。この興奮作用は網様体賦活系の抑制作用によるもので、脳の多くの興奮領域を調節している上位中枢の阻害コントロール機構が抑制される為、その阻害から解放された結果生じる現象に由来し、これを開放現象と呼んでいる。そのため発揚期は、抗不安、緊張緩和、気分高揚、多弁、情緒不安定といった精神症状を呈するが、その後は段階的に上位中枢を抑制する為、識別能、記憶、集中力、洞察力の低下や運動失調が生じる。本章ではアルコールによる「酔い」から派生する健忘症<sup>83)</sup>並びに記憶学習障害<sup>84)</sup>に対する葛花の作用を検討することにより、中枢における「酒毒」に対する葛花の消酒効果を検証するとともに、加えてヒトのアルツハイマー型認知症の原型モデルと考えられている Scopolamine 誘発性学習障害に対する効果についても検討した。

### 試料の調製

葛花トムソナイド (Lot. S-0046709)

第1章で示した抽出方法により作製した葛花トムソナイドを使用した。

(成分含量)

イソフラボノイド含量 ;	(mg/Thomsonide 100 mg)
6-Hydroxygenisn 6,7-di- <i>O</i> -glucoside	4.27
Glycitin	5.44
Tectorigenin 7- <i>O</i> -xylosylglucoside	13.51
Tectoridin	7.63
Glycitein	1.74

Tectorigenin	2.22
トリテルペノイドサポニン含量；	
Soyasaponin I	1.67
Kaikasaponin III	2.03

## 第 1 節 エタノール誘発性記憶学習障害に対する葛花の影響

### 第 1 項 エタノール誘発性記憶登録障害に対する葛花トムソナイドの影響

#### 実験方法

Zhang ら<sup>85)</sup>の方法に準拠して行った。マウスへ葛花トムソナイドを経口投与し、10分後に30%エタノール 3g/kg を経口投与し、さらに20分後に Step-Through 法による受動的回避反応を観察した。すなわち、獲得試行として等容積の明室及び暗室よりなるオープンフィールドのうち明室領域へマウスを3分間入れ、マウスが暗室へ入るまでの時間を測定するとともに、尾部が完全に暗室へ入った時点で 0.4 mA の電気刺激を与えた。翌日、保持試行として再びマウスを明室内へ5分間入れ、暗室へ入るまでの時間(潜時: Latency)を測定した。さらに、獲得試行では3分、保持試行では5分以内に暗室へ入らなかったものの潜時はそれぞれ3分及び5分とみなし、保持試行で暗室へ入らなかったマウスの割合を成功率として算出し対照群と比較した。なお、葛花トムソナイドは 1% CMC-Na に懸濁し、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で経口投与した。対照群は 1% CMC-Na を投与し、正常群は被検薬物の代わりに 1% CMC-Na を、30%エタノールの代わりに精製水を経口投与した。

## 実験結果

獲得試行として初日に明室へ入れたマウスは試行錯誤の末すべて 3 分以内に暗室へ入り電気ショックを経験した。暗室へ入るまでの潜時は、正常群の  $41.36 \pm 10.95$  sec に比べてエタノールを投与した Control 群の  $10.95 \pm 4.22$  sec は有意な短縮が認められ、エタノールによる思考能力の低下が観察されたが、Control 群と各葛花トムソナイド投与群、すなわち、125 mg/kg 投与群の  $17.75 \pm 4.49$  sec、250 mg/kg 投与群の  $9.50 \pm 2.09$  sec、500 mg/kg の  $5.58 \pm 14.31$  sec、各々との間で違いは見られなかった(Table 15)。一方、翌日行った保持試行においては正常群では 14 例中 13 例まで 5 分間の観察時間中暗室へ移動しなかったが、Control 群および葛花トムソナイド投与群ではすべての動物が暗室へ移動した。その潜時については Control 群の  $34.57 \pm 7.03$  sec は正常群の  $296.71 \pm 3.29$  sec に比べて有意な短縮が認められた。また、葛花トムソナイド投与群では Control 群と比較して 125 mg/kg 投与群で  $61.25 \pm 14.07$  sec、250 mg/kg 投与群で  $75.08 \pm 26.6$  sec、500 mg/kg 投与群で  $95.75 \pm 20.97$  sec と用量依存的に潜時の延長が見られ、正常群の値へと回復する傾向がみられた。特に 500 mg/kg 投与群では Control 群に比べて有意な延長が認められた。成功率で比較すると正常群は 92.86%、Control 群は 0%であり、エタノールの投与により成功率の有意な低下が認められたが、Control 群と葛花トムソナイド投与群の間では有意差は認められなかった(Table 15)。しかし、保持試行の際、個々の動物が暗室へ入るにあたって葛花トムソナイド投与群では繰り返し暗室へ入ろうか入るまいか躊躇する行動が観察された。以上の結果、葛花トムソナイドはエタノール誘発性健忘症の中でも記憶登録障害モデルに対して抑制する作用を示すことが示唆された。

Table 15. Effect of Thomsonide on Ethanol-induced Impairment of Memory Registration in a Passive Avoidance Task in Mice

	N	Acquisition Trial		Latency (sec)		Success Rate (%)
				Retention Trial		
Memory registration						
Normal	14	41.36	±10.95 *	296.71	± 3.29 **	13/14 (92.86)++
Control	14	10.93	± 4.22	34.57	± 7.03	0/14 (0)
Thomsonide						
125 mg/kg	12	17.75	± 4.49	61.25	±14.07	0/12 (0)
250 mg/kg	12	9.50	± 2.09	75.08	±26.60	0/12 (0)
500 mg/kg	12	5.58	±14.31	95.75	±20.97 **	0/12 (0)

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)

Significantly different from Control.

++  $p < 0.01$  (Chi-square test) Significantly different from Control.

## 第2項 エタノール誘発性記憶呼び出し障害に対する葛花トムソナイドの影響

### 実験方法

Zhang ら<sup>85)</sup>の方法に準拠し、マウスの Step-Through 法による受動的回避反応を観察した。すなわち、獲得試行として等容積の明室及び暗室よりなるオープンフィールドのうち明室領域へマウスを3分間入れ、マウスが暗室へ入るまでの時間を測定するとともに、尾部が完全に暗室へ入った時点で0.4 mAの電気刺激を与えた。翌日、保持試行として葛花トムソナイドを経口投与10分後に40%エタノール4 g/kg (p.o.)を投与し、さらに20分後に再びマウスを明室内へ5分

間入れ、暗室へ入るまでの時間(潜時: Latency)を測定した。さらに、獲得試行では3分、保持試行では5分以内に暗室へ入らなかったものの潜時はそれぞれ3分及び5分とみなし、保持試行で暗室へ入らなかったマウスの割合を成功率として算出し対照群と比較した。葛花トムソナイドは1% CMC-Naに懸濁し、体重10gあたり0.1mLの割合で投与した。対照群は葛花トムソナイドの代わりに1% CMC-Naを、正常群は葛花トムソナイドの代わりに1% CMC-Naを40% エタノールの代わりに精製水を、それぞれ経口投与した。なお、40% エタノールの投与により筋弛緩を誘発し全く歩行不能となったマウスはデータより除外した。

## 実験結果

獲得試行として初日に明室へ入れたマウスは試行錯誤の末すべて3分以内に暗室へ入り電気ショックを経験した。各群の潜時を比較すると正常群の $19.64 \pm 3.76$  sec と Control 群の $19.91 \pm 2.62$  sec の間で有意差は認められず、また Control 群と各葛花トムソナイド群、すなわち125 mg/kg 投与群の $21.43 \pm 4.81$  sec、250 mg/kg 投与群の $17.93 \pm 2.50$  sec、500 mg/kg 投与群の $27.73 \pm 5.41$  sec、との間でもそれぞれ有意差は認められなかった(Table 16)。翌日行った保持試行においては正常群では14例中13例まで5分間の観察時間中暗室へ移動しなかったが、Control 群では筋弛緩により歩行不能となった動物を除き、すべての動物が暗室へ移動したのに対して、葛花トムソナイド投与群では暗室へ移動しない動物が125~500 mg/kg 投与群においてそれぞれ1例ずつ認められた。各々潜時について比較すると、Control 群では $52.45 \pm 10.97$  sec と正常群の $295.50 \pm 4.50$  sec に比べて有意に短縮したが、葛花トムソナイド投与群では Control 群と比較して潜時の延長が見られ、125 mg/kg 投与群で $90.00 \pm 22.09$  sec、250 mg/kg 投与群で $60.71 \pm 22.62$  sec、500 mg/kg 投与群で $139.53 \pm 19.13$  sec と正常群の値へと回復する傾向がみられた。特に500 mg/kg 投与群では Control 群に比べて有



意な延長が認められた。成功率で比較すると正常群は 92.86%, Control 群は 0% でありエタノールの投与により成功率の有意な低下が認められたが、Control 群と葛花トムソナイド投与群との間では有意差は認められなかった (Table 16)。しかし、保持試行の際には、記憶登録障害の場合と同様に個々の動物が暗室へ入るにあたって、葛花トムソナイド投与群では繰り返し暗室へ入ろうか入るまいか躊躇する行動が観察された。以上の結果、葛花トムソナイドはエタノール誘発性健忘症の中でも第 1 項で示した記憶登録障害の改善に加えて、記憶の呼出しの障害に対しても改善する作用を示すことが示唆された。

Table 16. Effect of Thomsonide on Ethanol-induced Impairment of Memory Retrieval in a Passive Avoidance Task in Mice

	N	Acquisition Trial	Latency (sec)		Success Rate (%)
			Retention Trial		
Memory retrieval					
Normal	14	19.64 ± 3.76	295.50 ± 4.50 **		13/14 (92.86)++
Control	11	19.91 ± 2.62	52.45 ± 10.97		0/11 (0)
Thomsonide					
125 mg/kg	14	21.43 ± 4.81	90.00 ± 22.09		1/14 (7.14)
250 mg/kg	14	17.93 ± 2.50	60.71 ± 22.62		1/14 (7.14)
500 mg/kg	15	27.73 ± 5.41	139.53 ± 19.13 **		1/15 (6.67)

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)

Significantly different from Control.

++  $p < 0.01$  (Chi-square test) Significantly different from Control.



## 第 2 節 Scopolamine 誘発性記憶障害に対する葛花トムソナイドの影響

### 実験方法

第 1 節で記した方法と同様に Zhang ら<sup>85)</sup>の方法に準拠して行った。マウスへ葛花トムソナイドを経口投与し、10 分後に Scopolamine 0.5 mg/kg (i.p.)を投与し、さらに 20 分後に Step-Through 法による受動的回避反応を観察した。すなわち、獲得試行として等容積の明室及び暗室よりなるオープンフィールドのうち明室領域へマウスを 3 分間入れ、マウスが暗室へ入るまでの時間を測定するとともに、尾部が完全に暗室へ入った時点で 0.4 mA の電気刺激を与えた。翌日、保持試行として再びマウスを明室内へ 5 分間入れ、暗室へ入るまでの時間(潜時: Latency)を測定した。さらに、獲得試行では 3 分、保持試行では 5 分以内に暗室へ入らなかったものの潜時はそれぞれ 3 分及び 5 分とみなし、保持試行で暗室へ入らなかったマウスの割合を成功率として算出し対照群と比較した。なお、葛花トムソナイドは 1% CMC-Na に懸濁し、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で経口投与し、対照群は 1% CMC-Na を投与した。また、正常群は被検薬物の代わりに 1% CMC-Na を、Scopolamine の代わりに生理食塩水を投与した。

### 実験結果

獲得試行として初日に明室へ入れたマウスは試行錯誤の末すべて 3 分以内に暗室へ入り電気ショックを経験した。各群の潜時を比較すると正常群の  $19.31 \pm 2.62$  sec と Control 群の  $33.25 \pm 5.81$  sec との間で有意差は認められず、また Control 群と各葛花トムソナイド群、すなわち 125 mg/kg 投与群の  $41.92 \pm 8.44$  sec、250 mg/kg 投与群の  $49.85 \pm 7.38$  sec、500mg/kg 投与群の  $56.75 \pm 8.12$  sec との間でそれぞれ有意差は認められなかった(Table 17)。翌日行った保持試行においては正常群では 13 例中 11 例まで 5 分間の観察時間中暗室へ移動しなかったが、Control 群では 12 例中 11 例までが暗室へ移動したのに対して、葛花トム

ソナイド投与群では暗室へ移動しない動物が 125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg 投与群でそれぞれ 13 例中 3 例、13 例中 4 例、12 例中 6 例が認められた。各潜時について比較すると、Control 群では  $116.08 \pm 23.66$  sec と正常群の  $292.46 \pm 6.33$  sec に比べて有意に短縮したが、葛花トムソナイド投与群では 125 mg/kg 投与群で  $189.69 \pm 27.69$  sec、250 mg/kg 投与群で  $197.46 \pm 24.63$  sec、500 mg/kg 投与群で  $253.00 \pm 19.38$  sec と Control 群と比較して用量依存的に潜時の延長が見られ、正常群の値へと回復する傾向がみられた。特に 250 及び 500 mg/kg 投与群では Control 群に比べて有意な延長が認められた。成功率で比較すると正常群は 84.62 %, Control 群は 8.33 %であり、Scopolamine の投与により成功率の有意な低下が認められたが、葛花トムソナイド投与群では 125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg でそれぞれ 23.08%, 30.77%, 50.00%と用量依存的に成功率の回復が見られた。特に葛花トムソナイド 500 mg/kg 投与群は Control 群と比べて有意差が認められた (Table 17)。以上の結果、葛花トムソナイドはエタノール誘発性健忘症に加えて Scopolamine 誘発性健忘症に対しても改善作用が認められた。

Table 17. Effect of Thomsonide on Scopolamine-induced Impairment of Memory Registration in a Passive Avoidance Task in Mice

	N	Acquisition Trial	Latency (sec)		Success Rate (%)
			Retention Trial		
Normal	13	19.31 ± 2.62	292.46 ± 6.33 **		11/13 (84.62)++
Control	12	33.25 ± 5.81	116.08 ± 23.66		1/12 (8.33)
Thomsonide					
125 mg/kg	13	41.92 ± 8.44	189.69 ± 27.69		3/13 (23.08)
250 mg/kg	13	49.85 ± 7.38	197.46 ± 24.63 *		4/13 (30.77)
500 mg/kg	12	56.75 ± 8.12	253.00 ± 19.38 **		6/12 (50.00)+

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's multiple range test)

Significantly different from Control.

+  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$  (Chi-square test)

Significantly different from Control.

### 第3節 考察

本章では中枢神経系に対するアルコールの作用の中でも、飲酒による健忘症という点に着目し、葛花の記憶学習に及ぼす影響について検討を行った。保持試行でマウスが暗室へ入るまでの潜時時間はエタノールを負荷することにより短縮され、マウスの受動的回避反応は抑制されたが葛花トムソナイドはこの短縮した潜時を改善させたことから、エタノールによる記憶の登録及び呼び出しの障害に対して改善作用を示すことが示唆された。すなわち、葛花トムソナイドは抗健忘作用を持ち合わせているとともに、昔から伝統的に葛花が二日酔いによる諸種症状を改善する目的で用いられてきた「酒毒」に対する消酒効果は、アルコールの中枢神経系における障害に対しても波及していることが明らかとなった。また、本研究では葛花トムソナイドが **Scopolamine** 誘発性の記憶登録障害に対しても改善作用を示すことが明らかとなった。学習記憶についてはコリン作動性神経系が重要な役割を担っていることが知られており<sup>86)</sup>、脳内のコリン作動性神経系に対して作用する薬物はヒトや動物の学習記憶に影響を及ぼすことが明らかとなっている<sup>87)</sup>。たとえば、急性的にエタノールを摂取すると大脳皮質でのアセチルコリンの遊離<sup>88)</sup>及び代謝回転が低下すること<sup>89)</sup>、また Nabeshima ら<sup>90)</sup>によるとコリンエステラーゼ阻害剤であるフィゾスチグミンはエタノール誘発性健忘症を部分的に改善することが報告されている。すなわち、エタノール誘発性の学習記憶障害は部分的なコリン作動性神経系の低下によってもたらされることが示唆されている。以上の点を考慮すると、**Scopolamine** による学習記憶障害に対する葛花トムソナイドの改善作用は、コリン作動性神経系の調節によるものであらうと考えられる。一方、葛花はイソフラボノイドとトリテルペノイドサポニンを豊富に含んでおり<sup>91)</sup>、このイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンは記憶の改善作用のあることが示唆されている。イソフラボノイドは植物性ホルモンで、エストロゲンレセプターに対して弱い agonist としての活性を持ち合わせており、エストロゲンは選択的に記憶保持に

影響を及ぼすとともにコリン作動性神経系と相互に作用することによって記憶の調節に関与していることが Packard により報告されている<sup>92)</sup>。つまり、植物性ホルモンであるイソフラボノイドは、エストロゲンレセプターを介してコリン作動性神経機能を維持させることにより、記憶の上昇を促すことが支持されており、この点を考慮すると、葛花トムソナイドのアルコールやスコポラミンによる学習記憶障害に対する改善作用は、含有するテクトリジンなどのイソフラボノイドによるコリン作動性神経機能の上昇の結果であろうと推察される。一方、ニンジン中のサポニン成分の1つである Rb1 もコリン作動性神経機能を上昇させ、実験動物で記憶学習の障害を改善させる効果を示し<sup>93)</sup>、また Saito らは Rb1 が神経成長因子の作用を促進させることを報告している<sup>94)</sup>。これらの点を考慮すると、葛花トムソナイドがマウスの受動的回避反応における記憶学習障害を改善にさせたのは、イソフラボノイドに加えて葛花トムソナイドに含まれるトリテルペノイドサポニンである、Soyasaponin I や Kaikasaponin III も関与しているものと推察される。以上の結果、葛花トムソナイドは中枢神経系におけるアルコールの機能障害に対して抗健忘作用を持ち合わせていることが示唆されるとともに、この結果は葛花が昔からアルコールの作用をうち消す消酒効果の役割を担っているということを支持するものである。さらに、葛花トムソナイドが Scopolamine 誘発性の記憶登録障害を改善したことは、Scopolamine 誘発性健忘症が一般的な学習記憶障害のモデルとして幅広く利用されていることを考慮すると、葛花は臨床的にも老化による記憶障害や認知症の予防にも応用できるものと考えられる。

## 総 括

著者は、葛花の「酒毒」に対する消酒効果を薬理的に裏付ける事を目標にアルコールによる各種障害に対する葛花抽出物の影響について検討を行った。葛植物の中でもその根、葛根については「葛根湯」に代表されるごとく、漢方における効能効果とともに薬理的にも多くの研究がなされ、主にその作用は含有されるイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンに起因することが明らかとなっている。一方、葛花は葛根と効能効果は異なっているものの含有される成分は葛根とほぼ同様に類似のイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンを豊富に含有している。著者は葛花よりその主な成分であるイソフラボノイド及びトリテルペノイドサポニンを豊富に含む抽出物を得、これを葛花トムソナイドと命名し、この抽出物の安全性を確認した(第1章)。続いて、ヒトのアルコール代謝に及ぼす葛花エキスの影響について検討したところ、葛花エキスは飲酒後のヒトの血中アセトアルデヒドの消失を促進させることが明らかとなり、その作用機序はP-450(CYP)2E1誘導を介したアセトアルデヒド代謝促進、あるいは糸球体濾過率増加に伴うアセトアルデヒドの尿中クリアランス増加作用によるものと考えられ、いずれもその活性の本体は葛花の主な成分イソフラボノイドに起因するものと推察された(第2章)。

次に、マウスのアルコール致死に対する葛花トムソナイドの影響を観察したところ、マウスのアルコール致死を低下させたことから、急性アルコール中毒の予防改善作用が確認され、葛花の「酒毒」に対する消酒効果の一端が明らかとなった(第3章)。葛花トムソナイドのアルコール致死低下作用は、救命作用とともに延命作用も確認されこの延命作用が肝機能の改善作用に起因する可能性から、あらためてマウスの急性アルコール性肝障害に対するトムソナイドの作用について検討を行った。その結果葛花トムソナイドはリボフラビン、アスコルビン酸、システインとともに肝機能のマーカーである血清AST/ALTの上昇

を抑制し葛花トムソナイドが肝保護作用を示すことが明らかとなり、その活性の本体は含有されるイソフラボノイド並びにトリテルペノイドサポニンの抗酸化作用に起因することが示唆された(第4章)。

消化器系においては、葛花トムソナイドは胃粘膜保護薬テプレノン同様にアルコール誘発性の胃粘膜損傷を抑制し、また胃粘膜のプロスタグランジンの産生を増加させた。その作用はトリテルペノイドサポニンが関与している可能性が示唆された。すなわち、トムソナイドは消化器系に対しては「Cytoprotection」としての作用も持ち合わせていることが明らかとなり、また消化管輸送能亢進作用が認められたことから「胃もたれ」や「むかつき」等の症状改善が期待できる点で、葛花の「酒毒」に対する消酒効果は消化器系にも波及していることが明らかとなった(第5章)。そして、さらに葛花トムソナイドはマウスのアルコールによる学習記憶の障害に対しても改善作用が認められ、その作用は主にイソフラボノイドの Phytoestrogen 作用を介したコリン作動性神経の亢進作用が考えられ、トムソナイドが Scopolamine 誘発性健忘のモデルに対しても抗健忘作用が認められた点からも、この機序は明らかとなった。またトムソナイドの学習記憶の改善作用はニンジン中に含まれるサポニンの神経成長因子促進作用と同様に、トムソナイド中のトリテルペノイドサポニンによる可能性も推察される(第6章)。

本研究を通じて、「酒毒」に対する葛花の消酒効果はアルコール代謝、肝保護作用から消化器系における Cytoprotection をはじめ、中枢神経系における学習記憶改善作用に至るまで、薬理的には幅広い作用を担っておりしかも、その活性は含有されるイソフラボノイドとトリテルペノイドサポニンがそれぞれ適材適所に作用することにより効果を発揮していることが明らかとなった。



## 引用文献

- 1) 丹野興三太、葛根の解熱作用に就いて、日薬物誌、**33**, 263-168 (1941).
- 2) 許鴻源、許照信 原著、水野修一 訳注、戸田静男 共訳、臨床医のための図解 常用漢方方剤、雄渾社、1990.
- 3) 柴田承二、木村孝夫、西川嘉廣、日本及び中国生薬の成分研究(第1報) 葛根の成分について その1、薬誌、**79**, 757-760 (1959).
- 4) 栗原藤三郎、菊池正雄、花の成分研究(第5報) 葛花の成分について その2、新規イソフラボン配糖体の分離、薬誌、**95**, 1283-1285 (1975).
- 5) 栗原藤三郎、菊池正雄、花の成分研究(第6報) 葛花の成分について その3、薬誌、**96**, 1486-1488 (1976).
- 6) Ohshima Y., Okuyama T., Takahashi K., Takizawa T., Shibata S., Isolation and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of Isoflavonoids from the Pueraria Root, *Planta Medica*, **54**, 250-254 (1988).
- 7) Kinjo J., Furusawa J., Baba J., Takeshita T., Yamasaki M., Nohara T., Studies on the Constituents of *Pueraria lobata*. III Isoflavonoids and Related Compounds in the Roots and the Voluble Stems, *Chem.Pharm.Bull.*, **35**, 4848-4850 (1987).
- 8) 三浦孝次、竹田隆昌、中本泰正、斉藤晴生、葛根の化学及び薬理学的研究、応用薬理、**5**, 247-254 (1971).
- 9) 中本泰正、斉藤晴生、岩崎有紀、葛根の水溶性抽出物の研究(第2報) 活性エキス(MTF-101)とアセチルコリンとの生物学的相違について、薬誌、**95**, 1128-1132 (1975).
- 10) 柴田承二、原田正敏、村上孝夫、和漢薬成分の研究(第2報) 葛根成分の鎮痙作用について、薬誌、**79**, 863-866 (1959).
- 11) 中本泰正、岩崎有紀、木津治久、葛根の水溶性抽出物の研究(第4報) 葛根の活性エキス(MIF-101)からのダイジン単離並びにその体温降下作用と鎮痙作



- 用について、薬誌、**97**, 103-105 (1977).
- 12) 陣存仁 著、図説漢方医薬大辞典<中国薬学大典>第1巻、講談社、1982, p. 66.
- 13) 中薬大辞典、第1巻 上海科学技術出版社、小学館編、1985, p 291.
- 14) Hsu F. L., Liu I. M., Kuo D. H., Chuen W. C., Su H. C., Cheng J. T.,  
Antihyperglycemic Effect of Puerarin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats,  
*Journal of Natural Products*, **66**, 788-792 (2003).
- 15) Chen W. C., Hayakawa S., Yamamoto T., Su H. C., Liu I. M., Cheng J. T.,  
Mediation of  $\beta$ -Endorphin by the Isoflavone Puerarin to Lower Plasma Glucose in  
Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Planta Medica*, **70**, 113-116 (2004).
- 16) Morito K., Hirose T., Kinjo J., Hirakawa T., Okawa M., Nohara T., Ogawa S.,  
Inoue S., Muramatsu M., Masamune Y., Interaction of Phytoestrogens with  
Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 351-356 (2001).
- 17) Morito K., Aomori T., Hirose T., Kinjo J., Hasegawa J., Ogawa S., Inoue S.,  
Muramatsu M., Masamune Y., Interaction of Phytoestrogens with Estrogen  
Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (II), *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 48-52 (2002).
- 18) 江蘇新医学院(編)、「中薬大辞典(下冊)」、上海人民出版社、上海、1977, p.  
2307.
- 19) Kubo K., Shimada T., Onishi R., Tsubata M., Kamiya T., Nagamine R., Iizuka S.,  
Sai Y., Amagaya S., Aburada M., Miyamoto K., Puerariae Flos Alleviates  
Metabolic Diseases in Western Diet-loaded, Spontaneously Obese Type 2 Diabetic  
Model Mice, *Journal of Natural Medicines*, **66**, 622-630 (2012).
- 20) 栗原藤三郎、菊池正雄、花の成分研究(第1報)葛花の成分について、薬誌、  
**93**、1201-1205 (1973).
- 21) Kubo M., Sasaki M., Namba K., Naruto S., Nishimura H., Isolation of a New  
Isoflavone from Chinese Pueraria Flowers, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2449-2451

- (1975).
- 22) Kinjo J., Takeshita T., Abe Y., Terada N., Yamashita H., Yamasaki M., Takeuchi K., Murakami K., Tomimatsu T., Nohara T., Studies on the Constituents of *Pueraria lobata*. IV. Chemical Constituents in the Flowers and the Leaves, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1174-1179 (1988).
- 23) Kinjo J., Aoki K., Okawa M., Shii Y., Hirakawa T., Nohara T., Nakajima Y., Yamazaki T., Hosono T., Someya M., Niiho Y., Kurashige T., HPLC Profile Analysis of Hepatoprotective Oleanene-Glucuronides in *Puerariae* Flos, *Chem. Pharm. Bull.*, **47** 708-710 (1999).
- 24) Niiho Y., Nakajima Y., Yamazaki T., Okamoto M., Tsuchihashi R., Kodera M., Kinjo J., Nohara T., Simultaneous analysis of isoflavones and saponins in *Pueraria* flowers using HPLC coupled to an evaporative light scattering detector and isolation of a new isoflavone diglucoside, *Journal of Natural Medicine*, **64**, 313-320 (2010).
- 25) Irwin S., "Animal and Clinical Pharmacological Techniques in Drug Evaluation," ed. by Nodine J. H. & Siegler P. E., Year Book Medical Publishers, 1964, p. 36.
- 26) 中島嘉二郎、染谷雅子、細野剛、山崎 律、新甫勇次郎、大川雅史、野原稔弘、金城順英、葛花の成分研究(VII)葛花中のイソフラボンの定量、日本生薬学会第47回(2000年)年会、東京、講演要旨集。
- 27) 新甫勇次郎、山崎律、中島嘉次郎、伊東 宏、竹下尚、金城順英、野原稔弘、葛花の薬理学的研究(第1報)葛花のアルコール代謝並びにマウス自発運動に対する影響、薬誌、**109**, 424-431 (1989).
- 28) 新甫勇次郎、山崎 律、中島嘉次郎、伊東 宏、竹下 尚、金城順英、野原稔弘、葛花の薬理学的研究(第2報)アルコール誘発性の代謝異常並びに実験的肝障害に対する葛花の影響、薬誌、**110**, 604-611 (1990).
- 29) Tottmar S. O. C., Peterson H., Kiessling K. H., The Subcellular Distribution and

- Properties of Aldehyde Dehydrogenase in Rat Liver, *Biochem. J.*, **135**, 577-586 (1973).
- 30) Watanebe K., Narimatsu S., Yamamoto I., Yoshimura H., Oxygenation Mechanism in Conversion of Aldehyde to Carboxylic Acid Catalyzed by a Cytochrome P-450 Isozyme, *J. Biol. Chem.*, **266**, 2709-2711 (1991).
- 31) Kunitoh S., Asai H., Imaoka S., Funase Y., Monna T., Metabolism of Acetaldehyde to Acetate by Rat Hepatic P-450s: Presence of Different Metabolic Pathway from Acetaldehyde Dehydrogenase System, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **20**, 1 Suppl. 22A-24A (1996).
- 32) 飯樋洋二、高橋信江、岩間昌彦、菅家祐輔、ラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす味その影響、*食衛誌*、**33**, 17-22 (1992).
- 33) Kishida T., Ataki H., Takebe M., Ebihara K., Soybean Meal Fermented by *Aspergillus awamori* Increases the Cytochrome P-450 Content of the Liver Microsomes of Mice, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1367-1372 (2000).
- 34) Gimenez I., Martinez R. M., Lou M., Mayoral J. A., Garay R. P., Alda J. O., Salidiuretic Action by Genistein in the Isolated, Perfused Rat Kidney, *Hypertension*, **31**, 706-711 (1998).
- 35) Gimenez I., Lou M., Vargas F., Alvarez-Guerra M., Mayoral J. A., Martinez R. M., Garay R. P., Alda J. O., Renal and Vascular Actions of Equol in the Rat, *Journal of Hypertension*, **15**, 1303-1308 (1997).
- 36) 石井裕正、加藤真三、急性アルコール中毒とその治療、*クリニカ*、**12**, 874-877 (1983).
- 37) 須田都三男、文豊、松生恒夫、三上誠、神尾裕、小笠原久隆、堀口正晴、アルコール性肝障害に及ぼすアミノ酸の影響、アルコール代謝と肝、5, 東洋書店、1986, pp 207-214.
- 38) 中西穎央、アルコールの薬理作用—神経伝達とアルコール—、*治療学*、**4**,

- 579-584 (1980).
- 39) Erickson C. K., Burnam W. L., Cholinergic Alteration of Ethanol-Induced Sleep and Death in Mice, *Agents and Actions*, **2**, 8-13 (1971).
- 40) Liber C. S., Alcohol: Its Metabolism and Interaction with Nutrients, *Annual Review of Nutrition*, **20**, 395-430 (2000).
- 41) 井尻巖 飲酒後にみられる症状と血中アセトアルデハイドおよび尿中カテコールアミン濃度について、アルコール研究、**9**, 35-59 (1974).
- 42) 庵 政志、アルコール代謝と生体への影響、クリニカ、**12**, 869-873 (1983).
- 43) Eade N. R., Mechanisms of Sympathomimetic Action of Aldehydes, *J. Pharmacological Exper., Ther.*, **127**, 29-34 (1959).
- 44) James T. N., Bear E. S., Effects of Ethanol and Acetaldehyde on the Heart, *Am. Heart J.*, **74**, 243-255 (1967).
- 45) Egle J. L. Jr., Effects of Inhaled Acetaldehyde and Propionaldehyde on Blood Pressure and Heart Rate, *Toxic Appl. Pharmacology*, **23**, 131-135 (1972).
- 46) 福田幸雄、和漢薬のアルコール代謝に及ぼす影響、日大医誌、**42**, 887-897 (1983).
- 47) 奥平雅彦、佐々木憲一、中 英男、五十嵐正広、北爪伸仁、相田尚文、大部誠、竹村慎一郎、相原正弘、アルコール性肝障害の病理、臨床と研究、**57**, 2442-2446 (1980).
- 48) Schmidt W., "The epidemiology of cirrhosis of the liver; A statistical analysis of mortality data with special reference to Canada," In *Alcohol and the Liver*, ed. by Fisher M. M., Rankin J. G., New York, Plenum Press, 1977, pp 1-26.
- 49) 石井裕正、高木俊和、永田茂之、高橋久雄、加藤真三、竹川節男、重田洋介、土屋雅春、実験的アルコール性肝障害作製上の2,3の問題点の検討 アルコール代謝と肝、**2**, 医歯薬出株式会社、1983, pp 1-11.
- 50) 仁平信、急性エタノール中毒時のマウス血清並びに尿中成分の一般生化学

- 的分析、 アルコール研究と薬物依存、 **17**, 327-340 (1982).
- 51) 原田治良、永田稔、佐々木恵美、石黒伊三雄、太田好次、山崎資子、 大量アルコール投与ラットの血清浸透圧とアルコール濃度、並びに血清と肝の諸成分および諸酵素活性の変動、 アルコール研究と薬物依存、 **17**, 259-270 (1982).
- 52) Topping D. L., Clark D. G., Storer G. B., Trimble R. P., Acute Effects of Ethanol on the Perfused Rat Liver, Studies on Lipid and carbohydrate metabolism, substrate- cycling and perfusate aminoacids, *Biochem. J.*, **184**, 97-106 (1979).
- 53) 結城武彦、橋本恒一、栗山欣弥、滝野辰郎、 肝臓におけるアルコール代謝と酸素消費、アルコール代謝と肝 1、 医歯薬出版株式会社、1982, pp 21-32.
- 54) Lieber C. S., Jones D., Mendelson J., DeCarli L. M., Fatty Liver, Hyperlipemia and Hyperuricemia Produced by Prolonged Alcohol Consumption, Despite Adequate Dietary Intake, *Trans. Assoc. Am. Physician*, **76**, 289-300 (1963).
- 55) Reynold T. B., Hidemura R., Michel H., Peters R., Portal Hypertension without Cirrhosis in Alcoholic Liver Disease, *Ann. Int. Med.*, **70**, 497-506 (1969).
- 56) Gerber M. A., Popper H., Relation between Central Canals and Portal Tracts in Alcoholic Hepatitis, A Contribution to the Pathogenesis of Cirrhosis in Alcoholics. *Human Pathol.*, **3**, 199-207 (1972).
- 57) Lieber 著、アルコールと臓器障害－病態生理と治療－、石井裕正、岡崎勲、松崎松平 監訳、 医歯薬出版株式会社、1980, p. 179.
- 58) Kim Cho-IL., Roe. D.A., Development of riboflavin deficiency in alcohol-fed hamsters, *Drug-Nutrient Interactions.*, **3** 99-107 (1985)
- 59) Lieber C. S., Alcohol, Liver Injury and Protein Metabolism, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **13**, 17-30 (1980).
- 60) Markham J. D., Hoff EC, Toxic Manifestations in the Antabuse-Alcohol Reaction, *J. Am. Med. Ass.*, **152**, 1597-1600 (1953).

- 61) Baker Jr., "Physicians' Desk Reference," 28th ed. (Publ C. E.) Baker Jr., Med. Economics Co., Oradell, New Jersey, 1974, pp. 575-576.
- 62) Baraona E., Matsuda Y., Pikkarainen P., Finkelman F., Lieber C. S., Exaggeration of the Ethanol-Induced Decrease in Liver Microtubules after Chronic Alcohol Consumption Role of Acetaldehyde, *Gastroenterology*, **76**, PART 2, 1274 (1979).
- 63) Debey H. J., Mackenzie J. B., Mackenzie C. G., The Replacement by Thiazolidinecarboxylic Acid of Exogenous Cystine and Cysteine, *J. Nutri.*, **66**, 607-619 (1958).
- 64) Sprince H., Parker C. M., Smith G. G., Gonzales L. J., Protection against Acetaldehyde Toxicity in the Rat by L-cystein, Thiamin and L-2-Methylthiazolidine-4-carboxylic Acid, *Agents and Actions*, **4**, 125-173 (1974).
- 65) Lee K. T., Sohn H. C., Kim D. H., Choi J. W., Kwon S. H., Park H. J., Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Tectorigenin and Kaikasaponin III in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat and their Antioxidant Activity in vitro, *Arch. Pharm. Res.*, **23**, 461-466 (2000).
- 66) Hiai S., Yokoyama H., Nagasawa T., Oura H., Stimulation of the Pituitary-adrenocortical Axis by Saikosaponin of Bupleuri Radix, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 495-499 (1981).
- 67) 新註校定 國譯本草綱目 第六冊 草部、 春陽堂藏版、 1978, p 251.
- 68) Robert A., Nezamis J. E., Lancaster C., Hanchar A. J., Cytoprotection by Prostaglandins in Rats. Prevention of Gastric Necrosis Produced by Alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl, and Thermal Injury, *Gastroenterology*, **77**, 433-443 (1979).
- 69) Harada N., Okajima K., Murakami K., Isobe H., Liu W., Gastric Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) Prevents Stress-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats Primarily by inhibiting Leukocyte Activation, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **57**,

- 291-303 (1999).
- 70) Mayer E. M., Grabowski C. J., Fisher R. S., Effects of Graded Doses of Alcohol upon Esophageal Motor Function, *Gastroenterology*, **75**, 1133-1136 (1978).
- 71) Barboriak J. J., Meade R. C., Impairment of Gastrointestinal Processing of Fat and Protein by Ethanol in Rats, *J. Nutri.*, **98**, 373-377 (1969).
- 72) Barboriak J. J., Meade R. C., Effect of Alcohol on Gastric Emptying in Man, *Am. J. Clin. Nutri.*, **23**, 1151-1153 (1970).
- 73) Terano A., Shiga J., Hiraishi H., Ota S., Sugimoto T., Protective Action of Tetraprenylactone against Ethanol-Induced Damage in Rat Gastric Mucosa, *Digestion*, **35**, 182-188 (1986).
- 74) 渡辺理枝、加藤義則、田中衛、田島鉄弥、ラットのエタノール胃粘膜障害に対するセルベックス細粒 10%の作用、*基礎と臨床*、**22**, 6353-6358 (1988).
- 75) 矢部有紀、富海英、川野 淳、辻晋吾、テプレノン<sup>®</sup>は NFκB を介して PGE<sub>2</sub> を増加させる、*実験潰瘍*、**31**, 151-153 (2004).
- 76) Araki H., Ukawa H., Sugawa Y., Yagi K., Suzuki K., Takeuchi K., The Roles of Prostaglandin E Receptor Subtypes in the Cytoprotective Action of Prostaglandin E<sub>2</sub> in Rat Stomach, *Aliment Pharmacol. Ther.*, **14**, Suppl. 1, 116-124 (2000).
- 77) Konturek S. J., Robert A., Hanchar A. J., Nezamis J. E., Comparison of Prostacyclin and Prostaglandin E<sub>2</sub> on Gastric Secretion, Gastrin Release, and Mucosal Blood Flow in Gogs, *Digestive Disease and Sciences*, **25**, 673-679 (1980).
- 78) Gaskill H. V., Sirinek K. R., Levine B. A., Prostacyclin Increases Gastric Mucosal Blood Flow via Cyclic AMP, *Journal of Surgical Research*, **33**, 140-145 (1982).
- 79) Matsuda H., Li Y., Murakami T., Yamahara J., Yoshikawa M., Protective Effects of Oleanolic Acid Oligoglycosides on Ethanol- or Indomethacin-Induced Gastric Mucosal Lesions in Rats, *Life Sci.*, **63**, 245-250 (1998).
- 80) Jose M. G., Rosalia R. R., Maria G.D., Cristina R., Dolores H. M., Valentina R. G.,

- Lina B., Oleonic Acid Induces Prostacyclin Release in Human Vascular Smooth Muscle Cells through a Cyclooxygenase-2-Dependent Mechanism, *J. Nutri.*, **138**, 443-448 (2008).
- 81) Phaosawasdi K., Tolin R., Mayer E., Fisher R. S., Effects of Alcohol on the Pyloric Sphincter, *Digestive Disease and Sciences*, **24**, 934-939 (1979).
- 82) Harichaux P., Capron J. P., Lienard J., Freville M., Influence de l' ethanol sur l' evacuation gastrique. Etude clinique et experimentale, *Lille Medical.*, **15**, 1059-1065 (1970).
- 83) 松永啓介、向笠広和、正常人の記憶に及ぼすアルコールの影響、アルコール研究と薬物依存、**21**, 64-73 (1986).
- 84) Bammer G., Chesher G. B., An Analysis of Some Effects of Ethanol on Performance in a Passive Avoidance Task, *Psychopharmacology*, **77**, 66-73 (1982).
- 85) Zhang Y., Shioyama Y., Sugiura M., Saito H., Effects of *Crocus sativus* L. on the Ethanol-Induced Impairment of Passive Avoidance Performances in Mice, *Biol Pharm Bull.*, **17**, 217-221 (1994).
- 86) Kameyama T., Nabeshima T., Noda Y., Cholinergic Modulation of Memory for Step-Down Type Passive Avoidance Task in Mice, *Research communications in psychology, psychiatry and behavior*, **11**, 193-205 (1986).
- 87) Bartus R. T., Dean R. L., Beer B., Lippa A. S., The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction, *Science*, **217**, 408-417 (1982).
- 88) Morgan E. P., Phillis J. W., The effects of Ethanol on Acetylcholine Release from the Brain of Unanaesthetized Cats, *General Pharmacology*, **6**, 281-284 (1975).
- 89) Rawat A. W., Brain Levels and Turnover Rates of Presumptive Neurotransmitters as Influenced by Administration and Withdrawal of Ethanol in Mice, *Journal of Neurochemistry*, **22**, 915-922 (1974).
- 90) Nabeshima T., Tohyama K., Ishihara S., Kameyama T., Involvement of the



- Cholinergic Neuronal System and Benzodiazepine Receptors in Alcohol-Induced Amnesia, *European Journal of Pharmacology*, **195**, 285-289 (1991).
- 91) Kinjo J., Takeshita T., Abe Y., Terada N., Yamashita H., Yamasaki M., Takeuchi K., Murakami K., Tomimatsu T., Nohara T. Studies on the Constituents of *Pueraria lobata*. IV. Chemical Constituents in the Flowers and the Leaves, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1174-1179 (1988).
- 92) Packard M. G., Posttraining Estrogen and Memory Modulation, *Hormones and behavior*, **34**, 126-139 (1998).
- 93) Benishin C. G., Lee R., Wabg L. C. H., Liu H. J., Effects of Ginsenoside Rb1 on Central Cholinergic Metabolism, *Pharmacology*, **42**, 223-229 (1991).
- 94) Saito H., Suda K., Schwab M., Thoenen H., Potentiation of the NGF-Mediated Nerve Fiber Outgrowth by Ginsenoside Rb1 in Organ Cultures of Chicken Dorsal Root Ganglia, *Japanese Journal of Pharmacology*, **27**, 445-451 (1977).

## 謝 辞

本研究の機会を賜り、終始御懇篤なるご指導御鞭撻を賜りました熊本大学薬学部大学院野原稔弘名誉教授、福岡大学薬学部金城順英教授に謹んで御礼申し上げます。

また、今回の学位申請に当たって、著者の申し出を快くお引き受けくださった池田剛崇城大学薬学部教授に心から感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり終始適切な御助言を賜りご協力くださいました、株式会社太田胃散 中島嘉次郎常務、新甫勇次郎信頼性保証前部長、吉江紀明上席執行役員、細野剛執行役員、伊東宏前研究部長に心から深く感謝いたします。

また、本研究の共同研究者として実験にご協力くださいました、谷口(旧姓・染谷)雅子氏、松下雪氏、川島啓子氏、成井一裕氏をはじめ、種々お世話になりました株式会社太田胃散研究開発部の方々に心より感謝いたします。さらに、本研究にあたり御指導御助言を賜りました聖マリアンナ医科大学井上肇幹細胞再生治療学教授に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究の機会を賜りました株式会社太田胃散代表取締役 太田美明社長、太田淳之副社長、太田範子常任顧問、太田昭名誉会長はじめ学位取得にあたり陰ながら暖かく見守ってくださいました篠崎節夫専務、室井勝上席執行役員、西本正剛上席執行役員、吉岡信幸執行役員、坂口良治執行役員、小川浩一執行役員、佐藤桂一部長に厚く御礼申し上げます。