

氏名	まきのとしあき 牧野利明
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第445号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	紫蘇葉の糸球体腎炎抑制作用に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 本多義昭 教授 富岡 清 教授 中川照眞

論文内容の要旨

我が国では、腎臓疾患による死亡率は比較的高く、全死亡総数に占める割合は第7位(2.3%)である。その原因疾患の多くは慢性糸球体腎炎で、中でも特にIgA腎症が最も発症頻度が高くなっている。慢性糸球体腎炎の治療法としては、安静療法、食事療法、薬物療法など多くの試みがなされているが、未だ根本的な治療法はなく、対症療法によって進展・増悪を防止することが重要と考えられている。

近年、この慢性糸球体腎炎に対する漢方治療が積極的に試みられるようになり、かなりの評価が得られている。腎糸球体に存在するメサンギウム細胞の過剰な増殖は、多くの糸球体腎炎において観察される特徴の一つであるが、各種の柴胡剤が培養メサンギウム細胞に対して増殖抑制作用を示すことが知られている。中でも柴朴湯はこの作用が最も強く、紫蘇葉はこの薬方を特徴づけている生薬である。

そこで、本研究では紫蘇葉の糸球体腎炎に対する作用を明らかにすべく、以下の研究を行った。

第一編 紫蘇葉の *in vitro* での糸球体腎炎抑制作用

第一章 紫蘇葉の培養メサンギウム細胞増殖抑制作用とその活性成分

Perillaldehyde (PA) 型のアカチリメンジソ (32系統) から調整した紫蘇葉煎液は、ウシ胎児血清 (FCS) で誘導した培養マウスメサンギウム細胞の増殖を用量依存的に抑制し、その活性成分として、luteolin 7-O- $[\beta$ -glucuronosyl (1 \rightarrow 2) β -glucuronoside] (1), apigenin 7-O- $[\beta$ -glucuronosyl (1 \rightarrow 2) β -glucuronoside] (2), scutellarin (3), caffeic acid (4), rosmarinic acid (5) を単離・同定した。また、これら化合物の紫蘇葉煎液中の含有量を HPLC にて定量し、紫蘇葉煎液に対する比活性を検討したところ、紫蘇葉煎液の作用はほぼ5で代表されることが示された。さらに精油成分や色素成分が異なる各種のシソについて比較検討した結果、細胞増殖抑制作用はほぼ等しく、化合物1-5の含有量にも顕著な差異は見られなかった。

第二章 Rosmarinic acid のメサンギウム細胞増殖抑制作用とその機序の検討

Rosmarinic acid (5) は、血小板由来増殖因子 (PDGF) または腫瘍壊死因子 (TNF) α で刺激した培養メサンギウム細胞の増殖を抑制したことから、その作用は各増殖因子のレセプターには依存せず、各刺激に共通する細胞内情報伝達経路の阻害と推定された。ノーザンブロット解析の結果、5はメサンギウム細胞における PDGF mRNA および c-myc mRNA 発現を用量依存的に抑制することから、細胞増殖抑制作用の一部はこの機序によると推定された。

第三章 紫蘇葉のマウス培養メサンギウム細胞からの一酸化窒素 (NO) 産生誘導作用

一酸化窒素 (NO) は、血小板凝集阻害作用やメサンギウム細胞増殖抑制作用などを介して、腎臓を保護していると考えられている。紫蘇葉エキスは培養マウスメサンギウム細胞に対して NO の産生を誘導したが、一方ではインターフェロン (IFN) γ と lipopolysaccharide (LPS) を組み合わせて刺激を行った際の大量の NO 産生を抑制した。これらの二面性の作用は、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現と併行関係にあった。

第二編 紫蘇葉の *in vivo* での糸球体腎炎抑制作用

第一章 ラットメサンギウム増殖性腎炎モデルに対する紫蘇葉煎液の作用

ラットに胸腺細胞に対する抗血清を投与することにより惹起されるメサンギウム増殖性腎炎モデルにおいて、紫蘇葉煎液を経口投与すると、腎組織における糸球体あたりの全細胞数、増殖中の細胞数、浸潤したマクロファージ数は有意に減少した。また、紫蘇葉煎液を投与して得たラット血清の、マウス培養メサンギウム細胞に対する細胞増殖誘導作用は、用量依存的に有意に低下し、紫蘇葉の *in vivo* でのメサンギウム細胞増殖抑制作用は、少なくともその一部は全身レベルで発現した薬理作用に依存すると推測された。

第二章 ddY マウスによる自然発症 IgA 腎症モデルに対する紫蘇葉煎液の作用

ddY 系マウスは、40 週令以後において自然発症的にヒトにおける IgA 腎症病態を発現することが知られている。そこで本系マウスに対して 8 週令から 42 週令まで紫蘇葉煎液を飲水として投与しながら飼育したところ、タンパク尿および糸球体への IgA 沈着の抑制と、糸球体の肥大化と血清中 IgA 濃度の抑制傾向とが認められた。また血清中 IgA 濃度と糸球体への IgA 沈着の程度は有意に相関していたことから、紫蘇葉の糸球体への IgA 沈着抑制作用は、血清中 IgA 濃度の低下によると推定された。

第三章 若年好発性高 IgA 血症 (HIGA) マウスに対する紫蘇葉煎液の作用

ddY 系マウスは純系ではないため、その IgA 腎症様病態には個体差が大きく、薬効の評価には限界がある。そこで、若年より高 IgA 血症を呈する HIGA マウスを用いて、紫蘇葉煎液の IgA 腎症進展抑制作用について検討した結果、紫蘇葉投与群において、血中 IgA 濃度、糸球体への IgA および IgG 沈着の有意な減少が見られた。また HIGA マウスのパイエル細胞を 3 日間培養したときの培養上清中の IgA 濃度、および糞便中の IgA 含量の割合は、紫蘇葉投与群において有意に減少していたことから、血清 IgA 値の低下に対する腸管免疫の関与が推測された。さらに、脾臓細胞を LPS 存在下で 3 日間培養した後の培養上清中のインターロイキン-4/IFN- γ 濃度比、およびマウス血清中の IgG₁/IgG_{2a} 濃度比は、紫蘇葉投与群において有意に減少していたことから、紫蘇葉は Th1/Th2 バランスにおいて Th1 を誘導することにより、IgA 産生が抑制されたと推定された。

以上、本研究は紫蘇葉の糸球体腎炎抑制作用および活性成分を明らかにしたもので、今後の糸球体腎炎に対する予防または治療薬の開発の基礎的知見となるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文で申請者が取り上げた紫蘇葉は、食品、香辛料、薬用として広く用いられ、漢方医学では「気剤」として半夏厚朴湯、柴朴湯などに配合される。また、申請者が対象疾患として取り上げた糸球体腎炎は、現在のところ未だ根治的な治療はなく、新しい治療薬の開発が求められている。

本論文で、申請者は紫蘇葉の糸球体腎炎抑制作用を、マウス培養メサンギウム細胞による *in vitro* の実験系、thy-1 抗血清を用いたラットメサンギウム増殖性腎炎モデル、ddY マウスおよび HIGA マウスによる自然発症 IgA 腎症モデルを用いて検討し、その作用についての科学的検討を加えた。

すなわち、*in vitro* の実験系では紫蘇葉煎液の培養メサンギウム細胞増殖抑制作用を明らかにし、その活性成分として luteolin 7-O- β -glucuronosyl (1 \rightarrow 2) β -glucuronide], apigenin 7-O- β -glucuronosyl (1 \rightarrow 2) β -glucuronide], scutellarein 7-O- β -glucuronide, caffeic acid, rosmarinic acid を単離・同定した。また、紫蘇葉煎液中に含まれるこれらの化合物の含有量と比活性とから、rosmarinic acid が紫蘇葉煎液の細胞増殖抑制作用を代表していることを明らかにした。さらにその細胞増殖抑制作用機序を検討し、rosmarinic acid は細胞周期では G0 \rightarrow G1 期、G1 \rightarrow S 期の両方の移行を抑制し、また PDGF, c-myc の mRNA の発現を抑制することを明らかにした。一方で紫蘇葉抽出液は、培養メサンギウム細胞に対して NO 産生を誘導し、その作用が細胞増殖抑制作用に部分的に寄与していることも明らかにした。さらに *in vivo* の実験では、ラットメサンギウム増殖性腎炎モデル、ddY マウスおよび HIGA マウスによる自然発症 IgA 腎症モデルを用いて、紫蘇葉煎液ならびに rosmarinic acid の糸球体腎炎抑制作用を明らかにした。ラットメサンギウム増殖性腎炎モデルでは、紫蘇葉の成分が腎臓において直接細胞増殖を抑制するだけでなく、血清中に含まれる細胞増殖誘導因子を減少させる可能性を明らかにした。また ddY マウスと HIGA マウスを用いた実験では、紫蘇葉が血清中の培 A 濃度を減少させることにより、糸球体への IgA 沈着、IgG 沈着、細胞増殖を抑制することを明らかにした。またその機序として、rosmarinic acid が消

化管粘膜から吸収された後全身循環に入り、脾臓などにおける抗体産生を直接抑制して血清中の IgA 濃度を低下させ、また一方では、未知の化合物が消化管粘膜のパイエルパッチからの IgA 産生を抑制し、全身における Th 1/Th 2 バランスが Th 1 側へと変移することを明らかにした。これは、漢方薬の特徴とされる体質改善作用を示唆する結果であると考えられる。

以上、本論文では紫蘇葉の糸球体腎炎抑制作用について科学的検討を加えた。本研究で得られた新知見は、慢性糸球体腎炎保存期における治療法のひとつとして、紫蘇葉を食事療法などに応用できる可能性を示唆したほか、糸球体腎炎に対する予防または治療薬の開発の基礎的知見となると考えられる。また、本研究で採用した実験手法は、今後の漢方薬理学研究の発展に寄与するものと期待できる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 12 年 2 月 29 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。