

福岡大学審査学位論文

十味敗毒湯の尋常性痤瘡改善作用と
その作用機序に関する研究

2017年3月

松本 隆志

目次

緒言	1
第1章 十味敗毒湯の薬効研究	
はじめに	5
第1節 アクネ菌誘発耳介腫脹改善効果	6
1. 実験方法	6
1.1. 被験物質	6
1.2. 実験動物	7
1.3. 実験デザイン	7
1.3.1. アクネ菌の培養	7
1.3.2. 実験スケジュール	7
1.3.3. 耳介腫脹測定法	8
1.4. 統計解析	8
2. 実験結果	8
2.1. 十味敗毒湯の耳介腫脹改善効果	8
第2節 耳介腫脹改善効果の病理組織学的検証	10
1. 実験方法	10
1.1. 試薬	10
1.2. 耳介の病理組織学的評価法	10
1.3. 耳介菌塊膿瘍領域のアクネ菌占有率の測定	11

1.4. 統計解析	11
2. 実験結果	12
2.1. 耳介腫脹改善効果の病理組織学的検証	12
2.2. 耳介菌塊膿瘍領域におけるアクネ菌占有率	18
2.3. マクロファージ集簇率とアクネ菌占有率の相関	19
考察	20
小括	22

第2章 十味敗毒湯の作用機序研究

はじめに	23
第1節 抗テストステロン代謝作用	25
1. 実験方法	26
1.1. 被験物質及び試薬	26
1.1.1. ボクソクエキス末	26
1.1.2. ボクソク成分	26
1.1.3. 試薬	29
1.2. 実験動物	29
1.3. ラット肝ミクロソーム調製法	29
1.4. テストステロン代謝測定法	29
1.5. 5 α リダクターゼ活性測定法	30
1.6. 統計学的解析	31
2. 実験結果	31
2.1. ボクソクの抗テストステロン作用	31
2.1.1. テストステロン代謝阻害作用	31

2.1.2. 5 α リダクターゼ活性阻害作用	33
2.2. ボクソク成分の 5 α リダクターゼ活性阻害作用	34
第 2 節 皮脂合成抑制作用	35
1. 実験方法	35
1.1. 被験物質及び試薬	35
1.1.1. 被験物質	35
1.1.2. 試薬	36
1.2. ハムスター皮脂腺細胞の培養法	36
1.3. 細胞毒性確認法	36
1.4. 皮脂合成評価法	36
1.5. 統計学的解析	37
2. 実験結果	38
2.1. ボクソク及び pentagalloyl glucose の皮脂腺細胞に対する作用	38
2.2. ボクソクの皮脂合成抑制作用	39
2.3. Pentagalloyl glucose の皮脂合成抑制作用	41
第 3 節 抗酸化作用	42
1. 実験方法	43
1.1. 被験物質及び試薬	43
1.1.1. 被験物質	43
1.1.2. 試薬	45
1.2. 抗酸化反応試験	45
1.2.1. ROS（過酸化水素）酸化反応	45
1.2.2. RNS（一酸化窒素）酸化反応	46
2. 実験結果	46
2.1. グルクロン酸抱合体、代謝物及び成分の抗酸化作用	46
2.2. アグリコン及びグルクロン酸抱合体の抗 ROS 活性の比較	48

第4節 マクロファージ集簇亢進作用.....	49
1. 実験方法.....	50
1.1. 被験物質及び試薬.....	50
1.1.1. 被験物質.....	50
1.1.2. 試薬.....	51
1.2. 白血球遊走ケモカインの測定.....	51
1.3. マクロファージ活性化評価法.....	51
1.4. マクロファージ貪食機能測定.....	52
1.5. 統計学的解析.....	52
2. 実験結果.....	53
2.1. 白血球遊走ケモカインに対する十味敗毒湯の作用.....	53
2.2. マクロファージ機能に対する十味敗毒湯由来成分の作用.....	54
2.2.1. マクロファージの活性化マーカーに対する作用.....	54
2.2.2. マクロファージ貪食能に対する作用.....	55
考察.....	56
小括.....	61

第3章 十味敗毒湯の薬物動態研究

はじめに.....	62
第1節 十味敗毒湯及びボクソクのエキス中成分含量.....	63
1. 実験方法.....	64
1.1. 被験物質.....	64
1.2. エキス中成分の抽出・測定法.....	64
2. 実験結果.....	68

2.1. ボクソク及び十味敗毒湯のエキス中成分含量.....	68
第2節 十味敗毒湯投与ラットにおける血漿成分の薬物動態.....	71
1. 実験方法.....	71
1.1. 被験物質.....	71
1.2. 実験動物.....	71
1.3. 実験デザイン.....	72
1.4. 血漿中成分の LC-MS/MS 分析.....	72
1.5. 薬物動態解析.....	73
2. 実験結果.....	73
2.1. 十味敗毒湯投与ラットにおける血漿成分濃度.....	73
第3節 フラボノイド-グルクロン酸抱合体の血漿中薬物動態.....	77
1. 実験方法.....	77
1.1. 被験物質.....	77
1.2. 試薬.....	78
1.3. 実験動物.....	78
1.4. 実験デザイン.....	78
1.5. 血漿中フラボノイド定量法.....	78
1.6. 血漿中フラボノイド-グルクロン酸抱合体の定量法.....	79
1.7. フラボノイド-グルクロン酸抱合体の血中薬物動態解析.....	79
2. 実験結果.....	81
2.1. β -グルクロニダーゼ処理による血漿中フラボノイド濃度.....	81
2.2. フラボノイド-グルクロン抱合体の血漿中薬物動態.....	82
考察.....	84
小括.....	88

総括.....	89
引用文献.....	92
論文審査主査および副査.....	103
公表論文目録.....	104
謝辞.....	105

緒言

十味敗毒湯（洋名：jumihaidokuto）は、中国の古典『万病回春（まんびょうかいしゅん）』に記されている荊防敗毒散（けいぼうたいたくさん）を基本として江戸時代の医家華岡青洲（はなおかせいしゅう）が創製した十味敗毒散より、さらに改良が加わって完成した処方である。十種類の薬味（桔梗：ききョウ、柴胡：さいこ、川芎：センキョウ、茯苓：ふくりョウ、樸椒：ぼくけウ、独活：どくかつ、防風：ほうふう、甘草：かんざウ、荊芥：けいがい、生姜：しょうきョウ）から構成されることから十味といい、皮膚における化膿等の毒を敗退させるという意味で敗毒と表現されたものである¹⁾。現在では化膿性皮膚疾患・急性皮膚疾患の初期、じんましん、急性湿疹、水虫などに効能・効果をもつ医療用漢方エキス製剤として厚生労働省に認可され、尋常性痤瘡など皮膚疾患の治療薬として臨床使用されている²⁻⁴⁾。

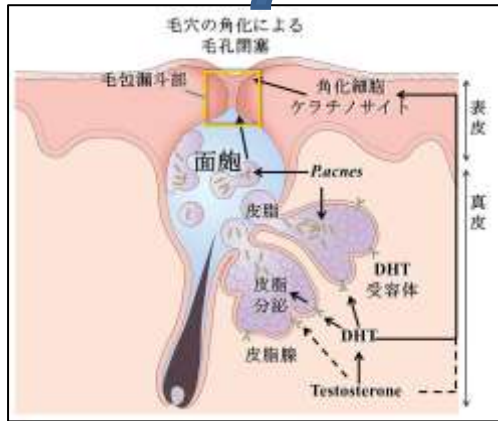
これまでに十味敗毒湯の薬理作用として、好中球の遊走能や貪食能の活性化作用⁵⁾、好中球の活性酸素種（ O_2^- 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ ）産生抑制作用⁶⁾、及び皮膚の角化抑制作用⁷⁾などが*in vitro*試験系で、また受動免疫系での皮膚アナフィラキシー反応抑制作用^{8,9)}がマウスで報告されている。しかし、尋常性痤瘡の改善効果や作用機序を説明するには、まだ科学的立証が不十分で、不明な点も多い。

尋常性痤瘡、いわゆる「ニキビ」は、思春期から 30 才前後の男女の顔、前胸部、背中に出来るもので、俗に言う「ふきでもの」も皮膚医学上では同一疾患である。主に思春期の男性ホルモン増加により毛嚢・脂腺系の慢性炎症を生じる皮膚病で治療を要する。日本における尋常性痤瘡の平均発症年齢は 13.3 ± 1.9 歳で、男女差はない。軽い症状も含めると、成人の 90%以上がこの病気を経験していると報告されている¹⁰⁾。

ニキビはホルモン、細菌および皮脂の相互作用によって毛包（毛穴）が炎症を起こすことで発症する。ニキビのできるメカニズムは完全に解明されていないが、一般的には図 1 に示すように、皮脂を分泌する毛穴が詰まるところから始まる。即ち、思春期には性ホルモンの変動、特に男性ホルモンであるテストステロン（testosterone）の 5α リダクターゼによる代謝が亢進し、活性体であるジヒドロテストステロン（dihydrotestosterone: DHT）が増加することにより、皮脂腺が活性化され、皮脂分泌が亢進し、さらに毛包漏斗部の角化が過剰に亢進することにより、

前段階 非炎症性皮疹(面皰)

A)微小面皰



B)閉鎖面皰 (白ニキビ)

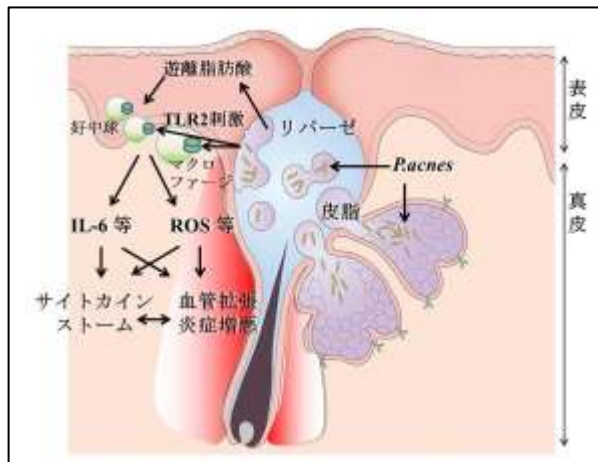


C)開放性面皰 (黒ニキビ)



炎症性皮疹

D)紅色丘疹 (赤ニキビ)



E)膿疱性丘疹 (黄ニキビ)

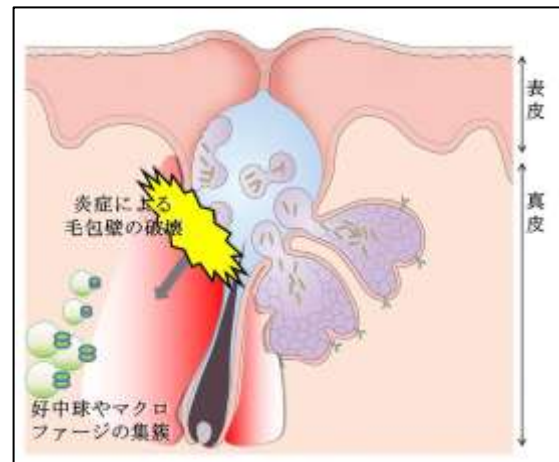


図1. 尋常性痤瘡の発症機序

微小面皰：男性ホルモンにより皮脂腺が活性化され、皮脂分泌の亢進や毛包漏斗部の角質異常が起こる。面皰：閉鎖面皰は、毛孔が角栓により閉鎖し、毛包内に皮脂の充満及びアクネ菌の集塊が認められる。開放性面皰は毛孔が開大しており、メラトニン並びに酸化された皮脂により黒く見える。紅色丘疹：好脂性のアクネ菌が増殖し、細菌性リパーゼや好中球走化因子などを産生する。リパーゼが皮脂を分解し遊離脂肪酸を産生、好中球走化因子により集積した好中球が活性酸素を放出することで炎症が惹起される。膿疱性丘疹：炎症細胞の集簇が著しく、紅色丘疹の炎症がさらに進展した状態。毛包壁は破壊され、内容物の漏出が炎症をより進展させる。

毛包内に皮脂が貯留する¹¹⁾。この状態が面皰（めんぽう）の前段階である微小面皰である（図 1-A）。悪化因子としては、月経前などに生じる性ホルモンバランス異常、ファンデーションなどの毛穴を詰める化粧品、睡眠不足、精神的ストレスなどがあげられる。ストレスにより発生する男性ホルモン分泌や交感神経の興奮（ノルアドレナリン分泌）も皮脂分泌を促す。

その後、毛孔が角栓により閉鎖し、白っぽく触知可能な状態を閉鎖面皰（白面皰又は白ニキビ：図 1-B）、外観は似ているが毛穴が開いて中心に黒点（毛包漏斗部とその周辺の表皮メラノサイト並びに過酸化された皮脂により黒く見えるといわれている）があり、中身が見える状態を開放面皰（黒面皰又は黒ニキビ：図 1-C）という。このような状態ではまだ炎症を伴わないことから非炎症性皮疹と言われる¹⁰⁾。非炎症性皮疹から赤い炎症性皮疹（紅色丘疹又は赤ニキビ）への移行は、皮膚常在菌のアクネ桿菌（*Propionibacterium acnes*：以後、アクネ菌と略す）による¹²⁾。アクネ菌は嫌気性細菌のため、酸素のない脂腺の奥に生息する。好脂性のアクネ菌は、詰まった毛穴の中で皮脂を栄養として過剰に増殖し、脂肪分解酵素のリパーゼや好中球走化因子などを産生する¹³⁾。細菌性リパーゼが皮脂を分解して産生した遊離脂肪酸（FFA）が、さらに過酸化脂質へと酸化され炎症が誘発されると毛包壁が刺激され丘疹が出現する。また、好中球走化因子により集積した好中球から活性酸素種が放出されると炎症が惹起される（図 1-D）¹³⁾。最近では、アクネ菌が単球/マクロファージの Toll-like receptor-2（TLR-2）を直接刺激し、炎症性サイトカインを放出させることが報告されている¹⁴⁾。紅色丘疹がさらに進展した状態では、好中球やマクロファージの集簇が著しい膿疱（黄ニキビ）が形成される（図 1-E）¹²⁾。炎症、物理的操作又は過激に擦ることによって毛包壁が崩壊したり破裂したりすると、FFA、細菌などの内容物が真皮組織内に漏出する。これが炎症をさらに激化させ、結節や囊肿、さらには癬痕化を招くことになる。

上述したように、尋常性痤瘡は、肉眼では見ることができない微小面皰を前段階とし、そこから非炎症性皮疹（面皰）、炎症性皮疹（紅色丘疹／膿疱）へと進展していく毛包脂腺系を場とする慢性炎症性皮膚疾患である。個々の患者の病変部には微小面皰、非炎症性皮疹並びに炎症性皮疹が混在する。従って、尋常性痤瘡を治療する場合は、微小面皰、面皰を治療し、炎症性皮疹への進展を抑制することが重症化を防ぐためにも重要となる。

本研究ではこの病態形成プロセス^{10, 12)}を考慮して、十味敗毒湯の尋常性痤瘡に対する薬理効果及び作用機序を検討した。先ず第1章では、尋常性痤瘡の原因菌であるアクネ菌をラットの耳介に注入し、炎症惹起から膿瘍形成への進展に対する十味敗毒湯の薬効について、耳介の腫脹と組織学的変化を指標に評価した。

次いで第2章では、十味敗毒湯による尋常性痤瘡の引き金となる微小面皰の発現に密接に関係するテストステロンの代謝及び皮脂合成に対する作用、炎症過程である紅色丘疹の炎症惹起に関与する活性酸素や活性窒素に対する作用、並びに炎症と組織修復の主役を担うマクロファージの機能（貪食）に対する作用、さらに各作用機序を担う活性成分についても追及した。

終章である第3章では、十味敗毒湯エキス中の主要成分の含量測定に加え、それら成分の薬物動態をラットを用いて明らかにし、薬効活性成分について考察した。

以上、本論文ではこれら一連の研究成果の詳細について、順を追って論述する。

第1章

十味敗毒湯の薬効研究

はじめに

緒言で述べたように、尋常性痤瘡（ニキビ）が発生する主要因は、原因菌であるアクネ菌（嫌気性常在菌）の繁殖である¹⁵⁾。この原因菌は、角栓によって毛穴の出入り口が塞がれた嫌気性条件下で増殖する。角栓形成には、皮膚の角質層の硬化や皮脂合成・分泌などに関与する男性ホルモン¹¹⁾、精神的ストレスによる交感神経系の興奮やストレスホルモンなど^{16, 17)}、様々な要因が関与する。このような発生機序を全て網羅した尋常性痤瘡の動物評価モデルはこれまでに報告されていないが、突然変異により皮膚異常を示すライノマウス^{18, 19)}、やラット耳介皮内にアクネ菌注射することにより急性皮膚炎を誘発するアクネ菌誘発耳介炎症モデル²⁰⁾などが便宜的に実験に用いられている。

本研究では、生体での尋常性痤瘡に対する十味敗毒湯の薬効を検証するため、尋常性痤瘡の病原菌であるアクネ菌を用いた耳介炎症モデルに着目した。本章第1節では、アクネ菌をラットの耳介に注入し、発症する炎症及び膿瘍に対する十味敗毒湯の効果について腫脹を指標に検証した。第2節ではその効果について病理組織学的側面から検証した。

第1節

アクネ菌誘発耳介腫脹改善効果

本章第1節では、尋常性痤瘡に対する生体での十味敗毒湯の薬効について、アクネ菌誘発耳介炎症モデルを用いて検討した。アクネ菌（死菌）をラットの耳介に皮内注射することにより炎症病変を誘発させ、十味敗毒湯の効果を炎症の5症候（発赤、腫脹、発熱、疼痛、機能障害）の一つである腫脹を指標に評価した。

1. 実験方法

1.1. 被験物質

本研究に用いた十味敗毒湯エキス末（Lot No. 332031900：以後、十味敗毒湯と略す）は、株式会社ツムラ（Tokyo, Japan）より供与された。本エキス末は、キキョウ、サイコ、センキュウ、ブクリョウ、ボウフウ、カンゾウ、ケイガイ、ショウキョウ、ボクソク及びドクカツの10種の生薬より成り（表1）、その熱水抽出物をスプレードライ法によりエキス化したものである。

表1. 十味敗毒湯の構成生薬

Japanese name	English name	Composition ratio (%)
日局 キキョウ（桔梗）	JP Platycodon Root	3.0 g (14.29%)
日局 サイコ（柴胡）	JP Bupleurum Root	3.0 g (14.29%)
日局 センキュウ（川芎）	JP Cnidium Rhizome	3.0 g (14.29%)
日局 ブクリョウ（茯苓）	JP Hoelen	3.0 g (14.29%)
日局 ボウフウ（防風）	JP Saposhnikovia Root	1.5 g (7.14%)
日局 カンゾウ（甘草）	JP Glycyrrhiza Root	1.0 g (4.76%)
日局 ケイガイ（荊芥）	JP Schizonepeta Spike	1.0 g (4.76%)
日局 ショウキョウ（生姜）	JP Ginger Rhizome	1.0 g (4.76%)
ボクソク（樺櫨）	Quercus Bark	3.0 g (14.29%)
ドクカツ（独活）	Aralia Rhizome	1.5 g (7.14%)

プレドニゾロン (PDN) は Shionogi Pharmaceutical Co. (Osaka, Japan) より購入した。

1.2. 実験動物

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを日本エスエルシー株式会社 (SLC, Shizuoka, Japan) より購入し、7 週齢で本実験に用いた。動物は、自由摂水、自由摂食、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 20\%$ 、12 時間明暗サイクル (明期 7:00–19:00) の環境で飼育した。全ての動物実験は、株式会社ツムラの「動物実験に関するガイドライン」に従い、動物実験審査会の承認のもとで実施した。

1.3. 実験デザイン

1.3.1. アクネ菌の培養

アクネ菌株 (*P. acnes* 株 : ATCC6919) は Microbiologics Inc. (St. Cloud, MN) から購入し、GasPak system (Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo, Japan) により嫌気性条件下で GAM broth (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) にて培養した。培養したアクネ菌を回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) で洗浄後、 $10,000\times g$ で 10 分間遠心した。同洗浄を 2 回行った菌は、熱殺傷 (95°C 、5 分間) 及び凍結乾燥後、ラット耳介への注入実験時まで -80°C で保管した。

1.3.2. 実験スケジュール

ラットのアクネ菌誘発耳介腫脹モデルは、De Young らの方法²⁰⁾を一部改変して作製した。実験スケジュールを図 2 に示す。イソフルラン吸入麻酔下で両耳介の腹側に、対照群には生理食塩水 ($50\ \mu\text{L}$)、アクネ菌群、十味敗毒湯群及びプレドニゾロン群にはアクネ菌の死菌 ($0.14\ \text{mg}/50\ \mu\text{L}$ 生理食塩水) をマイクロシリンジ (Hamilton Co., Reno, NV) を用いて皮内注射した。更に、対照群及びアクネ菌群には蒸留水 ($10\ \text{mL}/\text{kg}$)、十味敗毒湯群には蒸留水で調製した 0.1 、 0.5 、 1 又は $2\ \text{g}/\text{kg}$ 用量の十味敗毒湯、及びプレドニゾロン (PDN) 群には蒸留水で調製した $10\ \text{mg}/\text{kg}$ 用量の PDN をアクネ菌注射の 1 時間前及び 6 時間後、それ以降は 1 日 1 回、6 日目まで耳介厚測定の前 1 時間前にそれぞれ同用量を経口投与した。なお、実験に用いた十味敗毒湯用量は臨床用量 ($0.2\ \text{g}/\text{kg}$) をベースに $0.1\sim 2\ \text{g}/\text{kg}$ (臨床用量の $0.5\sim 10$ 倍) の範囲に設定した。PDN 投与量 ($10\ \text{mg}/\text{kg}$) は既報²¹⁾に従い設定した。

1.3.3. 耳介腫脹測定法

耳介腫脹は、菌注射の0（注入前）、2、4、6、24時間後、及び2、3、4、5、6、7日後にダイヤルシクネスゲージ（Ozaki MFG Co., Tokyo, Japan）を用いて計測した。腫脹率（%）は、各々のラットの菌注入前値に対する百分率で示した。

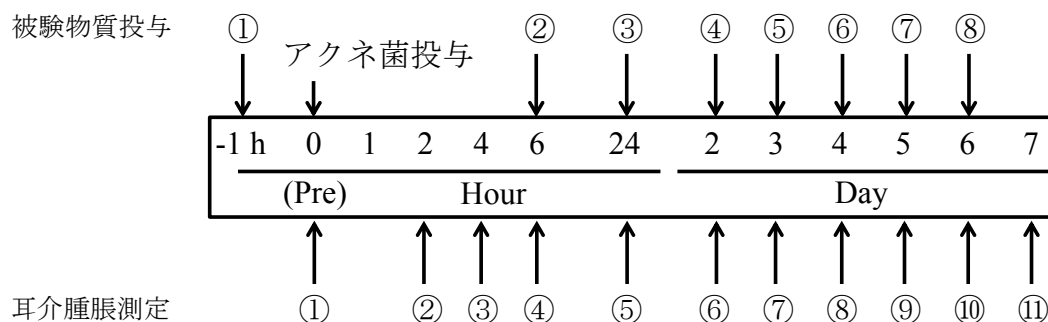


図 2. アクネ菌誘発耳介腫脹ラットにおける薬物投与および耳介腫脹度測定スケジュール

1.4. 統計解析

耳介腫脹率は、平均値 ± 標準誤差で示した。統計的有意性は二元配置反復測定分散分析（two-way repeated measures ANOVA）後、Bonferroni の多重比較検定（multiple comparisons test）によって評価した。P < 0.05 の場合に統計的な有意差があると判定した。

2. 実験結果

2.1. 十味敗毒湯の耳介腫脹改善効果

アクネ菌誘発耳介腫脹に対する十味敗毒湯の効果を図 3 に示す。アクネ菌注射後 24 時間の実験では（図 3A）、対照群に比べアクネ菌群では、菌注射により耳介の発赤が認められ、2 時間後にはその厚さが投与前の約 190%まで増加し、その後 24 時間目まで続いた（図 3A）。十味敗毒湯（0.1 及び 0.5 g/kg 群）は、このアクネ菌誘発耳介腫脹を用量依存的に抑制した。有意な抑制効果は 0.5 g/kg 用量で認められた。陽性対照として用いた PDN（10 mg/kg）もアクネ菌誘発耳介腫脹を有意

に抑制した。

図 3B には、アクネ菌投与後 24 時間までの耳介腫脹をより詳細に検討しながら、更に 7 日目までの経過を観察した結果を示す。2 から 24 時間目までの間に 4 及び 6 時間目の観察を加えたが、結果は図 3A と同様、アクネ菌群では菌投与後 2 時間目で耳介の肥厚が最大に達し 24 時間目まで持続した。耳介の肥厚はその後徐々に自然修復に向かった。十味敗毒湯の効果は、図 3A と同様、0.5 g/kg 群で菌注入 2 時間後の耳介腫脹を有意に抑制し、その効果は 24 時間後まで持続した。それ以降はアクネ菌群と同様、肥厚は改善に向かったが、その効果はアクネ菌群に比べ 3 日目まで有意な促進効果として認められた。また、このような腫脹抑制・修復効果は、用量を 0.5 g/kg 以上に増やしてもほぼ同様であった。

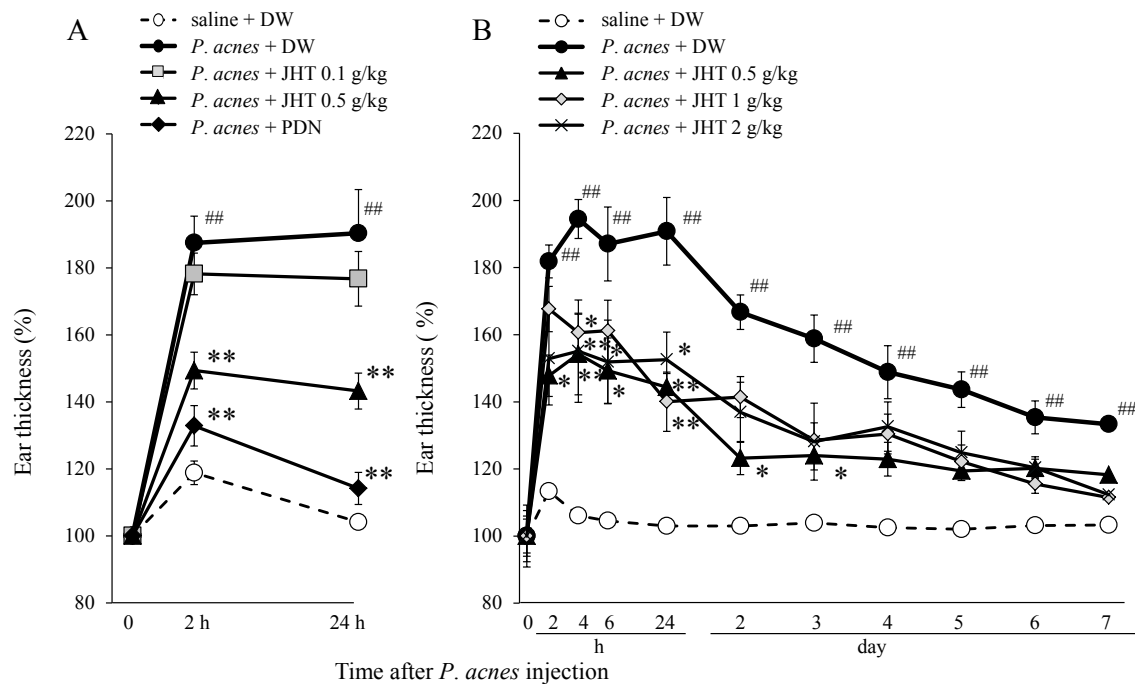


図 3. 十味敗毒湯のアクネ菌誘発耳介腫脹抑制作用

アクネ菌 (*P. acnes*, 0.14 mg/50 μ L/ear) 又は生理食塩水 (saline, 50 μ L/ear) は耳介表側に皮内注射した。十味敗毒湯 (JHT, 0.1、0.5、1 及び 2 g/kg) 又は蒸留水 (DW) は、菌注入の 1 時間前及び注入後 6、24 時間、更に 2、3、4、5 及び 6 日後に経口投与した。陽性対照薬として用いたプレドニゾロン (PDN, 10 mg/kg) も同様に投与した。耳介の厚さは、菌注射の 0 (投与前)、2、4、6、24 時間後、及び 2、3、4、5、6、7 日後に測定した。耳介腫脹率 (%) は、各ラットの菌注入前値に対する百分率で示した。全ての値は平均値 \pm 標準誤差 (図 3A : n = 10、図 3B : n = 6-7) で示した。^{##}*p* < 0.01 vs. コントロール (saline + DW) 群、**P* < 0.05 及び***P* < 0.01 vs. アクネ菌 (*P. acne* + DW) 群 (two-way repeated measures ANOVA + Bonferroni test)。

第2節

耳介腫脹改善効果の病理組織学的検証

第1節では、アクネ菌をラットの耳介に皮内注射することにより炎症病変を誘発させ、十味敗毒湯の効果を炎症症候の一つである腫脹を指標に検討した。その結果、十味敗毒湯がアクネ菌誘発耳介腫脹を有意に抑えることを示した。本節ではこの腫脹改善作用を更に病理組織学的に評価した。

1. 実験方法

1.1. 試薬

Phycoerythrin 標識マクロファージ抗体 (clone: HIS36) は BD Biosciences (San Diego, CA)、核染色用 DAPI 含有褪色防止用封入剤 (ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI) は Life Technologies (Grand Island, NY)、及び Gram Hücker 染色液は Muto Pure Chemicals (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。その他の試薬は商業的供給源から購入した。

1.2. 耳介の病理組織学的評価法

第1節のアクネ菌注入 2 及び 24 時間後において、耳介腫脹度測定を終了した対照群、アクネ菌群、十味敗毒湯群 (0.5 g/kg) 及びプレドニゾロン (PDN) 群の各ラットの耳介を病理組織学的観察に供した。各動物はイソフルラン吸入麻醉下で脱血死させた後、直ちに耳介を切除し、4°C の 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。パラフィン包埋後、中心軟骨 (耳介軟骨) を含む横断組織切片 (4 µm) を作製した。

耳介の病理組織学的検討は、アクネ菌注入 2 及び 24 時間後のパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、顕微鏡下で観察した。

組織マクロファージの免疫組織学的検討は、アクネ菌注入 24 時間後のパラフィン切片を phycoerythrin (PE, 1 µg/mL) 標識マクロファージ抗体にて免疫染色した後、核染色用 DAPI 含有褪色防止用封入剤にてマウントし、蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を用いて免疫蛍光解析を行った。画像は BZ-II ソフトウェア (Keyence) を用いてコンピューターに取り込み、菌塊膿瘍の内側と外側のマクロファージ集簇率 (%) を単位面積当たりの PE・DAPI 陽性細胞の占める面積比として算出した。

1.3. 耳介菌塊膿瘍領域のアクネ菌占有率の測定

耳介組織 (菌塊膿瘍領域) のアクネ菌 (グラム陽性桿菌) は前項で作製した 24 時間後のパラフィン切片 (n = 5) にグラム (Gram Hücker) 染色を施した後、蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ-9000) で観察した。膿瘍の内側又は外側におけるグラム陽性菌の占有率は、BZ-II ソフトウェア (Keyence) を用いて単位面積当たりの割合として算出した。

1.4. 統計解析

マクロファージ集簇率及びグラム陽性菌占有率は、平均値 ± 標準誤差で示した。統計的有意性は Dunnett の multiple comparisons test を用いて評価した。マクロファージ集簇率とグラム陽性菌占有率の相関性は、スピアマンの順位相関検定を用いて評価した。いずれの場合も $P < 0.05$ で統計的に有意差があると判定した。

2. 実験結果

2.1. 耳介腫脹改善効果の病理組織学的検証

十味敗毒湯のアクネ菌誘発耳介腫脹抑制作用を組織学的に検討した。図4は、アクネ菌投与2時間後の対照群、アクネ菌群、十味敗毒湯群(0.5 g/kg)及びPDN群(10 mg/kg)における耳介組織のHE染色画像を示す。耳介組織(図4A)は、腹側及び背側のいずれも耳介軟骨を中心に表層側から表皮、真皮、皮下組織および筋層から成り、腹側のほうが背側より層が厚い。正常組織の真皮及び筋層の拡大画像(図4B)において、炎症性細胞などはほとんど認められなかった。それに対し、アクネ菌群では菌塊が皮下組織に認められ、確実に皮内に菌が注入されていること(図4C)、並びに真皮から皮下組織にかけて水腫が観察され、耳介肥厚の原因となっていることが示された。また、その拡大画像は、この時点ではまだ炎症性細胞の浸潤がほとんど認められないことを示した(図4D)。十味敗毒湯(JHT:図4E)及びPDN(図4G)群では、アクネ菌群と同様に水腫が観察され、それらの拡大画像(JHT:図4F、PDN:図4H)では、炎症性細胞がわずかに認められた。

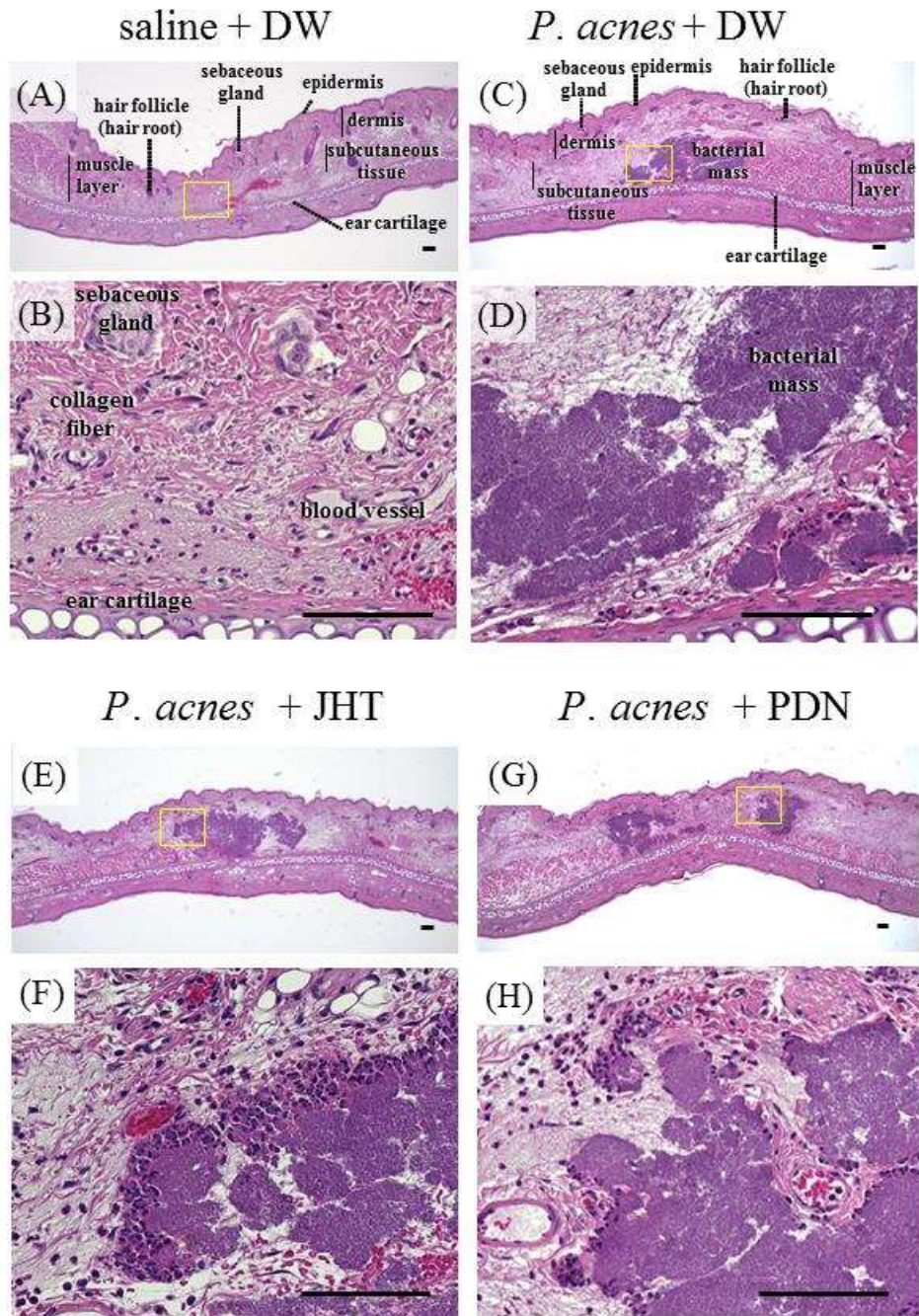


図 4. アクネ菌注射 2 時間後における耳介組織の病理画像 (HE 染色)

アクネ菌 (*P. acnes*) 注射 2 時間後の耳介から組織切片を作製し、HE 染色後に組織学的観察を行った。A) コントロール (saline + DW) 及び B) その拡大像、C) アクネ菌群 (*P. acnes* + DW) 及び D) その拡大像、E) 十味敗毒湯群 (*P. acnes* + 0.5 g/kg JHT) 及び F) その拡大像、G) プレドニゾロン群 (*P. acnes* + 10 mg/kg PDN) 及び H) その拡大像を示す。四角 (黄色) は各拡大の位置を示す。表皮 : epidermis、真皮 : dermis、皮下組織 : subcutaneous tissue、毛包 (毛根) : hair follicle (hair root)、皮脂腺 : sebaceous gland、筋層 : muscle layer、耳介軟骨 : ear cartilage、膠原線維 : collagen fiber、血管 : blood vessel、菌塊 : bacterial mass。スケール・バー : 100 μ m。

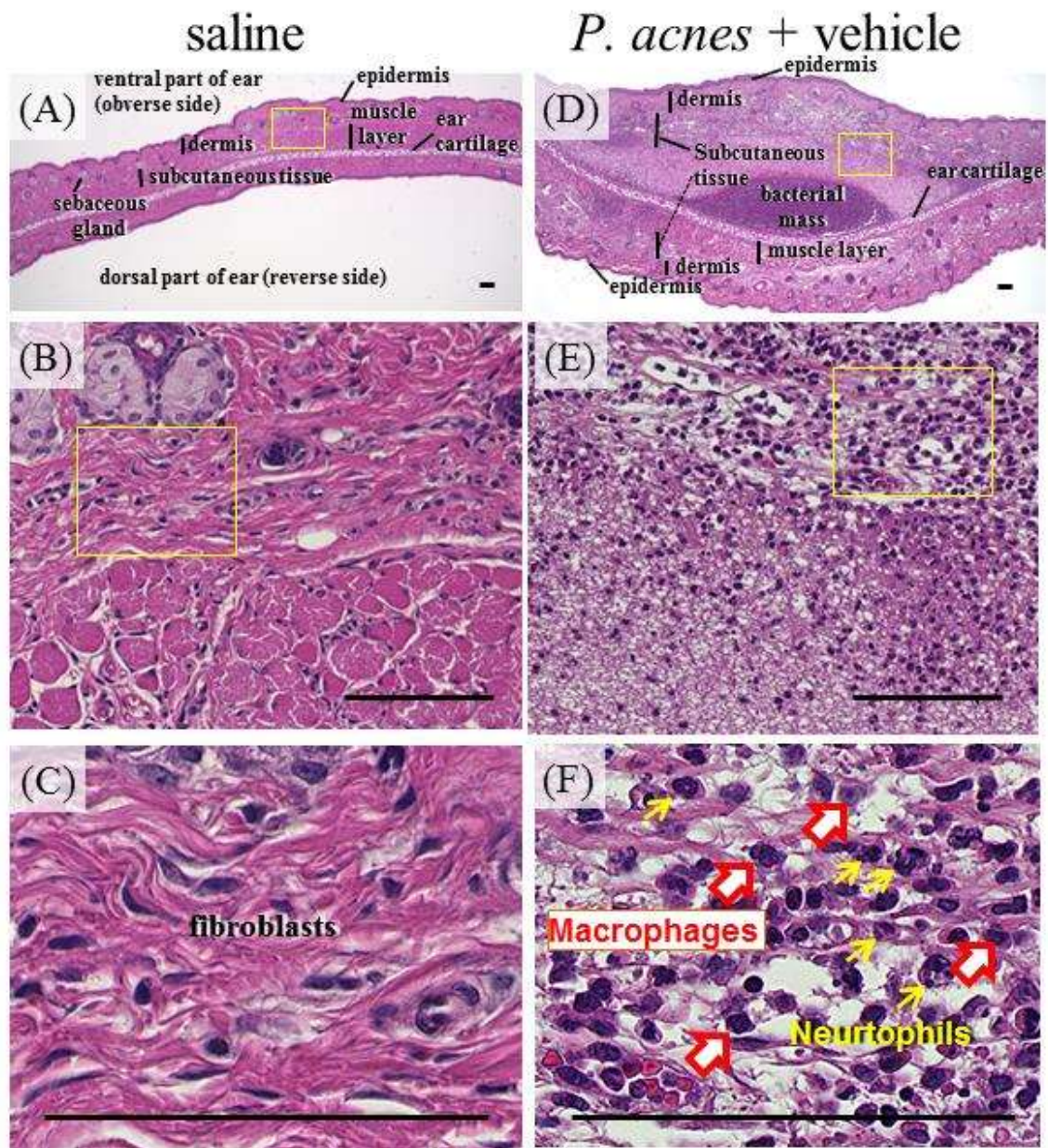


図 5 (A–F). アクネ菌注射 24 時間後における耳介組織の病理組織画像 (HE 染色)

アクネ菌 (*P. acnes*) 注射 24 時間後の耳介から組織切片を作製し、HE 染色後に組織学的観察を行った。A) コントロール (saline + DW) 及び B、C) その拡大像、D) アクネ菌群 (*P. acnes* + DW) 及び E、F) その拡大像、G) 十味敗毒湯群 (*P. acnes* + 0.5 g/kg JHT) 及び H、I) その拡大像、J) プレドニゾロン群 (*P. acnes* + 10 mg/kg PDN) 及び K、L) その拡大像を示す。四角 (黄色) は各拡大の位置を示す。黄色矢印は好中球、赤矢印はマクロファージを示す。耳介腹側 (表側) : ventral part of ear (obverse side)、耳介背側 (裏側) : dorsal part of ear (reverse side)、表皮 : epidermis、真皮 : dermis、皮下組織 : subcutaneous tissue、皮脂腺 : sebaceous gland、筋層 : muscle layer、耳介軟骨 : ear cartilage、線維芽細胞 : fibroblast、菌塊 : bacterial mass、マクロファージ : macrophages、好中球 : neutrophils。スケール・バー : 100 μ m。

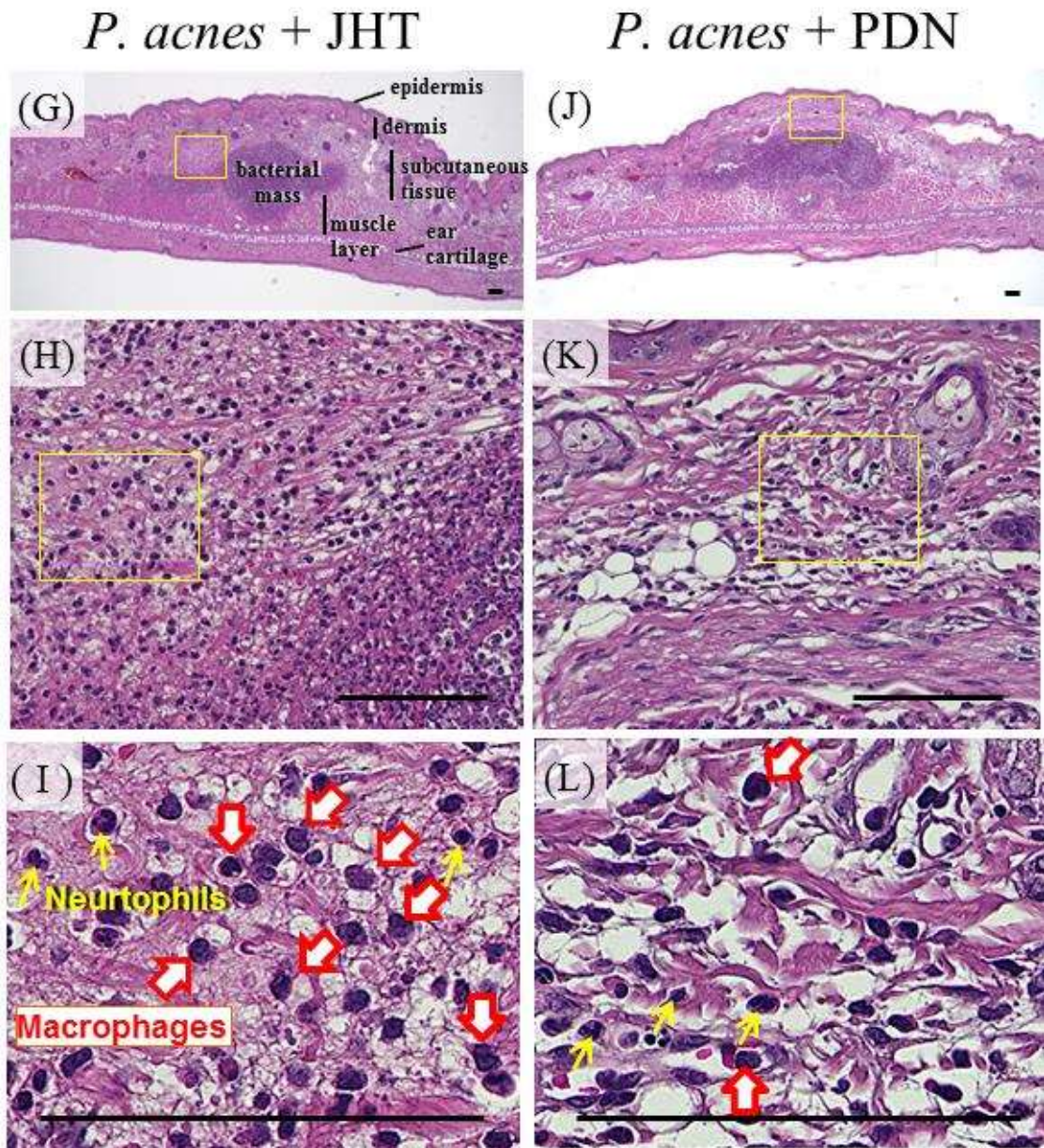


図 5(G-L). アクネ菌注射 24 時間後における耳介組織の病理組織画像 (HE 染色)

図 5 は、アクネ菌投与 24 時間後の対照群、アクネ菌群、十味敗毒湯群 (0.5 g/kg)、及び PDN 群 (10 mg/kg) における耳介組織の HE 染色画像を示す。コントロール群 (図 5A、5B、5C) と比較して、アクネ菌群では真皮及び皮下組織に著しい水腫が認められ、耳介組織が腫れている様子が観察された (図 5D)。その領域では著しい細胞浸潤が認められた (図 5E)。その更なる拡大画像は、それら細胞の多くが好中球及びマクロファージであることを示した (図 5F)。十味敗毒湯群 (JHT : 図 5G) 及び PDN 群 (図 5J) では、アクネ菌群と同様に水腫が認められ、それら

の拡大画像（JHT：図 5H、PDN：図 5K）ではコントロール群と同様な細胞浸潤が認められたが、更なる拡大画像では、十味敗毒湯群ではコントロール群に比べマクロファージがより多く観察された（図 5I）。一方、PDN 群では全体的な細胞浸潤が少なく、その細胞の主体は好中球であった（図 5L）。

十味敗毒湯のマクロファージ集簇促進作用について更に検証するため、マクロファージ特異抗体による免疫染色を施し免疫蛍光解析を行った。各群の免疫染色像を図 6 に示す。マクロファージは、PE 及び DAPI の二重陽性細胞として確認された（図中の黄色矢印）。コントロール群では僅かに常在性マクロファージが確認された（図 6A）。アクネ菌群では、膿瘍の内側（図 6B）及び外側（図 6C）にマクロファージが観察された。十味敗毒湯群では膿瘍内側（図 6D）のマクロファージ分布にアクネ菌群との差は認められなかったが、外側（図 6E）では、マクロフ

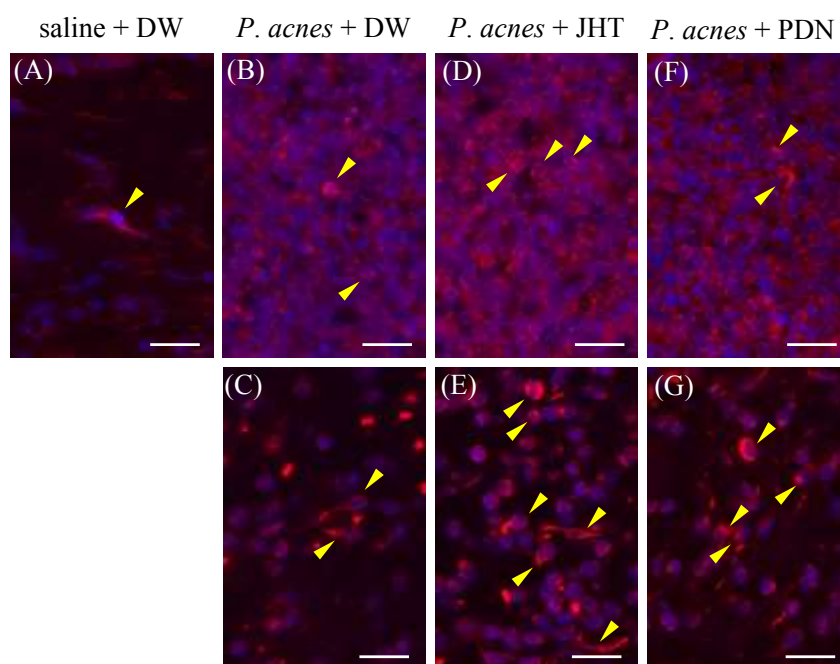


図 6. アクネ菌注入 24 時間後の耳介組織におけるマクロファージの免疫蛍光染色画像

A) はコントロール (saline + DW) 群、B)、D)、F) は、アクネ菌群 (*P. acnes* + DW)、十味敗毒湯群 (*P. acnes* + 0.5 g/kg JHT) 及びプレドニゾロン群 (*P. acnes* + 10 mg/kg PDN) における膿瘍の内側画像、C)、E)、G) は各群における膿瘍の外側画像を示す。PE 標識抗ラットマクロファージモノクローナル抗体 (clone: HIS36) と DAPI (核染) の二重染色陽性細胞をマクロファージとして同定した (矢印)。スケール・バー: 20 μ m。

マクロファージの増加（集簇）が確認された。PDN 群では内側（図 6F）と外側（図 6G）でマクロファージ分布に差は認められなかった。

図 7 は、アクネ菌注入 24 時間後（図 6）の PE・DAPI 二重陽性細胞（マクロファージ）の定量結果を示す。コントロール群と比較し、菌塊膿瘍の内側ではアクネ菌群、十味敗毒湯群及びプレドニゾロンの 3 群間に有意な差は認められなかったが、膿瘍の外側では十味敗毒湯群でマクロファージの有意な増加（集簇）が認められた。しかし、PDN 群ではこのような増加は認められなかった。

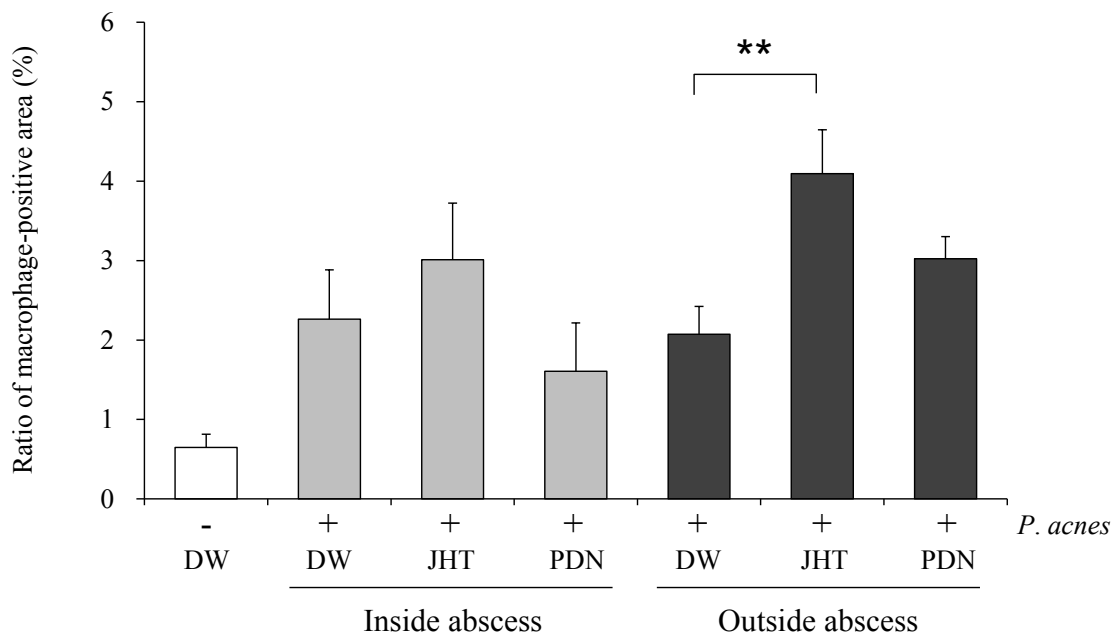


図 7. 十味敗毒湯のマクロファージ集簇促進作用

アクネ菌注入 24 時間後の免疫蛍光染色画像（図 6）における PE・DAPI 二重陽性細胞（マクロファージ）を定量した。コントロール群は皮下組織で検出されたマクロファージの占める面積を、またアクネ菌 (*P. acnes* + DW) 群、十味敗毒湯 (*P. acnes* + JHT) 群及びプレドニゾロン (*P. acnes* + PDN) 群では膿瘍様菌塊の内側 (Inside abscess) と外側 (Outside abscess) で検出されたマクロファージの占める面積を算出した。マクロファージ集簇率 (%) は単位面積当たりのマクロファージの占有面積比で示した。全ての値は平均値±標準誤差 (n=5) で示した。** $p < 0.01$ vs. アクネ菌 (*P. acne* + DW) 群 : Dunnett's test.

2.2. 耳介菌塊膿瘍領域におけるアクネ菌占有率

図 8 はアクネ菌注入 24 時間後の耳介菌塊膿瘍領域（内側及び外側）における各群のアクネ菌のグラム染色画像を示す（A、B 及び C はアクネ菌群、十味敗毒湯群及び PDN 群の内側、D、E 及び F は各群の外側）。これら画像の単位面積におけるグラム陽性桿菌（アクネ菌：図中で青染）の占有率を内側と外側に分け図 8G に示す。膿瘍内側（Inside of abscess）のアクネ菌占有率は、アクネ菌群で 4%、十味敗毒湯群で 3%に減少していたが、PDN 群ではこれらに比べ約 2 倍（8%）のアクネ菌が残存していた。外側では、アクネ菌群の菌占有率に対し十味敗毒湯群は統計的な有意性はなかったが、低下傾向（ $P=0.389$ ）が認められた。

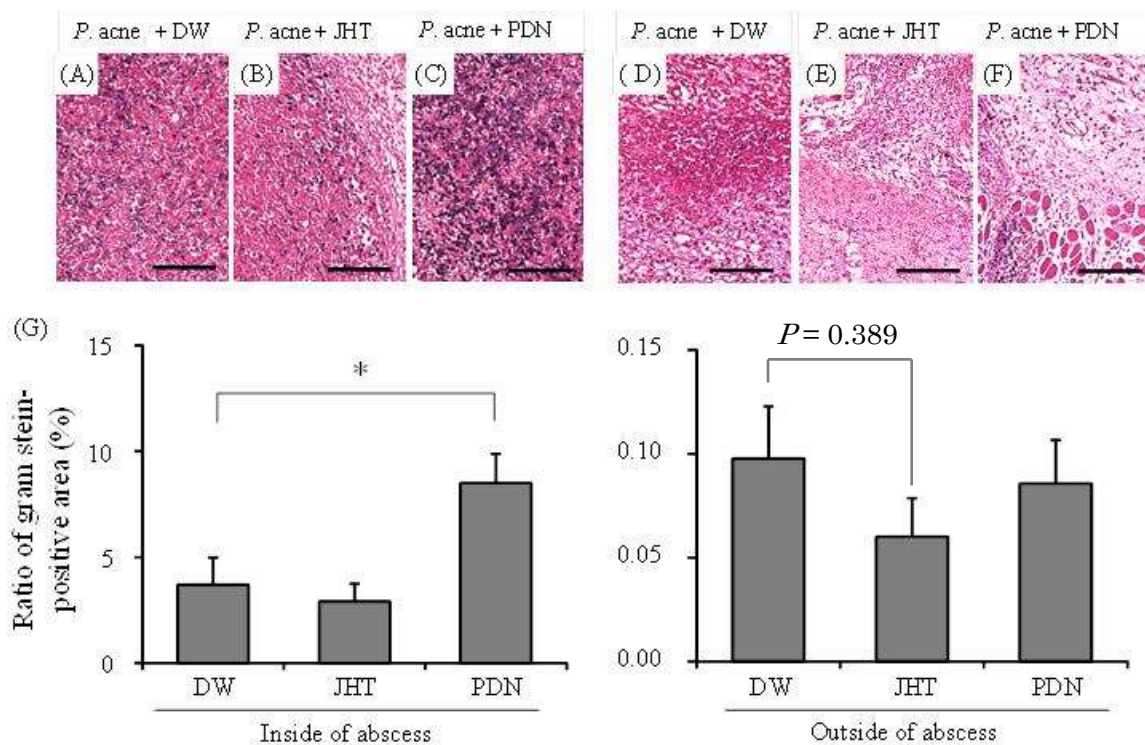


図 8. アクネ菌注入 24 時間後の耳介菌塊膿瘍領域におけるアクネ菌の占有率

A)、B) 及び C) はアクネ菌群、十味敗毒湯群及び PDN 群の菌塊膿瘍内側 (Inside of abscess)、D)、E) 及び F) は各群の菌塊膿瘍外側 (Outside of abscess) におけるグラム染色画像を示す。スケール・バー：100 μm。G) はそれらの画像から BZ-II ソフトウェアを用いて算出した内側及び外側の単位面積当たりにおけるグラム陽性桿菌（アクネ菌）の占有率 (%) を示す。各値は平均値±標準誤差 (n=5) で示した。* $P<0.05$ vs. アクネ菌 (*P. acne* + DW) 群：Dennett's test。

2.3. マクロファージ集簇率とアクネ菌占有率の相関

図9は先に示した菌塊膿瘍領域におけるマクロファージ集簇率とグラム陽性桿菌（アクネ菌）占有率の相関性を示す。この解析にはアクネ菌を注入した全ての群の各個体について、菌塊膿瘍の内側と外側を集計したデータ（22例）を用いた。マクロファージ集簇率とアクネ菌占有率の間には統計学的に有意な（ $P < 0.05$ ）負の相関（相関係数 $r_s = -0.670$ ）が認められ、マクロファージの集簇が多いほどアクネ菌が少ないことを示した。

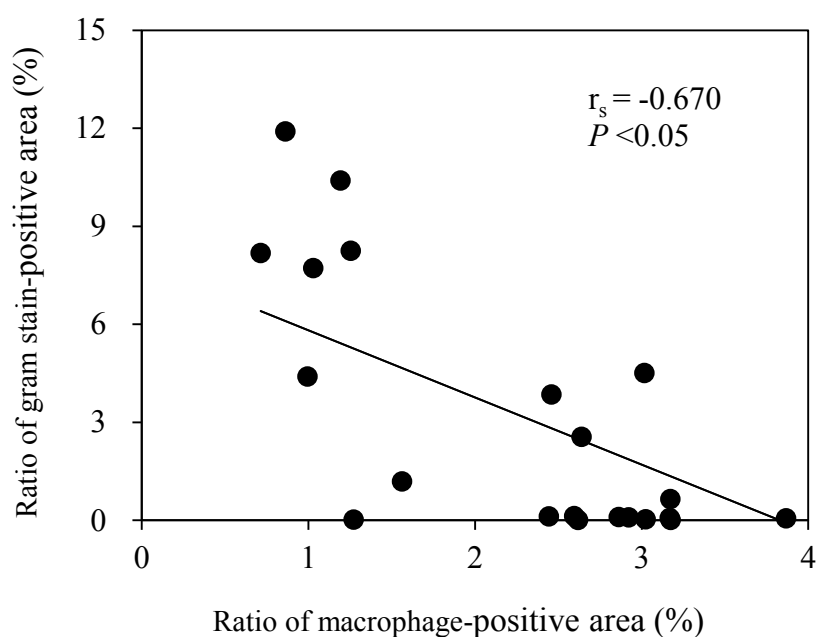


図9. マクロファージ集簇率とアクネ菌占有率の相関

マクロファージ集簇率（Ratio of macrophage-positive area）とグラム陽性桿菌（アクネ菌）占有率（Ratio of gram stain-positive area）に用いたデータは、図7及び図8の実験でアクネ菌を注入した全ての群の各個体について、菌塊膿瘍の内側と外側の値を集計した数値（ $n = 22$ ）を用いた。両者の相関性はスピアマンの順位相関検定にて評価した。

考察

アクネ菌の増殖は、炎症性痤瘡発症の主要な惹起因子である。即ち、アクネ菌は、好中球、単球及びリンパ球などを病巣に引き寄せる細胞走化因子の誘発^{22, 23)}、毛包内での皮脂産生の始動^{24, 25)}、Toll-like receptorを介した炎症サイトカイン（TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、IL-12など）の産生刺激^{14, 26, 27)}及びリパーゼ、プロテアーゼ、ヒアルロニダーゼなどの酵素放出による組織障害作用²⁸⁻³¹⁾を有する。アクネ菌に応答して、ケラチノサイト（ケラチン生成細胞）は、バクテリアを排除するためスカベンジャー受容体CD36の活性化を介したNAD(P)Hオキシダーゼによる大量のROSを産生させ、皮膚の発赤・腫脹などの炎症を引き起こす³²⁾。このように、アクネ菌を直接皮内に注入することにより、菌増殖を起点とした痤瘡様病態が発症する²⁰⁾。

そこで、本章第1節では、十味敗毒湯の尋常性痤瘡に対する生体での薬効を検証するため、アクネ菌をラットの耳介に皮内注射し炎症病変を誘発させ、十味敗毒湯の効果を炎症症候の一つである腫脹を指標に検討した。十味敗毒湯は、免疫抑制剤のPDN同様、アクネ菌による耳介腫脹を菌注入の2時間後で既に有意に抑制した。アクネ菌注入による急性炎症は24時間まで持続した後、回復に向かったが、十味敗毒湯はこの回復に対しても促進傾向を示した。この十味敗毒湯によるアクネ菌誘発耳介腫脹抑制及び回復（修復）促進作用は、0.5 g/kg 用量まで用量依存性が認められたが、それ以上の用量を用いてもその効果が増強することはなかった。この結果から、十味敗毒湯はアクネ菌誘発耳介腫脹抑制作用があり、その効果は 0.5 g/kg 用量で頭打ちになることが示唆された。

十味敗毒湯の抗腫脹作用について、第2節の病理組織学的検討によって検証した。耳介腫脹抑制作用には、生体の抗炎症能に加え、病巣部に対する炎症性・貪食性細胞の浸潤要因も関与する。しかし、耳介腫脹抑制効果が認められた菌注入2時間後の組織所見では、十味敗毒湯及びPDN投与の有無に関わらず、炎症・貪食に関与する好中球やマクロファージの浸潤はほとんど観察されなかった。このことから2時間後の腫脹抑制作用は、これらの細胞浸潤に依存しない改善機序が関与しているものと推察される。今回の病理組織所見からは十味敗毒湯の腫脹抑制作用の機序は特定できないが、十味敗毒湯が腫脹（炎症）を抑制したという事実は、その要因にROSなどの抑制を介した抗炎症作用などが関与しているのかもしれない。

一方、アクネ菌注入 24 時間後における腫脹耳介の組織所見では、真皮から皮下組織の著しい水腫に加え、多数の炎症性細胞の浸潤が観察された。また、細胞浸潤の拡大画像では、アクネ菌群の好中球／マクロファージの割合に比べ、十味敗毒湯群ではマクロファージの割合が増加、一方、PDN 群では好中球やマクロファージなどの細胞浸潤の割合が減少した。そこで、phycoerythrin (PE) 標識マクロファージ抗体染色（この抗体は組織マクロファージに結合するが、単球には結合しない）と核 (DAPI) 染色（赤血球は PE 陽性を示すが核がないため DAPI 陰性を示す）の二重染色により、マクロファージ (PE・DAPI 陽性細胞) を同定・定量したところ、十味敗毒湯群ではマクロファージ集簇が有意に増加し、PDN 群ではそのような増加はない、ということが確認された。好中球やマクロファージは病原体の貪食作用も担っているが、好中球は貪食能が非常に強い反面、寿命が短いため、長く組織に生存できるマクロファージが炎症部位に動員され、死滅した好中球の貪食処理をしながら生存好中球と共に病原体を貪食する³³⁾。マクロファージの集簇が菌塊膿瘍の外側に多かったことから (図 7)、膿瘍処理に携わるこれら貪食細胞は病巣周囲 (外側) から集まってくるものと推察された。これらの結果を統合すると十味敗毒湯は先述の抗炎症作用に加え、マクロファージ集簇によるアクネ菌貪食 (修復促進作用) を有している可能性が考えられた。

炎症耳介へのマクロファージ集簇の生物学的意義を検証するため、マクロファージの集簇促進が認められた24時間後の耳介切片を用いて菌塊膿瘍領域におけるグラム陽性桿菌 (アクネ菌) の面積比率を調べたところ、十味敗毒湯が菌塊膿瘍外側のグラム陽性菌率を減少させる傾向を示した。さらに菌塊膿瘍領域のマクロファージ集簇率とグラム陽性菌面積比率の相関性を調べたところ、両者には有意な負の相関性が認められた。この結果は、マクロファージの集簇が多いほどアクネ菌が貪食され減少すること (菌クリアランスの亢進) を示唆すると共に十味敗毒湯のマクロファージ集簇促進作用がアクネ菌の貪食に関与していることを示唆する。マクロファージ機能に及ぼす十味敗毒湯の作用を明らかにするためには今後より詳細な検討が必要である。マクロファージ集簇促進作用については、走化性因子や分化増強などの作用機序を更に検討したので次章の「十味敗毒湯の作用機序研究」で論述する。

以上、本章では、十味敗毒湯がアクネ菌誘発急性炎症に対し改善作用を有することを耳介腫脹及びその病理組織像から実証した。

小括

十味敗毒湯がアクネ菌誘発急性炎症に対し改善作用を有することが、耳介腫脹の抑制作用から実証された。その作用機序として抗炎症作用及びマクロファージ集簇・貪食促進作用などの関与が示唆された。一方、十味敗毒湯群の病理解析像では、PDN 群とは異なり炎症性細胞の集積の抑制像が認められず、むしろマクロファージ集積像が顕著に観察された。同薬群では、グラム染色陽性像が少ない傾向を示したことから、十味敗毒湯がマクロファージ機能を高め、菌クリアランスを亢進した可能性が示唆された。

第2章

十味敗毒湯の作用機序研究

はじめに

第1章では、十味敗毒湯の尋常性痤瘡改善効果をアクネ菌誘発急性炎症（耳介腫脹）モデルラットにて検証した。尋常性痤瘡は、諸言でも記載したように、微小面皰（面皰前段階）から非炎症性皮疹（面皰）、炎症性皮疹（丘疹・膿疱）まで様々な進行ステージが混在する。従って、治療においては、微小面皰、面皰を治療し、炎症性皮疹への進展を抑制し重症化を防ぐと共に自然修復力を高めることが重要となる。

尋常性痤瘡の病態には、ホルモンバランスの乱れ³⁴⁻³⁶⁾、皮脂合成の異常促進³⁷⁾、アクネ菌増殖³⁸⁾、炎症性細胞による炎症惹起³⁹⁾、貪食細胞による修復・治癒効果^{40, 41)}など様々な要因が関与している。十味敗毒湯の尋常性痤瘡改善効果を動物実験で検証することは臨床効果を支持し、さらに薬理機序を解明する上でも重要である。第1章で示したアクネ菌誘発モデルにおける検証は本剤の *in vivo* 効果を示唆した最初の知見である⁴²⁾。しかし、薬理機序を生体実験だけで解明するには限界があり、*in vitro* 実験系と併せた総合的な解釈が必須である。

十味敗毒湯に関しても、作用機序について、これまでにいくつかの *in vitro* 研究がなされている。例えば、面皰前段階に関与するテストステロンについて、活性体ジヒドロテストステロン（DHT）を産生する 5α リダクターゼ活性の抑制作用⁴³⁾、皮脂から遊離脂肪酸を生成するリパーゼの阻害作用^{44, 45)}、炎症性メディエーター産生と放出に関与する toll like receptor 2（TLR2）の阻害作用⁴³⁾などが報告されている。しかし、これらの知見は多数の成分が混合した漢方エキス又は生薬エキスの、いわゆる「ふりかけ実験」であり、活性成分の同定には至っていないため、生体での薬効に直接結びつけるのは適切ではない。しかし、それらの知見は活性成分を追及するための貴重な情報である。

そこで、本章では抗テストステロン代謝作用、皮脂合成抑制作用、炎症メディエーター（活性酸素及び活性窒素）産生抑制作用及びマクロファージ活性化作用に着目し、これらの作用機序について更に検証を加えると共にそれぞれの薬理機序に関与する活性成分を探索した。

第1節

抗テストステロン代謝作用

テストステロンは、アンドロゲン（男性ホルモン）に属するステロイドホルモンの一種であり、男性では精巣（睾丸）で95%以上が分泌され、女性では副腎や卵巣から男性の5~10%程度が分泌されている⁴⁶⁾。テストステロンはステロイド酵素の5 α リダクターゼによりジヒドロテストステロン（DHT）に代謝される。DHTはテストステロンよりアンドロゲン受容体への結合親和性が高く、標的遺伝子の転写を活性化させ皮脂腺細胞の増殖や皮脂合成を促すことから、アンドロゲンの中ではこのDHTがニキビ発生の主要原因と考えられている⁴⁷⁾。5 α リダクターゼには3つの亜群酵素(5 α -R1, 5 α -R2 及び 5 α -R3)が存在する。成人では、主に5 α -R1型が脂腺性毛包の皮脂腺細胞や表皮ケラチノサイトに発現している⁴⁸⁻⁵¹⁾。従って、5 α リダクターゼ(5 α -R1型)を阻害すれば皮脂腺を活性化させるDHT産生を阻止することができる。

十味敗毒湯には、これまでに5 α リダクターゼ活性の抑制作用が知られており、構成生薬のボクソクが活性生薬の一つとして推察されている⁴³⁾。ボクソクはブナ科コナラ属のクヌギの樹皮の水抽出物であり、ニキビを含む様々な皮膚疾患の治療薬として使われてきた。また、ボクソクには5 α -R1型リダクターゼを阻害すると推察されている種々のタンニンが豊富に含まれている⁵²⁻⁵⁶⁾。しかし、その薬理作用の詳細についてはまだ十分な検討がなされていない。

そこで、本章第1節ではボクソクに着目し、テストステロン代謝に対するエキス末及びその成分の作用について、5 α -R1型リダクターゼ阻害作用を指標に詳細に検討した。

1. 実験方法

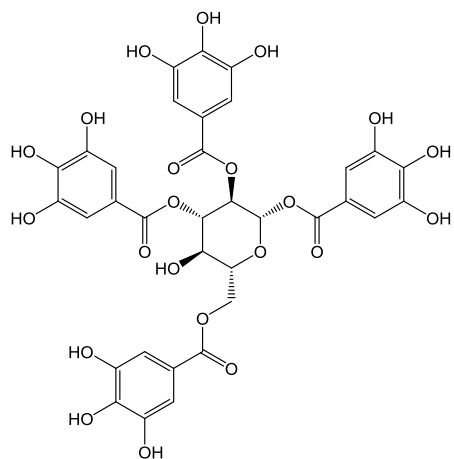
1.1. 被験物質及び試薬

1.1.1. ボクソクエキス末

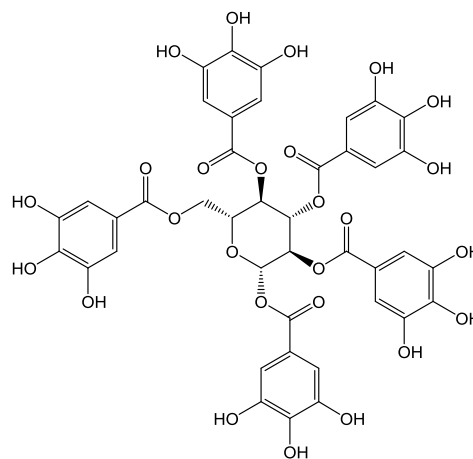
コナラ属クヌギの樹皮水抽出物から調製したボクソクの乾燥エキス末 (Lot No. 2131093010 : 以下「ボクソク」と略す) は、株式会社ツムラ (Tokyo, Japan) から入手した。種々濃度のボクソク溶液 (30–100 mg/mL) は、dimethyl sulfoxide を添加・混合した後、10 分間の超音波処理を行って調製した。培養実験では適切な濃度に希釈したエキス溶液を 0.45 μm フィルターでろ過して用いた。

1.1.2. ボクソク成分

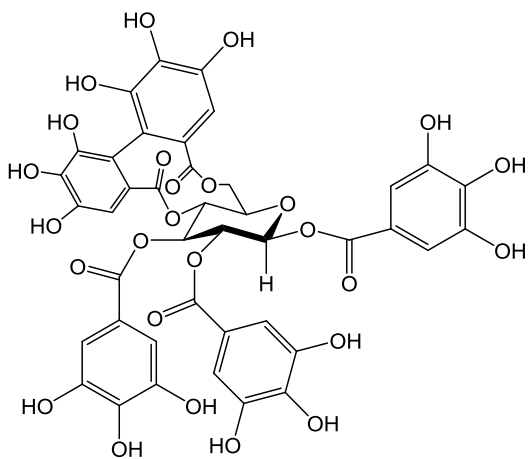
本研究にはボクソク由来 17 成分を用いた (図 10)。その内、1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl glucose (tetragalloyl glucose)、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl glucose (pentagalloyl glucose)、eugenin、1-desgalloyl eugenin、casuarinin、castalagin 及び stenophyllanin C は、株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部 (ibaraki, Japan) から入手した。Gallic acid、methyl gallate、(+)-catechin、(-)-epicatechin gallate、(-)-gallocatechin、(-)-epigallocatechin gallate 及び fraxin は、和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。2',5-Di-*O*-galloyl hamamelose (hamamelitannin) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、(+)-Gallocatechin は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、及び(+)-taxifolin は Extrasynthese (Lyon, France) からそれぞれ購入した。



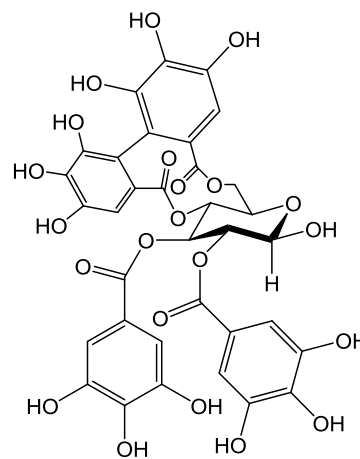
Tetragalloyl glucose



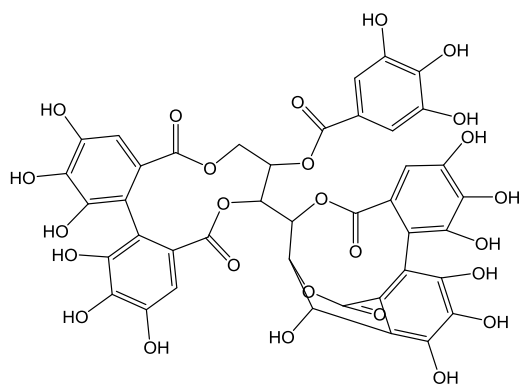
Pentagalloyl glucose



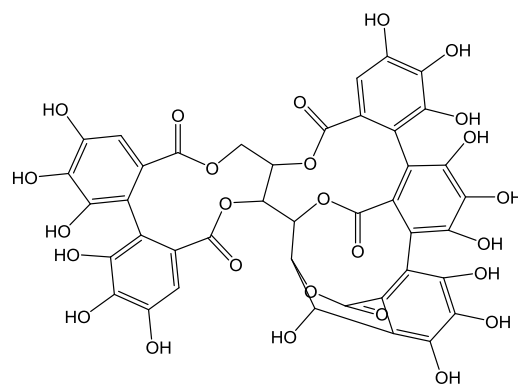
Eugeniiin



1-Desgalloyl eugeniiin

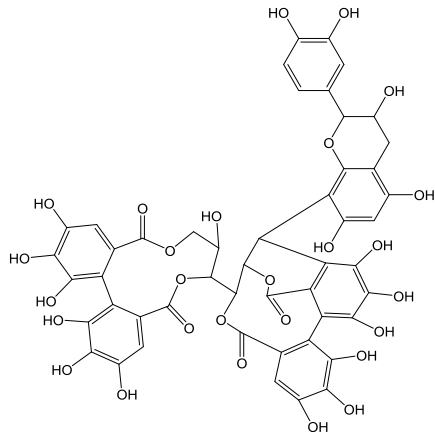


Casuarinin

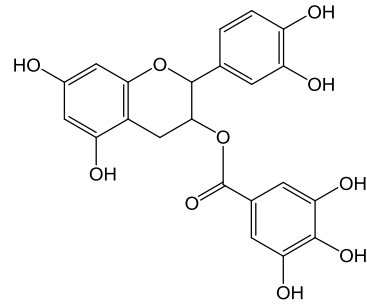


Castalagin

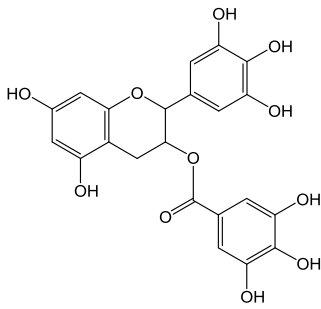
図 10-1. 5α リダクターゼ活性阻害試験に用いた 17 種のボクソク成分の構造式



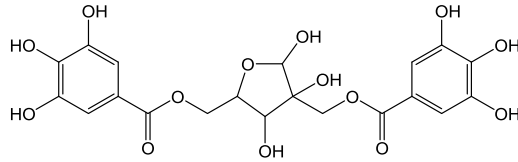
Stenophyllanin C



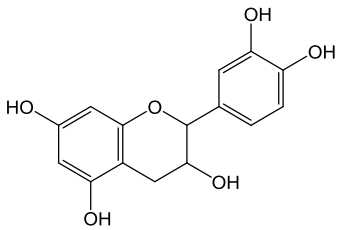
Epicatechin gallate



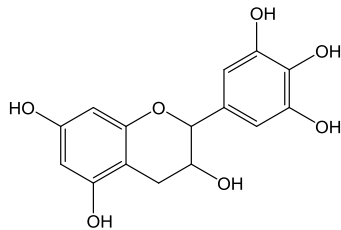
Epigallocatechin gallate



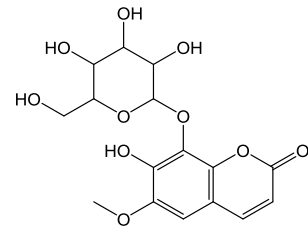
Hamamelitannin



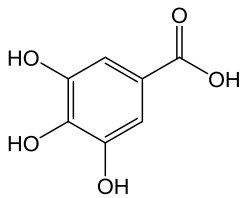
Catechin



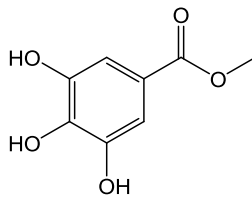
(+) or (-)-Gallocatechin



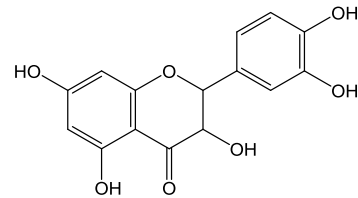
Fraxin



Gallic acid



Methylgallate



Taxifolin

図 10-2. 5 α リダクターゼ活性阻害試験に用いた 17 種のボクソク成分の構造式

1.1.3. 試薬

TMF-4AS-1 (5 α リダクターゼ阻害剤) は、Sigma-Aldrich から購入した。アンドロゲン標準物質としてのテストステロン、DHT 及び 5 α -androsterone-3 α ,17 β -diol は東京化成工業 (Tokyo, Japan) 又は Sigma-Aldrich から購入した。Dithiothreitol は、和光純薬工業から、またその他の試薬は商業的供給源から購入した。

1.2. 実験動物

日本クレア株式会社 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) から購入した SD 系雄性ラット (体重 300~320 g) を 5 α リダクターゼ用肝ミクロソーム調整に用いた。動物は購入後、自由摂水、自由摂食、温度 23 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 20 %、12 時間明暗サイクル (明期 7 : 00 - 19 : 00) の環境で 1 週間予備飼育した後実験に用いた。全ての実験は、株式会社ツムラの「動物実験に関するガイドライン」に従い、動物実験審査会の承認のもとで実施した。

1.3. ラット肝ミクロソーム調製法

ラット肝ミクロソームは、Lee らの方法⁵⁷⁾に従って調製した。即ち、一晩絶食させたラット (体重 300~320 g) を断頭・放血後、直ちに肝臓を摘出し、0.32 mol/L sucrose、1 mmol/L dithiothreitol 及び 20 mmol/L potassium phosphate を含有する冷却ホモジネート緩衝液 (pH 6.5) で洗浄した。これ以降の操作は全て 4 $^{\circ}$ C 条件下で行った。肝臓はハサミでミンチした後、ホモジネート緩衝液を加え Potter-Elvehjem grinder (Asahi Glass Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いてホモジナイズした。ホモジネートは 10,000 \times g で 10 分間遠心分離した後、ペレットを 2 倍量の同緩衝液で再度洗浄及び遠心分離した。2 回の遠心分離で得た上清を合わせ、更に 105,000 \times g で 1 時間遠心分離した。ペレット (ミクロソーム) は、再度同緩衝液に懸濁し遠心分離した後、最終的に約 6 mL の同緩衝液で懸濁し、300 μ L ずつ小分けして -80 $^{\circ}$ C で凍結保管した。ミクロソームは、使用直前に 40 mmol/L potassium phosphate (pH 6.5) で適切濃度に希釈し実験に用いた。

1.4. テストステロン代謝測定法

被験物質 (ボクソクまたは成分) は、1 mmol/L dithiothreitol、40 mmol/L potassium

phosphate、100 $\mu\text{mol/L}$ NADPH 及び 3.5 $\mu\text{mol/L}$ testosterone 又は dihydrotestosterone を含有する pH 6.5 の反応溶液に添加（最終容量：0.5 mL）し、室温で 20 分間プレインキュベーションした。5 α リダクターゼ活性阻害の陽性対照には被験物質の代わりに TMF-4AS-1（5 α リダクターゼ阻害剤）を最終容量中に添加した。酵素反応は、肝ミクロソーム（20 μg 蛋白量）の添加により開始した。37°C で 30 分間インキュベーション（酵素反応）した後、2 mL の酢酸エチルを加え脂溶性分画を抽出した。テストステロン及びその代謝物が含まれる酢酸エチル層（上層）を別のチューブに移し、遠心濃縮器（トミー精工, Tokyo, Japan）を用いて溶媒を蒸散させた。残渣（テストステロン及びその代謝物）は、アセトニトリル又はエタノールで溶解した。これらの酵素反応抽出溶液は、標準物質（testosterone、DHT 及び 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol）と共に下記条件下で薄層クロマトグラフィー（TLC）によるテストステロンの肝ミクロソーム代謝分析に用いた。

TLC 分析条件

TLC プレート：Silica gel 60 F254（Merck, Darmstadt, Germany）

展開溶媒：ethyl acetate : hexane = 1 : 1（v/v）

展開温度：室温

検出方法：展開後のプレートは 10% 硫酸液に噴霧・暴露した後、ホットプレート上で加熱。蛍光シグナルは 302 nm の UV 照射によって可視（ChemiDoc XRS Plus（BIO-RAD, Hercules, CA）

1.5. 5 α リダクターゼ活性測定法

前項の酵素反応抽出溶液を用いて、酵素反応後のテストステロン（基質）濃度を下記条件下で高速液体クロマトグラフィー（HPLC：島津, Kyoto, Japan）を用いて測定した。5 α リダクターゼ活性は、酵素反応に用いた基質量（100%）に対する反応後の相対基質量として求めた。

HPLC 分析条件

カラム：C18 column（3.0 \times 150 mm, GL Science, Japan）

カラムオープン温度：50°C

移動相：アセトニトリル：水 = 50 : 50（v/v）

流速：0.4 mL/min

検出器 UV 波長：240 nm

1.6. 統計学的解析

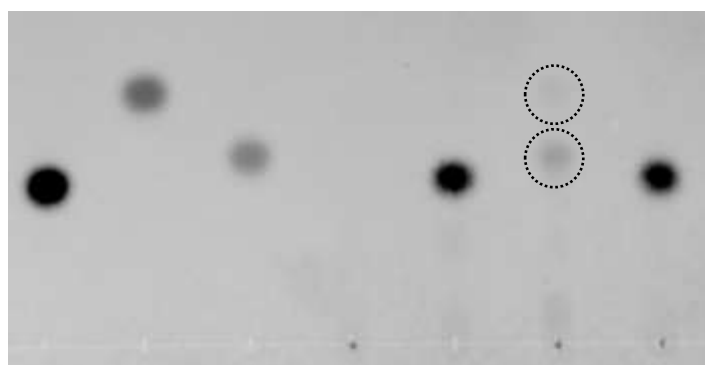
5 α リダクターゼ活性は、平均値 \pm 標準誤差 (SD) で示した。統計的有意差は、片側あるいは両側の ANOVA 検定後、Dunnett's multiple comparisons test 又は unpaired Student's *t*-test を用いて評価した。いずれも $P < 0.05$ の場合に統計的有意差があると判定した。

2. 実験結果

2.1. ボクソクの抗テストステロン作用

2.1.1. テストステロン代謝阻害作用

図 11 は、ラット肝ミクロソームのテストステロン代謝に及ぼすボクソクの作用を調べた TLC 分析の結果を示す。テストステロン (T)、ジヒドロテストステロン (DHT : テストステロンの 5 α リダクターゼ代謝物) 及び 5 α -androstane-3,17-diol (A diol : DHT のアルドケトリダクターゼ代謝物) の各標準物質 (Standard) の展開スポットと比較した際、肝ミクロソーム (Liver microsome) 溶液ではこれら標準化合物に相当するスポットは全く検出されなかった。基質溶液では、テストステロンのスポット ($R_f = 0.224$) だけが検出された。テストステロン+肝ミクロソーム反応溶液では、テストステロンのスポットが完全に消失し、代わりに代謝物である DHT ($R_f = 0.243$) 及び A. diol ($R_f = 0.342$) スポットが検出された。このテストステロン+肝ミクロソーム反応にボクソクを加えると、これら代謝物のスポットは全く認められず、テストステロンのスポットだけが検出された。

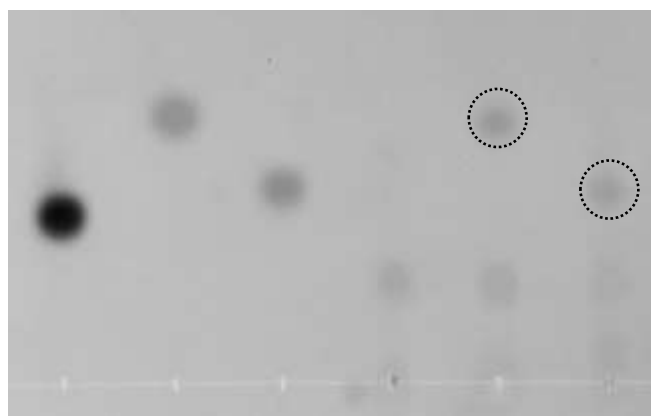


T.	DHT	A.diol	-	T.	T.	T.	Androgen
Standard			+	-	+	+	Liver microsome
			-	-	-		BK

図 11. 肝ミクロソームのテストステロン代謝に対するボクソクエキスの阻害作用：TLC 分析

テストステロン (T、最終濃度：3.5 $\mu\text{mol/L}$)、T + ラット肝ミクロソーム (Liver microsome: 40 $\mu\text{g/mL}$) 及び T + Liver microsome + ボクソク (BK: 30 $\mu\text{g/mL}$) の反応液 (37°C、30 分間) は、T、ジヒドロテストステロン (DHT) 及び 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (A.diol) の標準物質と共に薄層クロマトグラフィー (TLC) 展開した。

テストステロンの代わりに DHT を基質として肝ミクロソームと反応させると、DHT スポットが消失し A. diol スポットが検出された (図 12)。



T.	DHT	A. diol	-	DHT	DHT	Androgen
Standard			+	-	+	Liver microsome

図 12. 肝ミクロソームのジヒドロテストステロン代謝：TLC 分析

ジヒドロテストステロン (DHT、最終濃度：3.5 $\mu\text{mol/L}$) 及び DHT + ラット肝ミクロソーム (Liver microsome: 40 $\mu\text{g/mL}$) の反応液 (37°C、30 分間) は、テストステロン (T)、DHT 及び 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (A.diol) の標準物質と共に薄層クロマトグラフィー (TLC) 展開した。

2.1.2. 5 α リダクターゼ活性阻害作用

前項の TLC 分析は、ボクソクが肝ミクロソームによるテストステロン代謝を 5 α リダクターゼ活性阻害により抑制することを示唆した。この結果は、5 α リダクターゼ活性阻害率は基質として用いたテストステロン量の定量によって表すことができることを示唆する。そこで、ここでは 5 α リダクターゼ活性阻害率 (%) を HPLC 分析で定量したテストステロン濃度を指標に評価した (図 13)。酵素反応に用いたテストステロン濃度を 100%とした時、肝ミクロソームはそれに含まれる 5 α リダクターゼ活性により、その濃度を約 4%まで低下させた。この肝ミクロソーム (5 α リダクターゼ) 活性によるテストステロン濃度の低下は、ボクソク (3~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 又は 5 α リダクターゼ阻害剤 (TMF-4AS-1 : 0.000001~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) により濃度依存的に抑制された。その 50%阻害率 (IC₅₀ 値) は、ボクソクが 12.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び TMF-4AS-1 が 107 pmol/L であった。

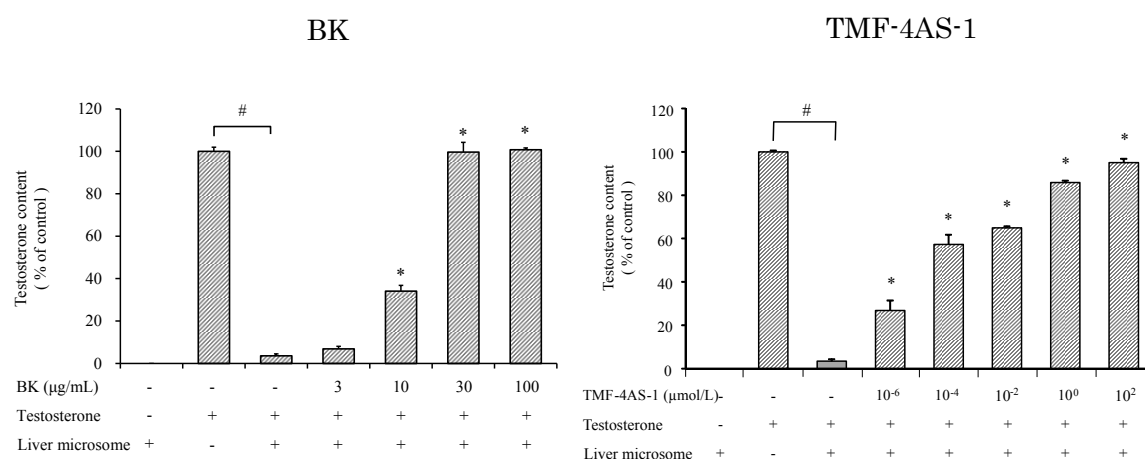


図 13. ボクソク及び TMF-4AS-1 の 5 α リダクターゼ阻害作用

ラット肝ミクロソーム (Liver microsome: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、テストステロン (Testosterone、最終濃度 : 3.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、Testosterone + Liver microsome 及び Testosterone + Liver microsome + ボクソク (BK: 3~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 又 TMF-4AS-1 (0.000001~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) は 37°C で 30 分間インキュベーションした。反応後のテストステロン量は HPLC で定量した。5 α リダクターゼ活性は、基質 (テストステロン) 濃度 (100%) に対する酵素反応後のテストステロン濃度の相対値で示した。各値は平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示した。# $P < 0.05$ vs. テストステロン (Student's *t*-test)、* $P < 0.05$ vs. テストステロン (Dunnett's multiple comparisons test)。

2.2. ボクソク成分の 5 α リダクターゼ活性阻害作用

ボクソクの 5 α リダクターゼ阻害成分を明らかにするため、前項と同様の HPLC 分析を用いて、17 種のボクソク成分について調べた。この内、hamamelitannin、(+)-catechin、(+)-gallo catechin、(-)-gallo catechin、fraxin、gallic acid、(+)-taxifolin 及び methyl gallate の 8 成分には有意な作用は認められなかった。しかし、表 2 に示した tetragalloyl glucose、pentagalloyl glucose、eugeniin、1-desgalloyl eugeniin、casuarinin、castalagin、stenophyllanin C、(-)-epicatechin gallate 及び(-)-epigallocatechin gallate の 9 成分 (0.1, 1, 10 及び 100 $\mu\text{mol/L}$) は、5 α リダクターゼ (肝ミクロソーム) 活性によるテストステロン (基質) の濃度低下を濃度依存的に抑制した。50% 阻害率 (IC₅₀ 値) の比較から、pentagalloyl glucose (IC₅₀=2.5 $\mu\text{mol/L}$) がこれら成分の中で最も強い 5 α リダクターゼ活性阻害作用を示した。

表 2. ボクソク成分の 5 α リダクターゼ活性阻害作用

BK ingredient	Inhibition of 5 α -reductase activity (% of control)				IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)				
	0.1	1	10	100	
tetragalloyl glucose	3.3 \pm 0.5	18.7 \pm 0.4	63.2 \pm 3.0	102.8 \pm 1.2	8.1
pentagalloyl glucose	5.4 \pm 1.3	36.1 \pm 6.5	83.5 \pm 1.3	107.9 \pm 2.2	2.5
eugeniin	4.2 \pm 1.0	13.9 \pm 0.5	62.5 \pm 0.6	114.6 \pm 0.6	10.9
1-desgalloyl eugeniin	4.6 \pm 0.2	9.2 \pm 1.6	52.5 \pm 2.4	107.9 \pm 0.9	12.6
casuarinin	6.4 \pm 1.4	10.8 \pm 0.7	59.0 \pm 2.0	110.1 \pm 0.5	10.5
castalagin	4.9 \pm 0.5	6.3 \pm 1.2	70.7 \pm 3.2	113.3 \pm 7.6	8.0
stenophyllanin C	5.6 \pm 0.6	4.6 \pm 0.5	63.1 \pm 0.4	102.3 \pm 2.2	7.2
(-)-epicatechin gallate	4.6 \pm 0.2	4.9 \pm 0.2	5.9 \pm 0.3	69.4 \pm 1.2	10-100
(-)-epigallocatechin gallate	3.7 \pm 0.1	4.4 \pm 0.4	5.3 \pm 0.3	58.6 \pm 2.7	10-100

各種ボクソク成分 (0.1~100 $\mu\text{mol/L}$) はテストステロン (3.5 $\mu\text{mol/L}$) 及びラット肝ミクロソーム (40 $\mu\text{g/mL}$) と共に 37°C で 30 分間インキュベーションした。酵素反応後のテストステロン量は HPLC で定量した。5 α リダクターゼ活性は、基質 (テストステロン) 濃度 (100%) に対する酵素反応後のテストステロン濃度の相対値で示した。各値は平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示した。

第2節

皮脂合成抑制作用

前節では十味敗毒湯の構成生薬の一つであるボクソクが、ニキビ発症要因の一つと考えられているジヒドロテストステロン (DHT) の産生を 5α リダクターゼ活性阻害作用により抑制すること、及びその作用には 9 種のボクソク成分が関与している可能性を示唆した。しかし、この作用を示したボクソクとその成分が皮脂合成・分泌を抑制する報告例はない。

そこで、本節では、ボクソク成分の中で最も強い 5α リダクターゼ活性阻害作用を示した pentagalloyl glucose (図 14) に焦点を当て、培養ハムスター皮脂腺細胞を用いて、テストステロン及びインスリン (皮脂腺細胞の増殖促進や脂肪合成促進作用を示す)⁵⁸⁻⁶¹⁾により促進される細胞増殖及び細胞内脂肪 (トリグリセリド) 合成に対する作用を検討した。

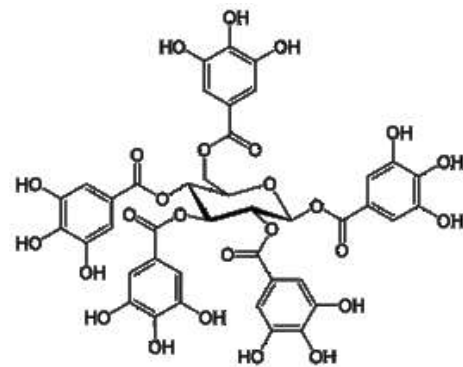


図 14. Pentagalloyl glucose の化学構造式

1. 実験方法

1.1. 被験物質及び試薬

1.1.1 被験物質

ボクソク及び pentagalloyl glucose (株式会社ツムラ) は、第 2 章・第 1 節の実験と同じものを用いた。テストステロンは和光純薬工業から、また、インスリンは倉敷紡績 (Osaka, Japan) から購入した。

1.1.2. 試薬

10 ng/mL 上皮成長因子 (EGF)、2% (v/v) ヒト血清 (HS) 及び 8% (v/v) 非働化牛胎児血清 (FBS)、HEPES 緩衝液、トリプシン-EDTA 溶液及びトリプシン中和液を含む継代用試薬セット及び Oil Red O を含む脂質合成測定キットは倉敷紡績から購入した。Penicillin (10,000 units)-streptomycin (10mg/ml) 混合液は Sigma-Aldrich から、2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) は Biological industries (Beth-Haemek, Israel) から購入した。その他の試薬は商業的供給源から購入した。

1.2. ハムスター皮脂腺細胞の培養法

ハムスター初代培養細胞 (Ha-SE、倉敷紡績) は、10 ng/mL のヒト組み換え型上皮成長因子 (hEGF)、2% (v/v) のヒト血清 (HS) 及び 8% (v/v) の非働化牛胎児血清 (FBS) を含有する皮脂腺細胞増殖用培地に penicillin-streptomycin 混液を添加した後、25 cm² 又は 75 cm² 培養フラスコで維持培養した。培地は 2 日に一度の頻度で交換した。継代は HEPES 緩衝液で細胞を洗浄し、トリプシンで細胞を剥離した後、トリプシンを中和し、適当な細胞数になるよう新しい培養フラスコへ細胞を播種し再び培養した。

1.3. 細胞毒性確認法

5~6 代目の Ha-SE 細胞を 96 ウェルのマイクロプレートに播種し (2×10⁴/well)、皮脂腺細胞増殖用培地で前培養してコンフルエント状態で実験に用いた。ウェルに被験物質としてボクソク (10 及び 30 µg/mL、溶媒:0.33% DMSO) 又は pentagalloyl glucose (10, 30 µmol/L、溶媒:0.1% DMSO)、細胞障害陽性対照として Triton X-100 (最終濃度 0.2%) を添加し 24 時間培養した。24 時間培養における生存細胞数は、各ウェルに XTT 試薬を添加し、30~60 分間インキュベーションした後に 465/630 nm の吸光度で測定した。

1.4. 脂質合成評価法

5~6 代目の Ha-SE 細胞を 24 ウェルプレート (5×10⁴/well) 又は 96 ウェルプレートに播種し (1×10⁴/well)、皮脂腺細胞増殖用培地でコンフルエントになるまで

前培養した。その後、皮脂腺細胞分化誘導用培地（8% FBS、2% HS 及び penicillin-streptomycin 混液含有）に分化誘導剤としてテストステロン又はインスリンを添加した培地を 2 日に 1 度の頻度で交換しながら培養した。被験物質は分化誘導剤の添加と同時に細胞に処置した。分化誘導開始後 8 日目に皮脂合成量及び生存細胞数を測定した。合成された皮脂量は皮脂測定キットを用いて測定した。即ち、皮脂腺細胞は Oil Red O で脂肪染色した後、その脂質量（A）を 300 μ L の 100% isopropanol で抽出し、520 nm の吸光度にて定量した。細胞量（B）はウェルに XTT 試薬を加え 30 分間インキュベーションした後、465/630 nm の吸光度で測定した（B）。脂質合成（Lipogenesis）は、次式に従い細胞量あたりの脂質量として算出した。

$$\text{Lipogenesis} = (A) / (B)$$

また、皮脂腺細胞の形態は Oil Red O 染色後、直ちに Biorevo BZ-9000 顕微鏡（KEYENCE, Osaka, Japan）を用いて撮影した。

1.5. 統計学的解析

全ての測定値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計上の有意差は Dunnett's test 又は Student's *t*-test にて評価した。いずれも $P < 0.05$ の場合に統計的有意差があると判定した。

2. 実験結果

2.1. ボクソク及び pentagalloyl glucose の皮脂腺細胞に対する作用

第1節では、10及び30 µg/mLのボクソク、10及び30 µmol/L濃度の pentagalloyl glucose が5αリダクターゼ阻害作用を示した。本節でこの有効濃度における皮脂合成抑制作用を検証するに先立ち、これらの濃度が培養皮脂腺細胞に対し障害性を持つか否かを評価した(図15)。本実験の基準となる皮脂腺細胞の生存吸光度(コントロール)は細胞障害誘発剤である Triton X-100の添加により完全に消失した。しかし、ボクソク及び pentagalloyl glucose は、いずれの濃度を添加してもそのような細胞障害は認められなかった。この結果から、以降の皮脂合成抑制実験は、細胞障害性のなかったこれらの濃度を用いて評価した。

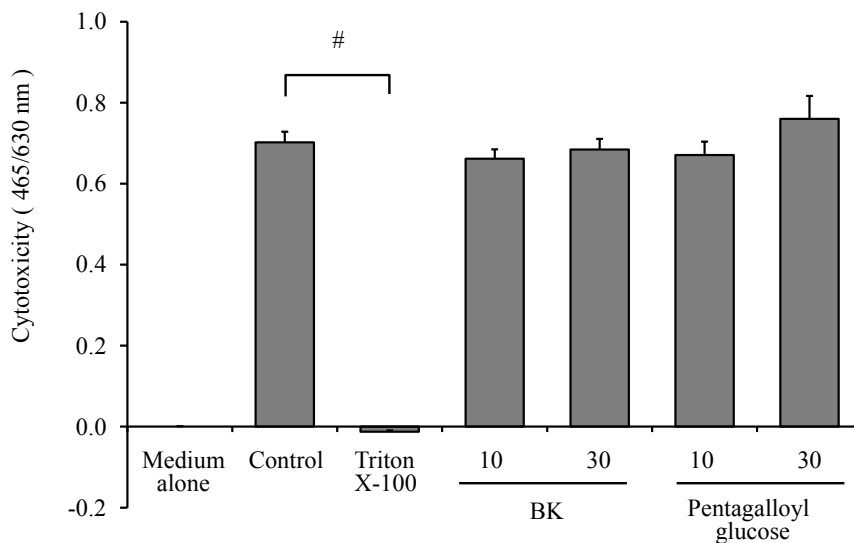


図15. ボクソク及び pentagalloyl glucose の皮脂腺細胞に対する細胞障害性の検討

ハムスター皮脂腺細胞 (Ha-SE) の生存はボクソク (BK : 10 及び 30 µg/mL)、pentagalloyl glucose (10 及び 30 µmol/L)、0.2% triton X-100 又は vehicle (Control : 0.1–0.33% DMSO) と共に 24 時間培養した後、XTT 試薬を用いて測定した。各値は平均値±標準誤差 (n = 3) で示した。#*P*<0.05 vs control (Student's *t*-test)。

2.2. ボクソクの皮脂合成抑制作用

ボクソク (10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の皮脂合成抑制作用はテストステロン又はインスリンによる培養皮脂細胞の皮脂合成増強に対して検討した。図 16 に 8 日間培養した各処置群における皮脂腺細胞の脂肪染色 (Oil Red O 染色) 像を示す。コントロール群 (a 及び拡大像 A) と比較し、テストステロン (b, B) 及びインスリン (d, D) 添加群では赤く染まる脂肪細胞が著しく増加し、個々の細胞は脂肪滴で膨満していた。ボクソク (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、これらのテストステロン (c, C) 及びインスリン (e, E) 誘発脂肪滴の増加又は膨満を抑制ないし抑制傾向を示しているように見えた。

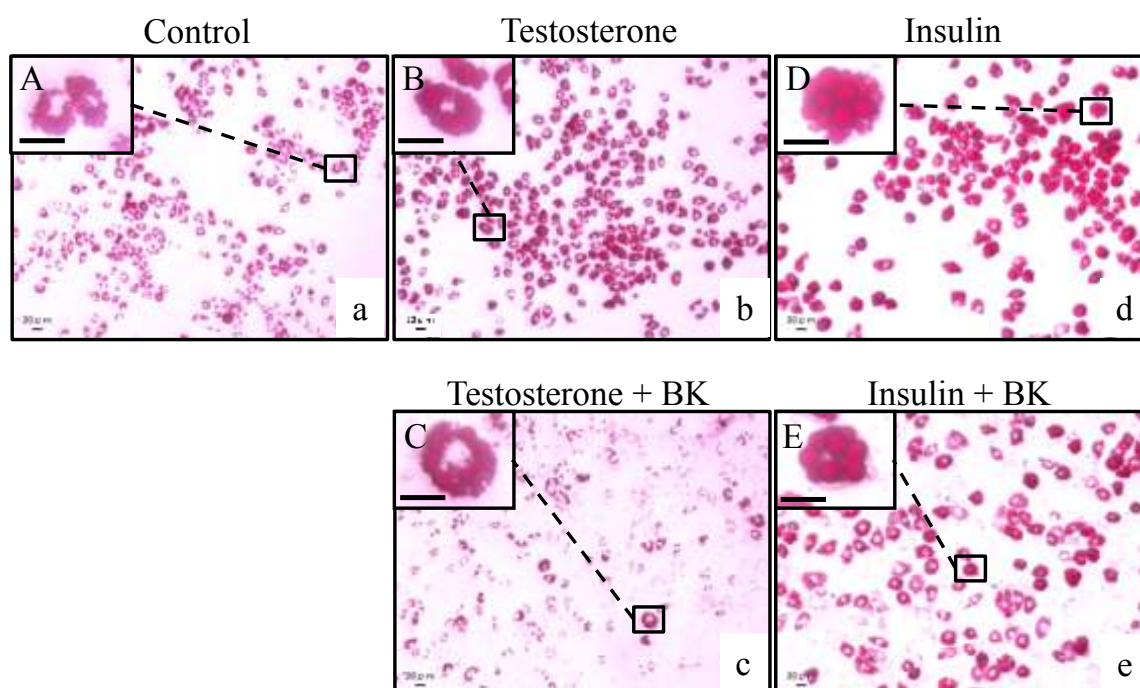


図 16. 培養皮脂腺細胞に対するボクソクの作用：脂肪染色画像

ハムスター皮脂腺細胞 (Ha-SE) は、テストステロン (testosterone : 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、testosterone + ボクソク (BK : 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 又はインスリン (insulin : 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、insulin + BK と共に 8 日間培養した後、脂肪染色 (Oil Red O 染色) した。各写真の左上には脂肪細胞の拡大像を示した。スケールバー : 20 μm 。

そこで、ボクソクの皮脂合成抑制効果を明確にするため皮脂合成の定量を行った (図 17)。テストステロン添加による皮脂合成は (図 17A)、無添加コントロールに比べ有意に増加した。ボクソク (10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、このテストステロン誘発皮脂合成を濃度依存的に抑制した。

一方、インスリン添加による皮脂合成も (図 17B)、その無添加コントロールに比べ有意に増加した。ボクソク (10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、このインスリン誘発皮脂合成も濃度依存的に抑制した。

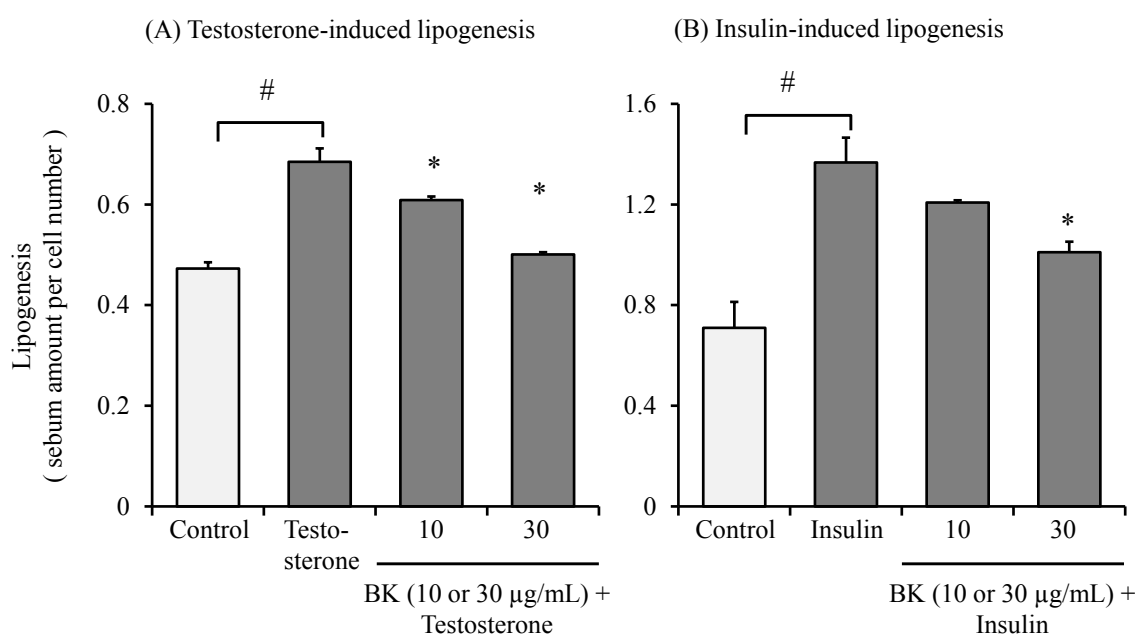


図 17. 皮脂腺細胞のテストステロン及びインスリン誘発皮脂合成に対するボクソクの抑制作用
 ハムスター皮脂腺細胞 (Ha-SE) は、テストステロン (testosterone : 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、testosterone + ボクソク (BK : 10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 又はインスリン (insulin : 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、insulin + BK (10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と共に 8 日間培養した後、皮脂量を脂質測定キットで定量した。細胞量あたりの脂質量として示した各群の脂質合成値 (Lipogenesis) は、平均 \pm 標準誤差 (n = 3) で示した。[#] $P < 0.05$ vs vehicle control (Student's *t*-test)。^{*} $P < 0.05$ vs testosterone or insulin (Dunnett's test)。

2.3. Pentagalloyl glucose の皮脂合成抑制作用

図18にはボクソク成分の中で最も強い5 α リダクターゼ阻害作用を示した pentagalloyl glucose (10、30 $\mu\text{mol/L}$) のテストステロン (図18A) 及びインスリン誘発 (図18B) 皮脂合成に対する作用を示す。皮脂合成は、テストステロン又はインスリン添加により無添加コントロールに対し有意に増加した。Pentagalloyl glucose (10、30 $\mu\text{mol/L}$) はボクソクと同様、テストステロン及びインスリン誘発皮脂合成を濃度依存的に有意に抑制した。

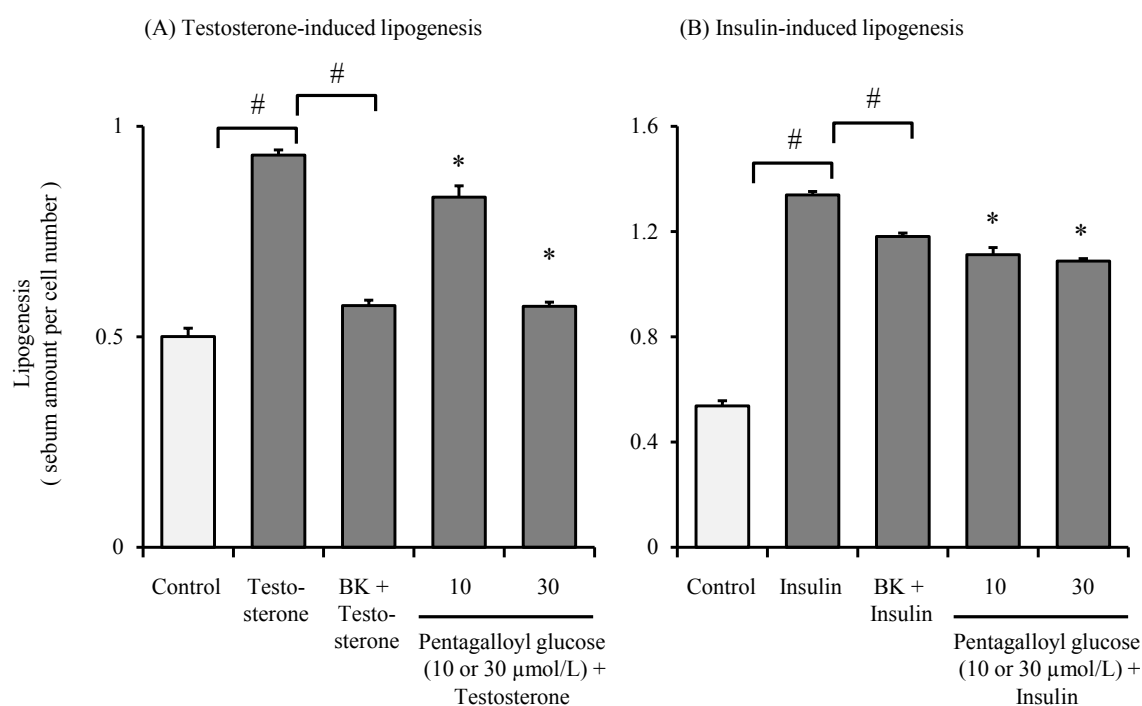


図18. Pentagalloyl glucoseの皮脂合成抑制作用

ハムスター皮脂腺細胞 (Ha-SE) は、テストステロン (testosterone : 10 $\mu\text{mol/L}$)、testosterone + pentagalloyl glucose (10 及び 30 $\mu\text{mol/L}$) 又はインスリン (insulin : 10 $\mu\text{g/mL}$)、insulin + pentagalloyl glucose (10 及び 30 $\mu\text{mol/L}$) BK (10 及び 30 $\mu\text{g/mL}$) と共に 8 日間培養した後、皮脂量を脂質測定キットで定量した。細胞量あたりの脂質量として示した各群の脂質合成値 (Lipogenesis) は、平均 \pm 標準誤差 (n = 3) で示した。[#] $P < 0.05$ vs testosterone or insulin (Student's *t*-test)。^{*} $P < 0.05$ vs testosterone or insulin (Dunnett's test)。

第3節

抗酸化作用

前節（第1及び第2節）では、面皰前段階の誘発要因と考えられているテストステロンについて、十味敗毒湯の構成生薬・ボクソクが活性体 DHT を産生する 5 α リダクターゼ阻害を介し皮脂合成を抑制すること、及びペンタガロイルグルコース（pentagalloyl glucose）を代表とするいくつかの成分がその作用を担うことを示唆した。

本節では過剰な DHT 産生及びアクネ菌増殖によって進行する次のステップ「炎症」に対する十味敗毒湯の作用について検討した。アクネ菌などの細菌感染に対し、好中球は生体反応として細菌を貪食・殺傷するために活性酸素種（reactive oxygen species : ROS、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素など）や活性窒素種（reactive nitrogen species : RNS、一酸化窒素 NO やペルオキシナイトライト ONOO⁻などの活性化された酸化窒素分子）を大量に産生する。それらの細胞外への過剰放出は周辺の健常な細胞にダメージを与え、更に大量に死滅した好中球や老廃物は二次的な炎症を引き起こす^{62,63}。

十味敗毒湯は、これまでに過酸化水素依存的な酸化反応及びスーパーオキシド生成反応を濃度依存的に抑制すること^{43,64}、更に、その抗酸化反応には構成生薬のカンゾウ、ボクソク及びケイガイ由来のフラボノイドが関与していることが報告されている⁶⁴。しかし、生体内において、経口的に摂取されたフラボノイドは、そのほとんどが小腸でグルクロン酸抱合を受けて血中に移行する⁶⁵⁻⁶⁷。一般的に化合物の薬理活性は抱合体化により減弱すると考えられているが、フラボノイドは、抱合を受ける分子内官能基の位置によってその程度が異なると云われている^{68,69}。

そこで、本節では入手できた5種のカンゾウ成分及び1種のケイガイ成分のグルクロン酸抱合体について、活性酸素（過酸化水素）及び活性窒素（一酸化窒素）の酸化反応又は生成に対する作用を検討した。

また、十味敗毒湯含有成分の中で血中移行性が高いと報告されているカンゾウ成分 glycyrrhizic acid の代謝物 glycyrrhetic acid⁷⁰及びボウフウ成分の cimifugin⁷¹及びボクソク成分 gallic acid の代謝物 4-O-methylgallic acid⁷²についても同様に検討した。

1. 実験方法

1.1. 被験物質及び試薬

1.1.1. 被験物質

本実験には十味敗毒湯由来成分及び抱合体の計13種類の化合物を用いた(図19)。その内、glycyrrhetic acid、cimifugin、isoliquiritigenin、liquiritigenin 4'-*O*-glucuronide (LQG-4'G)、liquiritigenin 7-*O*-glucuronide (LQG-7G)、isoliquiritigenin 2'-*O*-glucuronide (ILQG-2'G)及びisoliquiritigenin 4'-*O*-glucuronide (ILQG-4'G)は、株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部から入手した。また、Liquiritigenin、genistein及びhesperetinは和光純薬工業、genistein 7-*O*-glucuronide (GEN-7G)及び hesperetin 7-*O*-glucuronide (HPT-7G)はToronto Research Chemical Industries (Toronto, ON)、4-*O*-methylgallic acidはChromaDex (Irvine, CA)からそれぞれ購入した。

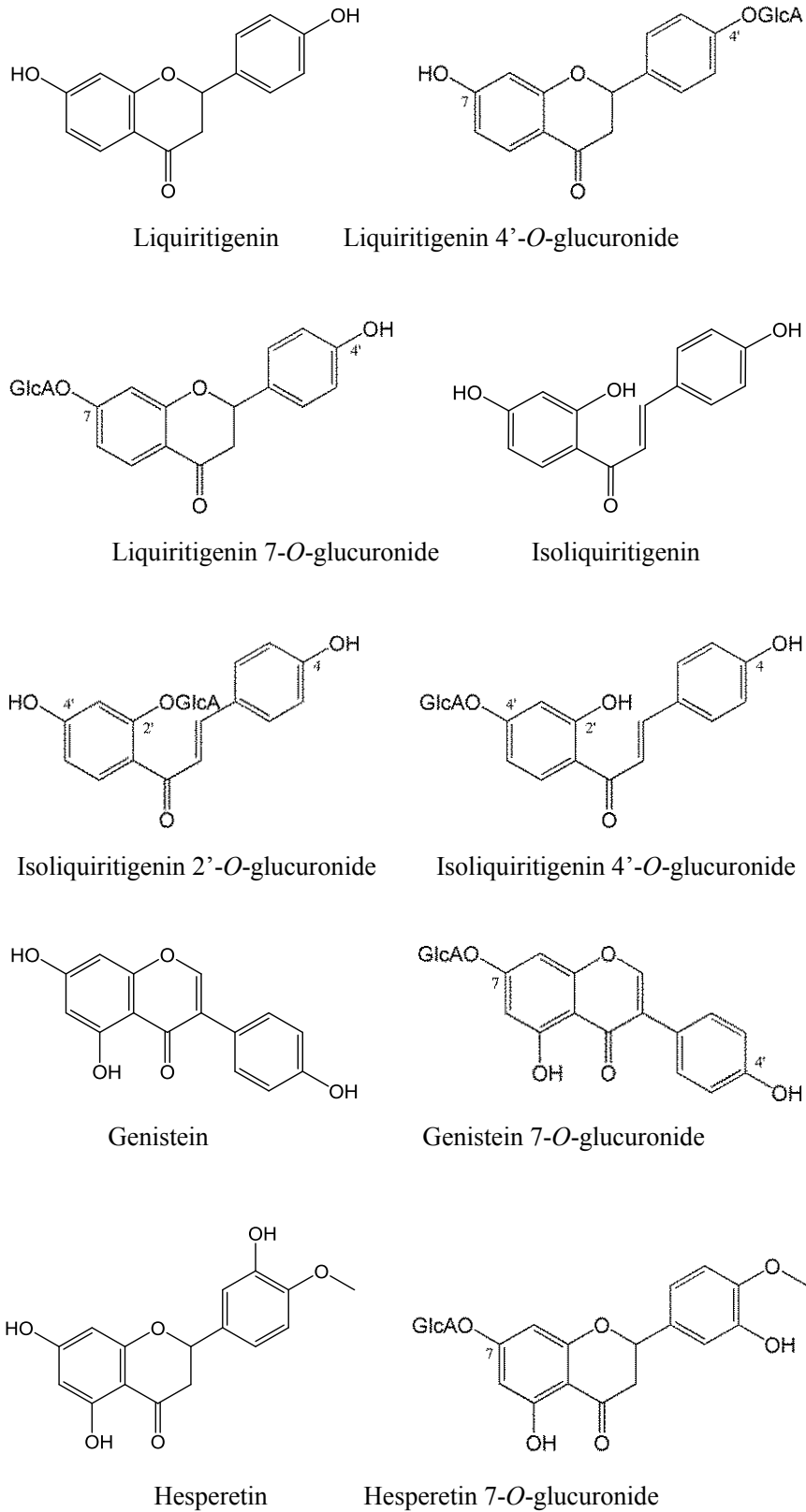


図 19-1. 抗酸化 (抗 ROS 及び抗 RNS) 作用の検討に使用された化合物の構造式
GlcA: Glucuronic acid.

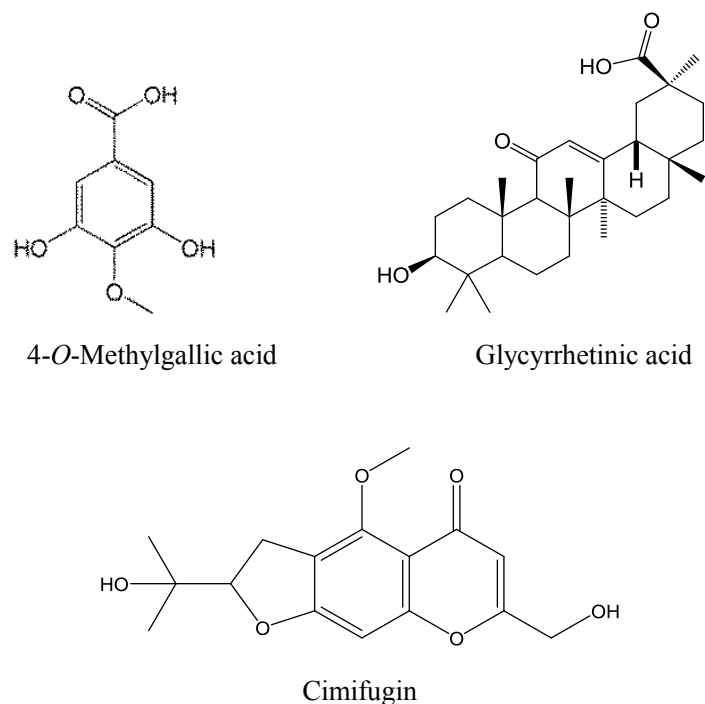


図 19-2. 抗酸化（抗 ROS 及び抗 RNS）作用の検討に使用された化合物の構造式

1.1.2. 試薬

ROS 及び RNS に対する抗酸化作用の検討に用いた OxiSelect *In vitro* ROS/RNS Assay kit は、Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA) から購入した。その他の試薬は、商業的供給源から購入した。

1.2. 抗酸化反応試験

1.2.1. ROS（過酸化水素）酸化反応

ROS 酸化反応に対する被験物質の抗酸化作用は、OxiSelect *In vitro* ROS/RNS Assay kit を用いて 96 ウェルプレートで評価した。ウェルあたり 80 μL の PBS、10 μL の被験試料標準溶液（終濃度 0.1、0.3、1、3、10 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ ）及び 10 μL の過酸化水素（終濃度 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ）を加え、室温で 5 分間反応させた後に dichlorodihydrofluorescein DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ) を蛍光プローブとして加えた。その後、さらに室温・遮光条件下で 15 分間静置反応させ、過酸化水素依存的に生成された 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) を励起波長 480 nm/蛍光波長

530nm で蛍光測定器 (Infinite M200; Tecan, Wako Pure Chemicals) を用いて測定した。

被験物質の ROS 抑制率は、次式に従って算出した。

$$\text{ROS 抑制率(\%)} = [1 - (\text{sample RFU}^a - \text{base RFU}^b) / (\text{control RFU}^c - \text{base RFU}^b)] \times 100$$

この式で、RFU は反応液の相対蛍光ユニット (relative fluorescent unit)、a は過酸化水素と被験物質に DCFH-DiOxyQ を加えた RFU 値、b は DCFH-DiOxyQ 単独添加時の RFU 値、c は過酸化水素に DCFH-DiOxyQ を加えた RFU 値を示す。

1.2.2. RNS (一酸化窒素) 酸化反応

RNS 酸化反応に対する被験物質の抗酸化作用は、(±)-(E)-4-Ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamide (NOR3) を一酸化窒素ドナーとして用いて 96 ウェルプレートで評価した。即ち、ウェルあたり 80 μL の PBS (pH 7.4)、10 μL の被験試料標準溶液 (終濃度 0.1、0.3、1、3、10 及び 30 μmol/L) 及び 10 μL の NOR3 (終濃度 30 μmol/L)、37°C で 150 分間反応させた。反応液の 100 μL 量に同量のグリース試薬 (1% sulfanilamide 及び 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride を含む 5% H₃PO₄) を加え室温で 10 分間インキュベーションした。グリース反応により NOR3 から生じたアゾ塩は 540 nm の吸光度で測定した。

2. 実験結果

2.1. グルクロン酸抱合体、代謝物及び成分の抗酸化作用

表 2 には、5 種類のカンゾウ成分のグルクロン酸抱合体 (GEN-7G、LQG-4'G、LQG-7G、ILQG-2'G、ILQG-4'G) 及び 1 種のケイガイ成分抱合体 (HPT-7G) 及びボクソク成分 gallic acid の代謝物 4-O-methylgallic acid、カンゾウ成分 glycyrrhizic acid の代謝物 glycyrrhetic acid 及びボウフウ成分 cimifugin の抗酸化 (抗 ROS 及び抗 RNS) 作用をそれぞれの IC₅₀ 値で示した。抗 ROS 作用は、5 種類のカンゾウ成分抱合体の内、LQG-4'G を除く 4 種 (GEN-7G、LQG-7G、ILQG-2'G、ILQG-4'G) に認められ、それぞれの IC₅₀ 値は、0.638、0.765、0.704 及び 0.691 μg/mL を示した。また、ケイガイ成分抱合体である HPT-7G にも抗 ROS 作用が認められた (IC₅₀ 値: 4.27 μg/mL)。しかし、4-O-methylgallic acid、glycyrrhetic acid 及び cimifugin には

抗 ROS 作用は全く認められなかった。

一方、抗 RNS 作用は、4-*O*-methylgallic acid で認められたのみで (IC₅₀ 値 : 3.59 μg/mL)、測定した他の化合物及びグルクロン酸抱合体には全く認められなかった。

表 2. 十味敗毒湯由来成分及びその代謝物 (抱合体) の抗酸化活性

	Antioxidant activity, IC ₅₀ (μg/mL)	
	Hydrogen peroxide	Nitric oxide
グルクロン酸抱合体		
カンゾウ成分グルクロン酸抱合体		
Genistein 7- <i>O</i> -glucuronide	0.638	n.d.
Liquiritigenin 4'- <i>O</i> -glucuronide	n.d.	n.d.
Liquiritigenin 7- <i>O</i> -glucuronide	0.765	n.d.
Isoliquiritigenin 2'- <i>O</i> -glucuronide	0.704	n.d.
Isoliquiritigenin 4'- <i>O</i> -glucuronide	0.691	n.d.
ケイガイ成分グルクロン酸抱合体		
Hesperetin 7- <i>O</i> -glucuronide	4.27	n.d.
非抱合体		
ボクソク由来代謝成分		
4- <i>O</i> -Methylgallic acid	n.d.	3.59
カンゾウ由来代謝成分		
Glycyrrhetic acid	n.d.	n.d.
ボウフウ成分		
Cimifugin	n.d.	n.d.

各 IC₅₀ 値 (μg/mL) は、0.1、0.3、1、3、10 及び 30 μmol/L 濃度の被験物質の抗酸化活性曲線 (n = 3) から計算した。n.d.は IC₅₀ 値算出不可を意味する。

2.2. アグリコン及びグルクロン酸抱合体の抗 ROS 活性の比較

図 20 は、表 2 で抗 ROS 活性を示したフラボノイド-グルクロン酸抱合体とそのアグリコンの活性を同様の方法を用いて測定・比較した結果を示す。

Liquiritigenin の抗 ROS 活性は、7-*O*-位がグルクロン酸抱合 (LQG-7G) されてもその活性は同等に維持された。しかし、4'-*O*-位が抱合 (LQG-4'G) されると、その活性はほぼ完全に消失した (図 20A)。

Isoliquiritigenin は、2'-*O*- (ILQG-2'G) 又は 4'-*O*-位 (ILQG-4'G) がグルクロン酸抱合されても抗 ROS 活性は、全く同等に維持されていた (図 20B)。

Genistein については、今回は GEN-7G との比較しかできないが、アグリコンとグルクロン酸抱合体の両方で抗 ROS 活性は同等であった (図 20C)。

Hesperetin の抗 ROS 活性は、7-*O*-位がグルクロン酸抱合 (HPT-7G) されることにより、アグリコンでの活性が部分的に失活した (図 20D)。

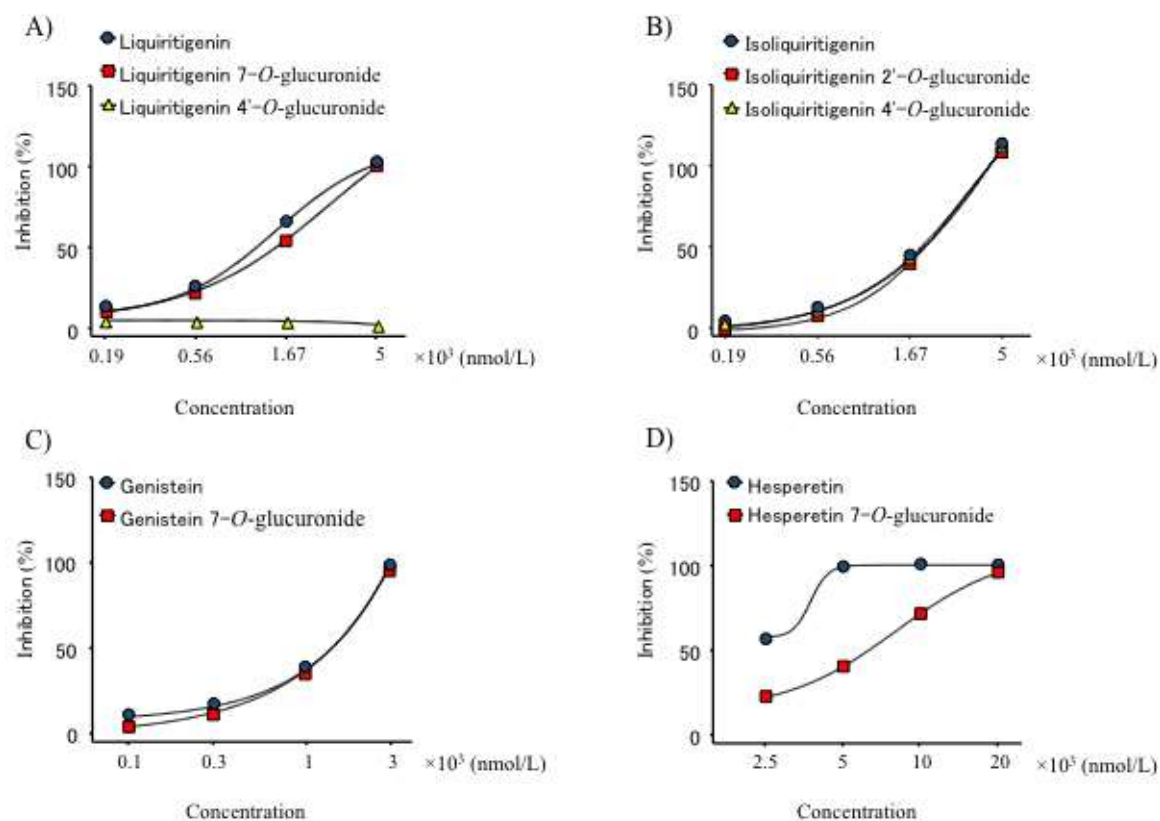


図 20. フラボノイド成分とそのグルクロン酸抱合体の抗酸化活性比較

ROS (過酸化水素) に対する抗酸化作用は OxiSelect *In vitro* ROS/RNS Assay kit を用いて測定した。各被験物質は、各図の下に示したモル濃度範囲で比較した。各値 (抗酸化率%) は、平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示した。

第4節

マクロファージ集簇促進作用

一般に細菌感染による炎症が生じた場合、炎症部位からケモカイン（白血球走化作用を示すサイトカイン）が産生・放出される。ケモカインにはいくつかの種類が存在し、好中球走化性因子や単球走化性因子などが知られている⁷³⁾。これらケモカインにより病変部に遊走された好中球や単球（マクロファージの前駆体）は、菌を排除する。好中球は、貪食能が非常に強いが寿命が短いため、炎症の終息と組織修復には、長く組織に生存できる組織マクロファージが重要な役割を担う。即ち、好中球は菌を貪食するとアポトーシスを起こし、eat-me signal を細胞表面に発現し、マクロファージに貪食され、組織が修復される⁷⁴⁾。

十味敗毒湯はこれまでに好中球の細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることにより、好中球遊走性を促進し貪食能機能を活性化する可能性が示唆されている⁵⁾。一方、十味敗毒湯のマクロファージに対する作用はこれまで報告されていなかったが、第1章のアクネ菌注入耳介の病理組織学的解析において、耳介腫脹の軽減に伴う菌塊周囲のマクロファージ集簇促進作用を認めたことから、十味敗毒湯がマクロファージ活性化作用を有する可能性が示唆された。本節ではその可能性を明らかにするため、白血球遊走ケモカイン活性及びマクロファージ機能に及ぼす十味敗毒湯の作用及び活性成分について検討した。

1. 実験方法

1.1. 被験物質及び試薬

1.1.1. 被験物質

十味敗毒湯は、第1章（第1節、実験方法 1.1. 被験物質の項参照）と同様、株式会社ツムラから入手した。十味敗毒湯由来成分の liquiritigenin、isoliquiritin、glycyrrhetic acid 及び cimifugin は、株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部から入手した。Liquiritin 及び 4-O-methylgallic acid は、和光純薬工業（Osaka, Japan）から購入した。これら成分の化学構造を図 21 に示す。

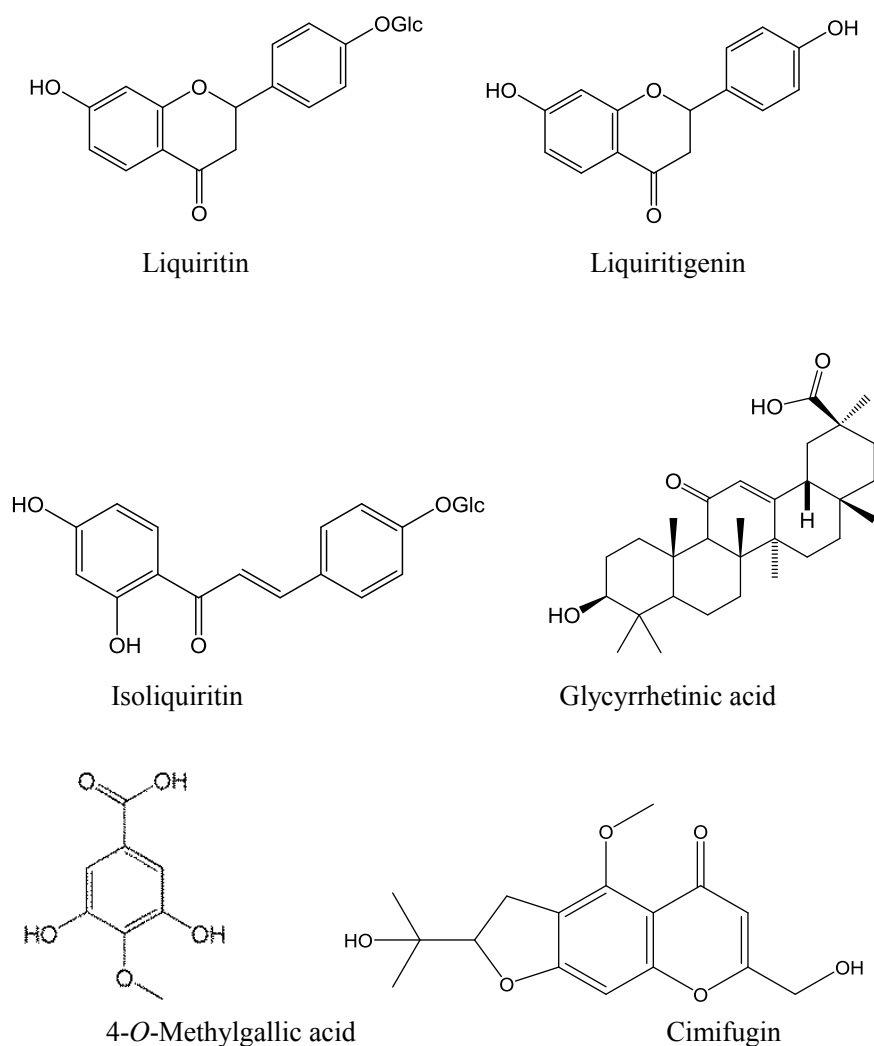


図 21. マクロファージ機能への作用を検討した化合物の構造式

Glc: Glucose.

1.1.2. 試薬

コンプリートプロテアーゼインヒビターカクテルは Roche Applied Science (Indianapolis, IN)、サイトカイン測定 ELISA キットは R&D Biosystems (Minneapolis, MN)、プロテインアッセイキットは Bio-Rad (Hercules, CA)、ヒト IFN- γ は PeproTech (Rocky Hill, NJ)、FITC 標識ヒト CD86 抗体 (clone: 2331) は BD Biosciences (San Diego, CA)、PE 標識ヒト CD192 (clone: K036C2) は Biolegend (San Diego, CA)、蛍光黄緑カルボキシル粒子 (2.0 μm) は Polysciences (Eppelheim, Germany) からそれぞれ購入した。

1.2. 白血球遊走ケモカインの測定

ラット白血球遊走ケモカイン (MCP-1 及び CINC-1) に対する十味敗毒湯の作用は、第 1 章の実験における対照群、アクネ菌群、十味敗毒湯群 (0.5 g/kg) およびプレドニゾロン (PDN) 群のアクネ菌注入 2 及び 24 時間後の耳介を用いて検討した (第 1 章、第 1 節、実験方法 1.3.2 の項参照)。即ち、各動物の耳介の一部 (8.0 mm 径) を生検トレパンでパンチアウトし、湿重量を測定した後、組織中の MCP-1 及び CINC-1 を ELISA キットのマニュアルに従い測定した。その概略を以下に示す。重量測定後の耳介パンチアウト組織は、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有した 0.5 mL の冷 PBS と一緒にホモジナイズした後、4°C で 5 分間遠心分離 (16,000 \times g) した。回収した上清はケモカイン測定用検体として測定時まで -80°C で保存した。調製したホモジネートを予め捕捉抗体がコーティングしてある 96 ウェルプレートに加え、2 時間インキュベーションした後 ELISA キットの wash buffer で 5 回洗浄した。検出抗体 (horseradish peroxidase conjugate) を加え 2 時間インキュベーションし wash buffer で 5 回洗浄した。発色基質を添加し 30 分インキュベーションした。反応停止液を加え 450 nm における吸光度を測定した。総タンパク量は、ウシ血清アルブミンを標準として、ローリー法により定量した。各サイトカイン量は、タンパク量当たりの相対値として補正表記した。

1.3. マクロファージ活性化評価法

マクロファージの活性化は、ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 (ATCC, Manassas, VA) を分化する培養系でマクロファージの活性化マーカー (CD86 及び CD192) 発現を解析することにより評価した。THP-1 細胞の培養には、10%非働化牛胎児

血清、2 mmol/L L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 及び 10 mmol/L HEPES を含む RPMI 1640 培地を用いた。細胞 (2×10^4 cells/well) は 96 ウェルプレートに播種し、10 ng/mL ヒト IFN- γ (マクロファージ活性化因子) の存在下で各被験物質 (30 µmol/L) を加え、2 日間 CO₂ インキュベーター (37°C、5%CO₂) で培養した。細胞を回収し、それに FITC 標識ヒト CD86 抗体又は PE 標識ヒト CD192 を加え、20 分間氷上でインキュベーションした。抗体標識細胞は、0.1% BSA 及び 0.05% NaN₃ 含有 PBS で洗浄後、4°C の 4%パラホルムアルデヒド (pH 7.4) を含むリン酸緩衝液中に 15 分間静置した。細胞表面に発現する CD86 及び CD192 は、FACScalibur フローサイトメーター及び CellQuest Pro ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。CD86 及び CD192 の発現量は、未処理細胞の蛍光強度を差し引いた平均蛍光強度 (MFI) で示した。各抗体の CD86 又は CD192 に対する特異的結合性は、FITC 又は PE 標識のアイソタイプ対照抗体 (BD Biosciences) を用いて確認した。

1.4. マクロファージ食食機能測定

THP-1 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 ウェル培養プレートに播種し、ヒト IFN- γ (10 ng/mL) の存在又は非存在下で十味敗毒湯由来成分 (30 µmol/L) を加え、CO₂ インキュベーター中 3 日間培養した。培養上清を取り除いた後、2.0 µm の蛍光黄緑カルボキシル粒子 (FITC-ビーズ; Polysciences, Eppelheim, Germany: 終濃度 6×10^6 particles/70 µL/well) を含む培養培地に置換し、静かに混和した。CO₂ インキュベーター内で 2 時間放置後、細胞を回収し、上述の洗浄液で遠心洗浄後、4°C の 4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 15 分間静置した。細胞に取り込まれた FITC-ビーズは、FACScalibur フローサイトメーター及び CellQuest Pro ソフトウェアを用いて解析した。食食機能の活性は、全細胞あたりの FITC 陽性細胞の百分率 (食食細胞の割合) と、全細胞あたりの平均蛍光強度 (MFI: 食食率) で示した。

1.5. 統計学的解析

全ての値は、平均値±標準誤差で示した。統計的有意性は Dunnett's multiple comparisons test 又は unpaired Student's *t*-test によって評価した。 $P < 0.05$ の場合に、統計的な有意差があると判定した。

2. 実験結果

2.1. 白血球遊走ケモカインに対する十味敗毒湯の作用

第1章実験の対照群、アクネ菌群、十味敗毒湯群 (0.5 g/kg) およびプレドニゾン (PDN) 群のアクネ菌注入 2 及び 24 時間後の耳介を用いて測定したラット好中球走化性因子 CINC-1 及び単球 (マクロファージ) 走化因子 MCP-1 の定量結果を図 22 に示す。

アクネ菌群の CINC-1 発現は、アクネ菌投与 2 時間後で有意に増加した。この増加は十味敗毒湯 (JHT) 又はプレドニゾン (PDN) を併用しても有意な変化は認められなかった。一方、24 時間後でもアクネ菌投与群では CINC-1 発現の増加が認められた。十味敗毒湯はこの増加に対しても有意な影響を与えなかったが、PDN 群ではアクネ菌群以上の増加が認められた (図 22A)。

アクネ菌群の MCP-1 発現はアクネ菌投与 2 時間後で有意に増加した。十味敗毒湯はこの増加に対し有意な作用を示さなかったが、PDN はこの増加を有意に抑制した。24 時間後では、アクネ菌群の MCP-1 発現は 2 時間目と比べ低下したが、まだ非炎症群との間に有意な増加が認められた。十味敗毒湯及び PDN 群は、この増加に対し有意な作用を示さなかった (図 22B)。

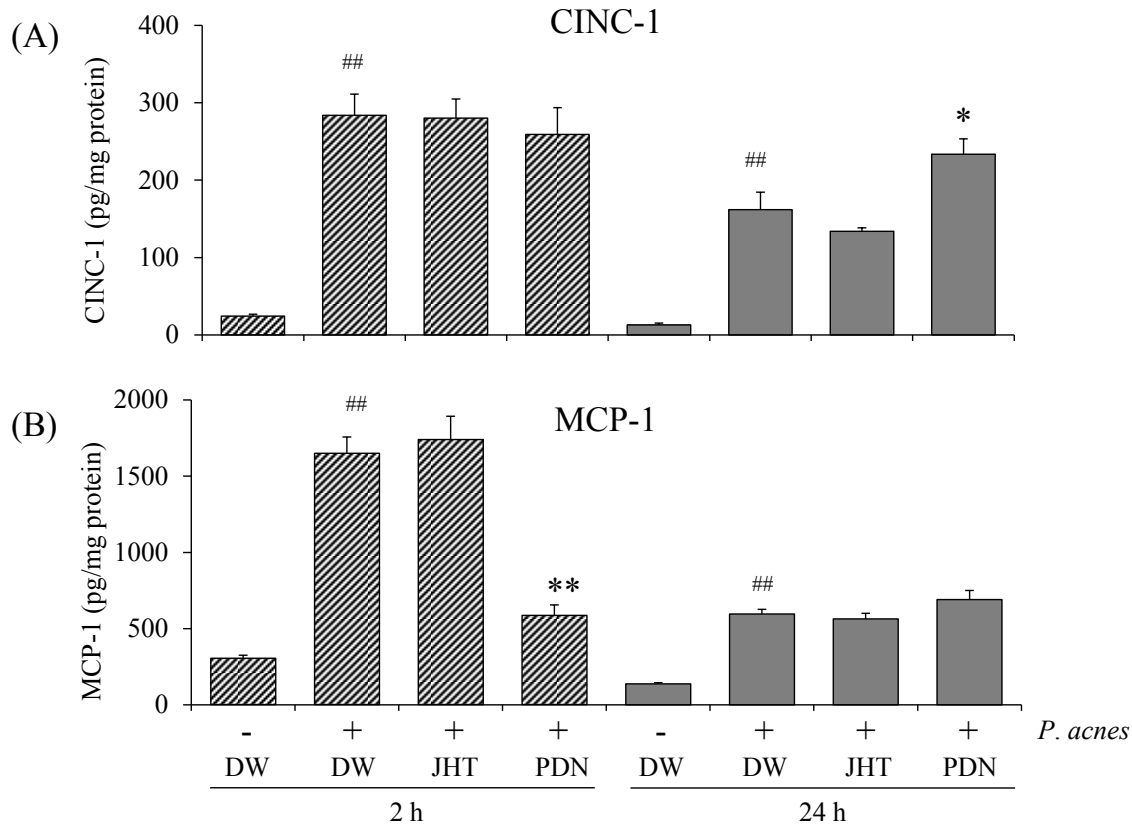


図 22. 白血球遊走ケモカインに対する十味敗毒湯の作用

ラット好中球走化性因子 CINC-1 及び単球（マクロファージ）走化因子 MCP-1 は第 1 章の DW 投与の非炎症の対照群、アクネ菌群、十味敗毒湯群（0.5 g/kg）及びプレドニゾロン（PDN）群の耳介を用いて測定した。アクネ菌注入後 2 時間（N = 10）及び 24 時間（N = 4-5）における各群の CINC-1 及び MCP-1 値は、平均値±標準誤差で示した。## $P < 0.01$ vs. saline + DW 群 (Student's t -test)、* $P < 0.05$ 及び ** $P < 0.01$ vs. *P. acnes* + DW 群 (Dunnnett's test)。

2.2. マクロファージ機能に対する十味敗毒湯由来成分の作用

2.2.1. マクロファージの活性化マーカーに対する作用

ヒト単球系細胞（THP-1 細胞）からマクロファージ分化に及ぼす十味敗毒湯由来成分の作用を表 3 に示した。THP-1 細胞は IFN- γ 刺激によりマクロファージ活性化マーカー（CD86：マクロファージ分化マーカー及び CD192：MCP-1 受容体マーカー）の発現が有意に増加した。また、十味敗毒湯由来 6 成分（liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin、glycyrrhethinic acid、cimifugin 及び 4-*O*-methylgallic acid）の内、liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin 及び cimifugin の 4 成分は、この IFN- γ 誘発 CD86 及び CD192 発現の増加を有意に増強した。

2.2.2. マクロファージ貪食能に対する作用

THP-1 細胞の貪食能に及ぼす十味敗毒湯成分の作用について、前述したマクロファージ活性化マーカーと一緒に表 3 に示した。IFN- γ 添加によって、FITC-ビーズ貪食能 (% FITC cells 及び MFI) は非添加に比べ有意に増加した。マクロファージ活性化マーカー発現を増強した 4 成分 (liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin 及び cimifugin) の内、liquiritigenin 及び isoliquiritin は、この貪食能の増加を更に増強した。

表 3. マクロファージ機能に対する十味敗毒湯関連成分の作用

Test sample	IFN- γ (10 ng/mL)	Expression of activation marker		Phagocytosis	
		CD86	CD192	% of FITC ⁺ cells	MFI
-	-	0.08± 0.06	0.19± 0.16	14.43± 1.08	3.16± 0.17
-	+	1.70± 0.07 ^{###}	1.57± 0.05 ^{###}	20.86± 1.05 [#]	4.76± 0.28 ^{###}
Liquiritin	+	3.28± 0.10 ^{**}	3.76± 0.05 ^{**}	24.67± 1.24	6.07± 0.41
Liquiritigenin	+	3.47± 0.12 ^{**}	3.80± 0.19 ^{**}	31.01± 3.06 ^{**}	7.88± 0.93 ^{**}
Isoliquiritin	+	5.27± 0.17 ^{**}	4.21± 0.15 ^{**}	42.42± 1.24 ^{**}	12.94± 0.71 ^{**}
Glycyrrhetic acid	+	1.84± 0.13	2.24± 0.12	18.00± 1.45	4.18± 0.31
Cimifugin	+	3.82± 0.43 ^{**}	4.84± 0.65 ^{**}	19.05± 0.59	4.28± 0.10
4-O-Methylgallic acid	+	1.18± 0.10	1.18± 0.12	18.91± 1.36	4.27± 0.31

ヒト単球系細胞(THP-1 細胞)を 96 ウェル培養プレートに 1 又は 2×10^4 cells/well で播種し、10 ng/mL ヒト IFN- γ と各被験物質 (30 μ mol/L) を加え 2~3 日間培養した。活性化マーカー発現解析では、2 日間の培養後、CD86 又は CD192 特異的な蛍光標識抗体で染色し、細胞上のそれらの発現はフローサイトメーターで測定した。データは、平均蛍光強度 (MFI) の測定値から未処理細胞の MFI (CD86 : 7.29、CD192 : 11.60) を差し引いて表記した。貪食能の確認試験では、3 日間の培養後に上清を除外し、FITC-ビーズ (6×10^6 beads/well) を含む培養培地に置換し、さらに 2 時間培養した。細胞を回収し FITC 陽性細胞の割合と MFI を測定した。試験は n = 3 で行い、全データは平均値±標準誤差で示した。[#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ vs. IFN- γ 刺激なし (Student's *t*-test)、^{**} $P < 0.01$ vs. IFN- γ 単独 (Dunnett's test)。

考察

本章では、尋常性座瘡発症の前段階から非炎症性皮疹、炎症性皮疹までの各進行ステージにおける十味敗毒湯の作用を検討した。

まず、第1節では尋常性座瘡の前段階の発症因子として重要視されている男性ホルモンに対するボクソク的作用を調べた。十味敗毒湯は、これまでにテストステロンからジヒドロテストステロン (DHT) への代謝を担う 5α リダクターゼ活性を抑制することが知られており、さらに構成生薬のボクソクが活性生薬の一つとして推察されている⁴³⁾。この 5α リダクターゼには3つの亜群酵素 (5α -R1, 5α -R2 及び 5α -R3) が存在するが、ヒトの毛包や表皮では、主に 5α -R1 型が発現している⁴⁸⁻⁵¹⁾。ラットの肝ミクロソームは、ヒトとは異なり 5α -R1 型のリダクターゼが特異的に発現していることから⁷⁵⁾、本節のテストステロン代謝実験ではラット肝ミクロソームを用いた。また、肝ミクロソーム回収においては、その回収を妨げるグリコーゲン量を減少させるため、一晚絶食させたラットを用いた⁵⁷⁾。

このラット肝ミクロソームとテストステロンを反応させ TLC 分析を行ったところ、テストステロンのスポットは完全に消失し、代謝物である DHT (テストステロン→DHT) 及び A. diol (DHT→A. diol) スポットが検出された。しかし、ボクソクを併用すると、これらのスポットは完全に消失し、テストステロンのスポットだけが検出された (図 11)。ラット肝ミクロソームとの反応で DHT のみならず A. diol のスポットが認められたことは、肝ミクロソームにはテストステロンを DHT に代謝する 5α リダクターゼと DHT を A. diol に代謝するアルドケトリダクターゼが共存していることを示唆した。この DHT と A. diol の両スポットが、ボクソク添加により消失したことから、ボクソクのテストステロン減少 (DHT 産生) 抑制作用はアルドケトリダクターゼではなく 5α リダクターゼを標的とした阻害作用であることが示唆された。そこで、 5α リダクターゼ活性阻害率 (%) をテストステロン分解抑制率で評価したところ (図 13)、ボクソクに TMF-4AS-1 (5α リダクターゼ阻害剤) と同様な 5α リダクターゼ阻害作用が認められた。

ボクソクが 5α リダクターゼ阻害作用を示したことは、その中に阻害活性を担う活性成分が含まれていることを示唆する。そこで、17種のボクソク成分についてその酵素阻害作用を調べたところ、tetragalloyl glucose、pentagalloyl glucose、eugeniin、1-desgalloyl eugeniin、casuarinin、castalagin、stenophyllanin C、(-)-epicatechin gallate 及び(-)-epigallocatechin gallate の9成分に 5α リダクターゼ阻害作用が見出され(表

2)、その中でペンタガロイルグルコース (pentagalloyl glucose) が最も強い阻害成分であることが判明した。このように本節では、これまで知られていた十味敗毒湯の 5 α リダクターゼ阻害作用⁴³⁾には、少なくともボクソク成分のペンタガロイルグルコースが高い活性を持ち関与していることを新たに見出した。

一方、尋常性痤瘡患者ではテストステロン (男性ホルモン) やプロゲステロン (黄体ホルモン) が高く、逆にエストロゲン (卵胞ホルモン又は女性ホルモン) 濃度が低いことが報告されている³⁶⁾。この知見は、その予防・治療に関与するホルモンバランスには上述した男性ホルモン活性に加え、プロゲステロンやエストロゲン活性なども含まれることを示唆する。カンゾウに含まれるリクイリチゲニン (liquiritigenin) やイソリクイリチゲニン (isoliquiritigenin)⁷⁶⁾、また、ケイガイに含まれるルテオリン (luteolin) やヘスペレチン (hesperetin)^{77, 78)}にはエストロゲン様作用が知られている。このことは、これら成分を含有する十味敗毒湯にも女性ホルモン様作用を介した治療効果が期待され、今後の研究課題として挙げられる。

次いで、第2節では、5 α リダクターゼ活性阻害成分の皮脂合成抑制作用を客観的に証明するため、ボクソク及び活性成分の中で最も強い阻害作用を示したペンタガロイルグルコースに焦点を当てた。テストステロン (DHT) 誘発皮脂合成⁵⁹⁻⁶¹⁾に対する作用を5 α リダクターゼ非依存性のインスリン誘発皮脂合成⁵⁸⁾と共に検討したところ (図18)、ペンタガロイルグルコースはボクソクと同様、テストステロン及びインスリンのいずれの皮脂合成促進も有意に抑制した。このテストステロン誘発皮脂合成抑制作用は、第1節で証明した5 α リダクターゼ活性阻害を介した皮脂合成抑制作用を裏付けるものである。しかし、インスリンによる皮脂合成は、PI3K/Akt及びMAPK/ERKシグナル伝達系を介しSREBP-1発現を高めることにより促進されるもので、5 α リダクターゼの関与はない⁵⁸⁾。ボクソク及びペンタガロイルグルコースがインスリン誘発皮脂合成を抑制した結果は、この生薬と成分は5 α リダクターゼ阻害以外の皮脂合成抑制機序も持っている可能性を示唆した。その可能性の一つとして、これまでに報告されている脂肪酸合成酵素阻害作用^{57, 79)}やインスリン受容体結合抑制作用⁸⁰⁾などが推察されるが、これらに関しては今後より詳細な研究が必要である。以上、本節では十味敗毒湯の皮脂合成抑制作用にはボクソク成分のペンタガロイルグルコースが関与し、その作用は5 α リダクターゼ阻害依存的および非依存的作用の相加ないし相乗作用の関与が示唆された。これらの作用は実験に用いた被験物質濃度で細胞障害性がなかったことから (図15)、特異的作用と考えられた。

第3節では、ホルモンバランスや皮脂合成によって進行する「炎症」ステージに対する十味敗毒湯の抗酸化作用について検討した。好脂性のアクネ菌は、詰まった毛穴の中で男性ホルモンにより産生された皮脂を栄養として過剰に増殖し、脂肪分解酵素のリパーゼや好中球走化因子などを産生する⁸¹⁾。細菌性リパーゼが皮脂を分解して産生した遊離脂肪酸（FFA）はさらに過酸化脂質へと酸化される⁸²⁾。また好中球走化因子により集積した好中球からは ROS や RNS などの酸化ストレス分子が放出される⁶²⁾。これらの過酸化脂質や酸化ストレス分子が炎症性皮膚疹を惹起することから^{63,83)}、十味敗毒湯の抗酸化作用を明確にすることは、その治療効果を裏付ける作用機序の解明に繋がる。

これまでに十味敗毒湯は過酸化水素依存的な酸化反応抑制作用を有し⁴³⁾、カンゾウ、ボクソク及びケイガイ由来のフラボノイドがその作用に寄与していることが報告されている⁶⁴⁾。しかし、生体では経口的に摂取されたフラボノイドのほとんどが小腸でグルクロン酸抱合を受けて血中に移行する^{65-67, 84)}。グルクロン酸抱合を受けた化合物は、一般的にはその薬理活性が失われると考えられているが、フラボノイド成分は、抱合化を受ける分子内官能基の位置によってはアグリコンと同等の抗酸化作用を示す^{65, 68)}。図23に示したフラボノイド基本骨格（Flavan）を例にとって説明すると、B環のC4'位に付く水酸基がグルクロン酸抱合されるとアグリコンの抗酸化や抗ラジカル活性が著しく減少するが、A環のC7位に付く水酸基がグルクロン酸抱合されてもその活性には影響しない⁶⁹⁾。

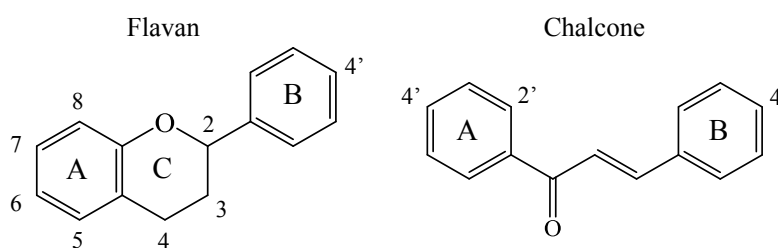


図23. フラボノイドの基本骨格

実際に、第3節で ROS に対して強い抗酸化作用を示したリクイリチゲニン⁸⁵⁾は、B環4'-O-位抱合体（liquiritigenin 4'-O-glucuronide）で活性が失活し、A環7-O-位抱合体（liquiritigenin 7-O-glucuronide）ではその活性が維持された（図20A）。イソリクイリチゲニンの場合もA環2'-O-位抱合体（isoliquiritigenin 2'-O-glucuronide）又は4'-O-位抱合体（isoliquiritigenin 4'-O-glucuronide）、またゲニステインの場合もA環7-O-位抱合体（genistein 7-O-glucuronide）でアグリコンと同等の抗酸化活性を示す⁸⁶⁾。

を示した (図 20B, 20C)。これらの結果は、フラボノイド活性の不活化は主に B 環に依存していることを示唆する。その一方で、検討したヘスペレチン-グルクロン酸抱合体は A 環 7-O-位抱合体 (hesperetin 7-O-glucuronide) であったにも関わらず、アグリコンの活性が一部減弱した (図 20D)。この原因は不明であるが、フラボノイドの抗酸化作用における構造活性相関を深く理解していくためにも、今後も検討を継続する必要がある。

以上の結果は、尋常性痤瘡の炎症を誘発する活性酸素及び活性窒素活性に対する十味敗毒湯の抗酸化作用は、フラボノイドをはじめとする成分に担われ、抱合体でもその抱合部位によってはアグリコン同様の作用を有することが示唆された。しかし、十味敗毒湯を経口投与した血中にどのタイプのグルクロン酸抱合体が検出されるかを検証する必要がある。この課題に関しては終章第 3 章で十味敗毒湯 (経口) 投与ラットの血中で活性抱合体を検出することができたので、そこでその詳細を述べる。

一方、本節では血中移行性が知られているボクソク成分没食子酸 (gallic acid) の主要代謝物 4-O-methylgallic acid⁷²⁾、カンゾウ成分グリチルリチンの主要代謝物 glycyrrhetic acid⁷⁰⁾及びボウフウ成分の cimifugin⁷¹⁾についても ROS 及び RNS 活性を検討したところ、4-O-methylgallic acid に RNS 生成抑制作用があることを初めて見出した。以上、本節ではこれらの成分及び代謝物が十味敗毒湯の抗酸化 (抗 ROS 及び RNS) 活性を担っている可能性が示唆された。

第 4 節では尋常性痤瘡の修復過程に関与するマクロファージに対する作用を検討した。十味敗毒湯がマクロファージ集簇を促進することは第 1 章のアクネ菌注入耳介の病理組織学的解析において述べた。第 1 章の耳介病理組織像で認めた菌塊部へのマクロファージ集簇には、単球 (マクロファージ) 遊走因子として知られている MCP-1⁷³⁾の産生増強があるのではないかと仮定し、本節では同耳介組織の MCP-1 量を測定した。実際、アクネ菌誘発腫脹耳介では MCP-1 発現の有意な増加が認められ、生体が外部から侵入したアクネ菌に対し MCP-1 発現を促し単球を病変部へ集簇させ、マクロファージに分化し防御反応をとっていることが窺われた。しかし、十味敗毒湯処置群では菌塊部周辺へのマクロファージ集簇増強作用が認められたにもかかわらず、アクネ菌誘発 MCP-1 発現増加に対する増強作用は認められなかった (図 22B)。この結果は十味敗毒湯のマクロファージ集簇増加は MCP-1 発現の増強によって誘発されたものではないことを示唆する。

そこで、培養ヒト単球系細胞 (THP-1 細胞) を用いて単球からマクロファージへの分化作用について検討した。表 3 に示したように、THP-1 細胞は IFN- γ 刺激

によりマクロファージ活性化マーカーである CD86 及び CD192 の発現と FITC 貪食機能が増加した。この結果は、IFN- γ により単球がマクロファージに分化したことを示唆する。この IFN- γ 誘発マクロファージ分化に対する十味敗毒湯由来の主要成分及び代謝物の作用を検討したところ（表 3）、リクイリチン (liquiritin)、リクイリチゲニン (liquiritigenin)、イソリクイリチン (isoliquiritin) 及びシミフギン (cimifugin) の 4 成分に CD86 及び CD192 発現の有意な増強が認められ、この内、リクイリチゲニンとイソリクイリチンが貪食機能の増強作用をもつことが明らかになった。これらの結果は十味敗毒湯のマクロファージ集簇作用は、単球（マクロファージ）走化性因子 MCP-1 の増強によるものではなく、マクロファージへの分化増強作用によるものであり、その貪食活性にはカンゾウフラボノイドのリクイリチゲニンとイソリクイリチンが活性成分として寄与していることが示唆された。

十味敗毒湯成分の単球からマクロファージへの分化誘導の作用機序については現在のところ不明であるが、「フラボノイド成分が免疫細胞の分化を促す」ことを示唆するいくつかの報告がある⁸⁵⁾。例えばイソフラボンである genistein やカルコンである phloretin は、ヒト骨髄白血病細胞の顆粒球又は単球への分化を促進する⁸⁶⁾。その機序として、protein tyrosine kinase 活性の抑制、phosphatidylinositol のターナーオーバーの抑制及び topoisomerase II 活性の抑制作用などが示唆されている⁸⁷⁻⁹⁰⁾。また genistein 等のイソフラボンには、マクロファージに発現しているエストロゲン受容体を介した分化誘導作用が示唆されている⁸⁵⁾。これらの知見は、本研究でマクロファージの分化誘導作用が見出されたフラボノイド（リクイリチゲニン及びイソリクイリチン）にも上述した機序が関与している可能性を推察される。

一方、本節では十味敗毒湯の好中球遊走能促進作用についても、同様のアクネ菌注入耳介を用いて好中球遊走因子 CINC-1 の関与を検討した。アクネ菌注入耳介では先の単球走化因子 MCP-1 と同様、CINC-1 の有意な発現増加が認められ（図 22A）、生体が外部から侵入したアクネ菌を排除する応答を示すことが分かった。しかし、十味敗毒湯群の耳介では CINC-1 発現の増強は認められなかった。本研究では、生体内における十味敗毒湯の好中球遊走能について詳細な検討は行っていないが、既に報告されている *in vitro* 実験⁵⁾では、十味敗毒湯は好中球中の Ca²⁺濃度を上昇させることにより遊走能や貪食能を促進する可能性を示唆している。この *in vitro* で認められた好中球遊走能促進作用が、実際の生体で生じ得るかどうかについては今後詳細に検討していく必要がある。

ケモカインの測定結果においては、十味敗毒湯と副腎皮質ステロイド（プレドニゾロン PDN）の作用は対称的であった（図 22）。アクネ菌誘発 CINC-1 発現の増加は、菌投与の 24 時間後において、十味敗毒湯は有意な影響を示さなかったが、プレドニゾロン群ではアクネ菌投与群以上の増加が認められた（図 22A）。また、アクネ菌誘発 MCP-1 発現の増加は、菌投与 2 時間後で十味敗毒湯群は有意な影響を示さなかったが、プレドニゾロン群では有意な減少が認められた（図 22B）。これらの結果は十味敗毒湯がプレドニゾロンとは異なる作用機序により耳介腫脹を改善することを示唆する。副腎皮質ホルモンの副作用の問題⁹¹⁾を考えると、異なる作用機序を有する十味敗毒湯の皮膚炎治療薬としての有用性が期待される。

小括

十味敗毒湯の抗テストステロン代謝作用は、5 α リダクターゼ活性阻害によるものであり、その作用には構成生薬であるボクソク及びその成分であるペンタガロイルグルコースが寄与している。

十味敗毒湯の皮脂合成抑制作用にもボクソク及びその成分であるペンタガロイルグルコースが関与し、その作用は 5 α リダクターゼ阻害依存的及び非依存的作用の双方が関与する。

十味敗毒湯は尋常性痤瘡の炎症病態に関与する活性酸素種（ROS）及び活性窒素種（RNS）に対し抗酸化（抗 ROS 及び抗 RNS）作用を発揮する。抗 ROS 作用は、カンゾウ成分（リクイリチゲニン、イソリクイリチゲニン、ゲニステイン）及びそれらの A 環抱合体（liquiritigenin 7-O-glucuronide、isoliquiritigenin 2'-O-glucuronide、Isoliquiritigenin 4'-O-glucuronide、Genistein 7-O-glucuronide）に認められた。一方で、ボクソク成分の 4-O-methylgallic acid に RNS 生成抑制作用が認められた。これらの成分及び代謝物が十味敗毒湯の抗酸化活性を担っている可能性が示唆された。

十味敗毒湯のマクロファージ集簇作用は、マクロファージ走化性因子の増強によるものではなく、炎症病巣に引き寄せられた単球からマクロファージへの分化増強作用によるものであった。この病巣修復に携わるマクロファージ集簇にはカンゾウフラボノイドのリクイリチゲニン及びイソリクイリチンが活性成分として見出された。

第3章

十味敗毒湯の薬物動態研究

はじめに

前章（第2章）では尋常性痤瘡の各病態進行ステージにおける十味敗毒湯の作用を明らかにした。病態発症の誘発要因であるテストステロン代謝阻害（5 α リダクターゼ阻害）及び皮脂合成抑制作用に対しボクソク成分のペンタガロイルグルコース、酸化・炎症過程のROSやRNSなどの酸化ストレス分子誘発炎症に対しカンゾウ、ケイガイ及びボクソク由来のフラボノイドやそれらのグルクロン酸抱合体、また、修復過程を担うマクロファージの活性化作用に対してはカンゾウフラボノイド（リクイリチゲニンおよびイソリクイリチン）の関与が示唆された。

生体において、これら成分が活性成分として十味敗毒湯の多彩な作用を担うことを立証するためには、十味敗毒湯の服用後に少なくともこれら成分が血中に移行することを検証する必要がある。十味敗毒湯の血中薬物動態はこれまで全く行われていないが、成分のいくつかは、単一化合物⁹²⁻⁹⁴、それらを含む生薬⁹⁵、またその生薬を構成生薬の一つとして含む他漢方薬^{96,97}などの投与試験で検討されている。例えば、甘草成分については、甘草エキスを経口投与したラットの血漿中からリクイリチゲニンやイソリクイリチゲニンが検出されている⁹⁵。また、ボクソク成分のペンタガロイルグルコースについては、腹腔内投与したラットで血中濃度推移が報告されている^{94,98}。しかし、成分単品、生薬エキス及び漢方エキスの各投与では成分の薬物動態が異なると云われていることから⁹⁹、十味敗毒湯として投与した際の成分の血漿中濃度推移、即ち血中薬物動態を実証することが肝心である。

そこで、先ず本章第1節では、十味敗毒湯とその活性生薬の一つであるボクソクについて、それらのエキス中成分含量を定量、比較した。次いで第2節では、十味敗毒湯を経口投与したラットの血漿中成分濃度を定量し、その薬物動態を解析した。最終節（第3節）では、前章第3節で問題提起した抗ROS作用に関与するフラボノイド-グルクロン酸抱合体の血漿中濃度とその薬物動態を検討した。

第 1 節

十味敗毒湯及びボクソクのエキス中成分含量

十味敗毒湯は、10種の構成生薬から成る漢方薬である。前章（第1節及び第2節）では十味敗毒湯のテストステロン代謝抑制及び皮脂合成抑制作用の活性生薬と考えられているボクソクについて、17種の成分を検討し、ペンタガロイルグルコースを主体とする9種のタンニン成分に活性があることを示した。このスクリーニングに用いた成分は、ボクソク成分としてこれまでに同定されている成分⁵²⁻⁵⁶⁾に加え、代表的なタンニン成分やフラボノイドを標的として選択したものであり、それらの成分がボクソクに実際どの程度含まれているかは不明である。ボクソク以外の構成生薬についても、主なフラボノイド成分としてカンゾウには liquiritin や isoliquiritin、ケイガイには luteolin が、それ以外の成分についてもボウフウには cimifugin、またサイコには saikosaponin d が同定されているが¹⁰⁰⁻¹⁰³⁾、これらの成分も十味敗毒湯にどれだけ含まれているかはまだ明らかにされていない。十味敗毒湯の薬効を担う活性成分及びその薬物動態を解明するためにも、少なくとも投与される一定規格の生薬エキスないし漢方エキス中の成分含量を明確にする必要がある。

そこで、本節では、ガロタンニン及びフラボノイドを含めた生薬由来の代表的な 4241 成分について、十味敗毒湯及びボクソクのエキス中成分含量を定量した。

1. 実験方法

1.1. 被験物質

十味敗毒湯（第1章・第1節）及びボクソク（第2章・第1節）は、これまでの実験と同様のエキス（株式会社ツムラ、Tokyo, Japan）を用いた。

十味敗毒湯及びボクソクのエキス中成分含量は41成分を対象に検討した。表4には、それら成分の測定法確立及び定量するために用いた各標準物質とその入手先を示した。また、これら成分定量の内標準物質として用いた niflumic acid は Sigma-Aldrich から、また、vincamine は東京化成工業から購入した。

1.2. エキス中成分の抽出・測定法

十味敗毒湯又はボクソクのエキス末（0.1 g）に、メタノール/水（75:25, v/v）混液 4 mL を添加した。攪拌後、溶液を 5 分間超音波処理し遠心（1700 g, 5 分間）した。上清は第一抽出液として回収した。残渣には 4 mL のメタノール/水（50:50, v/v）混液を加えた後、同抽出操作にて再度上清（第二抽出液）を回収し、先の第一抽出液に合わせた。

表4. 41成分の入手先

Compound Name	Procurement
ボクソク成分	
1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloylglucose	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloylglucose	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
2',5-Di- <i>O</i> -galloylhamamelose	Sigma-Aldrich
Eugenin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
1-Desgalloyl eugenin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Casuarinin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Castalagin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Gallic acid	和光純薬工業
Methyl gallate	和光純薬工業
(-)-Epicatechin gallate	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
(-)-Galocatechin	Nacalai Tesque
(-)-Epigallocatechin gallate	和光純薬工業
Stenophyllanin C	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Fraxin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
(+)-Catechin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Taxifolin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Quercitrin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Quercetin	和光純薬工業
カンゾウ成分	
Glycyrrhizic acid	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Glycyrrhetic acid	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Liquiritin	和光純薬工業
Liquiritin apioside	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Liquiritigenin	和光純薬工業
Isoliquiritin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Isoliquiritin apioside	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Isoliquiritigenin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Fomononetin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Glycycomarin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Ononin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Licorisoflavan A	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Medicarpin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Genistin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Genistein	和光純薬工業
ケイガイ成分	
Luteolin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Hesperidin	和光純薬工業
Hesperetin	和光純薬工業
ボウフウ成分	
Cimifugin	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
4'- <i>O</i> -Glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisaminol	和光純薬工業
サイコ成分	
Saikosaponin D	和光純薬工業
Saikogenin A	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所
Saikogenin D	株式会社ツムラ生薬本部生薬研究所

混和した抽出液は、そのまま、あるいはメタノールで10倍又は100倍希釈した後、内標準溶液として niflumic acid 又は vincamine 溶液を添加混合し LC-MS/MS 又は HPLC 分析による成分測定用試料とした。調製した成分測定用試料を、LC-MS/MS システム 1 : Agilent 1100 (LC; Agilent)-API4000 (MS/MS; AB SCIEX)、LC-MS/MS システム 2 : Agilent 1290 (LC; Agilent)-TripleQuad6500 (MS/MS; AB SCIEX) の multiple reaction monitoring モード、又は HPLC システム : Agilent 1200 (LC; Agilent) により分析した。表 5 には glycyrrhizic acid 以外の LC-MS/MS 分析で標的とした 40 成分の MS/MS イオンパラメータ (Q1Mass : プリカーサーイオン、Q3Mass : モニターするプロダクトイオン、DP : 化合物のイオン化電圧、CE : イオン銃の衝突電圧、CXP : コリジョンセル中のフラグメントイオンの加速電圧) の設定値を示す。また、各化合物の LC-MS/MS 分析における LC-MS/MS システム及び HPLC 条件は同表右欄に相当する ID を併記し、表 6 にその詳細を示した。Glycyrrhizic acid は、下記条件の HPLC システムにより分析した。

HPLC 分析条件

カラム : ODS-120A (4.6 × 250 mm, 10 µm, TOSO, Japan)

カラムオープン温度 : 40°C

移動相 : 蒸留水 : アセトニトリル : 酢酸 (1900 : 1077 : 100)

流速 : 1.2 mL/min

検出器 UV 波長 : 254 nm

表 5. LC-MS/MS 分析条件: 40 成分及び内標準物質 2 種の MS イオンパラメータ

Compound name	Q1Mass (<i>m/z</i>)	Q3Mass (<i>m/z</i>)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	LC-MS/MS system and HPLC method#
Hamamelitannin	483.18	168.8	-105	-42	-11	1-1
1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloyl glucose	787.213	168.9	-155	-70	-13	1-1
1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl glucose	939.262	769.1	-165	-44	-21	1-1
Eugenin	937.241	301	-175	-64	-17	1-1
1-Desgalloyl eugenin	785.268	300.7	-175	-56	-19	1-1
(+)-Catechin	288.917	109.1	-90	-32	-17	1-2
(-)-Epigallocatechin gallate	457.151	124.8	-95	-54	-19	1-2
(-)-Epicatechin gallate	441.043	168.9	-80	-28	-13	1-2
(-)-Galocatechin	305.057	125.1	-95	-30	-19	1-2
Luteolin	284.85	132.3	-90	-68	-23	1-2
Quercetin	300.98	150.7	-105	-30	-9	1-2
Quercitrin	447.103	300.5	-110	-36	-17	1-2
Genistin	431.012	269.1	-55	-16	-15	1-2
Genistein	268.919	132.7	-105	-42	-21	1-2
4'- <i>O</i> -Glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisamminol	451.245	270.9	-115	-24	-15	1-2
Gallic acid	168.79	125	-65	-22	-19	1-3
Methyl gallate	182.851	123.9	-65	-30	-19	1-4
Formononetin	266.978	251.8	-95	-30	-15	1-4
Ononin	429.052	266.9	-50	-14	-19	1-4
Licorisoflavan A	437.249	203.1	-135	-38	-11	1-4
Medicarpin	268.806	253.8	-85	-24	-13	1-4
Liquiritin	417.007	254.8	-85	-28	-5	1-5
Liquiritin apioside	549.216	135	-145	-62	-23	1-5
Liquiritigenin	254.895	118.9	-80	-38	-1	1-5
Isoliquiritin	416.971	255	-100	-24	-15	1-5
Isoliquiritin apioside	549.213	254.9	-150	-40	-23	1-5
Isoliquiritigenin	254.868	119	-75	-42	-21	1-5
Glycycoumarin	366.971	308.7	-90	-36	-27	1-5
Glycyrrhetic acid	469.203	425.3	-165	-50	-11	1-5
Hesperidin	609.238	301.1	-120	-38	-19	1-6
Hesperetin	301.101	164.2	-105	-34	-9	1-6
Saikosaponin D	781.53	455.3	136	25	14	1-7
Saikogenin A	490.384	437.4	66	15	14	1-7
Saikogenin D	490.396	455.5	66	15	14	1-7
Castalagin	935.025	468.9	181	39	22	2-8
Casuarinin	937.096	345.1	181	39	24	2-8
Stenophyllanin C	1057.252	585.2	216	43	10	2-8
Fraxin	371.07	209.1	31	19	12	2-8
(+)-Taxifolin	305.071	149.1	71	31	8	2-8
Cimifugin	306.942	259.1	116	41	16	2-8
Niflumic acid (IS)	280.826	236.8	-55 or -20	-24 or -30	-11 or -15	1-1-7
Vincamine (IS)	355.257	337.1	96	29	18	2-8

各化合物の定量下限は以下のとおり。40 ng/mL: tetragalloyl glucose 及び 1-desgalloyl eugenin、2500 ng/mL: ononin 及び licorisoflavan A、3200 ng/mL: pentagalloyl glucose、4 ng/mL: glycycoumarin, liquiritigenin, hamamelitannin 及び methyl gallate、1600 ng/mL: eugenin、10 ng/mL: medicarpin, (-)-epicatechin gallate, chrysin, luteolin, quercetin, quercitrin, fraxin 及び (+)-taxifolin、100 ng/mL: 4'-*O*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, (±)-galocatechin, casuarinin 及び castalagin、2 ng/mL: genistein、200 ng/mL: glycyrrhetic acid, gallic acid 及び stenophyllanin C、1 ng/mL: liquiritin, formononetin
#: 各化合物の分析に用いた LC-MS/MS システム及び HPLC 法は、表 6 に詳述する。

DP: declustering potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential.

表 6. LC-MS/MS 分析における LC-MS/MS システム及び HPLC 条件

LC-MS/MS system	HPLC method	HPLC condition
1	1	Column: Ascentis Express RP-amide column (100 × 2.1 mm I.D., 2.7- μ m particle size; Supelco Analytical, Inc., Tokyo, Japan) Mobile phase (A) 0.2 vol % acetic acid, (B) acetonitrile containing 0.2 vol % acetic acid Gradient elution program (% B in A): 0–8 min, 22%; 8–8.01 min, 22–90%; 8.01–13 min, 90%; 13–13.01 min, 90–22%; 13.01–18 min, 22% Other conditions were: flow rate, 0.2 mL/min; column temperature, 40°C
	2	Column: Ascentis Express RP-amide column Mobile phase (A) 0.2 vol % acetic acid, (B) acetonitrile containing 0.2 vol % acetic acid Gradient elution program (% B in A): 0–5 min, 22%; 5–10 min, 22–90%; 10–15 min, 90%; 15–15.1 min, 90–22%; 15.1–25 min, 22% Other conditions were: flow rate, 0.2 mL/min; column temperature, 40°C
	3	Column: Ascentis Express RP-amide column Mobile phase (A) 0.2 vol % acetic acid, (B) acetonitrile containing 0.2 vol % acetic acid Gradient elution program (% B in A): 0–2 min, 22%; 2–10 min, 22–80%; 10–15 min, 80%; 15–15.1 min, 80–22%; 15.1–20 min, 22% Other conditions were: flow rate, 0.2 mL/min; column temperature, 40°C
	4	Column: Ascentis Express RP-amide column Mobile phase (A) 0.2 vol % acetic acid, (B) acetonitrile containing 0.2 vol % acetic acid Gradient elution program (% B in A): 0–10 min, 10%; 10–10.1 min, 10–80%; 10.1–16 min, 80%; 16–16.01 min, 80–10%; 16.01–21 min, 10% Other conditions were: flow rate, 0.2 mL/min; column temperature, 40°C
2	5	Column: Inertsil Ph-3 column (100 × 2.1 mm I.D., 3- μ m particle size; GL Sciences, Tokyo, Japan) Mobile phase (A) 10 mM ammonium acetate, (B) acetonitrile Gradient elution program (% B in A): 0–1 min, 20%; 1–13 min, 20–65%; 13–13.01 min, 65–20%; 13.01–18 min, 20% Other conditions were: flow rate, 0.3 mL/min; column temperature, 40°C
	6	Column: Kinetex PFP column (100 × 2.1 mm I.D., 2.6- μ m particle size; Phenomenex, Torrance, CA) Mobile phase (A) 0.2 vol % acetic acid, (B) acetonitrile containing 0.2 vol % acetic acid Gradient elution program (% B in A): 0–10 min, 11%; 10–30 min, 11–40%; 30–30.01 min, 40–90%; 30.01–35 min, 90%; 35–35.01 min, 90–11%; 35.01–40 min, 11% Other conditions were: flow rate, 0.35 mL/min; column temperature, 40°C
	7	Column: Ascentis Express RP-amide column Mobile phase (A) 10 mM ammonium acetate, (B) acetonitrile Gradient elution program (% B in A): 0–12 min, 40%; 12–12.01 min, 40–90%; 12.01–15 min, 90%; 15–15.01 min, 90–40%; 15.1–20 min, 40% Other conditions were: flow rate, 0.3 mL/min; column temperature, 40°C
2	8	Column: Ascentis Express RP-amide column Mobile phase (A) 0.2 vol % formic acid, (B) acetonitrile Gradient elution program (% B in A): 0–1 min, 10%; 1–8 min, 10–30%; 8–10 min, 30–90%, 10–12 min, 90%; 12–12.01 min, 90–10 %; 12.01–17 min, 10% Other conditions were: flow rate, 0.3 mL/min; column temperature, 40°C

LC-MS/MS system 1 : Agilent 1100 (LC; Agilent)-API4000 (MS/MS; AB SCIEX) 、

LC-MS/MS system 2 : Agilent 1290 (LC; Agilent)-TripleQuad6500 (MS/MS; AB SCIEX)。

2. 実験結果

2.1. ボクソク及び十味敗毒湯のエキス中成分含量

表 7 に本測定条件で検出されたボクソク及び十味敗毒湯のエキス中成分含量を示す。ボクソクからは標的対象とした 18 種成分の全てが検出された。その中には前章で 5 α リダクターゼ阻害作用や皮脂合成抑制作用を示したペンタガロイルグルコース (1,2,3,4,6-penta-*O*-galloylglucose) を含むガロタンニンやカテキンなどが含まれた。最も含有量の高かった成分はカテキン ((+)-catechin : 10.7 mg/g)、続いてカスタラジン (castalagin : 5.91 mg/g)、オイゲニン (eugeniin : 4.74 mg/g)、ペンタガロイルグルコース (3.71 mg/g)、没食子酸 (Gallic acid : 2.89 mg/g)、デスガロイルオイゲニン (1-desgalloyl eugeniin : 2.65 mg/g)、ガロカテキン ((\pm)-gallocatechin : 1.69 mg/g)、ステノフィラニン (stenophyllanin C : 1.33 mg/g)、ガロイルハマメロース (2',5-Di-*O*-galloylhamamelose : 0.928 mg/g)、テトラガロイルグルコース (1,2,3,6-tetra-*O*-galloylglucose : 0.767 mg/g)、エピカテキンガレート ((-)-epicatechin gallate : 0.238 mg/g)、フラキシニン (fraxin : 0.183 mg/g)、カスアリニン (casuarinin : 0.154 mg/g)、メチルガレート (Methyl gallate : 0.113 mg/g) の順であり、その他の成分 (taxifolin、(-)-epigallocatechin gallate、quercetin、quercitrin) 含量は 0.1 mg/g 以下であった。

十味敗毒湯からは、標的とした 41 成分の内 30 成分が検出・定量された。その内訳は、ボクソク 14 成分、カンゾウ 11 成分、ケイガイ 3 成分、及びボウフウ 2 成分であった。

ボクソク成分は、上述のボクソク単品で測定した結果と比較すると、検出成分数の減少 (18 から 14 成分に減少) に加え、成分含量順位の変動があった。十味敗毒湯ではペンタガロイルグルコースが一番高く (0.345 mg/g)、次いでオイゲニン (eugeniin : 0.213 mg/g) と没食子酸 (Gallic acid : 0.213 mg/g) が続いた。0.1 ~ 0.01 mg/g 含有成分として castalagin、(+)-catechin、1,2,3,6-tetra-*O*-galloylglucose、1-desgalloyl eugeniin 及び 2',5-di-*O*-galloylhamamelose、(\pm)-gallocatechin、また 0.01 ~ 0.001 mg/g 含有成分として fraxin、quercetin、(-)-epicatechin gallate、methyl gallate 及び taxifolin が検出された。Stenophyllanin C、casuarinin、(-)-epigallocatechin gallate 及び quercitrin の 4 成分は検出限界以下であった。

十味敗毒湯中で検出されたカンゾウ 11 成分の中では、グリチルリチン酸が最も高く (glycyrrhizic acid : 5.12 mg/g)、続いてリクイリチン (liquiritin : 1.87 mg/g)、リクイリチンアピオシド (liquiritin apioside : 1.39 mg/g)、リクイリチゲニン (liquiritigenin : 0.298 mg/g)、イソリクイリチンアピオシド (isoliquiritin apioside : 0.167 mg/g)、イソリクイリチン (isoliquiritin : 0.13 mg/g)、グリシクマリン (glycy coumarin : 0.0688 mg/g)、イソリクイリチゲニン (isoliquiritigenin : 0.0302 mg/g)、メディカルピン (medicarpin : 0.00992 mg/g) フォルモノネチン (formononetin : 0.00832 mg/g)、ゲニステイン (genistein : 0.00164 mg/g) の順であった。

ケイガイ成分は 3 成分全てが検出され、その含量はヘスペリジン (hesperidin : 0.231 mg/g)、ルテオリン (luteolin : 0.0110 mg/g)、ヘスペレチン (hesperetin : 0.00338 mg/g) の順に高かった。

ボウフウ成分はグルコシルメチルビスサミノール (4'-*O*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol : 0.535 mg/g) とシミフジン (cimifugin : 0.198 mg/g) の 2 成分全てが検出された。

表 7. 十味敗毒湯及びボクソクのエキス中成分含量

生薬	化合物名	ボクソク中含量 (mg/ g)	十味敗毒湯中含量 (mg/ g)
ボクソク	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloylglucose	3.71	0.345
	Eugenin	4.74	0.213
	Gallic acid	2.89	0.151
	Castalagin	5.91	0.0779
	(+)-Catechin	10.7	0.0767
	1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloylglucose	0.767	0.0523
	1-Desgalloyl eugenin	2.65	0.0299
	2',5-Di- <i>O</i> -galloylhamamelose	0.928	0.0244
	(±)-Gallocatechin*	1.69	0.011
	Fraxin	0.183	0.00758
	Quercetin	0.00856	0.00385
	(-)-Epicatechin gallate	0.238	0.00325
	Methyl gallate	0.113	0.00318
	Taxifolin	0.0636	0.00174
	Stenophyllanin C	1.33	BQL
	Casuarinin	0.154	BQL
	(-)-Epigallocatechin gallate	0.0603	BQL
	Quercitrin	0.00142	BQL
カンゾウ	Glycyrrhizic acid	-	5.12
	Liquiritin	-	1.87
	Liquiritin apioside	-	1.39
	Liquiritigenin	-	0.298
	Isoliquiritin apioside	-	0.167
	Isoliquiritin	-	0.13
	Glycycomarin	-	0.0688
	Isoliquiritigenin	-	0.0302
	Medicarpin	-	0.00992
	Formononetin	-	0.00832
	Genistein	-	0.00164
	ケイガイ	Hesperidin	-
Luteolin		-	0.0110
Hesperetin		-	0.00338
ボウフウ	4'- <i>O</i> -Glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisamminol	-	0.535
	Cimifugin	-	0.198

BQL; 定量下限値未満。

*: (-)-Gallocatechin のピークは(+)-gallocatechin と分けて分析することが出来なかったため、(±)-gallocatechin として(-)-gallocatechin の検量線を用いて外挿値として含量を算出した。

第 2 節

十味敗毒湯投与ラットにおける血漿成分の薬物動態

第 1 節では十味敗毒湯のエキス中成分として第 2 章の各薬理作用に寄与した活性成分を含む 30 種類のボクソク、カンゾウ、ケイガイ及びボウフウ由来成分が検出された。これらの成分が十味敗毒湯の薬理活性成分としてその作用を担うためには、十味敗毒湯を経口投与した生体（血中）にこれら成分が移行するかを確認する必要がある。本節では、十味敗毒湯を経口投与したラットにおける血中移行成分の検出とそれら成分の薬物動態解析を行った。

1. 実験方法

1.1. 被験物質

十味敗毒湯エキス末は、第 1 章・第 1 節の実験と同じものを用いた。血漿中成分分析用の標準物質は、十味敗毒湯のエキス中から検出された成分に加え生体内の代謝物として想定されるボクソク由来の 4-*O*-methylgallic acid（入手先：ChromaDex）を合わせ、表 8 に示す 38 成分を検討対象とした（入手先は本章・第 1 節表 4 参照）。

1.2. 実験動物

SD 系雄性ラットを日本エスエルシー株式会社（SLC、Shizuoka, Japan）より購入し、7 週齢で本実験に使用した。動物は自由摂水、自由摂食、温度 23±3°C、湿度 55±20%、12 時間明暗サイクル（明期 7：00-19：00）の環境で飼育した。全ての実験は、株式会社ツムラの「動物実験に関するガイドライン」に従い、動物実験審査会の承認のもとで実施した。

表 8. 十味敗毒湯投与ラット血漿中の分析標的 38 成分

生薬	化合物名	生薬	化合物名	
ボクソク	Casuarinin	カンゾウ	Liquiritin	
	Stenophyllanin C		Liquiritigenin	
	Fraxin		Isoliquiritin	
	Taxifolin		Isoliquiritigenin	
	Castalagin		Glycycomarin	
	Quercitrin		Glycyrrhetic acid	
	Quercetin		Genistein	
	(+)-Catechin		Formononetin	
	(-)-Epicatechin gallate		Medicarpin	
	(±)-Gallocatechin		Licorisoflavan A	
	(-)-Epigallocatechin gallate		Ononin	
	Gallic acid		ケイガイ	Luteolin
	Methyl gallate		Hesperidin	
	4-O-Methylgallic acid		Hesperetin	
	Galloylhamamelose		ボウフウ	Cimifgin
	Tetragalloyl glucose		4'-O-Glucosyl-5-O-methylvisamminol	
	Pentagalloyl glucose		サイコ	Saikosaponin B1
	Eugenin		Saikogenin A	
	1-Desgalloyl eugenin		Saikogenin D	

1.3. 実験デザイン

蒸留水で調製した十味敗毒湯を約 16 時間絶食したラット（体重 230–285 g）に 2 g/kg の用量で経口投与した。本実験では十味敗毒湯投与後の血中成分を検出する目的で第 1 章の動物実験で設定した最大用量（臨床用量の 10 倍量）を用いた。

血液は、投与前（ブランク）及び投与 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 及び 24 時間後にイソフルラン麻酔下でヘパリン処理シリンジを用いて各時点 3 匹ずつの腹部後大静脈から採取した。遠心分離（1700 g、15 分間、4°C）により得た血漿は、成分分析に供するまで-80°C で保管した。

1.4. 血漿中成分の LC-MS/MS 分析

血漿中の liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin、isoliquiritigenin、glycycomarin、glycyrrhetic acid、hesperidin、hesperetin、saikosaponin B1、saikogenin A、saikogenin D、casuarinin、stenophyllanin C、fraxin、taxifolin、castalagin 及び cimifugin を分析するため、200 µL の血漿サンプルに 25 µL のメタノール、25 µL の内標準溶液（niflumic acid 又は vincamine 溶液）及び 750 µL のメタノールを添加した。検量線作成には、25 µL のメタノール代わりに各標準溶液、200 µL の血漿サンプルの代わりにブランク血漿を用いた。攪拌後、遠心分離（7,000 g、5 分間、室温）に

より得た上清の溶媒を窒素ガス流下（40°C）で留去した。残渣は、各化合物測定に相当する HPLC 初期移動相（前節表 5 及び 6 参照）の 50~100 μL で溶解し、その内 10 μL を各化合物分析用 LC-MS/MS システム（前節表 5 及び 6 参照）に注入した。

Genistein、luteolin、quercitrin、quercetin、(+)-catechin、(-)-epicatechin gallate、(\pm)-gallocatechin、(-)-epigallocatechin gallate、4'-*O*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol、gallic acid、methyl gallate、4-*O*-methylgallic acid、formononetin、medicarpin、licorisoflavan A、ononin、2',5-Di-*O*-galloylhamamelose、1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl glucose、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl glucose、eugenin 及び 1-desgalloyl eugenin の分析のため、上述した前処理法でメタノールの代わりに酢酸エチルを添加し、液-液抽出を行った。抽出後の上清の溶媒は窒素ガス流下（40°C）で留去した。残渣は、各化合物測定に相当する HPLC 初期移動相（前節表 5 及び 6 参照）の 50~100 μL で溶解し、その内 10 μL を各化合物分析用 LC-MS/MS システム（前節表 5 及び 6 参照）に注入した。4-*O*-Methylgallic acid の MS パラメータは、Q1mass: 182.851 m/z 、Q3mass: 123.9 m/z 、DP: -65 volts、CE: -30 volts、CXP: -19 volts に設定し、LC-MS/MS システム及び HPLC 法は前節表 5 の右欄 1-4 の条件で分析した。

1.5. 薬物動態解析

十味敗毒湯投与 24 時間後に至る 8 回の経時的測定ポイントの内、半分以上の測定ポイントで検出された成分について、薬物動態パラメータとして最高血漿中濃度 (C_{\max})、最高血漿中濃度到達時間 (t_{\max})、消失半減期 ($t_{1/2}$) 及び血中濃度-時間曲線下面積 ($\text{AUC}_{0-\text{last}}$) を Phoenix WinNonlin ソフトウェア (version 6.3, Certara L.P., St. Louis, MO) を用いたノンコンパートメント解析により算出した。 $T_{1/2}$ は、消失相の 3 点以上の濃度から算出された消失速度定数 k_e を用いて、 $\log_e 2/k_e$ により算出した。

2. 実験結果

2.1. 十味敗毒湯投与ラットにおける血漿成分濃度

十味敗毒湯 (2 g/kg) を経口投与したラットの血漿から、ボクソク由来成分 (methyl gallate、(+)-catechin、及び gallic acid の代謝物 4-*O*-methylgallic acid)、カンゾウ由来成分 (liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin、isoliquiritigenin、glycycoumarin、

formononetin、genistein、及び glycyrrhizic acid の代謝物 glycyrrhetic acid)、ケイガイ成分 (luteolin 及び hesperidin) 及びボウフウ成分 (cimifugin) が検出された。それら成分の時間-血漿中濃度推移を図 24 に示す。これらの検出成分の内、8 種の成分 (4-O-methylgallic acid、liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin、isoliquiritigenin、formononetin、glycyrrhetic acid、cimifugin) について薬物動態パラメータを算出することができた (表 9)。

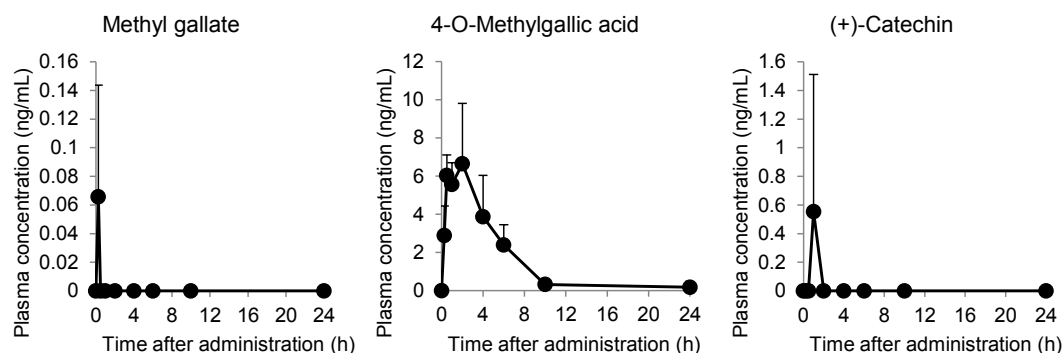
ボクソク成分のメチルガレート及びカテキンは十味敗毒湯投与後直ちに血中に検出されたが直ぐに消失した。一方、没食子酸 (gallic acid) 代謝物である 4-O-methylgallic acid は、 t_{\max} が 1.62 h で、その C_{\max} は 6.65 ng/ml を示し、その後速やかに消失した ($t_{1/2}=1.62$ h)。

カンゾウ成分では、グリシクマリン (glycycomarin) が十味敗毒湯投与後直ちに血中に検出されたが直ぐ消失した。また、ゲニステイン (genistein) は投与後直後 (0.25 h) に少し検出されたが直ぐに消失し、その後 24 時間目に再び検出されその時の血漿中濃度は 0.975 ng/mL であった。リクイリチン (liquiritin) は投与後速やかに検出され ($t_{\max}=0.25$ h)、その C_{\max} は 8.13 ng/ml を示し、その後速やかに消失した ($t_{1/2}=1.33$ h)。リクイリチゲニン (liquiritigenin) は投与後 2 峰性のピークを示した。 t_{\max} は一峰目の 0.25 h で、その C_{\max} は 1.5 ng/ml であった。消失半減期 ($t_{1/2}$) は少し長く 3.78 h を示した。イソリクイリチン (isoliquiritin) も投与後速やかに検出され ($t_{\max}=0.25$ h)、その C_{\max} は 1.69 ng/ml を示し、その後速やかに消失した ($t_{1/2}=1.53$ h)。イソリクイリチゲニン (isoliquiritigenin) は投与後 2 峰性のピークを示した。 t_{\max} は 2 峰目の 4.00 h、及びその C_{\max} は 1.02 ng/ml を示し、 $t_{1/2}$ は少し長く 2.52 h であった。フォルモノネチン (formononetin) も 2 峰性ピークを示し、その t_{\max} は 1 峰目 (0.25h) で C_{\max} は 0.164 ng/ml であった。 $t_{1/2}$ は比較的長く 6.21 h であった。カンゾウ由来成分の中で一番高濃度に検出された成分は、グルチルリチン酸の主要代謝物であるグリチルレチン酸であった。その t_{\max} は比較的遅く (6.00 h)、その C_{\max} は 287 ng/ml であり、その後の半減期 ($t_{1/2}$) も 7.36 h と遅かった。

ボウフウ成分として唯一検出されたシミフジン (cimifugin) は、本試験で検出された成分の中で一番高濃度に検出された成分であった。その t_{\max} は 1.00 h、 C_{\max} は 535 ng/ml を示し、半減期 ($t_{1/2}$) は 2.51 h であった。

なお、本試験では上述した成分以外はラット血漿中では定量できなかった。

ボクソク由来3成分



カンゾウ由来8成分

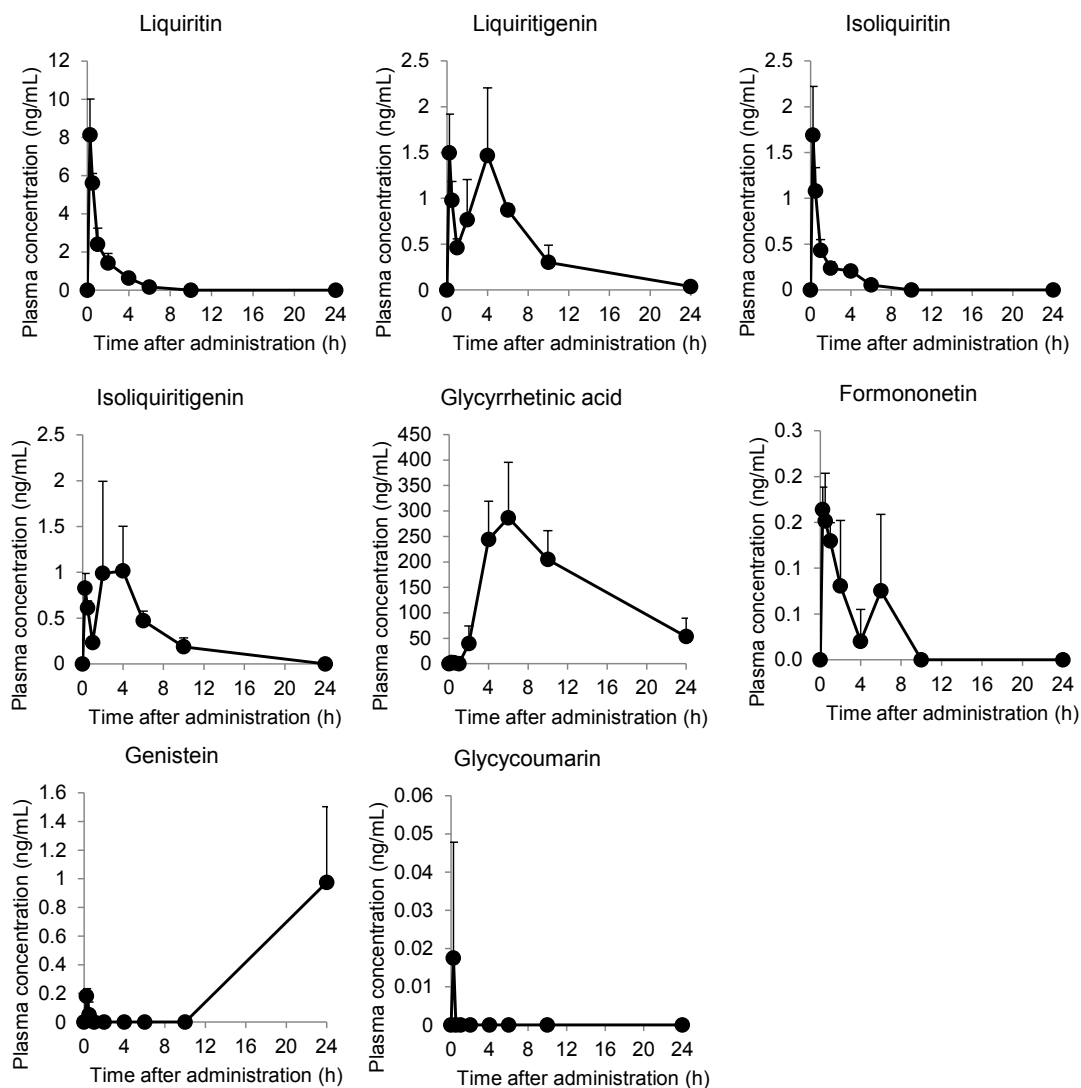


図 24-1. 十味敗毒湯エキス投与ラット血漿中から検出されたボクソク由来3成分及びカンゾウ由来8成分の時間-血漿中濃度推移グラフ

十味敗毒湯エキス (2 g/kg, n=3) 投与、0.25、0.5、1、2、4、6、10 及び 24 時間後の血漿中濃度を LC-MS/MS を用いて定量した。各時点 3 例のデータは平均値 ± 標準偏差で示した。

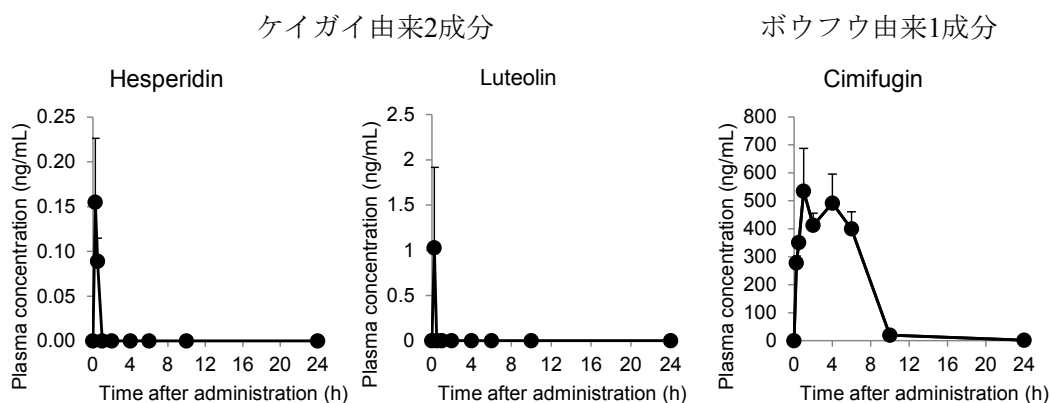


図 24-2. 十味敗毒湯エキス投与ラット血漿中から検出されたケイガイ由来 2 成分及びボウフウ由来 1 成分の時間-血漿中濃度推移グラフ

表 9. 血漿中から検出された化合物の薬物動態パラメータ

Compound_name	t_{\max} (h)	C_{\max} (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-last} (ng·h/mL)
ボクソク成分				
4-O-Methylgallic acid	2	6.65	1.62	32.7
カンゾウ成分				
Liquiritin	0.25	8.13	1.33	9.51
Liquiritigenin	0.25	1.5	3.87	10.8
Isoliquiritin	0.25	1.69	1.53	1.97
Isoliquiritigenin	4	1.02	2.52	5.92
Formonetin	0.25	0.164	6.21	0.547
Glycyrrhetic acid	6	287	7.36	3630
ボウフウ成分				
Cimifugin	1	535	2.51	3590

第3節

フラボノイド-グルクロン酸抱合体の血漿中薬物動態

本章第1節では、前章で抗ROS作用を示したカンゾウフラボノイド（リクイリチン、リクイリチゲニン、イソリクイリチン、イソリクイリチゲニン、ゲニステイン）及びケイガイフラボノイド（ヘスペレチン）などが十味敗毒湯に含まれていることを示した。しかし、本章前節（第2節）の十味敗毒湯投与ラットにおける血漿中濃度は低く、また、ヘスペレチンにおいては定量下限値以下であった。フラボノイドは生体内では主にグルクロン酸抱合体に変換される。一般的にはグルクロン酸抱合のような代謝を受けた成分は多くの場合その薬理活性が消失すると考えられている。しかし、抗ROS活性の実験で実証したように、フラボノイド-グルクロン酸抱合体はフラボノイド骨格のB環にグルクロン酸抱合を受けなければ、アグリコンと同様の活性が保持された（第2章・第3節参照）。そこで、前章では「血漿中ではどのタイプの抱合体がどの程度検出されるかを明らかにすることが重要である」ことを提起した。

本節ではその課題を解決するため、まずは十味敗毒湯を投与したラットの血漿血漿を β -グルクロニダーゼ処理することにより血漿中に存在する全体的なグルクロン酸抱合体の量を確認し、次いで血漿中のフラボノイドA環グルクロン酸抱合体及びフラボノイドB環グルクロン酸抱合体を定量し、それら成分の薬物動態解析を行った。

1. 実験方法

1.1. 被験物質

カンゾウ成分である liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin 及び isoliquiritigenin、ケイガイ成分である hesperetin 及び luteolin、ボクソク成分である quercetin 及び (+)-catechin の標準物質は、本章第1節表4と同じものを使用した。また、ボクソク成分の gallic acid の代謝物である 4-O-methylgallic acid は ChromaDex から入手した。

Isoliquiritigenin 4-*O*-glucuronide (ILQG-4G) は、株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部から入手、また、genistein 4'-*O*-glucuronide (GEN-4'G) は Toronto Research Chemical Industries (Toronto, ON, USA)、luteolin 7-*O*-glucuronide は Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Chengdu, Sichuan, China)、quercetin 3-*O*-glucuronide は WuXi AppTec (Shanghai, China) からそれぞれ購入した。その他のフラボノイド-グルクロン酸抱合体は、前章第 3 節の実験と同じものを用いた。

1.2. 試薬

β -グルクロニダーゼ (Type IX-A) は、Sigma-Aldrich から購入した。その他の試薬は、商業的供給源から購入した。

1.3. 実験動物

SD 系雄性ラットを日本エスエルシー株式会社 (SLC、Shizuoka, Japan) より購入し、7 週齢で本実験に使用した。動物は自由摂水、自由摂食、温度 23 ± 3 °C、湿度 55 ± 20 %、12 時間明暗サイクル (明期 7:00 – 19:00) の環境で飼育した。全ての実験は、株式会社ツムラの「動物実験に関するガイドライン」に従い、動物実験審査会の承認のもとで実施した。

1.4. 実験デザイン

約 16 時間絶食したラットに十味敗毒湯 (2 g/kg) を経口投与した。その後 1、6 及び 24 時間 (n = 3 / 各時点) にイソフルラン吸入麻酔下で腹部後大静脈よりヘパリン処理シリンジで採血し、遠心分離 (4°C, 1700 g, 15 min) より血漿を得た。

1.5. 血漿中フラボノイド定量法

未処理の血漿中フラボノイドは前節 1.4 項に記載した方法で定量した。 β -グルクロニダーゼ処理では、80 μ L の血漿 (検量線作成時はブランク血漿) に 50 μ L の β -グルクロニダーゼ溶液 (200 units/mL, pH: 6.8) を添加し、37°C で 2 時間インキュベーションした。この酵素反応は 500 μ L のメタノール又は 400 μ L の酢酸エチルを添加し停止させた。その溶液に 25 μ L のメタノール (検量線作成時は標準溶液)

を添加し、攪拌後、遠心分離（7,000 g、5 分間、室温）により得た上清の溶媒を窒素ガス流下（40°C）で留去した。残渣は、各フラボノイド測定（liquiritin、liquiritigenin、isoliquiritin、isoliquiritigenin、hesperetin、luteolin、quercetin、(+)-catechin 及び 4-*O*-methylgallic acid）に相当する HPLC 初期移動相（本章第 1 節表 5 及び 6 参照）の 50~100 μL で溶解し、その内 10 μL を各化合物分析用 LC-MS/MS システム（本章第 1 節表 5 及び 6 参照）に注入した。

1.6. 血漿中フラボノイド-グルクロン酸抱合体の定量法

前節の「1.3. 実験デザイン」と同様のスケジュール及び方法で十味敗毒湯（2 g/kg）を約 16 時間絶食したラットに経口投与し、投与前（ブランク）及び投与 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10 及び 24 時間（ $n = 3$ /各時間）後の血漿を得た。300 μL の各血漿サンプルに 60 μL のメタノール、25 μL の内標準溶液（niflumic acid 溶液）及び 800 μL のメタノールを添加した。検量線作成には 60 μL のメタノールの代わりに標準溶液、300 μL の血漿サンプルの代わりにブランク血漿を用いた。攪拌・遠心分離（7,000 g、5 分間、室温）により得た上清の溶媒は、窒素ガス流下（40°C）で留去した。残渣は、各化合物の分析条件（表 11）に記載した HPLC 初期移動相（50 μL ）で溶解し、その内 20 μL を LC-MS/MS システム：Agilent 1290（LC; Agilent）-TripleQuad6500（MS/MS; AB SCIEX）に注入した。表 10 には LC-MS/MS 分析で標的とした 10 種の抱合体成分及び内標準物質（IS：Niflumic acid）の MS イオンパラメータの設定値を示す。また、これら抱合体成分の HPLC 条件は表 11 に示す。

1.7. フラボノイド-グルクロン酸抱合体の血中薬物動態解析

フラボノイド-グルクロン酸抱合体の血漿中濃度データから前節と同じ方法で血漿薬物動態パラメータ（ C_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 及び $\text{AUC}_{0-\text{last}}$ ）を算出した。

表 10. LC-MS/MS 分析条件: 被験化合物のイオンパラメータ

Compound name	Q1Mass (<i>m/z</i>)	Q3Mass (<i>m/z</i>)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Liquiritigenin 4'- <i>O</i> -glucuronide	431.02	113	-80	-28	-19
Liquiritigenin 7- <i>O</i> -glucuronide	431.049	113	-75	-28	-17
Isoliquiritigenin 2'- <i>O</i> -glucuronide	431.041	254.8	-80	-26	-23
Isoliquiritigenin 4'- <i>O</i> -glucuronide	431.031	254.7	-85	-28	-15
Isoliquiritigenin 4- <i>O</i> -glucuronide	431.1	135	-85	-30	-1
Genistein 4'- <i>O</i> -glucuronide	445.06	113.1	-90	-26	-17
Genistein 7- <i>O</i> -glucuronide	445.072	269.1	-85	-30	-19
Hesperetin 7- <i>O</i> -glucuronide	477.016	301.1	-85	-34	-19
Luteolin 7- <i>O</i> -glucuronide	461.029	284.8	-90	-34	-15
Quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	477.029	301	-75	-32	-17
Niflumic acid (IS)	280.826	236.8	-20	-30	-15

各化合物の定量下限 : ILQG-4'G 及び ILQG-4G=0.05 ng/mL、GEN-4'G 及び GEN-7G=0.2 ng/mL、LQG-7G=0.5 ng/mL、LQG-4'G 及び LQG-2'G=1 ng/mL、HPT-7G=1.25 ng/mL、quercetin 3-*O*-glucuronide=2.5 ng/mL、luteolin 7-*O*-glucuronide=12.5 ng/mL. DP: declustering potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential.

表 11. LC-MS/MS 分析条件: HPLC 条件

HPLC condition
Column: Kinetex PFP column (100 × 2.1 mm I.D., 2.6- μ m particle size; Phenomenex, Torrance, CA)
Mobile phase (A) 0.2 vol % acetic acid, (B) acetonitrile containing 0.2 vol % acetic acid
Gradient elution program (% B in A):
0–10 min, 11%; 10–30 min, 11–40%; 30–30.01 min, 40–90%; 30.01–35 min, 90%; 35–35.01 min, 90–11%; 35.01–40 min, 11%
Other conditions were: flow rate, 0.35 mL/min; column temperature, 40°C

2. 実験結果

2.1. β -グルクロニダーゼ処理による血漿中フラボノイド濃度

図 25 には β -グルクロニダーゼ処理及び未処理の 9 種類の血漿中フラボノイド (アグリコン) 及び非フラボノイド成分 4-*O*-methylgallic acid の濃度を示す。測定に用いたサンプルは十味敗毒湯・経口投与 (2 g/kg) の 1、6 及び 24 時間後に採取した血漿である。本章第 2 節で示したように、酵素処理しないとフラボノイドの血漿中濃度は、各時点で低レベル (< 10 ng/mL) であった。しかし、 β -グルクロニダーゼ処理により、ほぼ全てのフラボノイド濃度が増加した。特に、リクイリチゲニン (liquiritigenin) は β -グルクロニダーゼ処理により 1 時間目の血漿で 0.460 ng/mL から 131 ng/mL、6 時間目の血漿で 0.873 ng/mL から 200 ng/mL、24 時間目の血漿で 0.0370 ng/mL から 10.1 ng/mL に上昇した。一方、非フラボノイドの 4-*O*-methylgallic acid (没食子酸 gallic acid の代謝物) は、 β -グルクロニダーゼ処理してもその濃度は殆ど変化しなかった。これらの結果は十味敗毒湯投与ラットの血漿ではフラボノイド-グルクロン酸抱合体が高濃度で存在することを示唆する。

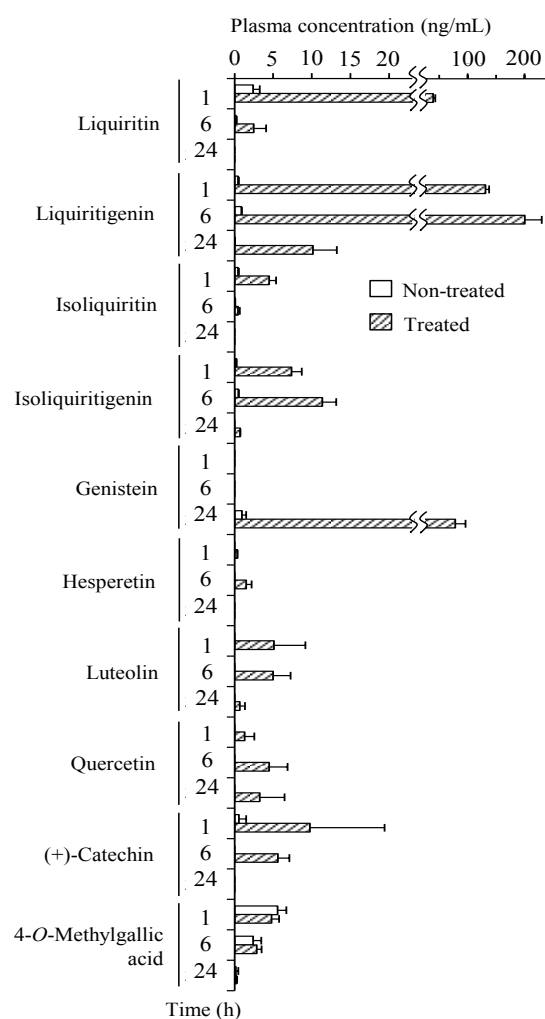


図 25. 十味敗毒湯投与ラットの血漿におけるグルクロン酸抱合体の検証

十味敗毒湯投与 (2 g/kg, n=3) 後、1、6 及び 24 時間の血漿について、 β -グルクロニダーゼで処理又は未処理時の成分濃度を LC-MS/MS で定量した。各時点の血漿中濃度は、3 例の平均値 \pm 標準誤差で示した。

2.2. フラボノイド-グルクロン抱合体の血漿中薬物動態

図 26 は十味敗毒湯 (2 g/kg) を経口投与したラットにおけるカンゾウフラボノイドのグルクロン酸抱合体 (リクイリチゲニンの抱合体 : liquiritigenin 4'-*O*-glucuronide、liquiritigenin 7-*O*-glucuronide、イソリクイリチゲニンの抱合体 : isoliquiritigenin 2'-*O*-glucuronide、isoliquiritigenin 4'-*O*-glucuronide、isoliquiritigenin 4-*O*-glucuronide、ゲニステインの抱合体 : genistein 7-*O*-glucuronide)、及びケイガイフラボノイドであるヘスペレチンのグルクロン酸抱合体 (hesperetin 7-*O*-glucuronide) の血漿中濃度推移を示す。また、それら抱合体成分の薬物動態パラメータを表 12 に示す。

リクイリチゲニン 4'-*O*-及び 7-*O*-の両抱合体は、いずれも十味敗毒湯投与後、二峰性のピークを示した。それらの最高血漿中濃度到達時間 (t_{\max}) は、いずれも二峰目の 2.00 h で、その最高血漿中濃度 (C_{\max}) は 4'-*O*-抱合体が 84.1 ng/mL、7-*O*-抱合体が 35.6 ng/mL であり 4'-*O*-抱合体の方が約 2.4 倍高かった。消失半減期 ($t_{1/2}$) はいずれも比較的速く、それぞれ 2.27 h 及び 2.72 h であった。

イソリクイリチゲニンの 2'-*O*-及び 4'-*O*-抱合体も十味敗毒湯投与後、二峰性のピークを示した。それらの t_{\max} は、いずれも一峰目の 0.25 h で、その C_{\max} は 2'-*O*-抱合体の 3.19 ng/mL に対し 4'-*O*-抱合体が 15.8 ng/mL を示し、4'-*O*-抱合体の方が約 5 倍高かった。 $t_{1/2}$ は 4'-*O*-抱合体のみ算出が可能で 2.25 h と早かった。また 4-*O*-抱合体は、4'-*O*-抱合体と同様、 t_{\max} は 0.25 h であったが、その C_{\max} (0.388 ng/mL) は 4-*O* 抱合体 (15.8 ng/mL) に比べ非常に低かった。

ゲニステインの 7-*O*-抱合体は、6 時間目までは全く検出されなかったが 10 時間目から急に高濃度 (48.7 ng/mL) で検出され、その濃度は 24 時間目まで維持した ($t_{1/2}$ は算出不可)。 t_{\max} は 24.0 h、 C_{\max} は 53.4 ng/mL であった。

ヘスペレチンの 7-*O*-抱合体も十味敗毒湯投与後二峰性のピークを示した。その t_{\max} は二峰目の 4.00 h で、 C_{\max} は 34.2 ng/mL、 $t_{1/2}$ は 2.99 h であった。

なお、本試験で測定対象とした 9 種の抱合体成分の内、上述した 7 種の抱合体成分以外のルテオリンの 7-*O*-抱合体及びケルセチンの 3-*O*-抱合体は残念ながら十味敗毒湯投与ラットの血漿中では検出・定量できなかった。

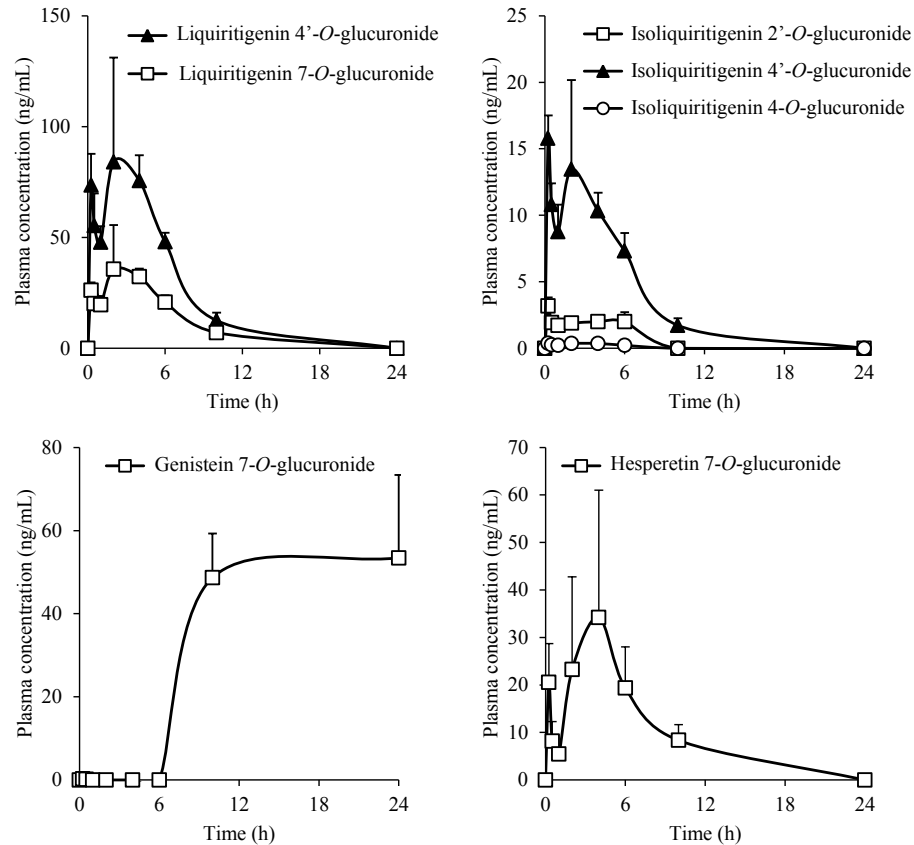


図 26. 十味敗毒湯投与ラットにおける血漿フラボノイド-グルクロン酸抱合体の濃度推移

リクイリチゲニン (liquiritigenin)、イソリクイリチン (isoliquiritigenin)、ゲニステイン (genistein) 及びヘスペレチン (hesperetin) の血漿グルクロン酸抱合体濃度は、十味敗毒湯 (2 g/kg) を経口投与した 0.25、0.5、1、2、4、6、10 及び 24 時間後の血漿を用いて定量した。各データは平均値±標準偏差で示した (n = 3)。

表 12. 血漿グルクロン酸抱合体の薬物動態パラメータ

Compound	t_{\max} (h)	C_{\max} (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-\text{last}}$ (ng·h/mL)
Liquiritigenin 4'-O-glucuronide	2.00	84.1	2.27	522
Liquiritigenin 7-O-glucuronide	2.00	35.6	2.72	223
Isoliquiritigenin 2'-O-glucuronide	0.250	3.19	-	11.6
Isoliquiritigenin 4'-O-glucuronide	0.250	15.8	2.25	80.8
Isoliquiritigenin 4-O-glucuronide	0.250	0.388	5.68	1.84
Genistein 7-O-glucuronide	24.0	53.4	-	812
Hesperetin 7-O-glucuronide	4.00	34.2	2.99	190

- : 算出不可。

考察

第1節ではボクソク及びそれを構成生薬の一つとする十味敗毒湯の主なエキス中含有成分濃度を調べた。ボクソクからは18成分が検出されたが、10種類の生薬から構成される十味敗毒湯では、ボクソクの絶対量が少ないため、4種の成分が定量限界以下であった。興味深いことは、ボクソクのエキス中成分含量の順位が十味敗毒湯で定量された順位と異なったことである(表7)。例えば、ボクソクで最高含量を示したカテキンは十味敗毒湯では5番目に下がり、ボクソクで4番目に高かったペンタガロイルグルコースは十味敗毒湯では1番高いボクソク成分として含有されていた。これは本研究で用いた単味のボクソクエキスと十味敗毒湯中のボクソクエキスのロットが異なる点も推察されるが、漢方薬中の成分量は混合生薬からの抽出過程で受ける成分間の相互作用による抽出効率に依存するとも云われている¹⁰⁴⁾。その要因の可能性は今後詳細に検討すべき課題であるが、今回の十味敗毒湯の成分含量結果からは、少なくとも前章(第2章)で示唆されたグルクロン酸抱合体を除く全ての活性成分(ペンタガロイルグルコース、リクイリチン、リクイリチゲニン、イソリクイリチン、イソリクイリチゲニン、ゲニステイン及びヘスペレチン)がエキス中に含まれていることが確認できた。しかし、これら成分が*in vitro*にて薬理活性を示しても、実際には未変化体のまま生体(血中)に吸収移行されるとは断定できない。例えば、十味敗毒湯に多量に含まれるカンゾウ主要成分であるグリチルリチン酸の未変化体は殆ど血中に移行せず、腸内細菌によって代謝され生成するグリチルレチン酸が血中に移行する⁹⁷⁾。この場合、血中で検出される代謝物グリチルレチン酸に薬理活性があることを確認する必要がある。また腸内細菌による代謝の影響は、十味敗毒湯に含まれるカンゾウ由来配糖体成分のリクイリチンやリクイリチンアピオシド、チンピ由来配糖体成分のヘスペリジンなどでも報告されており^{105, 106)}、これらの一部は腸内細菌によってアグリコンに変換され血中に移行する。その他、抱合体の問題や腸肝循環など様々な要因を考え合わせると、十味敗毒湯の活性成分の薬理作用を支持するためには、生体における漢方薬投与後の血漿成分の薬物動態を明らかにする必要がある。

そこで、第2節では十味敗毒湯を経口投与した際の血漿中成分の検出とその薬物動態試験についてラットを用いて検証した。この試験では第1節で検出した十

味敗毒湯含有成分に、想定される代謝物を含めた計 38 成分を標的として血漿中検出を試みたが、検出された成分は、ボクソク由来 3 成分（メチルガレート、4-*O*-メチル没食子酸、カテキン）、カンゾウ由来 8 成分（リクイリチン、リクイリチゲニン、イソリクイリチン、イソリクイリチゲニン、グリチルレチン酸、フォルモノネチン、グリシクマリニン、ゲニステイン）、ケイガイ由来 2 成分（ルテオリン、ヘスペリジン）、及びボウフウ由来 1 成分（シミフジン）であった。

強い抗テストステロン代謝作用（5 α リダクターゼ阻害作用：第 2 章・第 1 節）及び皮脂合成抑制作用（第 2 章・第 2 節）を示したボクソク成分のペンタガロイルグルコースは十味敗毒湯のエキス中には比較的高い濃度で含有されていたが、十味敗毒湯投与ラットの血漿中からは検出されなかった。本成分は、腸管上皮細胞（Caco-2 細胞）モデルで、細胞中のエステラーゼにより加水分解されることからバイオアベイラビリティーが低いと報告されている¹⁰⁷⁾。また、ペンタガロイルグルコースなどの加水分解型タンニンは、腸内細菌により没食子酸（gallic acid）に変換されることも報告されている^{94,108)}。これらの知見は、加水分解型タンニンであるペンタガロイルグルコースが未変化体としての血中に移行する可能性が低いことを示唆するが、一方で、本成分をラットの腹腔内に投与した際の血中濃度推移が報告されているのも事実である⁹⁸⁾。今回定量に用いた分析法の検出感度が低かった（定量下限値は 1,000 ng/mL）こともあり今後高感度分析法を確立し、再度血漿中での未変化体の有無を明確にする必要がある。またペンタガロイルグルコースの代謝物（gallic acid 及び 4-*O*-methylgallic acid）が後述する抗酸化活性を示す活性体であったことから、今後これら代謝物の抗テストステロン作用の有無についても検討し、ペンタガロイルグルコースのプロドラッグとしての可能性を明らかにする必要がある。

抗酸化作用（抗 ROS 活性：第 2 章・第 3 節）を示したカンゾウフラボノイド成分（リクイリチゲニン、イソリクイリチゲニン、ゲニステイン）及びケイガイ成分（ヘスペレチン）については、ヘスペレチンを除く 3 成分が十味敗毒湯投与後の血漿で検出され、これらの成分が相加ないし相乗作用にて抗 ROS 活性に關与している可能性が示唆された。唯一抗 RNS 活性が認められたボクソク由来成分の 4-*O*-メチル没食子酸（4-*O*-methylgallic acid：第 2 章・第 3 節）も血漿中で検出され、抗 RNS 活性の可能性が支持された。この成分自体は十味敗毒湯に含まれていないため、没食子酸（gallic acid）の代謝物として血中に現れたものと考えられる。本実験で用いたラットでは 4-*O*-メチル化代謝が主体であるが⁷²⁾、ヒトでは 3-*O*-メチル化代謝物の生成も確認されていることから¹⁰⁹⁾、今後 3-*O*-メチル化体の抗

RNS 活性についても検討する必要がある。

マクロファージ活性化作用（第 2 章・第 4 節）が示唆されたカンゾウ成分（リクイリチン、リクイリチゲニン、イソリクイリチン）及びボウフウ成分（シミフジン）の 4 成分（特にリクイリチゲニンとイソリクイリチンが強い活性を示した）のいずれも血漿中で検出されたことから、これら成分の相加・相乗作用がマクロファージ活性化に関与している可能性が推察される。

カンゾウ由来グリチルレチン酸はグルチルリチン酸の主代謝物であり¹¹⁰⁾、十味敗毒湯投与後の血漿でも高濃度に検出された成分である。本研究では尋常性痤瘡に関連する薬理作用は検討していないが、抗炎症作用¹¹¹⁾、抗アレルギー作用¹¹²⁾及び鎮痛作用¹¹³⁾などへの関与が報告されていることから、今後の尋常性痤瘡に対する研究が期待される。

本章終節（第 3 節）では、前章で問題提起したフラボノイド-グルクロン酸抱合体の血漿中濃度について検討した。十味敗毒湯投与ラットの血漿を β -グルクロニダーゼで処理することにより、リクイリチゲニン及びイソリクイリチンの血漿中濃度は、処理前と比較しそれぞれ 285 倍及び 31.5 倍に増加した（1 時間目）。また、ゲニステインの血漿中濃度も、処理前と比較し 80.3 倍に増加した（24 時間目）。さらに、ヘスペレチンの血漿中濃度は、処理前は定量下限値以下であったが、 β -グルクロニダーゼ処理により定量されるまでの濃度に増加した。これらの結果は、十味敗毒湯投与ラットの血漿中にアグリコンと比較して多量のフラボノイド-グルクロン酸抱合体が存在することを意味する。フラボノイド A 環グルクロン酸抱合体には抗 ROS 活性が保持されていたことから（第 2 章・第 3 節）、各種フラボノイド-グルクロン酸抱合体の血漿中濃度を直接測定したところ、活性体である A 環グルクロン酸抱合体、即ちリクイリチゲニン 7-O-抱合体、イソリクイリチゲニン 2'-O-及び 4'-O-抱合体、ゲニステイン 7-O-抱合体及びヘスペレチン 7-O-抱合体が検出された。これらの結果は、十味敗毒湯の抗 ROS 活性にはフラボノイドとその活性抱合体が相まって薬理活性を担っている可能性を示唆する。更に最近、フラボノイドの一種であるケルセチン（quercetin）のグルクロン酸抱合体が炎症による血管透過性亢進により炎症組織に入り、そこに局在するマクロファージの持つ β -グルクロニダーゼにより脱抱合されることが示された¹¹⁴⁾。この知見は、血管透過性及びマクロファージ集簇が亢進する炎症部位では、グルクロン酸抱合体が脱抱合され易くなり、活性型抱合体だけでなく非活性型抱合体の両方がアグリコンを炎症部位まで届けるキャリアーとなり得ることを推察させる。今回検出したフラボノイド-グルクロン酸抱合体に関してそのような可能性を明確にするため

にも、今後、炎症部位におけるグルクロン酸抱合体及びアグリコンの存在量について詳細に検討する必要がある。

十味敗毒湯は10種類の生薬で構成されている。本研究では十味敗毒湯投与後の血漿中から薬理活性を担うボクソク、ケイガイ、カンゾウ及びボウフウ由来成分のいくつかを検出することができたが、その他の構成生薬成分については薬理作用を含め、薬物動態を明確にすることができなかった。特に古典的に排膿消腫作用が謳われているキキョウには抗炎症作用¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾及びマクロファージ貪食能亢進作用¹¹⁸⁾などが報告されているが、このキキョウを含めた他の生薬由来成分の網羅的高感度測定法がまだ開発されていないのが現状である。おそらく十味敗毒湯の薬理作用には今回血中検出されなかった成分も含めた複合的な相加的あるいは相乗的作用が関与している可能性が推測され、今後漢方薬の配合理由を考える大きな課題として残る。

尋常性痤瘡治療において、十味敗毒湯（経口剤）はアダパレンや過酸化ベンゾイル等の西洋薬と併用される可能性が考えられる。これらの西洋薬は塗り薬であるため、その活性成分は未変化体として血中に移行しないと報告されている^{119, 120)}。このことから、その活性成分が十味敗毒湯由来成分の血中動態に直接的な影響を与えること、また逆に十味敗毒湯由来成分が西洋薬の活性成分に直接的な影響を与えることは殆どないと推察されるが、これまでに薬物相互作用に関する研究が全く報告されていないことから注意を払う必要がある。

また、十味敗毒湯は経口投与で用いられる。従って、皮膚に塗布した場合は経口投与のような活性代謝物（4-O-methylgallic acid）による抗酸化作用（NO生成阻害作用）は期待できない。

以上、本章では、十味敗毒湯を経口投与したラットにおいてエキス中に含まれる成分やそれら由来の活性代謝物及び抱合体などの血中移行性を薬物動態的に解明し、それらが活性成分として薬理作用を担っている可能性を実証した。ニキビに用いる漢方薬には十味敗毒湯の他に清上防風湯、桂枝茯苓丸加薏苡仁、荊芥連翹湯などがある。これらの漢方薬には十味敗毒湯と同様な生薬が一部構成生薬として配合されていることから、本報で得た知見や技術は、今後、これら漢方薬の研究にも活用される基礎知見でもある。

小括

十味敗毒湯のエキス中にはフラボノイドやタンニン類が豊富に含まれている。これら成分を含む十味敗毒湯をラットに経口投与投薬したところ、その血漿中には、活性成分として推定したフラボノイド、活性型代謝物及びグルクロン酸抱合体が検出された。これらの結果は、これまで検証した十味敗毒湯の尋常性座瘡改善メカニズムの多様性を担う活性成分として、これらの成分が寄与している可能性を強く支持した。

総括

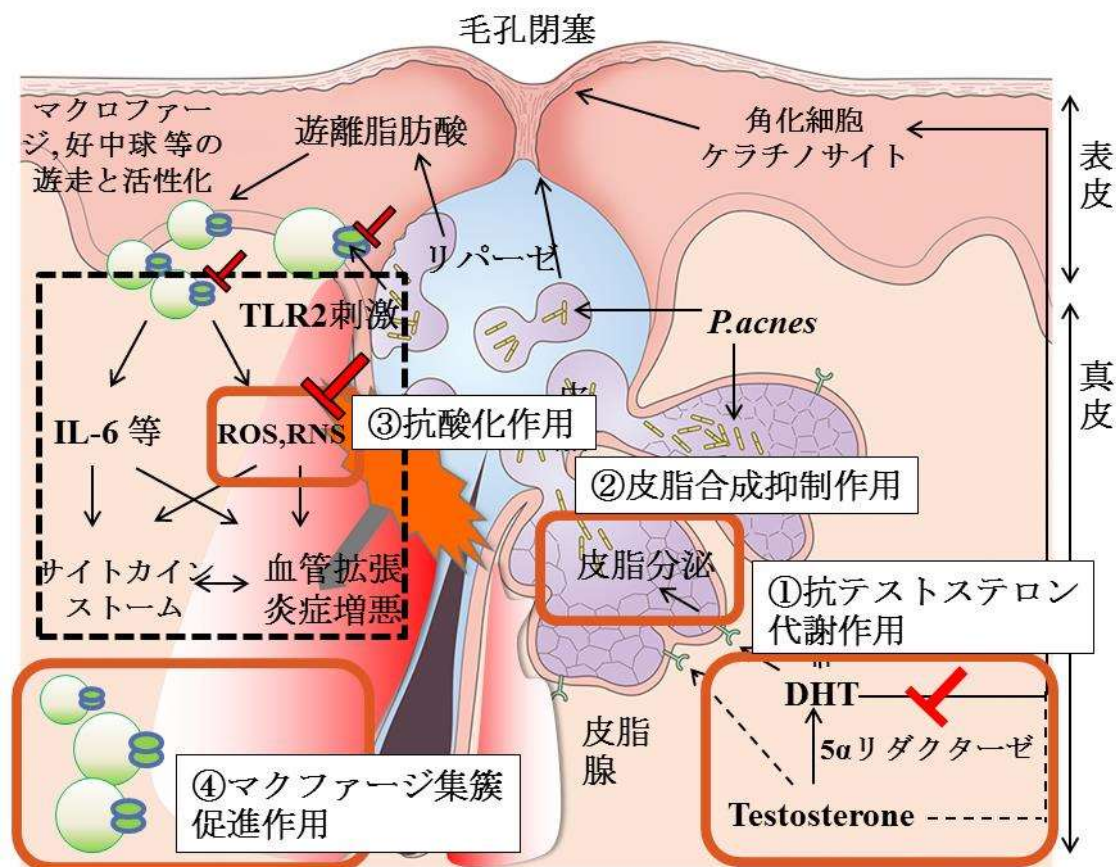
尋常性痤瘡（ニキビ）は、思春期に多く発症し、軽症のものを含めると成人の90%以上がこの疾患を経験している¹⁰⁾。尋常性痤瘡は前段階の微小面皰を起点として非炎症性皮疹及び炎症性皮疹へと進行する^{10,11)}。ニキビは軽症（非炎症性皮疹）でも見た目に現れ、重症化により癬痕形成にも至ることから、痤瘡患者の生活の質（Quality of life : QOL）を低下させる。

現在のニキビ治療には、毛包角化正常化剤、皮脂腺機能阻害剤、抗菌剤及び抗炎症剤が主に使用されている¹²⁾。しかし、面皰形成から炎症皮疹が混在する個々の病変では、炎症抑制などの対症療法に加え抗菌・殺菌・抗男性ホルモンなどの発症に対する原因療法が併用される。ニキビ治療の主薬剤であるレチノイド製剤は、皮膚刺激などの副作用のため治療計画の完遂が困難とされ、抗生剤は耐性菌出現問題のため使用法に制限が課せられている。昨年国内で認可された新薬のベンゾイル製剤は高い効果があるものの、ニキビを完治するに至らない。つまり、ニキビ治療薬は医療現場のニーズに十分に応えていない現状がある。本論文に取り上げた十味敗毒湯は、10種の生薬（桔梗、柴胡、川芎、茯苓、樸椒、独活、防風、甘草、荊芥、生姜）から構成される漢方薬であり、化膿性皮膚疾患・急性皮膚疾患などに処方され、ニキビ患者の皮疹改善に用いられている³⁾。十味敗毒湯の有効性を理解した皮膚科医は、他剤併用を含めニキビ患者に対し積極的に処方し、その効果を実感している。十味敗毒湯は、西洋薬が単一効果を示すのに対し、多成分系薬剤であることから毛包角化抑制、皮脂分泌抑制、抗テストステロン代謝作用、抗酸化・抗炎症作用及び炎症性細胞遊走作用など多様な作用が示唆されている^{43-45, 64)}。しかし、残念ながらこれらのメカニズムは主に漢方薬（合剤）エキスの *in vitro* 実験に基づくものであり、効果はあってもそれを裏付ける活性成分やその血中移行性などの薬理機序を証明した科学的エビデンスがまだ伴っていないのが現状である。

そこで、本研究では「十味敗毒湯の尋常性痤瘡改善作用とその作用機序」を解明するため、アクネ菌誘発痤瘡モデルを用いた薬効研究（第1章）、抗テストステロン代謝、皮脂合成抑制、抗酸化・抗炎症反応及びマクロファージ集簇作用を含めた作用機序研究（第2章）、及びそれらの薬効メカニズムを担う活性成分の同定とその血中薬物動態（第3章）を詳細に検討し、以下の新知見を得た。

1. 第 1 章では、十味敗毒湯がアクネ菌誘発急性炎症（耳介腫脹）を抑制することを実証した。また、耳介の病理組織像からマクロファージ集簇・貪食促進作用などの関与が示唆された。
2. 第 2 章では、作用機序について図 27 に示す以下の知見を明らかにした。
 - ① 抗テストステロン代謝について、構成生薬の一つであるボクソクが十味敗毒湯の 5 α リダクターゼ活性阻害を担う活性生薬であり、その作用には 9 種のタンニン成分が関与し、その中でペンタガロイルグルコースが最も強い活性成分であることを明らかにした。
 - ② 皮脂合成抑制作用について、ボクソク及びペンタガロイルグルコースはテストステロン及びインスリン誘発皮脂合成を阻害した。その作用は 5 α リダクターゼ阻害作用に加え、同酵素非依存的な作用が認められた。
 - ③ 抗酸化・抗炎症反応について、十味敗毒湯の抗炎症作用にはカンゾウ成分（リクイリチゲニン、イソリクイリチゲニン、ゲニステイン）及びそれらの A 環抱合体（liquiritigenin 7-*O*-glucuronide、isoliquiritigenin 2'-*O*-glucuronide、isoliquiritigenin 4'-*O*-glucuronide、genistein 7-*O*-glucuronide）並びにケイガイ成分（ヘスペレチン）及びその A 環抱合体（hesperetin 7-*O*-glucuronide）の抗活性酸素種（ROS）作用、及びボクソク由来成分 4-*O*-methylgallic acid の抗活性窒素種（RNS）作用が関与する可能性を見出した。
 - ④ 炎症性皮疹の組織修復促進作用について、十味敗毒湯投与による膿瘍周囲のマクロファージ集簇促進作用は、炎症病巣に引き寄せられた単球のマクロファージへの分化増強作用によるものであり、その作用にはカンゾウフラボノイドのリクイリチゲニン及びイソリクイリチンが活性成分として見出された。
3. 第 3 章では、十味敗毒湯のエキス中成分含量及び投与ラットの血漿中成分定量を行い、十味敗毒湯のエキス中にはフラボノイドやタンニン類が豊富に含まれていることを明らかにした。十味敗毒湯をラットに経口投与したところ、その血漿中には、活性成分として推定したフラボノイド、活性代謝物及びグルクロン酸抱合体が検出された。これらの結果は、これまで検証した十味敗毒湯の尋常性痤瘡に対するメカニズムの多様性を担う活性成分として、これらの成分が十味敗毒湯の作用を担っている可能性を強く支持した。

以上、尋常性痤瘡に対する十味敗毒湯の治療効果には、多成分系で構成される漢方薬特有の多様なメカニズムが関与し、病態の発症と進行の各ステージに薬効を示す可能性がある。本研究で解明した十味敗毒湯の作用機序は、既存のニキビ治療薬とは全く異なるユニークな作用である。本研究の成果は、今後の更なる研究の基盤になると共に、尋常性痤瘡に悩んでいる多くの患者の治療に貢献するものと考えられる。



十味敗毒湯作用	活性生薬	活性成分
① 抗テストステロン代謝作用	ボクソク	ペンタガロイルグルコース
② 皮脂合成抑制作用	ボクソク	ペンタガロイルグルコース
③ 抗酸化 (抗ROS及び抗RNS作用)	カンゾウ ケイガイ ボクソク	フラボノイドと活性型グルクロン酸抱合体及び4-O-メチル化没食子酸
④ マクファージ集簇促進作用	カンゾウ	リクイリチゲニン及びイソリクイリチン

図 27. 尋常性痤瘡治療における十味敗毒湯の各作用点と活性成分

引用文献

- 1) ツムラインインタビューフォーム. 漢方製剤 ツムラ十味敗毒湯エキス顆粒(医療用)
TSUMURA Jumihaidokuto Extract Granules for Ethical Use. *医薬品インタビュー
フォーム* **2014**.
- 2) ツムラ添付文書. 漢方製剤 ツムラ十味敗毒湯エキス顆粒(医療用). *添付文書*
2009.
- 3) Higaki, S.; Toyomoto, T.; Morohashi, M. Seijo-bofu-to, Jumi-haidoku-to and
Toki-shakuyaku-san suppress rashes and incidental symptoms in acne patients. *Drugs
Exp Clin Res* **2002**. 28: 193-196.
- 4) 大熊守也. 尋常性痤瘡の漢方内服・外用剤併用療法. *和漢医薬学会誌* **1993**. 10:
131-134.
- 5) 赤松浩彦・他. 十味敗毒湯の好中球機能に及ぼす影響について. *和漢医薬学雑
誌* **1994**. 11: 452-453.
- 6) 赤松浩彦・他. 漢方製剤の活性酸素に及ぼす影響. *医学書院* **1994**. *皮膚科にお
ける漢方治療の現況* 5: 35-45.
- 7) 廣井健治・他. 清熱剤による炎症性サイトカイン mRNA の調節作用と, それの
比較による証の免疫学的分析の試み ―ケラチノサイトを用いた実験系―. *医
学書院* **1997**. *皮膚科における漢方治療の現況* 9: 95-102.
- 8) 丸山博文・他. 十味敗毒湯 (TJ-6) および柴胡清肝湯 (TJ-80) の抗アレルギー
作用. *薬理と治療* **1995**. 23: 2257-2261.
- 9) Nose, M.; Sakushima, J.; Harada, D.; Ogihara, Y. Comparison of
immunopharmacological actions of 8 kinds of kampo-hozais clinically used in atopic
dermatitis on delayed-type hypersensitivity in mice. *Biol Pharm Bull* **1999**. 22:
48-54.
- 10) 清水宏. あたらしい皮膚科学. *中山書店* **2015**. 第2版: 342.
- 11) Kurokawa, I.; Danby, F. W.; Ju, Q.; Wang, X.; Xiang, L. F.; Xia, L.; Chen, W.; Nagy,
I.; Picardo, M.; Suh, D. H.; Ganceviciene, R.; Schagen, S.; Tsatsou, F.; Zouboulis, C.
C. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment.
Experimental dermatology **2009**. 18: 821-832.
- 12) Beers, M. H. ・他. メルクマニュアル 第18版 日本語版. *日経BP社* **2006**.
- 13) Christos C. Zouboulis, A. K., Albert M. Kligman. Pathogenesis and Treatment of
Acne and Rosacea. *Springer* **2014**.

- 14) Kim, J.; Ochoa, M. T.; Krutzik, S. R.; Takeuchi, O.; Uematsu, S.; Legaspi, A. J.; Brightbill, H. D.; Holland, D.; Cunliffe, W. J.; Akira, S.; Sieling, P. A.; Godowski, P. J.; Modlin, R. L. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* **2002**. *169*: 1535-1541.
- 15) Holland, K. T.; Ingham, E.; Cunliffe, W. J. A review, the microbiology of acne. *The Journal of applied bacteriology* **1981**. *51*: 195-215.
- 16) Chiu, A.; Chon, S. Y.; Kimball, A. B. The response of skin disease to stress: changes in the severity of acne vulgaris as affected by examination stress. *Archives of dermatology* **2003**. *139*: 897-900.
- 17) Evolahti, A.; Hulterantz, M.; Collins, A. Women's work stress and cortisol levels: a longitudinal study of the association between the psychosocial work environment and serum cortisol. *Journal of psychosomatic research* **2006**. *61*: 645-652.
- 18) Nieves, N. J.; Ahrens, J. M.; Plum, L. A.; DeLuca, H. F.; Clagett-Dame, M. Identification of a unique subset of 2-methylene-19-nor analogs of vitamin D with comedolytic activity in the rhino mouse. *The Journal of investigative dermatology* **2010**. *130*: 2359-2367.
- 19) Bernard, B. A. Adapalene, a new chemical entity with retinoid activity. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* **1993**. *6 Suppl 1*: 61-69.
- 20) De Young, L. M.; Young, J. M.; Ballaron, S. J.; Spires, D. A.; Puhvel, S. M. Intradermal injection of Propionibacterium acnes: a model of inflammation relevant to acne. *The Journal of investigative dermatology* **1984**. *83*: 394-398.
- 21) Chaudhary, N. I.; Schnapp, A.; Park, J. E. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* **2006**. *173*: 769-776.
- 22) Webster, G. F.; Leyden, J. J. Characterization of serum-independent polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors produced by Propionibacterium acnes. *Inflammation* **1980**. *4*: 261-269.
- 23) Burkhart, C. G.; Burkhart, C. N.; Lehmann, P. F. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *Postgraduate medical journal* **1999**. *75*: 328-331.
- 24) Mourelatos, K.; Eady, E. A.; Cunliffe, W. J.; Clark, S. M.; Cove, J. H. Temporal changes in sebum excretion and propionibacterial colonization in preadolescent children with and without acne. *The British journal of dermatology* **2007**. *156*: 22-31.

- 25) Iinuma, K.; Sato, T.; Akimoto, N.; Noguchi, N.; Sasatsu, M.; Nishijima, S.; Kurokawa, I.; Ito, A. Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands in vivo and in vitro. *The Journal of investigative dermatology* **2009**. *129*: 2113-2119.
- 26) Vowels, B. R.; Yang, S.; Leyden, J. J. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun* **1995**. *63*: 3158-3165.
- 27) Nagy, I.; Pivarsci, A.; Kis, K.; Koreck, A.; Bodai, L.; McDowell, A.; Seltsmann, H.; Patrick, S.; Zouboulis, C. C.; Kemeny, L. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2006**. *8*: 2195-2205.
- 28) Puhvel, S. M.; Reisner, R. M. The production of hyaluronidase (hyaluronate lyase) by *Corynebacterium acnes*. *The Journal of investigative dermatology* **1972**. *58*: 66-70.
- 29) Hoeffler, U.; Ko, H. L.; Pulverer, G. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and related microbial species. *Antimicrob Agents Chemother* **1976**. *10*: 387-394.
- 30) Hoeffler, U. Enzymatic and hemolytic properties of *Propionibacterium acnes* and related bacteria. *Journal of clinical microbiology* **1977**. *6*: 555-558.
- 31) Ingham, E.; Holland, K. T.; Gowland, G.; Cunliffe, W. J. Purification and partial characterization of an acid phosphatase (EC 3.1.3.2) produced by *Propionibacterium acnes*. *Journal of general microbiology* **1980**. *118*: 59-65.
- 32) Grange, P. A.; Chereau, C.; Raingeaud, J.; Nicco, C.; Weill, B.; Dupin, N.; Batteux, F. Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes*-induced inflammation of the skin. *PLoS pathogens* **2009**. *5*: e1000527.
- 33) Fox, S.; Leitch, A. E.; Duffin, R.; Haslett, C.; Rossi, A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity* **2010**. *2*: 216-227.
- 34) Lolis, M. S.; Bowe, W. P.; Shalita, A. R. Acne and systemic disease. *The Medical clinics of North America* **2009**. *93*: 1161-1181.
- 35) Khondker, L.; Khan, S. I. Acne vulgaris related to androgens - a review. *Mymensingh medical journal : MMJ* **2014**. *23*: 181-185.
- 36) Arora, M. K.; Yadav, A.; Saini, V. Role of hormones in acne vulgaris. *Clin Biochem*

2011. 44: 1035-1040.

- 37) Layton, A. M. Optimal management of acne to prevent scarring and psychological sequelae. *American journal of clinical dermatology* **2001**. 2: 135-141.
- 38) Alvarez-Sanchez, M.; Rodriguez-Ayala, E.; Ponce-Olivera, R. M.; Tirado-Sanchez, A.; Arellano-Mendoza, M. I. Bacterial resistance in acne? A meta-analysis of the controversy. *Cirugia y cirujanos* **2016**. 84: 190-195.
- 39) Kim, J. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology* **2005**. 211: 193-198.
- 40) Akamatsu, H.; Horio, T. The possible role of reactive oxygen species generated by neutrophils in mediating acne inflammation. *Dermatology* **1998**. 196: 82-85.
- 41) Holland, D. B.; Jeremy, A. H.; Roberts, S. G.; Seukeran, D. C.; Layton, A. M.; Cunliffe, W. J. Inflammation in acne scarring: a comparison of the responses in lesions from patients prone and not prone to scar. *The British journal of dermatology* **2004**. 150: 72-81.
- 42) Sekiguchi, K.; Koseki, J.; Tsuchiya, K.; Matsubara, Y.; Iizuka, S.; Imamura, S.; Matsumoto, T.; Watanabe, J.; Kaneko, A.; Aiba, S.; Yamasaki, K. Suppression of Propionibacterium acnes-Induced Dermatitis by a Traditional Japanese Medicine, Jumi-haidokuto, Modifying Macrophage Functions. *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**. 2015: 439258.
- 43) 金子篤, 関口協二, 小瀬木順一, 西村浩昭, 服部智久, 加瀬義夫 尋常性ざ瘡に対する十味敗毒湯の多標的作用. *新薬と臨牀* **2014**. 63: 1436-1447.
- 44) Higaki, S.; Nakamura, M.; Kitagawa, T.; Morohashi, M.; Yamagishi, T. Effect of lipase activities of Propionibacterium granulosum and Propionibacterium acnes. *Drugs Exp Clin Res* **2001**. 27: 161-164.
- 45) Higaki, S.; Kitagawa, T.; Kagoura, M.; Morohashi, M.; Yamagishi, T. Relationship between Propionibacterium acnes biotypes and Jumi-haidoku-to. *J Dermatol* **2000**. 27: 635-638.
- Handelsman, D. J., (2000). Androgen Physiology, Pharmacology and Abuse. In: De Groot, L. J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J. M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R. and others, eds. Endotext. South Dartmouth (MA).
- 47) Mauvais-Jarvis, P. Regulation of androgen receptor and 5 alpha-reductase in the skin

- of normal and hirsute women. *Clinics in endocrinology and metabolism* **1986**. *15*: 307-317.
- 48) Zouboulis, C. C. Sebaceous gland receptors. *Dermato-endocrinology* **2009**. *1*: 77-80.
- 49) Lakshmi, C. Hormone therapy in acne. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* **2013**. *79*: 322-337.
- 50) Fritsch, M.; Orfanos, C. E.; Zouboulis, C. C. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *The Journal of investigative dermatology* **2001**. *116*: 793-800.
- 51) Seiffert, K.; Seltmann, H.; Fritsch, M.; Zouboulis, C. C. Inhibition of 5alpha-reductase activity in SZ95 sebocytes and HaCaT keratinocytes in vitro. *Horm Metab Res* **2007**. *39*: 141-148.
- 52) Lee, Y. S.; Kim, J. K.; Bae, Y. S.; Won, M. H.; Kang, I. J.; Lim, S. S. Inhibitory effect of glucodistylin from the bark of *Quercus acutissima* on human recombinant aldose reductase and sorbitol accumulation. *Archives of pharmacal research* **2011**. *34*: 211-215.
- 53) Zeng, X. L.; Fu, G. M.; Tian, K.; Sun, J. X.; Xiong, H. B.; Huang, X. Z.; Jiang, Z. Y. Acutissimanide, a new lignan with antioxidant activity isolated from the bark of *Quercus acutissima* Carruth. *Natural product research* **2014**. *28*: 1364-1370.
- 54) Ishimaru, K.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Phenolic glucoside gallates from *Quercus mongolica* and *Q. acutissima*. *Phytochemistry* **1987**. *26*.
- 55) Ishimaru, K.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. LV. Isolation and characterization of Acutissimins A and B, novel tannins from *Quercus* and *Castanea* species. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1987**. *35*.
- 56) Tanaka, N.; Shimomura, K.; Ishimaru, K. Tannin production in callus cultures of *Quercus acutissima*. *Phytochemistry* **1995**. *40*.
- 57) Lee, H. H.; Ho, C. T.; Lin, J. K. Theaflavin-3,3'-digallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit rat liver microsomal 5alpha-reductase activity and the expression of androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **2004**. *25*: 1109-1118.
- 58) Mounier, C.; Posner, B. I. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* **2006**. *84*: 713-724.
- 59) Ebling, F. J. Androgens and the Skin. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **1964**. *57*: 525-527.

- 60) Pochi, P. E.; Strauss, J. S. Sebaceous gland response in man to the administration of testosterone, delta-4-androstenedione, and dehydroisoandrosterone. *The Journal of investigative dermatology* **1969**. 52: 32-36.
- 61) Giltay, E. J.; Gooren, L. J. Effects of sex steroid deprivation/administration on hair growth and skin sebum production in transsexual males and females. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**. 85: 2913-2921.
- 62) Li, C.; Jackson, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American journal of physiology. Cell physiology* **2002**. 282: C227-241.
- 63) Kono, H.; Onda, A.; Yanagida, T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Current opinion in immunology* **2014**. 26: 147-156.
- 64) 松原陽佑, 関口協二, 小瀬木順一, 土屋和明, 金子篤, 服部智久, 加瀬義夫. 急性皮膚炎動物モデルにおける十味敗毒湯の皮膚炎抑制作用. *薬理と治療* **2015**. 43: 791 -798.
- 65) Harada, M.; Kan, Y.; Naoki, H.; Fukui, Y.; Kageyama, N.; Nakai, M.; Miki, W.; Kiso, Y. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci Biotechnol Biochem* **1999**. 63: 973-977.
- 66) Sfakianos, J.; Coward, L.; Kirk, M.; Barnes, S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of nutrition* **1997**. 127: 1260-1268.
- 67) Soucy, N. V.; Parkinson, H. D.; Sochaski, M. A.; Borghoff, S. J. Kinetics of genistein and its conjugated metabolites in pregnant Sprague-Dawley rats following single and repeated genistein administration. *Toxicol Sci* **2006**. 90: 230-240.
- 68) Moon, J. H.; Tsushida, T.; Nakahara, K.; Terao, J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med* **2001**. 30: 1274-1285.
- 69) Burda, S.; Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* **2001**. 49: 2774-2779.
- 70) Raggi, M. A.; Bugamelli, F.; Nobile, L.; Schiavone, P.; Cantelli-Forti, G. HPLC determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in biological fluids, after licorice extract administration to humans and rats. *Boll Chim Farm* **1994**. 133: 704-708.
- 71) Wang, X.; Wang, Z.; Sun, H.; Lv, H.; Guan, H.; Meng, X.; Zhang, G.; Cao, H. Pharmacokinetics of cimifugin in rat plasma after oral administration of the extract of

- Saposhnikovia divaricatae root. Determination of cimifugin by high performance liquid chromatography coupled with solid phase extraction. *Arzneimittelforschung* **2008**. 58: 445-450.
- 72) Zong, L.; Inoue, M.; Nose, M.; Kojima, K.; Sakaguchi, N.; Isuzugawa, K.; Takeda, T.; Ogihara, Y. Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats. *Biol Pharm Bull* **1999**. 22: 326-329.
- 73) Alzoughaibi, M. A.; Zubaidi, A. M. Upregulation of the proinflammatory cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in rats' intestinal anastomotic wound healing—does it matter? *Asian journal of surgery / Asian Surgical Association* **2014**. 37: 86-92.
- 74) Guzik, K.; Bzowska, M.; Smagur, J.; Krupa, O.; Sieprawska, M.; Travis, J.; Potempa, J. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell death and differentiation* **2007**. 14: 171-182.
- 75) El-Awady, M. K.; El-Garf, W.; El-Houssieny, L. Steroid 5alpha reductase mRNA type 1 is differentially regulated by androgens and glucocorticoids in the rat liver. *Endocrine journal* **2004**. 51: 37-46.
- 76) Boonmuen, N.; Gong, P.; Ali, Z.; Chittiboyina, A. G.; Khan, I.; Doerge, D. R.; Helferich, W. G.; Carlson, K. E.; Martin, T.; Piyachaturawat, P.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. Licorice root components in dietary supplements are selective estrogen receptor modulators with a spectrum of estrogenic and anti-estrogenic activities. *Steroids* **2016**. 105: 42-49.
- 77) Xu, S. L.; Bi, C. W.; Choi, R. C.; Zhu, K. Y.; Miernisha, A.; Dong, T. T.; Tsim, K. W. Flavonoids induce the synthesis and secretion of neurotrophic factors in cultured rat astrocytes: a signaling response mediated by estrogen receptor. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**. 2013: 127075.
- 78) Liu, L.; Xu, D. M.; Cheng, Y. Y. Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. *J Agric Food Chem* **2008**. 56: 824-829.
- 79) Zhao, W. H.; Gao, L. F.; Gao, W.; Yuan, Y. S.; Gao, C. C.; Cao, L. G.; Hu, Z. Z.; Guo, J. Q.; Zhang, Y. X. Weight-reducing effect of *Acer truncatum* Bunge may be related to the inhibition of fatty acid synthase. *Natural product research* **2011**. 25: 422-431.
- 80) Li, Y.; Kim, J.; Li, J.; Liu, F.; Liu, X.; Himmeldirk, K.; Ren, Y.; Wagner, T. E.; Chen, X. Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-D-glucopyranose binds

- to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**. 336: 430-437.
- 81) Webster, G. F. Inflammatory acne. *International journal of dermatology* **1990**. 29: 313-317.
- 82) Picardo, M.; Ottaviani, M.; Camera, E.; Mastrofrancesco, A. Sebaceous gland lipids. *Dermato-endocrinology* **2009**. 1: 68-71.
- 83) Brune, B.; Dehne, N.; Grossmann, N.; Jung, M.; Namgaladze, D.; Schmid, T.; von Knethen, A.; Weigert, A. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxidants & redox signaling* **2013**. 19: 595-637.
- 84) Asl, M. N.; Hosseinzadeh, H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res* **2008**. 22: 709-724.
- 85) Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol* **2015**. 294: 63-69.
- 86) Takahashi, T.; Kobori, M.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **1998**. 62: 2199-2204.
- 87) Constantinou, A.; Kiguchi, K.; Huberman, E. Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* **1990**. 50: 2618-2624.
- 88) Sato, F.; Matsukawa, Y.; Matsumoto, K.; Nishino, H.; Sakai, T. Apigenin induces morphological differentiation and G2-M arrest in rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**. 204: 578-584.
- 89) McCabe, M. J., Jr.; Orrenius, S. Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**. 194: 944-950.
- 90) Makishima, M.; Honma, Y.; Hozumi, M.; Sampi, K.; Hattori, M.; Umezawa, K.; Motoyoshi, K. Effects of inhibitors of protein tyrosine kinase activity and/or phosphatidylinositol turnover on differentiation of some human myelomonocytic leukemia cells. *Leukemia research* **1991**. 15: 701-708.
- 91) Fiegel, V. G. Comparative studies of effects and side effects of hydrocortisone, prednisone, triamcinolone and dexamethasone. *Arzneimittelforschung* **1975**. 25: 560-563.

- 92) Lee, Y. K.; Chin, Y. W.; Bae, J. K.; Seo, J. S.; Choi, Y. H. Pharmacokinetics of isoliquiritigenin and its metabolites in rats: low bioavailability is primarily due to the hepatic and intestinal metabolism. *Planta Med* **2013**. *79*: 1656-1665.
- 93) Kang, H. E.; Kim, Y. W.; Sohn, S. I.; Baek, S. R.; Lee, J. W.; Kim, S. G.; Lee, I.; Lee, M. G. Pharmacokinetics of liquiritigenin and its two glucuronides, M1 and M2, in rats with acute hepatitis induced by d-galactosamine/lipopolysaccharide or CCl₄. *Xenobiotica* **2010**. *40*: 424-436.
- 94) Jiamboonsri, P.; Pithayanukul, P.; Bavovada, R.; Gao, S.; Hu, M. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of methyl gallate and pentagalloyl glucopyranose: application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2015**. *986-987*: 12-17.
- 95) Zhao, W. M.; Jiang, S. W.; Chen, Y.; Zhong, Z. Y.; Wang, Z. J.; Zhang, M.; Li, Y.; Xu, P.; Liu, L.; Liu, X. D. Laminaria japonica increases plasma exposure of glycyrrhetic acid following oral administration of Licorice extract in rats. *Chin J Nat Med* **2015**. *13*: 540-549.
- 96) Kaifuchi, N.; Omiya, Y.; Kushida, H.; Fukutake, M.; Nishimura, H.; Kase, Y. Effects of shakuyakukanzoto and its absorbed components on twitch contractions induced by physiological Ca²⁺ release in rat skeletal muscle. *J Nat Med* **2015**. *69*: 287-295.
- 97) Kitagawa, H.; Munekage, M.; Matsumoto, T.; Sadakane, C.; Fukutake, M.; Aoki, K.; Watanabe, J.; Maemura, K.; Hattori, T.; Kase, Y.; Uezono, Y.; Inui, A.; Hanazaki, K. Pharmacokinetic Profiles of Active Ingredients and Its Metabolites Derived from Rikkunshito, a Ghrelin Enhancer, in Healthy Japanese Volunteers: A Cross-Over, Randomized Study. *PLoS One* **2015**. *10*: e0133159.
- 98) Li, L.; Shaik, A. A.; Zhang, J.; Nhkata, K.; Wang, L.; Zhang, Y.; Xing, C.; Kim, S. H.; Lu, J. Preparation of penta-*O*-galloyl-beta-D-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analyses by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal* **2011**. *54*: 545-550.
- 99) Wang, J. W.; Chiang, M. H.; Lu, C. M.; Tsai, T. H. Determination the active compounds of herbal preparation by UHPLC-MS/MS and its application on the preclinical pharmacokinetics of pure ephedrine, single herbal extract of Ephedra, and a multiple herbal preparation in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2016**. *1026*: 152-161.
- 100) Guo, Z. Z.; Wu, Y. L.; Wang, R. F.; Wang, W. Q.; Liu, Y.; Zhang, X. Q.; Gao, S. R.;

- Zhang, Y.; Wei, S. L. Distribution patterns of the contents of five active components in taproot and stolon of *Glycyrrhiza uralensis*. *Biol Pharm Bull* **2014**. *37*: 1253-1258.
- 101) Muneto Matsuta, R. K., Yuji Saito, Akira Yamashita. The 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibitory Active Flabonoids and Phenylpropanoids from *Schizonepeta Spikes*. *Natural Medicines* **1996**. *50*: 204-211.
- 102) Jin GS, L. J., Pu HS. Studies on the chemical constituents of *Ledebouriella seseloides* Wolff. *Zhongguo Zhong Yao Zha Zhi*. **1992**. *17*: 28-40.
- 103) Dong, Y. Y.; Luo, S. Q. Determination of saikosaponins in radix *Bupleuri* using HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **1989**. *14*: 678-681, 703-674.
- 104) Hayashi, K.; Shimura, K.; Makino, T.; Mizukami, H. Comparison of the contents of kampo decoctions containing ephedra herb when prepared simply or by re-boiling according to the traditional theory. *J Nat Med* **2010**. *64*: 70-74.
- 105) Kamei, J.; Saitoh, A.; Asano, T.; Nakamura, R.; Ichiki, H.; Iiduka, A.; Kubo, M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of the antitussive principles of *Glycyrrhizae radix* (licorice), a main component of the Kampo preparation *Bakumondo-to* (Mai-men-dong-tang). *Eur J Pharmacol* **2005**. *507*: 163-168.
- 106) Jin, M. J.; Kim, U.; Kim, I. S.; Kim, Y.; Kim, D. H.; Han, S. B.; Kwon, O. S.; Yoo, H. H. Effects of gut microflora on pharmacokinetics of hesperidin: a study on non-antibiotic and pseudo-germ-free rats. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2010**. *73*: 1441-1450.
- 107) Zhang, J.; Li, L.; Kim, S. H.; Hagerman, A. E.; Lu, J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm Res* **2009**. *26*: 2066-2080.
- 108) CN, A.; G, G.-S. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci Technol Int* **2001**. *7*: 373-382.
- 109) Hodgson, J. M.; Morton, L. W.; Puddey, I. B.; Beilin, L. J.; Croft, K. D. Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *J Agric Food Chem* **2000**. *48*: 2276-2280.
- 110) Kim, D. H.; Hong, S. W.; Kim, B. T.; Bae, E. A.; Park, H. Y.; Han, M. J. Biotransformation of glycyrrhizin by human intestinal bacteria and its relation to biological activities. *Archives of pharmacal research* **2000**. *23*: 172-177.
- 111) Khaksa, G.; Zolfaghari, M. E.; Dehpour, A. R.; Samadian, T. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of disodium glycyrrhethinic acid hemiphthalate. *Planta Med*

1996. 62: 326-328.

- 112) Funakushi, N.; Yamaguchi, T.; Jiang, J.; Imamura, S.; Kuhara, T.; Suto, H.; Ueki, R.; Kase, Y.; Kobayashi, H.; Ogawa, H.; Ikeda, S. Ameliorating effect of Yokukansan on the development of atopic dermatitis-like lesions and scratching behavior in socially isolated NC/Nga mice. *Arch Dermatol Res* **2011**. 303: 659-667.
- 113) Suzuki, Y.; Mitsuhata, H.; Yuzurihara, M.; Kase, Y. Antiallodynic effect of herbal medicine yokukansan on peripheral neuropathy in rats with chronic constriction injury. *Evid Based Complement Alternat Med* **2012**. 2012: 953459.
- 114) Kawai, Y.; Nishikawa, T.; Shiba, Y.; Saito, S.; Murota, K.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Kanayama, M.; Uchida, K.; Terao, J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem* **2008**. 283: 9424-9434.
- 115) 横山弘臣, 日合奨, 大浦彦吉. 桔梗総サポニンならびにその Prosapogenin Methyl Esters のラット血漿コルチコステロン分泌促進活性. *YAKUGAKU ZASSHI* **1982**. 102: 1191-1194
- 116) 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. *YAKUGAKU ZASSHI* **1972**. 92: 961-968.
- 117) 高木敬次郎, 李殷芳. 桔梗の薬理学的研究(第1報)粗 Platycodin の毒性および中枢抑制作用. *YAKUGAKU ZASSHI* **1972**. 92: 951-960.
- 118) 久保道德, 長尾孝治., 松田秀秋, 難波健輔. 桔梗の免疫薬理学的研究(第1報). *生薬学雑誌* **1986**. 40: 367-374.
- 119) ガルデルマインインタビューフォーム. アダパレンゲル. *医薬品インタビューフォーム* **2015**.
- 120) マルホインタビューフォーム. 過酸化ベンゾイル. *医薬品インタビューフォーム* **2017**.

論文審査主査および副査

本学位論文は、2017年2月 福岡大学薬学部において審査された。

主査 岩崎 克典 教授

副査 片岡 泰文 教授

副査 金城 順英 教授

副査 三島 健一 教授

公表論文目録

本論文の内容は、以下の科学雑誌に公表した。

- 1) **Matsumoto T**, Matsubara Y, Mizuhara Y, Sekiguchi K, Koseki J, Tsuchiya K, Nishimura H, Watanabe J, Kaneko A, Maemura K, Hattori T, Kase Y. (2015). Plasma Pharmacokinetics of polyphenols in a traditional Japanese medicine, jumihaidokuto, which suppresses propionibacterium acnes-Induced dermatitis in Rats. *Molecules* 20(10):18031-18046. (IF: 2.465)
- 2) Koseki J, **Matsumoto T**, Matsubara Y, Tsuchiya K, Mizuhara Y, Sekiguchi K, Nishimura H, Watanabe J, Kaneko A, Hattori T, Maemura K, Kase Y. (2015) Inhibition of Rat 5 α -Reductase Activity and Testosterone-Induced Sebum Synthesis in Hamster Sebocytes by an Extract of *Quercus acutissima* Cortex. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:853846. (IF: 1.931)
- 3) Sekiguchi K, Koseki J, Tsuchiya K, Matsubara Y, Iizuka S, Imamura S, **Matsumoto T**, Watanabe J, Kaneko A, Aiba S, Yamasaki K. (2015) Suppression of Propionibacterium acnes-Induced Dermatitis by a Traditional Japanese Medicine, Jumihaidokuto, Modifying Macrophage Functions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:439258. (IF: 1.931)

謝辞

本論文の御指導、御高閲ならびに主査として御審査を賜りました福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室・岩崎克典教授、副査を務めて頂きました同学部薬学疾患管理学教室・片岡泰文教授、同学部生薬学教室・金城順英教授、及び同学部生体機能制御学教室・三島健一教授に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂き御支援を受け賜りました株式会社ツムラ製品戦略本部長・高崎隆次常務執行役員、同本部ツムラ研究所長・加瀬義夫博士、同研究所生体機能研究部長・服部智久博士、臨床解析研究部長・山本雅浩博士、及び(前)臨床解析研究部長・前村和也氏に深く感謝致します。

本研究の薬効薬理研究について、御指導と御鞭撻を賜りましたツムラ研究所生体機能研究部免疫炎症グループ長・金子篤博士をはじめとする研究スタッフ、関口協二博士、小瀬木順一博士及び松原陽佑研究員に深く感謝致します。病理組織学的検索に関し御指導を賜りました同研究部消化器グループ・飯塚生一博士、及び中枢神経グループ・今村幸子博士に深く感謝致します。また、本研究の共同研究者として御指導を賜りました東北大学大学院医学系研究科皮膚科学分野・相場節也教授及び山崎研志准教授に深く感謝致します。

薬物動態研究について、御指導と御鞭撻を賜りましたツムラ研究所臨床解析研究部薬物動態・渡辺淳子グループ長をはじめとする研究スタッフ、串田浩孝博士、水原康晴博士、定金千春博士及び土屋和明研究員に深く感謝致します。また、本研究に必要な多数の生薬及び成分を御提供して頂きました生産本部漢方製剤開発センター漢方品質設計部生薬品質設計グループの五十嵐靖グループ長及び西村浩昭博士に深く感謝致します。

本研究論文をまとめるにあたり、終始御指導と御鞭撻を受け賜りましたツムラ研究所、五十嵐康博士に深く感謝致します。

最後に、温かく見守り励ましてくれた家族に感謝致します。