

タンニン酸およびタンニン酸澱粉の実験的消化性潰瘍に対する効果

谷 覚

城西大学薬学部¹⁾

Effects of Tannic Acid and Tannic Acid-Starch on the Experimental Gastric Ulcer in Rat

SATORU TANI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University¹⁾

(Received November 27, 1975)

Tannic acid has an inhibitory effect against the proteolytic activity of pepsin *in vitro*, but its activity was nonspecific. In pylorus-ligated rat, tannic acid inhibited not only peptic activity but also gastric acid secretion. However, the volume of gastric juice was not influenced by tannic acid. Tannic acid showed antiulcer activity by its oral administration (50 mg/kg) in Shay's ulcer. By the use of artificial gastric juice perfusion technique, formation of ulcer was delayed by the addition of tannic acid in the perfusate. The acetic acid ulcer was slightly healed by the oral administration of tannic acid (200 mg/kg) for 10 days without any effect on the growth curve of rats. Tannic acid formed a precipitate with starch in water and this complex has the same activities.

From these results, it is suggested that tannic acid has ideal properties as an antiulcer agent.

緒 論

消化性潰瘍は胃液の消化作用と胃粘膜における消化からの防御という二つの因子のバランスの破綻として起るとも考えられるが、消化性潰瘍の治療剤の作用に関してみれば、攻撃因子の抑制はしばしば胃の正常な機能をそこなうのみならず他の種々な副作用が発現するものと思われる。従って防御作用を増強することが副作用も少なく、よりよい効果が期待出来る。著者らは人工胃液灌流法を用いて Davenport²⁾ の水素イオンの逆拡散をモデル化することを試みた。³⁾ この人工胃液灌流法で種々の物質の効果を調べる過程で蔗糖硫酸エステルアルミニウム塩が胃粘膜上に薄膜状に結合することを観察し、胃粘膜の物理的・化学的保護により消化性潰瘍が予防治療出来るのではないかと考えた。

消化器系の疾患に適用される生薬のうちタンニン酸を含有するものがいくつか見られるが、主に収斂や止血などの目的をもって投与されることが多い。著者らはラット胃を対象として gastrin 様 tetrapeptide の作用⁴⁾ およびその作用を抑制する物質⁵⁾ についてすでに報告してきたが、今回は生薬成分中比較的普遍的に存在し強い毒性を持たないタンニン酸を選びその抗潰瘍効果を検討した。また同時にタンニン酸のみでは他の作用が強く出ると考えられるので結合性が比較的弱い澱粉との複合体を作りその効果をも併せて検討した。

実験材料および方法

実験材料

タンニン酸 小宗化学薬品の最純品を使用した。

タンニン酸澱粉 5% タンニン酸溶液と 1% 溶性澱粉溶液を等量混合し沈殿を遠心分離し濾紙上で乾燥後、細粉とした。

- 1) Location: 1-1, Keyakidai, Sakado-cho, Iruma-gun, Saitama.
- 2) H.W. Davenport, *Gastroenterology*, **46**, 245 (1964).
- 3) 谷 覚, 水野人見, 谷 敬子, *医学のあゆみ*, **94**, 794 (1975).
- 4) 青沼 繁, 近藤 覚, *日本内分泌*, **47**, 527 (1971).
- 5) 青沼 繁, 近藤 覚, 武藤徳男, *薬誌*, **92**, 1552 (1972).

ペプシン 和光純薬工業の pepsin (1:10000) を使用した。

検定法

(1) Shay ラット 抗潰瘍作用は Shay⁶⁾ の方法に準じ 48 時間絶食した体重約 200 g の wistar 系雄性ラットを開腹し幽門部を結紮、再び縫合して 0.9% 食塩水に溶解した検体 1 ml を経口的に投与し絶食下 20 時間後に潰瘍指数、胃液を検査した。潰瘍指数は 0: 病変なし, 1: 出血または糜爛 2: 1—5 個の小潰瘍 (直径 3 mm 以下) 3: 5 個以上の小潰瘍または直径 3 mm 以上の大潰瘍 1 個 4: 多数の大潰瘍 5: 穿孔性潰瘍の 6 段階とした。胃液分泌の検討は同様に行ない、絶食絶水下 6 時間後に胃を取り出し胃液について液量, pH, 酸度, ペプシン活性を測定した。

(2) 人工胃液灌流法 著者ら⁸⁾ が開発した人工胃液灌流法を用いた。すなわち, Ghosh & Schild⁷⁾ により開発された胃内灌流法において 0.2N HCl 中に 0.2% NaCl および 0.1% pepsin (1:10000) を含む人工胃液を 10 分間に 13 ml の流速で灌流し, それにより惹起された出血を還元型フェノールフタレイン法で検出する。タンニン酸添加に際しては蛋白質と不溶性の沈殿を生ずるので灌流直前にペプシン溶液とタンニン酸溶液が合流するよう三方管を用い, 出血の有無は灌流液中の微細な血液塊を肉眼的に検出した。

(3) 酢酸潰瘍 高木ら⁹⁾ の酢酸潰瘍に準じ 10% 酢酸 0.05 ml を注射後 2 日目からタンニン酸 200 mg/kg をゾンデで 10 日間強制投与した。潰瘍の大きさを長径×短径 (mm²) として測定し治癒効果を検討した。

ペプシン活性

Anson⁹⁾ の方法に準じ pH 2.2 の乳酸溶液に溶解した 0.6% カゼイン 1 ml, pH 2.0 の 0.02M KCl-HCl buffer 0.7 ml, KCl-HCl buffer に溶解した試料 0.2 ml, それに KCl-HCl buffer に溶解した 0.1% pepsin (1:10000) 0.1 ml を添加した 2.0 ml の反応液を 37°, 30 分消化させ 1.7M 過塩素酸 2.0 ml を加え反応を止める。その上清を中和後 0.2M クエン酸緩衝液で液性を pH 5.0 に合わせニンヒドリン反応を行ない 570 m μ で比色した。胃液の場合は 0.1% pepsin (1:10000) 0.1 ml のかわりに胃液 0.1 ml を用い pepsin (1:10000) と比較して活性を算出した。

酸度

フェノールフタレインを指示薬として 0.02N NaOH で滴定した。

実験結果

タンニン酸およびタンニン酸澱粉のペプシン阻害作用

タンニン酸は蛋白質と結合するのでペプシン阻害作用がどの程度の量で現われるかを検討したのが Fig. 1 である。ペプシンに対する阻害作用が澱粉の共存下で変化するか, またその阻害作用がペプシンに対する阻害か基質に対する保護作用であるかも同時に検討した。その結果 Fig. 1 に示すように反応液中にタンニン酸のみ添加したものの, タンニン酸澱粉を添加したものの, またあらかじめペプシンをタンニン酸で処理したものに基質蛋白を加えたものでも, ほとんどその差が認められずタンニン酸の添加量に従ってペプシン活性が阻害された。他方タンニン酸とアルブミンの結合比を濁度の上昇で検討したところ重量比で約 5:1 でプラトーを示した。Fig. 1 でタンニン酸の終濃度 1.25 mg/ml を加えた場合を考えると, この反応液中には終濃度として pepsin (1:10000) が 0.05 mg/ml, カゼインが 3 mg/ml はいっているの、タンニン酸による前処理ですべてのペプシンはタンニン酸と結合し, 残ったタンニン酸が遊離の状態にあると考えられ, また基質中にタンニン酸を加えると, すべてのタンニン酸がカゼインと結合し遊離のものはないと考えられる。しかし前処理の有無にかかわらずペプシン活性がほとんど変わらないことはタンニン酸が蛋白質と強固に結

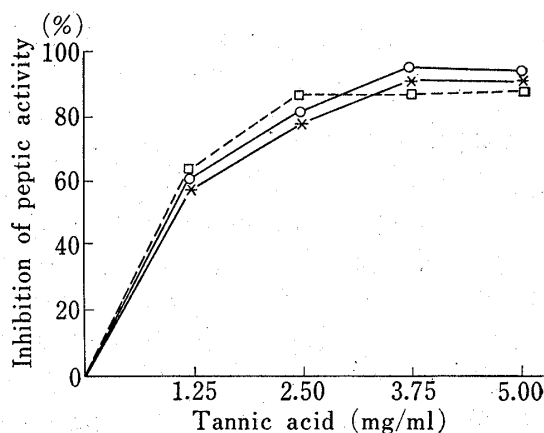


Fig. 1. Inhibitory Activity of Tannic Acid and Tannic Acid-Starch on the Proteolytic Activity of Pepsin

Casein was incubated with tannic acid (○—○) or tannic acid-starch (□---□) for ten min followed by pepsin. Pepsin was treated by tannic acid (*—*) for ten min, and incubated with casein.

6) H. Shay, S.A. Komarov, S.S. Fels, D. Meranze, M. Gruenstein, H. Siple, *Gastroenterology*, **5**, 43 (1945).

7) M.N. Ghosh, H.O. Schild, *Brit. J. Pharmacol.*, **13**, 54 (1958).

8) K. Takagi, S. Okabe, R. Saziki, *Jap. J. Pharmacol.*, **19**, 418 (1969).

9) M.L. Anson, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938).

TABLE I. Effect of Tannic Acid on Gastric Secretion in Pylorus Ligated Rats

	No. of rats	Volume (ml)	pH	Acid (meq/l)	Pepsin ^{a)} (mg/ml)
Control (0.9% NaCl 1 ml)	4	9.1±1.2	1.1±0.0	94.5±4.6	1.16±0.04
Tannic acid (100 mg/kg)	4	8.6±1.6	1.5±0.1 ^{b)}	54.3±6.3 ^{b)}	0.60±0.35 ^{c)}
Tannic acid (200 mg/kg)	3	6.7±1.2	2.0±0.2 ^{b)}	38.0±14.5 ^{b)}	0.19±0.04 ^{b)}
Tannic acid (1 g/kg)	3	11.0±0.8	2.7±0.2 ^{b)}	27.3±2.7 ^{b)}	0.00±0.00 ^{b)}

a) Peptic activity was converted as the weight of pepsin (1:10000) in one milliliter of gastric juice. (mean ±s.e.)

b) $p < 0.01$ c) $p < 0.05$

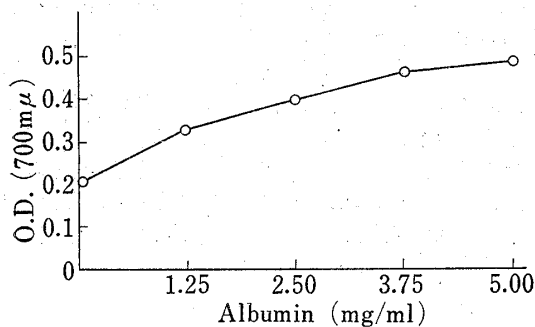


Fig. 2. Starch Liberation in Tannic Acid-Starch Solution by Addition of Albumin

After addition of albumin to the mixture of tannic acid 12.5 mg/ml and starch 2.5 mg/ml, iodostarch reaction of supernatant was measured.

合しているのではなく反応液中で一定の平衡状態にあることを意味するものと考えられる。

タンニン酸が澱粉と蛋白質ではどちらに強く結合するかについては、タンニン酸澱粉を経口投与した場合を考え、5% タンニン酸および1% 澱粉を含む懸濁液にアルブミン溶液を添加し遠心分離後上清中の澱粉をヨード反応で発色させたところ Fig. 2 に示すように、アルブミンの添加量に従い澱粉が遊離しタンニン酸は澱粉より蛋白質への結合性が強いという結果が得られた。すなわちタンニン酸澱粉が胃内に投与された場合、タンニン酸は胃内の蛋白質および胃粘膜と漸次結合物を形成していくことを示すものと考えられる。

タンニン酸の胃酸分泌抑制作用

Shay の方法を用いて胃酸分泌に対する作用を検討した。Table I に示すようにタンニン酸 100 mg/kg を投与すると酸の分泌量は対照に比べ1% の危険率で有意に抑制された。ペプシン活性についても同様に 100 mg/kg 投与で有意に半減させている。Table I より対照群の胃液中には pepsin (1:10000) に換算して胃液全体で約 10 mg のペプシンが存在することになり、また Fig. 1 より 0.05 mg の pepsin (1:10000) の活性を半減させるタンニン酸の量は約 1 mg と算出されるので対照群の胃液全体のペプシン活性を半減させるタンニン酸の量は約 200 mg となる。しかしタンニン酸 100 mg/kg 投与した場合を考えるとこのラット一匹あたり約 20 mg で半減させる量の約 10 分1量のタンニン酸しか投与されおらず、タンニン酸のペプシン活性抑制は分泌されたペプシンを阻害するばかりでなく分泌自体をも阻害している可能性が考えられる。しかし胃液量にはほとんど変化をおよぼさず水分の分泌には全く抑制作用はないと考えられる。またタンニン酸を 1 g/kg という多量投与するとペプシン活性は全く存在せず強いペプシン阻害活性を持っていることが判明した。なお対照群の 0.9% 食塩水 1 ml 投与群 4 匹中 1 匹に潰瘍の発生がみられた。

人工胃液灌流法におけるタンニン酸の抗潰瘍効果

人工胃液灌流法により抗潰瘍効果と粘膜保護効果が直接結びつくかを検討した。Fig. 3 に示すようにタンニン酸 2 mg/ml を灌流液中に添加すると出血時間が約 2 倍に延長され粘膜保護効果が認められた。しかしこの検定法ではタンニン酸がペプシンやヘモグロビンと不溶性の沈殿を作り、かならずしもその効果を定量的にみることは出来なかった。

Shay 潰瘍におけるタンニン酸およびタンニン酸澱粉の抗潰瘍効果

Shay 潰瘍に対するタンニン酸の抗潰瘍効果は胃酸分泌に影響をおよぼした投与量で検討を行い、Table II に示した。潰瘍指数ではタンニン酸 50 mg/kg で有意に抗潰瘍効果がみられた。0.9% 食塩水 1 ml 投

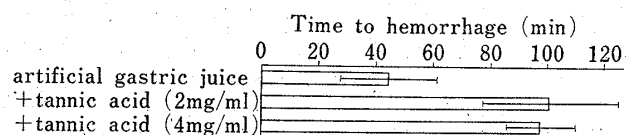


Fig. 3. Effect of Tannic Acid on the Time to Hemorrhage in the perfused Rat Stomach

TABLE II. Antiulcerous Activity of Tannic Acid on the Experimental Gastric Ulcer in Pylorus ligated Rats

	No. of rats	Ulcer index	Volume (ml)	Acid (meq/l)	Pepsin ^{a)} (mg/ml)
Control (0.9% NaCl 1 ml)	10	5.0±0.0	—	—	—
Tannic acid (50 mg/kg)	3	3.7±0.7 ^{b)}	14.4	19.5	1.07
Tannic acid (100 mg/kg)	3	2.7±0.3 ^{b)}	15.4±1.0	10.9±3.3	0.82±0.11
Tannic acid (500 mg/kg)	4	1.3±0.6 ^{b)}	17.9±2.0	4.2±1.3	0.92±0.08
Tannic acid (1 g/kg)	3	1.3±0.3 ^{b)}	14.8±3.0	5.4±1.4	0.67±0.13

a) Peptic activity was converted as the weight of pepsin (1:10000) in one milliliter of gastric juice.

(mean ±s.e.)

b) $p < 0.01$

TABLE III. Antiulcerous Activity of Tannic Acid-Starch on the Experimental Gastric Ulcer in Pylorus ligated Rats

	No. of rats	Ulcer index	Volume (ml)	Acid (meq)	Pepsin ^{a)} (mg/ml)
Control (0.9% NaCl 1 ml)	10	5.0±0.0	—	—	—
Tannic acid-starch (100 mg/kg)	4	4.3±0.5 ^{b)}	18.0	18.8	1.08
Tannic acid-starch (200 mg/kg)	4	2.8±0.3 ^{c)}	16.5±0.5	14.0±1.0	0.87±0.05

a) Peptic activity was converted as weight of pepsin (1:10000) in one milliliter of gastric juice.

(mean ±s.e.)

b) $p < 0.05$ c) $p < 0.01$

TABLE IV. Effect of Tannic Acid on Healing of the Acetic Acid Ulcer

Treatment	No. of rats	Ulcer (mm ²)
Control (0.9% NaCl)	9	9.2±3.9
Tannic acid (200 mg/kg)	8	3.9±2.7

mean ±s.e.

与した対照群ではかなり早い時間に穿孔が起っており、10例中9例で穿孔死、1例ですでに穿孔を起しており、胃液に対する比較は行えなかったが、タンニン酸投与群において投与量に対応した酸度およびペプシン活性の著明な低下が認められた。すなわちタンニン酸の抗潰瘍効果が粘膜保護効果だけでなく胃酸分泌抑制作用並びにペプシン活性阻害作用の共同作用であることが推測される。タンニン酸澱粉の抗潰瘍効果も Table III に示した様にタンニン酸単独投与の場合とほとんど同様に認められた。またこの時の胃にはタンニン酸の結合物がみられ、本胃の粘膜を覆っていた。この結合物は結紮時間が6時間の場合にもみられ、この結合により胃酸およびペプシンの分泌が阻害されている可能性も考えられる。またこの結合物は出血部に特に強く結合していることも観察された。

酢酸潰瘍に対するタンニン酸の治癒効果

タンニン酸の胃酸分泌抑制作用が明らかでない200 mg/kgを比較的胃内に食物がはいっていない午後にゾンデで10日間強制投与した。その間体重の測定も行い、投与群・対照群共に良好な成育を示した。10日後潰瘍の面積を測定したのが Table IV である。表に示すようにバラッキが大きいので有意差は見られないが、タンニン酸による治癒効果の傾向が認められた。

考 察

タンニン酸の抗潰瘍効果について様々な側面から検討を行った。今回はタンニン酸の化学的性質から胃粘膜保護剤のモデルとして利用出来るか、もし出来るなら消化性潰瘍に対して有効であろうと考え実験を行ったが実際

に粘膜に強く結合し胃粘膜保護作用を持つのみならず消化性潰瘍の攻撃因子である胃酸の分泌を抑制しペプシンの分泌並びに活性を阻害し、さらに抗ペプシン剤が容易に腸へ移行するのに比べタンニン酸は胃内に結合し長く残留することが明らかになったので、タンニン酸は最も理想的な抗潰瘍剤の諸性質を具備するものと考えられる。同時にこれらの実験を通じてタンニン酸が胃液量には何ら影響をおよぼさないことを見出したので胃液の分泌と胃酸の分泌とは独立している可能性をも示唆された。

一般にタンニン酸は抗潰瘍効果をもつとされているが実際に用いられている薬物としてはタンニン酸アルブミンが収斂剤として用いられているにすぎない。また生薬においても消化性潰瘍に対する漢方処方の中でタンニン酸含有生薬はあまり多くなくタンニン酸が積極的に用いられた根拠は少ない。しかし今回の実験結果に示される様にタンニン酸は抗潰瘍薬としての諸性質をもつと思われるのでタンニン酸製剤が抗潰瘍薬として再検討される必要があると考える。タンニン酸はコロイド状のものがよいとされているのでタンニン酸澱粉の抗潰瘍効果も同時に検討したがその作用は全く同じであり、さらにこの化合物が酸性であめ状の沈殿を作りタンニン酸の作用を持続的かつ緩和なものにするであろうと考えられる。また投与に際しては投与時間、剤型等の検討が必要であろう。

タンニン酸の副作用のなかに食欲の低下があげられているが、酢酸潰瘍の治癒試験の際に 200 mg/kg を 10 日間投与したにもかかわらずその量では何ら発育曲線には差が見られなかったのでラットの場合は抗潰瘍効果が顕著なこの量でも食欲には影響がないものと考えられる。またタンニン酸の副作用として肝障害が報告されているが、¹⁰⁾ これは大量に用いた場合に問題になるとと思われるので長期の使用に際しては肝機能の検査が必要であろう。

10) J. Eshchar, G. Friedman, *Amer. J. Dig. Dis.*, **19**, 825 (1974).