

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

医療用漢方製剤の抗酸化活性に関する研究

医薬品分子設計学分野 佐藤 直子

【序論】

漢方薬の有効性の立証やエビデンスの構築が集積され始め、医療機関における漢方薬の利用が増加している。さらに「現代病」と言われる精神疾患や慢性疾患、食習慣に関わるメタボリックシンドロームや多臓器にわたる疾患、診断のつかない様々な症状や健康問題を有する患者が増加し、漢方薬による治療を希望する患者も増加している。

漢方医学は現代医学とは異なった考え方に基づいた医学体系であり、原因不明の病気や不定愁訴など、現代医学では不得意とする領域において漢方薬の役割が注目されている。また漢方薬は複数の生薬を組み合わせた多成分系であり、マルチサイトに効果を発揮することから医療経済学的にも期待されている。さらに、多成分系である漢方薬の作用機序も解明されつつあり、新たな臨床応用の側面も見出されている。

現在、148 処方の漢方薬が医療用漢方製剤として臨床応用されており、これら処方の適応症には酸化ストレスが関わる疾患が多く含まれる。そこで、本研究では医療用漢方製剤の抗酸化活性と酸化ストレス関連疾患の関係に着目した。活性酸素（ROS）は、生体内において免疫システムによる防御機構や細胞内での情報伝達などの機能を担う一方で、過剰な ROS は酸化ストレスとなり、DNA 損傷、脂質過酸化およびタンパク質分解を誘導し、糖尿病、脂質異常症、脳梗塞、がんなど様々な疾患に関与していることが明らかになっている。そのため、過剰な ROS の除去はこれら疾患の予防および治療に重要なアプローチである。

本研究では、紫雲膏を除く経口用医療用漢方製剤 147 処方について、酸化ストレス疾患の薬物治療に漢方薬を相補的に活用することにより患者の QOL 向上を目指して、抗酸化活性の網羅的 *in vitro* 評価、更に細胞レベル、*in vivo* における抗酸化活性を総合的に評価し、優れた抗酸化活性を有する医療用漢方製剤を見出すことを研究目的とした。

【本論】

1. 経口用医療用漢方製剤 147 処方の網羅的 *in vitro* 抗酸化活性評価

本研究においては、現在保険適用のすべての経口用医療用漢方製剤 147 処方を研究対象とした。また、各漢方製剤については、臨床投与量を考慮して添付文書に定めた 1 日投与量を 1 Unit と定義し、抗酸化試験に用いるサンプル濃度は、それぞれの試験法において決定した。

多成分系から構成される漢方製剤の抗酸化作用を網羅的に評価するために、異なる測定原理を有する 3 種の *in vitro* 抗酸化活性試験法、即ち、①DPPH ラジカル捕捉活性測定試験（DPPH 法）、②スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験（SOD 法）、③ペルオキシドラジカル捕捉活性測定試験（AAPH 法）を用いて抗酸化活性を評価した。

①DPPH 法

DPPH 法は、人工有機ラジカルである DPPH ラジカルが抗酸化物質の存在下で一電子還元され吸光度が減少する原理を用いて、515 nm での吸光度を測定することで行った。その結果、麻子仁丸、通導散、大柴胡湯の順に高い DPPH ラジカル捕捉活性を示した (Table 1)。

②SOD 法

SOD 法では、スーパーオキシドアニオンラジカルと水溶性テトラゾリウム塩 WST-1 の反応から生じる黄色ホルマジン色素の生成量が抗酸化物質の存在下で減少する原理を用いて、450 nm での吸光度を測定することで行った。その結果、大柴胡湯、通導散、桃核承気湯の順に高いスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性を示した (Table 1)。

③AAPH 法

AAPH 法は、ラジカル発生剤である 2,2'-azobis(2- amidinopropane)dihydrochloride より発生したペルオキシドラジカルが標識物質であるフルオレセインを分解する原理を用いて、抗酸化物質の存在下での蛍光強度の減衰の抑制を抗酸化作用として評価した。標準物質のトロロックス当量として抗酸化活性を算出した結果、通導散、麻子仁丸、大柴胡湯の順に高いペルオキシドラジカル捕捉活性を示した (Table 1)。

Table 1. 上位5処方での *in vitro* 抗酸化活性

DPPH法		SOD法		AAPH法 ^{a)}	
漢方製剤名	EC ₅₀ (μ Unit/mL) ^{b)}	漢方製剤名	EC ₅₀ (μ Unit/mL) ^{b)}	漢方製剤名	(μ mol TE/Unit) ^{b)}
麻子仁丸	23.2 \pm 0.9	大柴胡湯	6.2 \pm 1.1	通導散	28660 \pm 355
通導散	23.2 \pm 0.6	通導散	6.3 \pm 1.9	麻子仁丸	13409 \pm 244
大柴胡湯	23.9 \pm 1.1	桃核承気湯	6.3 \pm 1.1	大柴胡湯	11567 \pm 61
桂枝加芍薬大黄湯	25.2 \pm 1.1	治打撲一方	6.8 \pm 1.1	大承気湯	9498 \pm 158
九味檳榔湯	26.9 \pm 0.9	九味檳榔湯	14.3 \pm 4.5	防風通聖散	8306 \pm 29

^{a)}TE: Trolox equivalent ^{b)}平均値 \pm SD, n=3

2. 通導散、大柴胡湯、麻子仁丸の細胞・動物レベルの抗酸化活性評価

In vitro 抗酸化活性評価において、最も高い抗酸化活性を示した3処方：通導散、大柴胡湯、麻子仁丸を選抜し、細胞および動物に対する抗酸化作用の発現の解析を行った。

①HepG2 細胞における抗酸化活性評価 (DCFH-DA 法)

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、ROS 蛍光プローブである DCFH-DA を用いて抗酸化活性を解析した。HepG2 細胞に通導散、大柴胡湯、麻子仁丸 (最終濃度 10 μ Unit/mL) および DCFH-DA を前処理した後に過酸化水素を添加し、添加後から 50 分までの蛍光強度変化を共焦点顕微鏡により解析することで抗酸化活性を評価した。過酸化水素添加後 30 分以降から蛍光強度の増強が観察されたが、通導散、大柴胡湯および麻子仁丸を前処理した細胞では、30 分以降の蛍光強度の増強が有意に抑制された (Figure 1)。

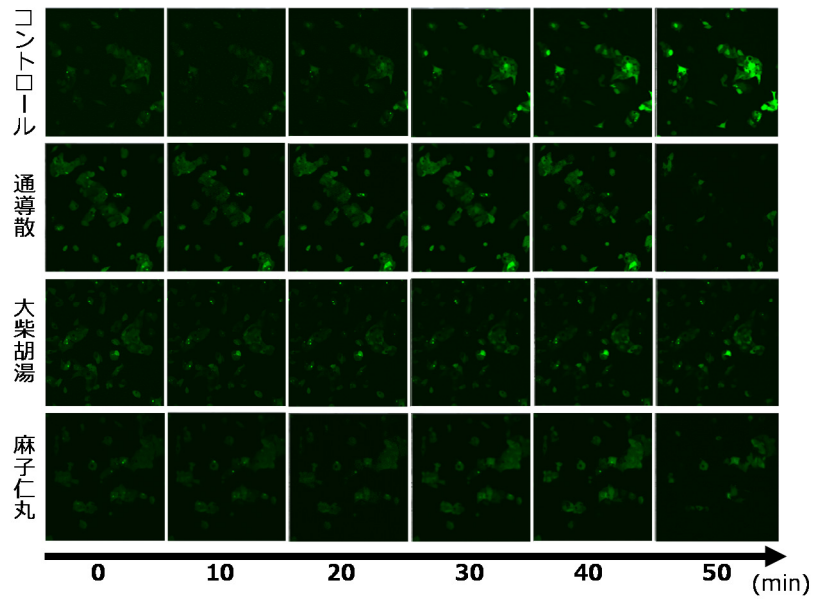


Figure 1. 大柴胡湯、通導散、および麻子仁丸の信号強度の経時的変化 (n = 3)

②マウスの血清抗酸化力に与える影響の解析

血液の抗酸化力の判定には Biological Anti-oxidant Potential test (BAP テスト) が構築されており、通導散、大柴胡湯、麻子仁丸をマウスに経口投与した後の BAP 値を測定した。通導散、大柴胡湯および麻子仁丸をマウスに 1 日 2 回、2 日間連続で経口投与 (2.5 g/kg) した後に採取した血清中の BAP 値 ($\mu\text{Eq/L}$) を測定した結果、通導散投与群にポジティブコントロールとして用いたアスコルビン酸とともに、Vehicle 群に比べ有意な BAP 値の上昇が観察された (Figure 2)。

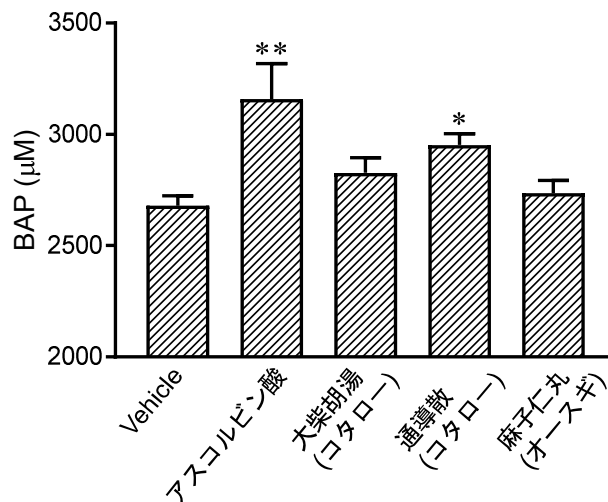


Figure 2. 大柴胡湯、通導散、麻子仁丸投与後のマウス血清 BAP 値
 平均値 \pm SEM (n=9) ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. vehicle (Dunnett test)

3. 通導散の抗酸化活性に寄与する生薬の解析

通導散は大黃、枳実、蘇木、紅花、厚朴、木通、当帰、陳皮、甘草、芒硝の10種類の生薬により構成されており、各生薬の抗酸化活性の寄与度を解析した。通導散の構成生薬の配合比に従って、それぞれの煎じ液を調製した。これら煎じ液に関して AAPH 法を用いてペルオキシドラジカル捕捉活性を測定した結果、大黃、枳実、蘇木、紅花、厚朴に抗酸化活性が認められ、特に大黃、枳実が高い寄与度を示した (Table 2)。

Table 2. 通導散構成生薬のペルオキシドラジカル捕捉活性

	通導散	大黃	枳実	蘇木	紅花	厚朴
($\mu\text{mol TE}$) ^{a)}	12468 \pm 1275	3112 \pm 475	2790 \pm 767	1823 \pm 640	1133 \pm 731	1037 \pm 1418
	陳皮	芒硝	木通	甘草	当帰	
($\mu\text{mol TE}$) ^{a)}	—	—	—	—	—	

^{a)} TE: Trolox equivalent, 平均値 \pm SD (n=3)

4. 結論

本研究において経口用医療用漢方製剤 147 処方の網羅的な *in vitro* 抗酸化活性評価を行った結果、通導散、麻子仁丸、大柴胡湯に高い抗酸化作用が発現することを見出した。さらにこれら 3 処方は HepG2 細胞に対する抗酸化作用を示し、通導散はマウスの血清抗酸化力を上昇させた。以上から、通導散に含有される抗酸化物質は *in vivo* においても直接血中に移行し作用を発現する可能性が示唆された。通導散は気滞瘀血を改善する処方であり、保険適応症は比較的体力があるものの便秘、月経不順、月経痛、更年期障害、腰痛、便秘、打撲、高血圧の随伴症状（頭痛、めまい、肩こり）である。酸化ストレスによる血行動態の不良状態は漢方医学的に瘀血状態であり、血液流動性の低下はこれら疾患の原因となる。通導散の強い駆瘀血作用には、高い抗酸化活性と血清抗酸化力の上昇作用が関与する可能性が本研究から示唆された。さらに、通導散の抗酸化作用に寄与する構成生薬を解析した結果、通導散の抗酸化作用には大黃、枳実、厚朴、紅花、蘇木が関与し、特に大黃、枳実の寄与度が最も高いことが示唆された。通導散や桃核承気湯等、駆瘀血作用を示す処方の中でも特に強い作用を示す処方には大黃が構成生薬として含まれ、本研究から強い駆瘀血作用の発現には大黃の高い抗酸化活性が寄与している可能性が考えられた。また通導散は、長期経過した陳旧性の瘀血症にも有効とされる。これには内出血の吸収により瘀血を除く破血薬に分類される紅花、蘇木の寄与が推定されるが、紅花、蘇木の高い抗酸化活性も通導散の薬効に重要となることが本研究から示唆された。本研究結果により、通導散を酸化ストレス疾患の薬物治療に対して補完的に活用されることが期待される。

【対象論文】

- 1) Sato N, Li W, Takemoto H, Takeuchi M, Nakamura A, Tokura E, Akahane C, Ueno K, Komatsu K, Kuriyama N, Onoda T, Higai K, Koike K. Comprehensive evaluation of antioxidant effects of Japanese Kampo medicines led to identification of Tsudosan as a potent antioxidant agent. *J Nat Med*, in press. DOI: 10.1007/s11418-018-1259-x

氏 名：佐藤直子

論文題目：医療用漢方製剤の抗酸化活性に関する研究

本論文は、酸化ストレスが深くかかわる疾患に対して、医療用漢方製剤の新しい応用を提唱したもので、現代西洋医学と漢方医学を中心とした統合医療の観点から価値の高い論文と認める。本論文は 3 章から構成されている。

佐藤直子氏は、東邦大学医療センター佐倉病院薬剤部の部長補佐の立場であり、漢方薬生薬認定薬剤師を有し、本学の生涯学習講座漢方講座の講師を長年担当している。佐藤氏は医療センター佐倉病院において漢方科外来の設立から診療科医師と将来の漢方治療について検討を重ねてきた。そのなかで、医療用漢方製剤の適応の分析から、内服医療用漢方製剤 147 処方の抗酸化活性と酸化ストレス関連疾患の関係性に着目し、現代医学の薬物治療を補完し患者の QOL を改善できるような漢方製剤を見いだすことを研究目的とした。

はじめに第 1 章では、医療用（内服）漢方製剤 147 処方に関して、網羅的な *in vitro* 抗酸化活性スクリーニング、すなわち DPPH ラジカル補足活性試験（DPPH 法）、スーパーオキシドアニオンラジカル補足活性試験（SOD 法）、活性酸素吸収能試験（APPH 法）を行った。その結果、DPPH 法では麻子仁丸、SOD 法では大柴胡湯、ならびに APPH 法では通導散に最も高い抗酸化活性があることを見いだした。

第 2 章では、*in vitro* 抗酸化活性試験より選抜した麻子仁丸、大柴胡湯、通導散に関して、ヒト肝がん由来 Hep-G2 細胞およびマウスでの抗酸化作用の発現を解析している。その結果、上記 3 処方すべてが細胞内酸化ストレスに対する抗酸化活性を示した。さらにマウスの血清抗酸化力についても Biological Anti-oxidant Potential test (BAP テスト) により判定し、通導散にのみが血清抗酸化を上昇させることを見いだした。

第 3 章では、第 1 章、2 章の研究を通して最も高い抗酸化作用を示した通導散に関して、抗酸化作用の発現に寄与する構成生薬（当帰、大黄、芒硝、枳実、厚朴、陳皮、木通、紅花、蘇木、甘草）について解析を行った。*In vitro* 抗酸化活性評価（DPPH 法、SOD 法、APPH 法）では、大黄、枳実、蘇木、紅花が高い活性を示すことを明らかにした。さらに、これらの生薬のなかで枳実、紅花がマウスの血清抗酸化力（BAP テスト）を上昇させた。通導散の抗酸化活性の本体が大黄、枳実、蘇木、紅花が寄与していることを見いだした。

以上の結果から、医療用（内服）漢方製剤 147 処方のなかで *in vitro* から *in vivo* まで高い抗酸化活性を示した通導散は、臨床での使用頻度は比較的 low、臨床および基礎科学的エビデンスの少ない処方である。通導散は中国明代の龔廷賢により編纂された「万病回春」に記載されている処方で、気滞と瘀血の改善する処方である。佐藤氏は抗酸化活性と駆瘀血作用には相関関係があることを明らかとし、駆瘀血剤としての作用の強弱を科学的に立証するエビデンスを見いだした。

以上の結果から、これまで通導散を使用しなかった医師が、積極的に通導散を患者に処方することが期待される。本論文の研究結果はこのような臨床的な波及効果が十分に期待できる。

佐藤氏は病院薬剤師として、基礎薬学研究方法論を用いて、生活習慣病や癌、認知症などの重篤な疾

患のほか、高血圧、精神疾患などの QOL 改善のために、患者から強く求められている疾患に対する医療ニーズに応えようとした姿勢も高く評価できる。

本博論文は、着眼点が総合病院の臨床現場で現代医学と漢方医学の経験を積んだ薬剤師ならではのものです。その成果は現代西洋医学を補完する漢方医学の応用方法を大きく進展させると推察する。結論に導いた研究結果や情報は過不足なく、適切な方法論を用いて実験を重ね、その結果を適切に解析している。さらに、考察においても過程と論拠を適切に提示して、一貫した論旨により帰結している。

本論文の骨格をなす研究成果は、佐藤直子氏を筆頭著者とした英文原著として公表されており、社会的にすでに評価されている、

以上のことから、佐藤直子氏は博士（薬学）の学位を授与に値すると結論する。

東邦大学薬学部生薬学教室
小池一男