

**6-shogaol および 6-paradol の
体内動態および薬理作用の検討**

徳原 大介

平成 26 年 1 月

博士論文

6-shogaol および 6-paradol の 体内動態および薬理作用の検討

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

分子作用学講座

学籍番号：1123032320

氏名：徳原 大介

主任指導教員名：石崎 純子 准教授

目次

| | |
|---|----|
| 略語 | 1 |
| 第1章 序論 | 2 |
| 第2章 6-shogaol の体内動態の検討 | 7 |
| 第1節 緒言 | 8 |
| 第2節 実験材料および方法 | 9 |
| 第1項 被験薬物および試薬 | 9 |
| 第2項 被験薬物の調整 | 9 |
| 第3項 実験動物および飼育条件 | 9 |
| 第4項 ラットへの 6-shogaol の投与 | 10 |
| 第5項 LC/MS/MS による ラット血漿中 6-shogaol および 6-paradol 濃度測定-- | 10 |
| 第3節 実験結果 | 12 |
| 第1項 LC/MS/MS による ラット血漿中 6-shogaol および 6-paradol 濃度測定-- | 12 |
| 第2項 6-shogaol 経口投与後の 未変化体および代謝物 6-paradol の血漿中濃度 | 13 |
| 第4節 考察 | 16 |
| 第3章 炎症に対する 6-shogaol および 6-paradol の効果の検討 | |
| 第1節 緒言 | 18 |
| 第2節 実験材料および方法 | 21 |
| 第1項 被験薬物および試薬 | 21 |
| 第2項 COX 阻害アッセイキット | 21 |
| 第3項 細胞実験用 | 21 |

| | | |
|------|---|----|
| 第4項 | 実験動物および飼育条件 | 22 |
| 第5項 | 被験薬物の調整 | 22 |
| 第6項 | Carrageenin 足浮腫に対する抗炎症作用 | 22 |
| 第7項 | 酢酸 writhing 法における鎮痛効果 | 23 |
| 第8項 | Yeast 発熱マウスにおける解熱効果 | 23 |
| 第9項 | COX 阻害活性の測定 | 24 |
| 第10項 | RAW 細胞に対する NO 産生阻害作用 | 25 |
| 第3節 | 実験結果 | 28 |
| 第1項 | Carrageenin 足浮腫に対する 6-shogaol と 6-paradol の抗炎症作用 | 28 |
| 第2項 | 6-shogaol および 6-paradol の 酢酸 writhing 法による鎮痛効果 (抗侵害作用) | 30 |
| 第3項 | Yeast 発熱マウスにおける 6-shogaol と 6-paradol の解熱効果 | 31 |
| 第4項 | 6-shogaol と 6-paradol の COX に対する阻害効果 | 34 |
| 第4節 | 考察 | 41 |
| 第4章 | 総括 | 45 |
| | 引用文献 | 49 |
| | 謝辞 | 58 |

略語

HPLC-UV : High performance liquid chromatography- ultraviolet
GC : Gas Chromatography
LC -MS/MS : Liquid chromatography- Mass spectrometry/ Mass spectrometry
COX : Cyclooxygenase
PGE₂ : Prostaglandin E2
PGG₂ : Prostaglandin G2
LT : Leukotriene
NO : Nitric oxide
cNOS : constitutive nitric oxide synthase
iNOS : inducible nitric oxide synthase
nNOS : neuronal nitric oxide
eNOS : endothelial nitric oxide synthase
LPS : Lipopolysaccharide
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
PBS : Phosphate-buffered saline
MTT : 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
IC50 : 50% inhibitory concentration

第1章 序論

ショウガ (Ginger rhizome : *Zingiber officinale* Roscoe) は、熱帯アジア地域が原産のショウガ科 (Zingiberaceae) の多年生植物であり、2000 年以上も昔から医薬品や香辛料として使われてきた。日本には、2~3 世紀頃に中国から伝わり、当時は「ハジカミ」という名称で呼ばれていたとの説もある。ショウガは、多くの漢方処方構成生薬としても配合され、日本では新鮮なショウガを『生姜』、生のショウガを乾燥させたものを『乾生姜』、蒸してから乾燥させたものを『乾姜』と称して、それぞれ区別して使われている。ただし、医療用漢方製剤においては、処方中のカンキョウは『乾姜』をそのまま配合しているが、ショウキョウは『乾生姜』を『生姜』として使用している。

「生姜」と「乾姜」は、ともに温（熱）薬として区分されているが、それぞれ薬効に差があり、使用上使い分けられている。本草書によれば、「生姜」は発散作用に優れ、胃寒などによる嘔吐に用いられるとされ、「乾姜」は裏寒を去り、脾胃の陽を温め、冷え痛みなどの症に常用され、また寒による咳喘症に用いられるとされている¹⁾。実験動物を用いた「生姜・乾姜」の薬理作用に関する報告も多くなされており、「生姜・乾姜」には鎮嘔、鎮咳、消化器の機能亢進等の多くの作用が認められている²⁻⁸⁾。一方、ラットを用いた実験において「生姜」および「乾姜」には消化管に対する異なった作用が報告されており、「生姜」は主に胃に働き消化不良や嘔吐に対して改善作用を示すこと、また「乾姜」は小腸に強く作用し小腸障害に対して改善作用を示すことが認められている⁹⁾

「生姜」および「乾姜」の含有成分は共通するものが多く、側鎖炭素数の異なる gingerol 類、shogaol 類、paradol 類、gingerdione 類、gingediol 類、dehydrogingerdion 類などが含まれているが^{10,11)}、「生姜」と「乾姜」ではそれぞれ

れの含有量が異なる。新鮮なショウガや「乾生姜」の辛味成分は 6-gingerol が主成分（約 0.1～0.3%）であり、6-shogaol は微量（～0.04%）しか含有されていない¹¹⁾。熱をかけて加工（蒸乾）した「乾姜」においては 6-gingerol の脱水反応により 6-shogaol が生成し、それぞれの含有量は逆転する^{11, 12)}。これら生薬中の成分は HPLC-UV^{13, 14)}、GC¹⁵⁾、LC/ESI-MS/MS¹⁶⁾ 法により多成分の構造が明らかとなり、品質評価が行われるようになった。

6-shogaol は、これまでに解熱・鎮痛作用¹⁷⁻¹⁹⁾、cyclooxygenase (COX) - 2 阻害作用^{10, 18-20)}などの抗炎症作用や、蠕動運動亢進などの消化促進作用^{17, 21)}、自発運動量の抑制やヘキソバルビタール睡眠の増強などの中枢抑制作用¹⁷⁾、血圧上昇作用^{22, 23)}などが報告されている。

Shogaol の体内動態については、*in vitro* 実験において、マウス、ラット、イヌ、サルおよびヒトの肝サイトゾル画分あるいは腎ミトコンドリア画分において shogaol が paradol 類に代謝されること²⁴⁻²⁶⁾、またマウスに 6-shogaol を経口投与した際に糞中に 6-paradol や他の代謝物が認められたことが報告されている²⁷⁾。また、最近、ショウガを健常人にショウガの 50%エタノールエキス末カプセルを投与した臨床試験において、血漿中の代謝物として、6-shogaol のグルクロン酸あるいは硫酸抱合体が検出されたことが報告されている^{28, 29)}。しかしながら、6-shogaol の薬物動態に関する研究はいまだ少ないのが現状である。

共同研究者らはこれまでに、ラットに ¹⁴C-6-shogaol を経口投与した実験において、6-shogaol は体内でほとんど代謝されること、また代謝物の主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であることを報告し、さらに主な代謝物が 6-paradol であることを予測した³⁰⁾。近年、6-paradol の薬理作用についての薬理研究が進んでおり、殺菌作用³¹⁾、抗酸化作用³²⁾、抗悪性腫瘍作用³²⁻³⁶⁾、抗炎症作用³⁷⁻⁴⁰⁾などに関する報告がある。

本論文では、第 2 章として、6-shogaol の体内動態の研究として、LC-MS/MS を用い、6-shogaol 経口投与後の 6-shogaol および主代謝物である 6-paradol の体内動態について検討した。第 3 章では、6-shogaol および代謝物の薬理作用の検討の一環として、抗炎症作用に注目し、代謝物である 6-paradol の薬理作用を 6-shogaol と比較検討した。



Fig.1 ショウガ (生姜 : *Zingiber officinale* Roscoe)



生姜の根茎

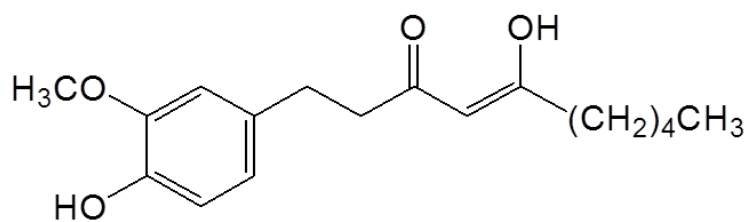


乾生姜（生姜）

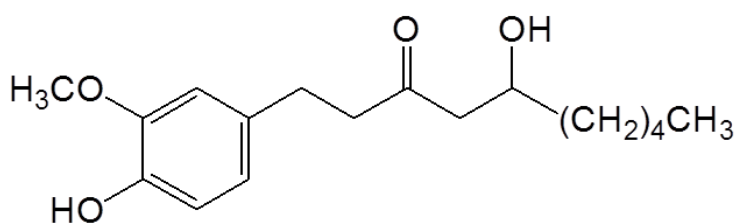


乾姜

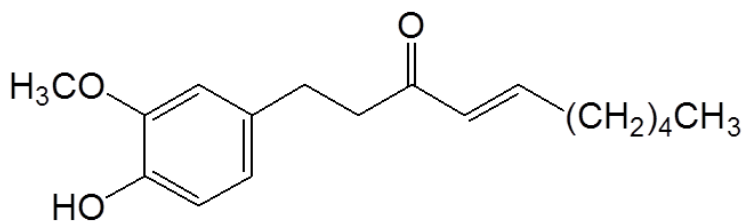
Fig.2 ショウガの根茎（生姜）と生薬として加工された乾生姜（生姜）および乾姜



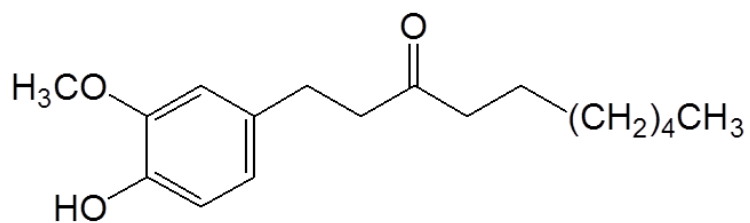
6-gingerdion



6-gingerol



6-shogaol



6-paradol

Fig.3 生姜の特徴的成分

第2章 6-shogaol の体内動態の検討

第1節 緒言

Asami ら³⁰⁾の、ラットに¹⁴C-6-shogaol を経口投与した実験において、6-shogaol は経口投与後 15 分から 40 分の間に最高血中濃度 (Tmax) に達し、4~5 時間の消失半減期 (T_{1/2}) で消失し、24 時間で検出限界を迎えた。また、排泄経路を検討した実験では、主な排泄経路は胆汁を経て糞に至り、48 時間以内に排泄されることが明らかにされた。つまり経口投与された 6-shogaol は、血漿中へ速やかに吸収、代謝され、主に胆汁を介して糞中へ排泄されることを示めされた。しかし、この際の血漿中・胆汁中・糞中の 6-shogaol 濃度は、放射活性測定によるものであり、6-shogaol のみならず化合物内に¹⁴C 位を有する代謝物・抱合体を含めた総濃度を測定していることとなる。つまり、放射活性測定による Asami ら実験では 6-shogaol 単独の濃度を測定したこととはならず、したがって、6-shogaol 単独の体内動態を明らかにするためには、代謝物の同定を含めた定量が必要となる。なお、上述したように、Surh らの *in vitro* の実験で shogaol が paradol 類に代謝されたという報告²⁴⁻²⁶⁾、および 6-shogaol 投与後においてマウスの糞中に 6-paradol が認められたという報告²⁸⁾ から、6-shogaol が経口投与された際の主な代謝物が 6-paradol である可能性が高いことを予測される。本章では、LC/MS/MS による 6-shogaol および 6-paradol の測定方法の確立、およびラットに 6-shogaol を経口投与した際の 6-shogaol および 6-paradol の血漿中濃度を測定し、6-shogaol および代謝物である 6-paradol の体内動態の検討を実施した。

第2節 実験材料および方法

第1項 被験薬物および試薬

6-shogaol および 6-paradol（純度 99%以上）は Tsumura & Co. (Tokyo, Japan) より提供された。内部標準物質 Ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate、Tween80、シクロヘキサン、酢酸エチル、酢酸アンモニウム、メタノールおよびイソプロパノールは和光純薬工業株式会社（Wako）より購入した。生理食塩水は、株式会社大塚製薬工業より、ヘパリンナトリウムは、ノボ・ノルディスク社よりそれぞれ購入した。

第2項 被験薬物の調整

6-shogaol は、水に溶けにくいため 2% Tween80/生理食塩水に懸濁して調製した。メノウ製の乳鉢に 6-shogaol と Tween 80 を加え、乳棒にてよく混和し、溶媒濃度が 2%になるように徐々に精製水を加えて懸濁化した。

第3項 実験動物および飼育条件

7週齢の雄性 SD 系 SPF ラットは、東京実験動物株式会社から購入し、1週間予備飼育した後、実験に供した。本実験は動物愛護および動物管理に関する法

律と実験動物の飼養・保管に関する基準および研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針に基づき制定された武蔵野大学学内動物実験に関する規定を遵守し適正に実施した。

第4項 ラットへの 6-shogaol の投与

絶食下でラットに 6-shogaol を 10 mg/kg 宛強制経口投与し、投与 5 分、15 分、30 分、60 分および 120 分後に経時的に尾静脈より、ヘパリン処理したシリンジにより採血した。採血した血液は、遠心分離（4℃、1,000×g、10 min）により血漿を分離し、LC/MS/MS による 6-shogaol および 6-paradol 濃度測定まで -20℃で保存した。

第5項 LC/MS/MS によるラット血漿中 6-shogaol および 6-paradol 濃度測定

6-shogaol および 6-paradol をメタノール/5 mmol/L 酢酸アンモニウム混液（1:1, v/v）で順次希釈し、500、100、50、10、5、1 および 0.5 ng/mL をそれぞれ調製し、検量線用標準溶液を作製した。内部標準溶液は、ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate をメタノールに溶解させ、被験薬物と同様の方法でメタノール/5 mmol/L 酢酸アンモニウム混液にて 10 ng/mL となるまで希釈調整して作製した。Oasis HLB（日本ウォーターズ）カートリッジ固相抽出カラム

に精製水 500 μL 、各標準溶液または血漿試料 50 μL 、メタノール/5mmol/L 酢酸アンモニウム混液 (1:1, v/v %) 50 μL および ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate 溶液 50 μL を、減圧下、カラムに順次展開した。10%メタノール 1 mL で洗浄後、シクロヘキサン/酢酸エチル (1:1, v/v %) 混液 1 mL で溶出した。溶出液を窒素により蒸発乾固し、残渣にメタノール/5 mmol/L 酢酸アンモニウム混液 (1:1, v/v %) 150 μL を加えて溶解し、20 μL を LC/MS/MS に注入した。

LC/MS/MS の HPLC は Agilent 1000 series (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) を用いた。カラムは Atrantis dC₁₈ (2.1 mm I.D.×50 mm, 3 μm , Nihon Waters Co., Ltd., Tokyo, Japan)を同 10 mm のガードカラムと組み合わせて用いた。移動相は (A) 5 mM 酢酸アンモニウムと(B) メタノールを用い、グラジエントモード (0→2 min ; A/B = 30/70、2→5 min ; A/B = 30→10/70→90) で送液した。カラム温度は 40°C、流速は 0.2 mL/min とした。

MS/MS は API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX, CA, USA)を用いた。イオン源はイオンスプレー (ESI)、電圧は -4500V、ネガティブ Multiple Reaction Monitoring (MRM)モードで検出した。モニターイオンは 6-shogaol : $m/z=275.1\rightarrow139.0(Q1\rightarrow Q3)$ 、6-paradol : $m/z=277.0\rightarrow141.3(Q1\rightarrow Q3)$ 、ethyl 4-hydroxy-3-methoxycinnamate (内標準物質) : $m/z=220.9\rightarrow205.7(Q1\rightarrow Q3)$ とした。データの解析は Analyst 1.4 software (Applied Biosystems/MDS SCIEX) を用いた。ラット血漿からの 6-shogaol および 6-paradol 回収率はそれぞれ 87.0%および 80.9%であった。また、本定量法での定量限界は 0.5 ng/mL であった。WinNonlin (ver.5.2) に血漿中薬物濃度などを入力し、最高血漿中薬物濃度 (C_{\max})、最高血漿中薬物濃度到達時間 (T_{\max}) などの薬物動態パラメータを求めた。

第3節 実験結果

第1項 LC/MS/MS によるラット血漿中 6-shogaol および 6-paradol 濃度測定

Oasis HLB カートリッジ固相抽出カラムを用いた試料の前処理法を確立し、ethyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamate を内標準物質として 6-shogaol、6-paradol を LC/MS/MS にて分離検出する条件を確立した (Fig. 4)。この系において 6-shogaol、6-paradol とともに 0.5~500 ng/mL の範囲で良好な検量線を作成することができた。

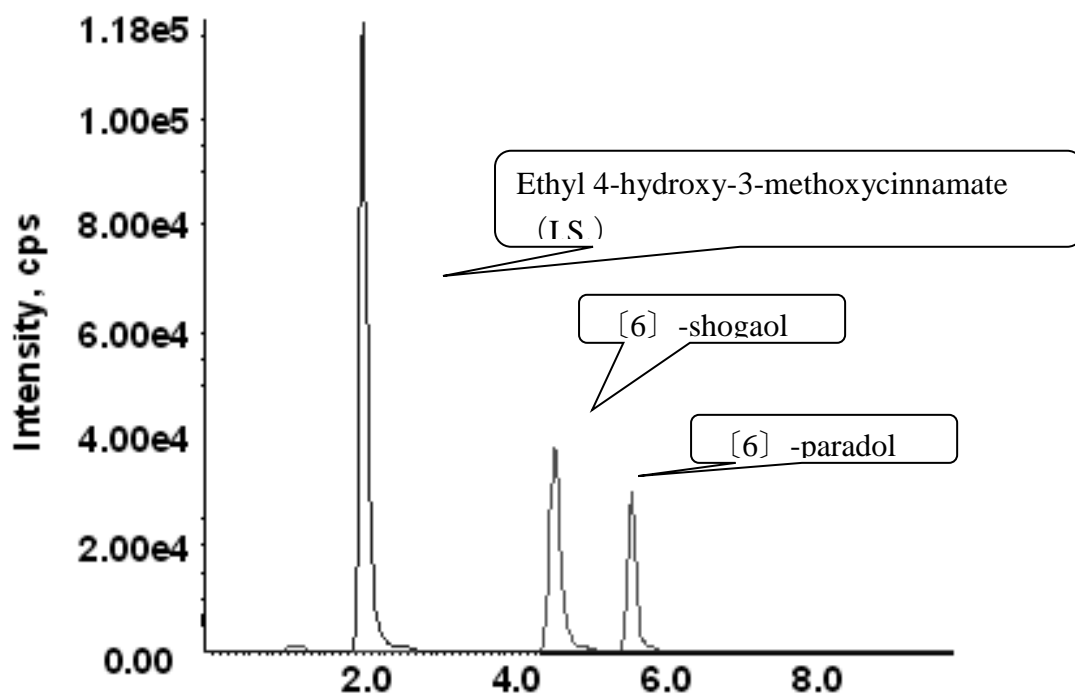


Fig. 4. LC/MS/MS MRM chromatograms of Standard solution (6-shogaol, 6-paradol, I.S.; 10 ng/mL each)

第 2 項 6-shogaol 経口投与後の未変化体および代謝物 6-paradol の 血漿中濃度

ラットに 6-shogaol (10 mg/kg) を経口投与した際の、投与 5 分、15 分、30 分、60 分および 120 分後の血漿中 6-shogaol および 6-paradol の濃度推移を Fig.5 および Table 1 に示す。

血漿中の 6-shogaol 濃度は、投与 5 分後で、Cmax (13.7 ± 5.2 ng/mL) に達し、その後急速に減少し、投与 2 時間後までにほとんど血漿中から消失した。また、6-shogaol を投与した際の血漿中 6-paradol 濃度においても、6-shogaol と同様なパターンを示し、投与 5 分後で、Cmax (43.7 ± 16.3 ng/mL) に到達し、その後速やかに減少していった。なお、血漿中 6-paradol 濃度は 6-shogaol 濃度に比べて投与 5 分、15 分、30 分、60 分および 120 分後においてそれぞれ 3.2、4.4、7.3、4.4 および 2.5 倍高い値を示した。

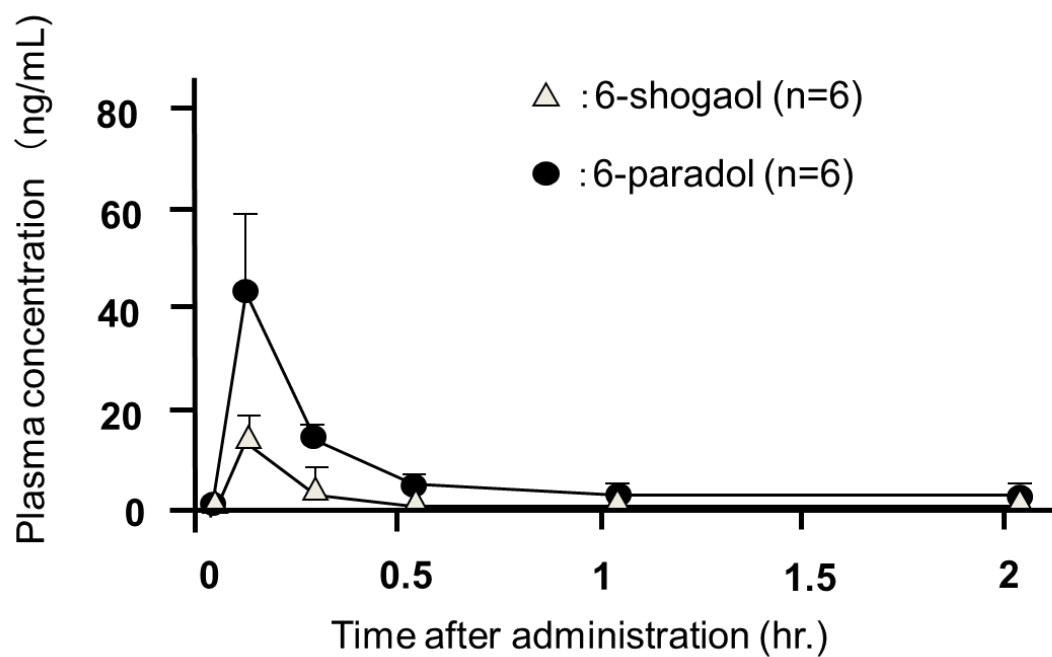


Fig. 5 Plasma concentration of 6-shogaol and 6-paradol after oral administration of 6-shogaol (10 mg/kg) in rats. Each value represents the mean \pm S.E.M.

Table 1 Plasma concentration of 6-shogaol and 6-paradolol after oral administration of 6-shagaol (10mg/kg) in rats.

| Hr | 0.083 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
|-----------------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 6-shogaol (ng/mL) | 13.7 ± 5.2 | 3.3 ± 1.2 | 0.6 ± 0.2 | 0.8 ± 0.2 | 1.1 ± 0.3 |
| 6-paradolol (ng/mL) | 43.7 ± 16.3 | 14.4 ± 3.6 | 4.7 ± 0.7 | 3.4 ± 0.6 | 2.6 ± 0.7 |
| 6-paradolol/6-shogaol | 3.2 | 4.4 | 7.3 | 4.4 | 2.5 |

Each value represents the mean ± S.E.M

第4節 考察

これまでに、¹⁴C-6-shogaol を用いた実験において、6-shogaol をラットに経口投与すると、未変化体・代謝物を含めた放射活性の総量として、そのほとんどが速やかに代謝・排泄されることが示された³⁰⁾。また、*in vitro* の代謝実験では、shogaol はラットやヒト等の肝サイトゾル画分あるいはラット腎ミトコンドリア画分等において還元反応をうけ、代謝物として paradol 類が生成されること²⁴⁻²⁶⁾、マウスに 6-shogaol を経口投与した際に糞中に 6-paradol や他の代謝物が認められたことが報告されている²⁷⁾。そこで本章では、LC/MS/MS を用いることにより、血漿中の 6-shogaol および 6-paradol を高感度に同時定量することを可能にした。次に、LC/MS/MS を用いて 6-shogaol のラット経口投与時における血漿中 6-shogaol およびその主代謝物と考えられる 6-paradol の体内動態についての検討を行った。その結果、6-shogaol を経口投与した際の、血漿中の 6-shogaol 濃度は、投与 5 分後で、Cmax に達し、その後急速に減少し、投与 2 時間後までにほとんど血漿中から消失した。また、6-shogaol を投与した際の血漿中 6-paradol 濃度においても、6-shogaol と同様なパターンを示し、投与 5 分後で、Cmax に到達し、その後速やかに減少していった。なお、血漿中 6-paradol 濃度は、6-shogaol の濃度に比べていずれの採血時間においても 2.5~7.3 倍以上高い値を示した。これらのことから、6-shogaol は投与後 5 分以内に体内に吸収され、そのほとんどが速やかに 6-paradol へと変換されて、排泄されることが示唆された。本研究では 6-shogaol から 6-paradol への代謝変換が 5 分前後と非常に速いスピードで行われていた。*in vitro* 実験において 6-shogaol から 6-paradol への代謝変換はマウスやヒト等の肝臓や腎臓のサイトゾル画分において認められているが²⁴⁻²⁶⁾、このように速やかに 6-shogaol が 6-paradol に代謝される要因は、肝臓や腎臓の他に小腸粘

膜やまたは消化管内での代謝機構も関与していることが考えられ、これらの点に関しては今後の検討が必要であると考えられる。

これまでの報告によると 6-shogaol には解熱・鎮痛作用¹⁷⁻¹⁹⁾、抗炎症作用^{10, 18-20)}、消化促進作用^{17, 21)}、中枢抑制作用¹⁷⁾、血圧上昇作用^{22, 23)}など数々の薬理作用が報告されているが、本研究や過去の報告を鑑みると、6-shogaol の薬理作用は 6-shogaol 自身だけによるものとするより、6-shogaol を経口投与後において高い血中濃度を示した 6-paradol の寄与が考えられた。つまり 6-paradol は 6-shogaol のプロドラッグ的存在として捉えることができ、今までに 6-shogaol の経口投与で得られた薬理作用の多くは、その主要な代謝物である 6-paradol によるものと考えた方が合理的であることが考えられた。そこで、次章は 6-shogaol および 6-paradol の薬理作用の比較研究として、抗炎症作用に注目し検討を行った。

第3章

炎症に対する 6-shogaol および 6-paradol の効果の検討

第1節 緒言

炎症とは、生体が化学的・物理学的・生物学的に何らかの有害な攻撃を受けた時に、防御反応として発現する症状であり、発赤、発熱、疼痛、腫脹、機能障害の五大徴候があげられる。これらの炎症反応は、生体が患部でプロスタグランジン E_2 (PGE_2) などを産生し、患部の血流を増加させ、治癒を促進させようとする一連の反応機構である。しかし過剰な炎症反応は、生体の自己組織の損傷をもたらし、痛みも増悪させる。この PGE_2 はアラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路で遊離アラキドン酸が COX により代謝され、 PGG_2 を経て合成される。また、ロイコトリエン (LT) 合成系で、炎症促進作用 (気管支平滑筋や血管透過性亢進作用など) がある LT がリポオキシゲナーゼによって合成される。現在、臨床において抗炎症薬として用いられているものは、大きく分けてステロイド性抗炎症薬と非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) に分類される。NSAIDs の薬効としては鎮痛作用、解熱作用および抗炎症作用があり、その主な作用機序は COX 阻害作用である。 COX には $COX-1$ と $COX-2$ の2つのアイソザイムがあり $COX-1$ は胃粘膜保護作用のような生体の恒常性維持に関わるが、 $COX-2$ は炎症時に発現が誘導され、炎症反応を促進する働きがある。古典的に用いられてきた COX 阻害剤であるアスピリンやインドメタシンなどは $COX-1$ 、 $COX-2$ ともに阻害することから抗炎症作用以外に胃腸障害や腎障害など $COX-1$ を阻害することによる副作用が発症することが知られていた。1999年頃より $COX-2$ 選択的阻害剤であるエトドラクやセレコ

キシブなどの医薬品が開発され、副作用の少ない NSAIDs が使用されるようになってきた⁴¹⁾。

一方で炎症は生体内で合成されえるフリーラジカルによっても引き起こされる。その中の一つである一酸化窒素 (NO) は様々な哺乳類の細胞や組織で構成型一酸化窒素合成酵素 constitutive nitric oxide synthase (cNOS) と誘導型の inducible NOS (iNOS) によって産生される物質である。cNOS は心血管神経や免疫学的システムにおいて生理学的、病理学的メカニズムの調節を含むホメオスタシスの鍵となる物質であるが、神経細胞で恒常的に作用している neuronal NO (nNOS) と内皮細胞の endothelial NOS (eNOS) に分けられる。一方、iNOS はリポポリサッカライド (LPS)、バクテリア、ウィルスや前炎症性サイトカインのような様々な刺激によって活性化された好中球やマクロファージ、クッパー細胞の細胞質内にある転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) によって合成される。合成された iNOS は L-アルギニンを NO に合成し、過剰産生された NO は DNA、脂質、タンパク質、糖にダメージを与え、細胞機能を障害し炎症作用を増強させると考えられている^{42,43)}。

既に、6-shogaol については、解熱・鎮痛作用や COX-2 阻害作用^{10, 17-20)}、f-ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン (f-MLP) で誘導させた多形核好中球の活性酸素種 (ROS) の産生抑制作用およびリポポリサッカライド (LPS) で刺激したマウス単球性白血病由来マクロファージ (RAW264.7 細胞) の NO 産生抑制作用など⁴³⁾、抗炎症作用に関連した薬理作用が多数報告されている。一方、6-paradol については、抗酸化作用³²⁾や抗腫瘍に関する作用³²⁻³⁶⁾などが報告されており、抗炎症関連では PGE2 産生抑制³⁷⁾、COX-1 阻害³⁸⁾、COX-2 阻害³⁹⁾、activator protein 1 (AP-1) および epidermal growth factor (EGF) の阻害⁴⁰⁾など *in vitro* 実験系での結果が得られている。そこで本章では 6-shogaol の薬理作用の 1 つとし

で認められている抗炎症作用に注目し、6-shogaol と 6-paradol の効果の比較検討を行うこととした。

実験内容としては生体内での 6-shogaol と 6-paradol の抗炎症効果を検討するために、*in vivo* 実験系として酢酸 writhing 法による鎮痛効果、carrageenin 足浮腫に対する抗炎症作用、yeast 発熱マウスを用いた解熱効果について評価した。また *in vitro* 実験では COX-1 および COX-2 に対する阻害効果、マウスの白血病単球 (RAW264.7) マクロファージを用いた LPS 刺激による一酸化窒素 (NO) 産生抑制作用を炎症マーカーとして評価した。

第2節 実験材料および方法

第1項 被験薬物および試薬

6-shogaol、6-paradol、Tween80、生理食塩水は、第2章・第2節・第1項と同一のものを用いた。

酢酸、aminopyrine、carrageenin、yeast dried は、Wako より購入した。

第2項 COX 阻害アッセイキット

Colormetric COX (ovine) inhibitor Screening Assay Kit (0.1M トリスー塩酸緩衝液 (pH 8 : アッセイバッファー)、ヘム、COX-1、COX-2、アラキドン酸、0.1M 水酸化カリウムおよび発色試薬) は Cayman Chemical Company (USA) から購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO) および indometacin は Wako より購入した。COX 阻害作用は、本キットに含まれるプロトコールに従い実験を実施した。なお、対照薬として indometacin を用いた。

第3項 細胞実験用

10% fetal bovine serum (Lot: 8143030, 8199550)、1% penicillin (10,000 unit/mL) streptomycin (10,000 µg/mL) liquid (P/S)、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 4.5 mg/ml glucose は、invitrogen (東京) より購入した。

Phosphate-buffered saline (PBS) (KH_2PO_4 、NaCl、 NaHPO_4)、スルファニルアミド、

ナフチルエチレンジアミン、亜硝酸ナトリウム、ジメチルスルホキシドは、Wako より購入した。

Lypopolysaccharides from Escherichia Coli 0127:B8 は、SIGMA (USA) より購入した。

第 4 項 実験動物および飼育条件

7 週齢の雄性 SD 系 SPF ラットおよび雄性 ddy 系マウスは、東京実験動物株式会社から購入し、1 週間予備飼育した後、実験に供した。本実験は、第 2 章・第 2 節・第 2 項に記載した動物実験に関する規定を遵守し適正に実施した。

第 5 項 被験薬物の調整

6-shogaol、6-paradol、aminopyrine は、第 2 章・第 2 節・第 2 項と同様の方法で調整した。

第 6 項 Carrageenin 足浮腫に対する抗炎症作用

2% Tween 80/生理食塩水に用時懸濁した 6-shogaol (50 mg/mL)、6-paradol (50 mg/mL)、あるいは control 群としての精製水をラットにそれぞれ 2 mL/kg 宛強制

経口投与した。30分後に1% carrageenin 水溶液を右後肢足跡に0.1 mL皮下注射し、0.5、1、2および5時間後の足容量を7140 Plethysmometer (UGO Basile, Italy)を用いて測定した。投与30分前に足容量を測定し、この値を100%として示した。

第7項 酢酸 writhing 法における鎮痛効果

18時間絶食した体重30~33gのマウスに2% Tween 80に懸濁した6-shogaol、6-paradol、aminopyrineを100 mg/kgとなるように0.1 mL/10 g体重宛で経口投与し、その10分後に0.7% 酢酸液を0.1 mL/10g体重宛で腹腔内投与した。0.7% 酢酸液投与10分後からwrithing数をかぞえ始め、10分間のwrithing数を記録した。Control群のマウスには、2% Tween 80を0.1 mL/10 g体重宛で経口投与した。

第8項 Yeast 発熱マウスにおける解熱効果

18時間絶食した8~11週齢の雄性 ddy 系マウスに生理食塩水に懸濁した20% yeast を背部に皮下注射した。18時間後の直腸温を温度計 (Thermalert TH-5, Physitemp Instruments, Inc., USA)で測定し、この体温を基準の温度とした。Yeast 投与19時間後に2% Tween 80に懸濁した6-shogaol、6-paradol を70 mg/kgと140 mg/kgの投与量となるように、またaminopyrineを100 mg/kgの投与量となるように0.1 mL/10g体重宛で経口投与し、薬物投与30、60、120分後の直腸温を測定した。Control群には、2% Tween 80を0.1 mL/10g体重宛で経口投与した。

第9項 COX 阻害活性の測定

COX 阻害実験は、Colormetric COX (ovine) inhibitor Screening Assay Kit に添付されているプロトコールに従って、以下の方法で実施した。

- バックグラウンドウェル：COX (-)、阻害剤 (-)
- 100%イニシャルアクティビティーウェル：COX (+)、阻害剤 (-)
- インヒビターウェル：COX (+)、阻害剤 (+)

- (1) 3つのバックグラウンドウェルに 160 μL のアッセイバッファーと 10 μL のへムを加え、次に3つの 100% イニシャルアクティビティーウェルに 150 μL のアッセイバッファー、10 μL のへムおよび 10 μL の酵素 (COX-1 または COX-2) を加えた。3つのインヒビターウェルに 150 μL のアッセイバッファー、10 μL のへムおよび 10 μL の酵素 (COX-1 または COX-2) を加えた。
- (2) インヒビターウェルに 10 μL のインヒビター (サンプル)、バックグラウンドウェルと 100% イニシャルアクティビティーウェルに 10 μL のインヒビターに使用した溶媒 (DMSO) を加えた。
- (3) 数秒間プレートを慎重に振とうし、25°Cで5分間インキュベートした。
- (4) 使用した全てのウェルに発色試薬 20 μL 、アラキドン酸 20 μL 加えた。
- (5) 数秒間プレートを慎重に振とうし、25°Cで5分間インキュベートした。
- (6) マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(株),Tokyo) の 595 nm で吸光度を測定した。
- (7) 計算方法は以下の数式により求めた。

$$\text{initial activity (\%)} = \{(B - A) - (C - A) / (B - A)\} \times 100$$

- A : バックグラウンドウェル : COX (-)、阻害剤 (-)
- B : 100%イニシャルアクティビティーウェル : COX (+)、阻害剤 (-)
- C : インヒビターウェル : COX (+)、阻害剤 (+)

第 10 項 RAW 細胞に対する NO 産生阻害作用

(1) 細胞培養法

RAW264.7 細胞は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。

RAW264.7 細胞の培養には、10% fetal bovine serum と penicillin (100 unit/mL)-streptomycin (100 µg/mL) を加えた 4.5 mg/mL glucose を含む DMEM を維持培地とし、plate に 1×10^5 cell/mL で播種した。播いた細胞は 37°C、湿度 100%、5% CO₂ インキュベーター (Yamato Scientific, Tokyo) 内で培養し、3 日毎に培地交換を行った。

(2) 細胞増殖測定法

RAW 細胞を 24well plate (COSTAR,USA) に 1×10^5 cell/well で播種し 24 時間インキュベートした。細胞が接着したのを確認後、DMSO に溶解した 6-shogaol、6-paradol を含む DMEM に置換し、24 時間インキュベートした。その後、培地を除去し、各ウェルに PBS で 5 mg/mL に溶解した MTT 溶液を 50 µL と DMEM を 450 µL 加え、さらに 4 時間インキュベートした。その後、染色されていることを確認して培地を除去し、200 µL/well の DMSO でホルマザンを完全に溶解し、

マイクロプレートリーダー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(株), Tokyo) の 595 nm で吸光度を測定した。

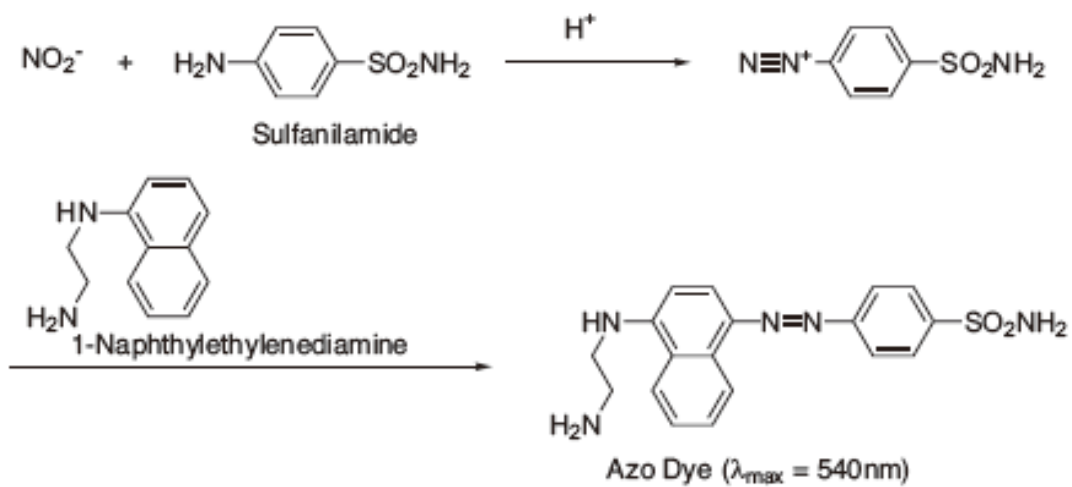
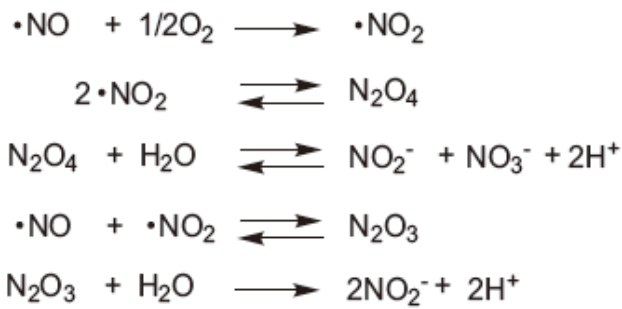
細胞増殖率は以下の式により求めた。

$$\text{cell proliferation (\%)} = \text{sample absorbance} / \text{control absorbance} \times 100$$

(3) NO 測定法

RAW 細胞を 96 well plate (株TOHO, hyogo) に 5×10^4 cell/well で播種し、5 時間培養した。細胞が接着したのを確認後、6-shogaol、6-paradol を含む DMEM および $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の LPS を処置し、24 時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルの上清を回収した。上清 $80 \mu\text{L}$ にグリース試薬 $80 \mu\text{L}$ (1%スルファニルアミド 5%リン酸溶液 $40 \mu\text{L}$ と 0.1%ナフチルエチレンジアミン水溶液 $40 \mu\text{L}$) を加え、数秒振とう 10 分静置の後、マイクロプレートリーダーにて 550 nm の吸光度を測定した。

NO は寿命の短い不安定な物質であるため、NO の代謝産物である NO_2^- の蓄積を測定する方が容易である。そのため、RAW 細胞により産生された NO は酸化され NO_2^- となりジアゾニウム塩化合物とナフチルエチレンジアミン (グリース試薬) のアゾカップリングを利用して間接的に NO を測定した。反応式は以下に示した。



また、亜硝酸塩産生阻害率は以下の式により求めた。

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A - B) / (A - C)] \times 100$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{A (control) : LPS (+)、sample (-)} \\ \text{B (sample) : LPS (+)、sample (-)} \\ \text{C (normal) : LPS (-)、sample (-)} \end{array} \right.$$

第 11 項 有意差検定

データは $\text{mean} \pm \text{SE}$ として表示した。統計学的有意差検定には Dunnett 検定を用いた。

第3節 実験結果

第1項 Carrageenin 足浮腫に対する 6-shogaol と 6-paradol の抗炎症作用

代表的な抗炎症作用の実験方法である carrageenin のラット足蹠皮下注射による足浮腫に対する 6-shogaol と 6-paradol の効果を Fig.6 に示した。Control 群の足容積は、carrageenin 投与 30 分後までに増加し、投与 5 時間後では投与前に比べて約 1.4 倍に増加した。6-shogaol 投与群は、control 群と比較し、足容積の増加抑制傾向を示したが、有意な抑制効果は認められなかった。これに対して、6-paradol 投与群では、control 群と比較し、carrageenin 投与後の足容積増加に対してすべての時間において有意な抑制作用を示した。

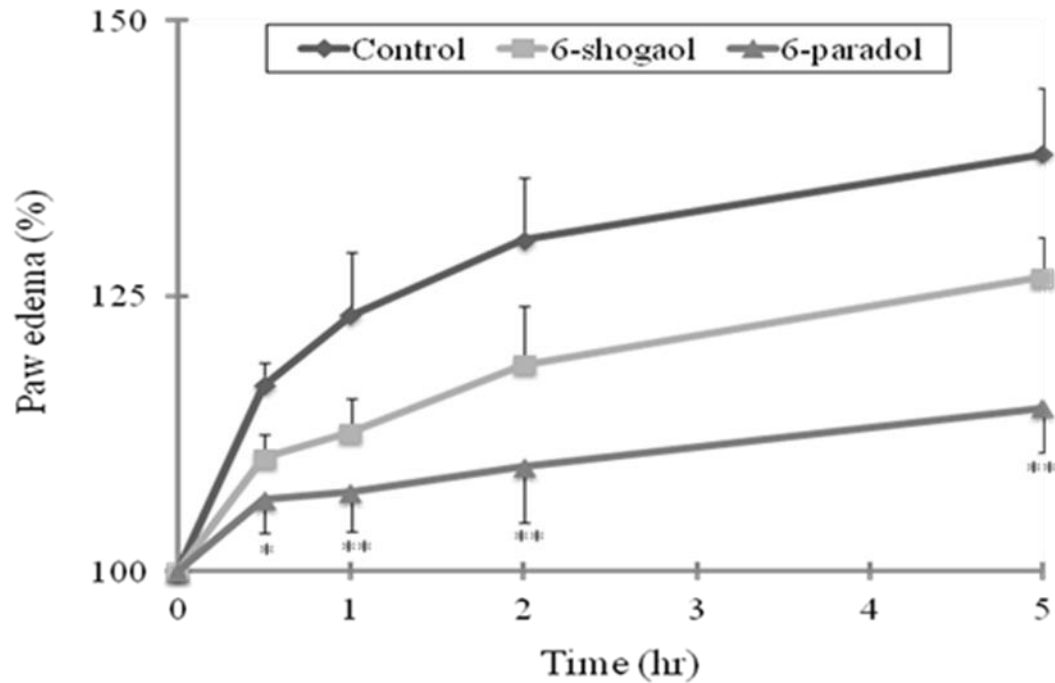


Fig. 6 Effects of 6-shogaol and 6-paradol on rat hind edema induced by carrageenan.

The hind-paw volume at 30 minutes prior to 6-shogaol and 6-paradol administration (100 mg/kg, p.o.) was taken as 100%. Data represent the mean \pm SE. value (n= 4-6)

*, **: Significantly different from the control at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

第2項 6-shogaol および 6-paradol の酢酸 writhing 法による鎮痛効果 (抗侵害作用)

酢酸 writhing 法における 6-shogaol と 6-paradol の“よじり運動”に対する効果を Fig.7 に示した。Control 群と比較し、6-paradol および対照薬である aminopyrine 処置群は 100 mg/kg の経口投与で、それぞれ“よじり運動”回数を有意に減少させたが、6-paradol の鎮痛効果はアミノピリンのそれより弱いものであった。一方、6-shogaol (100 mg/kg) では、“よじり運動”回数の抑制作用は認められなかった。

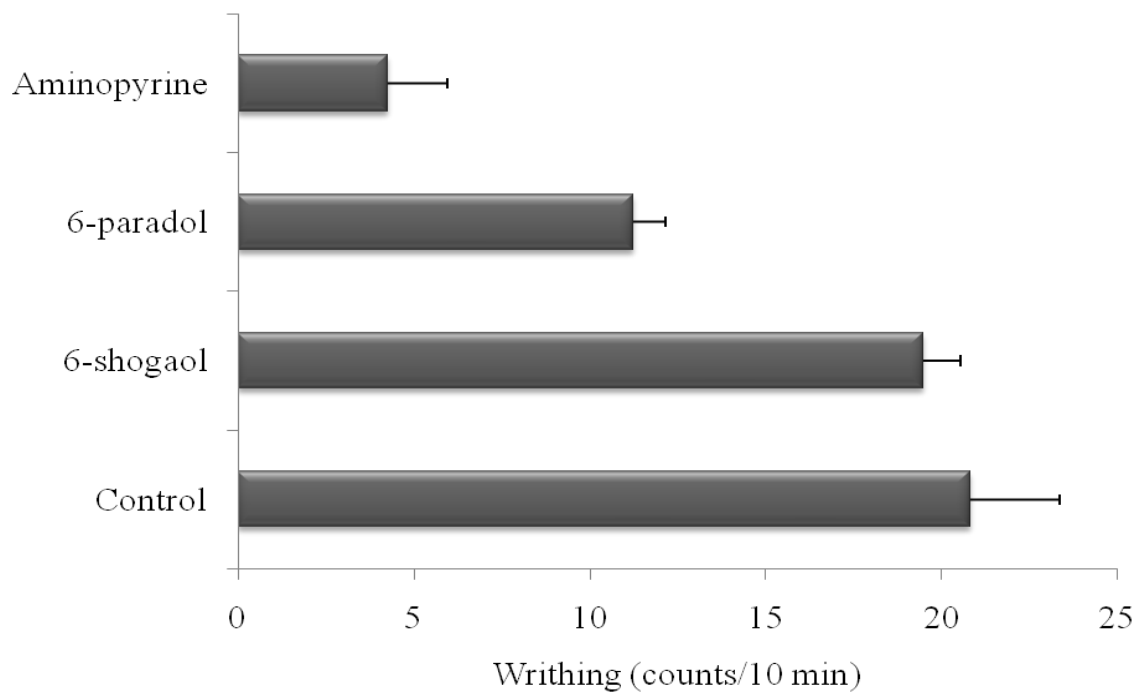


Fig. 7 Analgesic activity of 6-shogaol, 6-paradol and aminopyrine (100 mg/kg, *p.o.*) in writhing symptom of mice. Data represent the mean \pm S.E.M. value (n=4-6).

*,** : Significantly different from the control at $p < 0.05, < 0.01$

第3項 Yeast 発熱マウスにおける 6-shogaol と 6-paradol の解熱効果

マウス背部に生理食塩水に懸濁した yeast を皮下注射すると、直腸温は上昇するが、この発熱作用に対する 6-shogaol と 6-paradol の解熱効果を Fig.8 に示した。

Yeast 投与後 18 時間後の直腸温を基準値とし、薬物投与 0、30、60、120 分後の直腸温の変化を経時的にグラフに示した。Control 群に対して 6-shogaol 投与群では 70 mg/kg、140 mg/kg とともに大きな変化は見られなかった。一方、6-paradol 投与群は 70 mg/kg においては薬物投与 0、60 分後で、140 mg/kg においては薬物投与 30、60 分後で有意な直腸温度低下作用が確認された。6-paradol の 140 mg/kg 投与群では 60 分後まで 2°C 以上下がり、1 時間以上の解熱効果が見られた。また、対照薬の aminopyrine は投与 30、60、120 分後の全ての時間において 4°C 以上の有意な直腸温度低下作用を示した。

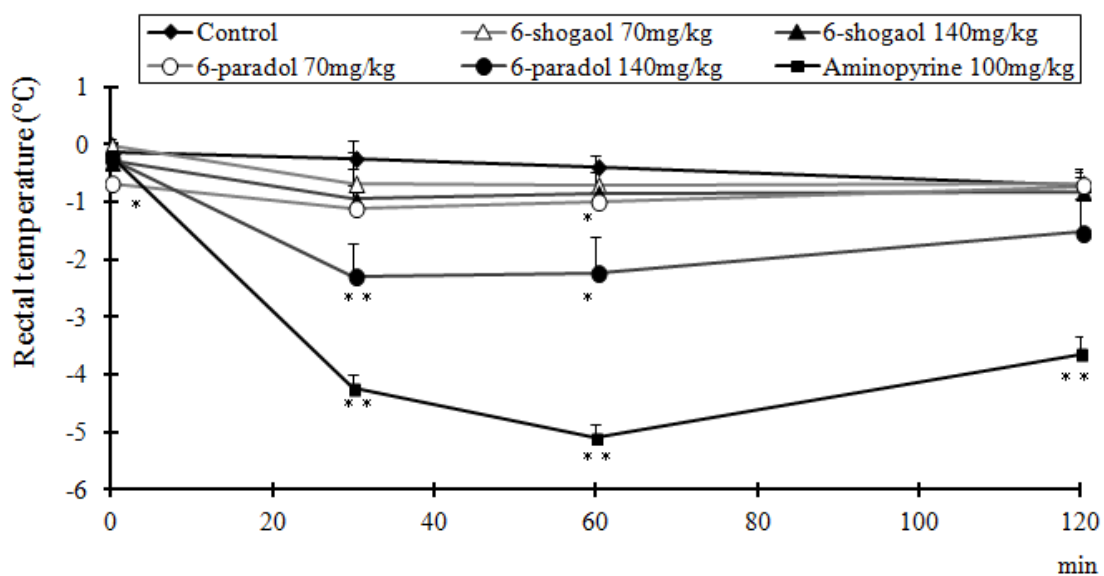


Fig. 8 Antipyretic activity of 6-shogaol and 6-paradol (70 mg/kg or 140 mg/kg, p.o.) in the Brewer's yeast-febrile mice. Data represent the mean \pm SE value (n=7).

*, **: Significantly different from the control at $p < 0.05$, $p < 0.01$

第4項 6-shogaol と 6-paradol の COX に対する阻害効果

6-Shogaol、6-paradol および indomethacin (Control) の COX に対する阻害活性試験の結果を Fig.9 および Table 2 に示した。COX-1 に対する阻害効果としては indomethacin が最も強く (IC_{50} : 2.69 μ M)、6-shogaol および 6-paradol はほぼ同程度で効力は弱いものであった (IC_{50} はそれぞれ 403.89 μ M, 328.89 μ M)。COX-2 に対する阻害効果は、COX-1 と同様に indomethacin が最も強い効果を示した (IC_{50} : 12.55 μ M) が、6-paradol も indomethacin よりやや弱いものの強い阻害効果を示した (IC_{50} : 31.89 μ M)。6-shogaol の COX-2 阻害効果 (IC_{50} : 192.74 μ M) は 6-paradol よりも 6 倍程度弱かった。

COX 阻害効果の COX-2 への選択性を示すマーカーである 1-2 比 (COX-1 IC_{50} /COX-2 IC_{50}) は indomethacin、6-shogaol および 6-paradol はそれぞれ 0.2、2.1 および 10 であり、3 つの化合物の中で 6-paradol が一番 COX-2 に対して選択的に阻害することが示された。

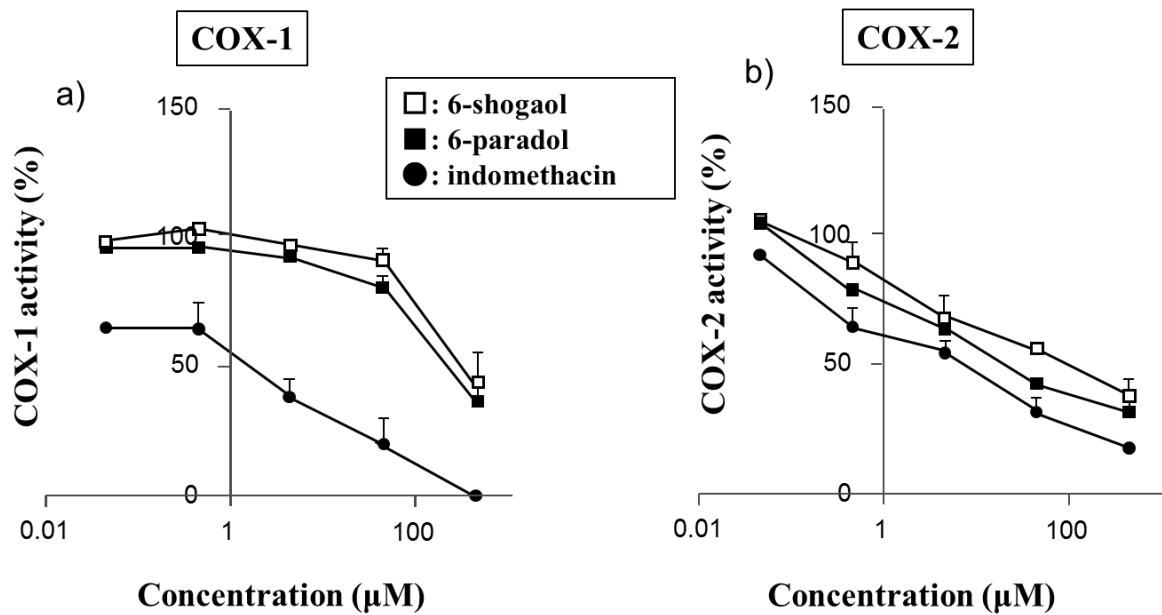


Fig. 9 a): Inhibition of cyclooxygenase-1 by 6-shogaol, 6-paradol and indomethacin.

b): Inhibition of cyclooxygenase-2 by 6-shogaol, 6-paradol and indomethacin.

Data represent the mean \pm S.E.M. value (n=4-7)

Table 2 IC₅₀ of COX-1, COX-2, and ratio of COX-1 IC₅₀/COX-2 IC₅₀

| | COX-1 IC ₅₀ (μ M) | COX-2 IC ₅₀ (μ M) | Ratio of COX-1 IC ₅₀ /COX-2 IC ₅₀ |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| 6-shogaol | 403.89 | 192.74 | 2.1 |
| 6-paradol | 328.89 | 31.89 | 10.3 |
| Indomethacin | 2.69 | 12.55 | 0.2 |
| Celecoxib ⁴⁸⁾ | 82 | 6.8 | 12 |
| Meloxicam ⁴⁸⁾ | 37 | 6.1 | 6.1 |
| Ibuprofen ⁴⁸⁾ | 12 | 80 | 0.15 |

Data represent the mean \pm S.E.M value (n=4-7)

⁴⁸⁾ Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S.: Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1679-85, 2001.

第5項 RAW細胞に対するNO産生阻害作用

(1) MTT assayによる6-shogaolおよび6-paradolの細胞毒性の評価

6-Shogaol および 6-paradol の細胞毒性評価を、細胞増殖測定法である MTT assay を用いて検討した結果を Fig.10 に示した。6-Shogaol および 6-paradol は共に 6 μ M までは細胞増殖に変化を与えなかったが、20、60、200 μ M と高濃度になるにしたがって細胞増殖の抑制が見られ、両者の細胞毒性の比較では 6-shogaol の方が強く認められた。以上の結果より、以下の検討では 6-shogaol、6-paradol は細胞毒性を認めない 6 μ M 以下の濃度で使用する事とした。

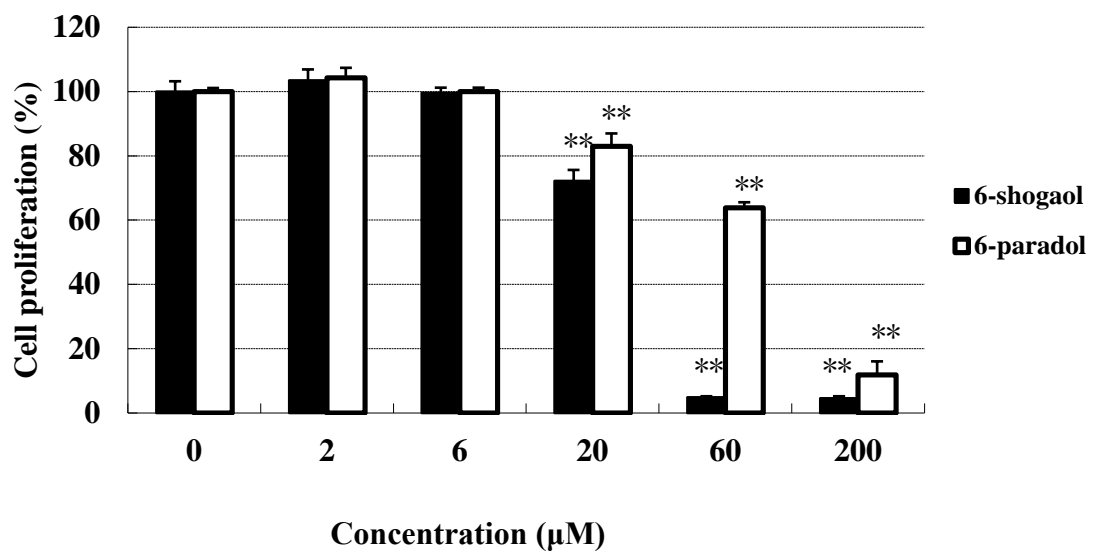


Fig. 10 Effect of 6-shogaol and 6-paradol in RAW264.7 macrophages

Date represent the mean \pm SD value (n=4).

** , Significantly different from the control at $p < 0.01$.

(2) 6-shogaol および 6-paradol の LPS 誘導 NO 産生に対する効果

6-Shogaol あるいは 6-paradol を 2.5、5 μM 含む DMEM に 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LPS を処置し、24 時間後回収した培地上清中の NO 量を測定した。その結果を Fig. 11 に示した。RAW 細胞から分泌される NO 濃度は LPS 刺激により、6.8 μM から 40.0 μM と 5 倍以上に上昇したことから、LPS 刺激で RAW 細胞が NO を産生していることが確認された。LPS 刺激により増加した NO 産生は 6-shogaol 処置により低下し、2.5 μM では NO 産生量が 34.2 μM (阻害率 14.5%)、5 μM では 29.1 μM (阻害率 27.3%) となり、用量依存的かつ有意な NO 産生量の減少が認められた。

一方、6-paradol 処置群では、2.5 μM で NO 産生量が 38.6 μM (阻害率 3.5%)、5 μM では NO 産生量が 36.7 μM (阻害率 8.3%) となり、減少傾向はあるものの 6-shogaol で認められたような有意な差は認められなかった (Figure 7)。

以上のことより、LPS 刺激による RAW264.7 細胞に対する NO 産生抑制作用は 6-paradol よりも 6-shogaol の方が強いことが分かった。

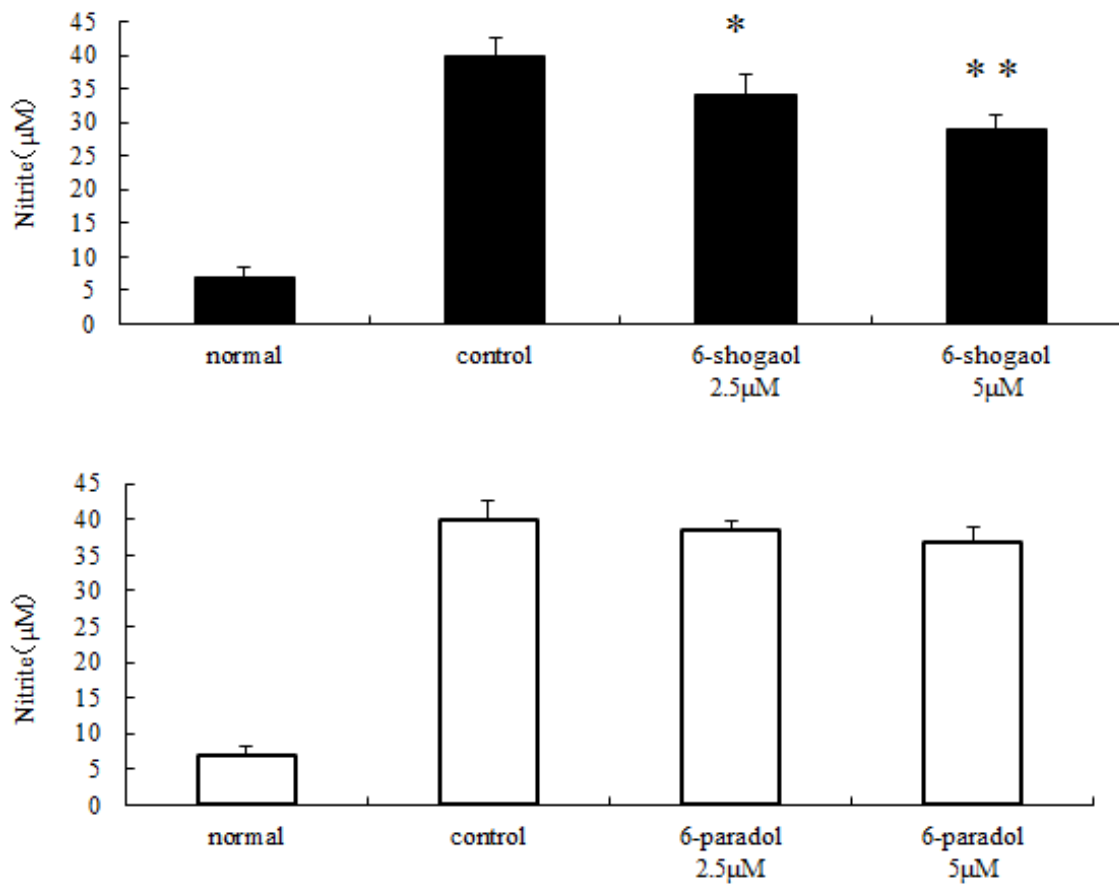


Fig. 11 Inhibition of nitrite formation in RAW 264.7 macrophages by 6-shogaol

Data represent the mean \pm SD value (n=4)

*,** :Significantly different from the control at $p < 0.05$, < 0.01

第4節 考察

第2章において、6-shogaol は経口投与後5分以内に体内に吸収され、速やかに代謝され、その多くが6-paradolへと変換されることが示唆された。

乾姜の主成分6-shogaolには、解熱や鎮痛などの抗炎症作用やCOX-2阻害作用が報告されているが、6-shogaolの代謝物である6-paradolについては、*in vivo*での抗炎症作用に関する報告は見当たらない。本章では、6-shogaolおよび6-paradolの抗炎症作用に注目し、*in vivo*実験では、ラットcarrageenin足浮腫に対する作用、酢酸writhing法による鎮痛効果、yeast発熱マウスを用いた解熱効果などを、*in vitro*実験では、アッセイキットを用いたCOX-1およびCOX-2に対する阻害効果およびマウスの白血病単球(RAW264.7)マクロファージにおけるLPS刺激によるNOの産生抑制作用を検討した。

まず、6-shogaolおよび6-paradolの抗炎症作用について、carrageenin足浮腫に対する作用を検討したところ、6-paradolは投与後30分より継続的な有意な浮腫抑制効果を示したが、6-shogaolは抑制傾向を示したのみであった。Carrageeninによる足浮腫は、carrageenin注射30分程度でピークに達し、以後速やかに消失する第一相と、注射1時間以後に浮腫が発生し、長時間にわたり持続する第二相からなる二相性の反応である⁴⁴⁾。第一相目の浮腫は、ヒスタミンやセロトニンが⁴⁵⁾、第二相目の浮腫はプロスタグランジン類が関与することが知られているほか⁴⁶⁾、一酸化窒素(NO)など様々なケミカルメディエーターとの関連が指摘されている⁴⁷⁾。これらを考慮すると6-paradolは、COX阻害以外の薬理作用を持つ可能性も考えられる。一方、今回の結果では6-shogaolのcarrageenin浮腫に対する抑制効果はこれまでに報告されてきたものと比べると弱く、今後さらなる検討する必要がある。また、酢酸writhing法を用いた鎮痛試験およびyeast発

熱マウスでの解熱試験などの *in vivo* 実験を行ったところ、6-shogaol よりも 6-paradol の方が強い効果を示した。これらの原因については、後述の COX 阻害実験の結果から、6-paradol の方が 6-shogaol より COX-2 選択性が高いことに起因すると考えられる。

次に、6-shogaol および 6-paradol の COX に対する阻害活性を比較検討した。COX-1 に対しては、6-shogaol および 6-paradol 共に indomethacin と比較して、約 150-200 倍弱い阻害活性であった。一方、COX-2 に対しては、6-paradol は indomethacin に比べて約 3 倍弱い効果であったが、その効果は 6-shogaol よりも 6 倍強い阻害活性であった。COX-2 選択性の指標となる選択的阻害比 (COX-1 IC50/COX-2 IC50) については 6-paradol は 10.3 であり、6-shogaol は 2.1 であった。Kato らは、COX-2 選択的阻害薬である Celecoxib および Meloxicam の選択的阻害比は 12 および 6.1 である⁴⁸⁾ことを報告しており、その値から比べると、6-paradol は比較的強い COX-2 選択性を持つことが示唆された。Van Breemen は、ショウキョウに含まれる化合物の COX-2 阻害作用の構造活性について報告しているが、それによると COX-2 の活性部位に対する結合能は paradol 類が一番強く、続いて shogaol 類、gingerol 類 および gingerdione 類であること、また構造式の C3 位が COX-2 結合に重要であることを示している⁴⁹⁾。我々の結果は、Van Breemen を支持する結果となった。California Teacher Study cohort において NASID は女性の colorectal cancer (CRC) 死亡率を低下させること⁵⁰⁾、COX-2 阻害剤である NS-398 は、敗血症モデルラットに対して免疫異常の改善や肝障害抑制を示すこと⁵¹⁾、さらに COX-2 阻害剤である Celecoxib は動脈硬化症の初期症状である末梢動脈疾患に対し効果を示し、動脈硬化症に対する新たな治療法になる可能性がある⁵²⁾などが報告されており、6-paradol の有用性は抗炎症作用以外にも有用であることが考えられた。

また、LPS 刺激による RAW 細胞の NO 産生に対する抑制効果は、6-shogaol の方が 6-paradol よりも強かったという結果であった。Swarnalatha ら²⁷⁾は同様の LPS で刺激した RAW 細胞における NO 産生実験において、6-shogaol を 6 μ M 処置した時、有意に NO 産生が抑制されたことを確認している。この報告からも、6-shogaol による抗炎症作用に NO 産生の抑制が関与していることが示唆される。NO は、様々な刺激によって活性化されたマクロファージなどの細胞質内にある転写因子 NF- κ B を活性化させ、iNOS の遺伝子を発現し、iNOS によって NO が合成される²⁶⁾ことから、NO 産生阻害には NF- κ B 不活性化や iNOS の発現阻害などの作用機序も考えられる。作用機序の解明に関しては、今後の検討と考える。

今回の研究では、6-shogaol と 6-paradol の抗炎症作用は、COX 阻害および NO 産生阻害の作用機序によって薬理活性の強弱が異なることが示された。しかしながら、*in vivo* 実験での抗炎症作用に関しては 6-paradol の方がより強い作用を示した。これらの違いは疼痛や発熱が起こる炎症メカニズムと NO 産生による細胞障害と炎症増強は異なったカスケードがあることに関係していると考えられた。例えば、疼痛のメカニズムでは、組織が損傷すると血漿からブラジキニンが遊離し、PGI₂ と PGE₂ が血管拡張、血管透過性亢進作用を生じ、ブラジキニンの作用を増強させて知覚神経末端の感受性を亢進させて疼痛を引き起こす。また、発熱のメカニズムでは、ウイルスや細菌など炎症物質がマクロファージを刺激し血中で IL-1 や TNF などを産生し、視床下部における PGE₁ や PGE₂ の産生を促す。それに伴い視床下部の体温調節中枢にある EP3 受容体を PGE₁ や PGE₂ が刺激することで体温が上昇する。これらのことから痛みや発熱には COX による PG 産生が重要な役割を果たしている。一方、NF- κ B の活性化により合成され過剰産生された NO は DNA、脂質、タンパク質、糖にダメージを与え、細胞機能を障害し炎症作用を増強させると考えられている^{26,27)}。これらの事から

本研究の *in vivo* において認められた痛みや発熱に対する作用は PGE₂ を産生に関与する COX-2 阻害作用が強かった 6-paradol により強い効果が認められたと考えられた。一方、NO 産生阻害作用に関しては 6-paradol より 6-shogaol の方がより強く、両化合物は異なった作用メカニズムに作用し抗炎症作用を示していることが示唆された。痛みや発熱等に関しては 6-paradol がより強い作用を示すことが認められたが、慢性の炎症反応や他の NO が関与する炎症反応に関しては 6-shogaol か 6-paradol のどちらが強い作用を示すかは、本研究だけでは結論づけることは難しい。今後も、PGE や NO が関与する種々の炎症反応に関しての阻害作用についての追加実験が必要と思われる。

一方、生薬学的見地において「生姜」および「乾姜」の使用目的や薬理作用が異なる理由の1つとして、含まれる gingerol 類、shogaol 類、paradol 類の割合が異なる故、作用するカスケード（抗炎症反応においては PGE 阻害作用か NO 合成阻害作用）が異なることが関与することが考えられた。

以上より、本研究において痛みや発熱に対する抗炎症作用は 6-shogaol に比べ 6-paradol のほうがより強い効果を認めた。これらの事から、これまで報告されていた 6-shogaol の抗炎症作用に関しては、6-shogaol そのものの作用よりは、体内で代謝されて生成された 6-paradol の寄与が大きいことが考えられた。また 6-paradol は COX-2 選択薬物と同程度の COX-2 選択性を有しており、6-paradol をシードとした抗炎症薬の開発研究が期待される。

第4章 総括

ショウガの根茎は、食品としてなじみの深い野菜でもあるが、加工調整したものは、多くの漢方処方に配合される重要な生薬の一つである。医療用漢方製剤では、その原料として生のショウガ根茎を乾燥させたものを『生姜』、蒸してから乾燥させたものを『乾姜』としてそれぞれ区別して使われている。「生姜」および「乾姜」の含有成分は共通するものが多いが、辛味成分として 6-gingerol および 6-shogaol が良く知られている。元来、ショウガの根茎には 6-gingerol および 6-shogaol とともに含有されているが、加工調製の過程で 6-gingerol は脱水反応により 6-shogaol に変化することが認められている。また、6-shogaol は生体内において主に 6-paradol に代謝されることが示唆されている。Shogaol 類の中で最も主要となる 6-shogaol については、多くの薬理研究により様々な薬理効果が認められているが、6-shogaol の薬物動態や主代謝物と思われる 6-paradol の薬理作用についての研究報告は未だ少ないのが実情である。

本論文では、6-shogaol の体内動態の研究として、まずは LC-MS/MS を用いて 6-shogaol 経口投与後の 6-shogaol および主代謝物である 6-paradol の体内動態について検討した。続いて、6-shogaol および代謝物の薬理作用の検討の一環として、抗炎症作用に着目し、代謝物である 6-paradol の薬理作用を 6-shogaol と比較検討した。

【6-shogaol の体内動態の検討】

1) LC/MS/MS によるラット血漿中 6-shogaol および 6-paradol 濃度測定

6-shogaol、6-paradol を LC/MS/MS にて分離検出する条件を確立し、この系において血漿中の 6-shogaol および 6-paradol を高感度に同時定量することを可能にした。

2) 6-shogaol 経口投与後の未変化体および代謝物 6-paradol の血漿中濃度

これまでに、¹⁴C-6-shogaol を用いた薬物動態実験において、未変化体と代謝物を含めた放射活性の総量として、そのほとんどが速やかに代謝・排泄されることが明らかとなり、代謝物の正体については、これまでの他の研究報告から 6-paradol であることが類推された。本研究においては、LC/MS/MS を用いて 6-shogaol のラット経口投与時における血漿中 6-shogaol およびその主代謝物と考えられる 6-paradol の体内動態についての検討を行った。その結果、6-shogaol の経口投与後、未変化体とともに代謝物として 6-paradol が検出され、両者の T_{max} は、いずれも 5 分であり、いずれの採血時間においても 6-paradol の血漿中濃度は、6-shogaol に比べて、常に 2.5 倍以上の高い値を示した。これらのことから、6-shogaol は経口投与後 5 分以内に体内に吸収され、そのほとんどが速やかに 6-paradol へと代謝変換され、そのままの形で消失するまで体内に留まることが明らかになった。

本研究結果や過去の報告を鑑みると、6-shogaol の薬理作用は 6-shogaol 自身だけによると考えるより、6-shogaol より高い血中濃度を示した代謝産物である 6-paradol の役割が大きいと考えられた。つまり 6-paradol は 6-shogaol のプロドラッグ的存在として捉えることができ、今までに 6-shogaol の経口投与で得られた薬理作用の多くは、その主要な代謝物である 6-paradol によるものと考えた方が合理的であることが考えられた。

【6-shogaol および 6-paradol の薬理作用の検討】

1) Carrageenin 足浮腫に対する抗炎症作用

carrageenin のラット足蹠皮下注射による足浮腫に対する 6-shogaol と 6-paradol の効果を検討したところ、6-paradol は足浮腫に対して有意な抑制作用を示したが、6-shogaol 抑制傾向を示しただけであった。

2) 酢酸 writhing 法による鎮痛効果（抗侵害作用）

酢酸 writhing 法における“よじり運動”に対する 6-shogaol と 6-paradol の効果を検討したところ、6-paradol は“よじり運動”回数を有意に減少させたが、6-shogaol では、同作用は認められなかった。

3) Yeast 発熱に対する解熱効果

Yeast を皮下注射による発熱に対する 6-shogaol と 6-paradol の解熱効果を検討したところ、6-paradol は有意な直腸温度低下作用を示したが、6-shogaol には有意な解熱作用は認められなかった。

4) COX に対する阻害効果

COX に対する阻害活性を検討したところ、COX-1 に対してはそれほど顕著ではないが、6-shogaol および 6-paradol はほぼ同程度の阻害効果を示した。また、COX-2 に対しては、6-shogaol および 6-paradol はともに阻害効果を示したが、6-paradol の作用は indomethacin のそれよりやや弱いものの顕著な阻害効果であり、6-shogaol よりも 6 倍程度強いものであった。COX-2 阻害の選択性については、indomethacin、6-shogaol および 6-paradol の中で 6-paradol が最も COX-2 に対する選択性が高かった。

5) RAW 細胞に対する NO 産生阻害作用

LPS 刺激による RAW 細胞からの NO を産生に対する効果を検討したところ、NO 産生は 6-shogaol により用量依存的かつ有意な低下が認められたが、6-paradol では、低下傾向はあるものの 6-shogaol で認められたような有意な差は認められなかった。

以上のように、痛みや発熱に対する *in vivo* での抗炎症作用は、6-shogaol に比べて 6-paradol の方により強い効果が認められた。これらの事から、これまで報告されていた 6-shogaol の抗炎症作用に関しては、6-shogaol そのものの作用よりは、体内で代謝されて生成した 6-paradol の寄与が大きいことが考えられた。また、6-paradol は COX-2 選択薬物と同程度の COX-2 選択性を有しており、他の研究においても COX-2 の活性部位に対する結合能は強いという報告があることから考えても、6-paradol をシードとした抗炎症薬の開発研究にも期待がもてる。

引用文献

- 1) 鳥居塚和生
モノグラフ 生薬の薬効・薬理
医歯薬出版株式会社 239-249 (2005)

- 2) Yamahara J, Rong HQ, Naitoh Y, Kitani T, Fujimura H.
Inhibition of cytotoxic drug-induced vomiting in suncus by a ginger constituent.
J Ethnopharmacol,27(3),353-355,(1989)

- 3) Kawai T, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K.
Anti-emetic principles of Magnolia obovata bark and Zingiber officinale rhizome.
Planta Med. ,60(1):17-20,(1994)

- 4) Sharma SS, Kochupillai V, Gupta SK, Seth SD, Gupta YK.
Antiemetic efficacy of ginger (Zingiber officinale) against cisplatin-induced emesis
in dogs.
J Ethnopharmacol. ,57(2),93-96,(1997)

- 5) Yamahara J, Mochizuki M, Rong HQ, Matsuda H, Fujimura H.
The anti-ulcer effect in rats of ginger constituents.
J Ethnopharmacol.,23(2-3),299-304,(1998)

- 6)Yoshikawa M, Hatakeyama S, Taniguchi K, Matuda H, Yamahara J.
6-Gingesulfonic acid, a new anti-ulcer principle, and gingerglycolipids A, B, and C,
three new monoacyldigalactosylglycerols, from zingiberis rhizoma originating in
Taiwan.
Chem Pharm Bull (Tokyo). ,40(8),2239-2241,(1992)

- 7) Huang QR, Iwamoto M, Aoki S, Tanaka N, Tajima K, Yamahara J, Takaishi Y,
Yoshida M, Tomimatsu T, Tamai Y.

- Anti-5-hydroxytryptamine₃ effect of galanolactone, diterpenoid isolated from ginger.
Chem Pharm Bull (Tokyo). 39(2):397-399,(1991)
- 8) Yamahara J, Huang QR, Li YH, Xu L, Fujimura H.
Gastrointestinal motility enhancing effect of ginger and its active constituents.
Chem Pharm Bull (Tokyo), ;38(2):430-431.(1990)
- 9) Hashimoto K, Kase Y, Murata P, Kido T, Nakai Y, Sakakibara I, Higuchi M, Sasaki H, Okada M.
Pharmacological evaluation of Shokyo and Kankyo (1).
Biol Pharm Bull.,25(9):1183-1187.(2002)
- 10) Richard, B. B., Yi, T. and Wenkui, L. :
Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*).
Fitoterapia, 82(1), 38-43 (2011)
- 11) 鹿野美弘
生姜・乾姜の化学
現代東洋医学、8(1) (1987)
- 12) Yoshikawa, M., Tyatani, N., Hatakeyama, S., Nishino, Y., Yamahara, J. and Murakami, N.
Crude drug processing by far-infrared treatment II. chemical function of constituent during the drying of *Zingiberis Rhizoma*.
YAKUGAKU ZASSHI, 113, 712-717 (1993)
- 13) Yoshihiro KANO, Kenichi SAITO, Masahiro TANABE and Masahiro Yasuda
On the Evaluation of the Preparation of Chinese Medicinal Prescriptions (2)
[6]-Shogaol in Steam Dried “Ginger”
Shoyakugaku Zasshi, 41 (4) 277-281 (1987)

- 14) Yoshihiro KANO, Kenichi SAITO, Masahiro TANABE and Masahiro Yasuda
On the Evaluation of the Preparation of Chinese Medicinal Prescriptions (4)
Determination and Availability of [6]-gingerol and [6]-Shogaol
Shoyakugaku Zasshi, 43 (1) 7-12 (1989)
- 15) Masayuki YOSHIKAWA, Shoko HATAKEYAMA, Nobuyasu TYATANI, Yukie NISHINO and Johji YAMAHARA
Qualitative and Quantative Analysis of Bioactive Principles in Zingiberis Rhizoma by Means of High Performance Liquid Chromatography and Gas Liquid Chromatography. On the Evaluation of Zingiberis Rhizoma and Chemical Change of Constituents during Zingiberis Rhizoma Processing
YAKUGAKU ZASSHI, 113 (4), 307-315 (1993)
- 16) Hongliang Jiang, Aniko M. Solyom, Barabara N. Timmermann and David R. Gang
Characterization of geingerol-related compounds in ginger rhizome (Zingiber officinale Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19(20), 2957-2964 (2005)
- 17) 油田正樹、石毛 敦、湯浅和典、須藤和彦、新保真澄、池谷幸信
生姜の薬理学的研究 辛味成分 6-gingerol および 6-shogaol の薬理作用
Proc. Symp. WAKAN-YAKU 15, 162-173 (1982)
- 18) Suekawa, M., Ishige, A., Yuasa, K., Sudo, K., Aburada, M. and Hosoya, E.
PHARMACOLOGICAL STUDIES ON GINGER. I. PHARMACOLOGICAL ACTIONS OF PUNGENT CONSTITUENTS, (6)-GINGEROL AND (6)-SHOGAOL
J. Pharmacobio Dynamics, 7(11), 836-848 (1984)
- 19) 油田正樹
生姜・乾姜の薬理

現代東洋医学, 8 (1), 45-50 (1987)

- 20) 末川 守, 湯浅和典, 磯野正直, 曾根秀子, 池谷幸信, 榊原 巖, 油田正樹, 細谷英吉
生姜に関する薬理学的研究 (第IV報) [6]-Shogaol のアラキドン酸代謝に対する作用
日本薬理学雑誌, 88, 263-269 (1986)
- 21) Hashimoto, K., Sato, K., Murata, P., Makino, B., Sakakibara, I., Kase, Y., Ishige, A., Higuchi, M. and Sasaki, H. :
Component of *Zingiber officinale* that Improves the Enhancement of Small Intestinal Transport.
Planta Medica, 68(10), 936-939, 2002
- 22) Suekawa, M., Aburada, M. and Hosoya, E.
Pharmacological studies on ginger. II. Pressor action of (6)-shogaol in anesthetized rats, or hindquarters, tail and mesenteric vascular beds of rats. *J. Pharmacobio Dynamics*, 9(10), 842-852 (1986)
- 23) Suekawa, M., Aburada, M. and Hosoya, E.
Pharmacological studies on ginger. III. Effect of the spinal destruction on (6)-shogaol-induced pressor response in rats. *J. Pharmacobio Dynamics*, 9(10), 853-860 (1986)
- 24) Surh Y-J. and Lee S-S.
Enzymatic Reduction of shogaol: A novel biotransformation pathway for the alpha, beta-unsaturated ketone system
Biochemistry International, 27 (1) 179-187(1992)
- 25) Surh Y-J and Lee S-S.
Enzymatic Reduction of Xenobiotic alpha, beta -unsaturated ketones: Formation of

- allyl alcohol metabolites from shogaol and dehydroparadol
Reseach Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 84 (1) 53-61
(1994)
- 26) Chen, H., Soroka, D., Zhu, Y. and Sang S.:
Metabolism of ginger component [6]-shogaol in liver microsomes from mouse, rat,
dog, monkey, and human.
Mol. Nutr. Food. Res., 57(5), 865-76, (2013)
- 27) Chen, H., Lv, L., Soroka, D., Warin, R.F., Parks, T.A., Hu, Y., Zhu, Y., Chen, X.
and Sang, S.:
Metabolism of [6]-shogaol in mice and in cancer cells.
Drug. Metab. Dispos., 40(4), 742-53, (2012)
- 28) Yu, Y., Zick, S., Li, X., Zou, P., Wright, B. and Sun, D.:
Examination of the pharmacokinetics of active ingredients of ginger in humans.
AAPS J., 13(3), 417-426, (2011)
- 29) Zick, S. M., Djuric, Z., Ruffin, M. T., Litzinger, A. J., Normolle, D. P., Alrawi, S.,
Feng, M. R. and Brenner, D. E.:
Pharmacokinetics of 6-Gingerol, 8-Gingerol, 10-Gingerol, and 6-Shogaol and
Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects.
Cancer Epidermal Biomarkers Prev., 17, 1930-1936, (2008)
- 30) Asami, A., Shimada, T., Mizuhara, Y., Asano, T., Takeda, S., Aburada, T., Miyamoto,
K. and Aburada, M.
Pharmacokinetics of [6]-shogaol, a pungent ingredient of *Zingiber officinale*
Roscoe (Part I).
J. Nat. Med., 64(3), 281-287, (2010)
- 31) Ahmed, M. G.
Antimicrobial Activity of 6-Paradol and Related Compounds.
Intern. J. Pharmacognosy, 34(1), 64-69,(1996)

- 32) Chung, W-Y., Jung, Y-J., Surh, Y-J., Lee, S-S. and Park, K-K.
Antioxidative and antitumor promoting effects of 6-paradol and its homologs.
Mutat. Res., 496(1-2), 199–206, (2001)
- 33) Ling, H., Yang, H., Tan, S-H., Chui, W-K. and Chew, E-H.
6-shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by
reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor- κ B
activation.
Br. J. Pharmacol., 161(8), 1763-1777,(2010)
- 34) Shukla Y., Singh M.
Cancer preventive properties of ginger : a brief review
Food Chem. Toxicol., 45 (5), 683-690 (2007)
- 35) Shukla Y., Prasad S., Tripathi C., Singh M., George J., Kalra N.
In vitro and vivo modulation of testosterone mediated alterations in apoptosis
related proteins by [6]-gingerol
Mol. Nutr. Food Res., 51 (12), 1492-1502 (2007)
- 36) Surh Y-J., Park K-K., Chun K-S., Lee L-J., Lee E., Lee S-S.
Anti-tumor-promoting activities of selected pungent phenolic substances present in
ginger
J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 18 (2), 131-139 (1999)
- 37) Jolad S-D, Lantz R-C, Chen G-J, Bates R-B., Timmermann B-N.
Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*) : composition and effects
on LPS-stimulated PGE₂ production
Phytochemistry, 66 (13), 1614-1635 (2005)
- 38) Nurtjahja-Tjendraputra E., Ammit A-J., Roufogalis B-D., Tran V-H., Duke C-C.
Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of

ginger

Thromb. Res., 111 (4-5), 259-265 (2003)

- 39) Tjendraputra E., Tran V-H., Liu-Brennan D., Roufogalis B-D., Duke C-C.
Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme
in intact cells
Bioorg. Chem., 29 (3), 156-163 (2001)
- 40) Bode A-M., Ma W-Y., Surh Y-J. and Dong Z.
Inhibition of Epidermal Growth Factor-induced Cell Transformation and Akt/Erk
Protein 1 Activation by [6]-Gingerol.
Cancer Res., 61, 850-853,(2001)
- 41) 柳澤輝行
新薬理学入門
南山堂 84-93, (2008)
- 42) 大柳善彦
NO ラジカルの医学
羊土社 29-41, 82-93, (2000)
- 43) Swarnalatha Dugasani, Mallikarjuna Rao Pichika, Vishna Devi Nadarajah, Madhu
Katyayani Balijepalli, Satyanarayana Tandra, Jayaveera Narsimha Korlakunta
Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of 6-gingerol,8-gingerol,
10-gingerol and 6-shogaol
J. Ethnopharmacol., 127(2), 515–520 (2010)
- 44) Vinegar, R., Schreiber, W. and Hugo, R.
Biphasic Development of Carrageenin Edema in Rats.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 166(1), 96-103,(1969)

- 45) Di Rosa, M. and Willoughby, D.A.
Screens for anti-inflammatory drugs.
J. Pharm. Pharmacol., 23(4), 297-298,(1971)
- 46) Salvemini, D., Wang, Z. Q., Bourdon, D. M., Stern, M. K., Currie, M. G. and Manning, P. T.
Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema.
Eur. J. Pharmacol., 303(3), 217–220, (1996)
- 47) Salvemini, D., Wang, Z. Q., Wyatt, P., Bourdon, D. M., Marino, M. H., Manning, P. T. and Currie, M. G.
Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation.
Br. J. Pharmacol., 118(4), 829–838, (1996)
- 48) Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S
Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes.
J. Pharm. Pharmacol., 53(12), 1679-1685, (2001)
- 49) van, Breemen, R.B., Tao, Y. and Li, W.:
Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*).
Fitoterapia. 82(1), 38-43,(2011)
- 50) Zell JA, Ziogas A, Bernstein L, Clarke CA, Deapen D, Largent JA, Neuhausen SL, Stram DO, Ursin G, Anton-Culver H.
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs : effects on mortality after colorectal cancer diagnosis.
Cancer, 115 (24), 5662-5671 (2009)

51) Li B, Li YM, Li X, Shi B, He MY, Zhu XL, Zhou WC, Wachtel MS, Frezza E.

COX-2 inhibition improves immune system homeostasis and decreases liver damage in septic rats.

J. Surg. Res., 157 (1), 43-47 (2009)

52) Florez A, de Haro J, Martinez E, Varela C, Bleda S, Acin F.

Selective cyclooxygenase-2 inhibition reduces endothelial dysfunction and improves inflammatory status in patients with intermittent claudication.

Rev. Esp. Cardiol., 62 (8), 851-857 (2009)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇篤なる御指導、本論文の御高閲を賜りました金沢大学附属病院 薬剤部 宮本 謙一 教授に衷心より深甚なる御礼を申し上げます。

本研究の作成にあたり、御指導とご高見を賜りました金沢大学院自然科学研究科薬学系臨床薬剤学研究室 石崎 純子 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただき、また研究の進行と論文の作成にあたり、懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました武蔵野大学薬学部 油田 正樹 教授に心より感謝の意を表しますと共に、厚く御礼申し上げます。

本研究の進行と本論文の作成にあたり、懇切なる御指導、数々の御助言と多大なる御協力を賜りました武蔵野大学薬学部 嶋田 努 講師に心より深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、御指導とご助言を賜りました武蔵野大学薬学部 西丸 宏 講師に深く感謝いたします。また、共に鼓舞激励し、協力してくださった生薬療法学研究室諸氏、特に高橋 晶子 氏に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、犠牲となった実験動物に感謝するとともに冥福を祈ります。

最後に、本研究遂行に際し終始温かく支えてくれた妻 春香と娘 優奈、家族に感謝いたします。

参考論文目録

本研究の内容は、以下の論文に公表する。
この論文は、2013年10月30日に受理され、2014年30号に収録される予定である。

Daisuke TOKUHARA, Tsutomu SHIMADA, Akitoshi ASAMI, Akiko TAKAHASHI,
Hiroko KOBAYASHI, Hiroshi SAIMARU and Masaki ABURADA
Pharmacokinetics of 6-shogaol, a pungent ingredient of Zingiberis Rhizoma, and the
anti-inflammatory activity of its metabolite, 6-paradol
Journal of Traditional Medicines, Vol.30, (2014)