

和漢薬方剂「越婢加朮湯」の慢性期  
抗炎症作用に関する研究

富山医科大学附属病院和漢診療部

城石 平一

①

和漢薬方剂「越婢加朮湯」の慢性期  
抗炎症作用に関する研究

富山医科薬科大学附属病院和漢診療部

城石平一

## 目次

### 緒言

第一部 和漢薬方剂「越婢加朮湯」の抗炎症作用に関する研究（Ⅰ）ラット急性および慢性炎症モデルに対する抑制効果

（序論、材料と方法、結果、考察、小括）

第二部 和漢薬方剂「越婢加朮湯」の抗炎症作用に関する研究（Ⅱ）線維芽細胞増殖に及ぼす越婢加朮湯、麻黄、および麻黄成分の影響

（序論、材料と方法、結果、考察、小括）

第三部 和漢薬方剂「越婢加朮湯」の抗炎症作用に関する研究（Ⅲ）麻黄アルカロイド、*d*-pseudoephedrine によるラット慢性炎症モデルに対する抑制効果

（序論、材料と方法、結果、考察、小括）

### 総括

## 緒言

抗炎症作用を有する薬物は多数開発されているが、慢性関節リウマチをはじめとする増殖型慢性炎症疾患に有効な治療薬は少ない。これまでにステロイド剤などの強力な慢性期抗炎症作用を示す薬物が開発されているが、副作用の出現頻度も高く、慢性疾患の治療に長期間投与することが困難な症例がみられるのが現状である。一方、和漢薬は一般に副作用が少なく長期間の投与に適していることが多く、越婢加朮湯をはじめとする方剤は、増殖型慢性炎症疾患に対し臨床的に広く用いられている。しかし、これまで、この種の和漢薬の慢性期抗炎症作用に関する基礎的研究は数少ない。本論文は越婢加朮湯の実験的炎症モデルに対する効果 (in vivo) を検討し、併せて、この和漢薬方剤の効果がどの生薬の如何なる成分に由来するかを、in vitro の実験により検討したものである。

## 第一部 和漢薬方剤「越婢加朮湯」の抗炎症作用に関する研究（Ⅰ）ラット急性および慢性炎症モデルに対する抑制効果

### 序論

慢性関節リウマチ（RA）の治療については、近年、様々な種類の非ステロイド系抗炎症剤や免疫調整剤が開発されている。しかしそれらの副作用のために長期投与に耐えられない症例も少なからず存在し、この種の患者が富山医科薬科大学和漢診療部を受診している。

RAに対する桂枝芍薬知母湯や桂枝加苓朮附湯等の和漢薬による治療効果の報告があり<sup>1)</sup>、和漢薬治療にも一定程度の有効性のあることが明らかになりつつある<sup>2-4)</sup>。RAは自己免疫的機序に基づいた増殖型慢性炎症を代表する疾患である。従って、抗リウマチ薬の評価にあたっては、抗炎症作用と免疫調整作用の両面からのアプローチが必要である。

ところが、これらの和漢薬方剤の作用機序

についての報告は未だ少ない<sup>5, 6)</sup>。本研究は、和漢薬方剤の抗炎症作用の側面を明らかにするために、その効果を、ラットにおけるカラゲニン空気嚢炎症モデルとカルボキシメチルセルロース(CMC)空気嚢炎症モデルを用いて検討したものである。ここではRAの和漢薬治療に関する過去の文献<sup>1-3)</sup>と日常の臨床での使用頻度を勘案し、越婢加朮湯を検討の対象とした。

## 材料と方法

### 1. 和漢薬方剤の調整

研究の対象とした越婢加朮湯(EJ)の構成生薬をTable Iに示した。方剤1日量はすべて、富山医科薬科大学附属病院で用いているものに準拠した。方剤EJ(水煎液)の作成方法は、Table Iの生薬を混合し(全量で24g)、400 mlの水を加え、1時間煮沸し、温時濾別し、得られた水煎液に水を加えて正確に300mlに調製した。3倍量、5倍量(以下それぞれ×

3. × 5と略記する)の水煎液は、減圧濃縮することによって、作成した。例えば EJ×3 は、EJの水煎液 300 ml を3分の1(100 ml)に減圧濃縮して得た。

## 2. 薬物および試薬

カラゲニン(Seakem #202 carrageenin)は Marine Colloid Inc.(N.J., U.S.A.)より、CMC(Serogen F3H)は第一工業製薬株式会社(京都)より、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)は日水製薬株式会社(東京)より、またインドメタシンは Sigma Chemical Co.(Mo., U.S.A.)より購入した。プレドニゾロン、クロラミンT、過塩素酸、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド、アミドブラックを含む他の試薬はすべて和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。

## 3. 実験動物

実験動物は、すべて6週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット(体重160~200 g)を日本エスエルシー株式会社(浜松)より購入して用

い、温度  $22 \pm 1$  °C、湿度 50-60 %、12 時間明 / 12 時間暗（点灯時間 7:00-19:00）のサイクルの飼育室で市販の固形飼料を用い、水は自由に摂取させて飼育した。

#### 4. カラゲニン空気嚢炎症

亜急性期および慢性期の炎症モデルとしてカラゲニン空気嚢炎症を用いた。鶴藤ら<sup>7, 8)</sup>の方法に従い、ラットの背部皮下に空気 7 ml を注射して空気嚢を作成し、翌日 2 % カラゲニン生食懸濁液 4 ml を空気嚢内に注入して炎症を惹起させた。方剤 EJ の効果は予防効果と治療効果にわけて検討した。まず、予防効果を検討する目的で、Fig. 1 に示すように、投薬群には方剤 (37°C) を 1.5 ml / 匹 / 日、対照群には水 (37°C) を同量、カラゲニン注入前日 (Day - 1) より 8 日目 (Day 7) まで連日 9 日間、ゾンデで経口投与した。また同様に、インドメタシン群にはインドメタシンを 0.25 mg / 匹 / 日、プレドニゾン群にはプレドニゾンを 0.25 mg / 匹 / 日 を経口投与した。

最終日である Day7 にラットをジエチルエーテル麻酔下で頸動脈からの脱血の後、肉芽嚢内の滲出液量と肉芽重量を測定した。肉芽組織は凍結保存し、後にコラーゲン蛋白質および非コラーゲン蛋白質の定量に供した。

次に、既に肉芽組織の形成が認められる慢性期での有効方剤の効果（治療効果）を確認するために Fig.2 に示す投与計画に従った実験も行なった。すなわち、あらかじめカラゲニン空気嚢炎症を作成しておき、Day 4 の時点で嚢の大きい（肉芽組織が十分形成していると推測される）ラットを選別した後、Day 4 から Day 8 まで方剤（EJ×3）を2.0 ml/匹/日、対照群には水（37℃）を同量、ゾンデで経口投与した。最終日である Day 9 に滲出液量と肉芽重量および肉芽組織のコラーゲン蛋白質量と非コラーゲン蛋白質量を測定した。

#### 5. C M C 空気嚢炎症

急性炎症モデルとして、C M C 空気嚢炎症を用いた。鶴藤ら<sup>9, 10)</sup>の方法に準じ、ラット

の背部皮下に空気 5 mlを注射し空気嚢を作成し、翌日 2% C M C 生食溶液 8 mlを注入し、急性炎症を惹起した。投薬群には、方剤 3 倍量を 37°C 1.5 mlずつ、対照群には水 (37°C) を同量ずつ、経口投与した。投与回数と時間は、Fig. 3 に示すように、C M C 注入前日に 1 回、当日注入前 1 時間、および 1, 3, 5 時間後の計 5 回投与とした。C M C 注入 3, 5, 7 時間後に嚢内液を毎回 0.2 ml ずつ採取した。そのうち 0.1 ml を遊出してきた白血球の算定に、他の 0.1 ml を滲出した蛋白質の定量に用いた。白血球は、コールターカウンター (Z<sub>8</sub> 型、コールターエレクトロニクス社、Flor., U.S.A.) で計測し、滲出蛋白質量を Lowry らの方法<sup>11)</sup> で定量した。

#### 6. 肉芽組織中のコラーゲン蛋白質、非コラーゲン蛋白質の定量

カラゲニン空気嚢炎症における肉芽組織中のコラーゲン蛋白質量および非コラーゲン蛋白質量の影響を検討した。前述のカラゲニン

空気嚢炎症における方剤EJ投与群での肉芽組織を、120℃、1.0 kg/cm<sup>2</sup>G、1hrで組織のコラーゲンをゼラチン化し、一部を濾過した後、コラーゲンに特有のアミノ酸であるヒドロキシプロリン(Hyp)の定量を行い、コラーゲン蛋白質の指標とした。非ゼラチン化の残りの画分は1N NaOH溶液に溶解した後、Lowryらの方法<sup>11)</sup>を用いて蛋白定量を行い、非コラーゲン蛋白質の指標とした。

#### 7. ヒドロキシプロリンの測定

前述のゼラチン濾液より得た試料に濃塩酸を加え6Nとし、105℃で16時間加水分解をおこなったものを正確に中和した後、総量を測定し、ヒドロキシプロリンの含有量をWoessnerの方法<sup>12)</sup>で定量した。二対の加水分解の試料に200μlのクロラミンT溶液を加えて1mlにした。試験管を攪拌し室温に20分間放置した後、3.15Mの過塩素酸を800μl加えた。室温で5分間放置したのち、20%ρ-ジメチルアミノベンズアルデヒドを800μl加

え、試験管を 60℃ で 20 分間温め、5 分間冷水で冷却したあと、557 nm での吸光度を測定した。ヒドロキシプロリン含有量は標準直線を用いて算出した。

#### 8. 肉芽組織中の線維芽細胞増殖抑制作用についての検討

カラゲニン空気嚢炎症における 8 日目での肉芽組織より得られた線維芽細胞を 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。牛胎児血清 (FBS) を 10% 含む DMEM を基礎培地として用い、方剤 EJ の水溶性成分を最高 5% となるよう培地中に添加した。3 日ごとに方剤含有培地を交換し、その都度、線維芽細胞数を 12 日目まで計測した。計測は、Vilcek らの方法<sup>13)</sup>に準じ、アミドブラックにて細胞を染色し、吸光度 (630 nm) を測定し、検量線から細胞数を算出した。

#### 9. 統計学的処理

幾つかの実験結果は、結果を同時に考慮する必要があるため、それぞれに対応する対照群の百分率または抑制率で表現した。結果は

平均値 ± 標準誤差で表わし、有意差検定は対応のない平均値の差の検定 (T-test) で行なった。

## 結果

### 1. カラゲニン空気嚢炎症モデルにおける方剤

#### EJ の抗炎症作用

カラゲニン空気嚢炎症 (予防実験) の 8 日目での肉芽腫嚢内の滲出液量と肉芽重量を測定した結果を Fig. 4 に示す。EJ による肉芽組織形成の抑制傾向を認め、とくに高濃度の EJ では有意に肉芽組織形成を抑制した。抑制率は EJ×5、および EJ×3において、それぞれ 30.1% ( $p < 0.01$ )、14.8% ( $p < 0.05$ ) であった。滲出反応に関しては、いずれも有意な抑制効果を示さなかった。インドメタシン (0.25 mg/day) およびプレドニゾン (0.25 mg/day) に関しては、肉芽組織形成の抑制率が各々 3.4%、48.9% ( $p < 0.01$ )、滲出反応のそれが各々 24.0%、42.0% であった。なお、方剤の副作用

として EJ×5でのみ下痢傾向を認めた。

## 2. C M C 空気嚢炎症に対する方剤 EJ の効果

上述のカラゲニン空気嚢炎症モデルは、亜急性期あるいは慢性期の炎症モデルと考えられる<sup>14)</sup>のに対し、C M C 空気嚢炎症は炎症の急性期を評価するのに適していると考えられる。カラゲニン空気嚢炎症モデルにおいて抗炎症効果の認められた方剤 EJ が、炎症の急性期の時点でどのような作用を示すかを検討する目的で、C M C 空気嚢炎症に対するこの方剤の抑制効果を検討した。C M C 空気嚢炎症における方剤 EJ の効果は、Fig.5 に示すように、血漿蛋白の滲出反応には影響を与えなかったが、7時間後の嚢内の白血球浸潤を抑制する傾向を認めた。抑制率は EJ 15.8%であったが推計学的には有意差はなかった。

## 3. 肉芽組織中のコラーゲン蛋白質、非コラーゲン蛋白質の定量

前述のカラゲニン空気嚢炎症における肉芽組織中のコラーゲン量をヒドロキシプロリン

(Hyp)として測定したところ、コントロール群に比較して、EJ群は一般に減少傾向を認めた。非コラーゲン蛋白質としての総蛋白質量の変化についても減少傾向を認めた。しかしこれらの成績を単位湿重量あたりのコラーゲンHypとして表現すると(Fig.6)、EJの高濃度で増加傾向にあったが、有意差を認めなかった。

#### 4. 肉芽組織中の線維芽細胞増殖に対する方剤EJの抑制効果

方剤EJによるカラゲニン空気嚢炎症での肉芽形成抑制の機序を検索するために、方剤添加後の線維芽細胞の増殖に対する影響を検討した。培養後12日目まで観察したところ、Fig.7に示すように、方剤EJを最終的に0.25%、1%、または5%となるように培養液中に添加すると、この方剤は線維芽細胞の増殖を用量依存的に( $p < 0.001$ )抑制した。

#### 5. カラゲニン空気嚢炎症(慢性期)に対する方剤EJの効果

カラゲニン空気嚢炎症における慢性期での抗炎症効果（治療効果）を確かめるために、前述の Fig. 2 に示した投与計画に従い、EJ×3 経口投与による実験を行った。下痢等の副作用は認めなかった。結果を、Fig. 8 に示す。EJ×3 は、Day 9 の肉芽重量を、有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した。この方剤による肉芽形成の抑制と、肉芽組織のコラーゲンとの関連を検討するために、前述の方法に準じて、肉芽組織のコラーゲン蛋白質量と、非コラーゲン蛋白質量を測定し比較検討した (Fig. 9)。EJ×3 群は対照群に比べ、有意に ( $p < 0.05$ ) 総コラーゲン蛋白質量の低下を認めた。非コラーゲン蛋白質量に関しては、低下傾向を認めたが有意差は無かった。この成績を肉芽の単位湿重量あたりのコラーゲン蛋白質量、あるいは単位湿重量あたりの非コラーゲン蛋白質量として表現すると、やや増加傾向を示したが、ともに有意差を認めなかった。

## 考察

RA は、増殖型慢性炎症性疾患の代表とされるので、RA に対する薬物の作用を検討するためには増殖型炎症の病態モデルが必要不可欠である。今回、用いたカラゲニン空気嚢炎症はその特徴として、(1)炎症反応の急性期から慢性期までを幅広く再現することができる、(2)炎症組織の生化学的研究を行なうのに十分な組織が比較的短期間(約1週間)で得られる、(3)病態モデルとしての再現性がよく、増殖型慢性炎症モデルとして有用である、等が挙げられる<sup>14)</sup>。今回、この炎症モデルを使用した結果、方剤 EJ は慢性炎症の特徴である肉芽組織の形成を抑制することが明らかとなった(Figs.4 and 8)。

抗炎症効果発現の機序としては、肉芽組織コラーゲン Hyp の産生抑制(Figs.6 and 8)と、肉芽組織線維芽細胞増殖抑制(Fig.7)とがあるが、方剤 EJ には肉芽組織線維芽細胞に対する増殖抑制作用のあることが示唆され

た。

カラゲニン空気嚢炎症モデルで有効性のみられた方剤 EJ の、炎症急性期（血管透過性亢進あるいは白血球遊走期）での作用を検討する目的で、CMC 空気嚢炎症実験を行なった（Fig. 3）。その結果、方剤 EJ は、急性炎症反応のうち、白血球浸潤に関しては抑制傾向を示したが、血漿蛋白の滲出反応を指標とした血管透過性亢進に関しては明かな抑制を示さなかった（Fig. 5）。したがって、カラゲニン空気嚢炎症において慢性炎症の抑制が顕著であった方剤 EJ は急性期の炎症を、少なくとも今回用いた CMC 空気嚢炎症実験では、抑制しなかった。

高濃度の方剤 EJ による肉芽組織の抑制に関しては、EJ×5 および EJ×3 は予防実験において肉芽組織形成をそれぞれ 30.1%、14.8% 抑制した（Fig. 4）。これらの抑制率はインドメタシン（3.4%）に決して劣らないが、プレドニゾロン（48.9%）に劣っていた。方剤 EJ のヒ

トの常用量と今回のラットにおける有効量との比較をすると、ヒトの常用量は 5~6 ml/kg であるのに対し、今回の実験のラットでは EJ( $\times 1$ ), EJ $\times 3$ , EJ $\times 5$  それぞれ EJ $\times 1$  に換算して 10 ml/kg, 30 ml/kg, 50 ml/kg となる。EJ $\times 3$  以上で肉芽組織形成を抑制し、EJ $\times 1$  はそれを抑制しなかったことから考えると、今回の研究でのラットにおける有効量はヒトの用量に比べ、少なくとも 5~6 倍高いと推測される。

今回の研究では、EJ は炎症第 3 期における抗炎症作用を有することが明らかとなった。肉芽組織中のコラーゲン量を Hyp を指標として測定し、これを肉芽単位湿重量あたりのコラーゲン量として算出してみると、EJ 群では増加傾向にあった (Figs. 6 and 9)。このことは、EJ の抗炎症作用に若干の特徴があり、例えば、EJ には、コラーゲンの生成を抑制する作用が考えられる以外に、自由水の炎症組織中への移行を抑制する作用も兼ね備えている

可能性もあることが示唆された。

さて、方剤 EJ を構成する個々の生薬別の抗炎症作用について、麻黄<sup>15-21)</sup> (Whittle法、ラット・カラゲニンおよびデキストラン足蹠浮腫法、他)、白朮<sup>22)</sup> (Whittle法、他)、甘草<sup>23-25)</sup> (ラット・ホルムアルデヒド足蹠浮腫法、他) に、抗炎症作用 (特に炎症の急性期) を認めるとの報告がある。本実験で用いた C M C 空気嚢炎症では、EJ の急性期抗炎症作用を見いだせなかったが、その理由として実験法の違いによることが考えられる。一方、EJ 構成生薬以外の生薬に言及すると、附子<sup>26)</sup>、牡丹皮<sup>27)</sup>、紫根<sup>28)</sup>、大黄<sup>29)</sup>、升麻<sup>30, 31)</sup>、荊芥<sup>32)</sup>、当帰<sup>28)</sup>、桔梗<sup>33)</sup> など多くの生薬に炎症の初期 (炎症第 1 期 ~ 第 2 期) を抑制する成分が存在することが知られている。

肉芽形成、結合組織増殖などの炎症後期 (炎症第 3 期) に作用を認めるとするものには、甘草<sup>23-25)</sup> (Glycyrrhizin, Glycyrrheti

c acid)、防己<sup>34)</sup>(Sinomenine)、柴胡<sup>35)</sup>(Saiikosaponin)、桔梗<sup>33)</sup>(Platycodin)、辛夷<sup>36)</sup>(Magnoshinin)が報告されているにすぎない。本研究で使用した方剤に配合された生薬のうち炎症第3期を抑制することが明らかにされている生薬は、甘草<sup>23-25)</sup>のみである。しかし、同じく甘草が含まれているにもかかわらず、同じ実験系で抗肉芽作用を認めないとする著者らの報告<sup>37)</sup>(桂枝加朮附湯)があり興味深い。このことは、単一の生薬を用いた場合と方剤として生薬を配合して用いた場合とは作用が異なることのある可能性を示唆している。すなわち、他の生薬との相互作用により作用が増強(相加または相乗)したり減弱(拮抗)する可能性がある。

生薬の炎症第3期抑制に関して、有地ら<sup>38)</sup>は、和漢薬の処方単位(方剤)として、柴胡桂枝乾姜湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯などの柴胡剤と称される一群の方剤がこの第3期を抑制すると報告している。これに関連して山本

ら<sup>35)</sup>も、柴胡の主要成分である柴胡サポニンに著明な第3期抑制作用のあることを報告している。

ラットのアジュバント関節炎に対する生薬についての報告として、当帰<sup>39-41)</sup>、白朮<sup>39-41)</sup>、芍薬<sup>39-41)</sup>、麻黄<sup>39, 40)</sup>、牡丹皮<sup>39, 40)</sup>、防風<sup>39, 40)</sup>が、方剤として桂枝加朮附湯<sup>6)</sup>、桂枝二越婢一湯加附子<sup>6)</sup>、桂枝芍薬知母湯<sup>6)</sup>があり、いずれにも抗炎症効果が認められている。アジュバント関節炎は、その発症と進展に細胞性免疫と液性免疫が密接に関与しているといわれる<sup>42)</sup>。従って、このアジュバント関節炎モデルは、今回の研究で用いた実験モデル(免疫学側面を明確に切り離したと考えられる炎症モデル)とは機序が異なると考えられる。いずれにしても、EJが、免疫学的機序を別にして増殖型慢性炎症である炎症第3期において炎症を抑制することは、特筆すべきことと思われる。

## 小 括

慢性関節リウマチに臨床的に効果の認められている和漢薬方剤である越婢加朮湯(EJ)について、まずカラゲニン空気嚢炎症ラットを用い、抗炎症効果を検討した。EJは経口投与にて、慢性炎症の特徴である肉芽組織の形成を有意に抑制した。次に慢性炎症の抑制を示したEJの急性期における作用をカルボキシメチルセルロース(CMC)空気嚢炎症ラットを用いて検討した。EJは、急性炎症反応のうち白血球浸潤に対し抑制傾向を示したが、血漿蛋白の滲出反応は抑制しなかった。さらに、この方剤による肉芽線維芽細胞増殖抑制実験により、慢性炎症抑制機序のひとつとして、肉芽組織線維芽細胞に対する増殖抑制機序が示唆された。

## 第二部 和漢薬方剤「越婢加朮湯」の抗炎症作用に関する研究（Ⅱ）線維芽細胞増殖に及ぼす越婢加朮湯、麻黄、および麻黄成分の影響

### 序論

第一部において、慢性関節リウマチ（RA）等の炎症性疾患に用いられる和漢薬方剤、越婢加朮湯（EJ）がラット・カラゲニン空気嚢炎症モデルの肉芽重量および肉芽組織中のヒドロキシプロリン量を減少させることを明らかにした<sup>37)</sup>。その慢性炎症抑制機序のひとつとして線維芽細胞増殖抑制作用が考えられた<sup>37)</sup>。そこで、EJ および EJ の構成生薬による抗炎症活性を、線維芽細胞増殖抑制を指標に検討し、併せて活性物質の検索を試みた。

### 材料と方法

#### 1. 和漢薬方剤の調製

実験用の方剤としての EJ の組成は Table

1 に示す通りである。麻黄、石膏等の個々の構成生薬、およびEJ去麻黄、EJ去石膏等のEJよりひとつの生薬を取り除いた方剤（EJ-Ma o, EJ-Sekko 等と表記）も用意した。すべての生薬は、栃本天海堂（大阪）より購入した。それぞれの方剤ないし生薬に水 400 ml を加え弱火で 60 分間煮沸し 300 ml の水煎液を得た。方剤（水煎液）を、適量（20～30 ml）に分け、-40℃で冷凍保存し、必要時に適宜解凍した後、実験に供した。

## 2. 実験材料

Balb/c-3T3, clone A31細胞は、大日本製薬株式会社（大阪）より購入したものを使用した。マイクロプレート（cell wells）は24穴のもの（25820MP）をCorning Glass Works（N.Y., U.S.A.）より購入した。牛胎児血清（FBS）はWhittaker Bioproducts, Inc.（Md., U.S.A.）のものを購入し使用した。ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）は日水製薬株式会社（東京）より購入した。N-2-hydroxyethylpiperazine-N

1-(2-ethanesulfonic acid(HEPES)および2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, monohydrate(MES)は株式会社同仁化学研究所(熊本)製のものを購入した。1-ephedrine, *d*-pseudoephedrine, 1-N-methylephedrine, *d*-N-methylpseudoephedrine, 1-norephedrine は、Aldrich Chemical Co.(Wis., U.S.A.)より購入した。デキサメタゾン、ナカライテスク株式会社(京都)より、インドメタシンはSigma Chemical Co.(Mo., U.S.A.)より購入した。炭酸水素ナトリウム、ペニシリンGカリウム、ストレプトマイシン硫酸塩、クリスタルヴァイオレット、グルタルアルデヒド溶液、酢酸、その他の試薬は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入したものを使用した。

### 3. 細胞の培養

線維芽細胞としてマウス balb/c-3T3, clone A31 を選んだ。培養条件は、常に、37°C、95% 空気 5% CO<sub>2</sub> で、CO<sub>2</sub> インキュベーターは、サンヨーフォーマー MIP3193 (三洋電機特機株式

会社、東京)を使用した。継代培養は10%(v/v)FBSを添加した培養液を基礎培地として用いた。培養液の組成は次の通りである。

培養液 1000 ml中、DMEM 10.00g、炭酸水素ナトリウム 3.698g、HEPES 5.96g、ペニシリンG 0.1g、ストレプトマイシン 0.1g。

Cell growth assay として、前日、24穴マイクロプレートに、継代で 70% confluent になった細胞を、 $5 \times 10^3$ 個ずつ(0.5ml)撒き、当日、水煎液(水溶性成分: 0.45  $\mu$ mのフィルターを通し滅菌したもの)を 4%、1% あるいは 0.25% 含む 5% FBS含有培養液で培地交換を行なった。3日後まで培養し、経日的に細胞数を色素法(クリスタルヴァイオレット法<sup>43, 44</sup>)で計測した。

#### 4. 色素法による細胞の計測

細胞は、1mlの培養液に glutaraldehyde(1%)100  $\mu$ lを加えることによって固定し、15分間軽く振動の後、水で3回洗った。Plateを乾燥させ、0.1%crystal violet(200 mM MES, p

H 6.0), 1mlを加え30分間染色し、水洗、乾燥の後、10%酢酸で溶出した。590 nmでの吸光度を島津自記分光光度計 UV-265FS (株式会社島津製作所、京都) にて測定した。細胞数と吸光度との間の標準直線をあらかじめ求めておき、吸光度から細胞数を算出した。

Xを細胞数、Yを590nmでの吸光度とすると、

$$X = 16807.2Y - 1969.46$$

$$r = 0.998, 0 < p < 0.002$$

## 5. 統計学的検討

統計処理はMEDICAL PLAN II Ver3.0 (株式会社データフォーム、京都) を使用し行なった。実験データはすべて平均値±標準誤差で表わし、検定は対応のない平均値の差の検定 (T-testまたはWilcoxon test) で行なった。

## 結果

EJ の線維芽細胞増殖抑制効果をFig.10 に示す。EJ 4%および1%は1日後より、0.25%は2日後より細胞数を対照に比し有意に減

少しした。

培養液中に直接水煎液を入れた為、細胞の増殖抑制が、薬剤の cell damage によるものでないことを確認するために、次の実験を行なった。EJ 添加実験で、Day 1 および Day 2 での培養液中の浮遊（あるいは死滅）細胞数を算定したところ、対照との間で有意差はなかった。Day 1 では対照： $7.8 \pm 1.3 \times 10^2$  cells, 4%EJ： $7.8 \pm 0.7 \times 10^2$  cells, 1%EJ： $8.3 \pm 1.7 \times 10^2$  cells, 0.25%EJ： $7.8 \pm 1.6 \times 10^2$  cells, Day 2 では対照： $9.4 \pm 1.6 \times 10^2$  cells, 4%EJ： $9.4 \pm 3.1 \times 10^2$  cells, 1%EJ： $9.4 \pm 3.9 \times 10^2$  cells, 0.25%EJ： $9.4 \pm 3.1 \times 10^2$  cells であった。

次に、Day 1 および Day 2 に培養液を通常の培地に交換したところ EJ 添加にて抑制されていた細胞数が対照のレベルにまで十分に回復した (Table II)。また、培養液に煎液を加えた際、培養液の pH に変化を認めなかった。

次に EJ 構成各生薬、およびそれらと対にな

る EJ より一味の生薬を除いた方剤による線維芽細胞増殖に及ぼす影響を検討した。まず麻黄および EJ 去麻黄による結果を Fig.11 に示す。麻黄は線維芽細胞増殖を、4% および 1% 濃度で添加したものは 1 日後より、また 0.25% では 2 日後より抑制した。しかし、EJ 去麻黄は、いずれの日にも細胞増殖に対し影響を及ぼさなかった。次に、大棗、EJ 去大棗による結果を Fig.12 に示す。大棗は細胞増殖抑制を認めなかったが、EJ 去大棗は 0.25% 以上の添加濃度で初日より有意に抑制した。結果は図示していないが、石膏、白朮に関しても大棗の結果とほぼ同様であった。全般に、EJ 構成生薬および EJ 去一味の方剤のうち、麻黄の含まれるものは抑制作用が強く、麻黄の含まれないものは抑制がわずかか、あるいは認められなかった。ただし、生姜と甘草には弱い抑制を認めた (Figs.13 and 14)。

そこで、*in vitro* で最も抑制効果の強いことが示唆された麻黄に着目し、文献的に麻黄

の成分であると報告されている *l*-ephedrine, *d*-pseudoephedrine, *l*-N-methylephedrine, *d*-N-methylpseudoephedrine, *l*-norephedrine (それぞれ 250, 25, 2.5  $\mu$ g/ml) について検討したところ、*d*-pseudoephedrine (250, 25  $\mu$ g/ml)、および *l*-norephedrine (250, 25  $\mu$ g/ml) に有意な増殖抑制が認められた (Figs. 15 and 16)。しかし *l*-ephedrine では抑制は全く認められなかった。*l*-N-methylephedrine, *d*-N-methylpseudoephedrine では高濃度 (250  $\mu$ g/ml) で Day 3 のみに増殖抑制が認められた (Fig. 17)。

陽性対照群として用いたデキサメタゾン (25, 2.5  $\mu$ g/ml, 250, 25, 2.5 ng/ml) とインドメタシン (250, 25, 2.5  $\mu$ g/ml) での結果を Fig. 18 に示す。デキサメタゾンは 25 ng/ml より高濃度で、インドメタシンは 2.5  $\mu$ g/ml より高濃度でそれぞれ増殖抑制を示した。

## 考察

今回の研究でとりあげた EJ は金匱要略・中風歴節病第五を出典とする処方である。歴節とは移動性の関節炎に相当する病態である。日常の臨床においても本方剤は関節炎をはじめとする各種の炎症性疾患に広く応用されている<sup>45)</sup>。本論文の第1部において、EJはラット・カラゲニン空気嚢炎症モデルで炎症第3期を抑制することを明らかにした<sup>37)</sup>。今回は EJ の慢性炎症に対する効果に検討の対象を絞り、EJ のどの成分が慢性期抗炎症活性を担っているかを検索した。

EJ の慢性期抗炎症効果を線維芽細胞増殖抑制を指標に検討し、次に EJ の構成生薬で検討したところ、麻黄に抗炎症活性があることを実証した。そこで、麻黄の抗炎症活性成分を麻黄のアルカロイド成分で検討したところ、*o*-pseudoephedrine、および *l*-norephedrine に活性がみられたが、*l*-ephedrine では全くみられなかった。

麻黄、あるいはそのアルカロイドによる急

性炎症（第1期、第2期）抑制の報告は数篇見受けられる<sup>15-21</sup>。それらによると、麻黄エキス、抽出総アルカロイドはWhittle法（酢酸による腹膜炎）、デキストランおよびカラゲニンによるラット足蹠浮腫に対し抗炎症作用を示し<sup>15-19</sup>、さらにこの作用が主として*d*-pseudoephedrineによるものであること<sup>15, 16, 20</sup>、そしてその作用機序として一部はアラキドン酸代謝抑制作用によること<sup>16, 21</sup>が明らかにされ、一部は交感神経系(adrenergic mechanism)に関与すること<sup>19, 20</sup>が示唆されている。

今回、麻黄およびそのアルカロイドの慢性期抗炎症作用をとくに線維芽細胞増殖抑制実験<sup>46-48</sup>を用いて明らかにしたが、このような方法でこの方剤の薬理効果を解明したのは本論文が初めてである。D'Arcyらの方法による鶏卵胚肉芽形成を麻黄および*d*-pseudoephedrineで証明した曳野らの報告<sup>15</sup>と矛盾しない結果であった。相違点としては、後者では

麻黄アルカロイドとして *d*-pseudoephedrine と *l*-ephedrine のみを取り上げたのに対し、我々は *l*-N-methylephedrine, *d*-N-methylpseudoephedrine, *l*-norephedrine の含有量の少ない成分を含めた結果を挙げる事ができた。

ところで、麻黄の種類により *l*-ephedrine と *d*-pseudoephedrine の含有比はまちまちで 10 倍以上の開きがある<sup>18, 49)</sup>といわれている。今回用いた麻黄は中麻黄(中国産の麻黄)であるが、中麻黄はやや多量の *d*-pseudoephedrine (0.6-0.7%) を含むのに対し、比較的少量の *l*-ephedrine (0.1-0.2%) しか含まないことが知られている<sup>50, 51)</sup>。曳野ら<sup>50)</sup>は麻黄の *d*-pseudoephedrine 含量と抗炎症効果 (whittle 法) とは平行関係にあることから、*d*-pseudoephedrine が麻黄の抗炎症効果の主要成分と結論している。また、今回強い抑制作用を示した *l*-norephedrine は中麻黄から検出不能かまたは極く微量 (0.0005%) 含まれるに過ぎない<sup>51-53)</sup>。実際本研究で用いた麻黄中のアルカロイドを

HPLCにより定量したところ、*l*-norephedrine は検出されず、*d*-pseudoephedrine は 0.7% 含まれていた (Table I)。*l*-N-methylephedrine, *d*-N-methylpseudoephedrine は、抗炎症活性がわずかであった。これらのことから考えて、麻黄における主要な抗炎症活性物質は、炎症慢性期において、*d*-pseudoephedrine と考えられる。次に実験上の問題点として考えられることを幾つか列挙したい。まず、今回の線維芽細胞増殖抑制実験において、培養液中に直接煎液を添加したため、細胞増殖抑制は細胞毒性あるいは細胞障害による結果ではないかということが可能性として考えられる。このことについては、次の諸点から細胞障害の可能性はほぼ否定し得ると考えている。

① 増殖を抑制した段階で培養液を煎液を含まない通常のものに置き換えると増殖が回復する (Table II)。② 培養液上清中の浮遊または死滅細胞数に差異がない。③ 培養液に水煎液を加えても培養液の pH に変化が見られない。

④ 増殖が抑制された場合でも増殖曲線が下向きにはならずむしろ上向きである (Fig. 10他)。

次に、今回の研究では、培養液中に薬剤を直接加えたわけであるが、このことが生体内での事実を反映していないのではないかという憶測が生じる可能性がある。我々は、このことについてまず、麻黄を含む漢方製剤を服用後のヒト血漿中の麻黄アルカロイドは微量ではあるが十分定量可能である点を強調したい。具体的には、山本<sup>54)</sup>によると ephedrine 3.5mg, pseudoephedrine 1.2mg 含有のエキス製剤 2g を服用した後2時間のヒト血中濃度がそれぞれ 15 ng/ml, 5 ng/ml であったという。本研究における培養液中の pseudoephedrine の濃度については、HPLCによる定量の結果から考えて、例えば細胞増殖抑制効果のみられた麻黄水煎液 1%含有培養液中には pseudoephedrine が  $1.4 \mu\text{g/ml}$ 、4%には  $5.6 \mu\text{g/ml}$  含まれる計算になる。単一成分としての pseudoephedrine 添加実験ではその十数倍に相当する  $25 \mu\text{g}$

/mlを要した。この濃度のレベルは実験動物では血中で十分に達し得る濃度と思われる。

麻黄アルカロイドの抗炎症作用機序について、炎症の急性期ではアラキドン酸遊離抑制作用によるアラキドン酸代謝産物の産生抑制が一部関与しているとの報告<sup>21)</sup>がある。また、麻黄はアラキドン酸からプロスタグランディンE<sub>2</sub>への変換を阻害するともいわれている<sup>55)</sup>。本研究で陽性対照群として用いたインドメタシンは10<sup>-5</sup>M以上で線維芽細胞増殖抑制したことから、慢性期炎症においてもアラキドン酸代謝が炎症に関与している可能性がある。しかし、炎症の急性期においても、麻黄アルカロイドは、ヒスタミン、セロトニン、プロスタグランディンE<sub>1</sub>などによる足浮腫反応に対しても抑制作用があらわれるため<sup>20)</sup>、麻黄アルカロイドの抗炎症作用はアラキドン酸代謝抑制作用のみでは説明できない<sup>21)</sup>といわれている。

## 小 括

越婢加朮湯(EJ)の各構成生薬、およびEJ去一味の生薬による抗炎症作用を、線維芽細胞(balb/c-3T3, clone A31)増殖抑制を指標に検討した。EJ、麻黄、およびEJ去一味のうち麻黄が含まれる場合に強い増殖抑制作用を認めた。次に麻黄に含まれるアルカロイドについて検討したところ、*d*-pseudoephedrine (250 , 25  $\mu$ g/ml)および *l*-norephedrine (250 , 25  $\mu$ g/ml)で有意な増殖抑制がみられた。以上の結果から、EJの慢性期抗炎症効果は、主として麻黄に由来し、その抗炎症活性物質として *d*-pseudoephedrine および *l*-norephedrine が想定されたが、文献的考察により麻黄の成分のうち *d*-pseudoephedrine が麻黄の慢性炎症抑制作用の重要な部分をしめるものと考えられた。

第三部 和漢薬方剤「越婢加朮湯」の抗炎症作用に関する研究（Ⅲ）麻黄アルカロイド、*d*-pseudoephedrine によるラット慢性炎症モデルに対する抑制効果

序論

第一部においては、増殖性慢性炎症性疾患に用いられる方剤「越婢加朮湯」の実験炎症モデルにおける有効性を明らかにし、その作用機序の一部として、線維芽細胞増殖抑制機序が想定された。第二部では、方剤「越婢加朮湯」の線維芽細胞増殖抑制作用を線維芽細胞増殖抑制実験系において確認するとともに、同一の系を用いて構成生薬および活性成分のスクリーニングを行なった。その結果、麻黄のアルカロイドである *d*-pseudoephedrine が主なる慢性期抗炎症活性成分である可能性が高いとの結論に達した。ところで、第一部では主に *in vivo* により研究を行なったが、第二部ではすべて *in vitro* による結果であ

る。したがって、第二部で得られた結論を *in vivo* の系において確認する必要があると考えられる。そこで、第一部で用いたラット・カラゲニン空気嚢炎症モデルに対する *d*-pseudoephedrine の効果を検討した。

## 材料と方法

### 1. 薬物および試薬

カラゲニン (Seakem #202 carrageenin) は Marine Colloid Inc. (N. J., U. S. A.) より、*d*-pseudoephedrine hydrochloride は、Aldrich Chemical Co. (Wis., U. S. A.) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入したものを使用した。

### 2. 実験動物

実験動物は、6週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重 160~200 g) を日本エスエルシー株式会社 (浜松) より購入して用いた。飼育条件は、第一部に準じた。

### 3. カラゲニン空気嚢炎症

治療効果検定プロトコール施行のためのカラゲニン空気嚢炎症モデルの作成は第一部の方法と同様の方法で行なった(Fig.2)。検定薬剤として *d*-pseudoephedrine hydrochloride を用い、その 10 mg/kg wt.(n=5) および 50 mg/kg wt.(n=5)を Day 4 から Day 8 まで連日経口投与(2 ml/day)した。対照群(n=6)には水を同量(2 ml/day)投与した。最終日の Day 9 での滲出液量と肉芽重量を測定した。

#### 4. 統計学的検討

統計処理はMEDICAL PLAN II Ver3.0(株式会社データフォーム、京都)を使用し行なった。実験データはすべて平均値±標準誤差で表わし、検定は対応のない平均値の差の検定(T-testまたはWilcoxon test)で行なった。

#### 結果

カラゲニン空気嚢炎症(治療効果)での Day 9 での肉芽組織重量と滲出液量を Fig. 19 に示す。*d*-pseudoephedrine 50 mg/kg は

肉芽組織重量と滲出液量をともに有意に ( $p < 0.05$ ) 低下した。 *d*-pseudoephedrine 10 mg/kg は低下傾向を示すものの有意差を認めなかった。

### 考察

第一部の慢性期実験炎症モデル (*in vivo*) にて有効性を明らかにした方剤 EJ について、考えられる作用の一つである線維芽細胞増殖抑制機序を利用して、第二部では *in vitro* 実験で EJ の構成生薬および活性成分のスクリーニングを行なった。その結果、麻黄のアルカロイドである *d*-pseudoephedrine が慢性期抗炎症活性成分であることが示唆された。そこで本稿 (第三部) では *d*-pseudoephedrine の慢性期抗炎症作用を *in vivo* の実験にもどし検討したところ、このものの明らかな抗炎症効果を確認し得た。

本来、和漢薬は複合成分系薬物であるので、*in vivo* の実験系において活性物質のスクリ

ーニングを場合を尽くして完遂するのは、実際上困難である。また一方、活性物質のスクリーニングを *in vitro* の実験でのみ行ない得ても、それが真の活性物質か否かは即断できない。そこで本論文では、まず、大きく *in vivo* で薬理効果を捉え、*in vitro* で細かくスクリーニングをし活性物質と推定されるものを見出し、再びその物質を *in vivo* で検討した。

#### 小括

*d*-pseudoephedrine の慢性期抗炎症作用をカラゲニン空気嚢炎症ラットモデル (*in vivo*) で検討したところ、*d*-pseudoephedrine 50mg/kg において肉芽形成、滲出反応ともに有意 ( $p < 0.05$ ) な抑制を示した。

## 総括

- 1) EJは慢性期（炎症第3期）における抗炎症作用を有することを *in vivo* で明らかにした。
- 2) その機序としてひとつにはEJの肉芽組織線維芽細胞増殖抑制機序が示唆された。
- 3) *In vitro* の実験から、EJの慢性期抗炎症効果は、主として麻黄に由来し、その抗炎症活性物質が *d*-pseudoephedrine であることが示唆された。
- 4) *d*-Pseudoephedrine の慢性期抗炎症活性を *in vivo* の実験において確認した。このような方法でこの方剤の慢性期抗炎症作用に関する薬理効果を解明したのは本論文が初めてである。

## 文献

- 1) Terasawa, K. and Imadaya, A. : Therapeutic effect of Sino-Japanese (Kampoh) medicine on rheumatoid arthritis. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 2, 439-445, 1985.
- 2) 多留淳文 : 慢性関節リウマチの漢方薬療法. *現代東洋医学* 2, 6-16, 1981.
- 3) 今田屋章、寺澤捷年、土佐寛順、伊藤隆、桜川信男、高橋薫 : 慢性関節リウマチの和漢薬治療. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 15, 207-215, 1982.
- 4) 田中大也 : 慢性関節リウマチ (RA) における漢方治療 - 柴苓湯の寛解導入的効果. *Pharma Medica* 6 (suppl.), 70-79, 1988.
- 5) 丁宗鉄、大塚恭男 : 漢方薬と抗炎症 - 薬理学的研究の現状と展望. *漢方医学* 6, 12-20, 1982.
- 6) 加野軒作、安田晶子、金本郁男、足立伊左雄、上野雅晴、堀越勇、寺澤捷年 : 桂枝

加朮附湯、桂枝二越婢一湯加附子、桂枝芍  
藥知母湯の抗炎症作用 (I) 実験炎症モデル  
に対する抑制効果. 和漢医薬学会誌 1,  
149-253, 1984.

- 7) Tsurufuji, S.: How to assess inflam-  
mation in animals. *Drug. Exptl. Clin.*  
*Res.* 5, 79-84, 1979.
- 8) Tsurufuji, S., Sato, H., Min, K. R. and  
Ohuchi, K.: Difference in the anti-  
inflammatory effect of indomethacin  
between acute and chronic stages of  
carrageenin-induced inflammation. *J.*  
*Pharm. Dyn.* 1, 8-14, 1978.
- 9) Tsurufuji, S. and Utsuki, S.: Anti-  
inflammatory activity assayed by CMC  
pouch method of clonixin, indometha-  
cin, phenylbutazone and hydrocorti-  
sone acetate. *Folia Pharmacol. Japon.*  
67, 509-513, 1971.
- 10) 石川 浩、新延信吉、鶴藤 丞: 抗炎症

薬の作用形式の研究第1報 - Carboxy-methyl cellulose 囊法による抗炎症作用の定量的解析. 薬誌 88, 1472-1477, 1968.

- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 12) Woessner, J. F.: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 440-447, 1961.
- 13) Vilcek, J., Palombella, V. J., Hendriksen-Destefano, D., Swenson, C., Feinman, R., Hirai, M. and Tsujimoto, M.: Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 163, 632-643, 1986.
- 14) 中川秀夫: 増殖型炎症の薬物制御. 薬誌

102, 221-235, 1982.

- 15) Hikino, H., Konno, C., Takata, H. and Tamada, M.: Anti-inflammatory principles of *Ephedra* Herbs. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2900-2904, 1980.
- 16) 今野長八, 玉田満, ヒキノヒロシ: 麻黄の抗炎症成分その2, 日本生薬学会第25回年会(福岡)講演要旨集, p. 39, 1978.
- 17) 原田正敏, 加瀬義夫: 中枢興奮作用および抗炎症作用における麻黄エキスと含有アルカロイドとの関係. 日本生薬学会27年会講演要旨集, 1980, p. 41.
- 18) 原田正敏: 麻黄の薬理. 現代東洋医学 1, 34-39, 1980.
- 19) 原田正敏, 西村一, 加瀬義夫: 麻黄エキスの薬理効果における含有エフェドリン類の役割. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 16, 291-295, 1983.
- 20) Kasahara, Y., Hikino, H., Tsurufuji, S., Watanabe, M. and Ohuchi K.: Anti-in-

flammatory actions of ephedrine in acute inflammations. *Planta Medica* 4, 325-331, 1985.

- 21) 菅原正喜, 大内和雄, 渡辺雅子, 平沢典保, 鶴藤 丞, 笠原義正, 曳野 宏: マクロファージによるアラキドン酸代謝と麻黄アルカロイドエフェドリン類の作用. 炎症 6, 245-249, 1986.
- 22) Endo, K., Taguchi, T., Taguchi, F., Hikino, H., Yamahara, J. and Fujimura, H.: Anti-inflammatory Principles of *Atractylodes* Rhizomes. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 2954-2958, 1979.
- 23) 熊谷 朗: カンゾウの生理化学(1)カンゾウ, とくにグリチルリチンのホルモン様作用とその作用機序. 代謝 10, 632-645, 1973.
- 24) Finney, R.S.H. and Somers, G.F.: The anti-inflammatory activity of glycyrrhetic acid and derivatives.

- J. Pharm. Pharmacol.* 10, 613-620, 1958.
- 25) Finney, R. S. H. and Tarnoky, A. L. : The pharmacological properties of glycyrrhetic acid hydrogen succinate (disodium salt). *J. Pharm. Pharmacol.* 12, 49-58, 1960.
- 26) Hikino, H., Konno, C., Takata, H., Yamada, Y., Yamada, C., Ohizumi, Y., Sugio, K. and Fujimura, H. : Anti-inflammatory principles of Aconitum Roots. *J. Pharm. Dyn.* 3, 514-525, 1980.
- 27) 有地 滋、久保 道德、松田 秀秋、谿 忠人、津永 佳世子、吉川 雅之、北川 勳 : 牡丹皮の研究 (第 3 報) 牡丹皮の抗炎症作用. *生薬* 33, 178-184, 1979.
- 28) 林 元英 : 紫根および当帰の薬理学的研究 (第 1 ~ 3 報) *日薬理誌* 73, 177-191, 193-203, 205-214, 1977.
- 29) Nonaka, G., Nishioka, I., Nagasawa, T. and Oura, H. : Tannins and related

compounds. I. Rhubarb(1). *Chem. Pharm. Bull.* 29, 2862, 1981.

- 30) 柴田 丸、山竹美和、天谷幸子、福島正子：生薬「升麻」の薬理学的研究（第1報）北升麻の急性毒性と抗炎症作用。薬誌 95, 539-546, 1975.
- 31) 柴田 丸、桜井信子、小野田真：生薬「升麻」の薬理学的研究（第2報）サラシナショウマの抗炎症作用。薬誌 97, 911-915, 1977.
- 32) 山原條二、松田久司、渡辺温子、沢田徳之助、藤村 一：生薬の生物活性成分に関する研究 ケイガイの鎮痛および抗炎症作用。薬誌 100, 713-717, 1980.
- 33) 高木敬次郎、李 殷芳：桔梗の薬理学的研究（第2報）粗 Platycodin の抗炎症作用、摘出臓器におよぼす作用およびその他の薬理作用。薬誌 92, 961-968, 1972.
- 34) Saeki, K., Yokoyama, J. and Wake, K.:  
Inhibition of granulation tissue

- growth by histamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 193, 910-917, 1975.
- 35) 山本昌弘：サイコの生化学と作用機序 - 抗炎症と脂質代謝. 代謝 10, 695-701, 1973.
- 36) Kimura, M., Suzuki, J., Yamada, T., Yoshizaki, M., Kikuchi, T., Kadota, S. and Matsuda, S.: Anti-inflammatory effect of neolignans newly isolated from the crude drug "Shin-i" (Flos Magnoliae). *Planta Med.* 51, 291-293, 1985.
- 37) Shiroishi, H., Terasawa, K., Toriizuka, K., Yamamoto, Y. and Nakagawa, H.: Studies on anti-inflammatory effects of Japanese Oriental (Kampo) medicines - Inhibitory effects on experimental acute and chronic inflammatory models in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 6, 89-99, 1989.

- 38) 有地 滋、岡田雄作、小林尚子、若園房  
雄：柴胡の研究第1報 胸脇苦満と柴胡。  
*Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 4, 48-57, 1970.
- 39) 長 紹元、高橋 誠、戸井田貞子、丁  
宗鉄：生薬によるアジュバント関節炎の  
抑制（第1報）。生薬 36, 78-81, 1982.
- 40) 戸井田貞子、高橋 誠、進藤美由記、丁  
宗鉄、山田陽城、清原寛章、長 紹元：  
生薬によるアジュバント関節炎の抑制。  
*Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 16, 262-266, 1983.
- 41) Takahashi, M., Cyong, J., Toita, S.,  
Shindo, M. and Cho, S.: Suppression of  
adjuvant arthritis by oral adminis-  
tration of Oriental Herbs II. *Kita-  
sato Arch. of Exp. Med.* 55, 34-45, 1982.
- 42) 小橋 修：アジュバント関節炎。「難治  
疾患のモデルと動物実験（京極方久編）」、  
ソフトサイエンス社、東京、pp. 340-350,  
1984.
- 43) Gillies, R. J., Didier, N. and Denton, M.:

- Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal. Biochem.* 159, 109-113, 1986.
- 44) Kueng, W., Silber, E. and Eppenberger, U. : Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 182, 16-19, 1989.
- 45) 寺澤捷年 : 症例から学ぶ和漢診療学, 医学書院, 東京, 1990, p209.
- 46) 麻生和雄, 稲積 豊 : ヒト線維芽細胞に対する外用副腎皮質ホルモン及び非ステロイド剤の影響. 現代の診療 21, 1773-1775, 1979.
- 47) 麻生和雄, 近藤慈夫, 稲積 豊 : 外用グルココルチコイドの *in vitro* での線維芽細胞抑制効果. 日皮会誌 90, 599-604, 1980.
- 48) 高橋信博, 向尾正昭 : リゾチームの正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する作用. 基礎と臨床, 18, 6306-6311, 1984.

- 49) 山崎和男：麻黄の品質について。和漢医薬学会誌 2, 93-94, 1985.
- 50) ヒキノヒロシ, 玉田 満, 今野長八：和漢薬の品質に関する研究第2報（麻黄）。日東医誌 31, 167-170, 1981.
- 51) 笠原義正, ヒキノヒロシ, 楊 玲玲, 顔 昆榮：麻黄の節間および節のエフェドリン系アルカロイドの含量。生薬学雑誌 39, 142-145, 1985.
- 52) 山崎和男：麻黄の有効成分，第8回和漢薬シンポジウム記録, 59-64, 1974.
- 53) Moriyasu, M., Endo, M., Kanazawa, R., Hashimoto, Y., Kato, A. and Mizuno, M.: High-performance liquid chromatographic determination of organic substances by metal chelate determination. III. Analysis of Ephedra bases. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 744-747, 1984.
- 54) 山本恵一：漢方製剤投与後のヒト血漿中

のエフェドリン類のGC/MS分析法. 医学と  
生物学 111, 157-160, 1985.

55) 三川 潮 : 生薬成分の酵素阻害作用. フ  
ァルマシア 17, 387-391, 1981.

Table 1 Constitution of Eppi-ka-jutsu-to (越婢加朮湯)

Mao (麻黄), Ephedrae Herba, Ephedra intermedia SCHRENK et MEYER*	6.0 g	from China
Sekko (石膏), Gypsum Fibrosum, gypsum $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.0	China
Shokyo (生姜), Zingiberis Rhizoma, Zingiber officinale ROSCOE	1.0	China
Taiso (大枣), Zizyphi Fructus, Zizyphus jujuba MILL. var. inermis REHD.	3.0	China
Kanzo (甘草), Glycyrrhizae Radix, Glycyrrhiza glabra L. var. glandulifera REG. et HERD.	2.0	China
Byakujutsu (白朮), Atractylodis Rhizoma, Atractylodes macrocephala KOIDZUMI	4.0	China

Each crude drug was mixed with 400 ml of water and boiled gently to 300 ml.

\*Contents of Ephedra alkaloids determined by HPLC were 0.42% of ephedrine, 0.70% of pseudoephedrine and 0.045% of methylephedrine. Norephedrine was undetectable in this dried Ephedra species.

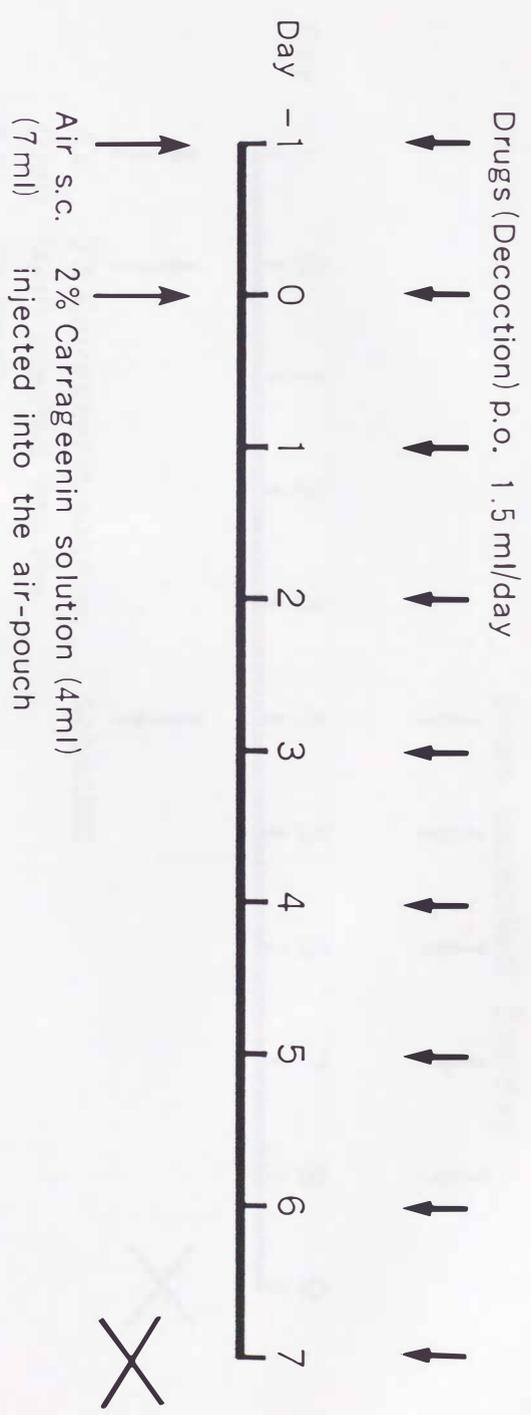


Fig. 1 Schedule of carrageenin air-pouch inflammation in rats for estimating preventive effects of the test drugs.

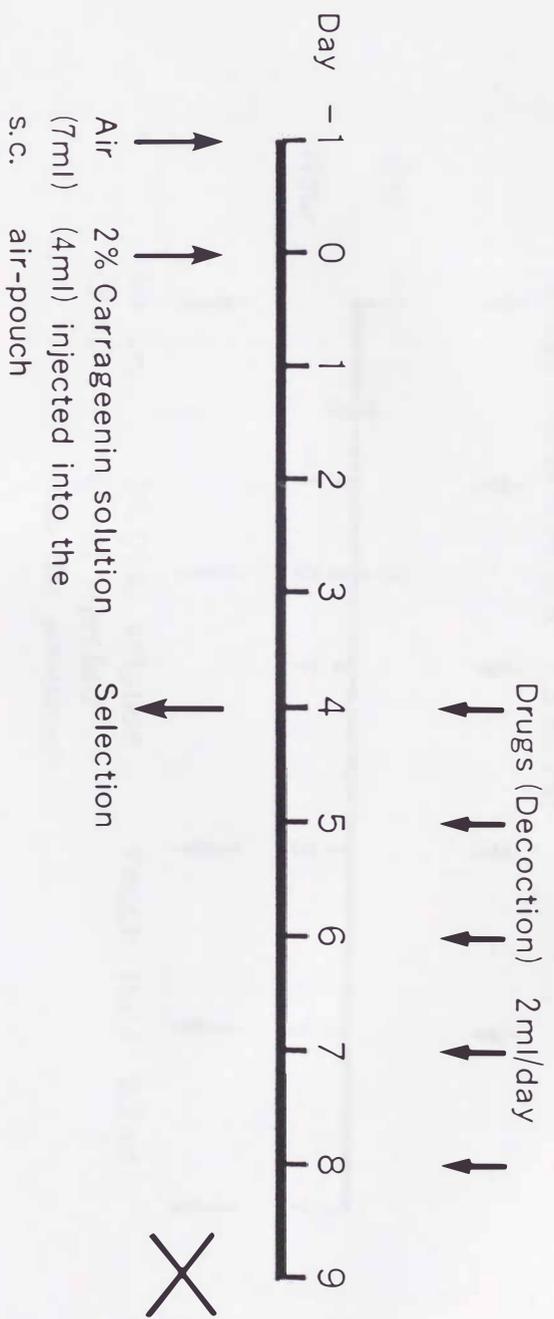


Fig.2 Schedule of carrageenin air-pouch inflammation in rats for estimating curing effects of the test drugs.

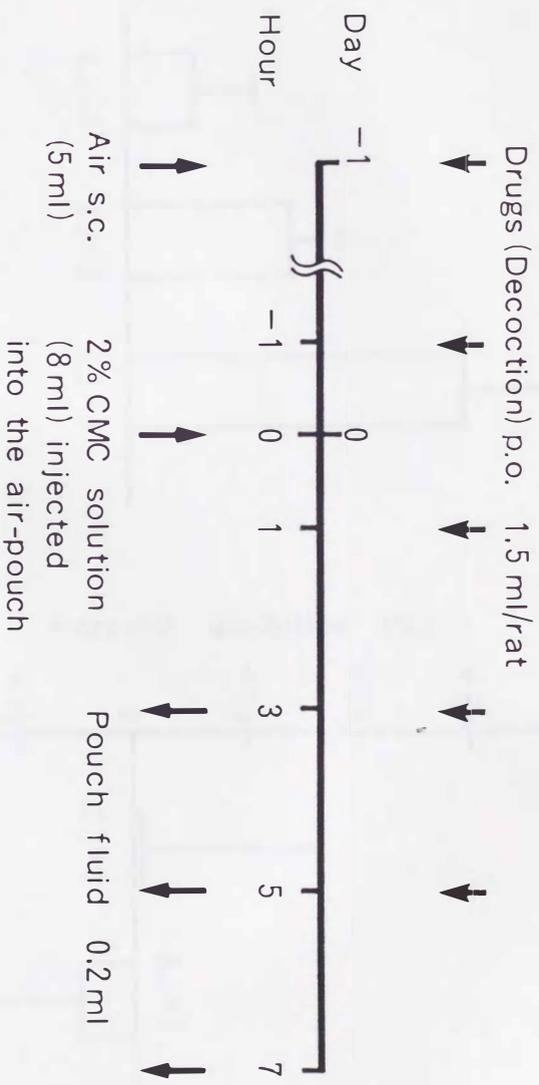


Fig. 3 Schedule of CMC air-pouch inflammation in rats.

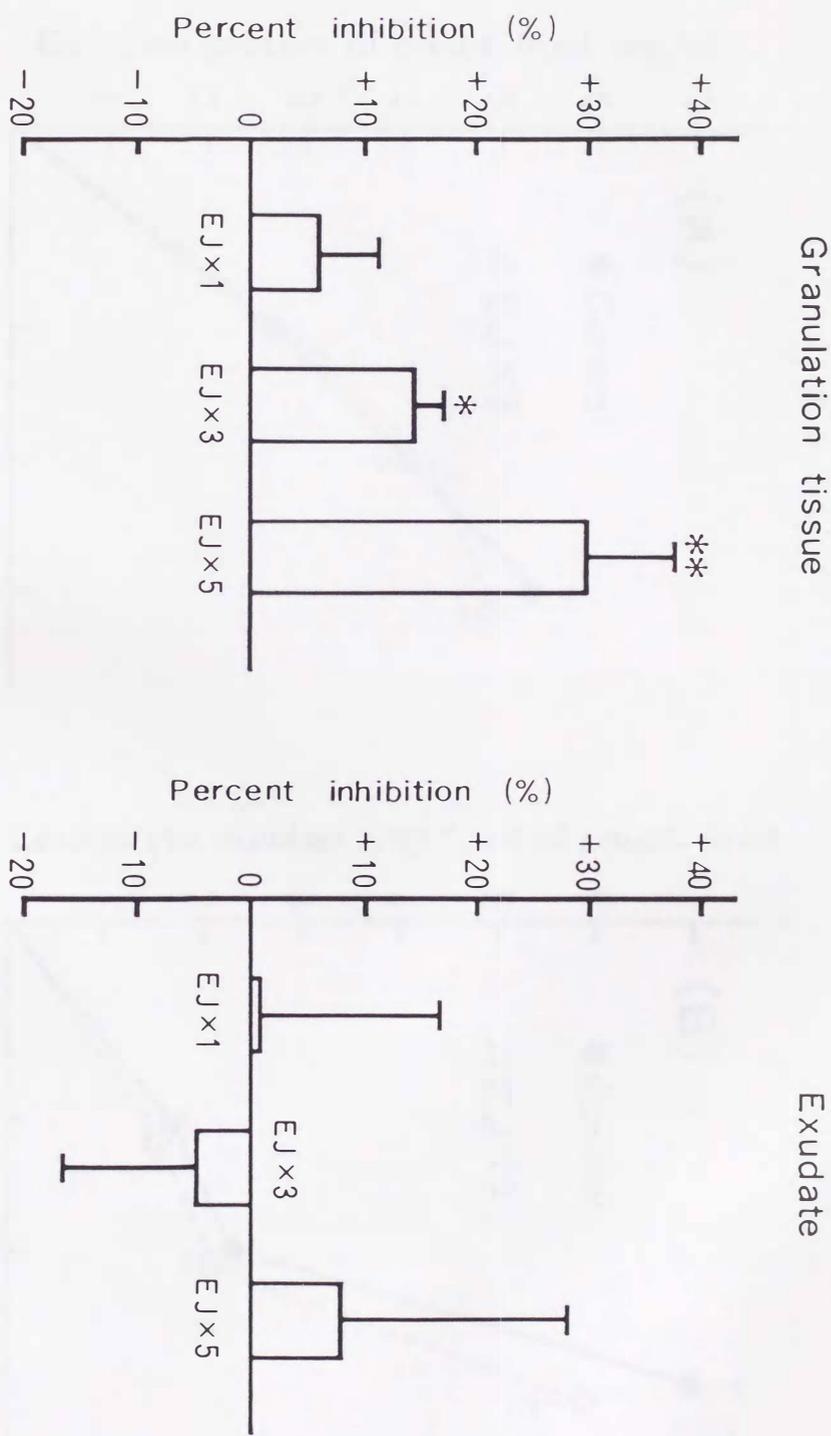


Fig. 4 Preventive effects on the amounts of granulation tissue and exudate of the carragenin air-pouch inflammation following the schedule shown in Fig. 1.

Vertical line means percent inhibition of control on the amounts of granulation tissue or exudate. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of six or seven rats. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

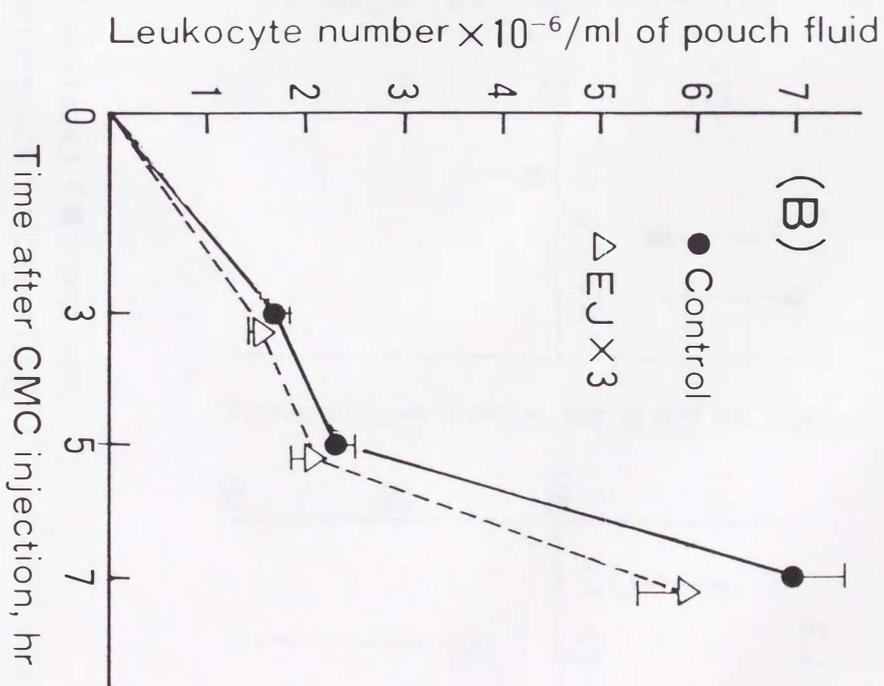
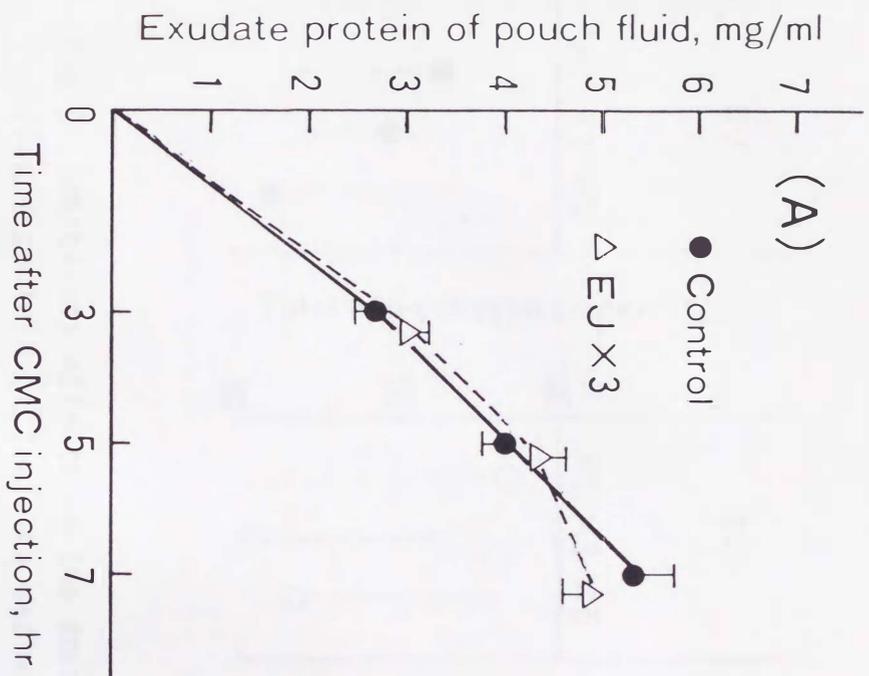


Fig. 5 Effect of EJ on exudate protein (A) and leukocyte emigration (B) in CMC air-pouch inflammation in rats.

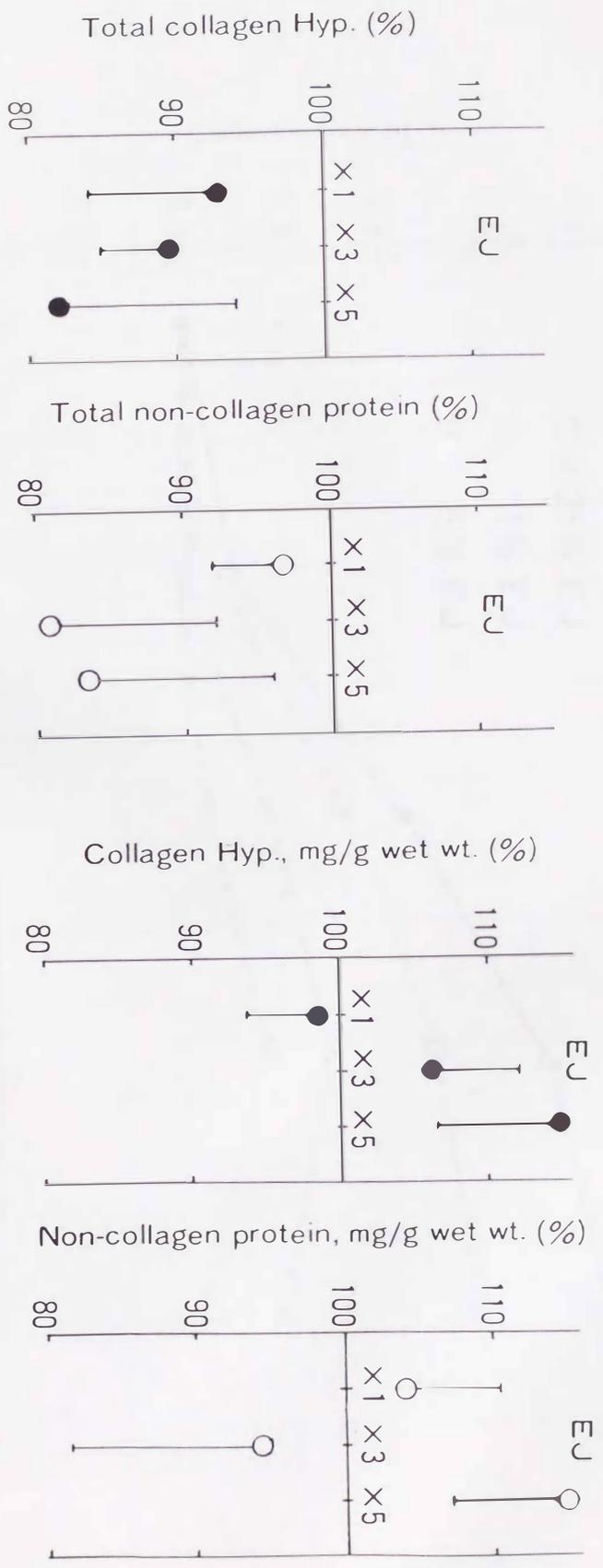


Fig. 6 Inhibitory effects on the amounts of collagen (●) and non-collagen protein (○) of the carrageenin air-pouch inflammation following the schedule shown in Fig. 1. Vertical line means percentage of amount compared with control. Each point represents the mean ± S.E.M. of six or seven rats. All values are not statistically significant versus corresponding controls.

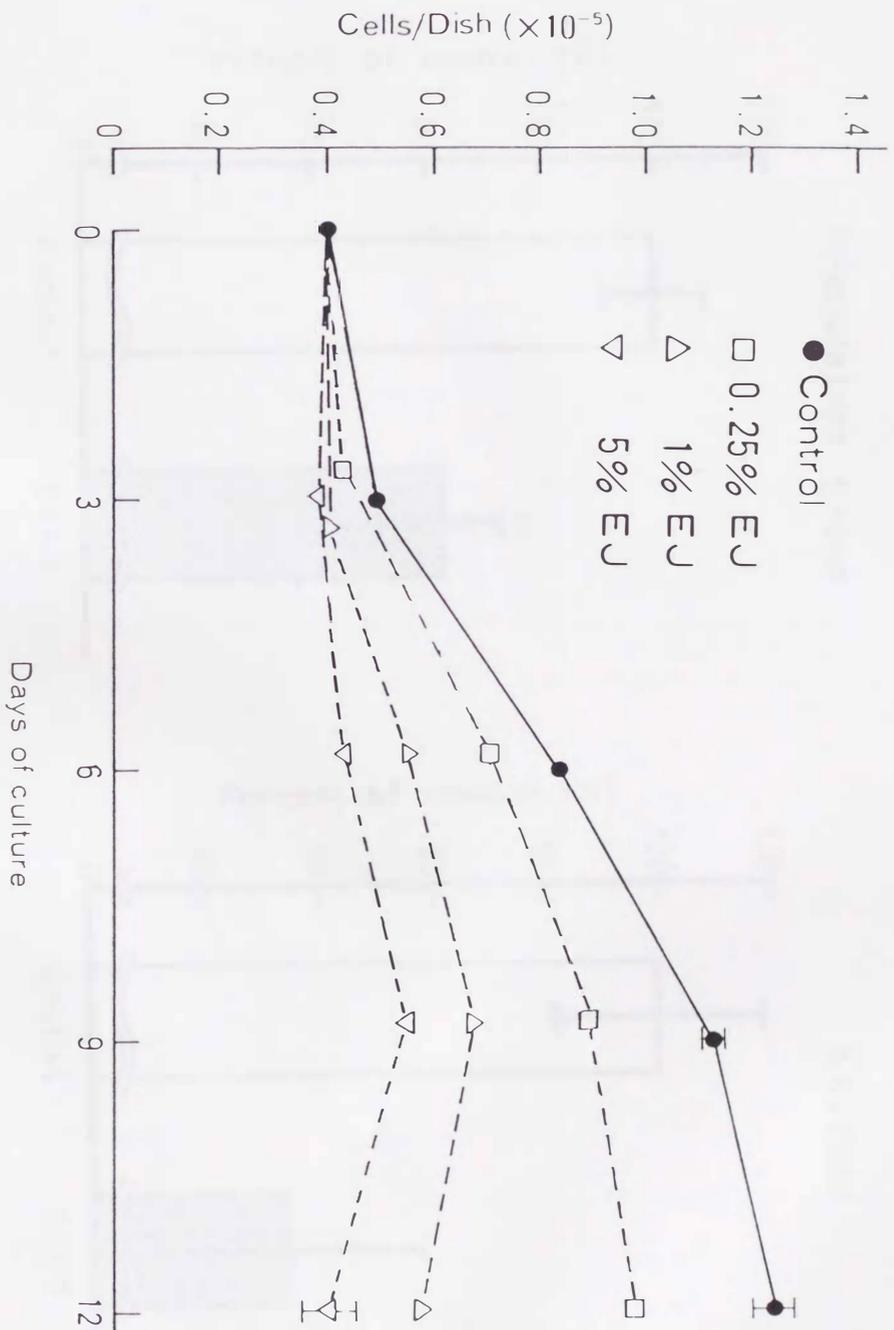


Fig. 7 Inhibitory effect of EJ on the proliferation of granulation tissue-derived fibroblasts in culture.

Results are expressed as cells number per dish, mean values  $\pm$  S.E.M. (vertical bars); vertical bars within the size of the symbol used are omitted. All values at day 6, 9 and 12 are significant *versus* corresponding controls ( $p \leq 0.001$ ).

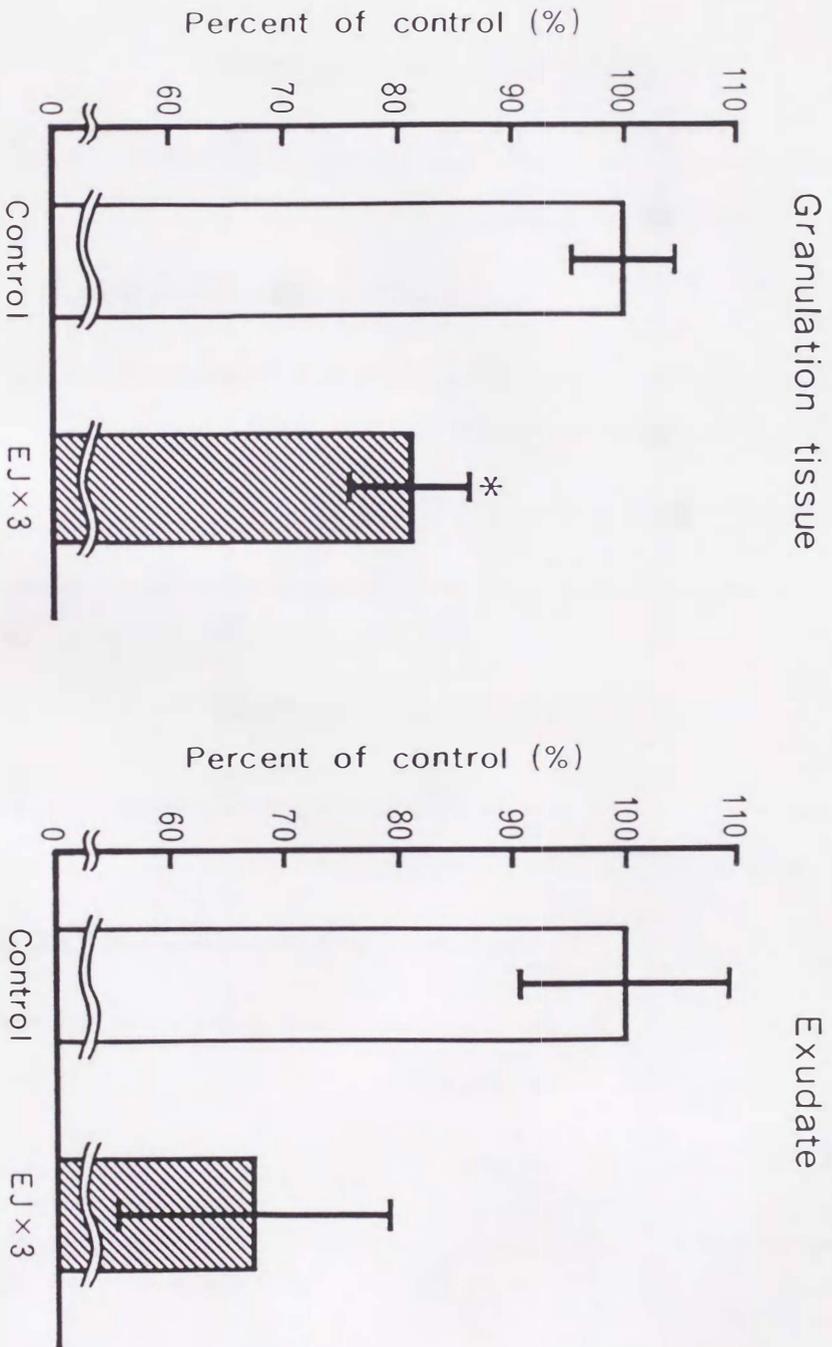


Fig. 8 Curing effect of EJ on the amounts of granulation tissue and exudate of the carragenin air-pouch inflammation following the schedule shown in Fig. 2.

Vertical line means percent of control. Each column and bracket represents the mean  $\pm$  S.E.M. of seven rats. Values significantly different from the control: \*  $p < 0.05$ .

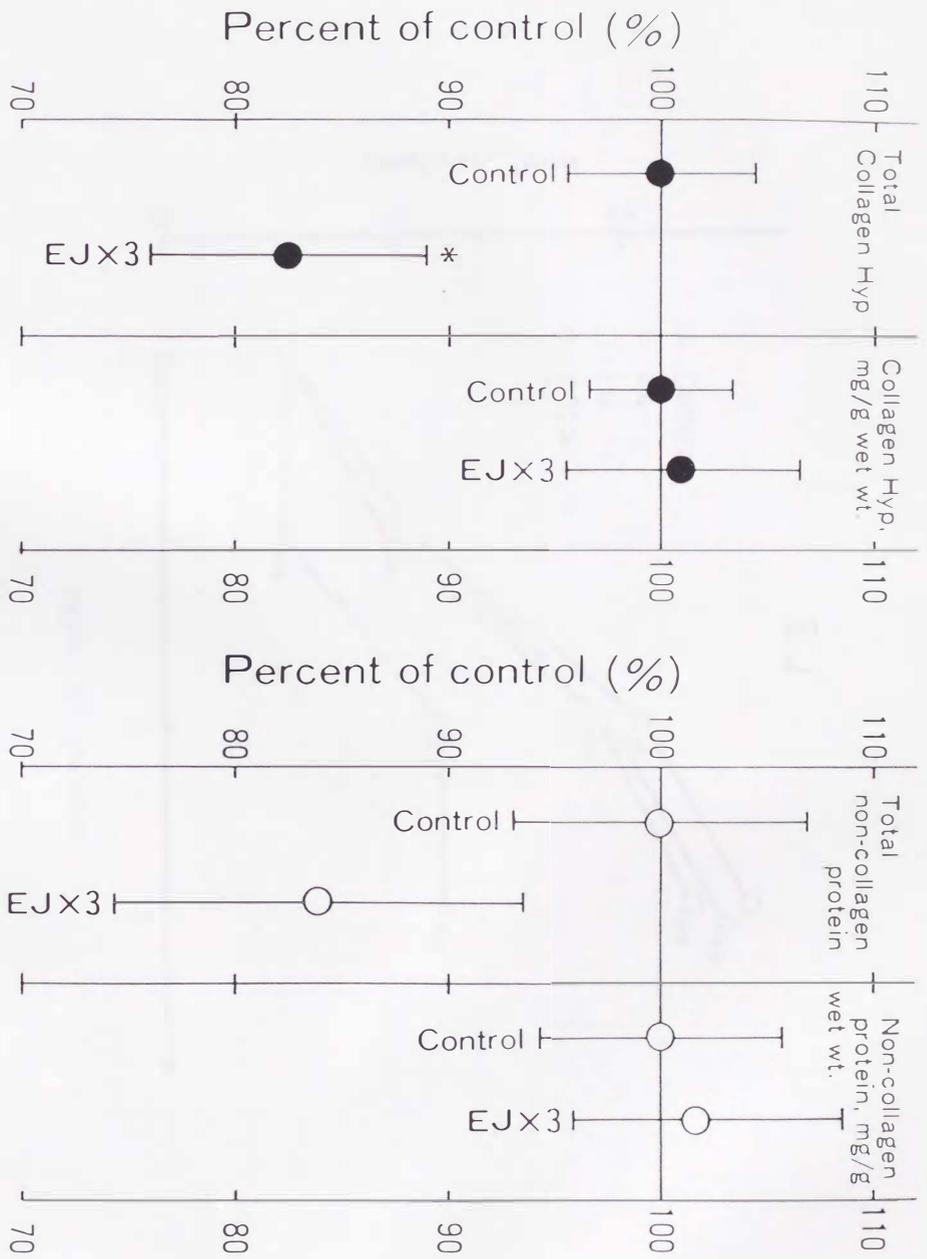


Fig. 9 Inhibitory effect of EJ on the amounts of collagen (●) and non-collagen protein (○) of the carrageenin air-pouch inflammation following the schedule shown in Fig. 2.

Vertical line means percent of control. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of seven rats. Values significantly different from the control: \*  $p < 0.05$ .

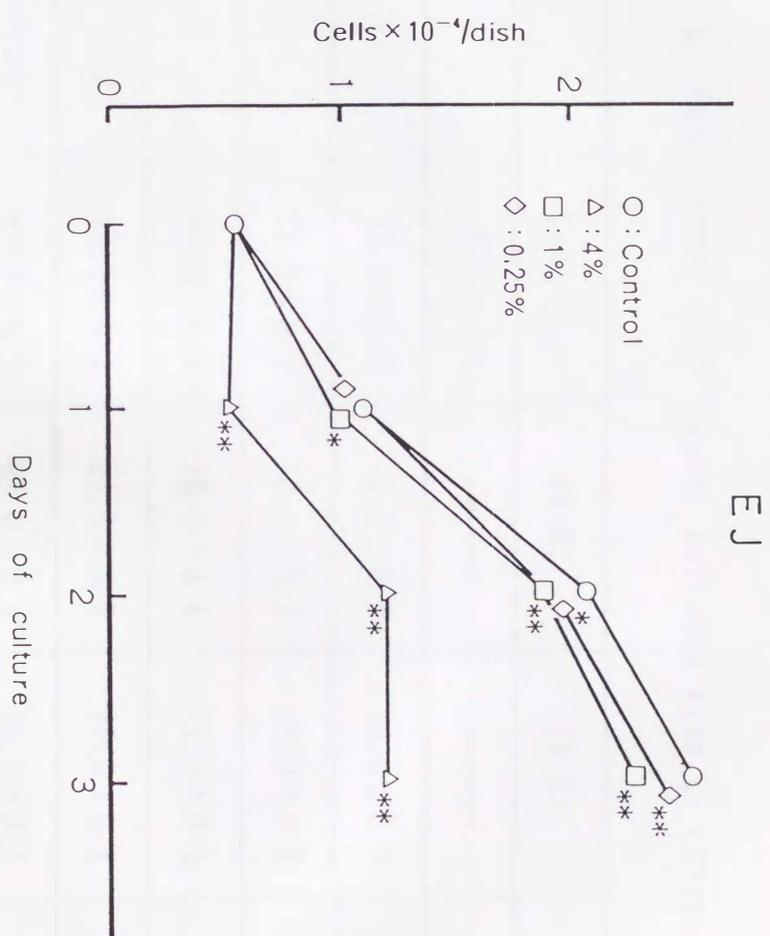


Fig. 10 Inhibitory effect of EJ in the proliferation of fibroblasts (Balb/c-3T3, clone A31) in culture.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

Table II Cell number ( $\times 10^{-3}$ /dish) cultured with EJ containing medium.

	Control	4% EJ	1% EJ	0.25% EJ
Day 0	5.5 $\pm$ 0.1	—	—	—
Day 1	11.0 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.2	10.0 $\pm$ 0.2	10.2 $\pm$ 0.4
Day 2	20.8 $\pm$ 0.2	12.1 $\pm$ 0.2	19.0 $\pm$ 0.2	19.6 $\pm$ 0.1
Day 3	25.3 $\pm$ 0.1	12.1 $\pm$ 0.4	22.8 $\pm$ 0.2	24.1 $\pm$ 0.1
Day 1 + 2*	26.2 $\pm$ 0.1	21.1 $\pm$ 0.5	25.2 $\pm$ 0.2	25.5 $\pm$ 0.2
Day 2 + 2*	26.2 $\pm$ 0.1	23.0 $\pm$ 0.4	25.6 $\pm$ 0.5	26.0 $\pm$ 0.2

\* Medium was exchanged with EJ-free, 10%FBS-containing medium on Day 1 or Day 2, and 2 days after the procedure, cell numbers were determined as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. of 6 determinations.

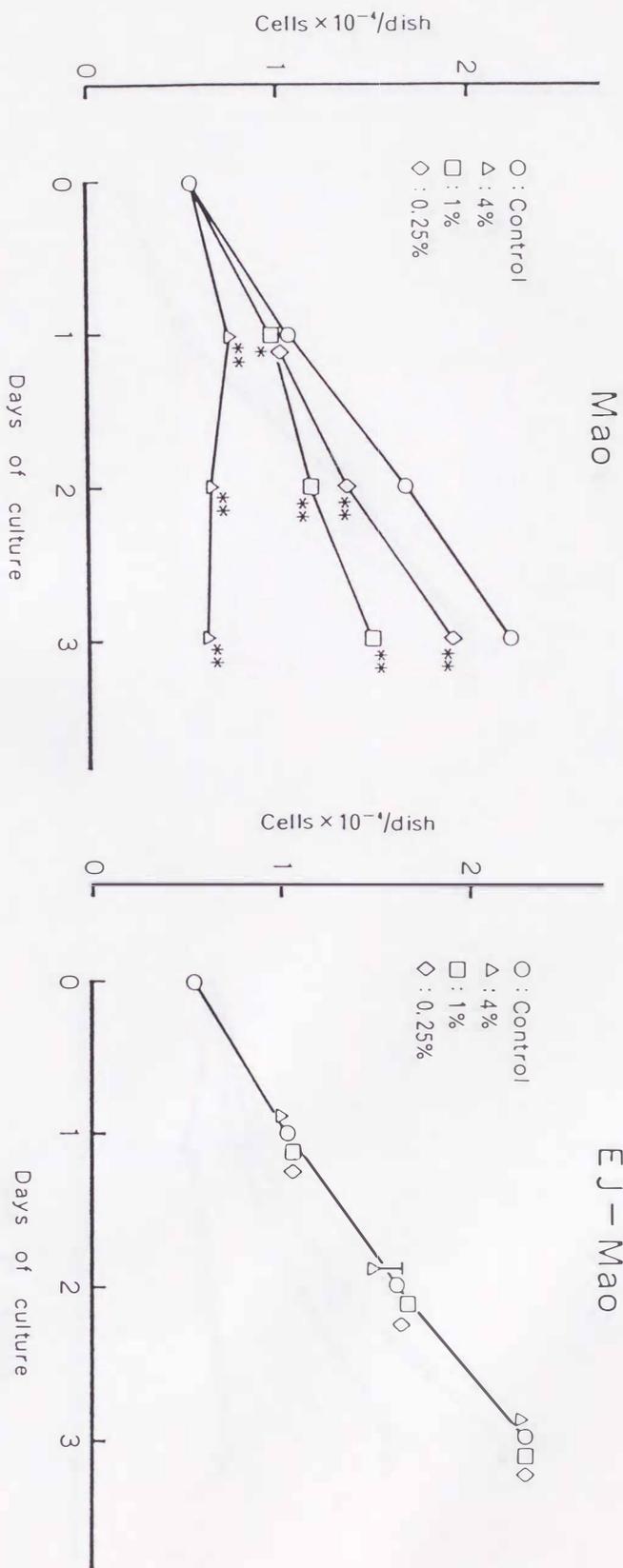


Fig. 11 Effects of "Mao" (Ephedra) and "EJ-Mao" (EJ without Ephedra) on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

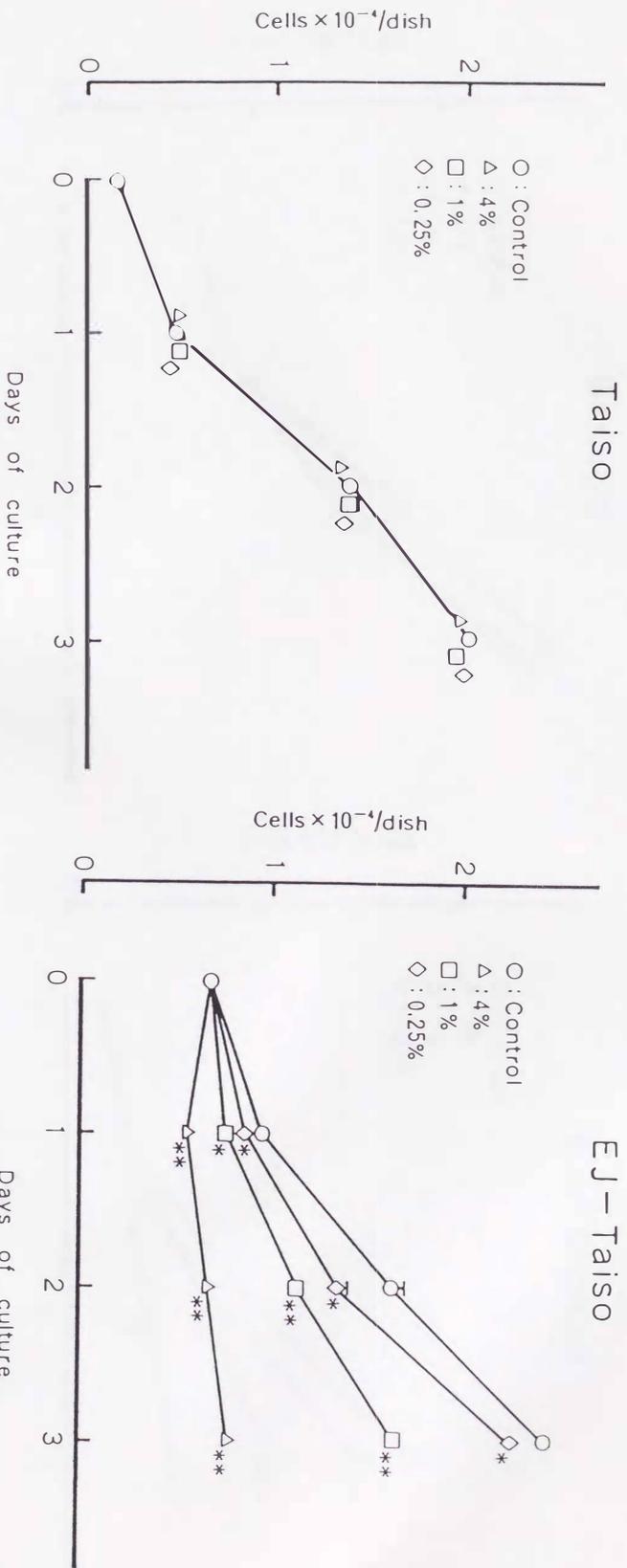


Fig. 12 Effects of "Taiso" (Zizyphus) and "EJ-Taiso" (EJ without Zizyphus) on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

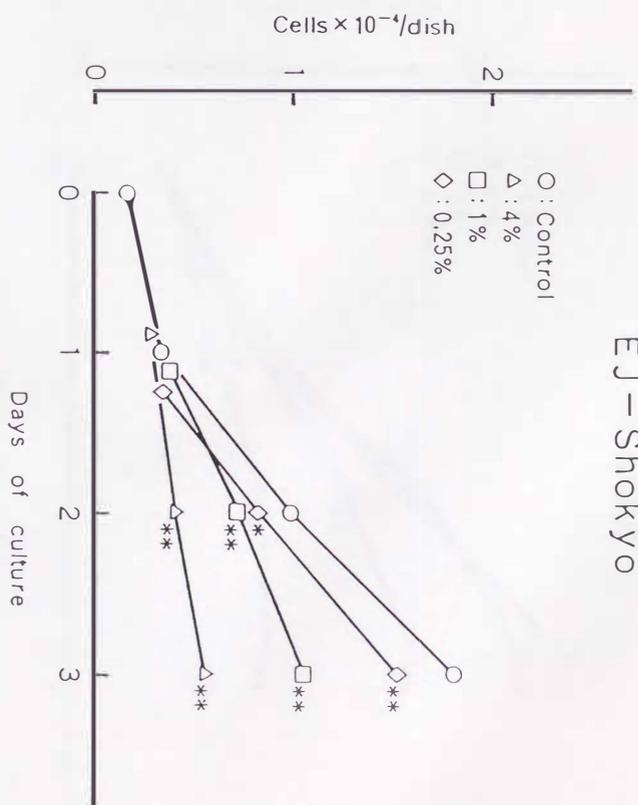
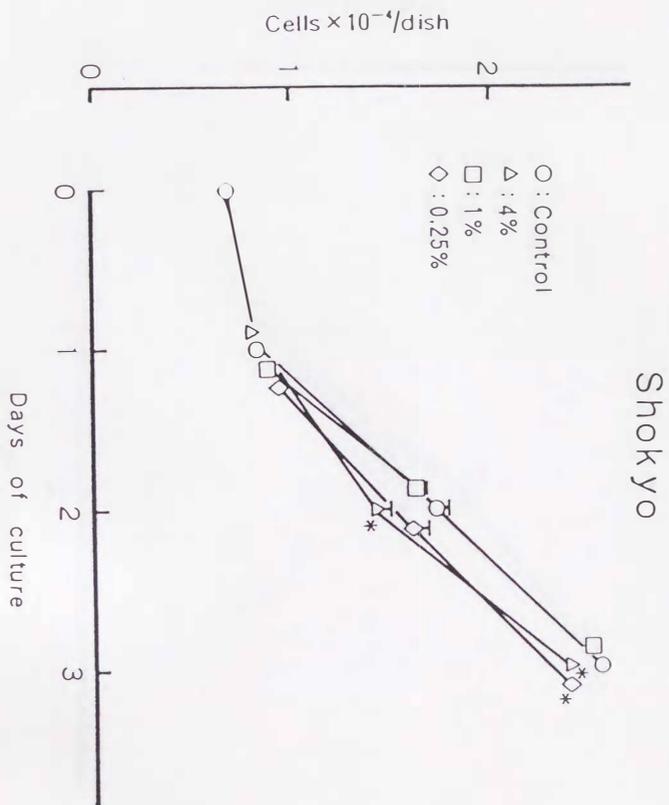


Fig. 13 Effects of "Shokyo" (Zingiber) and "EJ-Shokyo" (EJ without Zingiber) on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

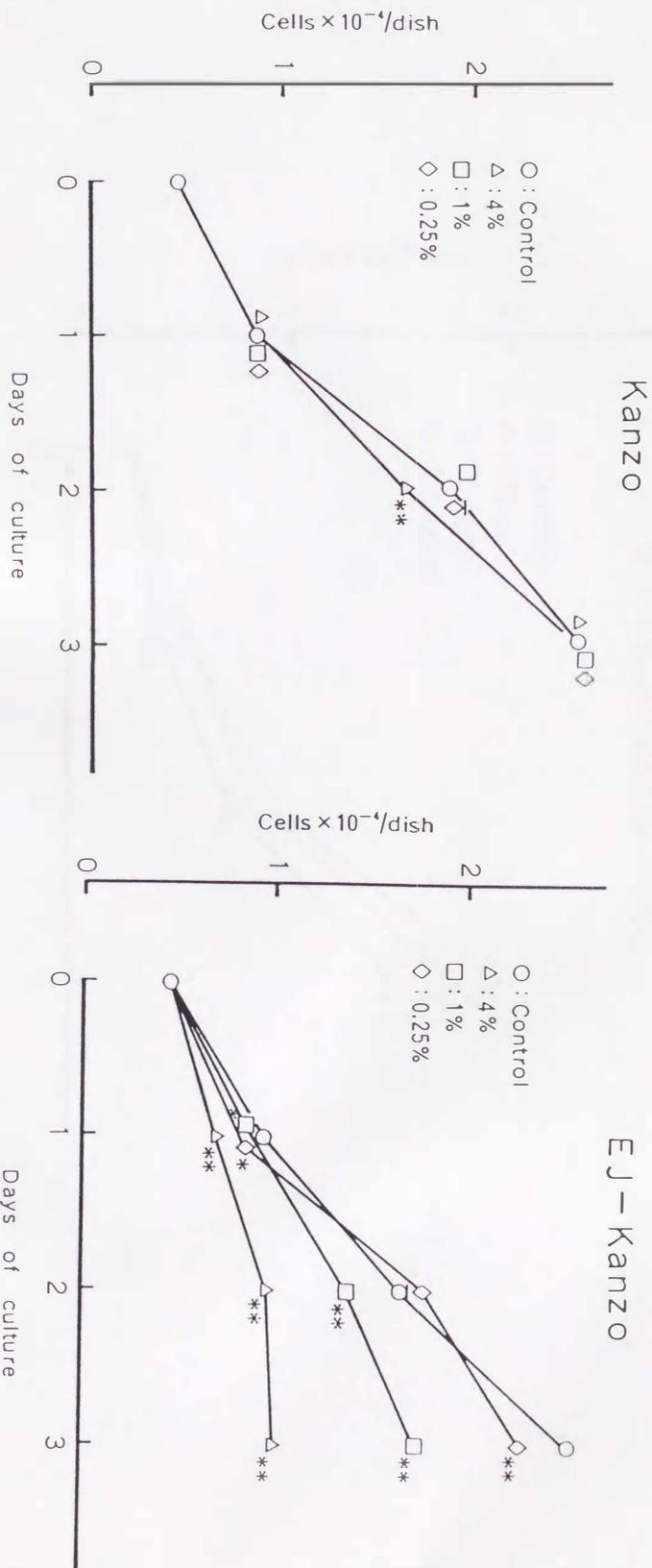


Fig. 14 Effects of "Kanzo" (Glycyrrhiza) and "EJ-Kanzo" (EJ without Glycyrrhiza) on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Values are statistically significant *versus* corresponding controls; \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

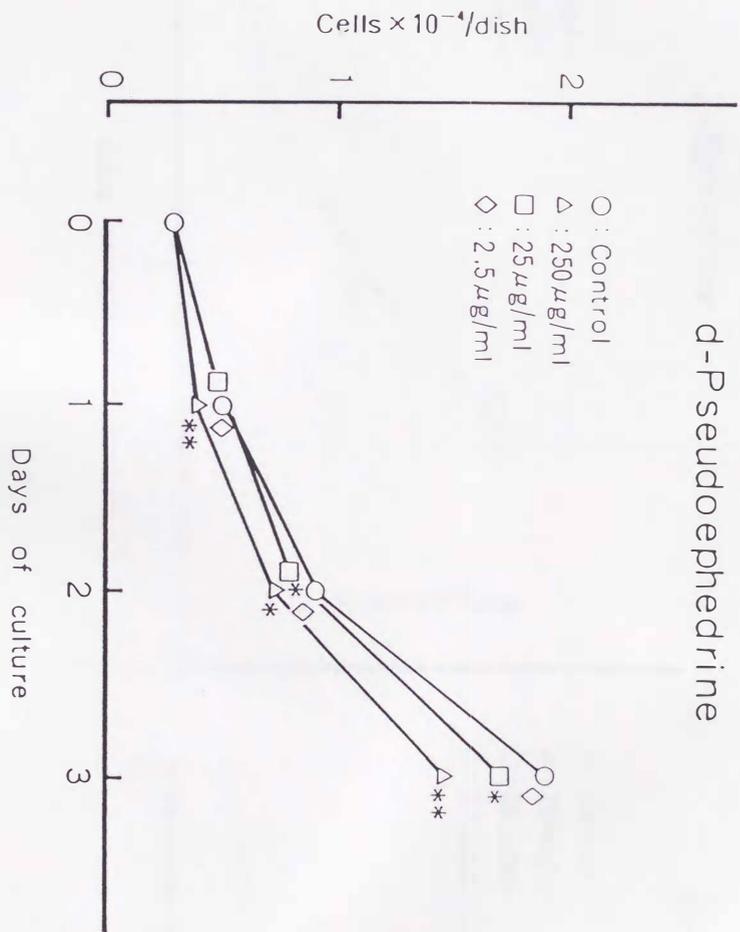


Fig. 15 Inhibitory effect of *d*-pseudoephedrine on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

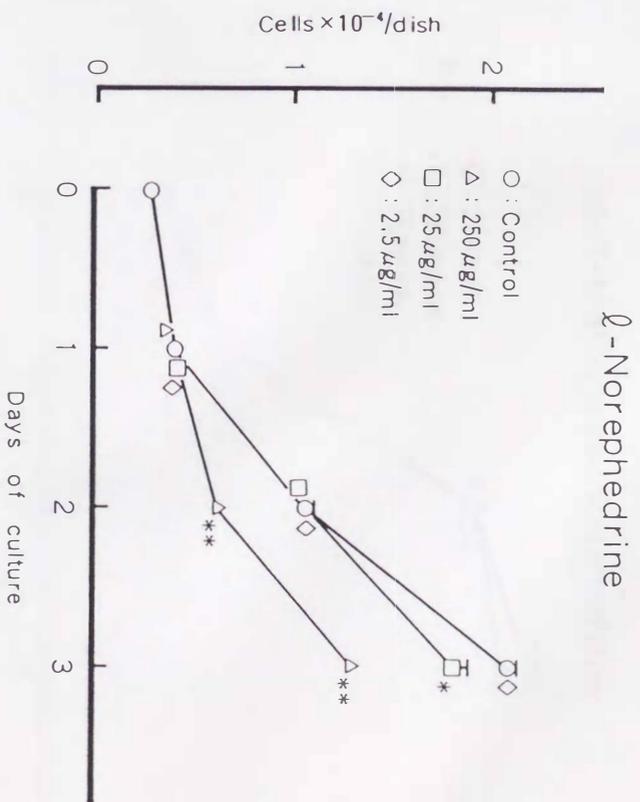
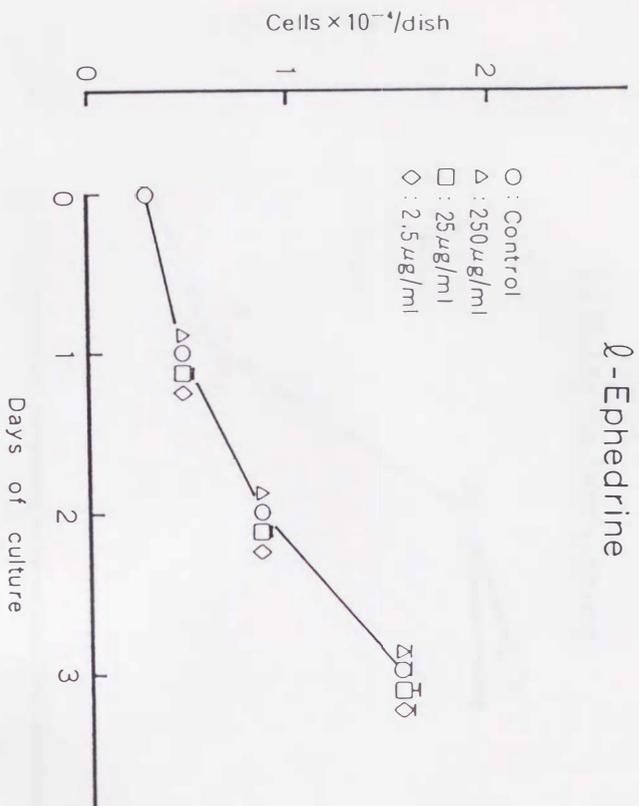
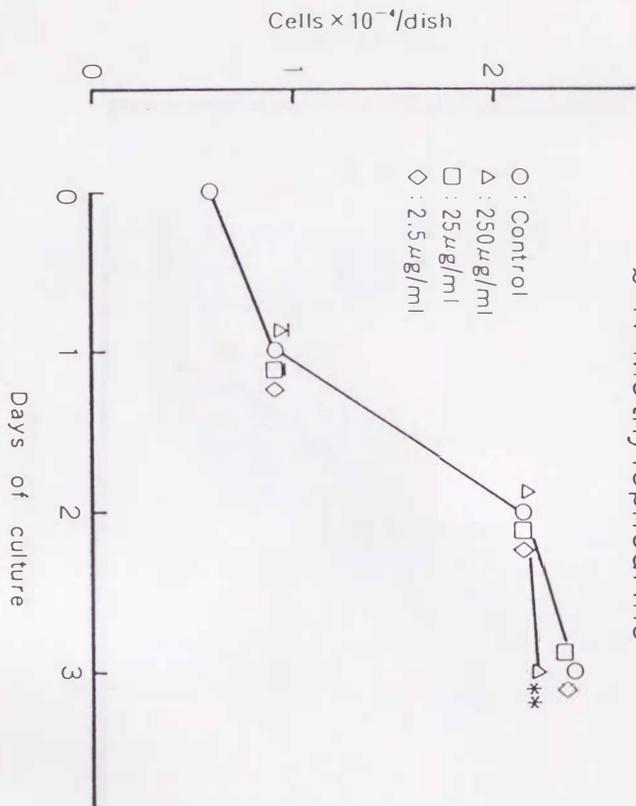


Fig. 16 Effects of *l*-ephedrine and *l*-norephedrine on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls; \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

### l-N-Methyllephedrine



### d-N-Methylpseudoephedrine

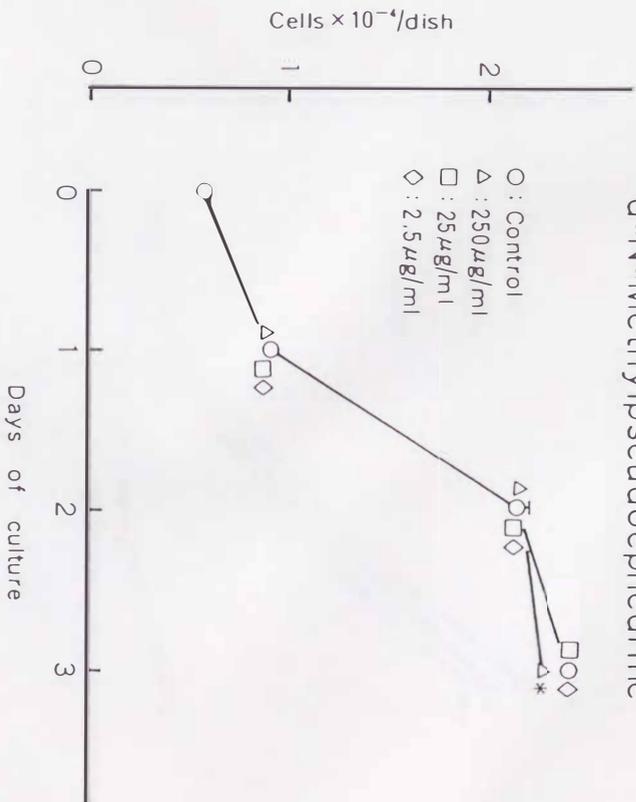


Fig. 17 Effects of *l*-N-methyllephedrine and *d*-N-methylpseudoephedrine on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

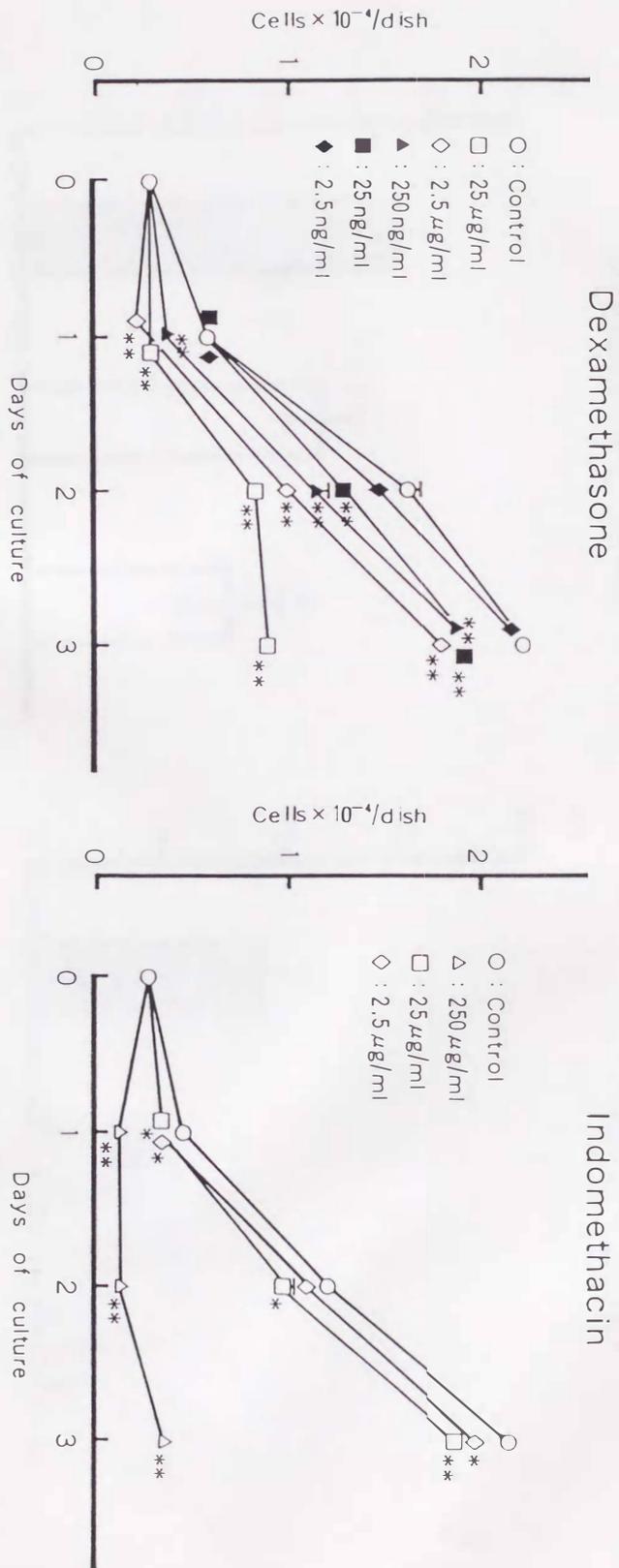


Fig. 18 Effects of dexamethasone and indomethacin on fibroblast proliferation.

Each point represents the number of cells per dish, and is the mean value  $\pm$  S.E.M. (vertical bar) of 6 determinations. Vertical bars within the size of the symbol used are omitted. Values are statistically significant *versus* corresponding controls: \*  $p < 0.05$ ; and \*\*  $p < 0.01$ .

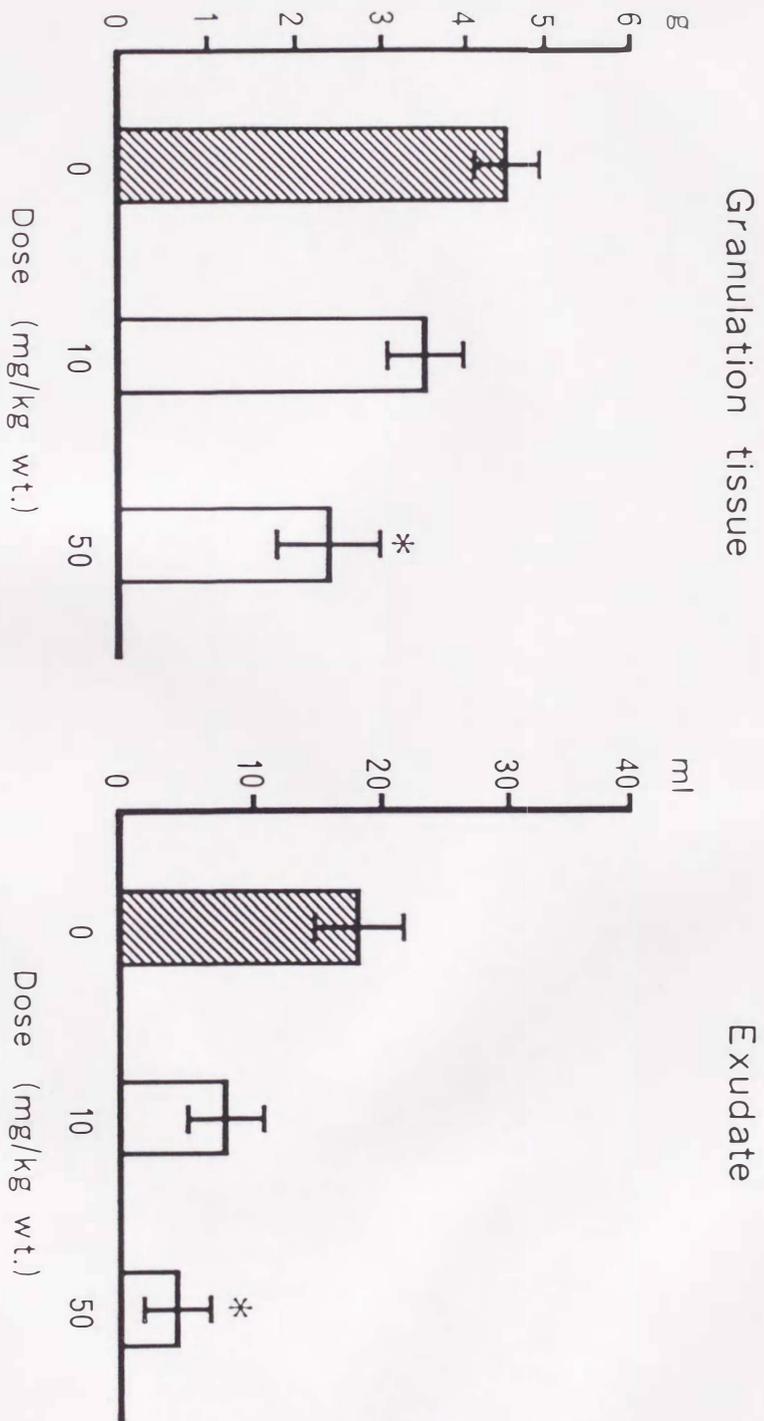
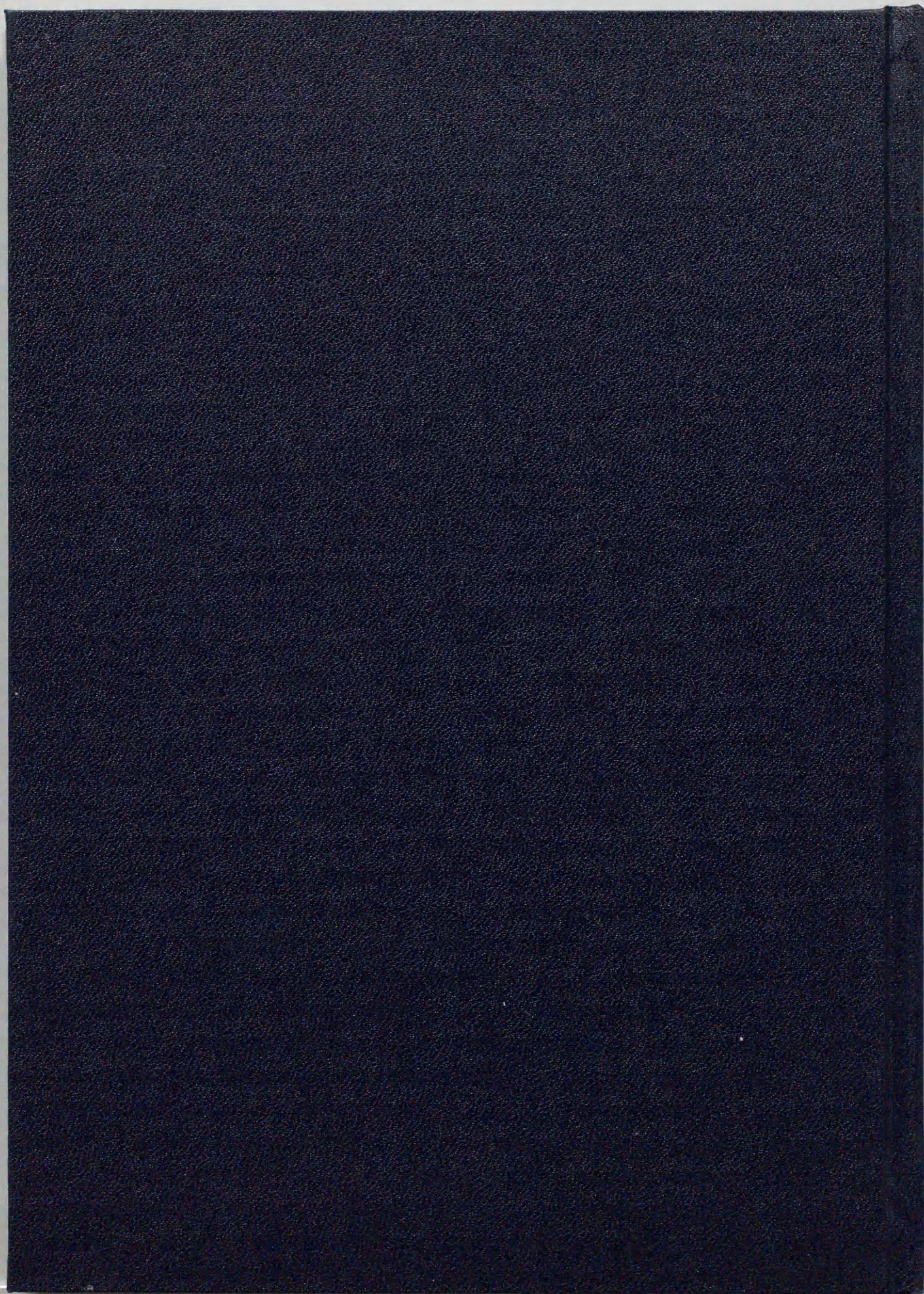


Fig. 19 Inhibitory effects of *d*-pseudoephedrine on the amounts of granulation tissue and exudate of the carrageenin air-pouch inflammation following the schedule shown in Fig. 2.

Results are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. of five or six rats. Values significantly different from the control: \*  $p < 0.05$ .



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

