

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16992

研究課題名（和文）新たなお血治療薬の提案を目指したお血治療薬作用機序の解明

研究課題名（英文）An action mechanism of a therapeutic drug for "oketsu" syndrome aiming for a new type of drug development.

研究代表者

小池 佑果 (Koike, Yuka)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：10644479

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、日本古来の医学である漢方医学において、独特な病態である「お血」に着目した研究である。「お血」は、血の流れが滞っている状態で、症状としてあざやくまなどが挙げられ、慢性疾患や婦人科系疾患の患者さんに多く見受けられる。我々は10種のお血治療薬について、血液凝固系と血液線溶系に關与する因子への影響を検討した。本研究結果から、治打撲一方（ぢたぼくいっぽう）が最も血液凝固時間を延長し、次に血液凝固因子であるトロンビンを阻害すること、更にその活性として、アントラキノン骨格を有する化合物2種を単離し構造を同定した。以上のことから、お血治療薬がトロンビンを阻害することで作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、これまで不明であった漢方薬の作用機序の一端を解明した。つまり、お血の治療薬の作用点として新たにトロンピンが追加され、既存の抗トロンピン薬がお血治療に利用できる可能性を見出した。また、「お血」が血液凝固系の因子であるトロンピンに關与していることが示唆された。更に、これまで抗トロンピン薬として未利用の化合物の抗トロンピン作用を明らかにしたことで、新たなトロンピン阻害薬のリード化合物の候補が加わった事は学術的に意義がある。これらのことから漢方薬のエビデンスが構築されたことで、漢方治療を積極的に利用する医師が増え、より国民が健康で過ごせる日常を増やすことに繋がることに社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：This research focuses on "Oketsu," a unique symptom in Kampo medicine, an traditional Japanese medicine. "Oketsu is a symptom in which the flow of blood is stagnant, and its symptoms include bruises and dark circles, which are often seen in patients with chronic diseases and gynecological disorders. We investigated the effects of 10 different Kampo on factors involved in the coagulation and fibrinolysis systems. We found that Jidaboku Ippo prolongs the coagulation time the most, and then inhibits thrombin, a coagulation factor. These results suggest that the hematological agents act by inhibiting thrombin.

研究分野：漢方

キーワード：漢方 お血 東洋医学 血液凝固

1. 研究開始当初の背景

瘀血患者の血液は血液流動性が低い。

「瘀血 (おけつ)」は「血」が滞ることを示す東洋医学における基本概念の1つである。瘀血は西洋医学の微小循環障害や血行障害に近いとされ、高血圧、動脈硬化、虚血性障害などの生活習慣病を有する患者に多く見られる。それらに加え瘀血は、打ち身、冷え症にも関わる。特に女性疾患の多くが瘀血にかかわり、更年期障害の不定愁訴などもそのひとつである。瘀血は精神的ストレスや運動不足、

長期ステロイド治療などにより引き起こされると考えられている [谿忠人、図表で見る現代医療の漢方製剤、29、1998、図1]。瘀血の診断は0-50点からなるアンケート形式の「瘀血スコア」が利用され、21点以上で瘀血とされる。女性患者27名を瘀血スコアにより3群に分けたところ、瘀血患者は非瘀血患者に比べ血液流動性が有意に低下していた [日東医誌、55、645-648、2004]。桂枝茯苓丸、当帰芍薬散、治打撲一方は瘀血症状を改善することが知られる代表的な漢方である。桂枝茯苓丸を下肢静脈溜患者30名に対し12週間、6g/日投与したところ、手足のしびれや痛み(自覚症状)と瘀血スコアの改善が認められた [S. Hayashi *et al.*, *Ann Vasc Dis*, 7, 266, 2014]。また、桂枝茯苓丸や当帰芍薬散を瘀血スコアにより瘀血と診断された患者に対し1ヶ月間服用させたところ、血液流動性が有意に改善すると報告した [堀部有三、日東医誌 *Kampo Med.* 55, 2004]。

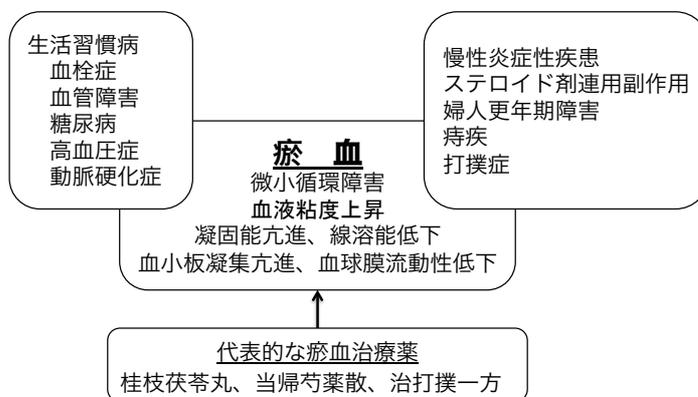


図1 瘀血がみられる疾患と治療薬

(図表で見る現代医療の漢方製剤の図を一部改変)

2. 研究の目的

本研究はこれらを踏まえて瘀血治療薬の作用機序解明と新たな瘀血治療薬を提案する事を目的とする。乃ち、①瘀血治療薬が作用する血液粘度因子と血小板凝集に関わる因子を特定する。②特定された因子に対する活性成分を明らかにし、活性成分や化学構造に近い化合物を含む植物や生薬をスクリーニングする。③活性が明らかとなったものを瘀血モデルマウスに投与し、末梢血流量や血流速度を評価することで瘀血に対する効果を明らかにし、今後の瘀血治療薬の開発に貢献する。

3. 研究の方法

(1) エキスの作成

当帰芍薬散、大黃牡丹皮湯、加味逍遙散、温経湯、通導散、女神散、当帰四逆加呉茱萸生姜湯、摂衝飲、芍婦調血 飲、治打撲一方の10種類を選択し、熱水によりエキスを抽出し、濃縮後凍結乾燥しエキスを作成した。

(2) エキスの分離と精製、構造決定

トロンビン活性が認められたエキスについて、各種カラムクロマトグラフィーを用いて

分離、精製し、活性成分を単離した。その後、NMR や MS スペクトル等の分析機器を用いて構造を決定した。

(3) APTT, PT 測定

ヒト標準血漿に、漢方エキスを添加し、プロトロンビン時間(PT)と活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

(4) トロンビン活性試験

トロンビンと合成基質を用いた酵素活性干渉試験をおこない蛍光強度を測定した。

(5) 血小板凝集能

ヒト新鮮血より得た多血小板血漿を使用し、血小板凝集装置により凝集時間を測定した。

(6) 血液線溶性

漢方エキスとウロキナーゼの混合物を、フィブリン平板に添加し1時間後の溶解窓を測定した。

(7) 血液流動性と血液成分への影響

ラットにステロイドを投与し、瘀血モデルマウスを作成した。コントロール群、瘀血群、ポジティブコントロール群、漢方投与群に分け、血液の流動性や血液成分に対する影響を検討した。

(8) 血小板、フォンビルブラント因子に対する影響

血管内皮細胞を用いて、血小板とフォンビルブラント因子の発現を測定するための、エキスの最適濃度を毒性試験法により検討した。

4. 研究成果

- (1) お血の治療に用いられる漢方 10 種を熱水抽出し、凍結乾燥しエキス粉末を作成した。
- (2) 血液線溶系に対する影響を検討したところ、線溶性は殆ど認められなかった。
- (3) 血小板凝集能を測定した結果、当帰芍薬散、大黄牡丹皮湯、加味逍遙散、温経湯、通導散、女神散、当帰四逆加呉茱萸生姜湯、摂衝飲、治打撲一方 1 mg/mL で凝集抑制が認められた。
- (4) 血小板、フォンビルブラント因子に対する影響については、コロナの影響で試薬が揃わなかった為、血管内皮細胞を用いた毒性試験により各漢方の添加濃度を設定し終了とした。それぞれの漢方における血小板、フォンビルブラント因子への影響は今後引き続き検討する。
- (5) 10 種類の漢方エキスについて APTT、PT を測定した結果、大黄牡丹皮湯、加味逍遙散、温経湯、通導散、女神散、当帰四逆加呉茱萸生姜湯、摂衝飲、芍帰調血飲、治打撲一方の 9 種類が 2.5、5、10 mg/mL において APTT、PT を延長した。
- (6) (5) で APTT、PT を延長したエキスについてトロンビン活性試験をした結果、9 種の漢方が 1 mg/mL でトロンビン活性阻害を示す事を明らかにした。これら中で最も強いトロンビン活性阻害を示した治打撲一方エキスの活性成分解明に着手した。まずエーテルと水でエキスを分配したところ、エーテル画分にトロンビン阻害活性が認められたため、当該画分をカラムクロマトグラフィーにて分離を繰り返し行い、活性成分を単離し構造決定をした。得られた化合物はアントラキノ骨格を有する chrysophanol-1-O- β -D-glucoside と chrysophanol-8-O- β -D-glucoside であることを明らかにした。

- (7) 瘀血モデルラットを用いて治打撲一方の血流の変化や血液成分に対する影響を検討した結果、ポジティブコントロール（桂枝茯苓丸）に比べ殆ど変化が認められなかった。

本研究結果は、お血治療薬のメカニズムの 1 つとして抗トロンビン活性がある事、更にアントラキノン骨格を有する化合物がお血治療薬の候補となる可能性を見出した。本成果は、お血の病態やお血治療薬の科学的解明を担い、今後のお血治療にこれまで利用されていなかった新しい治療薬を提案する事に意義があると考えます。本研究は 2022 American Society of Pharmacognosy Annual Meeting にて学会発表をし、Natural Product Communication に論文発表をした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuka Koike, Satoshi Takamatsu, Shin-ichiro Kurimoto and Kazuyoshi Kawazoe	4. 巻 17
2. 論文標題 Antithrombin Effect of Jidabokuippo and Identification of Active Compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X221074529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小池 佑果
2. 発表標題 治打撲一方の抗トロンビン作用と活性成分
3. 学会等名 昭和大学 東洋医学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池 佑果、坂下 諒太、福村 基徳、高松 智、川添 和義
2. 発表標題 トロンビンに対する漢方薬の作用
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Koike, Satoshi Takamatsu, Shin-ichiro Kurimoto and Kazuyoshi Kawazoe
2. 発表標題 Antithrombin Activity of Jidabokuippo and Identification of Active Compounds
3. 学会等名 2022 American Society of Pharmacognosy Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池佑果、高松智、川添和義
2. 発表標題 トロンピン活性を抑制した治打撲一方の成分
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------