

肝炎に対し有効な新規肝庇護療法薬の探索

申請代表者	磯田 勝広	帝京平成大学薬学部薬学科	講師
所外共同研究者	鈴木 重紀	帝京平成大学薬学部薬学科	非常勤講師（元教授）
〃	石井 竹夫	帝京平成大学薬学部薬学科	准教授

【背景・目的】 現在、本邦には200万人以上のC型ウイルス性肝炎患者が存在し、全世界では2億人以上と言われている。近年、インターフェロン（IFN）製剤の登場によりC型ウイルス性肝炎に対して著効はあるが、高ウイルス患者などに対して効果がなく、小柴胡湯など肝庇護製剤による治療の重要性が増している。しかし、肝炎に対し有効な肝庇護療法剤は、ミノファージェンと小柴胡湯などに限られている。そこで本研究は、生薬成分中に存在する肝炎に対して有効な成分を探索し、新規肝庇護療法薬の創成を試みる。

【方法】 S.D.ラット（♂, 6W）よりコラゲナーゼ灌流法を用い、肝実質細胞を採取した。採取した肝実質細胞はトリパンブルー染色法により細胞生存率を測定し、細胞生存率が85%以上であることを確認した。採取した肝細胞は96wellプレート（FALCON）に肝細胞を 1×10^4 cells/wellにて播種した。その際に用いた培養液は、William's Medium E (GIBCO)培地に10%FBSと抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加したものをを用いた。肝細胞播種24時間後に血清が添加されていない、William's Medium E培地に交換し、さらに生薬由来化合物セットの各種化合物を濃度 $10 \mu\text{M}$ にて添加した。化合物添加48時間後に細胞観察を行い、WST法にて細胞生存率を測定した。結果、化合物非添加（Control）を生存率100%として、各種化合物を添加した細胞生存率と比較することで各化合物の細胞生存率を算出した。生薬エキスは、前述と同様の方法を用い、濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ にて肝細胞に添加し、細胞生存率を測定した。

【結果】 Fig.1～Fig.8に各種生薬由来化合物の肝細胞生存率スクリーニング結果を示した。化合物成分非添加群である肝細胞生存率（Control）を100%として、各種化合物成分添加群の生存率を算出した結果、Control群より肝細胞生存率130%以上の化合物が多数得られた。さらに、肝細胞生存率の高かった化合物成分のみを抽出し、Fig.9にまとめた。Control群と比較し、肝細胞生存率が130%以上であった化合物が13種類得られた。さらに、Fig.9の黒バーにて示している化合物は、Control群と比較し、特に肝細胞生存率が高かった化合物である。5種類の化合物が得られ、塩酸ベンゾイルメサコニン、シノブホタリン、クルクミン、エピガロカテキン、エピヘスペリジンであった。Fig.10には、生薬エキス成分のスクリーニング結果を示した。生薬エキス非添加の肝細胞群（Control）の細胞生存率を100%として、各種生薬エキス成分の肝細胞生存率を測定した。結果、Control群を上回る生薬エキス成分はなかった。なお、大学の移転に伴い実験操作が進展できず、すべての生薬エキス成分のスクリーニングをすることができなかった。

【考察】 結果から得られた肝細胞生存率の特に高かった5種類の生薬由来化合物成分の中で肝臓に対し有効性があると報告されている成分は、クルクミンとエピガロカテキンの2種類のみである。エピヘスペリジンは、ヘスペリジンが陳皮に含有されている有効成分であるとの報告がある。このヘスペリジン含有しているサプリメントが、多く市販されており、中枢抑制作用、抗炎症作用などが報告されているが、肝疾患に対しての炎症抑制作用の報告はない。シノブホタリンは、センソなどに含有され強心剤として用いられている。しかし、シノブホタリンが肝疾患に対し有効性を検討した報告は皆無である。塩酸ベンゾイルメサコニンは、アルカロイドの一種である。塩酸ベンゾイルメサコニ

ンも肝疾患に対しての炎症抑制作用の報告はない。エピヘスペリジン、シノブホタリンと塩酸ベンゾイルメサコニンは今後、肝疾患に対して有効な効果が期待できる成分である。今後、さらなる検討が必要であると考えられる。エピガロカテキンは肝疾患に対し有効性のあることが報告されている (Kagaya N. et. Al. 2002, Biol. Pharm. Bull)。報告者は、過去に紅茶成分に含有されているエピガロカテキンの肝疾患に対しての有効性を検討した実験に携わった経験がある。その際に、カテキンの肝細胞生存率を測定した結果、高い生存率であった。これは今回のエピガロカテキンの肝細胞生存率結果とも合致している。本実験のスクリーニングにおいて、エピガロカテキンの肝細胞生存率はControl群と比較して200%以上であり、すべての生薬由来化合物中最も高い生存率であった。このことは、エピガロカテキンがもっとも肝疾患に対し有効性が高いことが示唆できる。しかし、本実験は*in vitro*における検討であり、*in vivo*における検討を行う必要性があり、肝疾患に対する肝庇護効果を検討するためには、さらに実験を行う必要があると考えられる。

【結論】 1) 生薬由来化合物から13種類の高い肝細胞生存率を持つ化合物がスクリーニングできた。2) 高い肝細胞生存率を持つ13種類のうち5種類の化合物成分は、肝細胞生存率がControl群と比較し、150%以上であり、顕著に高かった。

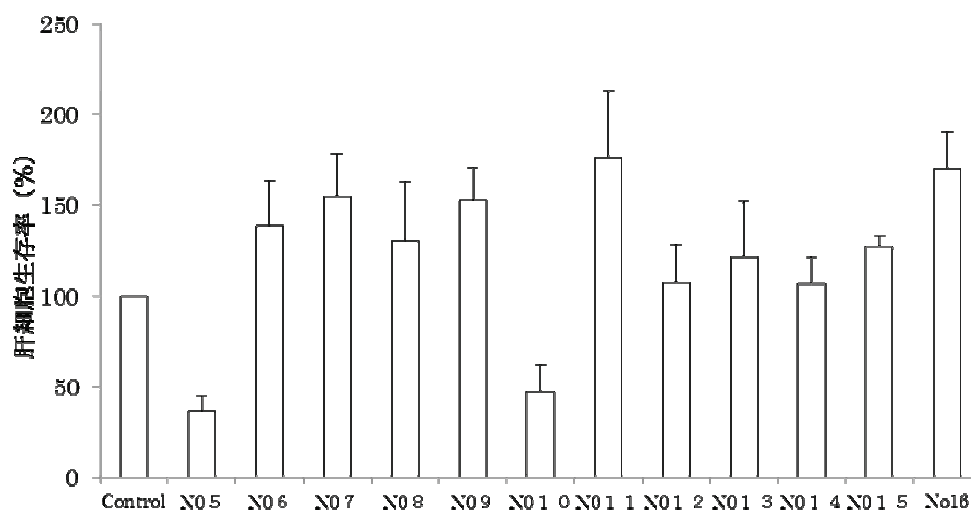


Fig.1 生薬由来化合物セットNo.5~16の肝細胞生存率

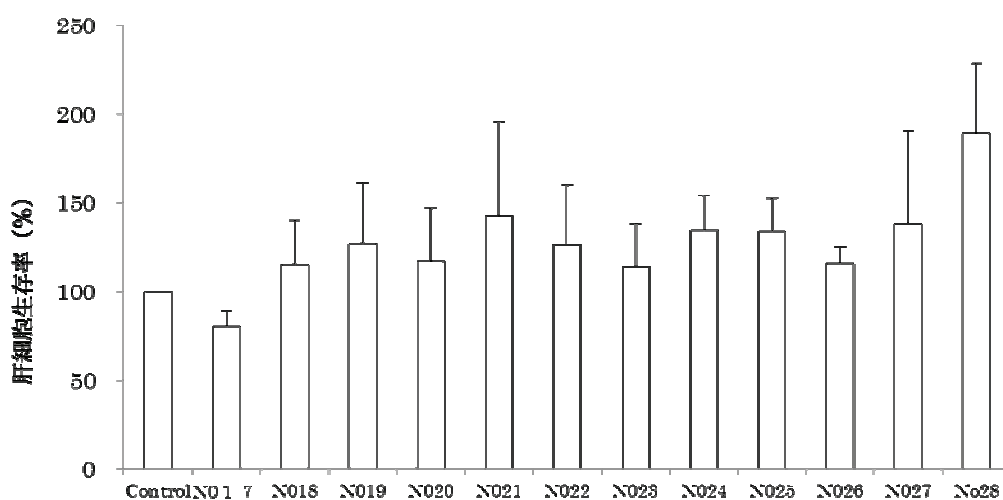


Fig.2 生薬由来化合物セットNo.17~28の肝細胞生存率

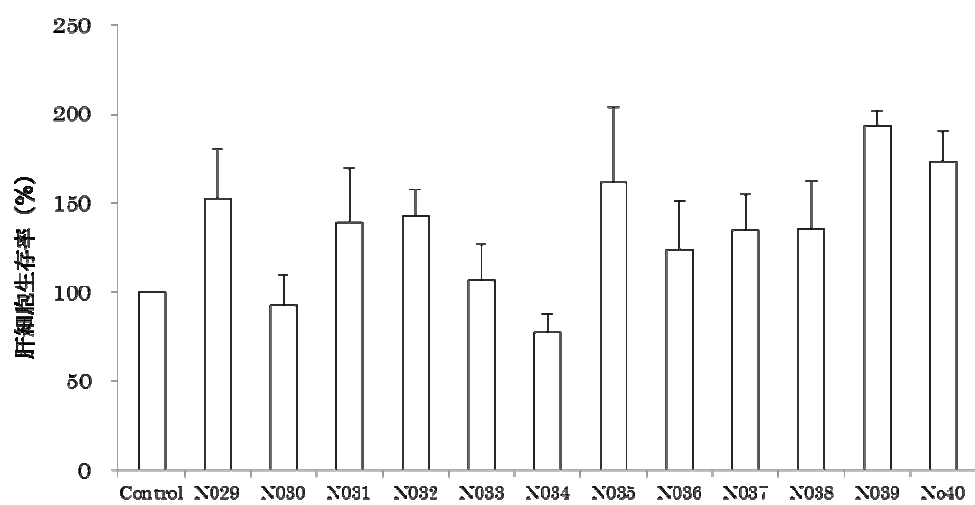


Fig.3 生薬由来化合物セット No.29~40の肝細胞生存率

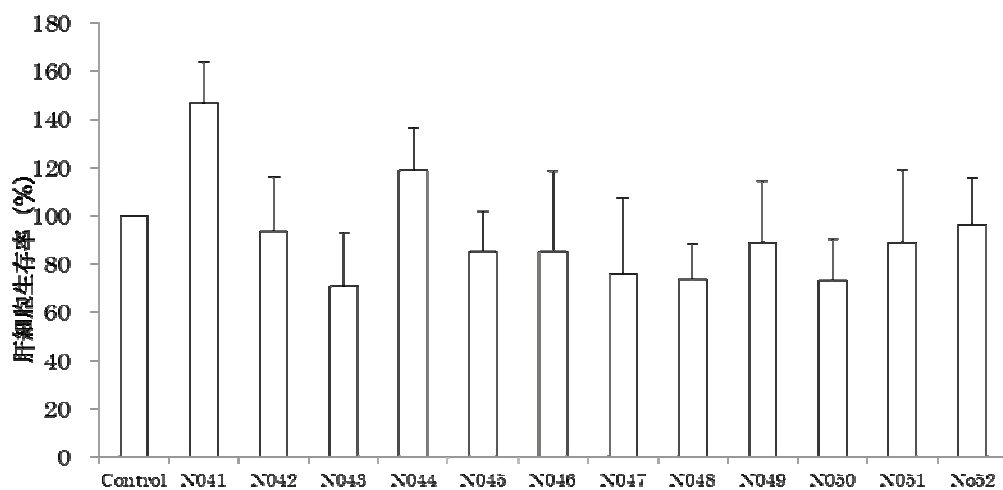


Fig.4 生薬由来化合物セット No.41~52の肝細胞生存率

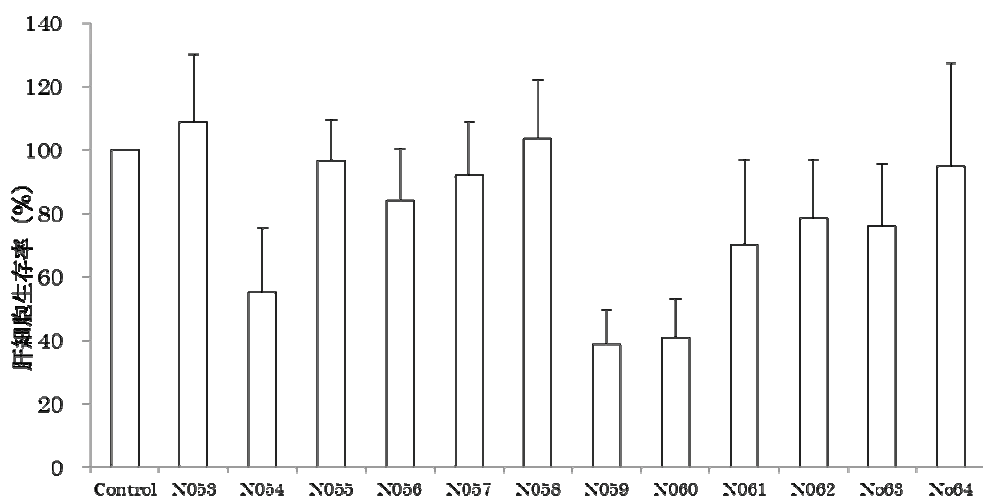


Fig.5 生薬由来化合物セット No.53~64の肝細胞生存率

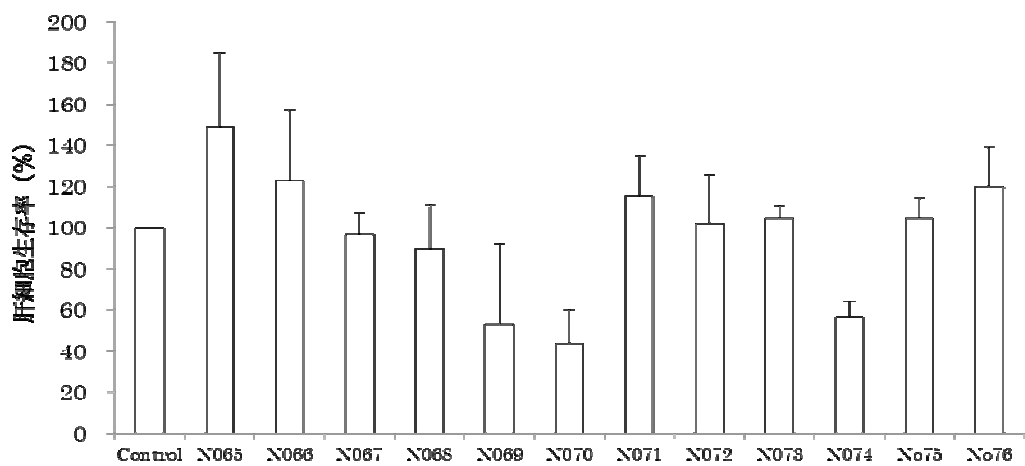


Fig.6 生薬由来化合物セットNo.65~76の肝細胞生存率

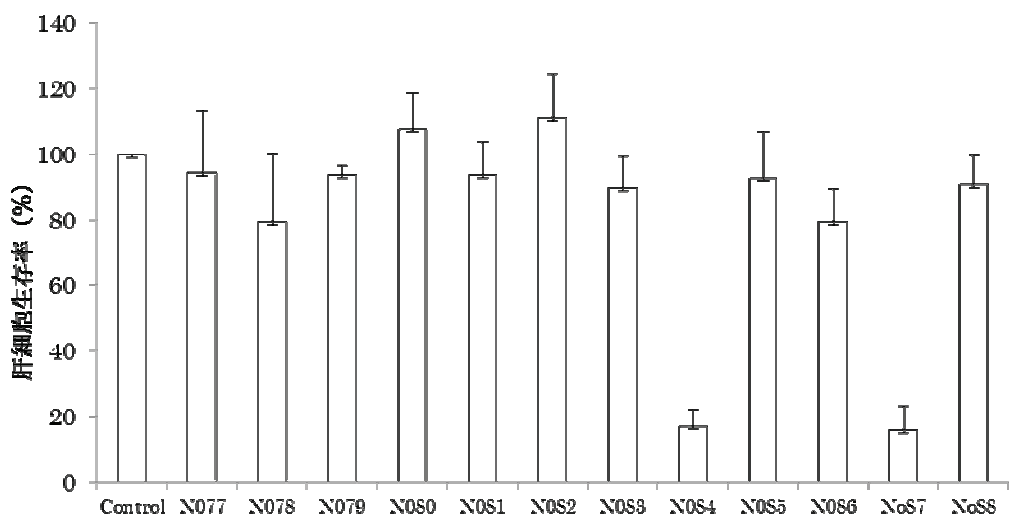


Fig.7 生薬由来化合物セットNo.77~88の肝細胞生存率

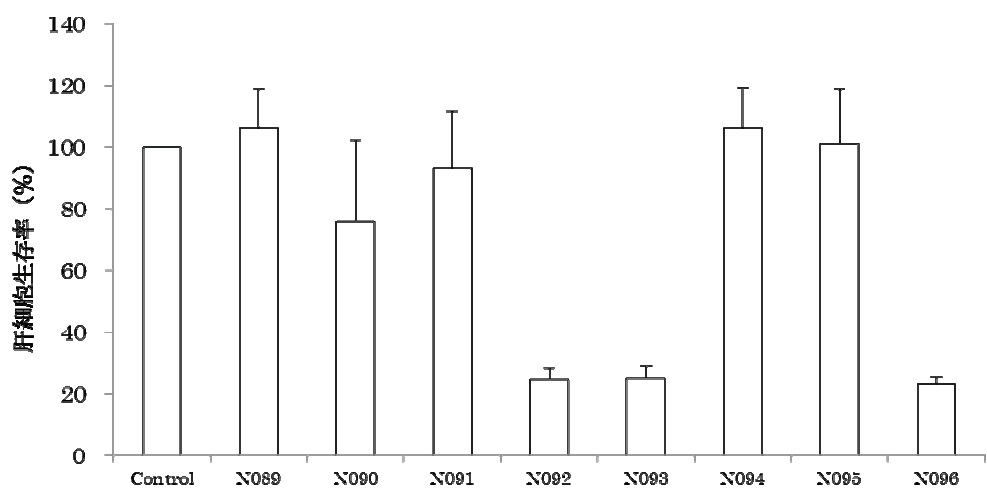


Fig.8 生薬由来化合物セットNo.89~96の肝細胞生存率

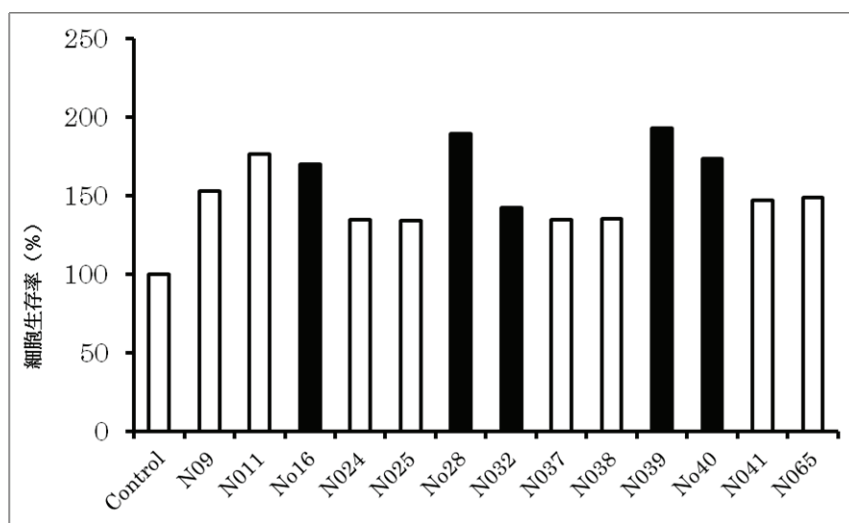


Fig.9 各種化合物(No.1~No.96)の肝細胞生存率

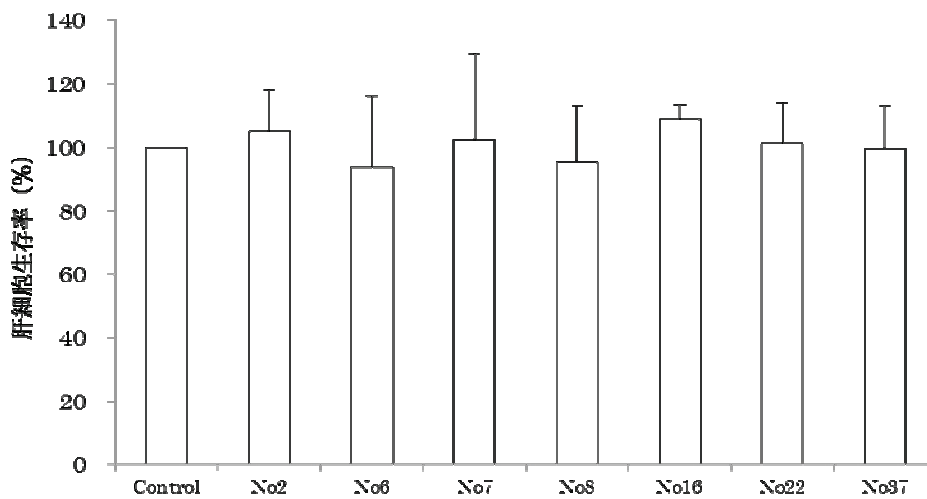


Fig.10 生薬エキス成分の肝細胞生存率