

氏 名 (本籍)	き 木	そ 曾	よし 良	のぶ 信
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	薬 博 第	1 3 6	号	
学位授与年月日	昭和 5 8 年	3 月	2 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 製薬化学専攻			
学 位 論 文 題 目	生薬成分の肝障害抑制作用に関する研究			

(主 査)

論文審査委員	教授 曳 野	宏	教授 鶴 藤	丞
			教授 佐 藤	進

# 論文内容要旨

肝炎は難治性の疾患とされ、いまだに根本的な治療薬は見い出されていない。筆者はこの肝炎の治療薬を生薬に求め、その活性成分および作用機序を明らかにすることを目的として本研究を行った。

## 1) Desoxypodophyllotoxin およびその類縁化合物の実験的肝障害に対する作用

さきに Hikino 等は、肝炎治療薬としてわが国で使用されている民間薬のアスナロ葉から、マウス四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 肝障害抑制成分として desoxypodophyllotoxin を単離した。<sup>1)</sup> そこで、この desoxypodophyllotoxin、さらに構造の類似した一連の化合物の肝障害抑制作用を調べ、ヒト肝炎治療薬としての有用性、また作用機序について検討を行った。

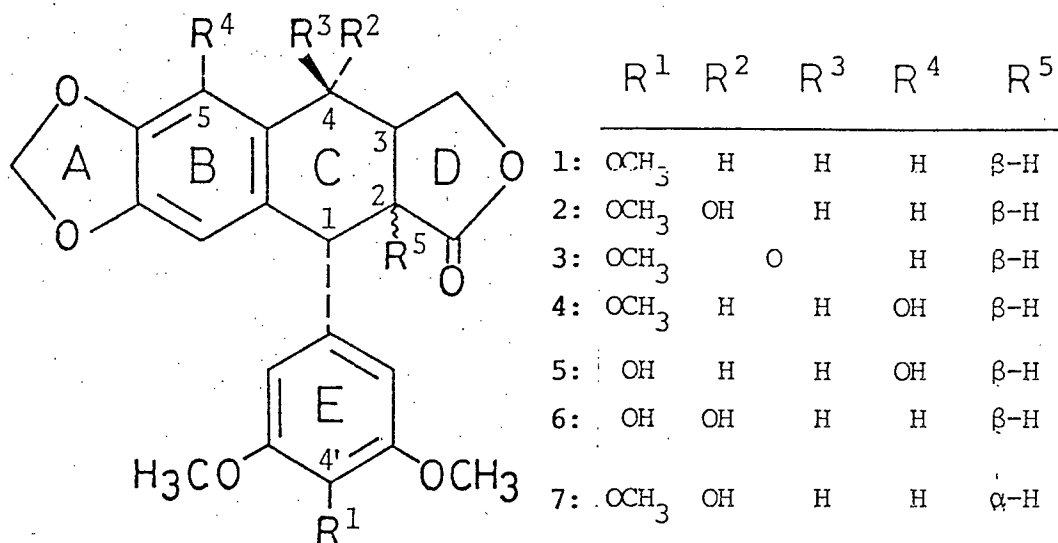
従来種々の実験肝障害が知られているが、ヒト肝炎と類似した肝障害を実験動物に起こさせることは困難とされていた。ところが Keppler 等は D-galactosamine (Gal N) をラットに投与することにより、病態生化学的にも病理組織学的にもヒト急性ウイルス肝炎と類似した肝障害を起こし得ることを明らかにした。<sup>2)</sup> そこで、この Gal N 肝障害に対する desoxypodophyllotoxin の作用を検討した。

Gal N をラットの腹腔内に投与すると、投与 24 時間後には血清トランスアミナーゼ (GOT, GPT) 活性の顕著な上昇が認められた。この上昇は desoxypodophyllotoxin の 4 日間前投与により用量依存的に抑制された。また組織学的にも、Gal N の投与による肝組織内の局所壊死は desoxypodophyllotoxin を投与した群では認められなかった。これらのことから、desoxypodophyllotoxin はラット Gal N 肝障害抑制作用を有することが明らかになった。Gal N 肝障害は、uridine が Gal N の代謝物に捕獲されて uridine phosphate の低下をきたし、さらに続いて核酸、糖タンパクおよび糖脂質の合成が抑制されることから起こるものと考えられている。<sup>3,4)</sup> また最近、Gal N 投与後数時間で膜障害が起こることから、この肝障害の進展において膜障害が重要視されるようになった。<sup>5,6)</sup> Desoxypodophyllotoxin は、CCl<sub>4</sub> 肝障害に対しても有効であることから、この膜障害を抑制することにより肝障害抑制作用を現している可能性が示唆される。

ところで、desoxypodophyllotoxin (1) には数種の類縁化合物が知られている。<sup>7)</sup> そこで次に、より肝障害抑制作用の強い化合物の発見、構造活性相関、さらに作用機序を明らかにすることを目的として、これらの化合物の肝障害抑制作用を調べた。

Desoxypodophyllotoxin の類縁化合物としてはポドフィリン末 (*Podophyllum hexandrum* および *Podophyllum peltatum* から調製されたもの) より単離した podophyllotoxin (2), podophyllotoxin (3),  $\beta$ -peltatin (4),  $\alpha$ -peltatin (5), 4'-demethylpodophyllotoxin (6), picropodophyllin

(7)を用いた。肝障害抑制効果の判定にはマウスCCl<sub>4</sub>肝障害モデルおよびラットGal N肝障害



モデルを用いた。前者では被検化合物およびCCl<sub>4</sub>を同時に投与して24時間後の血清GOT, GPT活性を, また後者では被検化合物をGal N投与の前4日間にわたって投与し, Gal N投与24時間後の血清GOT, GPT活性を測定した。その結果, マウスCCl<sub>4</sub>肝障害では desoxy-podophyllotoxin, picropodophyllinが, またラットGal N肝障害では desoxy-podophyllotoxin, β-peltatin, α-peltatin, 4'-demethylpodophyllotoxinが強い抑制作用を示した。いずれの肝障害に対しても desoxy-podophyllotoxinが最も顕著な抑制作用を示した。その他の化合物は, 検定法によって著しく異なる活性を示したことから, これらの化合物は複数の作用機序により肝障害抑制作用を現すことが推測される。構造活性相関の検討から, CCl<sub>4</sub>肝障害では4α位および5位に酸素官能基のないものが活性が高く, 一方Gal N肝障害では4α位については同様であるが, 5位の水酸基の存在は活性に影響を与えないことがわかった。本研究で得られた構造活性相関は, これまでに報告されている有糸分裂効果<sup>8)</sup>およびmicrotubule生合成抑制作用<sup>9)</sup>における構造活性相関と一致しないことから, これらとは異なる作用機序により肝障害抑制作用を現しているものと考えられる。

## 2) マウス四塩化炭素肝障害の肝臓保護生薬スクリーニングへの応用

肝炎治療薬の探索を行う上で目的にかなったスクリーニング法を選択することが重要となる。そこでまず, 最も一般的な肝障害として知られるCCl<sub>4</sub>肝障害に着目し, その有用性について検討した。これまでCCl<sub>4</sub>肝障害の実験には主にラットが用いられてきた。一般に生薬成分は分画

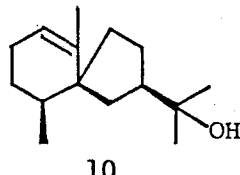
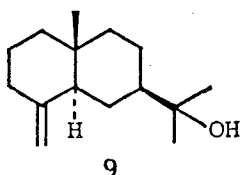
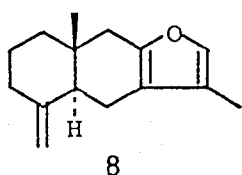
の繰り返しにより単離され、しかも微量しか得られない場合が多く、多量の検体量を必要とするスクリーニング法では活性成分を追求するには不相当である。この点ラットを用いた検定法には大きな問題がある。そこで、検体必要量の少ないマウスを用いた第1次スクリーニング法の確立を目的として実験を行った。

その結果、マウスの系統によりCCl<sub>4</sub>に対する感受性が著しく異なることが明らかになったが、種々条件の検討を行い、マウスCCl<sub>4</sub>肝障害によるスクリーニング法を確立した。この方法を用いて、古来より肝臓疾患に対して有効とされている生薬18種の効果を調べたところ、インチンコウ、サンシシで70%以上の、またメンインチン、ゴシツおよびウコンでも40%以上の強い抑制作用が認められた。さらにナズナおよびわが国で民間薬として繁用されているシジミでも、弱いながらも抑制作用を示すことが明らかになった。以上のことから、この方法は生薬中の肝障害抑制成分を見出すための1つの第1次スクリーニング法になり得るものと考えられる。

### 3) 朮の肝障害抑制成分

肝臓病に対して有効とされる生薬は数多く存在する。この生薬中の有効成分を明らかにするための1つのスクリーニング法として、上述のようにマウスCCl<sub>4</sub>肝障害を用いた方法を考案した。しかし、この方法はなおバラツキ、再現性などにおいて必ずしも満足の行く結果は得られず、さらにラットを用いた実験に比べれば検体の微量化ができるものの、まだかなりの量を必要とする。これらの問題点を補い得る方法として、初代培養ラット肝細胞を用いた肝障害抑制作用の検定法について検討し、CCl<sub>4</sub>細胞障害およびGal N細胞障害による方法を確立した。この初代培養ラット肝細胞を用いたCCl<sub>4</sub>細胞障害による検定法で種々の生薬のスクリーニングを行ったところ、数種の生薬エキスとともに朮のメタノールエキスに顕著な肝細胞障害抑制作用が認められた。

朮にはオオバナオケラおよびオケラの根茎から調製される白朮と、ホソバオケラおよびその変種の根茎から調製される蒼朮がある。この2種の朮を含有セスキテルペノイド成分という面からみると、白朮はフラン環を有するattractylon (8) およびその誘導体を含んでいる。一方蒼朮は、フラン環を持つ化合物はないか少なく、その代わりに主成分としてβ-eudesmol (9) とhinesol (10) を含んでいる。朮には消化管機能や水分代謝の異常を改善する薬効があるとされ、主とし



て健胃，利尿の目的に用いられる。その他に白朮には止汗作用，蒼朮には発汗作用と相反した効果があるといわれているが科学的には証明されていない。肝臓保護作用については，すでに白朮のヘキサノエキスおよび精油画分がマウスCCl<sub>4</sub>肝障害に対して抑制作用を示し，ラットGal N肝障害に対して抑制傾向を示すこと，<sup>10)</sup> またマウスCCl<sub>4</sub>肝障害に対して，蒼朮は無効であるが，白朮は抑制作用を示し，その有効成分はatractylonであることが報告されている。<sup>11)</sup> そこで初代培養ラット肝細胞を用いたCCl<sub>4</sub>およびGal N細胞障害による検定法でこれらを確認，さらにこれらの検定法で効果の認められたものについてはその有効成分を明らかにすることを目的として検討を行った。

その結果，ロットの違いにより効果に差があるものの，いずれの基源植物から調製された白朮および蒼朮も，CCl<sub>4</sub>およびGal N細胞障害抑制作用を示すことが認められた。また，これらの活性成分はそれぞれの主成分であるatractylon， $\beta$ -eudesmolおよびhinesolであることを明らかにした。

- 1) H. Hikino, T. Sugai, C. Konno, I. Hashimoto, S. Terasaki, I. Hirono, *Planta Med.*, **36**, 156 (1979).
- 2) D. Keppler, R. Lesch, W. Reutter, K. Decker, *Exp. Mol. Pathol.*, **9**, 279 (1968).
- 3) D. Keppler, K. Decker, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 219 (1969).
- 4) D. Keppler, J. Rudigier, W. Reutter, R. Lesch, K. Decker, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 102 (1970).
- 5) E. I. Mofty, M. C. Scrutton, A. Serroni, C. Nicolini, J. L. Farber, *Am. J. Pathol.*, **79**, 579 (1975).
- 6) W. Bachmann, H. Harms, B. Hassels, H. Henninger, W. Reutter, *Biochem. J.*, **166**, 455 (1977).
- 7) M. G. Kelley, J. L. Hartwell, *J. Natl. Cancer Inst.*, **14**, 967 (1954).
- 8) V. Seidolove-Masinova, J. Malinsky, F. Santavy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **18**, 359 (1957).
- 9) J. D. Loike, C. F. Brewer, H. Sternlicht, W. J. Gensler, S. B. Horwitz, *Cancer Res.*, **38**, 2688 (1978).
- 10) 櫛田秀雄，日本特許公報 昭 57-70818 (1982).
- 11) 山原條二，沢田徳之助，谿忠人，西野隆雄，北川勲，藤村一，薬誌，**97**，873 (1977).

## 審査結果の要旨

現在肝炎は広く見られる疾病であるが、真に有効な治療薬はあまり知られていない。

本研究においては、生薬の中から肝炎に有効な治療薬が見い出されるのではないかという観点から、種々の検討が行われている。

まずマウス四塩化炭素肝障害モデルにおいて顕著な抑制作用を示す desoxypodophyllotoxin について、ヒト急性ウイルス肝炎に類似したラットガラクトサミン肝障害モデルを用いて検定を行い、この障害に対しても顕著に抑制することを見い出し、その機構として desoxypodophyllo-toxin が膜障害の抑制にあることを示唆した。

つぎに desoxypodophyllotoxin のいくつかの同族体について、マウス四塩化炭素肝障害モデルおよびラットガラクトサミン肝障害モデルを用いて検定を行い、構造活性相関を検討した。前者では desoxypodophyllotoxin と picropodophyllin が、後者では desoxypodophyllotoxin,  $\beta$ -peltatin,  $\alpha$ -peltatin, 4'-demethylpodophyllotoxin が顕著な抑制作用を示した。両者の検定法で活性を示すものが必ずしも一致しないので、これらの化合物は複数の作用機序によって肝障害抑制作用を現していることを明らかにした。

ついで、生薬に有効な肝炎治療薬のソースを求めるための有用な検定法を確立するために、マウスの種々の系統について、四塩化炭素肝障害モデルを作製するのに最も適わしい系統の選別を行い、検定に適当な系統を見い出して、スクリーニング法を確立した。これを用いて肝炎に有効といわれている生薬の検定を行った。

しかしマウスを検定に使っても、なお費用、サンプル量、結果のバラツキ、再現性に問題があったので、これらの問題を克服するために初代培養ラット肝細胞を用いた肝障害抑制作用のスクリーニング法の検討を行い、四塩化炭素およびガラクトサミンを用いた肝障害モデルの作製に成功し、多数の検体について安価に、迅速に、バラツキが少なく、再現性良くスクリーニングする方法を確立した。

この方法を用いて生薬およびそのセスキテルペノイド成分について検定を行い、有効成分を明らかにした。

以上本研究は肝障害抑制作用を持つ生薬およびその成分の活性を明らかにする上で顕著な寄与をなしたもので、学位論文として価値あるものと認める。