

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 351号	学位授与年月日	平成13年11月 2日
氏名	鈴木康裕		
論文題目	Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model (マウス血栓モデルでのゲニポサイドとゲニピンの抗血栓作用)		

博士(医学) 鈴木康裕

論文題目

Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model.

(マウス血栓モデルでのゲニポサイドとゲニピンの抗血栓作用)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血小板の活性化は動脈硬化や心筋梗塞の発症において重要な役割を果たしており、その凝集はADP、コラーゲン、およびトロンボキサン A_2 (以下TXA $_2$)を含めたいくつかのアゴニストによって引き起こされる。

サンシシ(基原:クチナシの果実)は黄連解毒湯などの漢方薬で使用される生薬である。サンシシを含む漢方薬は、抗炎症作用、解熱作用、鎮静作用および止血作用がある。また、サンシシ自身も血小板凝集抑制効果を持つという報告があるが、その作用機序は未だ不明である。そこで私たちは光化学反応を利用した *in vivo* での血栓モデルにおいてサンシシの主要成分であるゲニポサイドとその代謝物であるゲニピンの抗血栓効果を検討し、さらに *in vitro* での血小板凝集に対する作用メカニズムを検討した。

[材料および方法]

ゲニポサイドとゲニピンは株式会社ツムラから提供された。

ベントバルビタール麻酔下 ICR 系マウスの大腿動脈を露出させ、そこに540 nm の緑色光を照射し、同時に頸静脈よりローズベンガル15 mg/kgを投与することによって血栓モデルを作製した。薬物は照射前から静脈内に持続投与した。

血小板凝集能の測定は、マウスからクエン酸入りシリンジにて血液を採取し、その血液から多血小板血漿(以下 PRP)を 3×10^6 個/ml に調製し、透過法にて行った。惹起物質はコラーゲン、ADP およびアラキドン酸を用いた。

膜リン脂質からアラキドン酸の切り出しに重要なホスホリパーゼ A_2 (PLA $_2$)活性はトリチウム標識したアラキドン酸を大腸菌の細胞膜に取り込ませ、PLA $_2$ を添加によって切り出されたアラキドン酸量を測定することで行った。

[結果]

in vivo 血栓モデルでは、対照群において光化学反応開始後約5分で血小板豊富な血栓によって大腿動脈は完全に閉塞した。ゲニポサイド投与群は用量依存的に閉塞までの時間を延長した。ゲニポサイドの代謝物であるゲニピンもまた閉塞までの時間を延長した。

in vitro におけるコラーゲン惹起の血小板凝集に対してゲニポサイドとゲニピンは用量依存的に抑制を示した。ゲニピンはゲニポサイドに比べ、コラーゲン凝集をより強力に抑制した。コラーゲン、ADP およびアラキドン酸凝集に対するゲニポサイド、ゲニピンおよびアスピリンの効果を比較したところゲニポサイドとゲニピンはコラーゲン凝集に対して抑制を示したが、アスピリンによる抑制は約50%と弱かった。ゲニポサイドとゲニピンはアラキドン酸凝集を抑制しなかったが、アスピリンは抑制した。ADP凝

集においては、ゲニボサイドは抑制せず、ゲニピンとアスピリンは弱い抑制があった。PLA₂活性におけるゲニボサイドの阻害効果は PLA₂ 阻害薬であるアリストロ酸と同程度であった。ゲニピンの効果は溶媒である DMSO が測定系に影響を及ぼすため測定できなかった。

[考察]

ローズベンガルと緑色光の光化学反応は過酸化物の産生を促し、その結果、内皮細胞の傷害、血小板の粘着、凝集、そして血小板豊富な血栓を形成する。このモデルはアスピリンなどの抗血小板薬の抗血栓作用を検討するのに簡便で再現性のよう実用的なモデルである。ゲニボサイドは生体内で肝臓と腸管内でゲニピンに代謝されると考えられている。今回の結果で、ゲニボサイド及びゲニピンが *in vivo* 血栓モデルにおいて抗血栓作用を示したことから、ゲニボサイドは個体において血栓形成を抑制できることを示した。ゲニボサイドとゲニピンは共に *in vitro* 血小板凝集を抑制したが、ゲニピンの方がより強力であった。ゲニボサイドは体内でゲニピンへ代謝されるのでゲニピンが主に抗血栓作用に寄与していることが考えられる。

コラーゲンは血小板膜上の受容体を介してチロシンキナーゼを刺激し細胞内カルシウム濃度を上昇させ PLA₂ を活性化させる。PLA₂ の活性化は膜リン脂質からアラキドン酸を放出させ、シクロオキシゲナーゼ(以下 COX)等の酵素によって TXA₂ を増産し、血小板を凝集させる。ゲニボサイドはコラーゲン惹起の血小板凝集を抑制したが、アラキドン酸惹起による凝集は抑制できなかったことから、ゲニボサイドの血小板凝集抑制効果はアラキドン酸の産生抑制によるものが考えられた。これは COX 阻害薬であるアスピリンがコラーゲン惹起による凝集よりもアラキドン酸惹起による凝集を強力に抑制したことから言える。そこで、PLA₂ 活性におけるゲニボサイドの抑制作用を検討した結果、ゲニボサイドは PLA₂ 活性を抑制した。このことから、ゲニボサイドは PLA₂ 活性を抑制することで血小板凝集を抑制したことが示唆された。

[結論]

ゲニボサイドとゲニピンは血小板凝集を抑制することによって *in vivo* における抗血栓作用を示し、その作用メカニズムとして PLA₂ 活性抑制が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者らは、生薬のサンシシ(基原：クチナシの果実)中の主要成分であるゲニボサイドとその代謝産物であるゲニピンの抗血栓効果を検討し、これらがホスホリパーゼ A₂(PLA₂)活性を抑制することによる血小板凝集抑制作用を有することを見いだした。

サンシシは抗炎症作用、解熱作用、鎮静作用を有する漢方薬に含まれている。サンシシ自身に血小板凝集抑制作用が報告されているが、その作用機序は不明である。申請者らは光化学反応を利用した *in vivo* の血栓モデルと *in vitro* の血小板凝集において、サンシシの主要成分であるゲニボサイドとその代謝産物であるゲニピンの血小板凝集抑制効果を検討しその作用機序を解析した。

血栓モデルは ICR 系マウスでローズベンガル15mg/kg を静注すると同時に大腿動脈に540 nm の緑色光を照射することにより作成した。薬物は照射前から静脈内に持続投与し、照射開始から完全閉塞までの時間を測定した。血小板凝集はマウスのクエン酸加血液から多血小板血漿と乏血小板血漿を調製し透過

法にて測定した。PLA2活性はトリチウム標識アラキドン酸を取り込ませた大腸菌の細胞膜を用い、PLA2により切り出されるアラキドン酸を定量することにより測定した。

実験の結果、*in vivo*の血栓モデルでゲニボサイド及びその代謝物であるゲニピンは血栓形成による大腿動脈の閉塞を抑制することを見いだした。また*in vitro*で両者は用量依存的コラーゲン(1 μ g/ml)惹起の血小板凝集を抑制した。これはゲニピンにおいてより著明であったがアスピリンは弱い抑制しか示さなかった。アラキドン酸(0.5 mM)凝集はアスピリンは抑制したがゲニボサイドとゲニピンは抑制しなかった。ADP(0.5 μ M)凝集はゲニボサイドは抑制せず、ゲニピンとアスピリンは極く弱い抑制を示した。コラーゲンは血小板膜上の受容体に結合しチロシンキナーゼを活性化し細胞内カルシウム濃度を上昇させてPLA2を活性化する。これにより膜リン脂質からアラキドン酸を放出させシクロオキシゲナーゼ等の酵素によりトロンボキサンA2(TXA2)を産生して血小板を凝集させる。コラーゲン凝集は抑制したがアラキドン酸凝集を抑制しなかったことから、ゲニボサイドとゲニピンはPLA2活性を抑制している可能性が示唆され、これを検討した。その結果、ゲニボサイドはPLA2活性を抑制することが明らかになった。ゲニピンに関しては溶媒であるDMSOが測定系に影響する為検討できなかった。

以上の結果より申請者らは、サンシシの主要成分であるゲニボサイドとその代謝産物であるゲニピンに抗血栓作用があることを確認し、これが、PLA2活性抑制作用に起因する血小板凝集抑制作用によることを明らかにした。

本研究は、生薬の有する薬効を科学的に評価するとともに作用機序を明らかにし新薬を開発するという創薬事業の一貫としてなされている。薬効の評価、作用機序の解明共に論理的に科学的になされており、新規な機構による血小板凝集抑制薬の開発につながる研究であることが審査委員会で高く評価された。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされ。

- 1) 本血栓モデルで血小板凝集抑制能を評価する妥当性
- 2) 薬剤の静脈内投与時の血中濃度
- 3) 血小板凝集能測定時の惹起物質の濃度の妥当性
- 4) ADP凝集は非可逆性凝集であったか
- 5) PLA2活性測定方法の妥当性
- 6) サンシシ含有漢方薬は血小板凝集抑制作用を有するか
- 7) 血管内皮細胞等血小板以外の細胞におけるPLA2活性阻害の影響
- 8) ゲニピンと他のPLA2活性阻害剤との構造上の相同性
- 9) ゲニピンと他の血小板凝集抑制剤との臨床効果の違い
- 10) ゲニボサイド及びゲニピンの膜透過性
- 11) ゲニボサイド及びゲニピンの経口投与での予測される薬効
- 12) ゲニボサイド及びゲニピンの予測される副作用
- 13) 動物の種による薬効の違いの可能性

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦野哲盟
副査 橋本久邦 副査 渡邊裕司