

論文審査結果の要旨

生薬は天産物であるがゆえに、栽培する地域や方法、調製法により様々な品質のものが生まれる。また、生薬には芸術的要素があり、分析機器も存在しなかった古き時代から、経験的に手で触った質感、味、匂い、色、形状などから総合判断して生薬の品質が評価されてきた。

学位申請者が題材とした当帰は *Angelica acutiloba*, *A. acutiloba* var. *sugiyamae* の根を基原とし、古来、補血活血、調経薬として用いられている重要な漢薬である。我国における当帰の栽培は江戸時代から始まり、大和地方（現在の奈良・和歌山県近辺）で栽培生産される当帰は“大和当帰”あるいは“大深当帰”と称され、生薬業界において、その品質が高く評価されている。しかしながら、近年は農業事情の事由により、高品質な大和当帰の国内生産量は減少の一途を辿っている。後世にわたって高い品質の生薬が受け継がれるには、栽培調製法の調査と伝承、栽培地の確保が必要となる。また、活性成分の探索から、含有化合物を指標とした品質評価の構築は、生薬の品質価値を高めることにも繋がる。

本論文では、以上の事項を踏まえ、まず、大和当帰の栽培・加工調製法および品質を薬史的に検証し、現在の大和当帰の主産地が奈良・和歌山県（大和地方）に限定された適地であったこと、およびその品質は他の当帰よりも高い評価を受けていたことを明らかにしている。さらに現在の栽培状況の調査を行い、古来、大和地方で行われている独特な“湯揉み”という加工調製法が現在もなお、継承されてきていることを確認している。

さらに、我国において、高品質な大和当帰の生産が減衰していることを受け、その代替栽培地を中国へ求め、これまで大和地方以外の我国では、生産することが出来なかった高品質な大和当帰の栽培を四川省で成功するとともに、生産された大和当帰が日本産のものと同品質で、日本市場での大和当帰の不足分を補う医薬資源になることを明らかにした。さらに、当帰の品質を検証するひとつの薬理的評価として線溶系活性化作用を見出し、その活性成分として (*Z*)-ligustilide, ferulic acid, adenosine を明らかにしている。また、伝統的に行われてきた湯揉み調製は、当帰の主要成分に変動を与えるものではなかったが、“味”という点において甘味を増すことを明らかにしている。

本研究は大和当帰を題材に取り上げ、高品質の生薬を伝承するためには、どのような研究が必要であるかの一案を提示したものである。また、本論文は「薬用資源学」「漢方医学」が目指す基本的な研究姿勢を示したもので、本研究が足がかりとなって、良質な生薬の生産が広く継承されることを期待する。

以上から、本論文は博士（薬学）の学位論文に十分値するものと認める。

氏名	伊藤 仁久			
学位の種類	博士（薬学）			
学位記番号	薬第90号			
学位授与の日付	平成22年3月23日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	ハッサク (<i>Citrus hassaku</i>) 果実の美白作用に関する研究			
論文審査委員 (主査)	教授	松田	秀秋	
(副主査)	教授	松尾	圭造	
(副主査)	教授	岩城	正宏	

論文内容の要旨

日本の化粧品市場における 2008 年度の美白化粧品の売上げは年間 2,000 億円を超えるといわれ、日本人の美白に対する期待と関心の高さが伺える。美白化粧品には“シミ・ソバカス”の生成を予防する製品や、それらの部分を覆い隠す製品がある。

“シミ・ソバカス”の成因には、紫外線、遺伝的素因、ホルモンバランスの乱れ、および加齢などが挙げられる。なかでも、過剰に紫外線を浴びることによるメラニンの生成・色素沈着に起因する場合が最も多いとされている。メラニンの生成は、メラニン合成酵素チロシナーゼによって制御されている。従って、チロシナーゼ阻害活性を持つ物質や紫外線防御剤が“シミ・ソバカス”の生成を予防する美白剤として化粧品に利用されている。

“シミ・ソバカス”の他に美容上の問題として挙げられる“くま”については、下地顔料などの化粧品によるマスキングを行うことが主流とされている。“くま”に有用なサプリメントとしては、ビタミン C および E を含有する製剤がいくつか上市されているにすぎない。“くま”と呼ばれる眼窩下に生じる暗色化現象は、疲労や睡眠不足などによって引き起こされ、その原因は血液流動性の低下が最も大きいと考えられている。そのため、血液流動性の低下を抑制できる薬剤は“くま”の予防または治療に利用できると考えられる。

著者は天然資源から“シミ・ソバカス”の発生を予防する新規な美白化粧品素材の探索を目的とした。これまで当研究室で柑橘類 (*Citrus* 属植物) の未熟ウンシュウミカン (*C. unshiu*) 果実エキスに抗アレルギー作用を確認し、サプリメントとして開発している。そこで著者は、天然資源として柑橘類果実に着眼し、各種 *Citrus* 属植物の 7 月から 11 月に採取した果実の抽出エキスについて一次スクリーニングした。

第 1 章第 1 節では、メラニン産生抑制作用を示す素材の探索を目的に 8 種の柑橘類の 7 月から 11 月に採取した果実の 50% ethanol (EtOH) 抽出エキスについて、*in vitro* チロシナーゼ阻害活性を指標に一次スクリーニングした。その結果、7 月に採取した未熟ハッサク果実の 50% EtOH 抽出エキス (CH-ext) に最も強いチロシナーゼ阻害活性 (IC₅₀ 値: 4.5 mg/mL) が認められた。

第 2 節では、メラニン産生の実験モデルとしてグルコサミン暴露した B16メラノーマ細胞を用いて検討した結果、CH-ext は細胞の増殖に影響しない濃度で有意なメラ

ニン産生抑制作用を示した。さらに、メラニンの合成過程にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が関与することから、SOD 様作用と 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉作用を用いた抗酸化作用を *in vitro* 試験で検討した。CH-ext の SOD 様作用の IC₅₀ 値は 0.5 mg/mL、ラジカル捕捉作用の IC₅₀ 値は 0.2 mg/mL であった。CH-ext のメラニン産生抑制作用の有効成分を明らかにするため、チロシナーゼ阻害活性を指標に分画した結果、CH-ext のフラバノン配糖体を多く含有する分画にチロシナーゼ阻害活性が認められた。そこで、ハッサクのフラバノン配糖体成分としてこれまで知られている naringin, neohesperidin, narirutin および hesperidin について検討した結果、チロシナーゼ阻害活性成分は naringin (IC₅₀ 値: 1.9 mM) であること、および neohesperidin はラジカル捕捉活性 (IC₅₀ 値: 0.6 mM) と SOD 様作用 (IC₅₀ 値: 26 μM) を有することがわかった。

第 3 節では、ヒトと同様に紫外線 (UVB) 照射によりメラニン色素沈着が生じる褐色モルモットを用いて、UVB 照射による色素沈着に対する CH-ext の作用を *in vivo* 試験で検討した結果、CH-ext 溶液塗布群には肉眼的評価および組織学的評価において色素沈着の抑制が認められた。

第 2 章第 1 節では、CH-ext が血液流動性の低下抑制作用を有すれば、“くま”の発生を予防するサプリメントの素材に成り得る可能性を期待した。CH-ext の経口投与による血液流動性の低下抑制作用は lipopolysaccharide (LPS) で誘発した disseminated intravascular coagulation (DIC) 病態ラットを用いて検討した。LPS 投与した対照群のラット血液の micro channel array flow analyzer (MC-FAN) で測定した全血通過時間と比較し、CH-ext 投与群の全血通過時間は有意に短縮された。また CH-ext は LPS による血小板数、フィブリノーゲン量の減少を抑制し、フィブリン分解産物 (FDP) 量の増加を抑制した。さらに、CH-ext を正常ラットに経口投与するとユーグロブリン溶解時間 (ELT) を短縮した。従って、CH-ext は DIC 病態ラットにおいて LPS による血液流動性の低下を抑制し、正常ラットにおいて線溶系活性化作用を有することがわかった。

第 2 節では、CH-ext の血液流動性低下抑制作用の有効成分を探索するため *in vitro* 試験でフィブリン平板法により線溶系活性化作用、赤血球凝集抑制作用および血小板

凝集抑制作用を指標に分画した。ハッサクの主フラバノン配糖体成分 **naringin** と **neohesperidin** に活性は認められなかったが、**naringenin-7-glycoside (prunin)** に強い線溶系活性化作用、赤血球凝集抑制作用および血小板凝集抑制作用が認められたので、CH-ext のこれらの活性の一部は **prunin** に由来することが示唆された。なお、ハッサクからの **prunin** の単離と **prunin** に血小板凝集抑制作用を見出したのは今回が初めてである。

第3章第1節では、美白化粧品素材としては、抗アレルギー作用を併有すればより望ましいと考えられる。当研究室で既に未熟ウンシュウミカン果実エキスに抗アレルギー作用を確認しているため、今回は CH-ext の抗アレルギー作用について詳細に検討した。まず、CH-ext は *in vitro* 試験でマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を示したので、活性を指標に分画した結果、フラバノン配糖体を多く含有する分画に活性が認められた。HPLC 分析により本分画の主成分は **naringin** と **neohesperidin** であった。我々は既に、柑橘類果実に含有される **naringin**, **neohesperidin**, **narirutin** および **hesperidin** などのフラバノン配糖体がヒスタミン遊離抑制作用を示すことを報告しているので、CH-ext のヒスタミン遊離抑制作用の本体は **naringin** および **neohesperidin** である。次に、CH-ext は *in vivo* 試験で有効かどうかを確かめるために以下の実験を行った。CH-ext の経口投与はマウスの IgE 依存 3 相性皮膚反応を **dinitrofluorobenzene (DNFB)** 誘発 1 時間後 (即時相; IPR), 24 時間後 (遅発相; LPR) および 8 日後 (超遅発相; vLPR) のいずれの時点においても用量依存的に抑制した。**Naringin** の経口投与は IPR, LPR および vLPR に対し用量依存的に抑制し、**neohesperidin** の経口投与は IPR および vLPR を抑制した。

第2節では、CH-ext とステロイド剤 **prednisolone** との併用による作用の増強効果の有無をマウスにおけるIV型アレルギーモデルである **picryl chloride** 誘発接触性皮膚炎 (PC-CD) を用いて検討した。主作用の評価基準には PC による耳介浮腫抑制作用を用い、副作用の評価基準には副腎、胸腺および脾臓の湿重量に対する影響を指標とした。CH-ext (*p.o.*) と **prednisolone** (*s.c.*) の併用投与はそれぞれの単独投与よりも耳介浮腫抑制作用を増強したが、**prednisolone** の副作用は増強しなかった。また、**prednisolone** (*s.c.*) とフラバノン配糖体 (**naringin** または **neohesperidin**, *p.o.*) の

併用投与は、CH-ext の場合と同様に、副作用を増強することなく耳介浮腫抑制作用に相乗効果が認められた。

以上の研究から、CH-ext にメラニン産生抑制作用と血液流動性の低下抑制作用をはじめで見出すとともに抗アレルギー作用を有することを確認した。従って、7月に摘果した未熟ハッサク果実は美白化粧品の新規な素材に成り得ると考えられる。また、未熟ハッサク果実は“くま”の発生の予防や抗アレルギー作用が期待されるサプリメントの素材として利用できる可能性が示唆された。

ハッサクの成熟果実は日本で食用に広く用いられており、12月に品質の良い成熟果実を収穫するためには7月の摘果が重要である。しかし、これまで7月に摘果した未熟ハッサク果実は不要なものとして廃棄されていた。未熟ハッサク果実の利用は未利用資源の産業利用という観点からも意義あることと考えている。本研究で得られた知見は、今後未熟ハッサク果実の薬用利用を進める上で重要な基礎的知見であり、メラニン産生の予防、“くま”の発生予防および抗アレルギー作用を併せ持つ新規な薬用資源としての活躍を未熟ハッサク果実に期待できると考えている。

論文審査結果の要旨

“シミ・ソバカス”の成因には、紫外線、遺伝的素因、ホルモンバランスの乱れおよび加齢などが挙げられる。また、“シミ・ソバカス”の他に美容上の問題として挙げられる“クマ・クスマ”は、疲労や睡眠不足などによって引き起こされ、その原因のひとつに血液流動性の低下やアレルギー反応が関与しているといわれている。しかし、現在上市されている美白剤の多くはメラニン産生の抑制を機序とするものがほとんどである。

学位申請者はメラニン産生の抑制とともに血液流動性の低下や抗アレルギー作用をも併せ持つ素材があれば、“シミ・ソバカス”のみならず“クマ・クスマ”の予防または治療により有用な素材を見出せると考え、本研究に着手されている。

まず、新規な美白素材の探索素材としては、古くから民間療法的に柑橘類果実が美白・美肌用剤として用いられていることに着目し、各種 *Citrus* 属植物の果実エキスのメラニン合成酵素であるチロシナーゼの阻害活性を検討し、7月に採取した未熟なハッサク (*Citrus hassaku*) 果実に高い有効性を見出している。その効果をB16メラノーマ細胞培養系においてメラニン産生の抑制を確認し、その作用機序の解明研究としてメラニン合成過程に関与する酸化反応を抑制すること、さらには有効成分として未熟な頃に多く含有されているフラバノン配糖体の *naringin*、*neohesperidin* を明らかにしている。

“クマ・クスマ”の予防または治療に対する効果としては、*in vivo*、*in vitro* 試験において抗血栓作用、線溶系活性化作用、抗I型、抗IV型アレルギー作用を見出し、有効成分としては *naringenin-7-glycoside* (*prunin*) に線溶系活性化作用、赤血球および血小板凝集抑制作用を見出し、*naringin*、*neohesperidin* に抗アレルギー作用を見出している。

ハッサク果実の化粧品素材としての有効性という観点からは、紫外線照射による皮膚メラニン色素の増加に対する外用時における効果を検討し、その効果は美白素材の *コウジ酸* と同程度の強い効果も見出している。

以上、本論文は天然薬用資源から、“シミ・ソバカス”の生成予防に加えて、“クマ・クスマ”の予防または治療にも薬用利用が可能と考えられる新規薬用素材として未熟ハッサク果実を見出し、さらに、その作用機序、有効成分をも明らかにするという「薬用資源学」が目指す基本的な研究姿勢を示したもので、極めて価値ある論文である。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文に十分値するものと認める。

氏名	高田宏文			
学位の種類	博士(薬学)			
学位記番号	薬第91号			
学位授与の日付	平成22年3月23日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	分子遺伝学的手法によるMAPKシグナル制御因子の同定とゲノム創薬への応用: ~ <i>in vivo</i> real-time MAPKシグナルモニタリングシステムの確立と抗がん薬の探索~			
論文審査委員(主査)	教授	杉	浦	麗子
(副主査)	教授	市	田	成志
(副主査)	教授	仲	西	功