

氏名（本籍）	関根 隆志	（千葉県）
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	乙 第94号	
学位授与年月日	平成11年3月13日	
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当者	
学位論文の題名	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	
論文審査委員	主査 教授 永井 恒司	
	副査 教授 永井 正博	
	副査 教授 本多 利雄	

## 論文内容の要旨

シコニン（SK）は、火傷および痔疾などの治療に用いられる紫雲膏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、抗炎症作用、抗菌作用および抗腫瘍作用などに関する報告がある。しかし、SKを外用剤とすると、その薬理効果が基剤により大きく変化することが報告されている。本研究では紫根の成分である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の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、SK軟膏の創傷治癒促進作用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作用に関する検討を行った。

SK軟膏を調製し、ラット熱傷および皮膚欠損傷モデルを用いて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軟膏は基剤に比べて有意に治癒を促進し、対照薬剤であるトコレチナート軟膏（オルセノン<sup>®</sup>）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軟膏は基剤に比べて有意に治癒を促進し、更にトコレチナート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。よって、0.1% SK軟膏は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可能性が示唆された。更に、皮膚欠損傷モデルにおいて、SK軟膏投与群のみに炎症反応に由来する創傷面の拡大が観察さ

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。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，冷蔵保存の必要があると考えられた。

皮膚潰瘍の治療においては，細菌感染の制御も非常に重要であり，特にMRSA感染の制御が非常に重要であると言われている。そこでMRSAに対するSKの抗菌性評価を最小発育阻止濃度（MIC）を求めることで行った。SKは硬紫根からの抽出品であり，硬紫根には光学異性体であるアルカンニン（AK）が含まれていることが知られている。そこで，SKの抗菌作用に与える光学的純度の影響も評価した。SKはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌のみならず，MRSAに対しても同等のMIC（25  $\mu$ g/mL）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，AKはSKと全く同等のMICを示したことから，SKの光学的純度は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。更に，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。よって，SK軟膏はMRSAに感染した皮膚潰瘍の治療においても有効である可能性が示唆された。

創傷治癒促進作用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起こる作用である。そこでSK由来の肉芽組織の生化学的評価を行い，さらにSKとカラゲニンとの肉芽増殖促進作用の違いをラットを用いて検討した。SKとカラゲニンの投与により，用量に依存して肉芽組織の乾燥重量が増大した。血管新生およびコラーゲン生成のマーカーとしてSK由来肉芽組織中のヘモグロビンおよびヒドロキシプロリン量を測定した結果，両者の値はともにコントロールに比べて有意に増大した。よって，SKは創傷治癒過程の組織修復において重要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。ラット足蹠浮腫誘発試験の結果，SKおよびカラゲニンはともに用量依存的に浮腫を誘発した。SKとカラゲニンはともにその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たが，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，その弱い刺激である浮腫誘発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の創傷治癒促進作用および抗炎症作用の作用機序を解明するために，SK

のフリーラジカル消去活性を電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて評価した。スーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) はヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼの反応により発生させた。SKの $O_2^{\cdot-}$ 消去活性は、 $O_2^{\cdot-}$  に対するSKとスピントラップ剤である5,5-ジメチル-1-ピロリン-1-オキシド (DMPO) の競合反応 (スピントラップ法) を利用して、生成するスピニアダクト ( $DMPO-O_2^{\cdot-}$ ) 量を測定することにより評価した。その結果、SKは濃度依存的にDMPO- $O_2^{\cdot-}$ の生成を抑制し、 $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を有することを明らかにした。更にAKも同等の効果を示し、SKおよびAKのDMPO- $O_2^{\cdot-}$ に対する50%生成抑制濃度 ( $ID_{50}$ ) は、それぞれ  $7.2 \times 10^{-6}$  および  $5.5 \times 10^{-6}$  mol/Lとなり、この値から $O_2^{\cdot-}$ との反応の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。その結果、両者の活性に差は認められず、ともに強力な $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を示すことが明らかとなった。SKの $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を代表的な $O_2^{\cdot-}$ 消去剤であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の活性値 (SOD様活性) で表すと約920 unit (U)/mgと算出され、0.1% SK軟膏のSOD様活性は約920 U/gとなった。SODの外用剤は310~1920 U/g程度の濃度で抗炎症作用や、創傷および熱傷の治癒促進作用を示したとの報告があることから、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。更に、SKと $O_2^{\cdot-}$ の反応後、SKセミキノラジカルに由来するシグナルが検出されたことから、SKは一電子還元反応によって $O_2^{\cdot-}$ 消去活性を示すと結論された。また、アドリアマイシンのようなキノン系薬物の細胞毒性はそのセミキノラジカルに由来するとの報告があることから、SKの抗菌作用や抗腫瘍作用にはSKセミキノラジカルも関係している可能性があるかと推察された。

次に、フリーラジカルの中で最も反応性の高いヒドロキシルラジカル ( $HO\cdot$ ) に対するSKおよびAKの消去活性を、生体における一般的な $HO\cdot$ 生成系である鉄イオンが関与する生成系 (Fenton反応) を用いて評価した。SKおよびAKの $HO\cdot$ 消去活性はDMPOを使ったスピントラップ法を用い、生成したスピニアダクト ( $DMPO-OH$ ) 量を測定することにより評価した。その結果、SKとAKは濃度依存的にDMPO-OHの生成を抑制し、 $ID_{50}$ はともに  $4.0 \times 10^{-5}$  mol/Lと算出され、両者は同等のDMPO-OH生成抑制効果を示した。しかし、DMPO濃度の変化に対して、SKの $ID_{50}$ に変化が認められなかった。更にSKセミキノラジカルの発生も観察されなかった。よって、SKのDMPO-OH生成抑制作用はDMPOとの競合反応による $HO\cdot$ の直接消去ではなく、Fenton反応による $HO\cdot$ 生成機構を抑制することにより発現したと結論された。Fenton反応の抑制は

SKと鉄イオンとのキレートにより生じたと考えられ、SKのID<sub>50</sub>とその試験に用いた鉄イオンの濃度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。次にSKを鉄イオンで滴定してその吸光度変化を評価した。その結果、SK由来の可視スペクトルは添加した鉄イオンの濃度の変化に伴い、等吸収点を持ちながら変化することから、キレート形成が確認された。更に、640 nmにおける吸光度と鉄イオンのモル分率の関係を調べた結果、モル分率0.5以上で吸光度が一定になった。このことから、このモル分率でキレート反応は終了したと考えられ、分光学的にもSKと鉄イオンはモル比2 : 1でキレートすることが推察された。以上の結果、SKは強力なO<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去作用に加えて、鉄イオン関与HO<sup>•</sup>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い出した。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の光学的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。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、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（MRAS）に対する抗菌作用を評価し、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結果をまとめたものである。その内容を要約すると以下のようなになる。

- 1) ラット熱傷モデルにおいてシコニン軟膏は基剤と比較して有意に創傷治癒を促進した。
- 2) ラット皮膚欠損傷モデルにおいて、0.1%シコニン軟膏は基剤および市販の皮膚潰瘍治療剤と比較して有意に創傷治癒を促進した。
- 3) 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、シコニン軟膏投与群のみに観察されなかった。
- 4) シコニンはマクロゴール基剤中で不安定であったが、安定化剤の添加により安定性が改善された。
- 5) 純シコニン [(R)-SK] および純アルカンニン [(S)-AK] はMRSAに対して全く同等の抗菌作用を示し、その効果は持続的であった。
- 6) (R)-SK および (S)-AK の黄色ブドウ球菌に対する最小発育阻止濃度は、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。
- 7) (R)-SK および (S)-AK の抗菌作用は、血清タンパクの添加により低下し、培地がpH5の酸性になると顕著に向上した。
- 8) シコニン軟膏は、ラット皮膚欠損傷モデル(in vivo)において抗菌作用を示した。
- 9) SKはラット綿球埋め込み試験において、顕著な肉芽増殖促進作用を示した。
- 10) SK誘発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はコントロールと比較して有意に増大していたことから、SKの肉芽増殖促進作用は創傷治癒において重要である血管新生およびコラーゲンの産生を伴うものであることが示された。
- 11) 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顕著に強いことが示された。

- 12) SK および AK はともにスーパーオキシドラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )消去活性を示し、その活性に差は認められなかった。
- 13) SK の  $O_2^{\cdot-}$ 消去活性(SOD 様活性)は約920U/mg と算出された。
- 14) SK は  $O_2^{\cdot-}$ と反応 (一電子還元反応) し、SK セミキノシラジカルに変化した。
- 15) SK および AK はともに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 反応を抑制し、その活性に差は認められなかった。
- 16) 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り、そのモル比は 2 : 1 であることが示された。

以上の結果から、本論文においてシコニン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が明らかになるとともに、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が新たに見い出された。また、シコニン軟膏が MRSA に対する抗菌作用を有する可能性が示された。更に、シコニンとアルカンニンの抗菌作用、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、シコニンの光学純度は薬効に影響しないことが明らかにされた。

以上のように、本論文は新しい知見が含まれ、シコニンの皮膚潰瘍治療剤の開発に資する有用な情報を提供している。記述も正確で表現も適切である。よって本論文は博士 (薬学) の学位論文に充分値するものと判定した。