

シコニン軟膏の創傷治癒促進作用とその作用機序  
に関する研究

関根隆志

# 目次

序論	1
第1章 シコニン (SK) 軟膏の調製と創傷治癒促進作用	4
第1節 実験の部	5
第2節 ラット熱傷モデルでの有効性	8
第3節 ラット皮膚欠損傷モデルでの有効性	11
第4節 本章のまとめ	15
第2章 SK 軟膏のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗菌性	16
第1節 実験の部	16
第2節 純シコニン [(R)-SK]および純アルカンニン [(S)-AK]の MRSA に対する抗菌性	19
第3節 In vivo での SK 軟膏の抗菌作用	21
第4節 本章のまとめ	22
第3章 SK の肉芽増殖促進作用	24
第1節 実験の部	24
第2節 SK 誘発肉芽組織の生化学的評価	27
第3節 SK とカラゲニンの作用	29
第4節 本章のまとめ	34
第4章 SK のスーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) 消去作用	36
第1節 実験の部	37
第2節 SOD 様活性 (SOD-like activity) の評価法	41
第3節 SK と AK の $O_2^{\cdot-}$ 消去活性	42
第4節 SK の $O_2^{\cdot-}$ 消去機構	43
第5節 本章のまとめ	46
第5章 SK の鉄イオン関与ヒドロキシルラジカル ( $HO\cdot$ ) 生成系への影響	47
第1節 実験の部	47

第 2 節	SK と AK の DMPO-OH 生成抑制効果	49
第 3 節	SK の DMPO-OH 生成抑制機構	52
第 4 節	SK と鉄イオンとの分光学的相互作用	53
第 5 節	本章のまとめ	55
第 6 章	総括ならびに結論	57
	謝辞	59
	引用文献	60

## 序論

現在、寝たきり老人の数は全国で 90 万人を越えると言われており、今後高齢化に伴いさらに増えると考えられている。褥瘡は寝たきりがもたらす栄養障害、動体不可、麻痺によって起こるいわゆる「床ずれ」である。したがって、褥瘡は単なる皮膚潰瘍ではなく色々な要因が複雑に作用して形成された病態であり、全身状態にも大きな影響を及ぼし、時には死につながると言われている。<sup>1)</sup> したがって、褥瘡の治療は非常に重要な問題である。現在褥瘡の治療においては、皮膚潰瘍治療剤、抗菌剤などの外用剤の他に、ポビドンヨードのような消毒剤およびハイドロコロイドゲルを用いたドレッシング剤などの医療用具が用いられている。しかし、これまでこの領域で使用できる薬剤はそれほど多くなかったことから、最近になって新たな皮膚潰瘍治療剤の開発が盛んに行われている。

紫雲膏は紫根、当帰、ごま油、サラシミツロウおよび豚脂からなる漢方軟膏で、現在、火傷、痔核による疼痛および肛門裂傷に対する治療剤として使用されている。<sup>2)</sup> シコニン (SK) はその構成生薬である紫根に含まれる薬理活性成分の一つでありこれまで肉芽増殖促進作用<sup>3-6)</sup>、抗菌作用<sup>7,8)</sup>、抗炎症作用<sup>3,9)</sup>および抗腫瘍作用<sup>10)</sup>などの薬理効果に関する報告がある。そこで、創傷治癒促進作用と抗菌作用を併せ持つ新規皮膚潰瘍治療剤の開発を目的として、紫根の成分である SK を主薬とした軟膏剤を調製し、まず、ラット創傷治癒モデルを用いて SK 軟膏の創傷治癒促進作用に関する検討を行った。<sup>11)</sup>

塚田ら<sup>12)</sup>は紫根に含まれるナフトキノ系色素には光学異性体が混在しており、R 型 (SK 類縁体) と S 型 (アルカンニン (AK) 類縁体) の存在比はその種類により異なり、硬紫根 (*Lithospermum erthrohizon* SIEB. et ZUCC.) は R 体、軟紫根 (*Macrotomia euchroma* PAULS) は S 体を多く含んでいると報告している。今回使用する SK は硬紫根からの抽出品であることから一定の割合で AK を含んでいると考えられる (Fig. 0-1 に構造式を示す)。光学異性体間で薬効の強さが異なる場合、その存在比は薬効に大きな影響を与えることから、それぞれの効力の比較は非常に重要なことである。田端ら<sup>9,13)</sup>、および尾崎ら<sup>5)</sup>はそれぞれ SK

と AK の抗炎症作用<sup>9)</sup>、抗菌作用<sup>13)</sup>および肉芽増殖促進作用<sup>5)</sup>の効力に差は認められなかったと報告している。

皮膚潰瘍の治療においては、創傷治癒促進とともに細菌感染の制御が非常に重要であり、最近特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染の予防および除去が臨床上重要であると言われている。<sup>14)</sup> しかし、これまで SK の MRSA に対する抗菌性は明らかにされていない。そこで、SK と AK を HPLC を用いて光学分割し、in vitro で MRSA に対するそれぞれの抗菌性を評価した。さらに、in vivo での SK 軟膏の抗菌性も検討した。<sup>15)</sup>

これまで SK には、先に述べたような非常に多岐にわたる薬理効果に関する報告があるものの、これらの作用機序に関する報告は見当たらない。SK 軟膏を実際に開発する上で、SK の薬理効果発現の作用機序解明は非常に重要である。そこで、SK の肉芽増殖促進作用を、同様の作用を有するカラゲニンの作用と比べ検討した。<sup>16)</sup>

最近、スーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) やヒドロキシラジカル ( $HO\cdot$ ) のようなフリーラジカルが色々の疾患や病態に密接に関連している<sup>17)</sup>と考えられており、火傷や皮膚潰瘍などの創傷治癒におけるフリーラジカルの関与に関する報告も多い。<sup>18-21)</sup> しかし、これまで SK の薬理作用とフリーラジカルの関係に関する報告は見当たらない。そこで今回、SK とフリーラジカルの関係に注目し、SK および AK のフリーラジカル消去活性に関する検討を電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて行った。<sup>22,23)</sup>

本研究において、第 1 章で SK 軟膏の創傷治癒促進作用、第 2 章で SK 軟膏の MRSA に対する抗菌作用の検討を行った。更に、SK 軟膏の創傷治癒促進作用の作用機序の解明を目的として、第 3 章で SK の肉芽増殖促進作用、第 4 章および第 5 章で SK のフリーラジカル消去および生成抑制作用に関する検討を行った。

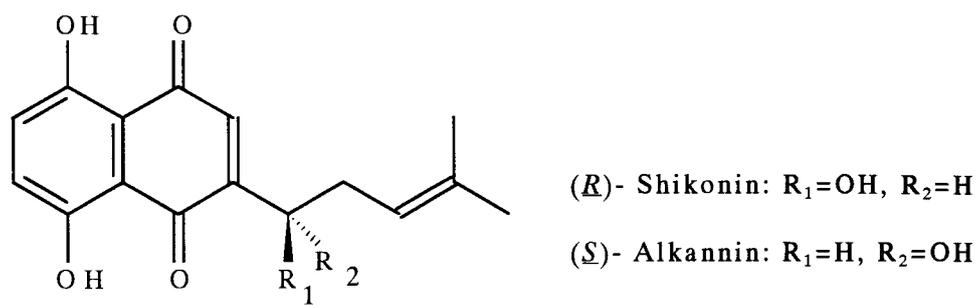


Fig. 0-1 Chemical structure of shikonin and alkannin

## 第1章 シコニン（SK）軟膏の調製と創傷治癒促進作用

林<sup>3)</sup>は、SKを油脂性基剤（ゴマ油、ミツロウおよびワセリンからなる基剤）の軟膏剤とし、ラット皮膚切創モデルで試験した結果、SK軟膏は創傷治癒促進作用があると報告している。一方、世戸ら<sup>24)</sup>はSKおよびその誘導体を粉末剤（水溶性高分子であるカーボポール®および乳糖からなる基剤）としてそれぞれラット皮膚切創モデルおよび皮膚欠損傷モデルで試験した結果、SK粉末剤は切創モデルでは創傷治癒促進作用が認められず、皮膚欠損傷モデルではかえって治癒を遅延させたと報告している。これらは、SKを外用剤として投与する場合、基剤の種類により薬理作用が大きく変化する可能性を示唆している。また、褥瘡のような皮膚潰瘍の治療において外用剤を用いると、使われている軟膏基剤の性質によって主薬の薬理効果に大きな違いが出ることが少なくないとの報告<sup>25)</sup>もあり、皮膚潰瘍治療剤において基剤の選択は非常に重要である。

軟膏基剤は大きく分けて疎水性基剤と親水性基剤に分類され、疎水性基剤にはワセリンやミツロウなどを使用する油脂性基剤があり、紫雲膏はこれに属する。親水性基剤には乳剤性基剤（クリーム）や水溶性基剤が分類される。<sup>26)</sup> 一般に油脂性基剤は創傷面を保護する作用が強く、滲出液が比較的少ない「浅い褥瘡」に適しているものの、分泌物が貯留する欠点があり汚染源になることがあると報告されている。<sup>25, 27)</sup> 一方、親水性基剤は浸出液が多いような「深い褥瘡」にも適用可能であり、その中で乳剤性基剤は薬物浸透性が高いものの、基剤に水を含むことから保存剤が含まれることが多く、乳化剤である界面活性剤による皮膚刺激に注意する必要があると報告されている。<sup>25)</sup> また、水溶性基剤であるマクロゴール基剤は吸水性であり分泌物を取り除く作用も強く適用範囲が広い<sup>25, 27)</sup>とされており、さらに基剤自身が黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対して抗菌作用を示し、皮膚潰瘍の治療上有用な基剤であるとの報告がある。<sup>28)</sup> SKは赤色系色素<sup>29)</sup>でもあり油脂性基剤を用いた場合、衣類などに着色した色素が水で落ちにくい<sup>2)</sup>など、実際の使用面での不都合も予想された。そこで、SK軟膏の基剤としてマクロゴール基剤を選択した。

今回、マクロゴール基剤を用いたSK軟膏の皮膚潰瘍治療剤としての有用性評価を目的として、ラット熱傷モデルおよび皮膚欠損傷モデルを用い、現在臨床で使用されている0.25% トコレチナート軟膏（TT軟膏，オルセノン<sup>®</sup>，日本レダリー（株））を対照とし、創傷治癒促進作用に関する効力の比較検討を行った。

## 第1節 実験の部

### 1. 試料

SKは丸善製薬から購入した。マクロゴール（MG）400，4000，および中鎖脂肪酸トリグリセリド（MCT）は日本油脂（株）から購入した。デキストリン，乾燥水酸化アルミニウムゲル（DAHG），ジブチルヒドロキシトルエン（BHT），軽質無水ケイ酸（LASA）およびクエン酸は，それぞれ松谷化学（株），富田製薬（株），吉富製薬（株），日本アエロジル工業および和光純薬工業（株）より購入した。0.25% TT軟膏は市販されている製剤を購入した。

### 2. SK軟膏の調製

皮膚熱傷モデルでの試験に用いたSK軟膏および基剤の処方をTable 1-1に示す。軟膏は，MG 400にMG 4000を加え，約80℃で加熱溶解し，そこにSKおよびその他の添加剤を加え均一に溶解した後冷却して調製した。皮膚欠損傷モデルでの試験に用いたSK軟膏および基剤の処方をTable 1-2に示す。軟膏は，MCTにSKおよびBHTを溶解し，これにLASAを加え均一な粉末にする。これとは別に，MG400にMG4000を加え約80℃で加熱溶解し，ここに先に調製した粉末およびクエン酸を加え，均一に溶解した後，冷却して調製した。

### 3. 皮膚熱傷の作成と効果判定方法

9週齢のWistar系雄性ラット（体重300-330 g）をペントバルビタールナトリウムで麻酔し，背部を電気カミソリで剃毛する。剃毛した背部をアルコール綿で消毒後，あらかじめ200℃に加温した専用電気こて（平面タイプ，直径約10mm）

摂津金属工業)を成中線に沿って左右2カ所に自重によって5秒間押し当てることによって熱傷を作成した。

薬剤は、熱傷作成直後(試験0日)から、患部に100 mg/siteを1日1回ごとに交換して18日間投与した。具体的には2.5 cm四方に切断したリント布に薬剤を塗布し、これで患部を覆い、粘着テープで固定することにより投与を行った。

効果の判定は、鴨志田ら<sup>30)</sup>の方法に従い、熱傷部位の障害度をTable 1-3に示す基準を用いて判定した。また、効果を総合的に判定する目的で、経時的な熱傷障害度スコアの変化をプロットして熱傷障害度・時間曲線下面積(AUC)を算出し、効果の指標である熱傷治癒指数(Burn Healing Index : B.H. Index)とした。

#### 4. 皮膚欠損傷の作成と効果判定方法

8週齢のWistar系雄性ラット(体重270-300 g)をペントバルビタールナトリウムで麻酔し、背部を電気カミソリで剃毛する。剃毛した背部をアルコール綿で消毒後、背部正中線を中心として直径15 mmで筋膜に達するまでの皮膚を切除し、皮膚欠損傷を作成した。

薬剤は、皮膚欠損傷作成直後(試験0日)から、患部に100 mg/siteを1日1回ごとに交換して14日間投与した。具体的には2.5 cm四方に切断したリント布に薬剤を塗布し、これで患部を覆い、粘着テープで固定することにより投与を行った。

効果の判定は、山下ら<sup>31)</sup>の報告に従い、皮膚欠損部位の長径(mm)および短径(mm)を測定してその積を面積(mm<sup>2</sup>)とし、式1-1に従って、創傷部面積比率(%)を算出した。また、効果を総合的に判定する目的で経時的な創傷部面積率の変化をプロットして創傷部面積比率・時間曲線下面積(AUC)を算出し、効果の指標である皮膚欠損傷治癒指数(Open Wound Healing Index : O.W.H. Index)とした。

創傷部面積比率(%)

$$= \text{観測日の創傷部面積(mm}^2\text{)} / \text{欠損傷作成日の創傷部面積(mm}^2\text{)} \times 100$$

…式 1-1

Table 1-1. Formulae of base and SK ointments for experimental  
burn healing model

	Base	0.1% SK	0.5% SK
SK		0.1	0.5
MG 400	68.5	68.5	68.3
MG 4000	29.5	29.4	29.2
Dextrin	1	1	1
DAHG	1	1	1
Total	100	100	100

Table 1-2. Formulae of base and SK ointments for the experimental  
open wound healing model

	Base	0.1% SK	0.5% SK
SK		0.1	0.5
MG 400	65.84	65.74	65.54
MG 4000	26.64	26.64	26.44
MCT	5	5	5
LASA	2	2	2
BHT	0.02	0.02	0.02
Citric acid	0.5	0.5	0.5
Total	100	100	100

Table 1-3. Evaluation of the damage score on the healing  
process at the injury site

Score	Evaluation of healing process
0	Tissue repair was finished (Heal)
1	Tissue repair was almost finished
2	Ulcer remained (Skin remodeling)
3	Whole scab was ablated and was an ulcer
4	Scab was ablated partially and ulceration
5	Scab covered whole injury site

## 5. 統計解析

得られたデータは一元配置分散分析（ANOVA）により解析し、有意差の認められた項目については、LSD（Fisher's least significant differences）法により群間の差を危険率5%以下（ $p < 0.05$ ）もしくは1%以下（ $p < 0.01$ ）として検定した。

## 第2節 ラット熱傷モデルでの有効性

熱傷創作成直後、患部は黄色に変色して硬くなり周囲辺縁部は赤く変色し、その翌日には壊死組織による明瞭な痂皮形成が観察された。この熱傷部位では日数の経過に伴って、周囲辺縁部から組織の再生が進行するとともに徐々に痂皮が剥離した。以上の所見から、作成された熱傷は壊死組織が真皮全層に至る第3度熱傷に相当すると判断された。

Fig. 1-1に経時的な熱症傷害度スコアの推移を示す。効果の発現は、0.5% SK軟膏  $\geq$  0.25% TT軟膏  $>$  0.1% SK軟膏  $>$  基剤  $>$  無処置 の順で認められ、特に0.5% SK軟膏および0.25% TT軟膏では比較的早い時期から痂皮の剥離とともに新生組織が形成され治癒に至った。0.1% SK軟膏は0.5% SK軟膏と比較して、試験開始初期での治癒が遅れたものの、15日目以降は急速な皮膚状態の改善が観察され、17日目以降は最も皮膚状態が良好であった。14日目から18日目までの熱症傷害度をTable 1-4に、熱症傷害度・時間曲線下面積から算出される熱傷治癒指数（B.H. Index）をFig. 1-2に示す。

Table 1-4およびFig. 1-2より、0.1、0.5% SK軟膏および0.25% TT軟膏は基剤と比較して有意に治癒を促進することが確認された。更に0.5% SK軟膏は0.25% TT軟膏と同等の創傷治癒促進作用を示した。0.5% SK軟膏は0.1% 軟膏と比べて効果の発現が早かったものの、痂皮の剥離が進む15日目以降の皮膚状態は0.1% SK軟膏の方が優れていた。これは痂皮のない状態であればSKは0.1%で十分有効であることを示している。以上の結果、今回調製したSK軟膏は熱傷に対して対照薬剤である0.25% TT軟膏と同程度の効果を示し、痂皮を伴わない創傷面では0.1% SK軟膏は0.25% TT軟膏と同等以上の効果を示す可能性が示唆された。

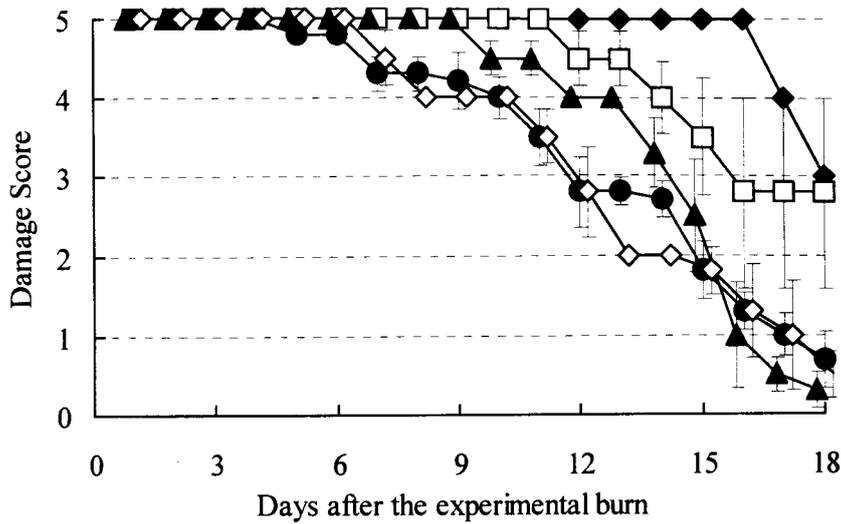


Fig. 1- 1 Periodical change in the damage score during the healing process

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4-6, except for none).

◆, None; □, Base; ▲, 0.1% SK; ●, 0.5% SK; ◇, 0.25% TT

Table 1-4 Effect of SK ointments on the healing of experimental burns in rats

Preparation	n	Damage score				
		Day 14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18
None	2	5.0	5.0	5.0	4.0	3.0
Base	4	4.0 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 1.2
0.1% SK ointment	6	3.3 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.2**	0.3 $\pm$ 0.2**
0.5% SK ointment	6	2.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4**	1.3 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3*	0.7 $\pm$ 0.4**
0.25% TT ointment	4	2.0 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.3**	1.3 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.7*	0.5 $\pm$ 0.3**

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 2~6).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from base as analyzed by 1-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

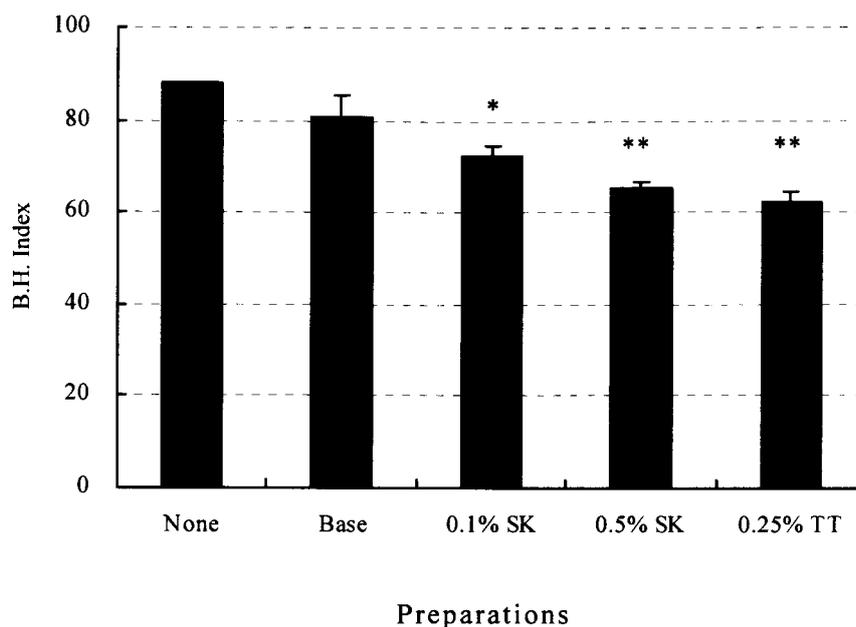


Fig. 1- 2 Effect of SK ointments on the B.H.Index of experimental burns in rats  
Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4-6, except for none).

\*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from base as analyzed by 1-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

また、SK軟膏投与群の痂皮は暗赤色に着色したものの、痂皮剥離後に形成されていた新生皮膚は周辺の皮膚と何ら変化が無く、SKによる赤色の色素沈着も全く認められなかった。

### 第3節 ラット皮膚欠損傷モデルでの有効性

Table 1-1に示したSK軟膏の安定性を調べると、40℃、1ヶ月保存でSK含量が当初の約30%程度まで低下していたことから、SKはマクロゴール基剤中で不安定であることが判明した。そこで、SKの安定化を目的としてMCT（溶解剤）およびBHT（抗酸化剤）を添加しTable 1-2に示す軟膏剤を調製した。その結果、SKは40℃、1ヶ月保存および25℃、6ヶ月保存で当初の95%以上の含量を保持していた。この処方によってSKの安定性は改善されたものの、安定性をより確実にするためには10℃以下の冷蔵保存することが必要であると考えられた。Table 1-2の処方のSK軟膏を用いてラット皮膚欠損傷モデルでの有効性の評価を行った。

Fig. 1-3に経時的な創傷部面積比率の推移を示す。SK軟膏群を除くすべての群において、創傷作成翌日に患部の面積拡大が起こった。中野ら<sup>32)</sup>は、創傷治癒初期の炎症期には一時的に創傷面積が増大し、4日目までは動揺期に相当するとして5日目以降の面積値をもとに評価を行っている。しかし、SK軟膏群ではこの炎症期での面積拡大が認められず、創傷作製翌日から急速に創傷面積の縮小が観察され、試験開始3日目ですでに他の群と比較して有意差が認められた。したがって、SK軟膏は抗炎症作用を示す可能性が示唆された。今回は、創傷作成翌日からの面積を用いて皮膚欠損傷治癒指数（O.W.H. Index）を算出した。その結果をFig. 1-4に示す。また、試験開始3,5,13および14日目の創傷部面積比率の値をTable 1-4に示す。

0.1% SK軟膏は基剤および0.25% TT軟膏と比較して有意な創傷面積の縮小が認められ、優れた創傷治癒促進作用効果を示した。しかし、0.5% SK軟膏は試験開始3日目および最終日には有意に創傷面積を縮小させたものの、治癒の進行が不安定であり、治癒の総合評価であるO.W.H. Indexでは明確な効果が確認できなかった。SKをマウスに皮下注射したときに刺激性が観察されたとの報告<sup>3)</sup>があることから、0.5% SK軟膏は刺激性により治癒の進行を妨げた可能性が考えられた。以上の結果、今回調製した0.1% SK軟膏は皮膚欠損傷に対して対照薬剤であ

る0.25% TT軟膏以上の創傷治癒促進効果を有することが示され、臨床上有用である可能性が示唆された。SK軟膏投与群の創面は暗赤色～紫色に着色したものの、治癒の進行とともに形成された新生皮膚は周辺の皮膚と何ら変化が無く、SKによる赤色の色素沈着も全く認められなかった。

左京ら<sup>33)</sup>は0.25% TT軟膏はラットの熱傷および皮膚欠損傷において有効性を示すことを報告している。しかし、0.25% TT軟膏は今回の試験でFig. 1-4に示すように、SK軟膏の基剤と比較して明確な有効性を示さなかった。この理由に関しては不明である。

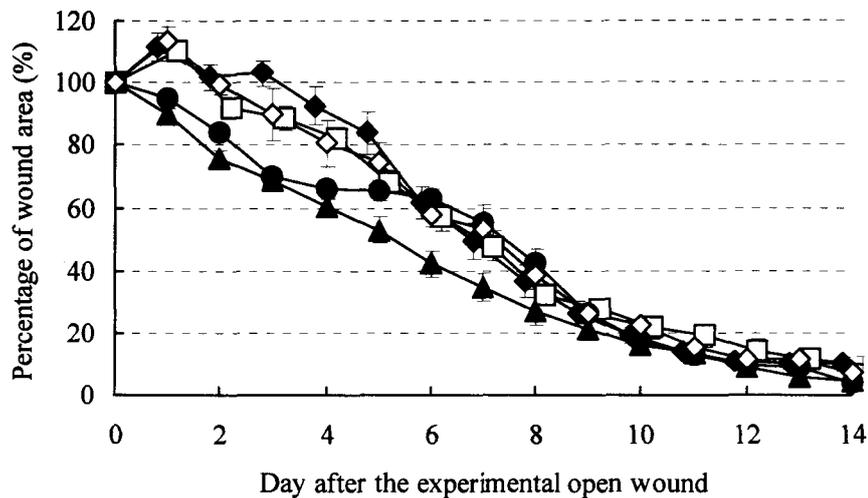


Fig.1-3 Periodical change in the open wound surface area during the healing process

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 5-6).

◆, None; □, Base; ▲, 0.1% SK; ●, 0.5% SK; ◇, 0.25% TT

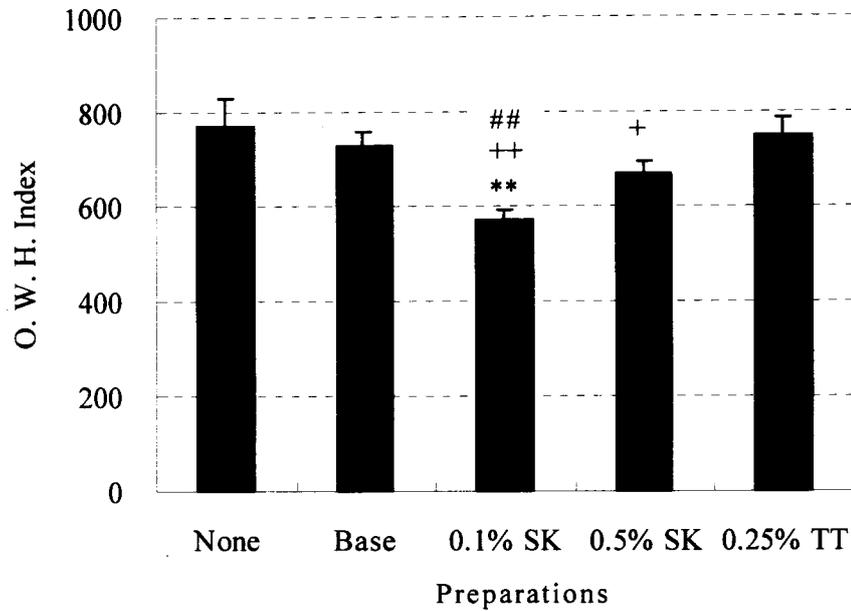


Fig. 1-4 Effect of SK ointments on the O.W.H. Index of experimental open wounds in rats

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 5-6).

$^+p < 0.05$  and  $^{++}p < 0.01$ , significantly different from none

$^{**}p < 0.01$ , significantly different from base

$^{##}p < 0.01$ , significantly different from 0.25% TT ointment

as analyzed by 1 way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

Table 1-4 Effect of SK ointments on the healing of experimental open wounds in rats

Preparation	n	Wound area (% of initial area)				
		Day 3	Day 5	Day 7	Day 13	Day 14
None	5	103.0±4.3	84.0±6.8	47.5±7.9	10.1±1.8	10.0±2.1
Base	6	88.6±3.7	68.3±3.7	47.6±5.3	11.8±2.8	9.7±2.5
0.1% SK ointment	6	68.7±1.2 <sup>++,**,##</sup>	52.7±4.1 <sup>++,*,##</sup>	34.7±4.9 <sup>#</sup>	5.9±1.4 <sup>*,#</sup>	4.7±1.1 <sup>+,*</sup>
0.5% SK ointment	6	69.8±2.5 <sup>++,**,##</sup>	65.5±3.4 <sup>+</sup>	55.1±6.7	9.2±2.0	3.6±0.3 <sup>+,*</sup>
0.25% TT ointment	6	89.5±3.4	73.4±6.9	53.1±2.8	11.5±1.4	7.0±1.2

Each value represents the mean ± S.E. (n = 5~6).

<sup>+</sup>p<0.05 and <sup>++</sup>p<0.01, significantly different from none

<sup>\*</sup>p<0.05 and <sup>\*\*</sup>p<0.01, significantly different from base

<sup>#</sup>p<0.05 and <sup>##</sup>p<0.01, significantly different from 0.25%TT ointment

as analyzed by 1 way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

#### 第4節 本章のまとめ

マクロゴール基剤を用いて0.1および0.5%シコニン(SK)軟膏を調製し、ラット熱傷モデルおよび皮膚欠損傷モデルで創傷治癒促進作用の検討を行った。その結果、熱傷モデルにおいてはSK軟膏は基剤と比較して有意に治癒を促進し、対照薬剤である0.25%トコレチナート(TT)軟膏（オルセノン®）と同等の効果を示した。皮膚欠損傷モデルにおいては、0.1% SK軟膏は基剤と比較して有意に治癒を促進し、更に0.25% TT軟膏よりも優れた効果を示した。しかし、0.5% SK軟膏投与群では治癒の進行が安定せず、明確な治癒促進効果が認められなかった。これはSKの刺激性のためであると考えられた。また、SKはマクロゴール基剤中で不安定であり、抗酸化剤を添加することで安定化したものの、SK軟膏は冷蔵保存する必要があると考えられた。

以上の結果、0.1% SK軟膏は安定性を改善する余地はあるものの、現在臨床で使用されている皮膚潰瘍治療剤と比較して優れた創傷治癒促進作用を有する薬剤となりうる可能性が示唆された。更に、皮膚欠損傷モデルにおいて、炎症反応に由来する欠損傷作成後の一時的な創傷面の拡大が、SK軟膏投与群のみに観察されなかったことから、SK軟膏は抗炎症作用も示す可能性が示唆された。

## 第2章 シコニン軟膏のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗菌性

近年、既存の抗生物質に耐性を有する黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) の出現とその危険性に関する報告が数多くなされている。<sup>24-36)</sup> また、褥瘡や熱傷などの皮膚潰瘍や外科術後創におけるMRSA感染の増加が大きな社会的問題となっている。<sup>37-39)</sup> したがって、皮膚潰瘍の治療においてMRSA感染の予防および除去は非常に重要な問題である。現在、皮膚潰瘍の治療を行うに当たりポビドンヨード製剤やスルファジアジン銀製剤が繁用されるのは、これらがMRSAに対しても抗菌作用を有する<sup>40-42)</sup>ためと考えられる。しかし、一方でこれらの抗菌剤を局所投与した場合、その細胞毒性のために創傷治癒が遅れるとの報告もある。<sup>43-45)</sup> 抗菌作用 (細胞毒性作用) と組織新生を促す創傷治癒作用 (細胞増殖作用) は相反する作用であることから、その両方の作用を示す薬物に関する報告は少ない。

これまでにシコニン (SK) は黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌に対して抗菌作用を示すことが報告されている。<sup>7,8)</sup> しかし、MRSAに対する抗菌性に関する報告は見当たらない。そこで、本章では創傷治癒促進作用を有するSKの抗菌性に関して、光学分割した純シコニン [(R)-SK] および純アルカンニン [(S)-AK] を用いてMRSAに対する抗菌性の評価を行った。さらにSK軟膏のin vivoでの抗菌作用を確認する目的で、ラット皮膚欠損傷モデルを用いて抗菌性の評価を行った。

### 第1節 実験の部

#### 1. 試料

SKは丸善製薬 (株) から購入し99%以上の純度に精製したものを用いた。スルファジアジン銀(SSD)は日局品を新日本薬業 (株) から購入した。ポビドンヨード(PV-I)はシグマ社から購入した。マクロゴール(MG) 400, 4000, および中鎖脂肪酸トリグリセリド(MCT)は日本油脂 (株) から購入した。軽質無水ケイ酸

(LASA)およびジブチルヒドロキシトルエン(BHT)はそれぞれ日本アエロジル工業(株)および吉富製薬(株)から購入した。ウシ血清アルブミンはコージンバイオ社製のものを用いた。これら以外はすべて試薬特級を用いた。

試験菌として、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) IFO 12732, ATCC 43300 (メチシリン感受性株; methicillin-sensitive *S. aureus*, MSSA) および臨床分離株2種(No. 1およびNo. 2)を用いた。臨床分離株は北里環境科学センターより入手し、メチシリンに対する最小発育阻止濃度が100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でありゲンタマイシン、エリスロマイシン、ミノサイクリンおよびシプロフロキサシンにも耐性を有する多剤耐性菌(MRSA)であることを確認して用いた。

## 2. SKの光学分割条件

光学分割はIkedaら<sup>46)</sup>の方法にしたがいHPLCで行い、光学的に純品である純シコニン [(R)-SK] と純アルカンニン [(S)-AK] を得た。

## 3. 最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) 評価方法

MICの判定は寒天平板希釈法(日本化学療法学会の方法)を用いた。Muller-Hinton (MH) 液体培地(BBL<sup>®</sup>, Becton Dickinson Microbiology Systems)中の菌濃度は生理食塩液を用いて $10^6$  colony-forming unit (CFU) / mLに調製した。(R)-SK、(S)-AKおよびSSDはジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、10 mLのMH寒天培地(BBL<sup>®</sup>, pH 7.3)に対してそれぞれのDMSO溶液0.1 mLを添加した。(R)-SKと(S)-AKの培地中での最終濃度は1.56~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにした。それぞれの培地を37°Cで約20時間培養後、菌の発育が全く認められなかった最小薬剤濃度をMICとした。また、抗菌作用の持続性を評価する目的で培養は48時間まで行った。

さらに、血清タンパクと培地pHの試験薬剤の抗菌作用に与える影響を調べるために、BSAを5%添加した培地と塩酸でpHを約5に調製した培地を用いてMICを評価した。

#### 4. In vivoでのSK軟膏の抗菌作用に関する評価

9週齢のWistar系雄性ラット（体重300-330 g）をペントバルビタールナトリウムで麻酔し，背部を電気カミソリで剃毛する。剃毛した背部をアルコール綿で消毒後，背部正中線を中心として左右2ヶ所に，直径約15 mmで筋膜に達するまでの皮膚を切除し皮膚欠損傷を作成した。SK軟膏はTable 1-2に示した処方ものを使用し，皮膚欠損傷作成直後（試験 0日）から，患部に100 mg/siteを 1日1回ごとに交換して6日間繰り返し投与した。具体的には2.5 cm四方に切断したリント布に薬剤を塗布し，これで患部を覆い，粘着テープで固定することにより投与を行った。

試験開始2および6日目に滅菌した綿棒で創傷面の滲出液を採取し，それをSoybean-Casein-Digest (SCD)寒天培地（栄研化学）に塗抹した後37℃で約20時間培養し，Table 2-1に示した評価方法で抗菌作用を評価した。

Table 2-1 Evaluation of colony-forming score  
(CFS) on the isolation culture

Score	Evaluation of CFS
—	None colony
+	A few colonies
++	Many colonies

## 第2節 純シコニン [(R)-SK] および純アルカンニン [(S)-AK] の MRSAに対する抗菌性

HPLCによる光学分割の結果、SK中の(R)-SKと(S)-AKの存在比は82 : 18であることが確認された。SKは硬紫根からの抽出品であるため、塚田ら<sup>12)</sup>の報告通りR体を多く含んでいることが確認された。分割された(R)-SKと(S)-AKはヘキサンから再結晶しCDスペクトルにて立体構造を確認した後試験に使用した。

Table 2-2に(R)-SK, (S)-AKおよびSSDのMICを示す。(R)-SKおよび(S)-AKはMSSAのみならずMRSAに対しても同等の抗菌性を示し、そのMICは25  $\mu$ g/mLであった。更に48時間後も同等のMICを維持していることから、その抗菌作用には持続性があると考えられた。対照薬として使用したSSDのMICは12.5  $\mu$ g/mLであり、これと比較すると(R)-SKおよび(S)-AKの抗菌力は若干低いことが示された。しかし、SSDは48時間後のMICが低下しており、抗菌力の持続性の点では(R)-SK並びに(S)-AKの方が優れていると考えられた。以上の結果、SKはMRSAに対してSSDとほぼ同程度の抗菌作用を有し、その抗菌作用は光学異性体の存在比に影響を受けない可能性が示唆された。

Table 2-2 MICs ( $\mu$ g/mL) of compounds tested against MSSAs and MRSA.

		MSSA		MRSA	
		IFO 12732	ATCC 43300	No.1	No.2
(R)-SK	20 h	25	25	25	25
	48 h	25	25	25	25
(S)-AK	20 h	25	25	25	25
	48 h	25	25	25	25
SSD	20 h	12.5	12.5	12.5	12.5
	48 h	50	50	50	25

次にSKの抗菌作用に影響を与える要因を明らかにする目的で、血清タンパク添加培地およびpH調整培地でのMIC測定を行った。Table 2-3およびTable 2-4にそれぞれの培地でのMICを示す。

Table 2-3より、(R)-SK、(S)-AKおよびSSDのMICはすべての菌株に対して50  $\mu$ g/mL以上となり正確なMIC測定ができなかった。以上の結果、血清タンパクの存在によりMICの値が大きくなったことから、SKの抗菌作用はin vivoでは低下する可能性が示唆された。Table 2-4より、酸性条件（pH 5）の培地での(R)-SKおよび(S)-AKのMICはすべての菌株に対して1.56  $\mu$ g/mL以下となり、MRSAに対してきわめて強い抗菌作用を示した。(R)-SKおよび(S)-AKは酸性条件の方が安定であるとの報告<sup>47)</sup>もあり、SK軟膏のpHを酸性側に調整することはSKの安定性のみならずMRSAに対する抗菌作用の点でも有利であることが示唆された。

Table 2-3 Influence of the serum protein on the anti-bacterial activity against MSSAs and MRSA

	MSSA		MRSA	
	IFO 12732	ATCC 43300	No.1	No.2
(R)-SK	50 <	50 <	50 <	50 <
(S)-AK	50 <	50 <	50 <	50 <
SSD	50 <	50 <	50 <	50 <

Table 2-4 Influence of the acidic condition (pH 5) on the anti-bacterial activity against MSSAs and MRSA

	MSSA		MRSA	
	IFO 12732	ATCC 43300	No.1	No.2
(R)-SK	< 1.56	< 1.56	< 1.56	< 1.56
(S)-AK	< 1.56	< 1.56	< 1.56	< 1.56

### 第3節 In vivoでのシコニン軟膏の抗菌作用

Table 2-5に試験2および6日後のcolony-forming score (CFS)を示す。無処置群および基剤群では6例中すべてに細菌が検出されたが、SK軟膏投与群では5例に検出されたものの1例には全く細菌が検出されなかった。また、0.1%と0.5% SK軟膏では抗菌作用にほとんど差は認められなかった。

Table 2-5 The colony-forming score at days 2 and 6 on the open wounds in rats

		No.1* <sup>1</sup>	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
None * <sup>2</sup>	day 2	++	++	++	++	++	++
	day 6	++	++	++	++	++	++
Base	day 2	++	++	++	++	++	++
	day 6	++	++	++	++	++	++
0.1% SK	day 2	++	++	—	++	++	++
	day 6	++	++	—	++	++	++
0.5% SK	day 2	+	++	—	++	++	++
	day 6	+	++	—	++	++	++

\*<sup>1</sup>: 6 open wounds in 3 rats, \*<sup>2</sup>: None means no treatment.

本試験はコンベンショナルな環境下でラットの飼育を行っており、創傷面へ当てるリント布は滅菌して使用したものの、リント布を固定する粘着テープなどは滅菌していない。かつ、特に創傷面を微生物から隔離する様な処置も行っていないことから、創傷面から滲出する体液を吸収し湿潤したリント布は、微生物にとって非常に繁殖に適した場所であると考えられる。そのような環境下で6例中1例のみではあるが微生物が検出されなかったことは、確実な抗菌性が発揮された結果であると考えられる。また、検出された細菌の種類を同定した結果、そのほとんどが*S. aureus*であった。したがってSK軟膏はin vivoでも*S. aureus*に対して抗菌性を示す可能性が示唆された。上滝ら<sup>48)</sup>はヨウ素製剤であるNI-009 (Iodosorb<sup>®</sup>)を用いてラットで同様な試験を行った結果、投与6日目で8例中5例に細菌が観察され、細菌が検出されなかったのは3例ではあるが細菌抑制作用の点でこの製剤は有効であると報告しており、現在臨床で使用されている。

以上の結果、0.1% SK軟膏は臨床的にも有効な抗菌性を有する可能性が高いと判断された。

#### 第4節 本章のまとめ

本章では、純シコニン[(*R*)-SK]および純アルカンニン[(*S*)-AK]のMRSAに対する抗菌性を評価し、さらにシコニン(SK)軟膏のin vivoでの抗菌作用を評価した。

(*R*)-SKおよび(*S*)-AKはMSSAのみならずMRSAに対しても全く同等の抗菌作用を示し、その効果は持続的であった。光学異性体間の抗菌作用に差がなかったことから、SKの光学純度はMRSAに対する抗菌作用に影響を与えないことが示された。また、これらの抗菌作用は皮膚潰瘍の治療に用いられる代表的な抗菌剤であるスルファジアジン銀と同程度であった。SKの抗菌作用は血清タンパクの添加により低下し、培地がpH 5の酸性側になると顕著に向上した。

実際に、SK軟膏はin vivoでのラット皮膚欠損傷モデルにおいて黄色ブドウ球菌に対する除菌効果を示した。

以上の結果，0.1% SK軟膏は臨床的にも有効な抗菌性を有する可能性が高いと考えられた。

### 第3章 シコニンの肉芽増殖促進作用

シコニン (SK) 軟膏の優れた創傷治癒促進効果<sup>11)</sup>において肉芽増殖促進作用は重要な役割を果たしていると考えられるが、肉芽増殖促進作用はカラゲニンのような起炎剤の投与によっても認められる作用である。<sup>49)</sup> これまでSKの肉芽増殖促進作用に関しては多くの報告<sup>3-6)</sup>があるがその作用機序に関する報告は見当たらない。そこで本章ではラット綿球埋め込み試験 (綿球法) を用いてSK投与により形成される肉芽組織の生化学的な評価を行い、さらにSKとカラゲニンとの作用の違いをラットにおける肉芽増殖促進作用と炎症誘発作用とを比較することで行った。

#### 第1節 実験の部

##### 1. 試料

シコニン(SK)は丸善製薬から購入し、99%以上の純度に精製したものをを用いた。マクロゴール(MG) 400は日本油脂 (株) から購入した。λ-carrageenin (カラゲニン) はSigma社から購入した。塩酸 (有害金属測定用) は和光純薬製を、その他の試薬はすべて特級品を用いた。また、L-ヒドロキシプロリンは乾燥後 (80℃, 減圧, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 4時間) 使用した。

##### 2. SK誘発肉芽組織の生化学的評価

SKはMG 400に溶解し滅菌した綿球 (20±1 mg) に0.1 mLしみ込ませた。投与するSKは110および330 μg/pellet (0.1および0.3%)となるようにした。8週齢のWistar系雄性ラット (日本チャールスリバー製) をペントバルビタールで麻酔し、背部を電気バリカンで剃毛する。剃毛した背部をアルコール綿で消毒後、正中線を中心に左右肩甲部皮下に薬物を含有する綿球を1個ずつ挿入し、切開部を縫合した。10日後にエーテル吸入により屠殺した後、埋め込まれた綿球を形成された肉芽組織とともに摘出し周囲の粘膜および皮下組織等をていねいに取り除き, Fig.

3-1に示した手順で処理して肉芽組織の乾燥重量，ヘモグロビン量およびヒドロキシプロリン量を測定した。対照として，生理食塩液 (saline) およびMG 400を用いた。取り出した綿球は60℃で約24時間一定重量になるまで乾燥したのち，重量を測定して綿球重量を引いて肉芽組織乾燥重量を算出した。ヘモグロビン量はヘモグロビン定量キット（ヘモグロビン-テスト ワコー，和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。ヒドロキシプロリンはクロラミンTを用いるKivirikkoら<sup>50)</sup>の方法を改良した永谷ら<sup>51)</sup>の方法を用いて測定した。

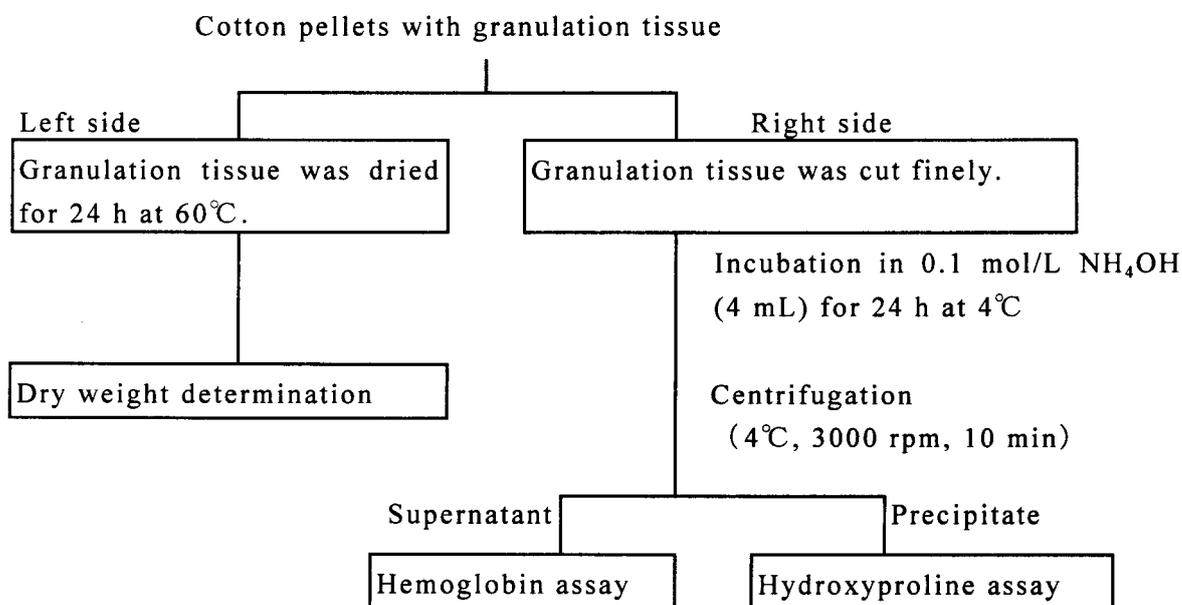


Fig. 3-1. Schematic representation of the procedure for the evaluation of biochemical parameters

### 3. SKとカラゲニンのラットにおける肉芽増殖促進作用

SKはMG 400に溶解し55, 110および330  $\mu\text{g/pellet}$ , カラゲニンは生理食塩液に溶解し10, 100および1000  $\mu\text{g/pellet}$ となるように調製し, 先に記載した方法と同様の方法(綿球法)で試験を行った。取り出した綿球は, 60°Cで約24時間一定重量になるまで乾燥したのち重量を測定して, 綿球重量を引いて肉芽組織乾燥重量を算出した。それぞれの肉芽増殖率は式 3-1を用いて算出し, 効果の指標である肉芽組織形成指数(Granulation Tissue Forming Index: G.T.F. Index)とした。ただし, SKおよびカラゲニンの対照溶液としてそれぞれMG 400および生理食塩液を用いた。

G.T.F. Index (%)

= (被験サンプルでの肉芽組織乾燥重量の平均値 / 対照溶液での肉芽組織乾燥重量の平均値)  $\times$  100 …式3-1

### 4. SKとカラゲニンのラットにおける炎症誘発作用

5週齢のWistar系雄性ラットを用いた。ラット左後肢足部をマジックインキでマーキングし, 予め足浮腫測定装置(TK101, ユニコム社製)で足容積を測定した(mL:  $V_0$ )。左後肢足部皮下に被験溶液を0.1 mL投与し, 5時間後に足容積を測定した(mL:  $V_5$ )。SKはMG 400に溶解し投与量が55, 110および330  $\mu\text{g}$ , カラゲニンは生理食塩液に溶解し投与量が10, 100および1000  $\mu\text{g}$ となるように調製した。

浮腫率は式 3-2に従って算出した。次に浮腫率から式 3-3に従って浮腫誘発率(%)を求め, これを効果の指標である浮腫誘発指数(Swell Inducing Index: S.I. Index)とした。ただし, SKおよびカラゲニンの対照溶液としてそれぞれMG 400および生理食塩液を用いた。

浮腫率(%) =  $(V_{5h} - V_0) / V_0 \times 100$  …式3-2

$V_{5h}$  : カラゲニン投与5時間後の足容積(mL)

$V_0$  : カラゲニン投与前の足容積(mL)

$$\text{Swelling Index (\%)} = (\text{被験サンプルでの浮腫率の平均値} / \text{対照溶液での浮腫率の平均値}) \times 100 \quad \dots\text{式3-3}$$

## 5. 統計解析

得られたデータは一元配置分散分析 (ANOVA) により解析し、有意差の認められた項目については、LSD (Fisher's least significant differences) 法により群間の差を危険率5%以下 ( $p < 0.05$ ) もしくは1%以下 ( $p < 0.01$ ) として検定した。

## 第2節 SK誘発肉芽組織の生化学的評価

肉芽増殖促進作用は肉芽組織の乾燥重量を測定して評価した。肉芽組織中のヘモグロビン量は血管新生の指標<sup>52)</sup>として、コラーゲンの特異的なマーカーであるヒドロキシプロリン量はコラーゲン産生の指標<sup>33, 53)</sup>として測定し、これらを生化学的なパラメータとした。生理食塩液、MG 400およびSK投与によって形成された肉芽組織でのこれら生化学的なパラメータの値をTable 3-1に示す。

生理食塩液とMG 400投与群では2種の生化学的パラメータ値に差は認められなかった。したがって本試験においてSKの溶解剤 (コントロール) としてMG 400を使用することは問題がないと考えられた。SK投与により肉芽組織の乾燥重量が有意に増大し、SKは顕著な肉芽増殖促進作用を示した。さらに、ヘモグロビン量およびヒドロキシプロリン量もコントロールと比較して有意に増大した。したがって、SKは血管新生およびコラーゲン生成を伴う肉芽増殖促進作用を有することが示された。

ヒドロキシプロリンの値はSKの用量に依存して数値の増大が認められたが、ヘモグロビン量は低用量 (110  $\mu\text{g/pellet}$ ) と高用量 (330  $\mu\text{g/pellet}$ ) との間で差は認められなかった。よって、SKの血管新生効果は今回の低用量 (SK濃度として0.1%) 以上では飽和に達していると考えられた。

Lawrenceら<sup>53)</sup>は創傷治癒において血管新生とコラーゲンの生成は重要であると

報告している。さらに、第1章に記述したように、我々は0.1% SK軟膏が優れた創傷治癒促進作用を示すことを見い出している。<sup>11)</sup> したがって、SKは創傷治癒過程の組織修復において重要な過程である血管新生およびコラーゲン生成を伴う肉芽増殖促進作用によって、創傷治癒を促進している可能性が示唆された。

Table 3-1 Values of the biochemical parameters of granulation tissue formed

	Dry weight (mg / pellet)	Hemoglobin (mg / pellet)	Hydroxyproline (mg / pellet)
Saline	30.5 ± 1.2	1.35 ± 0.13	0.40 ± 0.02
MG 400	34.9 ± 2.6	1.64 ± 0.14	0.39 ± 0.03
SK (110 μg/pellet)	57.7 ± 4.7 <sup>**</sup> , <sup>++</sup>	2.96 ± 0.17 <sup>**</sup> , <sup>++</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>*</sup> , <sup>+</sup>
SK (330 μg/pellet)	67.7 ± 5.6 <sup>**</sup> , <sup>++</sup>	2.90 ± 0.24 <sup>**</sup> , <sup>++</sup>	0.65 ± 0.09 <sup>**</sup> , <sup>++</sup>

Each value represents the mean ± S.E. (n = 7-10).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from saline

+  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , significantly different from MG 400

as analyzed by one way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

### 第3節 SKとカラゲニンの作用

肉芽増殖促進作用は、炎症性物質の投与により傷害を受けた部分の組織修復の過程で生体が示す作用である<sup>49)</sup>ことから、カラゲニンのような起炎剤を投与しても認められる作用である。したがって、SKの肉芽増殖促進作用の作用機序を明らかにすることを目的として、SKとカラゲニンにおけるそれぞれの肉芽増殖促進作用および炎症誘発作用の比較を行った。

Fig. 3-2にSKおよびカラゲニン投与により形成された肉芽組織の乾燥重量を示す。これより、SKのみならずカラゲニンも用量依存的に肉芽組織の形成を促進することが示された。この結果からSK投与による肉芽組織形成指数（G.T.F.Index, 式3-1）は55, 110および330  $\mu\text{g/pellet}$ のとき、それぞれ133, 148および176%と算出された。さらにカラゲニン投与によるG.T.F.Indexは10, 100および1000  $\mu\text{g/pellet}$ のとき、それぞれ107, 135および181%と算出された。これらをTable 3-2に示す。

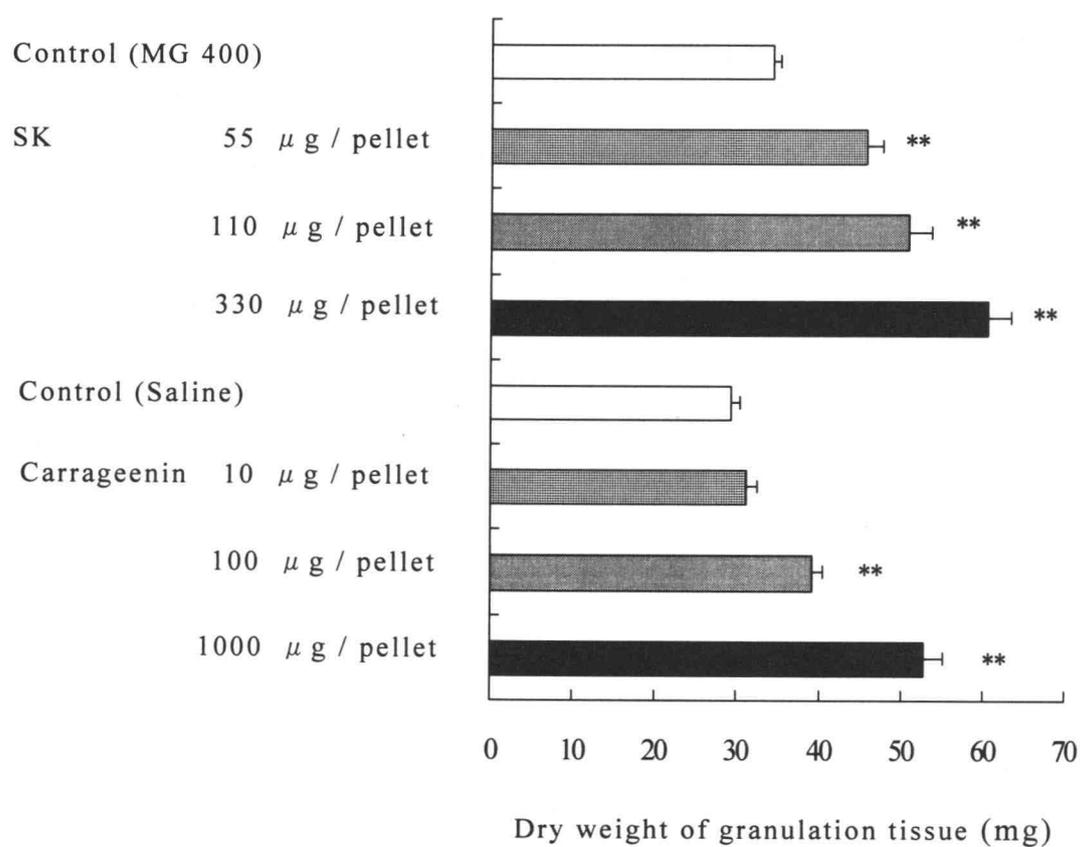


Fig. 3-1 Effect of SK and carrageenin on granulation tissue formation in rats

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 10-12).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from control

as analyzed by one way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

Table 3-2 G. T. F. indices of SK and carrageenin

Sample tested		G.T.F. index (%)
MG 400		100
SK	55 $\mu$ g / pellet	133
SK	110 $\mu$ g / pellet	148
SK	330 $\mu$ g / pellet	176
Saline		100
Carrageenin	10 $\mu$ g / pellet	107
Carrageenin	100 $\mu$ g / pellet	135
Carrageenin	1000 $\mu$ g / pellet	181

次に炎症誘発作用を評価するために、ラット足浮腫誘発試験を行った。SKおよびカラゲニン投与による浮腫率（式 3-2）をFig. 3-3に示す。これより、カラゲニンのみならずSKも用量に依存して足浮腫を誘発することが示された。この結果からSK投与による浮腫誘発指数（Swelling Index, 式 3-3）は55, 110および330  $\mu$ g/siteのとき、それぞれ195, 248および297%と算出された。さらにカラゲニン投与によるSwelling Indexは10, 100および1000  $\mu$ g/siteのとき、それぞれ357, 678および1631%と算出された。これらをTable 3-3に示す。

Fig. 3-3よりMG 400は生理食塩液と比較して浮腫を誘発したが、Table 3-1に示したようにMG 400投与によって肉芽組織の生化学的パラメータは、生理食塩液と全く差が認められなかった。したがって、今回観察されたMG 400の浮腫誘発作用はその高い吸水性に起因していると考えられた。

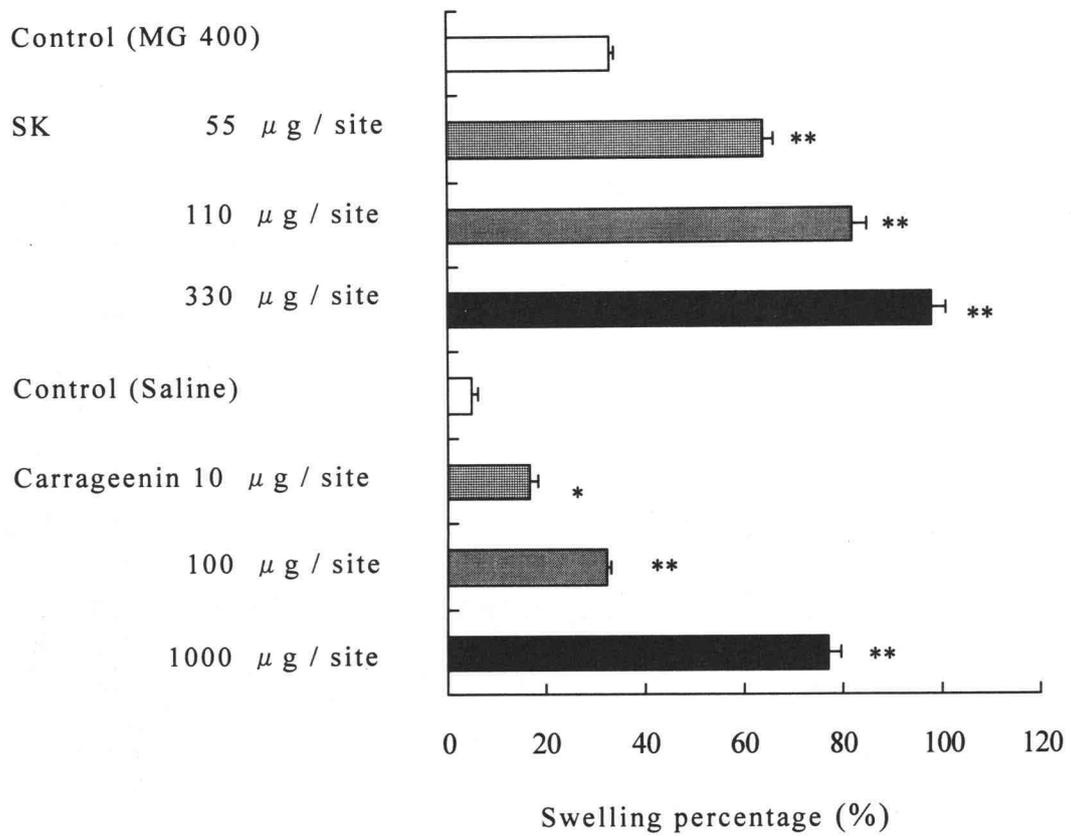


Fig. 3-3 Effect of SK and carrageenin with respect to the induction of swelling in the rats' hind paw

Each column represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 8-9).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from control

as analyzed by one way ANOVA followed by Fisher's least significant difference method.

Table 3-3 Swelling indices of SK and carrageenin

Sample tested		Swelling index (%)
MG 400		100
SK	55 $\mu$ g / pellet	195
SK	110 $\mu$ g / pellet	248
SK	330 $\mu$ g / pellet	297
Saline		100
Carrageenin	10 $\mu$ g / pellet	357
Carrageenin	100 $\mu$ g / pellet	678
Carrageenin	1000 $\mu$ g / pellet	1631

SKおよびカラゲニンのそれぞれの肉芽組織形成指数 (G.T.F.Index) および浮腫誘発指数 (Swelling Index) の関係を Fig. 3-4 に示す。G.T.F.Index と Swelling Index の間にはともに直線関係が認められ、SK およびカラゲニンでの相関係数 ( $r$ ) はそれぞれ 0.977 および 0.990 と算出され、両者の肉芽増殖促進作用と浮腫誘発作用は密接に関係していることが示された。また、Fig. 3-4 に示した直線の傾きが大きく異なっており、SK では肉芽増殖促進作用、カラゲニンでは浮腫誘発作用がそれぞれ顕著に強く、両者の作用は異なっていることが示された。

以上の結果、SK の肉芽増殖促進作用は主に炎症反応によって発現するのではないことが示唆された。しかし、SK は弱いながらも浮腫誘発作用を示したことから、その弱い炎症惹起作用は肉芽増殖促進作用に寄与していると考えられた。

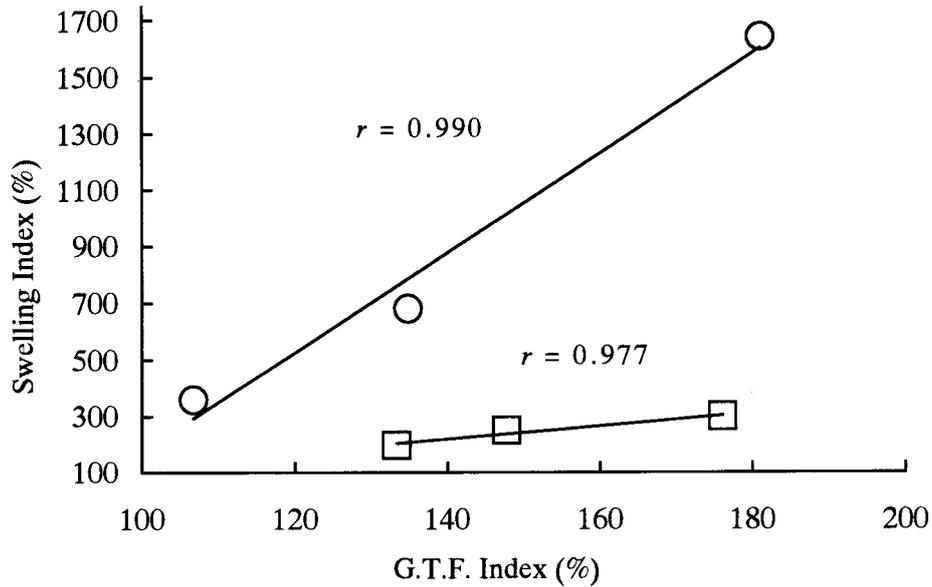


Fig. 3-4 Relationship between the G.T.F. index and swelling index of SK and carrageenin (□, SK; ○, Carrageenin)

#### 第4節 本章のまとめ

本章では、シコニン(SK)投与により形成される肉芽組織の生化学的な評価を行い、さらにSKとカラゲニンとの肉芽増殖促進作用の違いに関する検討を行った。

SKは顕著な肉芽増殖促進作用を示し、肉芽組織中のヘモグロビン量およびヒドロキシプロリン量もコントロールと比較して有意に増大させた。よって、SKは血管新生およびコラーゲン生成を伴う肉芽増殖促進作用を有することが示された。

SKとカラゲニンにおいて肉芽増殖促進作用と浮腫誘発作用の間に相関関係が存在し、SKでは肉芽増殖促進作用、カラゲニンでは浮腫誘発作用がそれぞれ顕著に強いことが示された。

以上の結果、SKは創傷治癒過程の組織修復において重要な過程である血管新生およびコラーゲン生成を伴う肉芽増殖促進作用によって創傷治癒を促進する可

能性が示唆された。さらに，SKとカラゲニンの肉芽増殖促進作用の作用機序は異なり，SKが示した弱い炎症惹起作用は肉芽増殖促進作用に寄与していると考えられた。

## 第4章 シコニンのスーパーオキシドラジカル消去作用

McCordとFridovich<sup>54)</sup>によるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性の発見以来、活性酸素が数多くの生理的および病的現象と深くかかわりあっていることが判明してきた。<sup>17)</sup> スーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) は活性酸素の一つとして知られ、特に $O_2^{\cdot-}$ 消去剤であるSODが種々の傷害や疾病に対して顕著な効果を示すことから $O_2^{\cdot-}$ は注目されており、火傷や皮膚潰瘍などの創傷治癒における $O_2^{\cdot-}$ の関わりに関する報告も多い。<sup>18-20)</sup>

電子スピン共鳴法 (ESR) は、物理的に確立された唯一のフリーラジカルの直接測定法であることから、その装置自身の進歩に伴いフリーラジカルの研究において大きな役割を果たしている。<sup>55)</sup> フリーラジカルのESR測定での問題点は、フリーラジカルの寿命が短いため測定が非常に困難なことであった。しかし、スピントラップ剤を用いて不安定なフリーラジカルを捕捉し、安定なラジカル (spin adduct) に変換してから測定を行うスピントラップ法 (Fig. 4-1) が開発<sup>56)</sup>されたことによって幅広い応用が可能となった。スピントラップ法はフリーラジカルの間接測定法ではあるが、得られるスペクトルはラジカル種により選択性があることから非常に有用な方法である。<sup>57)</sup>

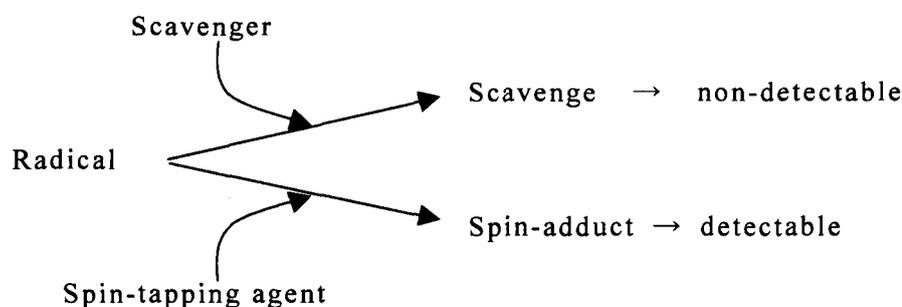


Fig. 4-1 Schematic representation of spin-trapping method

Mitsutaら<sup>58)</sup>はスピントラップ剤として5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO)を用いてSODと試料の $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を測定することで試料の $O_2^{\cdot-}$ 消去活性をSOD様活性 (SOD-like activity) として表現することができると報告している。

本章においては、シコニン軟膏の創傷治癒促進作用の作用機序の解明を目的として、シコニン (SK) とアルカンニン (AK) の $O_2^{\cdot-}$ 消去活性をスピントラップ法によりESRを用いて検討をした。さらに、Mitsutaら<sup>58)</sup>の方法を用いてSKのSOD-like activityを評価した。

## 第1節 実験の部

### 1. 試料

SKおよびAKはそれぞれ硬紫根および軟紫根から抽出し、99%以上の純度に精製したものを用いた。これらの光学純度をHPLCを用いてIkedaら<sup>46)</sup>の方法で評価した結果、純シコニン [(R)-SK]と純アルカンニン [(S)-AK] (Fig. 0-1) の比率 (R : S) はSKで82 : 18, AKで15 : 85であった。SKおよびAKは光学的に純品でないものの、光学異性体間の活性比較には使用可能であると判断して使用した。SOD (3750 unit (U) / mg protein) はフナコシ (株) から購入した。DMPO, ヒポキサンチン (HPX) およびキサンチンオキシダーゼ (XOD) はラボテック (株) から購入した。これら以外はすべて試薬特級を用いた。

### 2. ESR測定条件

ESR 装置は JEOL JES-TE 200 spectrometer (日本電子 (株)) を使用し、ESR用扁平セル(LC-12:有効容積130  $\mu$  L)を用いて測定した。 $O_2^{\cdot-}$ 消去活性の測定条件は、magnetic field, 337.1  $\pm$  5 mT; power, 4 mW 9.42 GHz; sweep time, 2 min; modulation, 100 kHz 0.079 mT; amplitude, 1  $\times$  200; time constant, 0.3 sとした。

SK セミキノラジカルの測定は、magnetic field: 337.1  $\pm$  5 mT; power: 1 mW 9.42 GHz; sweep time: 4 min; modulation: 100 kHz 0.01 mT; amplitude: 1  $\times$  200; time constant 0.03 sとした。

### 3. $O_2^{\cdot-}$ 消去活性の評価

$O_2^{\cdot-}$  の発生系としてHPX-XOD反応系を用いた。試料の $O_2^{\cdot-}$  消去活性は、生成した $O_2^{\cdot-}$  がDMPOによりトラップされたスピニアダクト (DMPO- $O_2^{\cdot-}$ ) 量を測定することにより行った。<sup>59)</sup> 測定手順をFig. 4-2に示す。

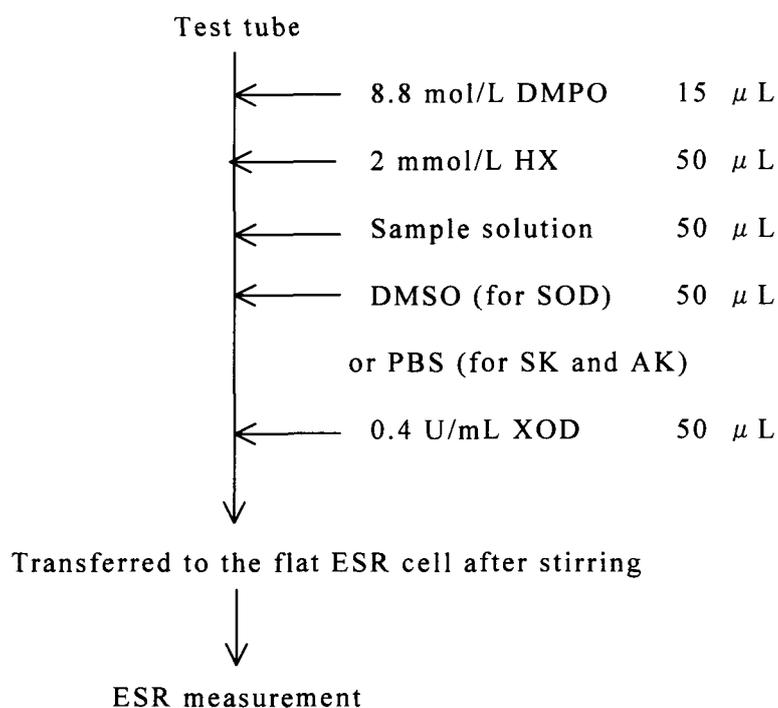


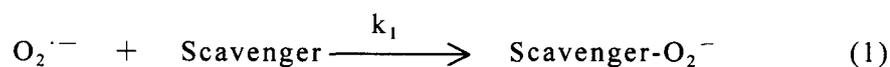
Fig. 4-2 Procedure for the determination of DMPO- $O_2^{\cdot-}$  yield

SODはpH 7.4リン酸緩衝液（PBS）に溶解し、0.8 ~ 25.0 U/mL（最終濃度 0.18 ~ 5.8 U/mL）に調製した。SKおよびAKは水に溶けないためジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、 $3.9 \times 10^{-3}$  ~ 39.0 mmol/L（最終濃度  $9.0 \times 10^{-4}$  ~ 9.0 mmol/L）に調製した。その他の試薬はPBSに溶解した。

生成されるDMPO- $O_2^{\cdot-}$ 量はXOD添加後、正確に45秒後に測定を開始した。実験はすべて室温（約22℃）で行った。DMPO- $O_2^{\cdot-}$ のシグナル強度は低磁場側から最初のシグナルのピーク高さと内部標準物質であるマンガンイオン（ $Mn^{2+}$ ）のシグナルのピーク高さの比を比較することにより行った。

SKおよびAKの $O_2^{\cdot-}$ 消去活性はDMSOを添加したコントロールに対するDMPO- $O_2^{\cdot-}$ の50%生成抑制濃度（ $ID_{50}$ ）を用いて評価した。さらに $O_2^{\cdot-}$ に対するSKおよびAKの2次反応速度定数は以下に示す競合反応モデル<sup>60,61</sup>の式(1)~(8)から算出した。

ただし、 $k_1$ および $k_2$ はそれぞれScavengerおよびDMPOの反応速度定数を表し、 $[Scavenger-O_2^{\cdot-}]$ 、 $[Scavenger]$ 、 $[DMPO-O_2^{\cdot-}]$ 、 $[DMPO]$ および $[O_2^{\cdot-}]$ はそれぞれの濃度を表す。また、 $F$ はScavengerによるspin-adduct生成抑制率（ $0 < F < 1$ ）を表す。



これを式で表すと

$$d[Scavenger-O_2^{\cdot-}] / dt = k_1 [Scavenger][O_2^{\cdot-}] \quad (3)$$

$$d[DMPO-O_2^{\cdot-}] / dt = k_2 [DMPO][O_2^{\cdot-}] \quad (4)$$

$$d[Scavenger-O_2^{\cdot-}] / dt : d[DMPO-O_2^{\cdot-}] / dt = F : (1-F) \quad (5)$$

式 (5)を式 (3), (4)で書き換えると

$$k_1 [\text{Scavenger}][\text{O}_2^{\cdot-}] : k_2 [\text{DMPO}][\text{O}_2^{\cdot-}] = F : (1-F) \quad (6)$$

式 (6)を $k_1$ で表すと

$$k_1 = k_2 \cdot F / (1-F) \cdot [\text{DMPO}] / [\text{Scavenger}] \quad (7)$$

Scavengerの濃度が50%生成抑制濃度 ( $\text{ID}_{50}$ ) のとき $F=0.5$ であるから

$$k_1 = k_2 \cdot [\text{DMPO}] / [\text{ID}_{50}] \quad (8)$$

ここで  $k_2$ ,  $[\text{DMPO}]$ および $[\text{ID}_{50}]$ は既知であることから式 (8)より $k_1$ を求めることができる。ただし, 本試験においては $k_2 = 16.9 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{s}^{-1}$ として計算した。<sup>58)</sup>

## 第2節 SOD様活性 (SOD-like activity) の評価法

Fig. 4-2の手順に従ってSODの $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を評価した。Fig. 4-3にSODの濃度と $F/(1-F)$  ( $F$ : DMPO- $O_2^{\cdot-}$ の生成抑制率,  $0 < F < 1$ ) の関係を示す。生成するシグナルはSODの濃度に依存して減少したことから、観察されたスペクトルはDMPO- $O_2^{\cdot-}$ であることが確認された。また、Fig. 4-3に示した直線の回帰式は式 4-1で示された。式 4-1からSODの $ID_{50}$  ( $F=0.5$  のとき) は1.92 U/mLと算出された。したがって試料のSOD-like activity はそれぞれの $ID_{50}$ の値を用いて式 4-2にしたがって表す<sup>58)</sup>ことができた。

$$F / (1-F) = 0.52 X \quad \dots \text{式 4-1}$$

ここで $X$ は SODの濃度 (U/mL) である。

$$\text{SOD-like activity (U/mg)} = 1.92 \text{ (U/mL)} / ID_{50} \text{ (mg / mL)} \quad \dots \text{式 4-2}$$

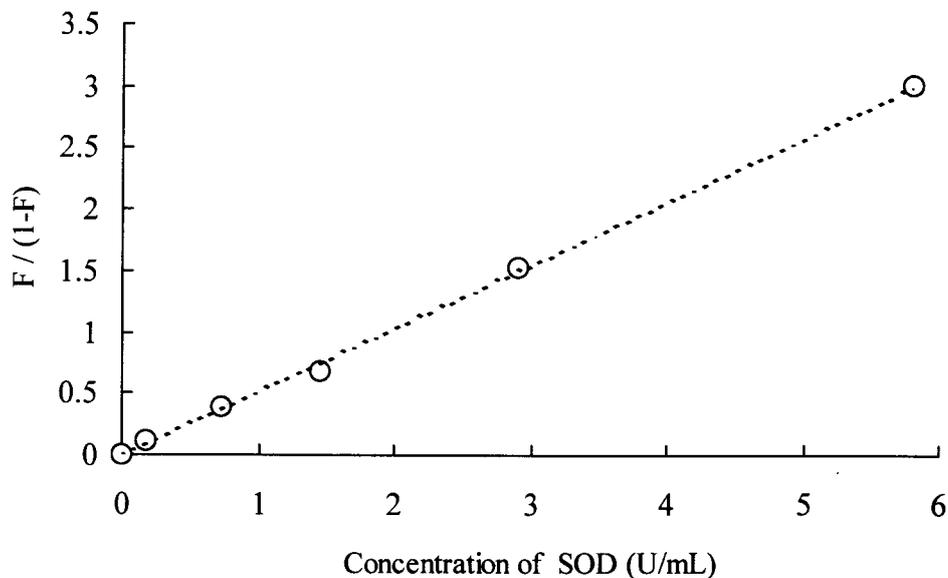


Fig. 4-3 Relationship between the concentration of standard SOD and the inhibitory ratio ( $F$ ) on the formation of DMPO- $O_2^{\cdot-}$

### 第3節 SKとAKの $O_2^{\cdot-}$ 消去活性

SKならびにAKの濃度と生成したDMPO- $O_2^{\cdot-}$ の相対的シグナル強度(%) (コントロールのシグナル強度を100%とした場合の強度)の関係をFig. 4-4に示す。SKならびにAKの濃度に依存してDMPO- $O_2^{\cdot-}$ のシグナル強度は減少し、ともに $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を示した。Fig. 4-4におけるDMPO- $O_2^{\cdot-}$ の生成量が50%付近の直線式を用いてSKならびにAKの $ID_{50}$ はそれぞれ $7.2 \times 10^{-6}$  および  $5.5 \times 10^{-6}$  mol/Lと算出された (Table 4-1)。式 (8)にこれらの $ID_{50}$ 値を用いると、 $O_2^{\cdot-}$ に対するScavengerの2次反応速度定数はそれぞれ $1.4 \times 10^6$  および  $1.9 \times 10^6$  (mol/L) $^{-1}$ s $^{-1}$ と算出された (Table 4-1)。これらの結果から、SKとAKはほぼ同等の $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を有することが示された。Mitsutaら<sup>58)</sup>は、代表的な $O_2^{\cdot-}$ 消去剤の一つであるアスコルビン酸の2次反応速度定数を $3.5 \times 10^5$  (mol/L) $^{-1}$ s $^{-1}$ と報告している。これらのことより、SKならびにAKはアスコルビン酸よりも強力な $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を有すると推察された。

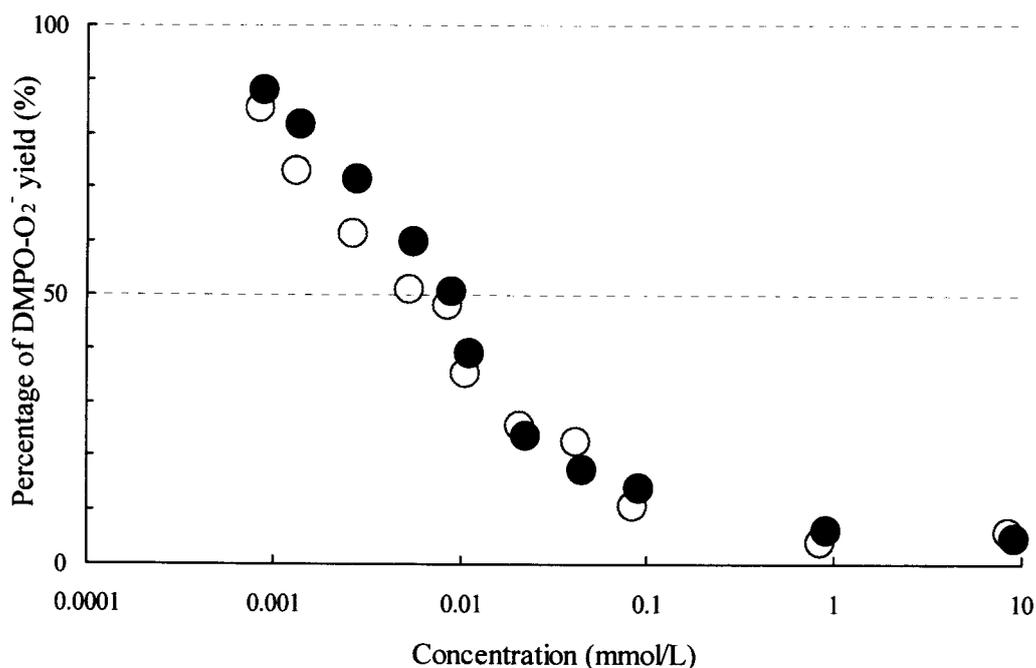


Fig. 4-4 Inhibitory effects of SK and AK on the formation of DMPO- $O_2^{\cdot-}$  (●, SK; ○, AK)

さらに、SKのSOD-like activity は $ID_{50}$ を式 4-2に代入して約920 U/mgと算出された。したがって、軟膏1 g当たりSK 1mgを含有する0.1% SK軟膏のSOD-like activityは約920 U/gであることが示された。Takamiら<sup>20)</sup>は0.06% SOD軟膏 (SOD activity 1920 U/g) がラット創傷治癒モデルにおいて優れた創傷治癒促進作用を示したと報告している。さらに、安部ら<sup>62)</sup>は0.01% 以上のSOD軟膏 (SOD activity 310 U/g 以上) がラットの皮膚刺激に対して0.1%ヒドロコルチゾン軟膏と同等の優れた抗炎症作用を示すことを報告している。

以上の結果、SKおよびAKは強力な $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を示し、0.1% SK軟膏は創傷治癒促進作用や抗炎症作用が期待できる $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を有することが示唆された。

Table 4-1  $ID_{50}$  values, rate constant (k) values of SK and AK

	$ID_{50}$ (mol / L)	k ((mol / L) <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
SK	$7.2 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^6$
AK	$5.5 \times 10^{-6}$	$1.9 \times 10^6$

#### 第4節 SKの $O_2^{\cdot-}$ 消去機構

Fig. 4-5にSK添加後に観察されたDMPO- $O_2^{\cdot-}$ のスペクトルを示す。高濃度のSK ( $1.9 \times 10^{-1}$  mmol) を添加したとき通常のDMPO- $O_2^{\cdot-}$ のシグナル以外に新たなシグナルの発生 (Fig. 4-5中に\*で示した) が確認され、かつそのシグナル強度は経時的に大きくなった (SK添加20分後のスペクトルをFig. 4-5に示した)。今回このスペクトルに関する詳細な解析は行わなかったが、Doddら<sup>63)</sup>は、5,8-dihydroxy-

1,4-naphthoquinone (naphthazarin)がセミキノンラジカルを形成することを報告している。SKも naphthazarin骨格を有していることから、この新たなラジカルは、SKと $O_2^{\cdot-}$ が反応して形成されたSKセミキノンラジカルであると推察した。このような反応はアドリアマイシンのようなキノン系薬物に認められ、Öllingerら<sup>64)</sup>はnaphthazarinの細胞毒性はセミキノンラジカルに由来することを報告している。さらに、Kalyanaramanら<sup>65)</sup>はセミキノンラジカルの細胞毒性は細胞内で酸素を酸化し $O_2^{\cdot-}$ 発生させることに由来すると報告している。よって、SKの抗菌作用や抗腫瘍作用にはSKが変化したSKセミキノンラジカルが関与していると推察された。

最近Tsujiuraら<sup>66)</sup>はメタノール中のSKを電気化学的に還元し、発生したSKセミキノンラジカルのESRスペクトルに関する報告をしている。さらにその反応の結果から、SKは一電子還元反応により $O_2^{\cdot-}$ 消去作用を示すと予測している (Chart 1)。今回、本研究においてDMPO- $O_2^{\cdot-}$ の生成がSKにより抑制され、かつSKセミキノンラジカルが生成されたことから、SKは一電子還元反応により $O_2^{\cdot-}$ を消去すると結論された。したがって、SKによるDMPO- $O_2^{\cdot-}$ 生成抑制作用は $O_2^{\cdot-}$ 発生系であるHPX - XOD反応系の抑制ではなく、 $O_2^{\cdot-}$ 消去作用により起こることが示された。

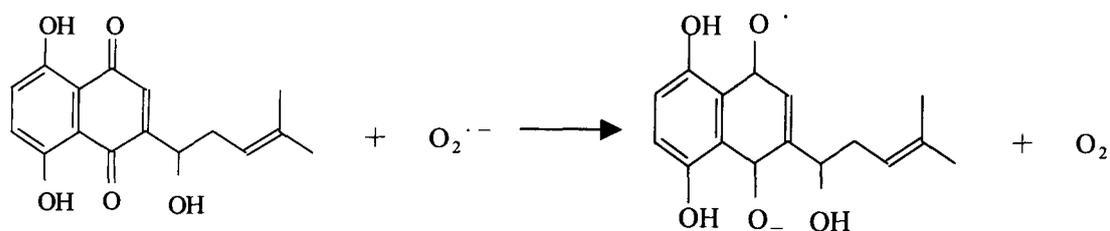


Chart 1. Speculated reaction of SK and  $O_2^{\cdot-}$

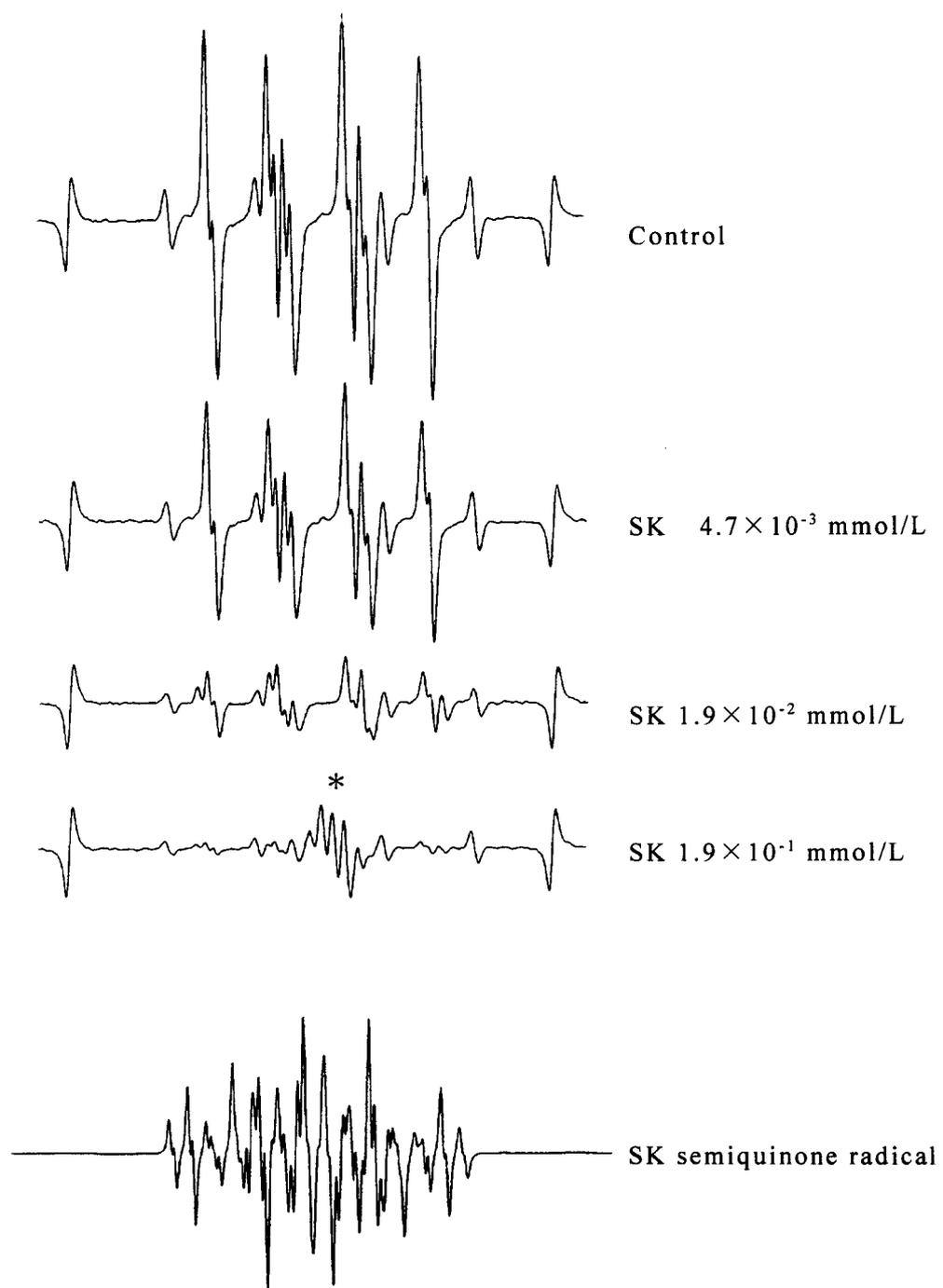


Fig. 4-5 The ESR spectra of  $\text{DMPO-O}_2^-$  observed upon the addition of SK and the ESR spectrum of the SK semiquinone radical

## 第5節 本章のまとめ

本章においては、シコニン(SK)の創傷治癒促進作用の作用機序の解明を目的として、SKとアルカンニン(AK)のスーパーオキシドラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )消去活性をESRを用いて検討した。その結果、SKおよびAKはともに強力な $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を示し、その活性に差は認められなかった。0.1% SK軟膏の $O_2^{\cdot-}$ 消去活性はSOD活性で表すと約920 U/gであり、創傷治癒促進作用および抗炎症作用が期待できる活性を有することが示された。またSKは $O_2^{\cdot-}$ と反応しSKセミキノンラジカルに変化することが示され、SKは一電子還元反応によって $O_2^{\cdot-}$ を消去すると結論された。

以上の結果、SK軟膏の創傷治癒促進作用において、 $O_2^{\cdot-}$ 消去作用は非常に重要な役割を果たし、また、抗菌作用においてはSKセミキノンラジカルが関与している可能性が示唆された。

## 第5章 シコニンの鉄イオン関与ヒドロキシルラジカル (HO·) 生成系への影響

フリーラジカルの中でもHO·は非常に反応性の高いラジカルとして知られ、核酸、タンパク質、脂質および糖などの生体成分と速やかに反応し酸化変性させると言われている。<sup>67)</sup> 生体内で有効に働く消去剤(スカベンジャー)としてはヒアルロン酸などが報告<sup>68)</sup>されているが、作用機構が明らかにされているものは多くない。Arisawaら<sup>21)</sup>は、HO·の存在により、創傷治癒が遅延される可能性があるとして報告している。そこで本章においては、SKおよびAKが鉄イオンの関与するHO·生成系に与える影響をスピントラップ法によりESRを用いて評価した。

### 第1節 実験の部

#### 1. 試料

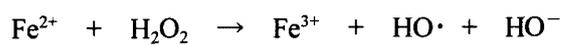
SKおよびAKは第4章で用いたものと同じものを使用した。5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO)はラボテック(株)から購入した。これら以外はすべて試薬特級を用いた。

#### 2. ESR測定条件

ESR装置はJEOL JES-TE 200 spectrometer(日本電子(株))を使用し、ESR用扁平セル(LC-12:有効容積130  $\mu$ L)を用いて測定した。測定条件は magnetic field, 335.5  $\pm$  5 mT; power, 4 mW 9.41 GHz; sweep time, 2 min; modulation, 100 kHz 0.079 mT; amplitude, 6.3  $\times$  100; time constant, 0.3 sとした。

#### 3. In vitroでの鉄イオン関与HO·生成系に与える影響に関する評価

SKおよびAK添加によるHO·生成系に対する影響は、以下に示すFenton反応(式5-1)<sup>69)</sup>により生成されるHO·をDMPOスピントラップ法によりスピニアダクト(DMPO-OH)<sup>70)</sup>として測定することにより行った。測定手順をFig. 5-1に示す。



…式 5-1

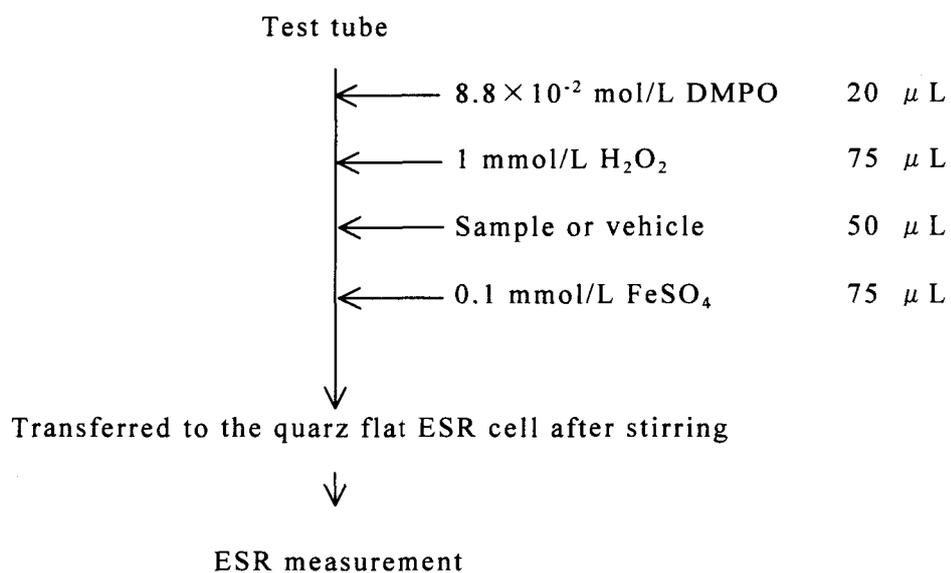


Fig. 5-1 Procedure for the determination of DMPO-OH yield

SKとAKは水にほとんど溶けないためアセトンに溶解しその濃度を $3.5 \times 10^{-3} \sim 3.5 \text{ mmol/L}$ （最終濃度 $8.0 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-1} \text{ mmol/L}$ ）に調製した。DMPO、 $\text{H}_2\text{O}_2$ および $\text{FeSO}_4$ は精製水に溶解し、それぞれの濃度は $8.8 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 、 $1 \text{ mmol/L}$ および $0.1 \text{ mmol/L}$ （最終濃度はそれぞれ  $8 \text{ mmol/L}$ 、 $3.4 \times 10^{-1} \text{ mmol/L}$ および $3.4 \times 10^{-2} \text{ mmol/L}$ ）に調製して用いた。生成したDMPO-OHの測定は $\text{FeSO}_4$ 溶液の添加後60秒後に行った。また、実験はすべて室温（約 $22^\circ\text{C}$ ）で行った。

シグナル強度の評価は、内部標準物質である $\text{Mn}^{2+}$ のシグナルピーク高さに対する低磁場側から2番目のDMPO-OHシグナルのピーク高さの比を比較することにより行った。HO $\cdot$ 生成抑制効果は、アセトンを添加したコントロールに対するDMPO-OHの50%生成抑制濃度（ID $_{50}$ ）を用いて評価した。

#### 4. SKと鉄イオンとの相互作用の分光学的評価

SKと鉄イオンとの相互作用を分光学的に調べた。測定用サンプルの調製はFig. 5-1と同様の手順で行い、各溶液も同様の比率になるように調製した（ただし、DMPO溶液の代わりに精製水を添加した）。SK濃度は $0.35 \text{ mmol/L}$ （最終濃度 $8.0 \times 10^{-2} \text{ mmol/L}$ ）で一定にして $\text{FeSO}_4$ の濃度を $1.2 \times 10^{-2} \sim 1.8 \times 10^{-1}$ （最終濃度 $0.4 \times 10^{-2} \sim 6.1 \times 10^{-2} \text{ mmol/L}$ ）に変化させた。 $\text{FeSO}_4$ 溶液添加後攪拌し、直ちに分光光度計（UVIDEC610-C：日本分光（株））を用いて $400 \sim 700 \text{ nm}$ における吸光度を測定した。

## 第2節 SKとAKのDMPO-OH 生成抑制効果

藤田ら<sup>71)</sup>は、HO $\cdot$ を直接に生成する反応は生体組織細胞には存在しないが、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ の不均化反応（式5-2）によって生じた $\text{H}_2\text{O}_2$ が $\text{Fe}^{3+}$ の存在下で $\text{O}_2^{\cdot -}$ と反応（Haber-Weiss反応—式5-3）してHO $\cdot$ を生じたり、金属イオン（ $\text{M}^{N+}$ ）が $\text{H}_2\text{O}_2$ と反応（Fenton反応—式5-4）してHO $\cdot$ を生じたりして、間接的にHO $\cdot$ は生成され、このHO $\cdot$ によって脂質過酸化反応が開始されるのが一般的であると述べている。



よって今回HO・消去活性の評価に当たり，in vitroでのHO・生成系として一般的であるFenton反応を利用することにした。Fenton反応系に精製水，アセトンおよびSKを添加した際に生ずる4本線の特徴的なDMPO-OHスペクトルをFig. 5-2に示す。なお，SKおよびAKは水に溶けないため溶解剤としてアセトンを用いたが，アセトン添加によりDMPO-OH発生強度は若干低下したものの，反応に大きな影響はなく，測定は可能であると判断し試験を行った。Fig. 5-2に示したESRスペクトルの超微細構造はそれぞれ $a_{\text{N}} = 1.49 \text{ mT}$ ， $\alpha_{\text{H}}^{\beta} = 1.49 \text{ mT}$ および $g = 2.006$ であった。さらに，今回用いた反応系に代表的なHO・消去剤であるジメチルスルホキシド（DMSO）を添加したところ，濃度依存的にシグナル強度が減少した。以上の結果から今回観察されたスペクトルはDMPO-OHであると同定された。

HO・生成系に添加したSKもしくはAK濃度（mmol/L）と検出されたDMPO-OHの生成率（%）の関係をFig. 5-3に示す。Fig. 5-3より，DMPO-OH生成率はSKおよびAK濃度の増加に伴い減少し，SKおよびAKがDMPO-OHの生成を抑制することが示された。SKおよびAKのID<sub>50</sub>はFig. 5-3に示したそれぞれの曲線のDMPO-OH生成率50%近傍の直線式を用いて算出した結果，共に $4.0 \times 10^{-2} \text{ mmol/L}$ を示し両者の間に違いは認められなかった。

生薬成分であるSKはその成分中にその光学異性体であるAKを含有しており，その存在比はある程度のばらつきを有するものである。<sup>12)</sup> 前章においてSKとAKはO<sub>2</sub><sup>·-</sup>消去作用を示し，その活性に差が認められないことを報告した。<sup>22)</sup> さらに今回SKとAKが同等のDMPO-OH生成抑制作用を示したことから，これらの作用に起因する薬理効果は光学異性体の存在比によって影響を受けないと考えられた。

### DMPO-OH spin adduct

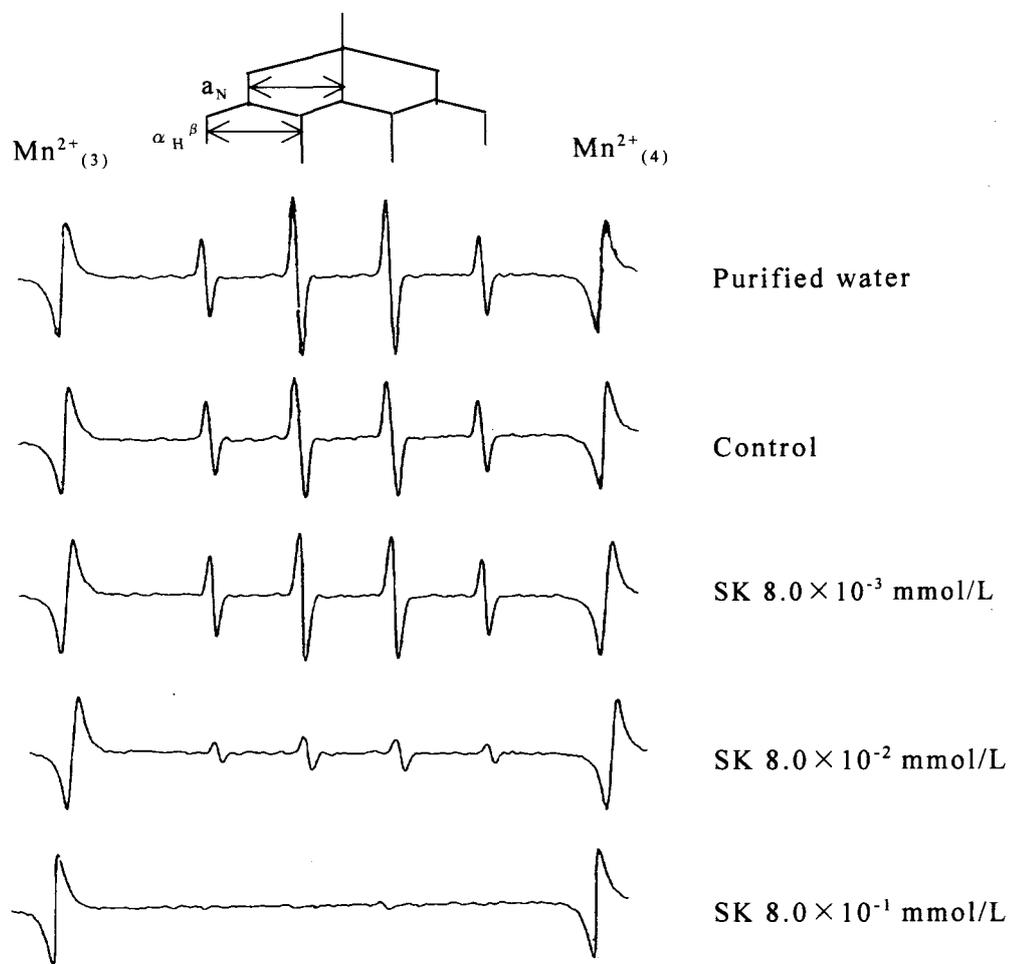


Fig. 5-2 The ESR spectra of DMPO-OH observed upon the addition of SK

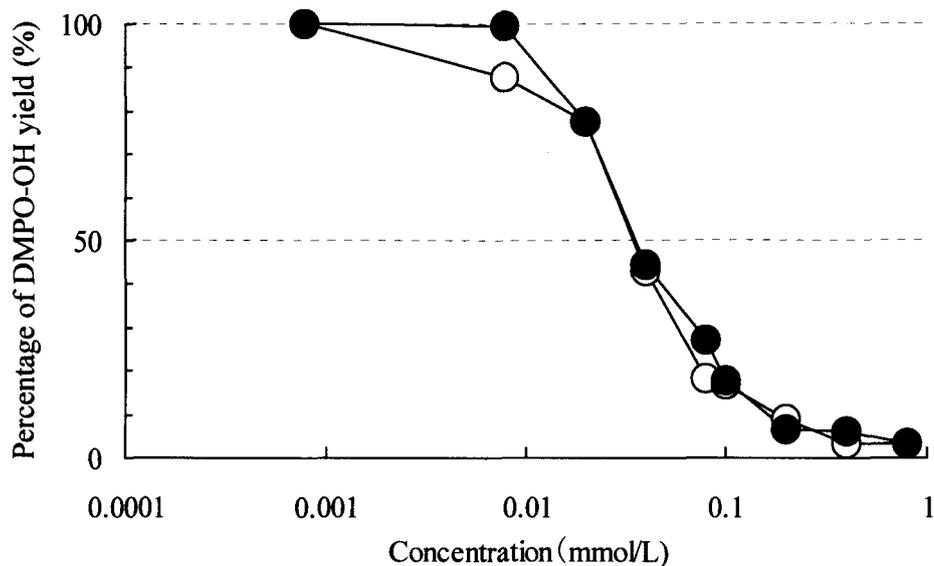


Fig. 5-3 Relationship between the concentration of SK (or AK) and the percentage of DMPO-OH yield (●, SK; ○, AK)

### 第3節 SKのDMPO-OH 生成抑制機構

HO $\cdot$ 生成系において、SK添加によるDMPO-OH生成率の減少が、HO $\cdot$ の直接消去であるかどうかを調べるため、DMPO濃度を変化させ競合反応を用いて検討した。DMPOの濃度を $8.8 \times 10^{-2}$  mol/Lから8.8 mol/Lに変化させて、SKを添加して同様の試験を行った。その結果、得られたID $_{50}$ は $3.6 \times 10^{-2}$  mmol/Lを示し、DMPO濃度の違いによるID $_{50}$ の変化が観察されなかった。この結果は、HO $\cdot$ に対してSKはDMPOと競合反応していないことを示唆し、SKはHO $\cdot$ を直接に消去していないと結論された。

前章において、SKはO $_2^{\cdot-}$ と反応しSKセミキノンラジカルに変化することを示した。<sup>22)</sup> ドーパミンの様なカテコール類が直接にHO $\cdot$ と反応しキノンおよびセミキノン類に変化することが報告<sup>72)</sup>されており、また、キノン類から発生するセミキノンラジカルは比較的安定であることも報告されている。<sup>73)</sup> しかし、本試

験においてはセミキノンラジカルの生成は観察されなかった。このことも、SKがHO・と反応していないことを示唆している。

以上の結果から、今回観察されたSKのDMPO-OH生成抑制作用は、Fenton反応のHO・生成機構を抑制することにより発現したと結論された。

毛利ら<sup>74)</sup>は金属イオンの存在によりSKの色調が変化し、かつ経時的な変色が抑制されると報告している。これはSKと金属イオンが結合（キレート）する可能性を示しており、今回観察されたFenton反応の抑制もSKと鉄イオンとのキレートに起因していると考えられた。また、SKのID<sub>50</sub> ( $3.6 \sim 4.0 \times 10^{-2}$  mmol/L)と試験に用いた鉄イオンの濃度 ( $3.4 \times 10^{-2}$  mmol/L) がほぼ同一の値を示したことから、SKと鉄イオンは2:1のモル比でキレートしていると推察された。

#### 第4節 SKと鉄イオンとの分光学的相互作用

SKと鉄イオンがキレート化合物を形成していることを分光学的にも調べた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含むSK溶液にFeSO<sub>4</sub>を加えるとSK由来の可視スペクトルは変化し、添加したFeSO<sub>4</sub>の濃度の変化に伴い、等吸収点(474, 527 nm)を持ちながら変化することが確認された(Fig. 5-4)。この結果より、SKと鉄イオンがキレート化合物を形成することが分光学的に確認された。

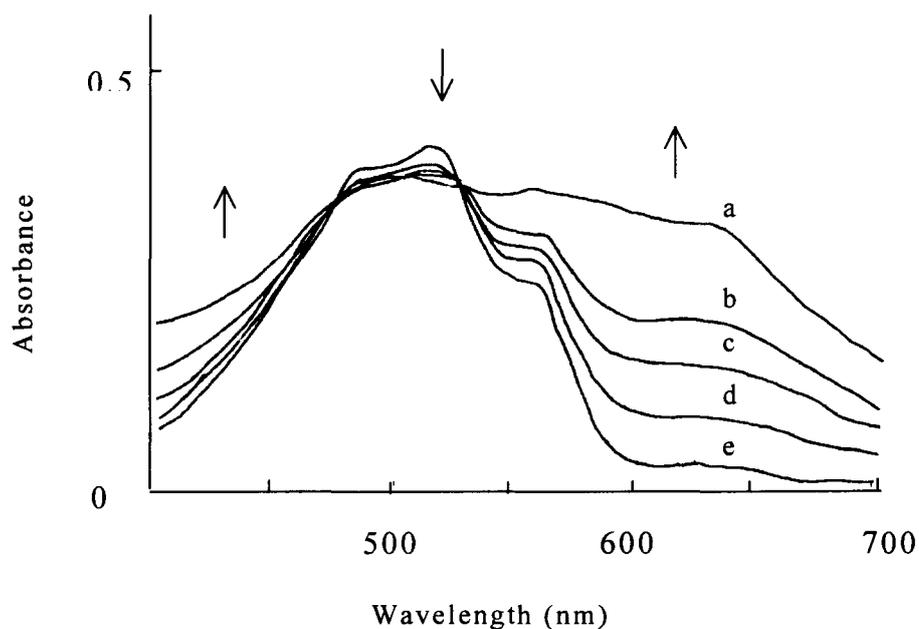


Fig. 5-4 Absorption spectral changes of SK accompanying with the titration with FeSO<sub>4</sub>

- a,  $4.1 \times 10^{-2}$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>; b,  $3.1 \times 10^{-2}$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>  
 c,  $2.0 \times 10^{-2}$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>; d,  $1.0 \times 10^{-2}$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>  
 e,  $0.4 \times 10^{-2}$  mmol/L FeSO<sub>4</sub>

Fig. 5-5にSKに対する鉄イオンのモル分率と640 nmにおける吸光度の関係を示す。Fig. 5-5より鉄イオンのモル分率が約0.5以上で吸光度変化が一定になったことから、この比率付近でSKと鉄イオンのキレート形成反応は終了していると考えられた。このことから、分光学的にもSKと鉄イオンはモル比2:1でキレートしていると考えた。

以上の結果、SKは鉄イオンとキレートすることが明らかとなり、式5-3および式5-4に示したHaber-Weiss反応およびFenton反応を抑制することによりin vivoにおいてHO $\cdot$ の生成を阻害する可能性が示唆された。

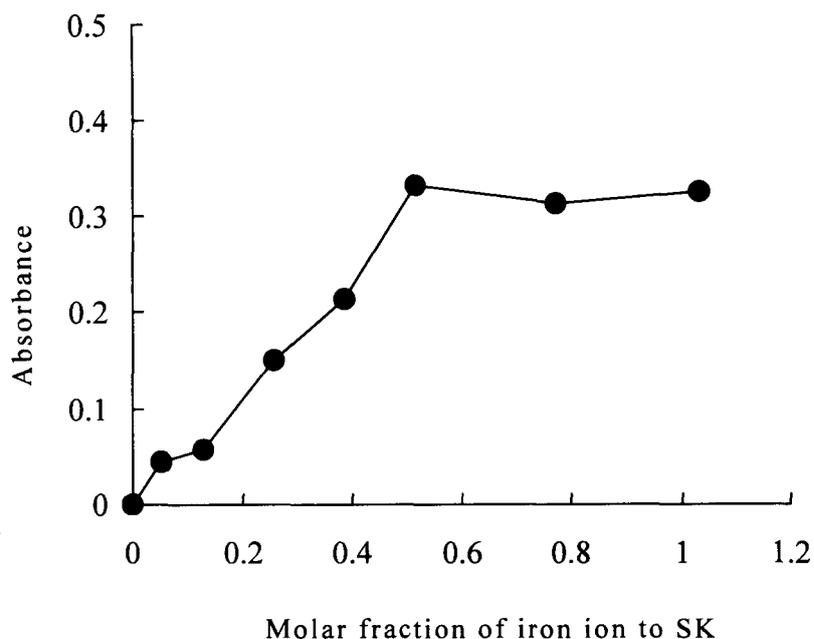


Fig. 5-5 Relationship between the molar fraction of iron ion to SK and the absorbance at 640 nm

## 第5節 本章のまとめ

本章においてはシコニン(SK)とヒドロキシルラジカル( $\text{HO}\cdot$ )との関係を明らかにすることを目的として、SKおよびアルカンニン(AK)が鉄イオンの関与する $\text{HO}\cdot$ 生成系であるFenton反応に与える影響をスピントラップ法によりESRを用いて評価した。その結果、SKおよびAKはともにスピンアダクト(DMPO-OH)の生成を抑制し、それらの活性に差は認められなかった。しかし、DMPOの濃度の変化に対して $\text{ID}_{50}$ の変化が認められず、またSKセミキノンラジカルの生成も確認されなかったことから、SKのDMPO-OH生成抑制作用は、Fenton反応の $\text{HO}\cdot$ 生成機構を抑制することで発現したと結論された。

SKによるFenton反応の抑制はSKと鉄イオンのキレート形成に起因していると考えられ、SKの $ID_{50}$ と鉄イオンの濃度がほぼ同一の値を示したことから両者は2:1のモル比でキレートしていると推察された。さらに分光学的にもSKと鉄イオンが2:1のモル比でキレートすることが示された。

Yoshikawaら<sup>75)</sup>はスーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼを併用することにより、 $O_2^{\cdot-}$ および $H_2O_2$ を消去して、反応性の高い $HO\cdot$ の生成を阻止することによって、組織細胞傷害がより効果的に防御できることを報告している。

以上の結果、 $O_2^{\cdot-}$ 消去作用を有するSKに、さらに鉄イオン関与 $HO\cdot$ 生成系の抑制作用が確認されたことから、SKはin vivoにおいてフリーラジカルによる組織細胞傷害を効果的に防御できる可能性が示唆された。

## 第6章 総括ならびに結論

本研究では紫根の成分であるシコニン（SK）を主薬とした新規皮膚潰瘍治療剤の開発を目的として、水溶性基剤であるマクロゴール基剤を用いてSK軟膏を調製し、その創傷治癒促進作用およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に対する抗菌作用を評価した。また、薬理効果発現の作用機序解明を目的として、SKの肉芽増殖促進作用およびフリーラジカル消去および生成抑制作用に関する検討を行った。

SK軟膏はラット創傷治癒モデルにおいて創傷治癒促進作用および抗炎症作用を示し、0.1% SK軟膏は現在臨床で用いられている皮膚潰瘍治療剤よりも優れた創傷治癒促進効果を有する可能性が示唆された。しかし、SKはマクロゴール基剤中で不安定であり、抗酸化剤を添加することで安定化したものの、冷蔵保存する必要があると考えられた。

SKはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）のみならず、MRSAに対しても抗菌作用を示し、対照薬として用いた代表的な皮膚潰瘍治療用の抗菌薬であるスルファジアジン銀と同程度の抗菌作用を有することが確認された。また、SKの光学異性体であるアルカンニン（AK）は、SKと全く同等の抗菌効果を示したことから、SKの光学純度はMRSAに対する抗菌作用に影響を与えないことが示された。SKの抗菌作用は血清タンパクの存在により低下し、培地がpH 5の酸性になると顕著に向上した。SK軟膏はラット皮膚欠損傷モデルにおいて黄色ブドウ球菌に対する除菌効果を示した。したがって、SK軟膏は皮膚潰瘍の治療においてMRSA感染の予防および治療に関しても有効である可能性が示唆された。

SKは創傷治癒過程の組織修復において重要な過程である血管新生およびコラーゲン生成を伴う肉芽増殖促進作用を示すことが確認された。SKとカラゲニンはともに肉芽増殖促進作用と浮腫誘発作用の間に相関関係を示し、SKはカラゲニンに比べ肉芽増殖促進作用が顕著に強いことが示された。よって、SKの肉芽増殖促進作用のメカニズムはカラゲニンと異なり、その弱い炎症惹起作用は肉芽増殖促進作用に寄与している可能性が示唆された。

SKおよびAKはスーパーオキシドラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )消去作用を示し、両者の活性に差は認められなかった。また、その活性は抗炎症作用や創傷、熱傷の治癒促進作用が期待できる強さであることが示された。よって、SKの $O_2^{\cdot-}$ 消去活性はその創傷治癒促進作用や抗炎症作用において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、SKは $O_2^{\cdot-}$ と反応してSKセミキノンラジカルを生成したことから、SKの $O_2^{\cdot-}$ 消去作用は一電子還元反応によって発現すると結論された。また、SKの抗菌作用や抗腫瘍作用には、SKセミキノンラジカルも関係している可能性があるかと推察された。

SKおよびAKは鉄イオンが関与するヒドロキシルラジカル( $HO\cdot$ )生成系であるFenton反応の抑制作用を示し、両者の活性に差は認められなかった。SKによるFenton反応の抑制はSKと鉄イオンとのキレート形成により起こったと考えられ、SKと鉄イオンは2 : 1のモル比でキレートしていると推察された。よって、SKは強力な $O_2^{\cdot-}$ 消去作用に加えて、鉄イオン関与 $HO\cdot$ 生成系の抑制作用を示したことから、SK軟膏はフリーラジカルによる組織細胞傷害を効果的に防御できる可能性が示唆された。

本研究において、SK軟膏は現在臨床で使用されている皮膚潰瘍治療剤に比べ優れた創傷治癒促進作用を有することを明らかにするとともに、その作用が肉芽増殖促進作用、フリーラジカルの消去および生成抑制作用に起因している可能性を新たに見出した。また、SK軟膏がMRSAに対する抗菌作用を有する可能性を示した。更に、SKとAKの抗菌作用、フリーラジカルの消去および生成抑制作用には差が認められず、SKの光学純度は薬効に影響しないことを明らかにした。

以上の結果、本研究は、軟膏中でのSKの安定性を改善する余地があるものの、SK軟膏が、優れた創傷治癒促進作用とMRSAに対する抗菌作用を併せ持つ、特異な作用を有する皮膚潰瘍治療剤となりうる可能性を明らかにした。

## 謝辞

本研究の実施に当たり、懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました星薬科大学教授 永井恒司先生、星薬科大学助教授 高山幸三先生に深く感謝申し上げます。

また、本研究完成に至るまで、終始有益なる御指導ならびに御助言を賜り、御激励を戴きました星薬科大学講師 米谷芳枝先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、有益なる御指導ならびに御助言を賜り、本研究に御協力戴きました日本電子株式会社 河野雅弘氏、増水章季氏に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究の機会をお与えくださり、有益なる御指導ならびに御助言を賜り、御激励戴きました株式会社ツムラ 前中央研究所製剤研究所所長 山本武司氏、医薬営業本部ヘルスケア企画部部長 木村孝良氏、中央研究所商品開発研究所開発研究第一部部長 松本高明氏ならびに中央研究所創薬研究所新薬製剤研究部部長 花村聡氏に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究の機会をお与えくださいました、株式会社ツムラ 取締役研究総轄部長 岡田稔氏、理事中央研究所所長 亀井英夫氏、中央研究所創薬研究所所長 川村秀樹氏ならびに中央研究所名誉所長 丸野政雄氏に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究に御協力くださいました、児島康司氏、太田真一氏、佐々木茂氏ならびに株式会社ツムラ 中央研究所創薬研究所新薬製剤研究部の皆様に心より厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 福井基成, “最新褥瘡治療マニュアルー創面の色に着目した治療法”, 6-7, 照林社, 東京(1993).
- 2) (株) ツムラ, TJ-501 ツムラ紫雲膏, 医薬品インタビューフォーム (1996).
- 3) 林元英, 日薬理誌, **73**, 193 (1977).
- 4) Ozaki Y., Ohno A., Saito Y., Satake M., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 683 (1993).
- 5) Ozaki Y., Ohno A., Saito Y., Satake M., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1075 (1994).
- 6) Ozaki Y., Xing L., Satake M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 233 (1996).
- 7) 田中康雄, 小谷功, 薬誌, **92**, 525 (1972).
- 8) 京極和旭, 寺山博行, 舘安英, 鈴木堯, 小松曼耆, 生薬, **27**, 31 (1973)
- 9) Tanaka S., Tajima M., Tsukada M., Tabata M., *J. Nat. Prod.*, **49**, 466 (1986).
- 10) Sankawa U., Ebizuka Y., Miyazaki T., Isomura Y., Otuka H., Shibata S., Inomata M., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2392 (1977).
- 11) Sekine T., Kojima K., Ota S., Matsumoto T., Yamamoto T., Maitani Y., Nagai T., *S.T.P. Pharma. Sci.*, **8**, 249 (1998).
- 12) 塚田稔, 福井宏至, 羽原千里, 田端守, 生薬, **37**, 299 (1983).
- 13) Tabata M., Tsukada M., Fukui H., *Planta Medica*, **44**, 234 (1982).
- 14) 永武毅, 松本慶蔵, 宍戸晴美, 宇塚良夫, 山本眞志, 田口幹雄, 力富直人, 吉田利昭, 隆杉正和, 高橋淳, 大石和徳, 坂本翊, 屋富祖夏樹, 鈴木寛, ムバキ・ンシアラ, 渡辺貴和雄, *Chemotherapy*, **34**, 240 (1986).
- 15) Sekine T., Kojima K., Sasaki S., Matsumoto T., Yamamoto T., Maitani Y., Nagai T., *S.T.P. Pharma. Sci.*, **8**, 255 (1998).
- 16) Sekine T., Kojima K., Matsumoto T., Yamamoto T., Maitani Y., Nagai T., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 950 (1998).
- 17) 吉川敏一, 製薬工場, **7**, 329 (1987).
- 18) Melikian V., Laverson S., Zawachi B., *J. Trauma*, **27**, 151 (1987).
- 19) White M. J., Heckler F. R., *Clin. Plast. Surg.*, **17**, 473 (1990).

- 20) Takami M., Nishiguchi K., Kiyohara Y., Komada F., Iwasawa S., Okumura K.,  
薬剂学, **53**, 185 (1993).
- 21) Arisawa S., Arisawa T., Ohashi., Nitta Y., Ikeya T., Asai J., *Clin. Exp. Pharm.  
Phys.*, **23**, 222 (1996).
- 22) Sekine T., Masumizu T., Maitani Y., Nagai T., *Int. J. Pharm.*, **174**, 133 (1998).
- 23) 関根隆志, 増水章季, 米谷芳枝, 高山幸三, 河野雅弘, 永井恒司, 薬誌, **118**,  
609 (1998).
- 24) 世戸康弘, 元吉悟, 中村秀雄, 伊牟田淳一, 石徳武, 諫山滋, 薬誌, **112**, 259  
(1992).
- 25) 林恭史 編, 越田晃, 中島洋一, “褥瘡の治療と対策”, 58-61, 医薬ジャー  
ナル社, 東京 (1992).
- 26) 高野正彦, “今日の皮膚外用剤”, 163-164, 南山堂, 東京 (1981).
- 27) 福井基成, “最新褥瘡治療マニュアルー創面の色に着目した治療法”, 25, 照  
林社, 東京 (1993).
- 28) 中条正行, 石崎登留, 医学と薬学, **29**, 205 (1993).
- 29) 藤田泰宏, 菅忠三, 化学工場, **39**, 851 (1988).
- 30) 鴨志田勝男, 小山内洋子, 松浦典子, 山下浩美, 前田朋子, 高木弘, 臨床医  
薬, **4**, 1245 (1988).
- 31) 山下彰三, 近江彰, 浜田雄三, 大石一茂, 矢野正彦, 黒木さゆ里, 藤井良久,  
赤松博, 小島寛, 応用薬理, **37**, 313 (1989).
- 32) 中野方正, 尾関義郎, 川辺洋, 武田克之, 鶴見介登, 応用薬理, **47**, 29 (1994).
- 33) 左京かつふみ, 石川智一, 増川善和, 浦野陽介, 浜田浩之, 尾川修, 西木克  
郁, 応用薬理, **43**, 121 (1992).
- 34) O'Toole R. D., Drew W. L., Dahlgren B. J., Beaty H. N., *J.A.M.A.*, **213**, 257  
(1970).
- 35) Wenzel R. P., *Ann. Inter. Med.*, **97**, 440 (1982).
- 36) 生方公子, 最新医学, **44**, 2499 (1989).
- 37) 稲松孝思, 診断と治療, **77**, 1573 (1989).

- 38) 石川周, 医学の歩み, **166**, 359 (1993).
- 39) 木村昭夫, 医学の歩み, **166**, 363 (1993).
- 40) Goldenheim P. D., *Postgraduate Med. J.*, **69** Suppl 3, S62 (1993).
- 41) 上田正登, 尾藤利憲, 永井宏, 福田均, 鳴瀬一弘, 市橋正光, 千原俊也, 下浦明里, 山本桂三, 正木弘實, 本田千博, 寛島保, 塩野正博, 川上尚弘, 小村明彦, 中村敦子, 清水良輔, 薬理と治療, **22**, 3703 (1994).
- 42) 吉田哲憲, 大浦武彦, 杉原平樹, 吉田哲也, 石川隆夫, 本間賢一, 小浦場祥夫, 木村中, 村住昌彦, *Jpn. J. Antibiot.*, **50**, 39 (1997).
- 43) Mccauley R. L., Linares H. A., Pelligrini V., Herndon D. N., Robson M. C., Heggers J. P., *J. Surg. Res.*, **46**, 267 (1989).
- 44) Watcher M. A., Wheeland R. G., *J. Derm. Surg. Onc.*, **15**, 1188 (1989).
- 45) Leitch I. O., Kucucelebi A., Robson M. C., *Australian New Zealand J. Surg.*, **64**, 289 (1993).
- 46) Ikeda Y., Ishida N., Fukuda C., Yokoyama K., Tabata M., Fukui H., Honda G., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2351 (1991).
- 47) Chen F. A., Cheng H. W., Wu A. B., Hsu H. C., Chen C. Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 249 (1996).
- 48) 上滝博夫, 太田豊久, 村瀬均, 太田洋, 小川純子, 会田真理子, 石田貢, 川島眞, 臨床医薬, **6**, 627 (1990).
- 49) 鶴藤丞, 三井洋司, 代謝, **8**, 576 (1971).
- 50) Kivirikko K. I., Laitinen O. and Prockop D. J., *Anal. Biochem.*, **19**, 249 (1967).
- 51) 永谷康典, 武藤康章, 佐藤宏, 飯島昌夫, 薬誌, **106**, 41-46, (1986).
- 52) 尾関義郎, 川辺洋, 清水保, 塚本桂, 中野方正, 林元英, 鶴見介登, 応用薬理, **49**, 1 (1995).
- 53) Lawrence W. T., Diegelmann R. F., *Clinics in Dermatology*, **12**, 157 (1994).
- 54) McCord J. M., Fridovich I., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 55) 西川弘泰, 吉川敏一 編, 吉川敏一 “ESR とフリーラジカル”, 13-18, 日本医学館, 東京 (1989).

- 56) Jansen E. G., *Accounts Chem. Res.*, **4**, 31 (1971).
- 57) 西川弘泰, 吉川敏一 編, 牧野圭祐, “ESR とフリーラジカル”, 19-29, 日本医学館, 東京 (1989).
- 58) Mitsuta K., Mitzuta Y., Kohno M., Hiramatsu M., Mori A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 187 (1990).
- 59) Kohno M., Mizuta Y., Kusai M., Masumizu T., Makino K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 1085 (1994).
- 60) Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., Paxton J., *Mol. Pharmacol.*, **16**, 675 (1979).
- 61) Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **200**, 1 (1980).
- 62) 安部誠, 深谷嘉英, 梅村芳樹, 野田浩子, 森田清嗣, 竹内誠, 宍戸かおり, 上田宏, 杉浦功人, 高橋久英, *皮膚*, **29**, 61 (1987).
- 63) Dodd N. J. F., Mukherjee T., *Biochem. Pharmac.*, **33**, 379 (1984).
- 64) Öllinger K., Brunmark, A., *J. Bio. Chem.*, **266**, 21496 (1991).
- 65) Kalyanaraman B., Perez-Reyes E., Manson R. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **630**, 119 (1980).
- 66) Kamada, H, Ohya H. (eds), Tsujita, T., Okamoto, S., Tajima, K., Azuma, N., Kohno, M., Makino, K., and Ishizu, K., “The Proceedings of the 2nd International Conference on Bioradicals”, 8-9, Yamagata Technopolis foundation, Yamagata (1997).
- 67) 西川弘恭, 吉川敏一 編, 谷川徹, 吉川敏一, 内藤裕二, 小田山裕一, 上田茂信, 竹村俊樹, 森田豊, 田井中憲三, 吉田憲正, 杉野成, 近藤元治, “ESR とフリーラジカル”, 109-114, 日本医学館, 東京 (1989).
- 68) Shiraishi H., Kataoka M., Morita Y., Umemoto J., *Free Radic. Res. Commun.*, **19**, 315 (1993).
- 69) Cohen G., Sinet P. M., *FEBS Lett.*, **138**, 258 (1982).
- 70) Finkelstein E., Rosen G. M., Raukman E. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4994(1989).

- 71) 藤田直, 藤本陽子, 日薬理誌, **99**, 381 (1992).
- 72) Nappi A. J., Vass E., Prota G., Memoli S., *Pigment Cell Res.* **8**, 283 (1995).
- 73) Ozawa T., Hanaki A., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2535 (1983).
- 74) 毛利和子, 周 彫, 吉田隆志, 奥田拓男, 薬誌, **115**, 221 (1995).
- 75) Yoshikawa T., Ueda S., Natio Y., Takahashi S., Oyamada H., Morita Y., Yoneta T., Kondo M., *Free Radic. Res. Commun.*, **7**, 285 (1989).