



## Antitrichomonal action of emodin in mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 煌輝 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1466">http://hdl.handle.net/10271/1466</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 189号	学位授与年月日	平成 6年12月 2日
氏 名	王 煌 輝		
論文題目	Antitrichomonal action of emodin in mice (マウスにおける emodin の抗トリコモナス作用)		

博士(医学) 王 煌 輝

## 論文題目

Antitrichomonal action of emodin in mice

(マウスにおける emodin の抗トリコモナス作用)

## 論文の内容の要旨

〔目的〕台湾では赤痢アメーバ症と膣トリコモナス症が現在でも約10%みられている。これらの原虫症の治療には、従来、metronidazole が用いられてきた。この薬物の有効性には問題ないが、1977年に Hornigberg によって発癌性ないし変異原性が報告されて以来、安全性に問題が生じ、新しい治療薬の開発が重要な課題となっている。従来の抗寄生虫薬の開発研究は主として合成化学薬品のスクリーニングにより進められてきた。最近、中国古来の漢方薬から得られた artemisinin とその誘導体が chloroquine 耐性マラリアに対する代用薬として注目されている。そこで、我々も、従来とは異なる発想からの開発研究として、生薬成分に metronidazole の代用薬を求める研究に着手した。中国では *Rheum palmatum* や *Sophora flavescens* などの生薬ないしその抽出エキスが膣トリコモナス症に対して有効との報告がある。そこで本研究では *Rheum palmatum* (大黄) の1成分、emodin の抗膣トリコモナス活性を metronidazole を既知対照として検討した。

〔方法〕*in vivo* 実験では、*Trichomonas vaginalis* を皮下感染したマウス(雄性 Balb/c 系)の皮下膿瘍の体積および膿瘍内の原虫数ならびに膣内感染マウスのトリコモナス感染宿主個体数と膣内原虫数を指標として、経口および皮下注射により投与された emodin の抗トリコモナス活性を検討した。*in vitro* 実験では、細胞培養の方法を用いて、培養ラット脳星状細胞の増殖に及ぼす共培養トリコモナス原虫の傷害作用の程度を指標として emodin の抗トリコモナス活性を観察した。

〔結果および考察〕まず、*in vivo* で、Balb/c 系マウスにおける皮下トリコモナス膿瘍の体積を指標として検討した。膿瘍形成前の感染1時間後から emodin の100mg/kg を1日2回皮下注射した場合、48時間後までは膿瘍の形成が完全に抑制されたが、その後は対照群と同様の形成がみられた。次に、同様の皮下トリコモナス症マウスに膿瘍が十分に形成された感染2日後から emodin の100および200mg/kg を1日2回3日間皮下注射後の皮下膿瘍中のトリコモナス原虫数を指標として検討した。その結果、対照群に比べ投与群では用量依存的な減少がみられ、いずれの投与量でも効果は有意であった。同様の皮下トリコモナス症マウスに感染3日後から emodin を1日2回7日間投与した場合の効果も膿瘍の体積を指標として対照の metronidazole と比較した。経口投与では200および500mg/kg により、また皮下投与では100および200mg/kg により、有意の、しかも用量依存的な抑制作用がみられた。metronidazole の50および75mg/kg の経口投与でも著明な効果がみられたので、皮下感染トリコモナス症が抗トリコモナス活性を研究する上で妥当な実験モデルであることが確認された。次に、膣トリコモナス症マウスに感染3日後から emodin の500mg/kg を1日1回5日間経口投与した場合の効果を検討した。膣内に原虫が認められるマウス個体数でみると効果はわずかであったが膣内のトリコモナス原虫を指標にした場合には有意の減少がみられた。対照の metronidazole は50mg/kg の経口投与で、いずれの指標についても完全な抑制効果を示した。以上の *in vivo* 実験の結果から、従来、*Rheum palmatum* の抽出エキスで認められていた抗トリコモナス活性が emodin の効果に基づくことを明らかにできた。皮下および膣トリコモナス症に対して経口投与の emodin が有効なことから、この薬剤が腸管から吸収されることは明らかである。今後、投与経路や剤形を工夫すれば、*in vivo* での有効性が更

に高まるものと思われる。

次に、*in vitro* で、培養ラット脳星状細胞にトリコモナス原虫を共培養すると、この原虫により星状細胞は72時間後までに完全に死滅した。ところが、emodin (10~100  $\mu$ M) を培養液に加えると原虫による星状細胞の傷害作用は濃度依存的に抑制された。一方、星状細胞の増殖に対しては、emodin 自体は100  $\mu$ M でわずかな抑制を示したのみだった。従って、この *in vitro* 実験における傷害作用の阻止効果からも emodin の抗トリコモナス活性が明らかとなった。次に emodin が細胞内で  $H_2O_2$  の形成を促進するという報告があるので、作用機序の一端を知る目的で、培養ラット脳星状細胞系で認められたトリコモナスによる細胞傷害の阻止効果に及ぼす free radicals の除去剤の影響を検討した。その結果、catalase ( $H_2O_2$  除去剤) は有意の効果を示したが、superoxide dismutase (superoxide anion radicals 除去剤) と mannitol (hydroxy radicals 除去剤) は無効であった。従って、emodin の抗トリコモナス作用に  $H_2O_2$  が DNA の障害などを介してかかわっていることが示唆された。

〔結論〕今回行った一連の *in vivo* および *in vitro* 実験から *Rheum palmatum* の1成分の emodin に抗トリコモナス活性を認めることができ、その作用には catalase に感受性を持つ free radicals の産生がかかわっていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

従来、赤痢アメーバ症や腫トリコモナス症に対しては、主として、metronidazole が用いられてきた。しかし、1977年に Hornigberg によって発癌性ないし変異原性が報告されて以来、metronidazole の代用薬の開発が求められている。申請者は中国で古来から経験的に用いられてきた漢方薬に metronidazole の代用薬を求める研究に着手した。本研究では2つの *in vivo* 実験モデルおよび1つの *in vitro* 実験モデルを用いて、大黄 (*Rheum palmatum*) の1成分、emodin の抗腫トリコモナス活性を metronidazole を既知対照として検討した。

得られた主な結果は次の如くである。

- (1) *in vivo* で、Balb/c 系マウスにおける皮下トリコモナス膿瘍の体積を指標として検討した。膿瘍形成前の感染1時間後から emodin の100mg/kg を1日2回皮下注射した場合、48時間後までは膿瘍の形成が完全に抑制されたが、その後は対照群と同様の形成がみられた。
- (2) 同様の皮下トリコモナス症マウスに膿瘍が十分形成された感染2日後から emodin の100および200mg/kg を1日2回3日間皮下注射後の皮下膿瘍中のトリコモナス原虫数を指標として検討した。その結果、対照群に比べ投与群では用量依存的な減少がみられ、いずれの投与量でも効果は有意であった。
- (3) 同様の皮下トリコモナス症マウスに感染3日後から emodin を1日2回7日間投与した場合の効果は膿瘍の体積を指標として対照の metronidazole と比較した。経口投与では200および500mg/kg により、また、皮下投与では100および200mg/kg により、有意の、しかも用量依存的な抑制作用がみられた。metronidazole の50および75mg/kg の経口投与でも著明な効果がみられた。
- (4) 腫トリコモナス症マウスに感染3日後から emodin の500mg/kg を1日1回5日間経口投与した場合の効果を検討した。腫内に原虫が認められるマウス個体数でみると効果はわずかであったが、腫内のトリコモナス原虫数を指標にした場合には有意の減少がみられた。対照の metronidazole の場合には、50mg/kg の経口投与で、いずれの指標についても完全な抑制効果がみられた。
- (5) *in vitro* で、培養ラット脳星状細胞にトリコモナス原虫を共培養すると、この原虫により星状細胞は

72時間後までに完全に死滅した。ところが、emodin (10~100  $\mu$ M) を培養液に加えると原虫による星状細胞の傷害作用は濃度依存的に抑制された。一方、星状細胞の増殖に対しては、emodin 自体は100  $\mu$ Mでわずかな抑制を示したのみだった。

- (6)emodin が細胞内で  $H_2O_2$  の形成を促進するという報告がある。そこで、培養ラット脳星状細胞系で emodin の作用機序の一端を知る目的で、トリコモナスによる細胞傷害作用に対する emodin の阻止効果と free radicals 除去剤の関係を検討した。その結果、catalase ( $H_2O_2$  除去剤) は有意の効果を示したが、superoxide dismutase (superoxide anion radicals 除去剤) と mannitol (hydroxy radicals 除去剤) は無効であった。

以上の結果から、従来、中国で経験的に使われてきた *Rheum palmatum* の抗トリコモナス作用が、その主要成分の emodin によることを明らかにできた。その作用機序としては、emodin による  $H_2O_2$  の形成促進の関与が示唆された。また、今回の研究で、2つの *in vivo* モデルおよび1つの *in vitro* モデルを用いることにより、生薬成分の抗トリコモナス作用を研究する基礎を確立できた。今後の発展が十分に望まれる。

審査の過程において審査員から申請者に対して次のような質問が出された。

- 1) *In vivo* 実験系で Balb/c 系マウスを使用した理由
- 2) *In vitro* 実験系の細胞はラットの脳星状細胞でないといけないのか
- 3) 大黃とはどんな植物で、どのような成分を含み、どんな薬理作用があるか
- 4) 大黃の成分のうち emodin 以外の成分にも抗寄生虫作用があるか
- 5) emodin の単離法
- 6) emodin の抗トリコモナス作用以外の抗寄生虫作用は
- 7) emodin の安全性、催奇形性、その他の毒性は確かめられているか
- 8) emodin が腫トリコモナス治療薬として取り上げられるようになった理由
- 9) emodin と matrine の関係と相違点
- 10)  $H_2O_2$  と  $Fe^{2+}$  との関係で、本来 Fe は培養液や宿主体液に多量含まれるが、その  $Fe^{2+}$  が emodin の作用に影響しないか
- 11) *In vitro* で、直接トリコモナスの殺虫作用を検定する方法はないか
- 12) emodin ないしこれを含む生薬が臨床的に用いられているか
- 13) emodin の抗トリコモナス薬としての実用化ないし将来性はどうか

これらの質問に対する申請者からの解答は概ね適切で、本論文は博士(医学)の学位申請論文としてふさわしいものであると審査委員会委員全員が一致して判定した。

論文審査担当者 主査 教授 寺 尾 俊 彦

副査 教授 佐 野 基 人 副査 教授 橋 本 久 邦

副査 助教授 小 出 幸 夫 副査 助教授 林 秀 晴