

氏名	太田 康之
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第 1112 号
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	補血関連生薬・漢方方剤に由来する造血活性成分の研究
論文審査委員(主査)	太田 富久(医薬保健研究域・教授)
論文審査委員(副査)	御影 雅幸(医薬保健研究域・教授), 垣内 信子(医薬保健研究域・准教授), 高野 文英(医薬保健研究域・准教授), 辻本 和雄(北陸先端科学技術大学院大学・教授)

Abstract

Previously, we have found some active constituents including catechins and polysaccharides, isolated from medicinal plants which prevent against chemotherapeutic drug-induced anemia and leukemia. Some Kampo medicines that have been clinically to ameliorate the anemia and disruption of marrow function were shown to stimulate marrow cell proliferation; however, whose active substances were not identified.

In this study, we tried to explore the active hematopoietic constituents as a marrow cell proliferation-promoting compound from the Kampo extracted by a well-established experimental model of 5-FU-induced anemia; moreover using liquid culture and colony-forming units assay systems. As a result, Kampo extracts, Ninjin'yoeito (NYT; "Ren-Shen-Yang-Rong-Tang" in Chinese) and Kyukikyogaito (KKT; "Xiong-gui-jiao-ai-tang") strongly enhanced the marrow cell proliferation and the formation of immature marrow cell colonies co-stimulated with interleukin-3 and erythropoietin. Moreover oral injection of NYT inhibited 5-FU-induced decreases in peripheral reticulocyte and bone marrow cell on day 10 and markedly hastened their recovery on day 20, in dose-dependent manner. We tried to analyze PDA-HPLC profile of NYT. As a result, HPLC analysis revealed the presence of some chemical constituents, so that we explored the active constituents against marrow-cell proliferation effect and main constituents of *Schisandrae* fructus and extract of *Glycyrrhizae* radix strongly enhanced the marrow cell proliferation. We further fractionated the Kampo extract and two medicinal plants in accordance with bio assays. Consequently, 5-(hydroxymethyl)furfural was isolated as the active constituent from *S. fructus*, liquiritin and its derivative from *G. radix*, and polysaccharides from KKT.

学位論文要旨

【目的】 癌の治療では腫瘍摘出などの外科的療法や放射線療法の外に、抗癌剤を主と

する内科療法がある。抗癌剤を用いる化学療法は癌治療の主流を占め、現行の抗癌剤は、より癌細胞に対し選択性が高い薬剤とされているが、持続的な抗癌剤の治療によっては癌細胞だけでなく、正常細胞にも影響を及ぼし、重篤な副作用の発症に至ることが多い。その一つに骨髄機能障害があり、貧血や白血球減少症、血小板減少症、免疫低下による感染症の発生、組織再構築の遅延が起こり、癌患者のQOLが著しく低下する場合がある。抗癌剤による骨髄機能障害の発症時には、輸血の他、granulocyte-colony stimulating factor や erythropoietin などの造血系サイトカイン製剤が投与されるが、一方で、人參養榮湯や十全大補湯といった漢方方剤も積極的に用いられる。

しかし、これらの造血に関与する漢方方剤については活性成分やメカニズムが十分解明されていない場合も多い。そこで、本研究では、癌の化学療法において重篤となる骨髄機能障害を改善する漢方方剤を選び、その活性成分を調べる計画を立て、マウス培養骨髄細胞の増殖活性を指標に、成分の探索を行った。

【実験材料と方法】本研究において材料とした方剤と生薬は、漢方では補剤・補血に用いる処方の芎歸膠艾湯と人參養榮湯であり、また、これを構成する生薬として甘草と五味子を選んだ。人參養榮湯については、マウスに高用量の制癌剤（5-fluorouracil: 5-FU）を静脈内投与して発症する骨髄機能障害モデルで評価した。2種類の漢方処方と生薬は一日量を400 mLの蒸留水で液量が半量になるまで煎じ、凍結乾燥してエキスを精製した。次に各エキスについてマウスの骨髄細胞増殖活性を指標に、各種のクロマトグラフィーやエタノール沈澱・透析法を用いることにより活性成分の単離を行った。活性の指標とした骨髄細胞増殖活性では、マウス的大腿骨から採取した骨髄細胞をそれぞれ、液体培地と半固形培地培養する方法により増殖活性を調べた。メチルセルロースを用いる半固形培地培養法では造血分化細胞の系統特異的コロニーの増殖を評価でき、液体培養法では骨髄細胞全体の増殖を評価することが可能である。これとは別に、造血系サイトカインで、赤血球系の前駆細胞増殖を誘導する erythropoietin とミエロイド系前駆細胞の増殖を誘導する IL-3 で刺激する培養条件も設定して検討した。骨髄細胞の増殖活性を示した画分については、各種のクロマトグラフィーを用い

て分画し、活性成分の単離・精製を行い、1次元および2次元 NMR や各種 MS などの分光学的手法を用いることで、化合物の構造決定を行った。さらに、得られた化合物について、液体培地系と半固形培養法における骨髓細胞の増殖活性も調べた。

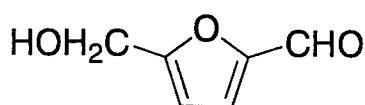
【結果】補血剤の人参養栄湯エキスは、これをマウスに経口投与することにより、5-FU 誘導末梢血赤血球数および白血球数減少症を抑制するとともに、それらのリカバリーを増加させる活性が認められた。さらに、人参養栄湯は5-FU による骨髓細胞と reticulocyte の減少も抑制し、特に未分化な骨髓細胞からの赤血球系前駆細胞の発現を増加させる活性があることが分かった。

次に芎帰膠艾湯の骨髓細胞増殖活性に及ぼす影響を調べた結果、濃度依存的に骨髓細胞増殖活性を示すことが、液体培養および半固形培養法により明らかとなった。芎帰膠艾湯エキスを有機溶媒溶出性画分および水溶性高分子画分、水溶性低分子画分に分けて活性を調べたところ、水溶性低分子画分に移行し、ODS およびゲル濾過カラムクロマトグラフィー用担体を用いた HPLC による分画を行った結果、2種類の多糖体の1および2を単離することに成功した。MALDI-MS 解析により、化合物1は m/z 1824.5 に、化合物2は 867.3 に分子イオンピークがそれぞれ認められ、ともに 162 u 間隔でフラグメントイオンピークが観測された。1の MALDI-MS から m/z 1824.5 から m/z 365 まで9個の 162 u 分の間隔が認められ、2からは m/z 867.3 から m/z 381 まで3個の 162 u 間隔が認められた。

人参養栄湯と芎帰膠艾湯にマウスおよび細胞レベルで骨髓細胞活性が認められたこととから、これらを構成する生薬の甘草と五味子について骨髓細胞増殖活性とその活性成分について調べた。

五味子エキスを骨髓細胞に処理することにより、コントロール培養に比べ 125% の増殖活性が認められ (有意差 < 0.01)、また、五味子の主要成分である schisandrin, gomisin A 投与群とともに 115 ~ 120% の増殖活性が認められた (有意差 < 0.05)。また、HPLC による解析で検出された人参養栄湯含有化合物について、半固形培養法による系統特異的骨髓細胞コロニー増殖活性を試験した結果、五味子由来 deoxyschisandrin, gomisin A 処理群とともに 115% の増殖活性を示した (gomisin A

投与群では有意差 < 0.05). 五味子の主要成分であるリグナン類に骨髓細胞増殖活性が認められたことから, deoxyschisandrin と gomisin A 以外の五味子リグナンに活性があるか成分調査を行った. その結果, 五味子エキスを Diaion HP20 カラムクロマトグラフィーで分画して得られた, MeOH/H₂O = 1:9 および 1:3 溶液で溶出する画分に活性が移行し, これを Sephadex LH20 を担体とするカラムクロマトグラフィー, ODS-HPLC で分画・精製した結果, 1 種の化合物を単離した. この化合物について分光学的手法により構造解析を行ったところ, 既知化合物の 5-(hydroxymethyl)furfural であることが分かった(Figure 1).



5-(hydroxymethyl)furfural

Figure 1. Structure of 5-(hydroxymethyl)furfural (5-TMF).

次に, 人參養榮湯および芎歸膠艾湯の両方剤を構成する生薬の甘草について, 活性を調べた. その結果, 熱水抽出エキスを ODS で分画して得られた画分のうち, MeOH/H₂O = 4:6 溶液で溶出する画分に活性が認められ, これをさらに ODS カラムで分画して得られた画分に活性が移行した. 次いで, この画分を Sephadex LH-20 を担体とするカラムクロマトグラフィーで精製した結果, 4 種類の化合物が得られ, これらを ¹H および ¹³C-NMR および FAB-MS により構造解析をおこなった結果, 既知化合物の liquiritin, liquiritin apioside と他 2 種のフラボン誘導体を単離した (Figure 2).

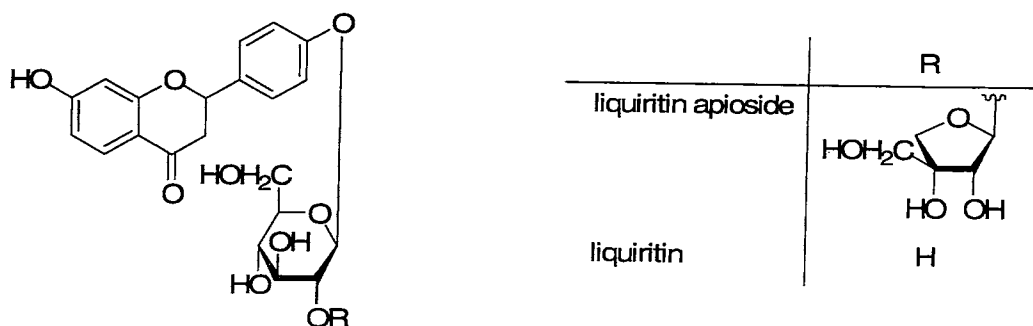


Figure 2. Structures of liquiritin apioside and liquiritin.

【考察】人參養榮湯および芎歸膠艾湯エキスは実験動物および骨髓細胞培養系において貧血、白血球減少症および血球前駆細胞の増殖促進活性が認められた。さらに、これらの方剤の一部を構成する生薬の甘草と五味子も骨髓細胞の分化と増殖活性が認められ、甘草からは liquiritin と liquiritin apioside の 2 種のフラバン配糖体が活性成分として得られた。さらに五味子からは deoxyschisandrin と gomisin A などのリグナン類と 5-(hydroxymethyl) furfural に骨髓細胞増殖活性が認められた。また、芎歸膠艾湯から直接、骨髓細胞増殖活性を示す成分について探索を行った結果、2 種の多糖体を見出すことができた。このように、生薬および漢方方剤中の骨髓細胞増殖に影響する成分は、フラバン配糖体およびリグナンのような低分子化合物から多糖体のように高分子の化合物にまで、広く分布していることが明らかとなった。今後は生体においてどちらの分子種が主として有効性を発揮するのかを明らかにする必要がある。漢方方剤、構成生薬の甘草と五味子、およびこれらから単離された化合物は、骨髓細胞を造血系サイトカイン (EPO/IL-3) で刺激する条件において、有意で濃度依存的な活性が認められた。このことは、漢方および生薬成分単独が直接的な骨髓細胞増殖活性を示すのではなく、骨髓細胞が分化・増殖する細胞内プロセスあるいは生体内における間接的な機序が影響して造血系の細胞分化が誘導されていることを強く示唆する。今後、どのようなメカニズムを介して血球系細胞の分化・増殖をもたらすかを解明する必要がある。

【結論】以上の研究成果から、2 種類の漢方方剤および 2 種類の漢方構成生薬が造血機能に関連する血球系細胞の増殖活性と、人參養榮湯については実験動物レベルにおいて貧血の改善と赤血球系の前駆細胞の増殖活性があることを薬理的に証明することができた。さらに甘草および五味子から得られたフラバンおよびリグナンの低分子化合物には新たに、サイトカイン依存性の赤血球系前駆細胞の増殖を選択的に増加させる活性が認められたことから、これらの成分が抗癌剤による骨髓機能障害の軽減、および造血の創薬研究において有用である可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

本研究では、がん化学療法において重篤となる骨髄機能障害を改善する漢方方剤をスクリーニングし、選択した2種の方剤について、マウス培養骨髄細胞の増殖活性を指標として活性成分の探索を行った結果をまとめたものである。

補剤・補血に用いる4種の方剤について、実験的骨髄機能障害モデルマウスにおける骨髄増殖作用を検討したところ、人参養榮湯が赤血球減少症に最も有効であった。同方剤は、マウスに経口投与することにより5-FUが誘導する血球減少症を抑制し、骨髄細胞と網状赤血球の減少も抑制したことから、未分化な骨髄細胞における赤血球系前駆細胞の発現を増加させる作用があることが分かった。人参養榮湯と同様、芍帰膠艾湯も濃度依存的に骨髄細胞増殖活性を示し、それらの方剤を構成する生薬であるカンゾウとゴミシにも骨髄細胞の分化と増殖活性が認められた。それらの成分探索を行った結果、カンゾウからは2種のフラバノン配糖体、ゴミシからはリグナン類と5-(hydroxymethyl)furfuralが得られ、骨髄増殖活性が認められた。また、芍帰膠艾湯からは骨髄細胞増殖活性を示す2種多糖体を見いだした。

2種の方剤、共通する構成生薬あるいは単離した活性成分はいずれもEPOとIL-3刺激条件下で有意に濃度依存的な骨髄増殖活性を示したことから、それらは直接的な活性ではなく骨髄細胞の分化・増殖プロセスなどの間接的な機序を経由して細胞分化・増殖が誘導されることが示唆された。

以上の結果は、本研究の新規性を示しており、博士（薬学）に相当すると判断する。