

アーユルヴェーダ薬線 *kSara sUtra* の  
国産代替品金沢糸の改良研究

横川 貴美

2018年1月

# 博士論文

## アーユルヴェーダ薬線 *kSara sUtra* の 国産代替品金沢系の改良研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

分子生薬学研究室

学 籍 番 号 1429012010

氏 名 横川 貴美

主任指導教員名 佐々木 陽平

## 目次

略語記載一覧.....	1
序論.....	2
本論.....	5
第1章 金沢糸1号（改良前）の活性評価.....	5
第1節 骨格筋芽細胞を用いた組織切断作用評価.....	5
第1項 実験材料.....	5
第2項 実験方法.....	6
第3項 結果及び考察.....	6
第2節 マクロファージ様細胞のNO産生による活性比較.....	10
第1項 実験材料.....	10
第2項 実験方法.....	11
第3項 結果及び考察.....	11
第2章 金沢糸1号の改良研究：金沢糸2号の開発.....	15
第1節 実験材料.....	15
第2節 実験方法.....	15
第3節 金沢糸2号の調製の検討結果.....	15
第4節 臨床結果及び考察.....	18
第3章 金沢糸1号の改良研究：金沢糸3号の開発.....	20
第1節 実験材料.....	20
第2節 実験方法.....	20
第3節 結果及び考察.....	21
第4章 金沢糸1号と金沢糸3号の生物活性比較.....	24
第1節 アカメガシワ添加法の検討と金沢糸3号の調製.....	24
第2節 実験材料.....	26
第3節 実験方法.....	26
第4節 結果及び考察.....	27

第5章 トウダイグサ科植物の起炎活性比較.....	31
第1節 実験材料.....	31
第2節 実験方法.....	31
第3節 結果および考察.....	33
第6章 金沢系に使用するウコンについて.....	39
第1節 実験材料.....	39
第2節 実験方法.....	40
第3節 結果及び考察.....	40
総括.....	44
実験の部.....	46
実験材料.....	46
実験方法.....	51
謝辞.....	56
引用文献.....	57
参考資料.....	62



## 略語記載一覧

本論文での検体及び試薬等の名称を以下のように略式記載する。

KS; <i>kSara sUtra</i>	MJB; アカメガシワ樹皮
KanS1; 金沢系 1 号	MJBT; アカメガシワ樹皮チンキ (エタノール抽出物)
KanS2; 金沢系 2 号	L6; ラット由来骨格筋芽細胞
KanS3; 金沢系 3 号	J774.1; マウス由来マクロファージ様細胞
IKS; インド産 <i>kSara sUtra</i>	NO; 一酸化窒素
SKS; スリランカ産 <i>kSara sUtra</i>	LPS; Lipopolysaccharide
CLR; ウコン末	L-NMMA; <i>N</i> <sup>G</sup> -Monomethyl-L-arginine, acetate
AFK; ヒナタイノコヅチ <i>kSara</i>	ENLx; <i>snuhl</i> 乳液, キリンカク乳液
FCLx; イチジク乳液	ENSt; <i>snuhl</i> 茎, キリンカク茎
CAT; トウガラシチンキ	GUR; 甘草

### ・ 第 5 章

AAW; エノキグサ全草	MJLf; アカメガシワ葉
CMW; コニシキソウ全草	MLW; ヤマアイ全草
CNM; オオニシキソウ全草	NJBr; シラキ枝
EAW; ノウルシ全草	NJLf; シラキ葉
ELW; タカトウダイ全草	PTW; ナガエコミカンソウ全草
EMLx; ハナキリン乳液	PUW; ヒメミカンソウ全草
EMSt; ハナキリン茎	RCS; トウゴマ種子
EPLf; ポインセチア葉	TsBr; ナンキンハゼ枝
ESeW; センダイタイゲキ全草	TSLf; ナンキンハゼ葉
ESiW; ナツトウダイ全草	TSSe; ナンキンハゼ種子
ETLx; ミドリサンゴ乳液	VCLf; アブラギリ葉
ETSt; ミドリサンゴ茎	VFLf; シナアブラギリ葉
EVLf; <i>Euphorbia viguieri</i> 葉	VFSe; シナアブラギリ種子
EVLx; <i>Euphorbia viguieri</i> 乳液	

### ・ 第 6 章

CLR-I; インド産ウコン	PAB; 黄柏
CLR-J; 日本産ウコン	LER; 紫根
CJR; 黄連	AAR; 当帰

## 序論

*kSara sUtra* (クシャーラ・ストトラ; KS) とはインドの伝統医学アーユルヴェーダの痔瘻治療に使用される薬線である。アーユルヴェーダの根付くインドやスリランカでは現在でも痔瘻治療に KS が用いられている。KS は複数の薬材から製される糸状の製剤である。*kSara* はサンスクリット語で「腐蝕性の物質」や「アルカリ」を、*sUtra* は「糸」を意味する<sup>1,2)</sup>。すなわち *kSara sUtra* は腐食糸, アルカリ性の糸という意味を示す。KS には植物全草の灰から製した灰製剤 (*kSara*) も一材料として使用するため, KS の物性はアルカリ性を示す。

痔瘻は肛門部歯状線の肛門小窩から細菌が侵入し, 肛門導管や肛門腺に感染が伸展し膿瘍を形成する疾患である<sup>3)</sup>。自然治癒しないため手術療法が原則となる<sup>4)</sup>。KS を用いた痔瘻治療は二次口から一次口 (原発口) へと KS を通して結紮するだけの簡単な術式である (Fig. 1)。KS の薬材による腐食作用と結紮による物理的な力によって痔孔前壁の組織が緩徐に切断され, 同時に痔孔後壁側では新しい肉芽による治癒過程が始まり, 瘻管が開放になったときにはほぼ新生肉芽組織に覆われ治癒している<sup>5)</sup>。KS を用いた痔瘻治療は西洋外科手術と比して手術時間や入院期間も短く, 再発率も低いことが報告されている<sup>5,6)</sup>。しかし日本に於いて痔瘻治療に KS を用いる場合 KS を個人輸入で入手する必要がある, そのような KS では品質の違いや薬効の不安定さが懸念されている<sup>7)</sup>。また, 日本でインド産 KS と同じ材料を入手することは難しく, 温室などの特殊な環境でなければ原植物の栽培も困難である。これらの問題を解決するため, 吉光らによって日本で入手可能な植物由来の薬材で製される国産 KS, 金沢糸 1 号が開発された (Fig. 2)<sup>8,9)</sup>。

KS は三種類の薬材, *haridrA* (*Curcuma longa* L.) 根茎末, *apAmArga* (*Achyranthes aspera* L.) *kSara* (灰製剤), *snuhI* (*Euphorbia antiquorum* L. または *Euphorbia nerifolia* L.) 乳液で調製される。一方, 金沢糸 1 号はウコン (*Curcuma longa* L.) 根茎末, ヒナタイノコヅチ (*Achyranthes fauriei* Lévl. et Vaniot) *kSara*, イチジク (*Ficus carica* L.) 乳液, トウガラシ (*Capcicum annum* L.) チンキの 4 種の薬材で調製されている (Fig. 3)。ウコンは日本でも栽培可能であり, 入手が容易であるため KS と同様に金沢糸 1 号でも使用している。*A. aspera* は日本に自生しておらず, 日本では栽培が困難であるため, 同属植物のヒナタイノコヅチに代替している。*A. aspera* で調製した *kSara* とヒナタイノコヅチで調製した *kSara* は元素組成が類似することから品質的に同等であることが確認されている<sup>10)</sup>。*snuhI* も日本での栽培が困難であるため日本で栽培できる生薬由来の薬材に代替している。*snuhI* 乳液は粉末薬材を糸に塗布するときの接着剤の役割をするほか, 起炎作用を有し患部の血流を改善していると推測される<sup>11,12)</sup>。接着剤の役割として日本で古くから痔治療にも用いられてきたイチジク乳液を使用し<sup>13-a,14-a)</sup>、起炎作用を追加する目的でトウガラシチンキが用いられている。

2002 年から金沢糸 1 号が臨床使用されて以来多くの臨床報告が行われており, 副作用や臨床使用上の問題はないとされている<sup>15,16,17,18)</sup>。また痔瘻治療だけでなく裂肛や毛巣洞の治療へも応用されているが<sup>19,20,21)</sup>、インド産 KS と比して瘻孔前壁の切断力が弱いことが指摘されている<sup>7,15,22)</sup>。切断力が弱いということは糸の交換回数が増え, 通院回数や入院日数の増加につながり, 患

者の QOL の低下を招く。そのため、金沢糸の組織切断力を向上させることが望まれる。金沢糸改良に際し構成生薬を見直し、生物活性への寄与をもとに入れ替えを検討する必要がある。しかし金沢糸 1 号やインド産、スリランカ産 KS の臨床報告は多数あるものの *in vitro* での生物活性試験の報告はほとんどなく、改良のために指標となるものが存在しない。本研究では金沢糸 1 号及び構成生薬の薬理活性を明らかにし、金沢糸 1 号の改良を行うための基礎検討を実施した。

改良研究に際し、金沢糸 1 号の調製時の問題についても同時に検討を行った。金沢糸 1 号に使用するイチジク乳液は採集に時間を必要とし、長期保存も適していないため、年間を通じての金沢糸 1 号の調製は困難である。そのため、イチジク乳液を使用しない金沢糸の調製を試みた。さらに金沢糸 1 号に使用しているウコンの代替についても検討を行った。

なお本論文で KS と表記した場合インド産 KS, スリランカ産 KS, 金沢糸すべての総称である。

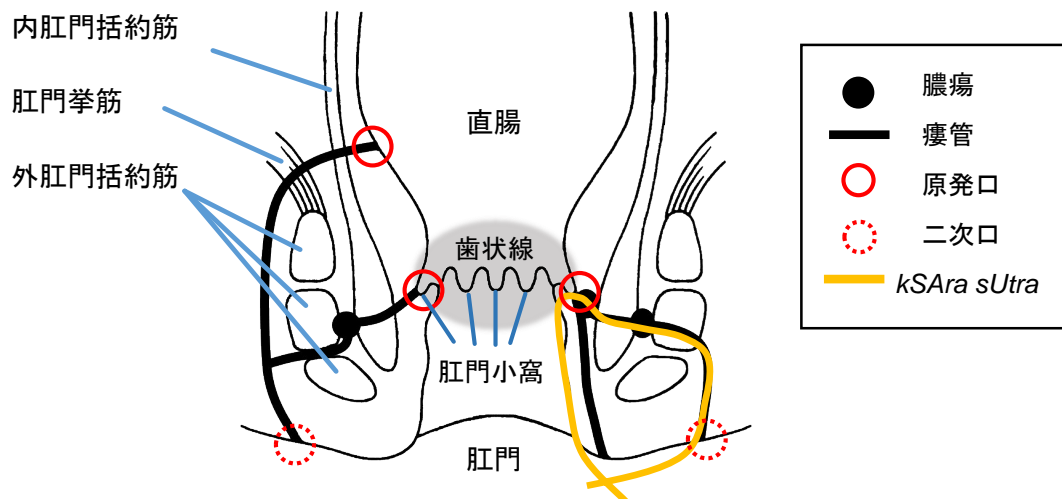


Fig. 1. *kSara sUtra* を用いた痔瘻治療

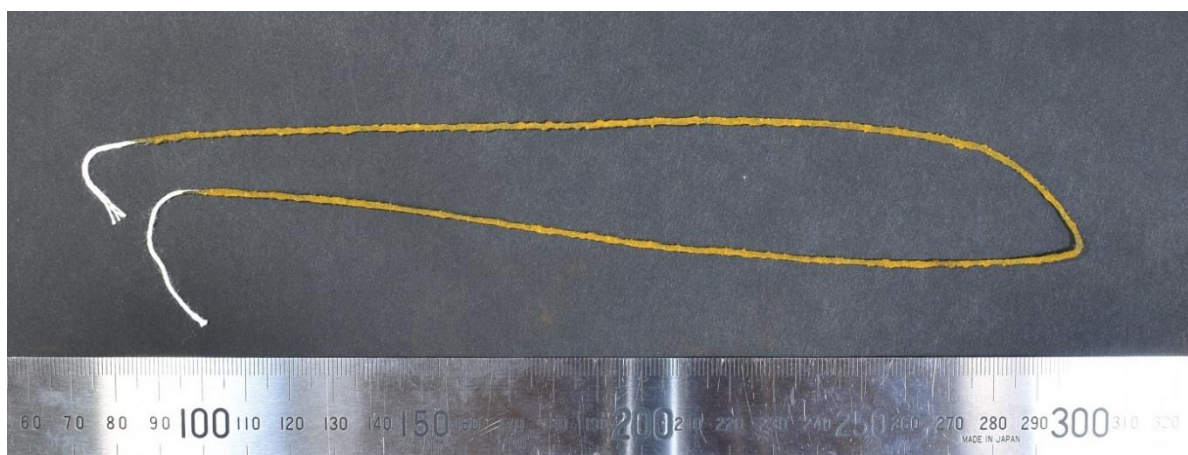


Fig. 2. *Kanazawa sUtra I* (金沢糸 1 号)








<i>Kanazawa sUtra I</i>				
Japanese name	Ukon; ウコン	Hinata-inokoduchi; ヒナタイノコヅチ	Ichijiku; イチジク	Togarashi; トウガラシ
Scientific name	<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Achyranthes fauriei</i> Lév. et Vaniot	<i>Ficus carica</i> L.	<i>Capsicum annuum</i> L.
Used part or Dosage form	Powdered dried rhizome	<i>kSara</i>	Latex of matured/immature fruit	Tincture of matured fruit
<i>kSara sUtra</i> in India or Sri Lanka				
Sanskrit name	<i>haridrA</i>	<i>apAmArga</i>	<i>snuhI</i>	
Scientific name	<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Achyranthes aspera</i> L.	<i>Euphorbia antiquorum</i> L. or <i>E. neriifolia</i> L.	
Used part or Dosage form	Powdered dried rhizome	<i>kSara</i>	Latex of stem	

Fig. 3. The ingredients of *Kanazawa sUtra I* and Indian or Sri Lankan *kSara sUtra*

## 本論

### 第1章 金沢糸1号（改良前）の活性評価

金沢糸1号を改良するにあたり金沢糸1号や構成薬材の活性を明らかにする必要がある。金沢糸1号の性状や活性の報告は pH<sup>8)</sup>、プロテアーゼ活性<sup>23)</sup>、*kSara* の元素組成<sup>10)</sup>のみでありその他の活性の報告はない。また KS の評価法として経験に基づいた臨床試験のみしか行われておらず、*in vitro* における評価系は確立されていない。本章では骨格筋芽細胞、マクロファージ様細胞に対する各種 KS 及び金沢糸1号の構成薬材の活性評価を行った。

#### 第1節 骨格筋芽細胞を用いた組織切断作用評価

KS を用いた痔瘻治療では KS を二次口から一次口を通して結紮する。KS の腐食作用と結紮による物理的な力により組織が徐々に切断され、切断された組織は徐々に再生していく。金沢糸1号はインド産 KS、スリランカ産 KS と比して瘻管が開放するまでの期間が長い<sup>7, 15)</sup>。つまり金沢糸1号は組織の切断能が弱いということである。そこで、この組織切断能を *in vitro* の細胞毒性試験で評価できないかと考え、ラット由来骨格筋芽細胞を用いて評価を行った。骨格筋芽細胞は、分化、融合し、筋繊維となる細胞である<sup>24)</sup>。KS が結紮する組織には多くの場合、肛門括約筋が含まれる。肛門括約筋の中でも外肛門括約筋は骨格筋に該当するため、骨格筋芽細胞を用いることで組織の切断能を評価できると考えた。

本節では臨床結果で組織切断力が金沢糸1号よりも強いとされる2種のインド産 KS、1種のスリランカ産 KS を用いて細胞毒性を評価し金沢糸1号との活性の比較を行った。また、金沢糸1号の構成材料について、細胞毒性および分化誘導した細胞の形態変化への影響の評価を行った。

#### 第1項 実験材料

ラット由来骨格筋芽細胞 (L6) JCRB 細胞バンクより分譲

金沢糸1号 (KanS1)、インド産 KS① (IKS-1)、インド産 KS② (IKS-2)、スリランカ産 KS (SKS) ウコン末 (CLR)、ヒナタイノコヅチ *kSara* (AFK)、イチジク乳液 (FCLx)、トウガラシチンキ (CAT)

KanS1 : 2013 年調製, IKS-1 : 畑氏より入手, IKS-2 : 田澤氏より入手, SKS : Upali Pilapitiya 氏より入手

## 第2項 実験方法

### (1) 細胞添加試料調製

FCLx は室温で乾燥させたものを使用し、各種 KS は細かく刻んだ。検体 1 g にメタノールまたは水 100 ml を加え室温で 30 分超音波抽出を行い、一晚放置後ろ過した。メタノール抽出物は減圧蒸留で水抽出物は凍結乾燥機で溶媒を除去し、それぞれ抽出物を得た。CAT は抽出作業を行わず溶媒除去して試料とした。

### (2) 細胞毒性の測定

96 well plate に L6 細胞を播種し 24 時間培養後、培地に 100 µg/ml メタノール抽出物を添加し 48 時間培養した後、MTT 法で細胞生存率を測定した。Vehicle の細胞生存率を 100% とし、細胞生存阻害率を細胞毒性として算出した。

### (3) L6 細胞の分化誘導および形態観察

L6 細胞を増殖培地で 80-90%コンフルエントに培養した。30 µg/ml の試料を含む分化培地へ培地を交換し 48 hr 培養した。同じ組成の試料含有培地を交換し、さらに 48 hr 培養した。エタノールで細胞固定を行い、顕微鏡で4つのエリア (850×850 µm) をランダムに選び観察した。画像解析ソフト (ImageJ) によって分化細胞の占める割合を分析し、Vehicle の分化した細胞の面積を 100% としてそれぞれの割合を算出した。

## 第3項 結果及び考察

### (1) 各抽出物の収率

メタノール抽出物の収率は KanS1 11.2%, CLR 3.9%, AFK 0.7%, FCLx 39.3%, CAT 1.0%, 水抽出物では KanS1 15.2%, CLR 12.5%, AFK 3.1%, FCLx 48.9%であった (Table 1)。インド産 KS 及びスリランカ産 KS は微量であったため収率は算出できなかった。

### (2) 各種 KS による L6 細胞の毒性評価

各種 KS の細胞毒性は IKS-1 90.8%, IKS-2 90.2%, SKS 91.6%, KanS1 27.0%であった (Fig.

4)。KanS1 に対して IKS-1, IKS-2, SKS は有意に細胞毒性が強かった ( $p<0.05$ )。

臨床で使用した際に金沢系 1 号はインド産 KS, スリランカ産 KS よりも組織切断力がやや劣ることや、KanS1 の細胞毒性が有意に弱いことから、KS の組織切断力の要因に骨格筋への細胞毒性が関与している可能性が示唆された。

### (3) 金沢系 1 号及び構成薬材による L6 細胞の毒性評価

KanS1 はメタノール抽出物，水抽出物ともに穏やかな細胞毒性を示し，それぞれ 17.0%，13.9%であった (Fig. 5)．KanS1 の構成薬材の中でやや強い細胞毒性を示したのは CLR のメタノール抽出物のみで 49.5%であった．その他はメタノール抽出物及び水抽出物ともに細胞毒性は 15%を下回り，メタノール抽出物では AFK 0.8%，FCLx 2.5%で，CAT は細胞毒性を示さず，水抽出物では AFK 14.3%，FCLx 6.3%で，CLR は細胞毒性を示さなかった．

この結果より KanS1 の骨格筋芽細胞への細胞毒性は CLR の寄与が大きいことが明らかとなった．またスルタ・サンヒター (アーユルヴェーダ三大古典の一つ) によると *kSara* は腐食作用や皮膚と肉を破壊する働きがあるとされているが<sup>25)</sup>，AFK の細胞毒性は穏やかであり，AFK のメタノール抽出物の収率は 0.7%，水抽出物は 3.1%と非常に低く (Table 1)，金沢系として使用する際の細胞毒性は低いと考えられる．

Table 1. Yields of methanol or water extracts of KanS1 and its ingredients

Yield	Methanol extract (%)	Water extract (%)
KanS1	11.2	15.2
CLR	3.9	12.5
AFK	0.7	3.1
FCLx	39.3	48.9
CAT	1.0 <sup>a</sup>	-

a; CAT extract was prepared by removing solvent in tincture

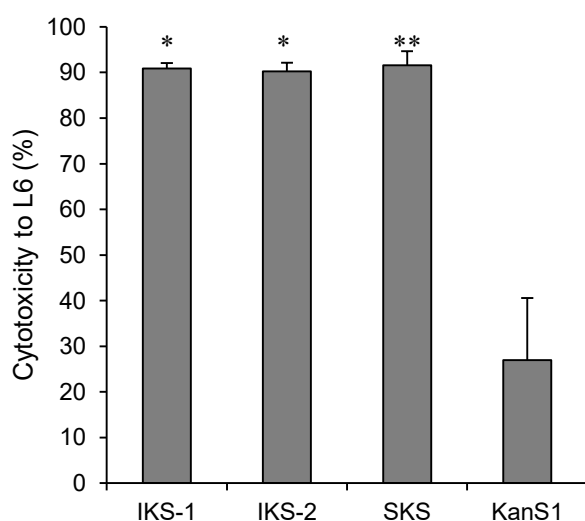


Fig. 4. Effect of several *kSara sUtra* (KS) on L6 of cytotoxicity.

L6 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with 100 µg/ml of methanol extracts of KS for 48 h. The cytotoxicity L6 was determined by the rate of death cell. Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean ± SE). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from KanS1.



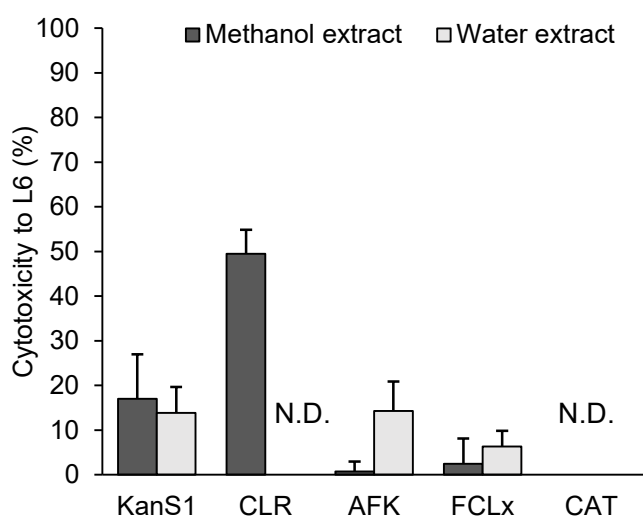


Fig. 5. Effect of KanS1 and its ingredients on L6 of cytotoxicity.

L6 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with methanol or water extracts of KanS1 and its ingredients for 48 h. The final concentration of each extract was 100  $\mu\text{g/ml}$ . The cytotoxicity to L6 was determined by the rate of death cell. Data were determined by averaging the results from 4 to 5 assays (mean  $\pm$  SE). N.D. means not detected.

### (3) 金沢系 1 号及び構成薬材による L6 細胞の分化への影響

分化した細胞は隣接する細胞と融合するが、未分化の細胞は融合しない (Fig. 6-A). これらの画像を解析すると、分化した細胞の割合は KanS1 メタノール抽出物では 75.7%, 水抽出物では 55.0%であった。KanS1 の構成薬材のメタノール抽出物の結果は CAT 104.7%, AFK 103.4%, FCLx 100.5%, CLR 18.6%であった (Fig. 6-B). 一方、水抽出物の結果は CLR 94.0%, AFK 95.1%, FCLx 39.4%であった。KanS1 メタノール抽出物、水抽出物共に有意に分化した細胞が減少していた。また CLR メタノール抽出物及び FCLx 水抽出物も有意に分化した細胞が減少していた。

これらの結果から金沢系 1 号は骨格筋芽細胞の分化融合を阻害することが明らかとなり、この活性が組織切断に寄与する可能性が示された。またこの活性には CLR 及び FCLx が大きく寄与していることが明らかとなった。



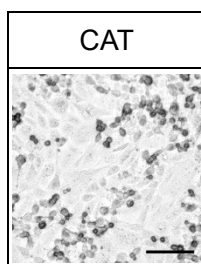
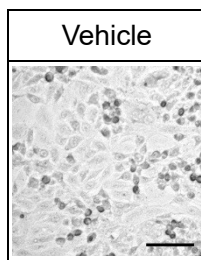
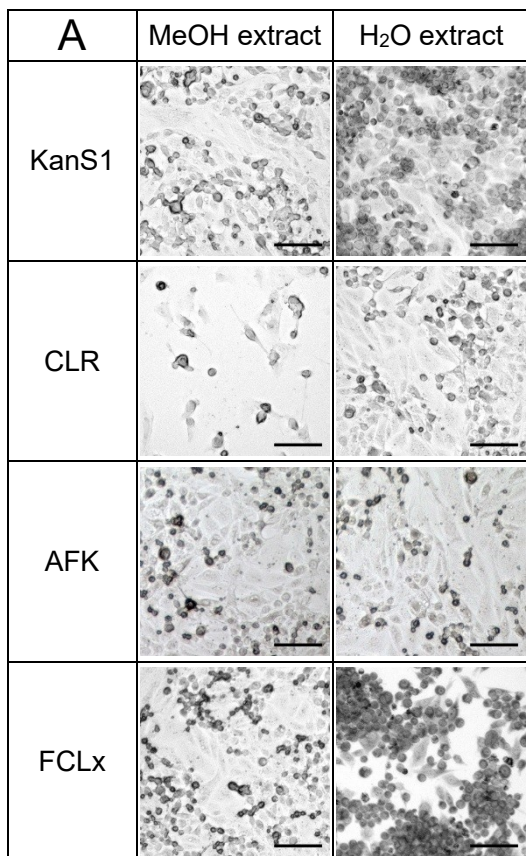
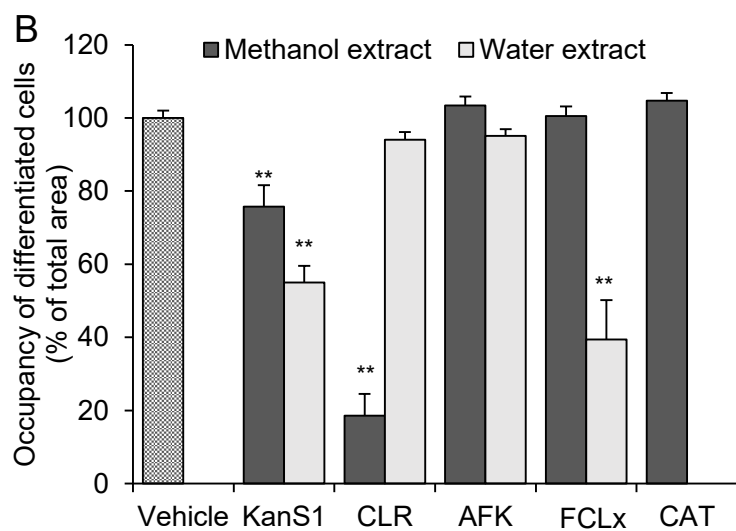


Fig. 6. Effects of KanS1 ingredients on L6 differentiation.

A; After L6 were grown to 80-90% confluence in a dish containing growth medium, the growth medium was replaced with differentiation medium containing 30 µg/ml of methanol or water extracts of test samples, and the differentiation medium was replaced with new medium after incubating for 48 h. After incubating for more than 48 h, the cells were immobilized by ethanol and observed under a microscope. Bar is 100 µm.

B; Round and darkly stained cells were regarded as undifferentiated, and the observed image was analyzed by ImageJ to determine the occupancy of differentiated cells. Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean ± SE). \*\* $P < 0.01$ , significantly different from vehicle.



## 第2節 マクロファージ様細胞の NO 産生による活性比較

痔瘻形成には炎症反応が関与する。炎症は病原体や外傷、化学物質、熱などの組織障害を受けた組織から多くの物質が放出され、障害を受けていない周囲の組織に劇的な二次的変化をもたらす組織変化のことである<sup>26)</sup>。痔瘻は肛門部歯状線の肛門小窩から侵入した細菌が引き金となる<sup>27, 28, 29)</sup>。侵入した細菌は炎症反応を起こし、好中球およびマクロファージによって貪食される<sup>26, 30, 31)</sup>。

好中球およびマクロファージは多数の細菌や壊死組織を貪食後死滅し、組織液と共に肛門周囲に膿となって蓄積される。膿が局所的に蓄積された部位が膿瘍であり、肛門周囲膿瘍が自壊または切開された状態が痔瘻である。体内には常在菌が多く存在するため、金沢糸を用いた痔瘻治療ではその細菌によって更に炎症反応が惹起される可能性や、金沢糸自身が組織を徐々に切断するため金沢糸による炎症反応が起こる可能性も考えられる。そこで金沢糸 1 号および構成薬材の炎症作用への関与をマウス由来マクロファージ様細胞 (J774.1) を用いて評価した。

炎症性のサイトカインによってマクロファージや好中球、血管内皮細胞が活性化され誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase; iNOS) が合成され、血中の一酸化窒素 (NO) 濃度が増加する<sup>32)</sup>。産生した NO は病原体に対し障害を示す一方で過剰な NO は正常な細胞をも傷つけ、さらなる炎症反応の原因にもなる<sup>33, 34)</sup>。本節ではこの過剰な NO 産生を指標として試料の抗炎症作用および起炎作用の評価を行った。試料添加によって NO 産生が誘導されるものを起炎作用、NO 産生誘導物質である lipopolysaccharide (LPS) を試料と同時に添加し測定される NO 産生阻害を抗炎症作用とみなした。

また、マクロファージは KS の組織切断によって生じる壊死した細胞を貪食することが推測されるため、KS のマクロファージへの細胞毒性が治癒期間に影響すると考えられる。そのため各種 KS および金沢糸構成薬材のマクロファージへの毒性の評価を検討し、指標としてマウス由来マクロファージ様細胞 (J774.1) の細胞毒性を評価した。

### 第1項 実験材料

マウス由来マクロファージ様細胞 (J774.1)

金沢糸 1 号 (KanS1 : 2011 年調製), インド産 KS① (IKS-1), インド産 KS② (IKS-2), スリランカ産 KS (SKS)

ウコン末 (CLR), ヒナタイノコヅチ *kSara* (AFK), イチジク乳液 (FCLx), トウガラシチンキ (CAT)

L-NMMA (NO 産生阻害のポジティブコントロール)

参考として金沢糸 1 号の構成薬材重量比は Table 2 に示した。

## 第2項 実験方法

培養細胞に添加する試料は第1節と同様に調製を行った。

ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたマウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 を用いた。5-10×10<sup>5</sup> cells/ml の細胞懸濁液を調製し 96 well plate に細胞懸濁液を分注後、24 時間培養した。その後、試料を添加し（終濃度 100 μg/ml）さらに 24 時間培養した。試料添加時に必要に応じて LPS を添加し（終濃度 1 μg/ml）NO 産生を誘導した。培地中の NO 量は Griess 法によって測定し、LPS（1 μg/ml）の刺激で産生される NO 量を 100%として、それぞれ NO 産生率を算出した。LPS 刺激に対する NO 産生阻害作用のポジティブコントロールとして L-NMMA（100 μM）を使用した。細胞生存率は MTT 法で測定し、細胞生存阻害率を細胞毒性として算出した。

## 第3項 結果及び考察

### (1) 各種 KS 及び金沢系 1 号構成薬材による J774.1 細胞の毒性評価

各種 KS メタノール抽出物の細胞毒性は、KanS1 が細胞毒性を示さず、IKS-1 18.8%、IKS-2 56.3%、SKS 61.4%であった（Fig. 7-A）。KanS1 に対して IKS-1、IKS-2、SKS は有意に細胞毒性が強かった（ $p<0.05$ ）。水抽出物についてはそれぞれ、KanS1 13.3%、IKS-1 2.2%、IKS-2 7.6%、SKS 1.4%とそれぞれほとんど細胞毒性を示さず、KanS1 に対して IKS-1、IKS-2、SKS は有意差を示さなかった。金沢系構成薬材のメタノール抽出物、水抽出物ともに約 20%以下の細胞毒性しか示さなかった（Fig. 7-B）。メタノール抽出物の細胞毒性はそれぞれ CLR 1.5%、AFK 20.1%、FCL 9.6%、CAT 3.9%を示し、水抽出物はそれぞれ CLR 14.0%、AFK 7.2%、FCL 5.7%の細胞毒性を示した。L-NMMA の細胞毒性は 1.3%であった。

臨床で使用した際に金沢系 1 号はインド産 KS、スリランカ産 KS よりも治癒期間が短いことが報告されているため<sup>37)</sup>、マクロファージへの毒性が治癒期間に影響する可能性が示唆された。

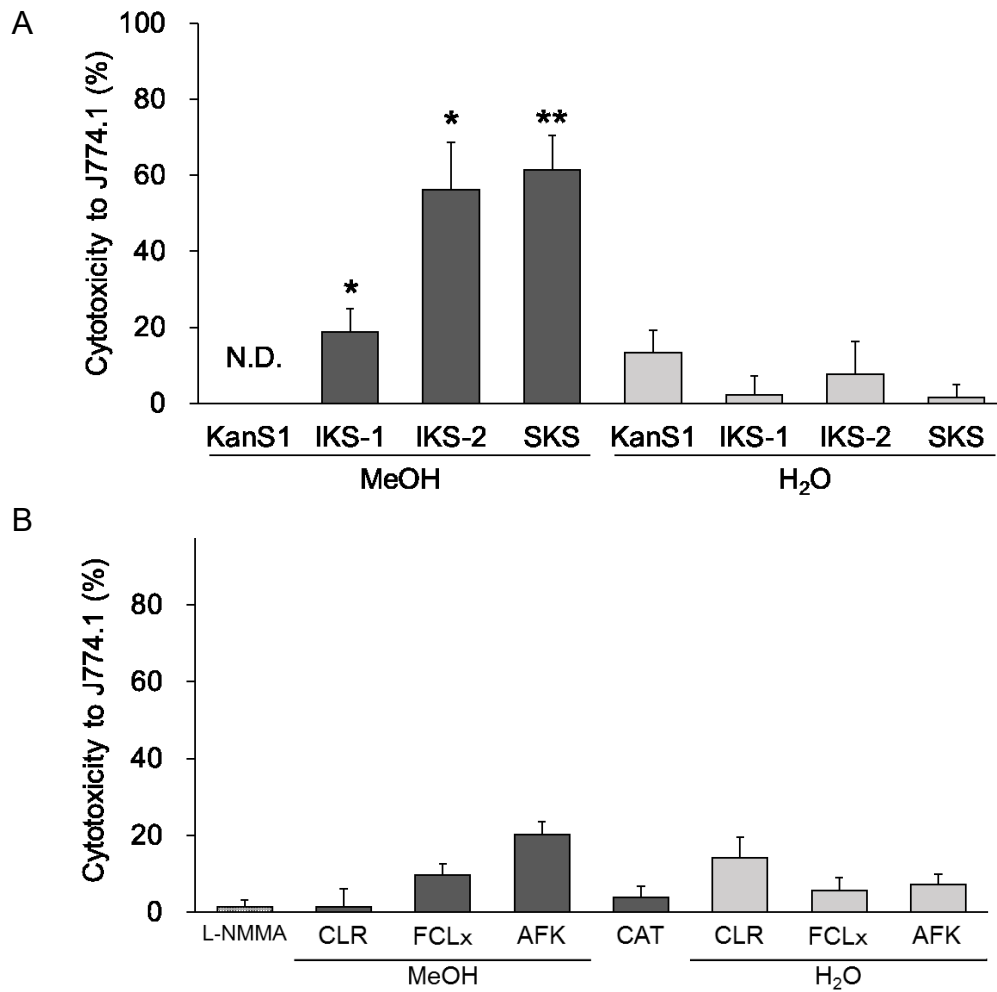


Fig. 7. Effect of KS and the ingredients of KanS1 on J774.1 of cytotoxicity.

A; Some types of KS. B; The ingredients of KanS1.

J774.1 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with methanol or water extracts of KS and the ingredients of KanS1 for 24 h. The final concentration of each extract was 100 µg/ml. L-NMMA was used as a positive control and its final concentration was 100 µM (25 µg/ml). The cytotoxicity to J774.1 was determined by the rate of death cell. Data were determined by averaging the results from 4 to 5 assays (mean ± SE). N.D. means not detected.

\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from KanS1.

## (2) 各種 KS および金沢系 1 号構成薬材による J774.1 細胞の NO 産生率評価

各種 KS の NO 産生活性の結果は LPS(+) での NO 産生率はメタノール抽出物添加時で KanS1 は 42.6%とやや NO 産生阻害を示す一方で、インド産、スリランカ産 KS はほとんど NO 産生活性を示さず、IKS-2 1.3%、SKS2.3%、IKS-1 は NO 産生を示さなかった (Fig. 8-A). これはインド産 KS、スリランカ産 KS が J774.1 に対し細胞毒性を示すため (Fig. 7-A), NO 産生機能が低下したと考えられる. また LPS(+)での水抽出物添加時の NO 産生率は KanS1 67.5%、IKS-1 50.7%、IKS-2 63.6%、SKS 36.8%と大差のない NO 産生阻害活性を示した.

LPS(-) ではメタノール抽出物、水抽出物ともに NO 産生活性をほとんど示さなかった. それぞれの NO 産生率はメタノール抽出物添加時で IKS-1 11.9%であり、KanS1、IKS-2、SKS ともに NO 産生活性を示さなかった. また水抽出物添加時の NO 産生率は KanS1 5.5%、IKS-1 0.4%であり IKS-2 及び SKS は NO 産生活性を示さなかった.

KanS1 の構成薬材の NO 産生率は LPS(+) でのメタノール抽出物添加時で CLR 1.7%、FCLx 80.4%、AFK 74.8%、CAT39.3%で、水抽出物添加時は CLR 48.4%、FCLx 62.1%、AFK 84.2%であった (Fig.8-B). LPS(-) での NO 産生率はメタノール抽出物添加時で CLR 4.5%、AFK 1.4%であり、FCLx 及び CAT は NO 産生活性を示さなかった. 水抽出物添加時は CLR 9.5%、FCLx 1.7%、AFK 0.5%とほとんど NO 産生活性を示さなかった. L-NMMA は LPS(+)で 54.3%の NO 産生率を示し、LPS(-)で NO 産生活性を示さなかった.

LPS(-)で NO 産生活性が強い場合は、起炎作用を有する可能性があるが、メタノール抽出物および水抽出物ともに LPS(-)で NO 産生活性を示さなかったため、各種 KS および KanS1 構成薬材は NO 産生による起炎作用をほとんど有さないことが明らかとなった.

一方、LPS(+)で NO 産生活性が低い場合は NO 産生阻害活性が強いことを示し、抗炎症作用が期待される. KanS1 はメタノール抽出物、水抽出物共に穏やかな NO 産生阻害活性を示した. このことから KanS1 には抗炎症作用が期待される. 構成薬材の活性を比較すると CLR のメタノール抽出物は強い NO 産生活性を示し、CAT は穏やかな NO 産生阻害活性を示していた. これらの活性は既報の内容と一致する<sup>35,36)</sup>. 本節では KanS1 の構成比や抽出物の収率を考慮せず、すべて同じ濃度で抽出物を添加したため各薬材の活性を単純に KanS1 の活性とみなすことはできないが、KanS1 の NO 産生阻害活性には CLR の影響が大きいと考えられる. CAT は NO 産生阻害活性を示しているものの、KanS1 の構成比が 0.1%であり (Table 2)、ほとんど活性に関与しないと考えられる. なお本節の結果は同じ濃度で試料を添加して培養して得られたものであり、薬材の構成割合や収率などを考慮されていない. これらを考慮した結果は第 4 章で述べる.

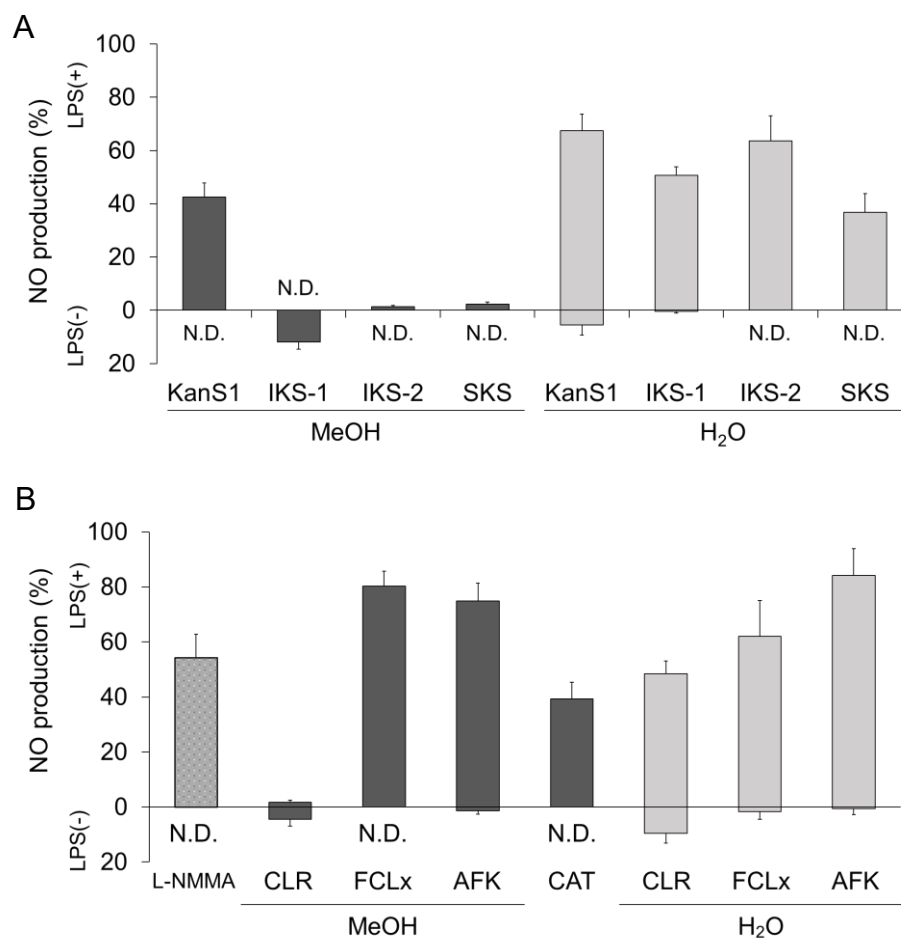


Fig. 8. Effects of KS and the ingredients of KanS1 on NO production and cell viability of J774.1.

A; Some types of KS. B; The ingredients of KanS1. J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  of methanol or water extract of each sample was added. After incubated for 24 h, NO production was measured by the Greiss assay. The amount of NO produced by J774.1 upon stimulation with LPS was regarded as 100%. L-NMMA was used as a positive control and its final concentration was 100  $\mu\text{M}$  (25  $\mu\text{g/ml}$ ). Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean  $\pm$  SE) N.D. means not detected.

Table 2. Weight ratios of KanS1 ingredients

Ingredient	Weight ratio (%)
CLR	15-25
AFK	15-25
FCLx	50-70
CAT	0.1

## 第2章 金沢系1号の改良研究：金沢系2号の開発

金沢系1号は材料にイチジク乳液を使用する。イチジク乳液は採集して放置すると二層に分離や褐変などの性状変化がおきるため長期保存が難しい。そのため乳液採取後は、すみやかに金沢糸を調製する必要がある。現在イチジク乳液は果実用にイチジクを生産している方の取り残しの果実を分けていただいて確保している。そのため採取できる時期は果実出荷後の11月後半に限定されるうえ、時間をかけて一つの果実の切り口から2～3滴落ちる乳液を回収しており、一度に大量の乳液を得ることは困難である。そこで本章ではイチジク乳液を使用せず金沢糸を調製する方法を検討した。すなわち金沢系1号におけるイチジク乳液の役割の一つは接着剤であるため、糸に粉を付着させる代替手段を検討した。ヒナタイノコヅチ *kSAra* の付着の目安に pH、ウコン末の付着と目安としてクルクミン含量を指標とした。このように調製した糸を金沢系2号とした。

### 第1節 実験材料

高吸水性糸（カネボウ株式会社試作製品）

金沢系1号2検体（KanS1-1：2014年調製, KanS1-2：2016年調製）

ウコン末（CLR）、ヒナタイノコヅチ *kSAra*（AFK）、トウガラシチンキ（CAT）

### 第2節 実験方法

#### ・pHの測定

生理食塩水2 mlに3 cmに切断した金沢糸または検体を入れ10分超音波抽出した後、pHメーターを用いて生理食塩水のpHを測定した。

#### ・クルクミン測定

クルクミンの相対的な含量比較はTLC法によって、クルクミンの定量はHPLC法によって行った。

### 第3節 金沢系2号の調製の検討結果

#### (1) 糸への薬材の付着法の検討結果

イチジク乳液は糸へCLR及びAFKを付着させる役割があるため、イチジク乳液を使用しない場合、糸に擦り込むか、抽出液を吸収させることを考えた。金沢系1号1本あたりに使用する薬材量と同量の薬材を使用し、それぞれの方法で金沢糸を調製し、pHとクルクミン含量を比較した。

A) 糸にCLR及びAFKをそのまま擦り込んだ

B) CLR及びAFK混合物を水に懸濁させ糸に擦り込んだ

C) 糸にAFK水懸濁液を塗布し乾燥後、CLRのメタノール抽出物を塗布し乾燥させた。

A-Cで使用した糸はあらかじめCATを塗布して乾燥させた糸を使用した。

KanS1-1 は pH 8.1, KanS1-2 は pH 9.3, A は pH 8.5, B は pH 8.0, C は pH 8.7 と B はやや pH が低いものの, どの検体も金沢糸 1 号に対して有意差はなかった (Table 3). 次いで TLC 法でクルクミン含量を比較したところ A 及び B のスポットは薄く C のスポットは最も濃かったが, C のスポットは金沢糸 1 号よりも薄かった (Fig. 9).

AFK は粒子径が小さく糸の縫りに入り込みやすく A, B, C のどの手法を用いても金沢糸 1 号と同等の pH を示す結果となった. しかし CLR は比較的粒子径が粗く, 接着剤なしでは糸に残存することが困難であり, 金沢糸 1 号と比して A 及び B のクルクミンのスポットが著しく薄いという結果であった. C は A, B よりもクルクミンのスポットが濃く検出されたため, これらの三つのうちでは C の製法が適切と考えられる. ただし金沢糸 1 号と同量の CLR を使用してもすべての成分が抽出できないので, さらに CLR のメタノール抽出物を塗り重ねる必要があると判断した.

## (2) CLR の塗布回数の検討結果

次に CLR の塗り重ねる回数を増やした次の条件でイチジク乳液を使用しない金沢糸を再度調製し, pH 及び TLC 法によって金沢糸 1 号と比較した. 調製法は次の通りである. トウガラシチンキを塗布して乾燥させた糸に AFK 水懸濁液を塗布し乾燥後, CLR のメタノール抽出物を次に示す回数塗布した. D 3 回, E 4 回, F 5 回, G 6 回.

D は pH 8.8, E は pH 9.3, F は pH 9.4, G は pH 9.4 と, どの検体の pH も金沢糸 1 号に対して有意差はなかった (Table 3). TLC でクルクミン含量を比較したところ D, E, F のスポットは金沢糸 1 号より薄く, G のスポットは金沢糸 1 号と同程度であった (Fig. 9). G のクルクミン含量を HPLC 法で測定したところ  $8.3 \mu\text{g}/\text{cm}$  であり, KanS1-1  $7.2 \mu\text{g}/\text{cm}$ , KanS1-2  $13.2 \mu\text{g}/\text{cm}$ , CLR  $8.9 \mu\text{g}/\text{mg}$  であった (Table 4). G のクルクミン濃度は KanS1-1 と KanS1-2 の間の値であったため, 金沢糸 2 号の CLR を塗り重ねる回数を 6 回とし, 金沢糸 2 号の調製方法を決定した (Fig. 10).



Table 3. pH of each samples

Data were determined by averaging the results from 3 tests (mean  $\pm$  SD).

Sample	pH	Sample	pH
KanS1-1	8.1 $\pm$ 0.4	Normal saline	5.6
KanS1-2	9.3 $\pm$ 0.2	D	8.8 $\pm$ 0.1
A	8.5 $\pm$ 0.2	E	9.3 $\pm$ 0.1
B	8.0 $\pm$ 0.4	F	9.4 $\pm$ 0.2
C	8.7 $\pm$ 0.1	G	9.4 $\pm$ 0.2

- A) Powdered of turmeric and AFK were rubbed into the thread without binder.  
 B) Powdered of turmeric and AFK were rubbed into the thread by water.  
 C) The thread was coated AFK suspension in water. After dried, the thread was coated with methanol extract of turmeric only once.  
 D) After preparing like C, the thread was more coated with CLR methanol extract 2 times.  
 E) After preparing like C, the thread was more coated with CLR methanol extract 3 times.  
 F) After preparing like C, the thread was more coated with CLR methanol extract 4 times.  
 G) After preparing like C, the thread was more coated with CLR methanol extract 5 times.

Those thread was coated with capsicum tincture before preparation.

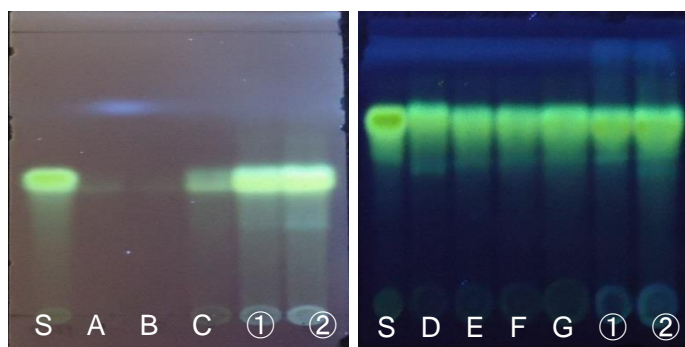


Table 4. Curcumin contents

Sample	Concentration
KanS1-1	7.2 $\mu$ g/cm
KanS1-2	13.2 $\mu$ g/cm
G	8.3 $\mu$ g/cm
CLR	8.9 $\mu$ g/mg

Fig. 9. Comparison of the curcumin content included in the *Kanazawa sUtra* by TLC.

Shredded 10 cm of KanS and added 5 ml methanol. After sonicated for 15 min, the resultant eluate is centrifuged and the supernatant solution was used as the sample solution. The sample solutions (20  $\mu$ l) were spotted on a silica gel 60-F<sub>254</sub> plate. The plate was developed in a TLC developing chamber previously saturated with Ethyl acetate: *n*-Hexane: Acetic acid (70:30:0.1). The curcumin were detected at 356 nm.

S; Curcumin Standard ① KanS1-1, ② KanS1-2

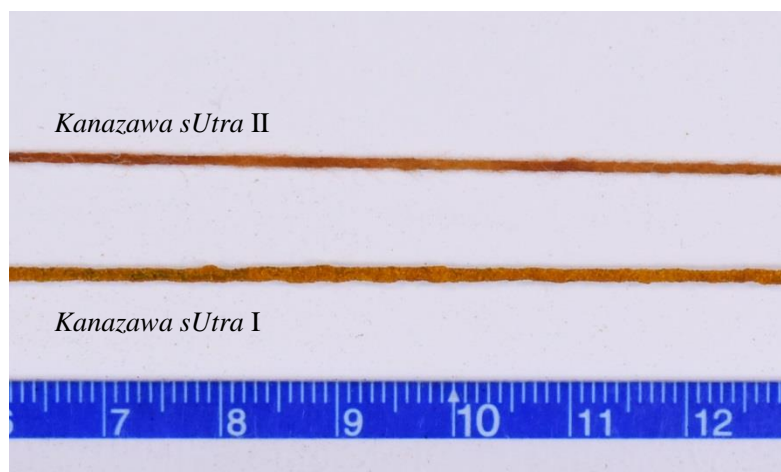


Fig. 10. *Kanazawa sUtra I* and *Kanazawa sUtra II* (金沢糸 1 号と金沢糸 2 号)

#### 第 4 節 臨床結果及び考察

開放創となるまでの平均日数は金沢糸 1 号 31.2 日，金沢糸 2 号 52.9 日，インド産 KS30.1 日，1 回の糸交換で切断される組織の平均の長さは金沢糸 1 号 0.79cm，金沢 2 号 0.78cm，インド産 KS0.98cm，治癒までの期間は金沢糸 1 号 12.1 週，金沢糸 2 号 14.3 週，インド産 KS13.6 週であった (Table 5, 参考 Fig. 11)．開放創となってから治癒までの期間は金沢糸 1 号 7.7 週，金沢糸 2 号 6.7 週，インド産 KS9.4 週であった．金沢糸 2 号症例は瘻孔が長い症例が多かったため開放創までに時間を必要としたが，1 回の交換で切れる糸の長さは 1 号と同程度であった．金沢糸 2 号は金沢糸 1 号やインド産 KS と比して開放創から治癒までの期間が短いため両者の治癒までの期間に大きな差はないと考えられる．ただし，金沢糸 2 号の糸交換の際，滑りが悪く操作性に少々問題があったことが指摘された<sup>37)</sup>．イチジク乳液は臨床使用上での操作性を良くするため，金沢糸に必要であると考えられる．

インドでも *snuhI* 乳液はイチジク同様に入手が限られる点や，*snuhI* 乳液を用いた KS は痛みが強い点から，*snuhI* 乳液を *Guggul* (*Commiphora wightii* の樹脂) やパパイヤ (*Carica papaya*) 乳液，*Arka* (*Calotropis gigantea*) 乳液に替えた KS が報告されている<sup>38,39,40,41-a)</sup>．金沢糸も，イチジク乳液を除く方向ではなく，イチジク乳液を代える方向で他の乳液や樹脂等の検討を行う必要がある．

Table 5. Treatment outcome of KanS1, KanS2 and Indian KS<sup>37)</sup>

Sumikoshi classification typeII	KanS1	KanS2	Indian KS
1. Number of case	88	13	80
2. Initial length of KS [max] (cm)	3.9 [7.4]	5.2 [7.6]	4.2 [7.5]
3. The number of replacement times of KS [max]	4.1 [9]	6.4 [17]	3.6 [9]
4. Total number of days to cut through the tract [max]	31.2 [68]	52.9 [114]	30.1 [80]
5. U.C.L. <sup>a)</sup> (cm/time)	0.79	0.78	0.98
6. U.C.T. <sup>b)</sup> (day/cm)	8.2	9.81	7.0
7. Total number of weeks of cut through the tract to healing	7.7	6.7	9.4
8. Healing (weeks)	12.1	14.3	13.6

a) Unit Cutting Length = (2. Initial length of KS) / [(3. The number of replacement times of KS) + 1]

b) Unit Cutting Time = (4. Total number of days to cut through the tract) / (2. Initial length of KS)

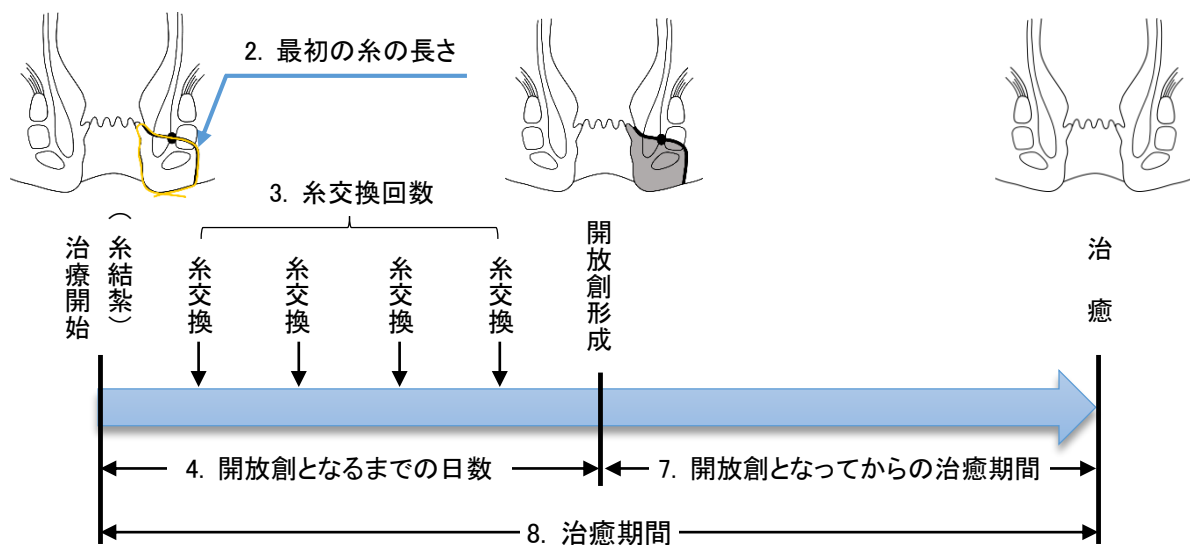


Fig. 11. KS による痔瘻治療一例

### 第3章 金沢系1号の改良研究：金沢系3号の開発

金沢系1号は組織切断力が弱いことが指摘されているが<sup>7, 15, 22)</sup>, KSを用いた痔瘻治療では1週間に1回程度の割合でKSを交換するため<sup>7)</sup>, 切断力が劣ると金沢系の交換回数が多くなり通院回数も増え患者のQOL低下につながる. 金沢系1号の切断力を向上させるためには材料の再検討が必要である. そのためインド産KSとの相違点を改めて考えてみると, *snuhl* (トウダイグサ科) 乳液をイチジク (クワ科) 乳液とトウガラシ (ナス科) チンキに代替したことが, 薬効の差異へ大きく影響したと考えられる. *snuhl*がトウダイグサ科にも関わらず, 代替品をトウダイグサ科から選定した理由はトウダイグサ科植物には発がん性物質を含む種がある<sup>42, 43, 44)</sup>ことよると報告されている<sup>9)</sup>.

第2章の結果からイチジク乳液は金沢系調製のために必要な要素であることが示唆されたため, トウガラシチンキに変わる強い切断力を示す薬材を選定する必要がある. そこで改めて日本に自生するトウダイグサ科植物について検討してみることにした. この科に由来する日本薬局方収載生薬にアカメガシワが存在する<sup>45)</sup>. アカメガシワは胃薬として内服の使用経験があり, 他のトウダイグサ科植物のような発がん性の危険性もない. 本章ではアカメガシワがトウガラシチンキの代替になり得るか生物活性試験を行い, 金沢系3号を開発することを目的とした. なお様々なトウダイグサ科植物について検討した結果は第5章に詳細を示す.

またアカメガシワの妥当性を検討するために *snuhl* の原植物である *E. neriifolia* の乳液及び茎について比較した. またサンスクリット語で甘草を示す *STimadhu* (*Glycyrrhiza glabra* Linné) をインド産KSに加えることでインド産KSの組織切断力が強くなったことが報告されているため<sup>46)</sup>, 参考として甘草の活性比較も行った.

#### 第1節 実験材料

本章で使用した生薬は Table 6 に詳細を示した.

Table 6. Samples used in this study

Sample name	Japanese name	Scientific name	Used Part
MJB	<i>Akamegashiwa</i> ; アカメガシワ	<i>Mallotus japonicus</i> Mueller Argoviensis	Bark
ENLx	<i>Kirinkaku</i> ; キリンカク	<i>Euphorbia neriifolia</i> L.	Latex
ENSt	<i>Kirinkaku</i> ; キリンカク	<i>Euphorbia neriifolia</i> L.	Stem
GUR	<i>Kanzo</i> ; カンゾウ	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Root and Stolon

#### 第2節 実験方法

ENSt 及び ENLx は採集後, 凍結乾燥機を用いて乾燥した. ENLx を除くすべての検体は粉碎機で粉碎後, メタノールまたは水で抽出し1章と同様に細胞添加試料を調製した. 第1章と同様にL6細胞に対する細胞毒性及びJ774.1に対する細胞毒性及びNO産生率を評価した.

### 第3節 結果及び考察

#### (1) 各抽出物の収率

メタノール抽出物の収率は GUR 29.4%, ENLx 63.7%, ENSt 24.7%, MJB 16.0%, 水抽出物の収率は GUR 30.7%, ENLx 30.2%, ENSt 47.7%, MJB 11.9%であった (Table 7).

Table 7. Yields of water and methanol extracts of herbal medicines

Sample name	Methanol extract (%)	Water extract (%)
MJB	16.0	11.9
ENLx	63.7	30.2
ENSt	24.7	47.7
GUR	29.4	30.7

#### (2) L6 細胞の毒性評価

各検体のメタノール抽出物の L6 への細胞毒性は高い順に MJB 62.0%, ENLx 61.1%, GUR 13.1% で ENSt は細胞毒性を示さなかった (Fig. 12). インド産 KS やスリランカ産 KS に使用される ENLx は比較的強い細胞毒性を示したが, 第1章の結果ではイチジク乳液 (FCLx), トウガラシチンキ (CAT) 共に細胞毒性がほとんど認められなかった (Fig. 5). この ENLx と FCLx, CAT の細胞毒性の違いが金沢糸1号とインド産 KS, スリランカ産 KS の切断力の違いである可能性が示唆された. MJB は L6 への細胞毒性を示していたため, MJB を CAT の代替とすることで金沢糸の切断力向上の可能性が示された.

ENLx の細胞毒性について *E. neriifolia* 葉のメタノール抽出物から腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) ファミリーの Death-Receptor 5 (TRAILR2) の発現を増幅し, 細胞のアポトーシスを誘導する成分が 11 種報告されている<sup>47)</sup>. 本章で用いた *E. neriifolia* の使用部位は乳液と茎のため葉とは成分の含有率が異なるものの, これらの成分が細胞毒性に関与していたことが推察される.

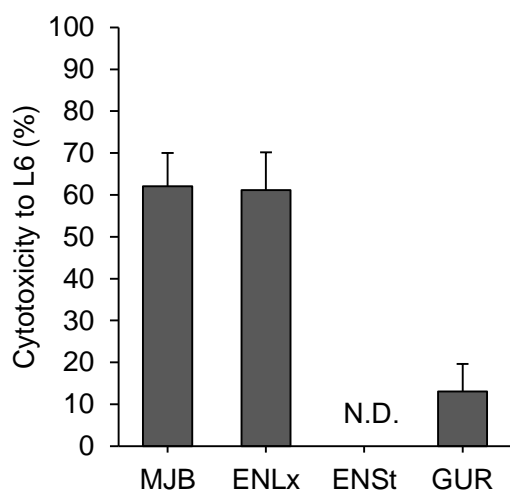


Fig. 12. Effect of methanol extract of herbal medicines on L6 of cytotoxicity.

L6 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with 100  $\mu$ g/ml methanol extracts of herbal medicines for 48 h. The cytotoxicity to L6 was determined by the rate of death cell.

Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean  $\pm$  SE). N.D. means not detected.

### (3) J774.1 の毒性及び NO 産生率評価

それぞれの細胞毒性はメタノール抽出物添加時で MJB 13.5%, ENLx, ENSt, GUR は細胞毒性を示さなかった (Fig. 13-A). 水抽出物添加時は GUR 23.2%, MJB 19.9%, ENSt 12.6%であり, ENLx は細胞毒性を示さなかった. L-NMMA も細胞毒性を示さず, 今回使用した検体は全体的に細胞毒性をほとんど示さなかった.

J774.1 の NO 産生率は LPS(+)のメタノール抽出物添加時において ENSt 14.4%, ENLx 14.5%, GUR 23.5%, MJB 52.8%で, 水抽出物添加時は GUR 8.8%, ENSt 26.2%, MJB 27.0%, ENLx 49.3%を示し, L-NMMA は 49.1%であった (Fig. 13-B). 一方, LPS(-)での NO 産生率はメタノール抽出物では ENLx 9.0%, ENSt 16.2%で GUR, MJB は NO 産生活性を示さず, 水抽出物では GUR 80.7%, ENLx 8.3%, ENSt 63.6%, MJB 50.0%を示した.

ENLx および ENSt メタノール抽出物は LPS(-)でわずかに NO 産生活性を示し, 水抽出物についても LPS(-)で NO 産生活性を示していた. この結果から *E. neriifolia* にはマクロファージを刺激して NO 産生を誘導する成分が含有されていることが明らかとなった. *E. neriifolia* の起炎作用の機序に NO も関与している可能性が示された.

さらにインド産 KS に加えることで切断力が上がるとされる甘草 (GUR) も水抽出物が LPS(-)で NO 産生活性を示していることや, 金沢系 1 号の構成薬材のメタノール抽出物および水抽出物はほとんど NO 産生活性を示していなかったことから (Fig. 8-B), NO 産生を誘導する生薬を添加することで金沢系の薬効向上の可能性が推測された. MJB の水抽出物では NO 産生活性を示していたため, MJB を金沢系に用いることは薬効向上につながると考えられる.

CAT は ENLx の起炎作用を補う目的で使用されているが, NO 産生活性を示さなかった (Fig. 8-B). トウガラシの起炎作用は主要成分である Capsaicin がイオンチャネル型受容体の TRPV1 に直接働きかけることが知られている<sup>48,49</sup>. このように *smuh1* とトウガラシによる起炎作用の機序の差異が切断力に影響を与えている可能性がある.

### (4) まとめ

本章ではアカメガシワ (MJB) がトウガラシチンキ (CAT) の代替になり得るか活性試験を行った. 第 1 章では CAT は L6 細胞への細胞毒性を示さなかったが, ENLx 及び MJB は細胞毒性を示していた. そのため, 切断力の MJB を用いることで組織切断力向上の可能性はある. また MJB は J774.1 の細胞毒性は 20%以下と弱いため, 組織修復にも毒性は問題ないと考えられる. さらに ENLx や ENSt, MJB は LPS(-)において J774.1 の NO 産生活性を示していたが, CAT は NO 産生活性を示していない. そのため CAT にはない ENLx の炎症作用を MJB が補う可能性が示唆された. これらの結果から CAT を MJB に変更することで金沢系 1 号の切断力が改善される可能性が示唆された.

CAT を MJB に変更した金沢系 3 号を調製するにあたり MJB 濃度の検討が必要になる。ENLx と MJB は同じメタノール抽出物濃度で同等の細胞毒性を示した (Fig. 12)。NO 産生活性は同濃度の MJB、ENLx 間で 10-40%程度の活性の差があった (Fig. 13)。L6 細胞への細胞毒性はより組織切断力との関与が大きいと推測され、L6 への細胞毒性は ENLx と MJB 同濃度で同程度の活性を示していた。ゆえに金沢系 3 号は ENLx 濃度と同程度の MJB を使用することとした。

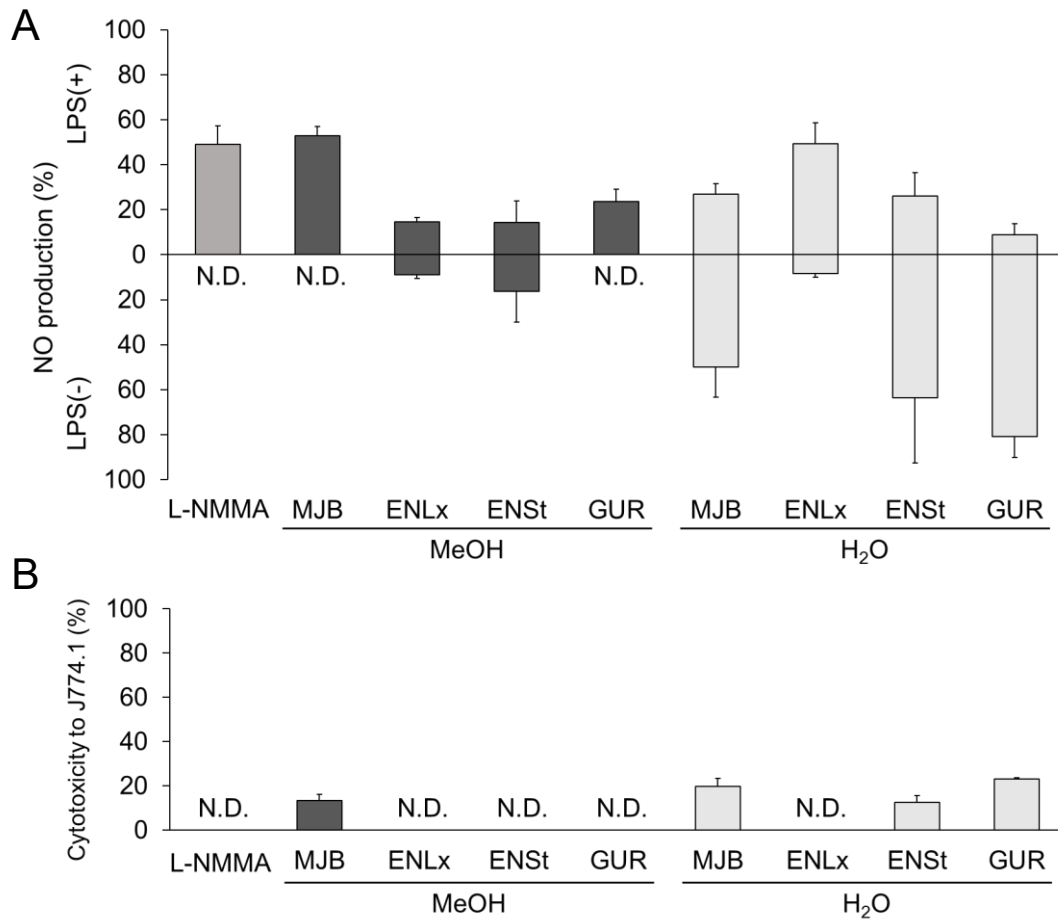


Fig. 13. Effects of methanol and water extract of herbal medicines on NO production and cytotoxicity of J774.1.

A; J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  of methanol or water extract of each sample was added. After incubated for 24 h at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>, NO production was measured by the Greiss assay. The amount of NO produced by J774.1 upon stimulation with LPS was regarded as 100%. L-NMMA was used as a positive control and its final concentration was 100  $\mu\text{M}$  (25  $\mu\text{g/ml}$ ). B; the cell viability was measured by the MTT assay. The cytotoxicity to J774.1 was determined by the rate of death cell.

Data were determined by averaging the results from 4 to 5 assays (mean  $\pm$  SE). N.D. means not detected.

## 第4章 金沢系1号と金沢系3号の生物活性比較

第3章では金沢系1号のトウガラシチンキをアカメガシワに変更した金沢系3号に金沢系の切断力改善の可能性を見出した。本章では実際に金沢系3号を調製し、前章と同様の活性の比較を行った。また大腸菌、黄色ブドウ球菌への抗菌活性も比較した。

痔瘻の起炎菌としてみられる細菌には特殊なものではなく、普通に糞便中にみられる大腸菌や嫌気性菌による<sup>28)</sup>。そこでヒトに常在し痔瘻の原因や再発に寄与すると推定される大腸菌、黄色ブドウ球菌に着目した。大腸菌は通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、ヒトや動物の腸管の常在菌である<sup>50,51,52)</sup>。糞便1g中には約 $10^{6-8}$ 個の大腸菌が含まれている。一方、黄色ブドウ球菌は通性嫌気性のグラム陽性球菌であり、表皮や鼻腔粘膜あるいは腸管に多く常在する。黄色ブドウ球菌は代表的な化膿菌であり、膿瘍形成の原因となりやすい菌である<sup>30)</sup>。すでにウコンの精油成分や主要成分のクルクミンに大腸菌及び黄色ブドウ球菌への抗菌活性は報告されているため<sup>53,54)</sup>、ウコンを使用する金沢系にも抗菌活性が予想されるが、構成薬材の組み合わせの違いで抗菌作用が増強または低下する可能性もある。そのため、金沢系1号および金沢系3号の抗菌活性も比較した。

### 第1節 アカメガシワ添加法の検討と金沢系3号の調製

#### (1) アカメガシワ (MJB) 添加法の検討

MJBを用いた金沢系3号を調製するにあたりMJBの添加法を検討した。Table 7からENLxとMJBの抽出物の収率を比較すると、ENLxのメタノール抽出物の収率はMJBの約4倍、水抽出物は約3倍である。この量を粉末で塗布する場合、金沢系が太くなり臨床使用上の操作性が悪くなる可能性が懸念されるため抽出物で塗布することとした。ENLxと活性の挙動に近いメタノール抽出物の使用を検討し、さらに臨床使用することを見据え人体に比較的安全なエタノールを用いてMJBエキスを抽出することとした。なお、エタノール抽出物とメタノール抽出物の活性が同等であることを確認している (Table 8, Fig. 15)。

第3章の結果から、メタノール抽出濃度において同程度のMJB抽出物を用いることで金沢系がインド産KS、スリランカ産KSの活性に近づくことが推測された。インド産KSに使用されるENLx量は不明のためsnuhl乳液がイチジク乳液と同量使用されているものと仮定し、抽出率を考慮して金沢系3号に用いるMJBエタノール抽出物(MJBチンキ;MJBT)濃度の計算した。その結果、金沢系1本あたりMJBT(300mg/ml)を400 $\mu$ l塗布することで同等の活性が得られると算出した。

濃度調整のためMJBTはエバポレーターで溶媒を減圧留去し、水に再溶解させて使用した。



## (2) 金沢糸 3 号の調製

高吸水性糸を 46 cm×32 cm 木枠に等間隔で 9 本糸を張り、アガメガシワエタノール抽出物 (300 mg/ml) を 1 本あたり 200  $\mu$ l 塗布して乾燥させた。ヒナタイノコヅチ *kSara* 0.90 g とイチジク乳液 3 ml を混合して全量を 9 本の糸に塗布して乾燥させたあと、再度アガメガシワエタノール抽出物 (300 mg/ml) を 1 本あたり 200  $\mu$ l 塗布して乾燥させた。イチジク乳液を塗布しウコン粉末を付着させ乾燥した (Fig. 14)。

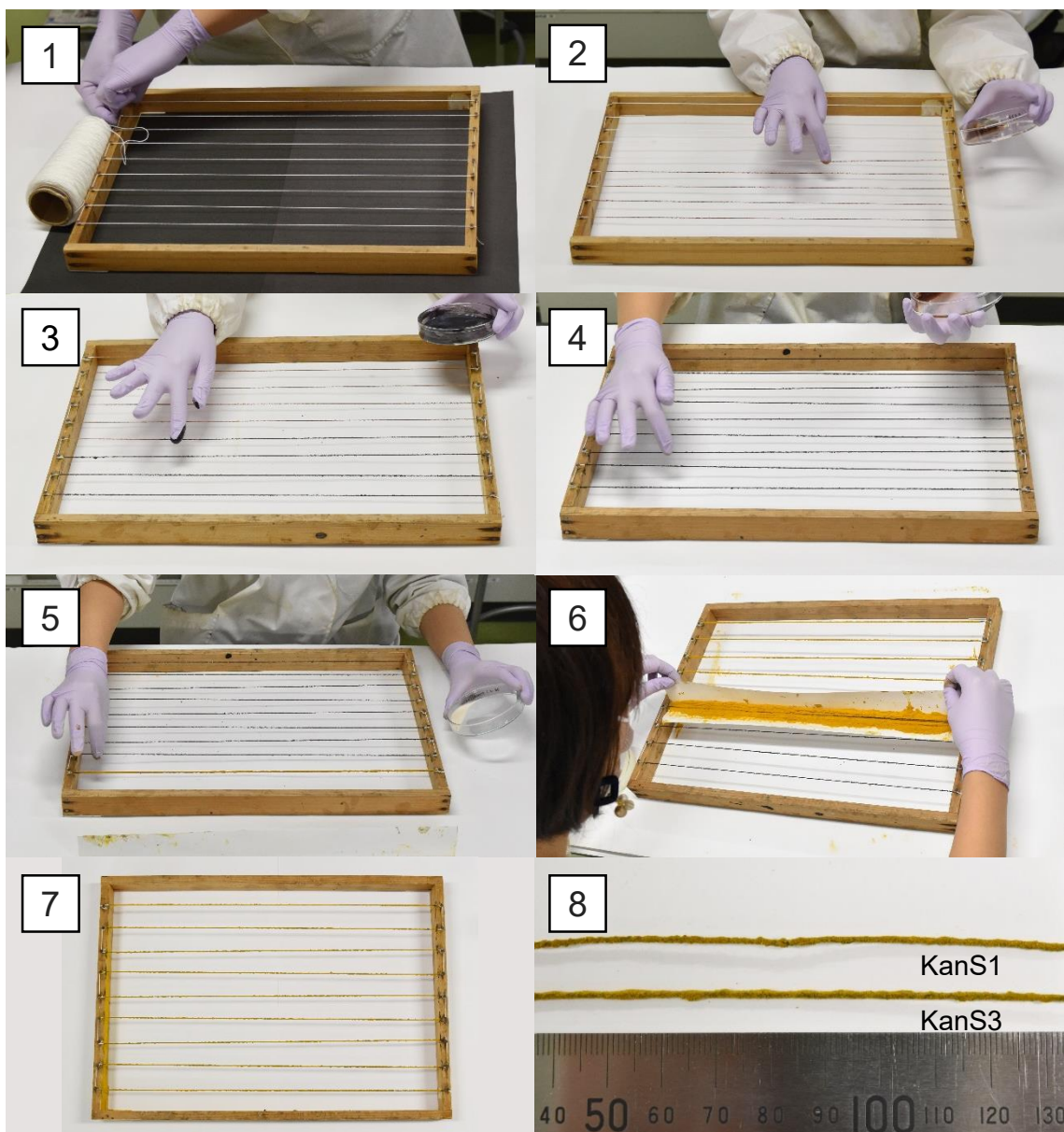


Fig. 14. The procedure of preparing *Kanazawa sUtra* III

1) Thread was stretched on a wooden frame. 2) Coat with MJB extract. 3) Coat with a mixture of FCLx and AFK. 4) Coat with MJB extract. 5) Coated with FCLx. 6) Dredge with CLR. 7) Dry. 8) KanS1 and KanS3.

Table 8. Yields of ethanol and methanol extracts of MJB

EtOH extract	MeOH extract
13.7%	16.0%

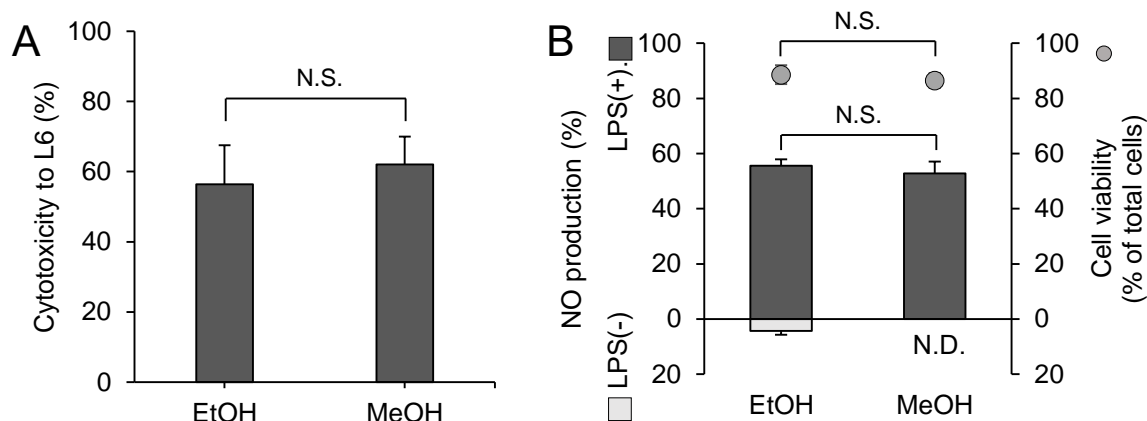


Fig. 15. Effect of ethanol or methanol of MJB on L6 cytotoxicity or NO production and cell viability.

A; L6 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with methanol or ethanol extracts of MJB for 48 h. The final concentration of each extract was 100  $\mu\text{g/ml}$ . The cytotoxicity L6 was determined by the rate of death cell. Data were determined by averaging the results from 4 assays (mean  $\pm$  SE).

B; J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  of ethanol or methanol MJB extract was added. NO production was measured by the Greiss assay and cell viability was measured by the MTT assay. Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean  $\pm$  SE) N.D. means not detected. N.S. means not significant.

## 第2節 実験材料

金沢系1号 (KanS1), 金沢系3号 (KanS3), ウコン末 (CLR), イチジク乳液 (FCLx), ヒナタイノコヅチ *kSara* (AFK), トウガラシチンキ (CAT), アカメガシワチンキ (MJB エタノール抽出物; MJBT)

KanS1 : 2016年調製, KanS3 : 2016年調製

## 第3節 実験方法

### ・細胞添加試料調製

KanS1, KanS3, CLR, FCLx, AFK はそれぞれメタノール抽出物及び水抽出物を CAT, MJBT は溶媒を除去した状態を第1章と同様に細胞添加試料として調製した。

### ・L6細胞の毒性評価

第1章と同様に MTT 法で測定した。但し, 細胞添加試料濃度は金沢系構成薬材の割合を考慮して添加した。すなわち 0.5 mm 金沢系に含まれる薬材から抽出されるメタノール抽出物または水抽

出物を抽出率から算出して添加した。それぞれメタノール抽出物濃度は KanS1 111.2 µg/ml, KanS3 233.9 µg/ml, CLR 7.9 µg/ml, AFK 0.8 µg/ml, FCLx 93.6 µg/ml, CAT 0.48 ng/ml, MJBT 142.9 µg/ml であった。水抽出物濃度は KanS1 115.1 µg/ml, KanS3 130.8%, CLR 13.5 µg/ml, AFK 3.3 µg/ml, FCLx 116.4 µg/ml とした (Table 9)。

・ J774.1 の NO 産生率及び細胞毒性評価

第 1 章と同様に Griess 法で測定した。但し、細胞添加試料濃度は L6 細胞への細胞毒性と同様に金沢糸構成薬材の割合を考慮して添加した。

・ 抗菌活性

ペーパーディスク法を用いて抗菌活性を比較した。KanS1 または KanS3 をメタノールで抽出し、ディスクに 25 mg 添加した。ポジティブコントロールとしてカナマイシン 30 µg/disc を用いた。大腸菌または黄色ブドウ球菌を塗布した培地に試料を含んだディスクを配置し、37°C 好気性下で 19±2 hr 培養した。その後、阻止円の直径を計測した。

Table 9. The amount of each ingredient and extract in 0.5 mm of KanS.

	The amount of dried material (µg)	Methanol extract (µg)	Water extract (µg)
KanS1	564.4	111.2	115.1
KanS3	731.0	233.9	130.8
CLR	119.0	7.9	13.5
AFK	107.1	0.8	3.3
FCLx	238.1	93.6	116.4
CAT	4.8×10 <sup>-4</sup>	4.8×10 <sup>-4a</sup>	-
MJBT	142.9	142.9 <sup>a</sup>	-

a; The extract was prepared by removing solvent in tincture

第 4 節 結果及び考察

(1) L6 細胞の毒性評価

メタノール抽出物の L6 への細胞毒性は KanS1 40.6%, KanS3 95.9%, CLR 14.2%, AFK 5.4%, FCLx 23.4%, CAT 6.7%, MJBT 96.1%, 水抽出物は KanS1 37.1%, KanS3 37.1%, CLR 23.4%, AFK 21.5%, FCLx 50.6%であった (Fig. 16)。KanS1 と KanS3 のメタノール抽出物添加時の細胞毒性を比較すると、KanS3 が KanS1 より有意に細胞毒性が強い結果となった ( $P<0.01$ )。MJB が強い細胞毒性を示していることから、メタノール抽出物における KanS1 と KanS3 の細胞毒性の違いは MJBT の寄与が大きいことが考えられる。また水抽出物については KanS1 と KanS3 で細胞毒性に有意差はなかったものの、メタノール抽出物の方が水抽出物よりも脂溶性が高く、細胞への作用度合いが大きいことが推察される。そのため KanS3 は KanS1 よりも強い組織切断力

を有する可能性が示唆された。

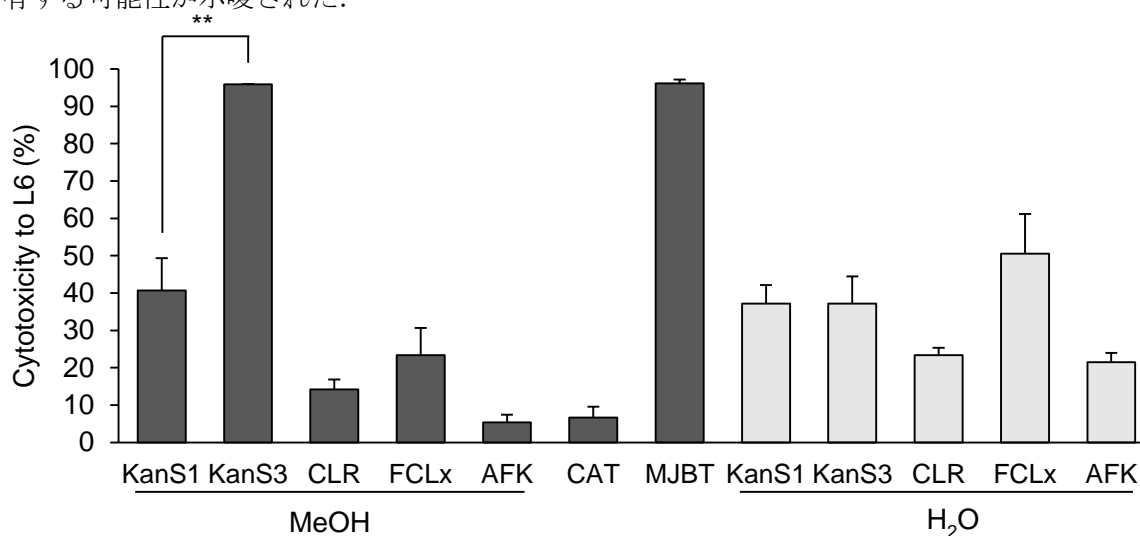


Fig. 16. Effect of KanS1 or KanS3 and its gradients on L6 of cytotoxicity.

L6 cells were incubated with methanol or water extract for 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The final concentration of each extract was the amount of extract in 0.5 mm KanS per milliliter. The cell viability was measured by MTT assay and the cytotoxicity was determined by the rate of death cells. The results are presented as a percentage of the Vehicle. Data were determined by averaging the results from 4 assays (mean ± SE). \*\**P*<0.01, significantly different from KanS1.

## (2) J774.1 の NO 産生率及び細胞毒性評価

LPS(+)でメタノール抽出物添加時の NO 産生量は KanS1 49.2%, KanS3 26.3%, CLR 78.1%, FCLx 88.2%, AFK 97.1%, CAT 101.7%, MJBT 44.5%であった (Fig. 17-A)。水抽出物添加時は, KanS1 44.2%, KanS3 56.8%, CLR 86.3%, FCLx 26.9%, AFK 97.7%であった。L-NMMA は 44.7%を示した。LPS(-)では KanS1 及び FCLx の水抽出物がそれぞれ 20.5%, 36.5%の NO 産生率を示し, その他の試料はどれも NO 産生活性を示さなかった。

KanS3 メタノール抽出物, 水抽出物共に LPS(+)で NO 産生阻害活性を示し, LPS(-)で NO 産生活性を示さなかったことから抗炎症作用が期待される。一方, KanS1 はメタノール抽出物, 水抽出物共に LPS(+)で NO 産生阻害活性を示しているものの, LPS(-)で水抽出物がわずかに NO 産生活性を示していた。この結果から KanS1 よりも KanS3 の方がより NO 産生阻害活性が強く, より強い抗炎症作用が期待される。また MJB は強い NO 産生阻害活性を示していたことから, KanS1 と KanS3 の活性の違いに MJB の寄与が大きいことが示唆された。

メタノール抽出物添加時の細胞毒性は KanS1 20.5%, KanS3 18.5%であり, 構成薬材は MJBT 11.0%, FCLx 10.0%, CLR 8.5%, AFK 4.6%で CAT は毒性を示さなかった (Fig. 17-B)。水抽出物添加時は KanS1 27.8%, KanS3 16.0%, CLR 10.5%, FCLx 27.0%, AFK 0.5%であった。L-NMMA は 7.1%を示した。それぞれの細胞毒性は J774.1 の NO 産生には大きな影響はないと結果であると考えられる。また KanS1 と KanS3 の間にはメタノール, 水抽出物ともに大きな差を示さなかった。

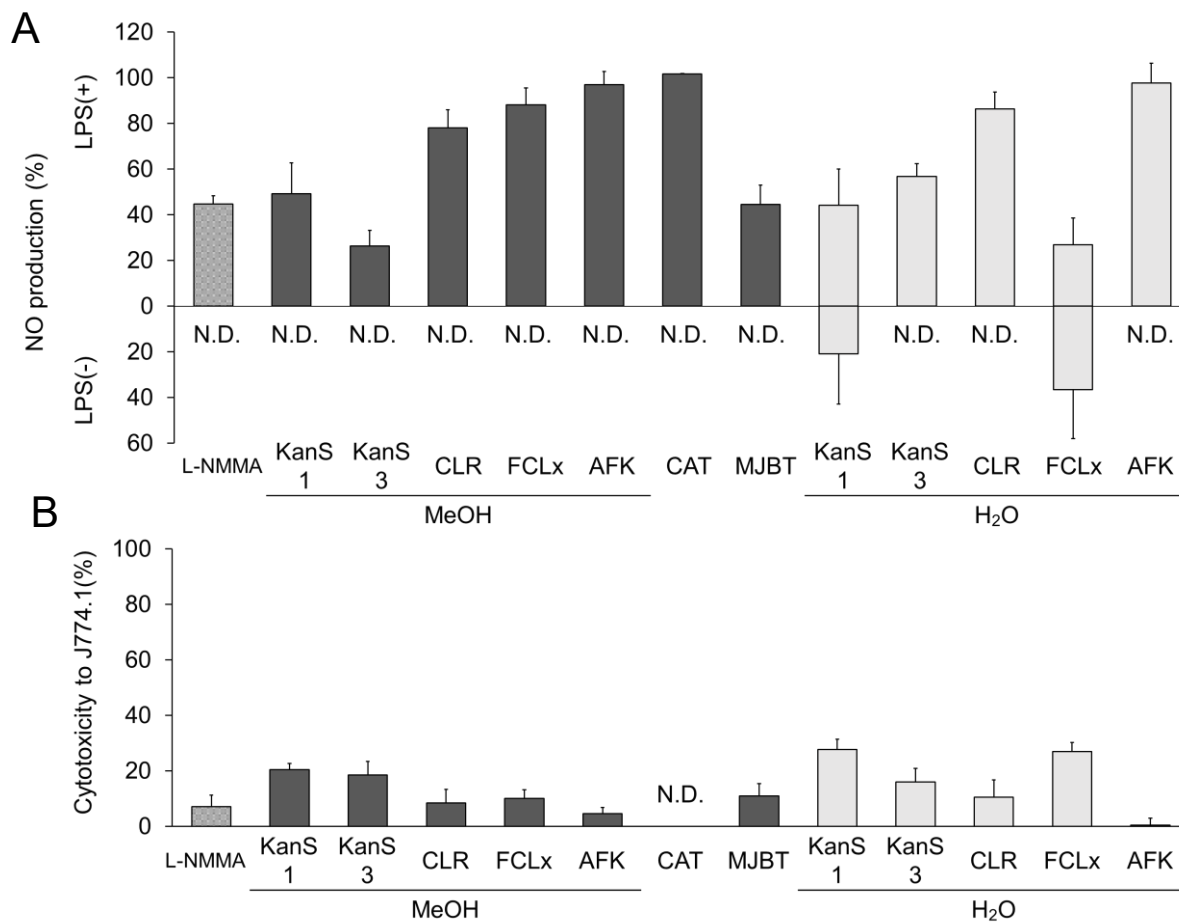


Fig. 17. Effects of KanS and its ingredients on NO production and cytotoxicity of J774.1.

A; J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and methanol or water extract of each sample was added. The final concentration of each extract was the amount of extract in 0.5 mm KanS per milliliter. After incubated for 24 h at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>, NO production was measured by the Greiss assay. The amount of NO produced by J774.1 upon stimulation with LPS was regarded as 100%. L-NMMA was used as a positive control and its final concentration was 100  $\mu\text{M}$  (25  $\mu\text{g/ml}$ ). B; The cell viability was measured by the MTT assay. The cytotoxicity to J774.1 was determined by the rate of death cell.

Data were determined by averaging the results from 4 to 5 assays (mean  $\pm$  SE). N.D. means not detected.

### (3) ペーパーディスク法による抗菌活性比較

KanS1は大腸菌及び黄色ブドウ球菌共に阻止円を形成しなかった (Fig. 18). KanS3は大腸菌に対して5回中3回阻止円を形成し、形成した阻止円の直径平均は7.0 mmであった (Table 10). 黄色ブドウ球菌に対しては15.8 mmの阻止円を形成した. ポジティブコントロールのカナマイシンは大腸菌に対して27.3 mm, 黄色ブドウ球菌に対しては26.6 mmの阻止円を形成した. Brankは大腸菌及び黄色ブドウ球菌共に阻止円を形成しなかった.

ウコンの精油成分やクルクミンは大腸菌, 黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性が報告されていたため<sup>53,54</sup>, KanS1, KanS3ともに大腸菌, 黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示すことが予想さ

れたが、KanS1 はどちらの菌に対しても阻止円を形成しなかった。今回の抽出方法では精油成分を十分に回収できない手法であり、KanS1 や KanS3 のクルクミン含量は活性が報告されている量よりも非常に少ない量のため KanS1 は抗菌活性を示さなかったと考えられる。一方、KanS3 は大腸菌に対して非常に弱いものの抗菌活性を示し、黄色ブドウ球菌に対しても抗菌活性を示していた。痔瘻は細菌感染が原因で発症するため<sup>4,28)</sup>、KanS3 は KanS1 よりも高い治療効果が期待される。

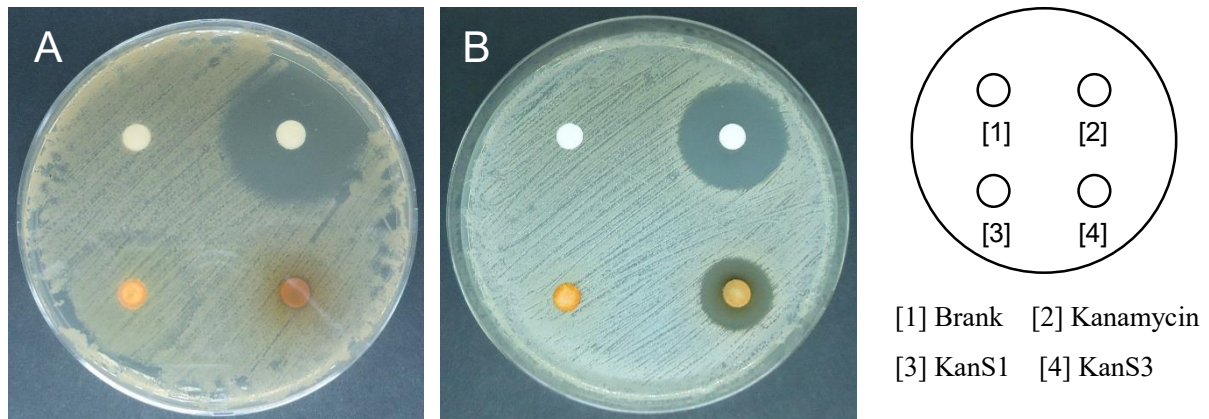


Fig. 18. Antimicrobial activity of KanS1 or KanS3 extracts against *E. coli* or *S. aureus* by the disc diffusion test.

0.5 McFarland of *E. coli* or *S. aureus* was inoculated on Mueller-Hinton agar. The disc that concentration was 25 mg/disc methanol extract of KanS1 or KanS3 was put on the Mueller-Hinton agar. After incubate for  $19 \pm 2$  hr at  $36 \pm 2^\circ\text{C}$ , the dimer of inhibitory zone was measured.

A; *E. coli* ATCC 25922

B; *S. aureus* ATCC 29213

Table 10. Antimicrobial activity of KanS1 or KanS3 extracts against *E. coli* or *S. aureus* by the disc diffusion test.

Sample name	Concentration	Dimer of inhibitory zone (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
KanS1	25 mg/disc	N	N
KanS3	25 mg/disc	$7.0 \pm 0.8^a$ ( $4.2 \pm 1.6^b$ )	$15.8 \pm 0.7$
Kanamycin	30 $\mu\text{g}$ /disc	$27.3 \pm 1.3$	$26.6 \pm 1.3$
Brank	-	N	N

Values are means  $\pm$  SD (n=4 to 5)

N; No inhibitory zone was detected

a; Mean of the result when inhibitory zone was made.

b; Mean of all result



## 第5章 トウダイグサ科植物の起炎活性比較

本章では日本で入手可能なトウダイグサ科植物および金沢大学環日本海域研究センター附属植物園内の温室で管理されているトウダイグサ科植物，10属20種の植物から27検体の試料を調製し，前章と同様にマクロファージ細胞（J774.1）に対する起炎性NOの産生及び細胞毒性を指標にした試験を行った．一部の試料については骨格筋芽細胞に対する細胞毒性評価も行った．

ノウルシ（*Euphorbia adenochlora*）やコニシキソウ（*Chamaesyce maculata*）などのトウダイグサ科植物では枝葉から滲出する乳液に触れると皮膚がかぶれることが知られている<sup>55)</sup>．実際に多くのトウダイグサ科植物には起炎物質が含まれており，特にトウダイグサ属植物には有毒成分のEuphorbolなどのphorbol esterを含有していることが報告されている<sup>56,57)</sup>．本試験で使用したトウダイグサ科植物すべてが炎症を起こすという報告がある訳ではない．しかし，トウダイグサ科植物には含有量は高くなくても炎症を引き起こす化合物が含まれている可能性がある．細胞を使用する本試験系ではそのような検体についても評価できると考えられる．

なお，今回比較したトウダイグサ科植物は一部を除いて市場性は無く，人体への使用経験が乏しいものが多く，発がん性の危険性があるなどの理由から金沢系への使用は断念した．

### 第1節 実験材料

使用したトウダイグサ科植物の採集地（または入手先）をTable 11に示した．10属20種のトウダイグサ科植物から，全草あるいは部位別に調製した計27検体を使用した．

### 第2節 実験方法

細胞添加試料は第1章と同様にメタノール抽出物，水抽出物を調製した．但し，トウゴマ種子（RCSe）のみは実験の安全性を考慮して有毒タンパクとして知られるリシンを不活化するためオートクレーブ後，乾燥させたものを使用した．すべての試料についてJ774.1細胞のNO産生活性をGriess法で測定し，LPS（1 µg/ml）の刺激で産生されたNO量を100%として，NO産生率を算出した．NO産生抑制のポジティブコントロールとしてL-NMMAを最終濃度100 µMで用いた．使用した細胞についてはMTT法で細胞生存率を測定し，細胞生存阻害率を細胞毒性として算出した．

また一部の試料についてはL6細胞の細胞毒性評価も行った．

Table 11. Samples used in this study.

Japanese name	Sample name	Scientific name	Used Part	Location
<i>Enoki-gusa</i> ; エノキグサ	AAW	<i>Acalypha australis</i> L.	Whole plant	Kanazawa Univ.
<i>Konishikiso</i> ; コニシキソウ	CMW	<i>Chamaesyce maculata</i> (L.) Small	Whole plant	Kanazawa Univ.
<i>Onishikiso</i> ; オオニシキソウ	CNW	<i>Chamaesyce nutans</i> (Lag.) Small	Whole plant	Nomi city, Ishikawa Pref.
<i>Nourushi</i> ; ノウルシ	EAW	<i>Euphorbia adenochlora</i> C.Morren et Decne.	Whole plant	Komatsu city, Ishikawa Pref.
<i>Taka-todai</i> ; タカトウダイ	ELW	<i>Euphorbia lasiocaula</i> Boiss.	Whole plant	Nomi city, Ishikawa Pref.
<i>Hama-kirin</i> ; ハナキリン	EMLx	<i>Euphorbia milii</i> Des Moul.	Latex	Greenhouse at Kanazawa Univ.
<i>Hana-kirin</i> ; ハナキリン	EMSt	<i>Euphorbia milii</i> Des Moul.	Stem	Greenhouse at Kanazawa Univ.
<i>Poinsechia</i> ; ポインセチア	EPLf	<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd. ex Klotzsch	Leaf	Market product
<i>Sendai-taigeki</i> ; センダイタイゲキ	ESeW	<i>Euphorbia sendaica</i> Makino	Whole plant	Kanazawa Univ.
<i>Natsu-todai</i> ; ナツトウダイ	ESiW	<i>Euphorbia sieboldiana</i> C.Morren et Decne.	Whole plant	Kaga city, Ishikawa Pref.
<i>Midorisango</i> ; ミドリサンゴ	ETLx	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Latex	Kanazawa Univ.
<i>Midorisango</i> ; ミドリサンゴ	ETSt	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Stem	Kanazawa Univ.
—	EVLf	<i>Euphorbia viguieri</i> Denis	Leaf	Greenhouse at Kanazawa Univ.
—	EVLx	<i>Euphorbia viguieri</i> Denis	Latex	Greenhouse at Kanazawa Univ.
<i>Akamegashiwa</i> ; アカメガシワ	MJLf	<i>Mallotus japonicus</i> (L.f.) Müll.Arg.	Leaf	Kanazawa Univ.
<i>Yama-ai</i> ; ヤマアイ	MLW	<i>Mercurialis leiocarpa</i> Siebold et Zucc.	Whole plant	Kaga city, Ishikawa Pref.
<i>Shiraki</i> ; シラキ	NJBr	<i>Neoshirakia japonica</i> (Siebold et Zucc.) Esser	Branch	Kaga city, Ishikawa Pref.
<i>Shiraki</i> ; シラキ	NJLf	<i>Neoshirakia japonica</i> (Siebold et Zucc.) Esser	Leaf	Kaga city, Ishikawa Pref.
<i>Nagae-mikanso</i> ; ナガエコミカンソウ	PTW	<i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb.	Whole plant	Kanazawa Univ.
<i>Hime-mikanso</i> ; ヒメミカンソウ	PUW	<i>Phyllanthus ussuriensis</i> Rupr. et Maxim.	Whole plant	Kanazawa Univ.
<i>Togoma</i> ; トウゴマ	RCSe	<i>Ricinus communis</i> L.	Seed	Kanazawa Univ.
<i>Nankinhaze</i> ; ナンキンハゼ	TSBr	<i>Triadica sebifera</i> (L.) Small	Branch	Kanazawa city
<i>Nankinhaze</i> ; ナンキンハゼ	TSLf	<i>Triadica sebifera</i> (L.) Small	Leaf	Kanazawa city
<i>Nankinhaze</i> ; ナンキンハゼ	TSSe	<i>Triadica sebifera</i> (L.) Small	Seed	Kanazawa city
<i>Aburagiri</i> ; アブラギリ	VCLf	<i>Vernicia cordata</i> (Thunb.) Airy Shaw	Leaf	Kaga city, Ishikawa Pref.
<i>Shina-aburagiri</i> ; シナアブラギリ	VFLf	<i>Vernicia fordii</i> (Hemsl.) Airy Shaw	Leaf	Kanazawa Univ.
<i>Shina-aburagiri</i> ; シナアブラギリ	VFSe	<i>Vernicia fordii</i> (Hemsl.) Airy Shaw	Seed	Kanazawa Univ.

—; No Japanese name



### 第3節 結果および考察

#### (1) 各抽出物の収率

各トウダイグサ科植物のメタノールでの収率は 5.3-74.0%，水での収率は 6.6-50.4%であった (Table 12)。収率は属による違いは小さく、部位によって異なる傾向を認めた。例えば樹皮や枝の収率はメタノール抽出物、水抽出物共に低く 20%を下回った。また乳液のメタノール抽出物の収率は 60-70%程度、水抽出物はハナキリンの乳液 (EMLx) の 50.4%を除くとほぼ 30%程度であった。これらは植物組織の基本構造が同じであることに起因すると考えられる。乳液は水中に様々な成分が分散しているため、水溶性の物質が多く水抽出物の収率が高くなったと考えられる。また枝は木質化しており、木部の主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンが今回の抽出法では水にもメタノールにもほとんど溶解しないため<sup>58)</sup>、水抽出物、メタノール抽出物ともに収率が低かったと考えられる。

Table 12. Yields of methanol and extracts of samples.

Sample Name	Yield (%)		Sample Name	Yield (%)	
	MeOH	H <sub>2</sub> O		MeOH	H <sub>2</sub> O
AAW	23.0	26.6	MJLf	24.4	27.3
CMW	18.3	23.8	MLW	17.7	34.0
CNW	32.3	35.8	NJBr	5.3	8.0
EAW	19.7	10.7	NJLf	21.9	31.2
ELW	22.3	29.3	PTW	28.1	31.8
EMLx	63.7	50.4	PUW	24.6	20.7
EMSt	11.2	6.6	RCSe	41.4	11.9
EPLf	27.1	28.8	TSEBr	8.6	11.3
ESeW	43.1	48.1	TSLf	42.3	44.6
ESiW	19.8	37.1	TSSe	22.5	10.1
ETLx	74.0	34.9	VCLf	22.5	11.8
ETSt	25.3	34.9	VFLf	26.4	29.7
EVLf	24.2	38.9	VFSe	9.7	8.3
EVLx	57.9	31.3			

## (2) J774.1 の NO 産生率及び細胞毒性評価

メタノール抽出物の細胞毒性は 0-34.7 %, LPS(+)での NO 産生率は 6.5-78.4%, LPS(-)での NO 産生率は 1.2-12.4%であった (Fig. 19, Table 13). 水抽出物の細胞毒性は 0-71.9%, LPS(+)での NO 産生率は 8.8-86.3%, LPS(-)での NO 産生率は 2.3-166.2%であった (Fig. 20, Table 13). L-NMMA は細胞毒性を示さず, LPS(+)での NO 産生率は 38.0%, LPS(-)での NO 産生率は 1.1%であった. メタノール抽出物では NJB (34.7%), EPLf (31.6%), VFLf (31.5%) の順で細胞毒性が強く, その他は 30%以下であった. PTW, MLW, TSLf の 3 検体は細胞生存率が 100%を越え細胞毒性を示さなかった. 水抽出物では, EVLx (71.9%), RCSe (46.1%), EMLx (44.4%), NJBr (41.3%) の順で細胞毒性が高く, その他は 40%以下であった. TSLf, ESiW の 2 検体は細胞生存率が 100%を越え細胞毒性を示さなかった.

炎症は病原体や外傷, 化学物質, 熱などの組織障害を受けた組織から多くの物質が放出され, 障害を受けていない周囲の組織に劇的な二次的変化をもたらす組織変化のことである<sup>26)</sup>. つまり今回の活性測定で炎症作用を起こすと予測される活性は, ①細胞毒性を示していたもの, ②LPS(-)での NO 産生活性を示していたものである.

今回の試料で①の活性を最も強く示していたものは *Euphorbia viguieri* 乳液 (EVLx) 水抽出物 (細胞毒性 71.9%) であった. 他に, 細胞毒性が 40%以上であったのは 4 検体 (EVLx, RCSe, EMLx, NJBr) で, これらは細胞毒性により起炎作用を現す可能性が示唆された.

②について全ての検体でメタノール抽出物には強い NO 産生活性を認めなかった. 一方, 水抽出物については多くの検体で NO 産生活性を認めた. NO 産生率が 60%以上の検体は 6 種類 (RCSe, TSSe, VFSe, VCLf, ENSt, CMW) で, これらは NO 産生率により起炎作用を現す可能性が示唆された. 炎症性 NO の誘導物質である LPS は水溶性のリポ多糖であることから, これらの検体には同様のリポ多糖類が含まれている可能性があり, それが起炎作用の一因として考えられる.

## (3) L6 細胞の毒性評価

L6 細胞毒性は 6 種のトウダイグサ科植物由来検体について試験を行った. すなわちコニシキソウ全草 (CMW), センダイタイゲキ全草 (ESeW), アカメガシワ葉 (MJLf), トウゴマ (RCSe), ナンキンハゼ種子 (TSSe), シナアブラギリ (VFSe) について試験した.

メタノール抽出物について細胞毒性が高い順に ESeW 59.1%, MJLf 28.7%, CMW 18.7%, VFSe 9.8%, RCSe 8.4%, TSSe 1.7%であった (Fig. 21). 水抽出物については, RCSe 74.1%, CMW 29.1%, VFSe 26.7%, MJL 22.0%, TSSe 10.3%, ESeW 8.4%であった.

今回比較した試料の中でメタノール抽出物では ESeW, 水抽出物では RCSe の細胞毒性が最も強く, 切断力の増強および, 炎症作用を現す可能性が示された.

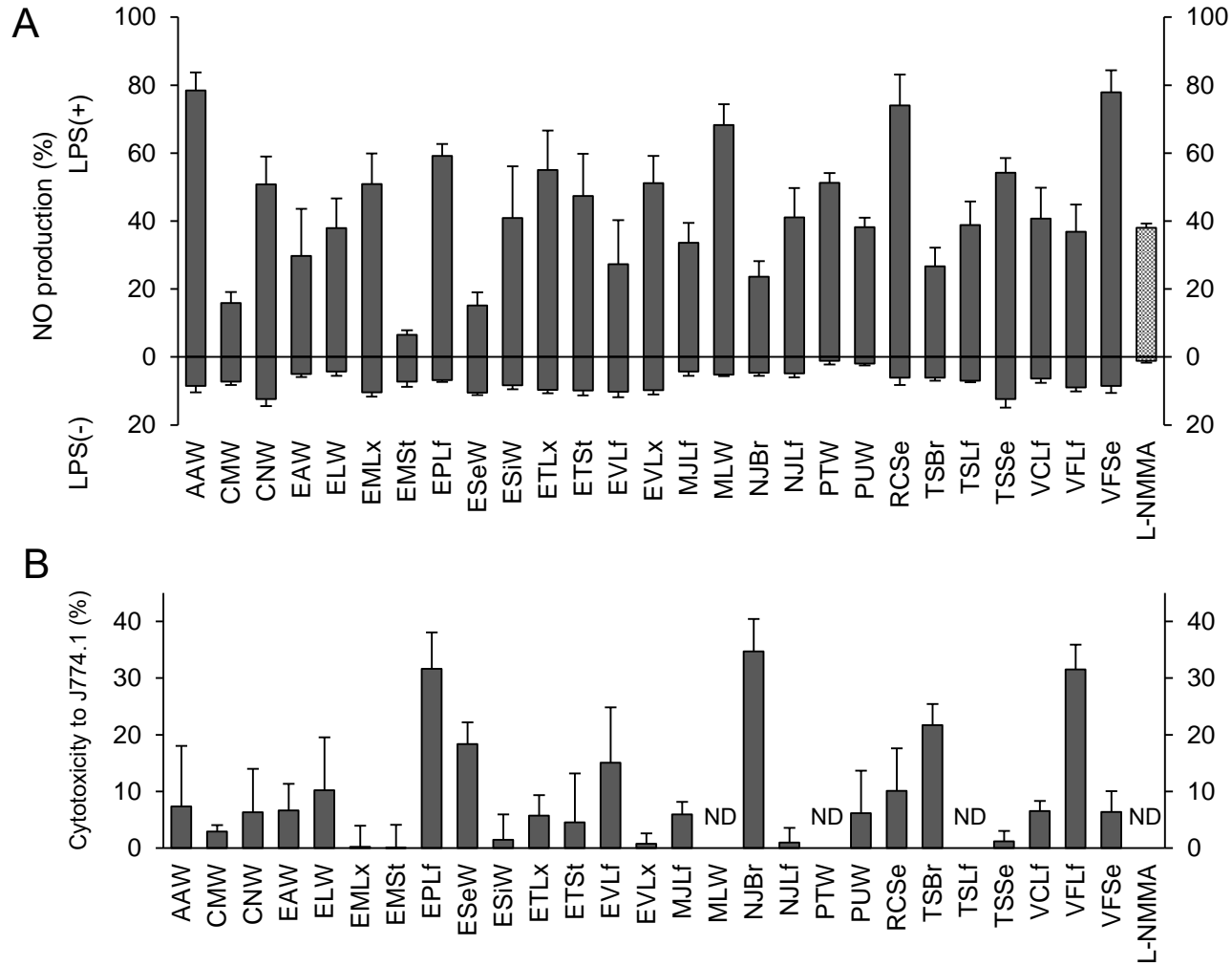


Fig. 19. Effects of methanol extract of *Euphorbiaceae* plants on NO production and cytotoxicity of J774.1.

A; J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  methanol extract of each sample was added. After incubated for 24 h at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>, NO production was measured by the Greiss assay. The amount of NO produced by J774.1 upon stimulation with LPS was regarded as 100%. B; The cell viability was measured by the MTT assay. The cytotoxicity to J774.1 was determined by the rate of death cell.

Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean  $\pm$  SE). ND means not detected.

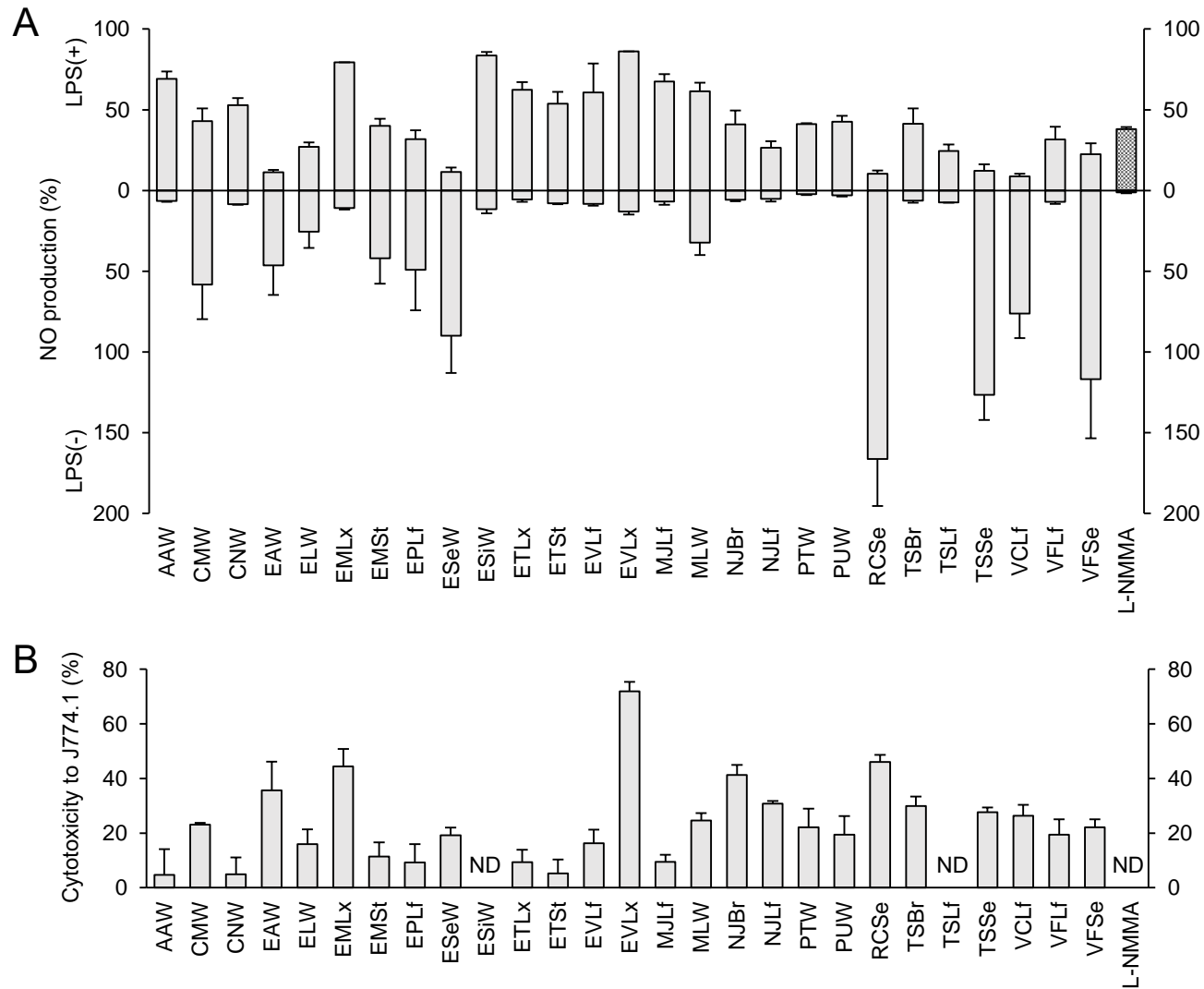


Fig. 20. Effects of water extract of *Euphorbiaceae* plants on NO production and cell viability of J774.1.

A; J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  water extract of each sample was added. After incubated for 24 h at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>, NO production was measured by the Greiss assay. The amount of NO produced by J774.1 upon stimulation with LPS was regarded as 100%. B; The cell viability was measured by the MTT assay. The cytotoxicity to J774.1 was determined by the rate of death cell.

Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean  $\pm$  SE). ND means not detected.

Table 13. Effects of *Euphorbiaceae* plants on NO production and cell viability of J774.1.

Methanol extract		AAW	CMW	CNW	EAW	ELW	EMLx	EMSt	EPLf	ESeW	
NO production (%)	LPS(+)	78.4±5.3	15.8±3.3	50.8±8.3	29.7±13.9	37.9±8.7	50.8±9.1	6.5±1.4	59.2±3.5	15.2±3.9	
	LPS(-)	8.5±1.9	7.3±1.0	12.3±2.1	5.0±0.9	4.3±1.3	10.4±1.2	7.2±1.6	6.8±0.5	10.5±0.7	
Cytotoxicity (%)		7.4±10.6	2.9±1.2	6.3±7.7	6.6±4.7	10.2±9.3	0.2±3.7	0.1±4.0	31.6±6.5	18.4±3.8	
Methanol extract		ESiW	ETLx	ETSt	EVLf	EVLx	MJLf	MLW	NJBr	NJLf	
NO production (%)	LPS(+)	40.9±15.2	55.0±11.6	47.4±12.4	27.3±12.9	51.2±8.0	33.6±5.8	68.2±6.1	23.6±4.6	41.1±8.6	
	LPS(-)	8.4±1.2	9.7±1.0	9.9±1.4	10.2±1.7	9.8±1.2	4.3±1.3	5.2±0.5	4.6±0.9	4.8±1.2	
Cytotoxicity (%)		1.5±4.4	5.8±3.6	4.5±8.6	15.1±9.8	0.8±1.8	6.0±2.2	N.D.	34.7±5.7	1.0±2.6	
Methanol extract		PTW	PUW	RCS <sub>e</sub>	TSBr	TSLf	TSS <sub>e</sub>	VCLf	VFLf	VFSe	L-NMMA
NO production (%)	LPS(+)	51.2±2.9	38.2±2.8	74.0±9.0	26.6±5.6	38.8±7.0	54.2±4.4	40.7±9.2	36.8±8.0	77.9±6.4	38.0±1.3
	LPS(-)	1.2±1.1	2.0±0.5	6.1±2.1	6.1±0.9	7.0±0.4	12.4±2.5	6.3±1.3	9.0±1.1	8.6±2.1	1.1±0.6
Cytotoxicity (%)		N.D.	6.2±7.5	10.1±7.5	21.7±3.7	N.D.	1.2±1.9	6.5±1.8	31.5±4.4	6.4±3.7	N.D.

Water extract		AAW	CMW	CNW	EAW	ELW	EMLx	EMSt	EPLf	ESeW
NO production (%)	LPS(+)	69.2±4.5	43.1±7.8	52.9±4.5	11.4±1.5	27.1±2.7	79.5±0.0	40.1±4.3	31.9±5.5	11.5±2.8
	LPS(-)	6.4±0.6	58.3±21.4	8.4±0.4	46.3±18.4	25.5±10.1	10.8±1.0	42.0±15.7	49.1±25.2	89.9±23.1
Cytotoxicity (%)		4.7±9.5	23.2±0.6	4.9±6.2	35.7±10.5	16.0±5.4	44.4±6.4	11.4±5.2	9.3±6.7	19.2±2.8
Water extract		ESiW	ETLx	ETSt	EVLf	EVLx	MJLf	MLW	NJBr	NJLf
NO production (%)	LPS(+)	83.6±2.2	62.4±4.7	53.7±7.3	60.7±17.9	86.3±0.0	67.5±4.5	61.4±5.4	40.9±8.7	26.6±4.0
	LPS(-)	11.6±2.4	5.6±1.4	8.0±0.4	8.3±1.1	13.1±1.7	6.8±2.0	32.2±7.8	5.7±0.9	5.2±1.6
Cytotoxicity (%)		N.D.	9.4±4.5	5.2±5.1	16.2±5.0	71.9±3.5	9.5±2.5	24.6±2.8	41.3±3.7	30.7±1.0
Water extract		PTW	PUW	RCS <sub>e</sub>	TSBr	TSLf	TSS <sub>e</sub>	VCLf	VFLf	VFSe
NO production (%)	LPS(+)	41.1±0.6	42.6±3.7	10.4±2.0	41.4±9.5	24.6±4.0	12.3±4.0	8.8±1.6	31.7±7.8	22.4±6.9
	LPS(-)	2.3±0.5	3.0±0.6	166.2±29.1	6.2±1.3	7.3±0.3	126.5±15.7	76.3±15.1	7.0±1.2	116.9±36.5
Cytotoxicity (%)		22.1±6.9	19.4±6.8	46.1±2.6	29.9±3.4	N.D.	27.6±1.7	26.4±4.0	19.5±5.6	22.1±3.0

N.D. means not detected.

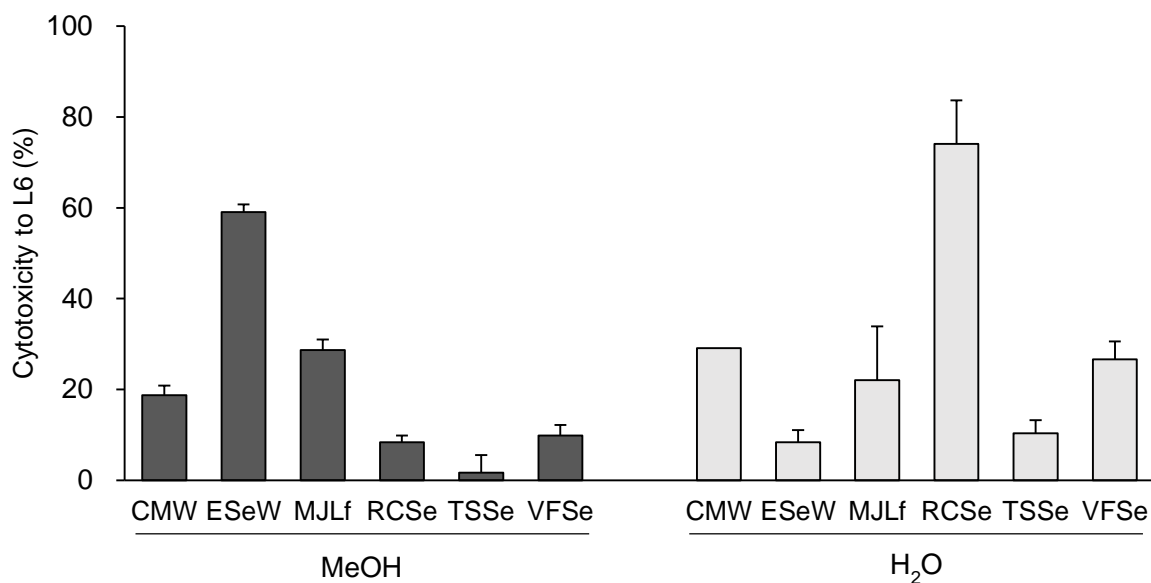


Fig. 21. Effects of *Euphorbiaceae* plants on L6 cytotoxicity

L6 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with methanol or water extracts of *Euphorbiaceae* plants for 48 h. The final concentration of each extract was 100  $\mu\text{g/ml}$ . The cytotoxicity L6 was determined by the rate of death cell. Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean  $\pm$  SE).

## 第6章 金沢系に使用するウコンについて

アーユルヴェーダには身土不二、すなわち「住んでいる土地と身体は切り離せない」という思想があり、住む環境、季節によって食べ物を変えることが言及されている<sup>25-b, 59, 60</sup>。現在、臨床提供している金沢系1号には安価で入手しやすいためインド産のウコンを使用している。しかし日本人の体質には日本産の生薬を用いる方が適していると考えられる。そこで本章ではインド産ウコンの代わりとなりうる国産ウコン、黄連、黄柏、紫根、当帰について検討した。

黄連、黄柏は共にベルベリンを含有し殺菌作用、消炎作用があるとされている<sup>61-a, 62-a, 63-a</sup>。また紫根、当帰は火傷や切り傷、痔などに外用される紫雲膏に配合される生薬で、紫根は抗炎症作用や肉芽促進作用などがあり、当帰は補血、鎮痛作用がある<sup>61-b, 62-b, 63-b, 64</sup>。これらの生薬の生物活性試験を行った。

### 第1節 実験材料

本章で使用した生薬は Table 14 に詳細を示した。

Table 14. Samples used in this study

Sample name	Japanese name	Scientific name	Used part	Production areas
CLR-I	Ukon; 鬱金	<i>Curcuma longa</i> L.	Rhizome	India
CLR-J	Ukon; 鬱金	<i>Curcuma longa</i> L.	Rhizome	Japan, Okinawa Pref.
CJR	Oren; 黄連	<i>Coptis japonica</i> Makino	Rhizome	Japan, Fukui Pref.
PAB	Obaku; 黄柏	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	Bark	Japan
LER	Shikon; 紫根	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	Root	China*
AAR	Toki; 当帰	<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	Root	Japan

\*国産の紫根が入手できなかったため参考値として、中国産の紫根を用いた。

## 第2節 実験方法

CLR-I 及び CLR-J は HPLC 法でクルクミン含量を定量した。

細胞添加試料は 1 章と同様に検体を粉砕機で粉砕後、メタノールまたは水で抽出して調製した。

第 1 章と同様に L6 細胞に対する細胞毒性, J774.1 に対する NO 産生率測定を行った。

## 第3節 結果及び考察

### (1) クルクミン含量

クルクミン含量は CLR-I 8.9 mg/g, CLR-J 4.4 mg/g であった。

### (2) 各抽出物の収率

メタノール抽出物の収率は CLR-I 3.9%, CLR-J 6.0%, CJR 17.4%, PAB 26.3%, LER 52.5%, AAR 42.4%, 水抽出物の収率は CLR-I 12.5%, CLR-J 18.6%, CJR 16.3%, PAB 21.6%, LER 51.1%, AAR 47.6%であった (Table 15)。

Table 15. Yields of water and methanol extracts of herbal medicines

Sample name	Methanol extract (%)	Water extract (%)
CLR-I	3.9	12.5
CLR-J	6.0	18.6
CJR	17.4	16.3
PAB	26.3	21.6
LER	52.5	51.1
AAR	42.4	47.6



### (3) L6 細胞の毒性評価

各検体のメタノール抽出物の L6 への細胞毒性は、高い順に CLR-J 70.9%, CLR-I 42.9%, CJR 25.3%, PAB 24.2%, AAR 0.2%, LER は細胞毒性を示さなかった (Fig. 22).

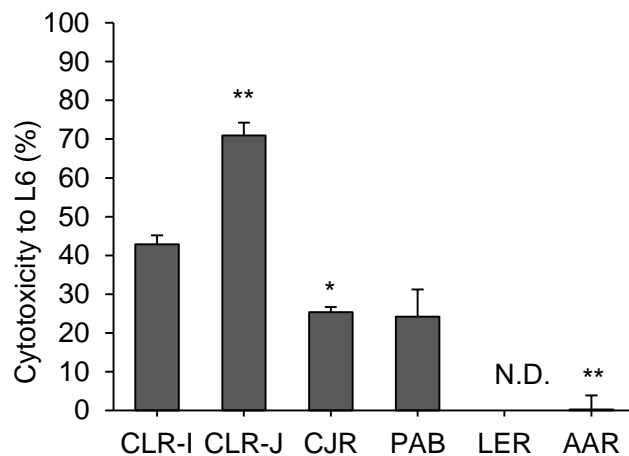


Fig. 22. Effect of methanol extract of herbal medicines on L6 of cytotoxicity.

L6 cell viability was measured by the MTT assay after incubation with methanol extract of herbal medicines for 48 h. The final concentration of each extract was 100 µg/ml. The cytotoxicity L6 was determined by the rate of death cell. Data were determined by averaging the results from 3 to 4 assays (mean ± SE). N.D. means not detected.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from CLR-I.

### (4) J774.1 の NO 産生率及び細胞生存率

LPS(+)でのメタノール抽出物添加時の NO 産生率は CLR-J 1.5%, CLR-I 1.7%, CJR 32.9%, PAB 37.4%, AAR 76.5%で、CLR-I, CLR-J 間では有意差はなく、CJR, PAB, AAR の NO 産生率は CLR-I と比して有意に高かった (Fig. 23-A). また LPS(+)での水抽出物による NO 産生率の結果は CJR 33.8%, PAB 41.5%, CLR-I 48.4%, CLR-J 32.6%, AAR 77.6%, LER 85.1%であった. 一方, LPS(-)での NO 産生率の結果はメタノール抽出物では CLR-J 1.9%, CLR-I 4.0%, LER 5.2%で CJR, PAB, AAR は NO 産生活性を示さず, 水抽出物では CJR 1.4%, LER 2.6%で CLR-I, CLR-J, PAB, AAR は NO 産生活性を示さなかった.

それぞれの細胞毒性はメタノール抽出添加時で CLR-J 41.0%, PAB 29.0%, CJR 23.6%, CLR-I 20.5%, AAR 0.6%, LER は毒性を示さなかった (Fig. 23-B). 水抽出物添加では CJR 45.3%, PAB 32.0%, CLR-I 14.0%, LER 11.2%, AAR 3.1%, CLR-J は細胞毒性を示さなかった.

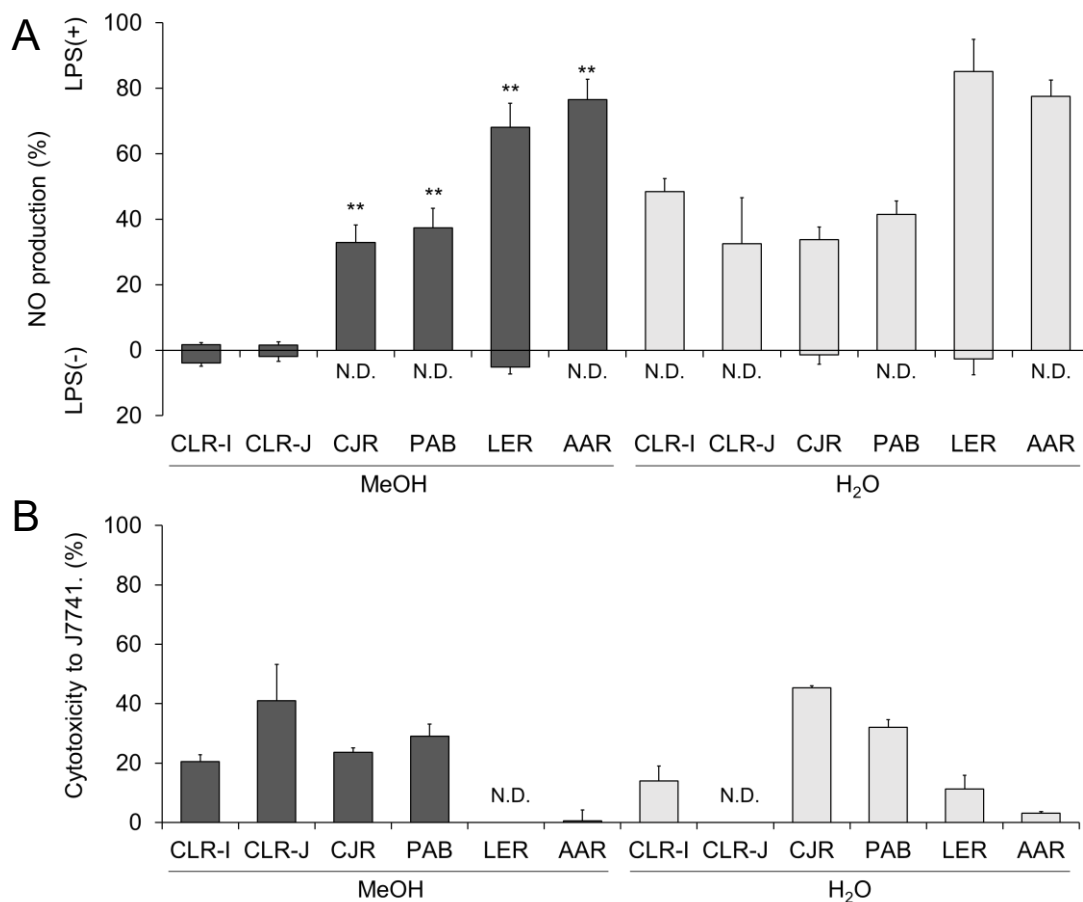


Fig. 23. Effects of methanol and water extract of herbal medicines on NO production and cytotoxicity of J774.1.

A; J774.1 was stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS and 100  $\mu\text{g/ml}$  of methanol or water extract of each sample was added. After incubated for 24 h at 37°C and 5%CO<sub>2</sub>, NO production was measured by the Greiss assay. The amount of NO produced by J774.1 upon stimulation with LPS was regarded as 100%. B; The cell viability was measured by the MTT assay. The cytotoxicity to J774.1 was determined by the rate of death cell.

Data were determined by averaging the results from 4 to 5 assays (mean  $\pm$  SE). N.D. means not detected.

\*\* $P < 0.01$ , significantly different from CLR-I.

## (5) 考察

インド産ウコン (CLR-I) と国産ウコン (CLR-J) を比較すると CLR-J の方が L6 への細胞毒性が有意に高く ( $P<0.01$ ), J774.1 の NO 産生阻害活性は CLR-I 及び CLR-J のメタノール抽出物, 水抽出物共に同等程度の活性を示していた. この結果から日本産ウコンを使用すると同程度もしくはそれ以上の薬効が期待できる. CLR-I のクルクミン含量は CLR-J の約 2 倍であった. メタノール抽出物の収率は CLR-I (3.9%) は CLR-J (6%) の約 2/3 倍である. そのため細胞添加試料中には CLR-I により多くのクルクミンが含有されている. L6 への細胞毒性の差はクルクミン以外の他の成分が影響していると考えられるため, ウコン選定にはクルクミン以外の指標が必要であると考えられる.

紫根 (LER), 当帰 (AAR) は L6 への細胞毒性を示さず, メタノール抽出物, 水抽出物共に LPS(+)での NO 産生阻害作用も LPS(-)での NO 産生作用も示さなかった. そのため, LER, AAR を用いた金沢系は切断力が劣ると推測されるため, ウコンの代替としてふさわしくないと考えられる.

黄連 (CJR), 黄柏 (PAB) は L6 に対してやや細胞毒性を示していたが, CJR の細胞毒性は CLR-I よりも有意に低く ( $P<0.01$ ), PAB も有意差はないものの CLR-I より細胞毒性は低い値を示していた. メタノール抽出物及び水抽出物も J774.1 の NO 産生阻害活性を示していたが, メタノール抽出物では NO 産生率が CLR-I より有意に高かった ( $P<0.05$ ). そのためウコンを黄連, 黄柏に代替した場合, 抗炎症作用が減弱する可能性がある.

以上の結果から, 今回検討した生薬の中で, インド産ウコンの代わりとして一番適するものは国産のウコンである. ただし, 今回使用したウコンは 1 品種ずつであり, ウコンは産地によって品質が大きく異なるため<sup>65, 66, 67</sup>, 新たなウコン選定の場合には活性比較や品質評価を行うことが必要であると考えられる.

## 総括

- I. 金沢系 1 号はインド産 KS およびスリランカ産 KS より骨格筋芽細胞への細胞毒性が弱いことを明らかにした。金沢系 1 号の構成薬材で骨格筋芽細胞へ毒性を示すものはウコンのみである一方で、インド産 KS, スリランカ産 KS に使用される *snuhl* (*Euphorbia neriifolia*) 乳液も細胞毒性を示していた。そのため *Euphorbia neriifolia* の乳液が有する細胞毒性が金沢系 1 号, インド産 KS, スリランカ産 KS との細胞毒性の差であると考えられる。細胞毒性の差は金沢系 1 号の組織切断力がインド産 KS やスリランカ産 KS に劣る一つの原因であると推察された。金沢系 1 号はインド産 KS よりも刺激が少ない印象があると報告されており<sup>68)</sup>, *snuhl* を用いた KS は痛みが強いため *snuhl* を用いない KS の検討もされている<sup>41-b)</sup>。本研究の結果より *snuhl* による疼痛の一因は細胞毒性である可能性が推察された。
- II. 炎症作用の指標として用いた NO 産生活性についてインド産 KS, スリランカ産 KS に使用されている *E. neriifolia*, インド産 KS に塗り重ねると切断力がわずかに向上する甘草の水抽出物は共に NO 産生活性を示していた。*snuhl* の原植物である *E. neriifolia* や *E. antiquorum* には起炎作用の報告がされており, NO 産生活性もその起炎作用の一端を担っている可能性が示された。一方, 起炎作用を期待して金沢系 1 号に使用されているトウガラシチンキや他の金沢系 1 号の構成薬材は NO 産生活性を示すものはなかった。トウガラシは感覚神経上の受容体 TRPV1 に直接作用することで血流増加などの炎症反応をおこし<sup>48,49)</sup>, *snuhl* の起炎作用は免疫系を介したものであることが推測される<sup>69,70)</sup>。両者の違いの影響も切断力の違いに現れた可能性が考えられる。
- III. 金沢系 1 号に使用するイチジク乳液は通年の入手が困難であり, 金沢系 1 号の調製を制限するためイチジク乳液を使用しない金沢系 2 号を開発した。臨床使用した結果, 金沢系 2 号の 1 回の交換で切れる糸の長さは 1 号と同程度であり, 金沢系 1 号と大差はない結果であった。しかし糸交換時の滑りが悪く操作性の悪さが指摘されたため, 金沢系にイチジク乳液が必要であることが明らかとなった。操作性の悪さの原因としてイチジク乳液使用による糸の強度増加, 摩擦力の軽減などが考えられる。これらを改良する方法としてイチジク乳液の代わりに他の植物の乳液や樹液, 軟膏材の使用などが考えられるが, それらの検討は今後の課題である。
- IV. アカメガシワは骨格筋芽細胞への細胞毒性, マクロファージ様細胞の NO 産生活性を示していたため, 金沢系 1 号の組織切断力を改善するために有望であることを見出した。トウガラシチンキをアカメガシワエキスに代えた金沢系 3 号は骨格筋芽細胞への細胞毒性の増強, マクロファージ様細胞の NO 産生阻害作用の増強, 大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性が示され, 金沢系 1 号よりも薬効が優れていると推測される。さらに, アカメガシワはタンニンを含み<sup>13-b,14-b,63-c)</sup>, タンニンは収斂作用があるため<sup>73)</sup>, 創傷治癒作用が向上する可能性も考えられる。

- V. 金沢系 1 号に使用しているインド産ウコンをアーユルヴェーダの身土不二の理念に基づき日本産生薬への代替を検討した。日本産ウコン，黄連，黄柏，紫根，当帰で検討を行い，骨格筋芽細胞への細胞毒性，マクロファージ様細胞の NO 産生活性を指標とすると日本産ウコンがインド産ウコンと同等もしくはそれ以上の薬効が期待できると考えられた。アーユルヴェーダにはトリドーシャ理論があり体質別に薬を使用する考え方がある<sup>71, 72)</sup>。金沢系も今後体質別で使い分けができるようウコンだけでなく他の生薬の使用の検討も必要であると考え。今回の他の生薬の結果はそれらを検討するための有意なデータとなったと考える。

以上，本研究では今まで臨床データ以外に評価法がなかった KS に対する *in vitro* の評価系を確立することに成功した。その結果，金沢系 1 号の活性を明らかにするとともに，金沢系 1 号を改良した金沢系 2 号及び金沢系 3 号を開発し，金沢系 3 号は金沢系 1 号よりも薬効が優れている可能性を見いだした。インド産 KS，スリランカ産 KS を含め *kSara sUtra* の *in vitro* 試験の報告はこれまでに例がなく，本研究は培養細胞を用いて *kSara sUtra* を評価した初めての報告である。

## 実験の部

### 実験材料

#### (1) ヒナタイノコヅチ *kSAra* の調製

ヒナタイノコヅチ *kSAra* は御影らの報告に準じて調製した<sup>10)</sup>。ヒナタイノコヅチ全草（金沢市内自生）を採集後、自然乾燥し長さ 2-3cm に刻んだ。素焼きの蓋付容器に入れ実験室用電気炉（林電工株式会社, NEW-1 型）で 800°C まで加温し、以後 800-840°C を 45 分保持して灰化した。灰化物中から大きな固形物を除去し乳鉢乳棒を用いて粉碎後、篩過し（東京スクリーン株式会社, JIS Z 8801, 目開き 150 μm）粒径を揃えた。約 6 倍量の蒸留水に懸濁させた後、静置し上澄み液をろ過後、さらに約 6 倍量の蒸留水で懸濁させ、ろ過後、定温乾燥器（Yamato, DV41）によって乾燥しヒナタイノコヅチ *kSAra* を得た。

#### (2) イチジク乳液の採集

イチジク乳液は石川県内で栽培されるイチジクの未熟果実及び成熟果実を基部で切り取り、切り口から滲出する乳液を集めた（Fig. 24-1, 24-2）。

#### (3) 金沢糸の調製

金沢糸の調製に使用した薬材の詳細は Table 17 に示した。

##### ・金沢糸 1 号

金沢糸 1 号は吉光らの報告に順じて一部改変を行い調製した<sup>8,9)</sup>。高吸水性糸（カネボウ株式会社試作製品）を 46 cm×32 cm（自製）木枠に等間隔で 9 本糸を張り、10%トウガラシチンキ水溶液を 0.2 ml/本 塗布し乾燥させた。1 枠、9 本あたりヒナタイノコヅチ *kSAra* 0.90 g とイチジク乳液 3 ml を混合して全量を塗布して乾燥させたあと、再度 10%トウガラシチンキ水溶液を 0.2 ml/本 塗布し乾燥させた。イチジク乳液を塗布しウコン粉末を付着させ乾燥した。

##### ・金沢糸 2 号

高吸水性糸 50 cm に切断し、10%トウガラシチンキ水溶液を 0.20 ml/本 塗布し乾燥させた。再度 10%トウガラシチンキ水溶液を 0.20 ml/本 塗布し乾燥させた。0.60 g/ml ヒナタイノコヅチ *kSAra* 水懸濁液を 0.20 ml 塗布して乾燥させたあと、ウコンメタノール抽出物（0.30 g/ml）を 0.20 ml、6 回塗布した。

##### ・金沢糸 3 号

アガメガシワはエタノール抽出し、減圧下で溶媒を除去した。得られた抽出物を水に再溶解させ 300 mg/ml とした。高吸水性糸を 46 cm×32 cm 木枠に等間隔で 9 本糸を張り、アカメガシワエキス（300 mg/ml）を 0.20 ml/本 塗布し乾燥させた。1 枠、9 本あたりヒナタイノコヅチ *kSAra* 0.90 g とイチジク乳液 3 ml を混合して全量を塗布して乾燥させたあと、再度アカメガシワエキス（300 mg/ml）を 0.20 ml/本 塗布し乾燥させた。イチジク乳液を塗布しウコン粉末を付着させ乾燥した。



Fig. 24-1. Collecting of fig latex



Fig. 24-2. Collecting of fig latex

Table 16. Samples used in this study

<i>kSara sUtra</i>	Sample name	Voucher no.
Indian <i>kSara sUtra</i>	IKS-1	KANP9709-I008
Indian <i>kSara sUtra</i>	IKS-2	KANP9709-I002
Sri Lankan <i>kSara sUtra</i>	SKS	KANP9709-S001

Table 17. Samples used in this study

Japanese name	Sample name	Scientific name	Part used	Production areas	Company, Lot.	Voucher no.
<i>Ukon</i> 鬱金	CLR or CLR-I	<i>Curcuma longa</i> L.	Rhizome	India	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. VQFMQ	KANP9697
<i>Hinata-inokoduchi</i> ; ヒナタイノコヅチ	AFK	<i>Achyranthes fauriei</i> H.Lév. & Vaniot.	Whole plant	Japan, Ishikawa Pref.		KANP9699
<i>Ichijiku</i> イチジク	FCLx	<i>Ficus carica</i> L.	Latex	Japan, Ishikawa Pref.		
<i>Togarashi</i> トウガラシ	CAT	<i>Capsicum annuum</i> L.	Tincture of fruit		Fudimi-Seiyakusho Ltd. Lot. 007RMR, 500ml	
<i>Ukon</i> 鬱金	CLR-J	<i>Curcuma longa</i> L.	Rhizome	Japan, Okinawa Pref.	Tochimoto Tenkaido Co., Ltd. Lot. 140225	KANP9418
<i>Oren</i> 黄連	CJR	<i>Coptis japonica</i> Makino	Rhizome	Japan, Fukui Pref.	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. ZA22716	KANP9248
<i>Obaku</i> 黄柏	PAB	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	Bark	Japan	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. 9291008	KANP9410
<i>Shikon</i> 紫根	LER	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	Root	China	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. 91S0215	KANP9415
<i>Toki</i> 当帰	AAR	<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	Root	Japan	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. 7BC1169	KANP9412
<i>Kanzo</i> 甘草	GUR	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	Root and Stolon	China	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. 88T1057	KANP9414
<i>Akamegashiwa</i> 赤芽柏	MJB	<i>Mallotus japonicus</i> Mueller Argoviensis	Bark	Japan, Shikoku District	Uchida Wakanyaku Ltd. Lot. DBH3035	KANP9700
<i>Kirinkaku</i> 麒麟角	ENSt	<i>Euphorbia neriifolia</i> L.	Stem	Greenhouse at Kanazawa Univ.	-	KANP9701
<i>Kirinkaku</i> 麒麟角	ENLx	<i>Euphorbia neriifolia</i> L.	Latex	Greenhouse at Kanazawa Univ.	-	KANP9701



Table 18. Samples used in this study at Chapter 5.

Japanese name	Sample name	Scientific name	Used Part	Location	Voucher no.	Collection date
<i>Enoki-gusa</i> ; エノキグサ	AAW	<i>Acalypha australis</i> L.	Whole plant	Kanazawa Univ.	KANP-TY-Eup1	Jul. 2016
<i>Konishikiso</i> ; コニシキソウ	CMW	<i>Chamaesyce maculata</i> (L.) Small	Whole plant	Kanazawa Univ.	KANP9704	Oct. 2013
<i>Onishikiso</i> ; オオニシキソウ	CNW	<i>Chamaesyce nutans</i> (Lag.) Small	Whole plant	Nomi city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup2	Jun. 2016
<i>Nourushi</i> ; ノウルシ	EAW	<i>Euphorbia adenochlora</i> C.Morren et Decne.	Whole plant	Komatsu city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup3	Jun. 2016
<i>Taka-todai</i> ; タカトウダイ	ELW	<i>Euphorbia lasiocaula</i> Boiss.	Whole plant	Nomi city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup4	Jun. 2016
<i>Hama-kirin</i> ; ハナキリン	EMLx	<i>Euphorbia milii</i> Des Moul.	Latex	Greenhouse at Kanazawa Univ.	KANP9702	Jun. 2016
<i>Hana-kirin</i> ; ハナキリン	EMSt	<i>Euphorbia milii</i> Des Moul.	Stem	Greenhouse at Kanazawa Univ.	KANP9702	Jun. 2016
<i>Poinsechia</i> ; ポインセチア	EPLf	<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd. ex Klotzsch	Leaf		KANP-TY-Eup5	Sep. 2016
<i>Sendai-taigeki</i> ; センダイタイゲキ	ESeW	<i>Euphorbia sendaica</i> Makino	Whole plant	Kanazawa Univ.	KANP-TY-Eup6	Oct. 2013
<i>Natsu-todai</i> ; ナツトウダイ	ESiW	<i>Euphorbia sieboldiana</i> C.Morren et Decne.	Whole plant	Kaga city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup7	Jun. 2016
<i>Midorisango</i> ; ミドリサンゴ	ETLx	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Latex	Kanazawa Univ.	KANP9703	Jun. 2016
<i>Midorisango</i> ; ミドリサンゴ	ETSt	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Stem	Kanazawa Univ.	KANP9703	Jun. 2016
—	EVLf	<i>Euphorbia viguieri</i> Denis	Leaf	Greenhouse at Kanazawa Univ.	KANP9712	Jul. 2016
—	EVLx	<i>Euphorbia viguieri</i> Denis	Latex	Greenhouse at Kanazawa Univ.	KANP9712	Jul. 2016
<i>Akamegashiwa</i> ; アカメガシワ	MJLf	<i>Mallotus japonicus</i> (L.f.) Müll.Arg.	Leaf	Kanazawa Univ.	KANP9705	Oct. 2013
<i>Yama-ai</i> ; ヤマアイ	MLW	<i>Mercurialis leiocarpa</i> Siebold et Zucc.	Whole plant	Kaga city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup9	Jun. 2016
<i>Shiraki</i> ; シラキ	NJBr	<i>Neoshirakia japonica</i> (Siebold et Zucc.) Esser	Branche	Kaga city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup10	Jun. 2016
<i>Shiraki</i> ; シラキ	NJLf	<i>Neoshirakia japonica</i> (Siebold et Zucc.) Esser	Leaf	Kaga city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup10	Jun. 2016
<i>Nagae-mikanso</i> ; ナガエコミカンソウ	PTW	<i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb.	Whole plant	Kanazawa Univ.	KANP-TY-Eup11	Jul. 2016
<i>Hime-mikanso</i> ; ヒメミカンソウ	PUW	<i>Phyllanthus ussuriensis</i> Rupr. et Maxim.	Whole plant	Kanazawa Univ.	KANP-TY-Eup12	Jul. 2016
<i>Togoma</i> ; トウゴマ	RCSe	<i>Ricinus communis</i> L.	Seed	Kanazawa Univ.	KANP9706	Oct. 2013
<i>Nankinhaze</i> ; ナンキンハゼ	TSBr	<i>Triadica sebifera</i> (L.) Small	Branche	Kanazawa city	KANP-TY-Eup13	Jun. 2016
<i>Nankinhaze</i> ; ナンキンハゼ	TSLf	<i>Triadica sebifera</i> (L.) Small	Leaf	Kanazawa city	KANP-TY-Eup13	Jun. 2016
<i>Nankinhaze</i> ; ナンキンハゼ	TSSe	<i>Triadica sebifera</i> (L.) Small	Seed	Kanazawa city	KANP9706	Nov. 2013
<i>Aburagiri</i> ; アブラギリ	VCLf	<i>Vernicia cordata</i> (Thunb.) Airy Shaw	Leaf	Kaga city, Ishikawa Pref.	KANP-TY-Eup14	Jun. 2016
<i>Shina-aburagiri</i> ; シナアブラギリ	VFLf	<i>Vernicia fordii</i> (Hemsl.) Airy Shaw	Leaf	Kanazawa Univ.	KANP-TY-Eup15	Jun. 2016
<i>Shina-aburagiri</i> ; シナアブラギリ	VFSe	<i>Vernicia fordii</i> (Hemsl.) Airy Shaw	Seed	Kanazawa Univ.	KANP9708	Oct. 2013

—; No Japanese name



Fig. 25. Euphorbiaceae plants used in this study at Chapter 5.

## 実験方法

### (1) 細胞添加試料調製；第1章，第3章，第4章，第5章，第6章

FCLx 及び ENLx は室温で乾燥させたものを使用した。切断生薬は粉碎し，各種 KS は細かく刻んで用いた。検体 1 g にメタノール（和光純薬工業株式会社，和光一級，136-01837，14 kg，Lot. TWQ5158）または水を 100 ml 加え 30 分間超音波抽出を行い，ろ過した。メタノール抽出物は減圧蒸留でメタノールを除去し，水抽出物は凍結乾燥機（東京理化学工業株式会社，FDU-1100 型）で溶媒を除去した。CAT はトウガラシをエタノール抽出したものであるため抽出作業を行わず，溶媒除去して用いた。得られた抽出物を精密に測り Dimethyl sulfoxide (DMSO: 和光純薬工業株式会社，和光一級，042-21765，500 ml，Lot. DSF3633) に溶解させ，さらに滅菌水を加え試料を 10 mg/ml in 5% DMSO とした。

### (2) 骨格筋芽細胞の培養及び細胞毒性測定<sup>74)</sup>；第1章，第3章，第4章，第5章，第6章

#### ・骨格筋芽細胞の培養

ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたラット由来骨格筋芽細胞株 L6 (JRCB9081, Lot.1301816) を用いた。10% Fetal bovine serum (FBS: Biowest, Inc., S182H, 500 ml, Lot. S11727S182H) 及び 2% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (×50) (和光純薬工業株式会社，細胞培養用，164-25251, 100 ml, Lot. AWE7041, ECL7031) が添加された Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM (High Glucose with L-Glutamine and Phenol Red), 和光純薬工業株式会社，細胞培養用，044-29765, 500 ml, Lot. DSR7031) を培地として用いた。L6 は 37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下，90 mm dish で（アズワン株式会社，VIOLAMO Tissue Culture Dish VTC-D100, 2-8590-03) 培養した。細胞の培養にはミニ CO<sub>2</sub> インキュベーター（十慈フィールド株式会社，BL-40CD) を用いた。

#### ・細胞毒性測定

コンフルエントになった L6 の培地を除き 1 ml Trypsin-EDTA 溶液（和光純薬工業株式会社，細胞培養用，209-16941, 100 ml, Lot. ECP7002) を加え 37°C，5% CO<sub>2</sub> で 5 分培養した。9 ml Phosphate-buffered saline (PBS(-):和光純薬工業株式会社，細胞培養用，166-2355, 500 ml, Lot. DSE7023) を加え細胞懸濁液にし，15 ml チューブに移して 5 分間 1000 rpm で遠心した。上清を除き培地を加え，細胞計算盤（フナコシ株式会社，FMG 521-10) を用いて細胞濃度を測定し， $1.5 \times 10^5$  cell/ml に調製した。96 well plate (BioLite 96 well Multidish 130188, Thermo Scientific Inc., 12-9985) に細胞懸濁液を 100  $\mu$ l ずつ添加し 37°C，5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後，培地に試料を添加し 48 時間培養した。添加試料の最終濃度は 100  $\mu$ g/ml もしくは金沢糸の構成比換算（1 ml あたり 0.5 mm の金沢糸に含まれる薬材の抽出物換算量）で添加した。

細胞毒性測定のため MTT 試薬を 10  $\mu$ l 添加し 2 時間培養後，培地を除き 200  $\mu$ l DMSO に溶解させ，マクロプレートリーダー（東ソー株式会社，MPR-A4i II) を用いて吸光度（測定波長：540 nm) を測定した。MTT 試薬は 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT: 同仁化学研究所，341-0823, 1 g, Lot.ES056) を PBS(-)に溶解させ 5 mg/mL MTT を調製し，0.20  $\mu$ m の

フィルターを通して滅菌ろ過したものをを用いた。細胞毒性は次の計算式を用いて算出した。

$$[\text{Cytotoxicity (\%)}] = 100 - 100 \times \frac{(\text{試料平均吸光度}) - (\text{Blank の吸光度})}{(\text{Vehicle の吸光度}) - (\text{Blank の吸光度})}$$

### (3) 骨格筋芽細胞の分化誘導<sup>75)</sup> ; 第1章

細胞増殖には増殖培地(10%FBSおよび2%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (×50) in D-MEM), 分化誘導には分化培地 (2% horse serum (MP Biomedicals, Inc., 2921149, 100 ml, Lot. M7621), 2%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (×50) in D-MEM) を用いた。35-mm dish (FALCON Easy Grip Tissue Culture Dish, Thermo Scientific Inc., 35-3001) に細胞を播種し, 増殖培地で 80-90%コンフルエントな状態に培養した後, 30 μg/ml の試料を含む分化培地 3 ml へ培地を交換した。48 hr, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養後, 同じ組成の試料含有分化培地と交換し, さらに 48 hr, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。エタノール (Ethanol(99.5): 和光純薬工業株式会社, 和光一級, 052-00467, 18 L, Lot. TWN5699) で細胞固定を行い, 倒立型蛍光位相差顕微鏡 (株式会社キーエンス, BZ-9000) で4つのエリア (850 × 850 μm) をランダムに選び観察した。画像解析ソフト (ImageJ) を用いて分化細胞の占める割合を分析した。

### (4) NO 産生活性<sup>76)</sup> ; 第1章, 第3章, 第4章, 第5章, 第6章

ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたマウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 (JRCB0018, Lot.13003671500737) を用いた。培地は 10% FBS, 2% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (×50) を含む RPMI-1640 (Thermo Scientific Inc., 11875-093, 500 ml, Lot. 1788454, 1553603, 1830631, 1740844, 1627110) を用いた。5~10×10<sup>5</sup> cells/ml の細胞懸濁液を調製し, 96 well plate に細胞懸濁液を 100 μl 添加後, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C で 24 時間培養した。試料を添加した培地 200 μl と古い培地を交換し 24 時間培養した。試料添加時に必要に応じて最終濃度 1 μg/ml Lipopolysaccharide (LPS from *E.coli* O26 (by phenol extraction): 和光純薬工業株式会社, 細胞生物学用, 120-05131, 25 mg, Lot. LAM2560) を添加し NO 産生を誘導した。添加試料の最終濃度は 100 μg/ml もしくは金沢糸の構成比換算 (1 ml あたり 0.5 mm の金沢糸に含まれる薬材の抽出物換算量) とした。

培地中の NO 量を測定するため培養培地 100 μl と Griess 試薬 100 μl を混合し, 吸光度 (測定波長: 540 nm, 参照波長: 620 nm) を測定し, 以下の計算式を用いて NO 産生率を算出した。

$$\begin{aligned} A &= [\text{試料 : LPS(+)} \text{ O.D.540}] - [\text{試料 : LPS(+)} \text{ O.D.620}] \\ a' &= [\text{試料 : LPS(-)} \text{ O.D.540}] - [\text{試料 : LPS(-)} \text{ O.D.620}] \\ C &= [\text{Control : LPS(+)} \text{ O.D.540}] - [\text{Control : LPS(+)} \text{ O.D.620}] \\ c' &= [\text{Control : LPS(-)} \text{ O.D.540}] - [\text{Control : LPS(-)} \text{ O.D.620}] \end{aligned}$$

$$\text{LPS(+)} \text{ [NO 産生率 (\%)]} = 100 \times [(A - a') / (C - c')]$$

$$\text{LPS(-)} \text{ [NO 産生率 (\%)]} = 100 \times [(a' - c') / (C - c')]$$



Griess 試薬は 0.1 % *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩（和光純薬工業株式会社, 窒素酸化物測定用, 147-04141, 1 g, Lot. SAE7048), 1 % スルファニルアミド（和光純薬工業株式会社, 試薬特級, 191-04502, 25 g, Lot. TLK3883), 2.5%リン酸（和光純薬工業株式会社, 試薬特級, 27618-55, 500 ml, Lot. V6A7185) 水溶液として用時調製した. 使用した細胞は MTT 法で測定した. LPS 刺激に対する NO 産生阻害作用のポジティブコントロールとして *N*<sup>G</sup>-Monomethyl-L-arginine, monoacetate salt (L-NMMA: 同仁化学研究所, 345-07161, 25 mg, Lot. DK183) を使用した. L-NMMA を PBS(-) に溶かし培地で 100 μM に希釈して用いた.

#### (5) pH の測定 ; 第 2 章

吉光らの方法を参考に一部改変して測定した<sup>10)</sup>. 0.9 w/v % 塩化ナトリウム（ナカライテスク株式会社, 試薬特級, 31320-05, 500 g, Lot. VOH3081) 水溶液を調製して生理食塩水とした. 生理食塩水 2 ml に 3cm に切断した金沢糸を入れ超音波抽出機（DENTCRAFT®, Ultrasonic 3800) を用いて 10 分超音波抽出した. その後, 上清を pH メーター（HORIBA, コンパクト Twin pH メーター-B-212) を用いて pH を測定した.

#### (6) TLC 法によるクルクミン含量の比較 ; 第 2 章

第十六改正日本薬局方のウコンの確認試験を一部改変した<sup>7)</sup>. 金沢糸 10 cm を細かく切断し, メタノール 5 ml を加え 15 分間超音波抽出を行った後, 遠心して上澄みを試料溶液とした. 試料溶液 20 μl をシリカゲル薄層クロマトグラフィー板（TLC Silicagel 60 F245, EMD Millipore Co. Ltd., 1.05715.0001, Lot. HX309722) にスポットした. 次に酢酸エチル/*n*-ヘキサン/酢酸混液（7 : 3 : 0.1) を展開溶媒として展開した後, 薄層板を風乾し 365 nm でスポットを検出した. 酢酸エチル（和光一級, 191-04502, 15 kg, Lot. KQK2016), *n*-ヘキサン（和光一級, 080-00427, 12 kg, Lot. EBL3591), 酢酸（試薬特級, 017-00256, 500 ml, Lot. TWR5969) は和光純薬工業株式会社から入手した.

(7) HPLC 法によるクルクミン含量の定量 ; 第 2 章, 第 6 章

上原らの手法を参考に次の方法でクルクミンの定量を行った<sup>78)</sup>. ウコン末 0.5 g を精密に量り 10 ml のメタノールを加え, 金沢糸は 10 cm 測り細かく切断した後 5 ml のメタノールを加え, クルクミン標準品 (ナカライテスク株式会社, Curucmine1, Lot.V0H3534) は 4 mg 精密に量り 10 ml のメタノールを加え, それぞれ 30 min の超音波抽出を行った. その後 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (Minisart RC25; Sartorius Stedim Biotech) に通し試料溶液とした. クルクミン標準液は段階希釈を用いて使用した. HPLC の条件を次のように設定し定量した.

Column : Handy ODS (Wako, 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm)

Mobile phase : acetonitrile-water-acetic acid (50:50:1)

Flow rate : 1 ml/min

Column temperature : 35°C

Detector : 380 nm

Injection : 10  $\mu\text{l}$

アセトニトリル (34888, 2.5 L, Lot.WXBC5219V) は SIGMA-ALDRICH から入手した.

機器は以下を使用した.

検出器 : 株式会社日立ハイテクロノジーズ, L-2400

ポンプ : 株式会社日立ハイテクロノジーズ, L-2130

オートサンプラー : 株式会社日立ハイテクロノジーズ, L-2200

カラムオーブン : 株式会社センシュー科学, SSC-2300

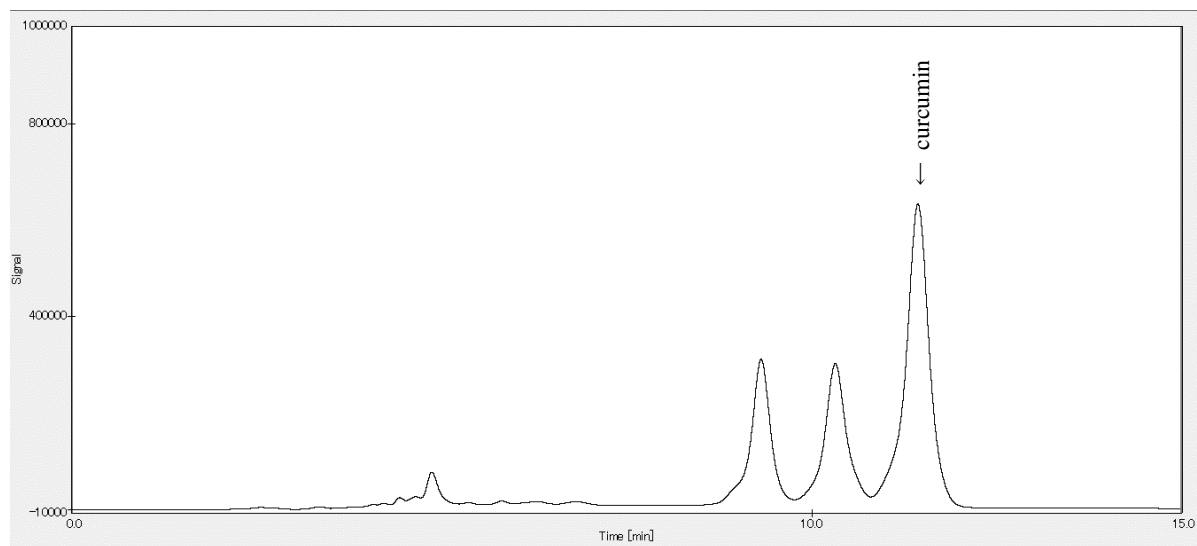


Fig. 26. The Chromatogram of *Curcuma longa* by HPLC

#### (8) 抗菌活性<sup>79)</sup>; 第4章

##### ・ ミューラー・ヒントン寒天培地の調製

ミューラー・ヒントン培養液 (SIGMA-ALDRICH, for microbiology, 70192, 100 g, Lot.BCBC4787 100962357) 23 g と水 1,000 ml を混合し, 寒天 (和光純薬工業株式会社, 細菌培地用, 010-08725, 500 g, Lot.SAN4585) 17 g を加えオートクレーブ (株式会社トミー精工, LBS-325) を用いて滅菌を行いシャーレ (関東化学, 滅菌シャーレ浅型(S), CSPD-90-15S) に厚さ 3-4 mm となるように分注した.

##### ・ 菌液調製法

プロンプトンキット (Becton, Dickinson and Company, 226306) を用いて接種菌液を調製した. あらかじめミューラー・ヒントン寒天培地で培養した *Staphylococcus aureus* 標準株 (関東化学, ATCC 29213, Lot; 365-49-7) または *Escherichia coli* 標準株 (関東化学, ATCC 25922, Lot; 335-184-1) のコロニー数個をプロンプト接種棒の先端でつつくように採取し, 生理食塩水の入った接種チューブに入れた. ボルテックスで攪拌し, 約  $1.5 \times 10^8$  個/ml (0.5 McFarland) の接種菌液を調製した.

##### ・ 抗菌活性測定

各粉末試料をメタノールで抽出し溶媒を除去した. 試料をメタノールに再溶解させ, 抗生物質試験用ペーパーディスク (ADVANTEC, 抗生物質検定用濾紙 薄手 6mm) に各濃度しみ込ませ自然乾燥させた. 陰性対照として試料を含まないメタノールを用いて同様処理を行い, 陽性対照として 6 mg/ml カナマイシン (Kanamycin Sulfate, Thermo Fisher Scientific Inc., 11815-024, 5 g, Lot.1017741) 水溶液をディスクに 5  $\mu$ l 添加し自然乾燥させた. 滅菌綿棒 (Becton, Dickinson and Company, 252095) を用いて, 寒天培地表面に菌液を均一に画線塗抹接種し, 3~5 分間表面を乾燥させた. ディスクをピンセットで配置し, 好氣的条件下で  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , 16-24 時間インキュベーター (アズワン株式会社, Cool Incubator, FCI-280) 内で培養し, ノギスを用いて防止円の直径を測定した.

#### (9) 統計学的検定

有意差検定は Student's t-test により行い,  $P < 0.05$  を有意水準とした. またデータは平均±標準誤差で表した.

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、金沢大学大学院医薬保健学総合研究科准教授 佐々木陽平 先生のご教示を受け、研究面に留まらず研究者として、人としての在り方等、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

本研究は金沢大学大学院名誉教授・東京農業大学教授 御影雅幸 先生のご教示のもとに着手し、終始懇篤なるご指導を賜りました。また、アーユルヴェーダや生薬学の興味をもつきっかけを下さいました。ここに深甚なる感謝を表します。

本研究の臨床データの提供や臨床使用についての情報提供やご助言していただきました富山医科薬科大学名誉教授 田澤賢次 先生，不二越病院外科 山本克弥 先生，不二越病院外科 杉木実 先生に深謝致します。

本研究に供しましたイチジク乳液は羽咋郡宝達志水町 高崎進 氏が栽培しているイチジクから採集させていただきました。ご提供いただけたことを深謝致します。

日頃より助言くださいました金沢大学大学院医薬保健学総合研究科助教 安藤広和 先生，並びに様々な形でご協力いただいた金沢大学分子生薬学研究室の皆様にあわせて深く感謝致します。

最後に、ここまで経済・環境面で支えてくれた親に深く感謝致します。



## 引用文献

- 1) 山中元, サンスクリット語-日本語単語集, 国際語学社, 東京, 2004, kṣāra; p.99, sūtra; p.179.
- 2) 財団法人鈴木学術財団編, 漢訳対照 梵和大辞典 新装版, 講談社, 東京, 1986, kṣāra; p.395, sūtra; p.1497.
- 3) 伊藤正男, 井村裕夫, 高久史麿編, 医学大辞典 第2版, 医学書院, 東京, 2009, p.1373.
- 4) 山口徹, 北原光夫, 福井次矢総編集, 今日の治療指針 2011年版, 私はこう治療している, 医学書院, 東京, 2011, pp. 456-459.
- 5) 田澤賢次, 佐伯俊雄, 竹森繁, 山本克弥, 霜田光義, 斎藤智裕, 齊藤素子, 野本一博, 新井英樹, 藤巻雅夫, 服部征雄, 難波恒雄, クシャーラ・スートラによる痔瘻の手術, *手術*, **49**(6), 847-855 (1995).
- 6) Dutta G., Bain J., Ray A.K., Dey S., Das N., Das B., Comparing Ksharasutra (Ayurvedic Seton) and open fistulotomy in the management of fistula-in-ano, *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, **6**(2), 406-410 (2015).
- 7) 山本克弥, 杉木実, 田澤賢次, クシャーラ・スートラによる痔瘻の治療, *臨床肛門病学*, **4**(2), 67-73 (2012).
- 8) Yoshimitsu M., Mikage M., Nakagawa Y., Yamamoto K., Tazawa K., Studies of Kshara, an Ayurvedic medicine (2). Preparation of alternative Kshara Sutra in Japan, *J. Trad. Med.*, **22**, 15-18 (2005).
- 9) 吉光見稚代, アーユルヴェーダ薬線 Kshara Sutra の研究, 金沢大学, 2005, 博士論文.
- 10) 御影雅幸, 長嶋麻由子, 吉光見稚代, 伏見裕利, アーユルヴェーダ薬 Kshara(アルカリ剤)の研究(1)*Achyranthes aspera* L.由来のスリランカ産 Kshara について, *J. Trad. Med.*, **18**(4), 177-181 (2001).
- 11) 高橋澄子, クシャーラ・スートラの薬学的考察, *アーユルヴェーダ研究*, **17**, 1801-1806 (1987).
- 12) Adolf W., S. Chanai, E. Hecker, 3-O-Angeloylingenol, the toxic and skin irritant factor from latex of *Euphorbia anitiquorum* L. (Euphorbiaceae) and from a derived Thai purgative and anthelmintic (vermifuge) drug, *J. Sci. Soc. Thailand*, **9**, 81-88 (1983).
- 13) 岡田稔 監修, 原色牧野和漢薬草大圖鑑, 北隆館, 東京, 1988, a; p.23, b; p.274.
- 14) 鈴木洋, 漢方のくすりの事典—生薬・ハーブ・民間薬—, 医歯薬出版, 東京, 1994, a) p.399, b) p.2.
- 15) 山本克弥, 田澤賢次, 金沢糸-1号の臨床経験, 日本アーユルヴェーダ学会第27回研究総会抄録集, 静岡, 2005-11-12/13, 日本アーユルヴェーダ学会, 2005, p.26.
- 16) 生内一夫, 複雑痔瘻術後の難治性二次痔孔に金沢糸が奏効した一例, 第8回クシャーラ・スートラ研究会プログラム・抄録集, 富山, 2011-4-10, クシャーラ・スートラ研究会, 3.
- 17) 生内一夫, 本院における金沢糸の使用状況, 第9回クシャーラ・スートラ研究会プログラム・抄録集, 富山, 2011-4-8, クシャーラ・スートラ研究会, 3.
- 18) 宇仁田卓, 金沢糸の使用経験 一般肛門外科医が金沢糸を使用してみたなら, 第13回クシャーラ・スートラ研究会プログラム・抄録集, 富山, 2016-4-10, クシャーラ・スートラ研究会, 2.
- 19) 畑嘉高, 増田芳夫, 日本産のクシャーラ・スートラ(金沢糸1号)にて治療した毛巣洞の一例, *日本大腸肛門病学会誌*, **66**, 183-187 (2003).

- 20) 畑嘉高, 畑嘉也, 裂肛に対するクシャーラ・スートラ (金沢糸) の経験, 日本アーユルヴェーダ学会第 27 回研究総会抄録集, 静岡, 2005-11-12/13, 日本アーユルヴェーダ学会, 2005, pp.25-26.
- 21) 笹口政利, 毛巢洞への金沢糸の使用経験, 第 11 回クシャーラ・スートラ研究会プログラム・抄録集, 富山, 2014-4-13, クシャーラ・スートラ研究会, 1.
- 22) 鳥越義房, 金沢糸とインド糸の切れ味の違い, 日本アーユルヴェーダ学会第 34 回研究総会抄録集, 東京, 2015-9-15/17, 日本アーユルヴェーダ学会, p.53.
- 23) 横川貴美, アーユルヴェーダ薬線 Kshara Sutra の改良研究, 金沢大学, 2014, 修士論文, pp.5-7.
- 24) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, 中村桂子(監訳), 松原謙一(監訳), 細胞の分子生物学 第 6 版, ニュートンプレス, 東京, 2017, pp.1232-1235.
- 25) K. L. Bhishagratna(英訳), 伊東弥恵治(和訳), 鈴木正夫(補訳), ススルタ大医典 第 1 巻, 日本医史学会, 東京, 1971, a) pp.36-41, b) pp.162-163.
- 26) Arthur C. Guyton, John E. Hall, 御手洗玄洋(総監訳), ガイトン 生理学 原著第 11 版, エルゼビア・ジャパン, 東京, 2013, pp.453-455.
- 27) J. Peerman Nesselrod, Pathogenesis of Common Anorectal Infections, *Am. J. Surg.*, **88**(5), 815-817 (1954).
- 28) 土屋周二, 痔瘻と肛門周囲膿瘍, *臨床と研究*, **54**(6), 85-90, (1977).
- 29) 名川弘一, 鶴丸昌彦, 永井秀雄編集, 最新 アップ・ヘモ・ヘルニア・下肢バリックスの手術 改訂第 2 版, 金原出版, 東京, 2005, pp.144-152
- 30) Kumar, Cotran, Robbins, 森亘(訳), 桶田 理喜(訳), ロビンス 基礎病理学 第 7 版, 廣川書店, 東京, 2005, p.69.
- 31) Gerard J.Tortora, Bryan Derrickson, 桑木共之 (訳), 黒澤美枝子(訳), 高橋研一(訳), 細谷安彦(訳), トートラ人体の構造と機能 第 3 版 (原書第 12 版), 丸善出版, 東京, 2011, pp.868-870.
- 32) 筒井正人, 上野晋, 豊平由美子, 柳原延章, 一酸化窒素合成の構造と機能—とくに血管組織における動態と意義, *蛋白質 核酸 酵素*, **47**(15), 2024-2031 (2002).
- 33) David A. Wink, James B. Mitchell, Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.*, **25**(4-5), 434-456 (1998).
- 34) Charles A. Janeway Jr., Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik, 笹月健彦(訳), 免疫 生物学—免疫系の正常と病理— 原書第 5 版, 南江堂, 東京, 2003, p.40.
- 35) Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK., Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages., *Biochem. Pharmacol.*, **60**(11), 1665-76 (2000).
- 36) Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R., Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IkB-a degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages, *Cell Signal*, **15**(3), 299-306 (2003).
- 37) 山本克弥, 杉木 実, 田澤賢次, 国産痔瘻治療糸 (金沢糸) による痔瘻の治療, *日本大腸肛門病会誌*, **68**(9), 597 (2015).

- 38) Rakesh Kumar Meena, T. S. Dudhamal, GUGGULU BASED KAHARASUTRA IN THE TREATMENT OF BHAGANDARA (FISTULA-IN-ANO): CASE REPORT, *Int. J. Res. AYUSH and Allied Syst.*, **1**(1), 20-24 (2014).
- 39) S. Dattatreya Rao, Efficacy of Kshara sutra mad from Papaya and Snuhi latex in the treatment of fistula in ano, *Ancient science of life*, **18**(2), 145-151 (1998).
- 40) Manju Rani, Riju Agarwal, K K Sijjoria, PREPARATION OF DIFFERENT TYPES OF KSHARA SUTRA, *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, **7**(2), 176-180 (2016).
- 41) Praveen Kumar, K. K. Sijoria, Diagnosis and management of ano-rectal disease, Chaukhamba Sanskrit Pratishtan, Delhi, 2009, a) pp. 61-77, b) p.171.
- 42) Evans FJ, Taylor SE., Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families *Euphorbiaceae* and *Thymelaeaceae*, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **44**, 1-99 (1983).
- 43) Hohmann J., Molnár J., Euphorbiaceae diterpenes: plant toxins or promising molecules for the therapy?, *Acta. Pharm. Hung.*, **74**(3), 149-57 (2004).
- 44) Zayed SM, Farghaly M, Taha H, Gminski R, Hecker E., Dietary cancer risk from conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (Euphorbiaceae). III. Milk of lactating goats fed on the skin irritant herb *Euphorbia peplus* is polluted by tumor promoters of the ingenane diterpene ester type, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **124**(6), 301-6 (1998).
- 45) 厚生労働省編, 第十七改正日本薬局方, 東京, 2016, p.1731
- 46) DAVE Om Prakash, Role of *STimadhu* powder coated *kSara-sUtra* in the management of *bhagandara* (fistula in ano), *Santi Margah*, **23**(2), 26-44 (2013).
- 47) Toume K., Nakazawa T., Hoque T., Ohtsuki T., Arai A. M., Koyano T., Kowithayakorn Thaworn, Ishibashi M., Cycloartane Triterpenes and Ingol Diterpenes Isolated from *Euphorbia nerifolia* in a Screening Program for Death-Receptor Expression-Enhancing Activity, *Planta Med.*, **78**(12), 1370-1377 (2012).
- 48) Michael J. Caterina, Mark A. Schumacher, Makoto Tominaga, Tobias A. Rosen, Jon D. Levine, David Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, **389**, 816-824 (1997).
- 49) Oh U., Hwang S. W., Kim D., Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci*, **16**, 1659–1667, (1996).
- 50) 吉開泰信(監訳), 西山幸廣(監訳), レビンソン微生物学・免疫学 原書 11 版, 丸善出版, 東京, 2012, pp.100-105, 黄色ブドウ球菌; pp.100-105, 大腸菌; pp.132-135.
- 51) 東匡伸, 小熊恵二, 堀田博, シンプル微生物学 改訂第 5 版, 南江堂, 東京, 2011, 黄色ブドウ球菌; pp.129-130, 大腸菌; pp.117-119.
- 52) 山西弘一(監修), 平松啓一(編集), 中込治(編集), 標準微生物学 第 9 版, 医学書院, 東京, 2005, 黄色ブドウ球菌; pp.162-169, 大腸菌; pp.232-239.
- 53) S. Uechi, Y. Ishimine, F. Hongo, Antibacterial activity of essential oil derived from *Curcuma* sp.(Zingiberaceae) against foodborne pathogenic bacteria and its heat-stability, *Sci. Bull. Fac. Agric. Univ. Ryukyus*, **47**, 129-136 (2000).

- 54) Tyagi P., Singh M., Kumari H., Kumari A., Mukhopadhyay K., Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane, *PLoS One*, **10**(3), e0121313 (2015).
- 55) 佐竹元吉(監修), 日本の有毒植物, 学研教育出版, 東京, 2012, pp.58-203.
- 56) Nielsen P. E., Nishimura H., Liang Y., Calvin M., Steroids from Euphorbia and other latex-bearing plants. *Phytochemistry*, **18**(1), 103-104 (1979).
- 57) Shi QW., Su XH., Kiyota H., Chemical and pharmacological research of the plants in genus Euphorbia. *Chemical reviews*, **108**(10), 4295-4327 (2008).
- 58) 島地謙, 須藤彰司, 原田浩, 木材の組織, 森北出版, 東京, 1976, pp.47-50.
- 59) 矢野道雄, インド医学概論, 朝日出版社, 東京, 1988, pp.47-51.
- 60) K. R. Srikantha Murthy (Translated), Vagbhata's Astanga Hrdayam, Vol. 1, 9th edition, Chowkhamba Krishnadas Academy, Varanasi, 2013, pp.33-44.
- 61) 原島広至, 生薬単 改訂第2版, NTS, 東京, 2012, a) pp.88-89, 208-209, b) pp.20-21, 158-159.
- 62) 御影雅幸, 木村正幸, 伝統医薬学・生薬学, 南江堂, 東京, 2009, a) pp.161-162, 198-199, b) pp.132, 147.
- 63) 難波恒雄, 津田喜典編, 生薬学概論(改訂第3版増補), 南江堂, 東京, 2004, a) pp.275, 307, b) pp.237-238, 253, c) p.277.
- 64) 川添和義, 図解漢方処方方のトリセツ, じほう, 東京, 2014, pp.158-159.
- 65) 沢田 徳之助, 山原 條二, 島津 早苗, 太田 利夫, 生物試験法による和漢薬の品質評価に関する研究(第3報): 産地別ウコン成分含量の比較および防カビ効果, *生薬学雑誌*, **25**(1), 11-16 (1971).
- 66) 西田 裕子, 高橋 京子, 上島 悦子, 小松 かつ子, 佐々木 陽平, 荒川 行生, 山本 克己, 竹上 学, 片岡 和三郎, 黒川 信夫, 東 純一, ウコン (*Curcuma*) 属生薬のヒト肝 CYP 代謝活性への阻害効果, *臨床薬理*, **34**(1), 107S-108S (2003).
- 67) Mikage M., Yoshimitsu M., Matsuo A., Kawahara K., Kakiuchi N., Evaluation of the Crude Drugs by means of Colorimeter. Part 5. : Correlation between the Color and Curcumin Content of Turmeric, *Natural Medicines*, **57**(6), 246-249 (2003).
- 68) 山本克弥, 田澤賢次, 杉木実, 国産痔瘻治療糸(金沢糸)による隅越分類 II 型の治療成績, *アーユルヴェーダ研究*, **40**, 60-61 (2015).
- 69) 難波恒夫, 沢和子, Mohan B. Gewali, 服部征雄, 成瀬優知, 鏡森定信, 免疫調節作用を有する薬物の開発研究(II): 数種のアーユルヴェーダ薬物のマウスリンパ球幼若化に及ぼす影響について, *生薬学雑誌*, **43**(3), 250-255 (1989).
- 70) Bigoniya P, Rana AC, Immunomodulatory activities of *Euphorbia nerifolia* leaf hydroalcoholic extract in rats. *Ind. Drugs*, **45**(2), 90-97 (2008).
- 71) Vaidya Bhagwan Dash, Acarya Manfred M .Junius ,A Handbook of Ayurveda ,Concept Publishing Company ,New Delhi ,1987 ,p.16.
- 72) V.B. アタヴァレー, 稲村晃江(翻訳), アーユルヴェーダー日常と季節の過ごし方, 平河出版社, 1987, pp.5-11.

- 73) 海老塚豊(編), 森田博史(編), パートナー天然物化学, 南江堂, 東京, 2007, pp.124-131.
- 74) Moorthi R. V., Bobby Z., Selvaraj N., Sridhar M. G., Vitamin E protects the insulin sensitivity and redox balance in rat L6 muscle cells exposed to oxidative stress, *Clin. Chim. Acta.*, **367**(1-2), 132-136 (2006).
- 75) Siu P.M., Wang Y., Alway S.E., Apoptotic signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes., *Life Sci.*, **84**(13-14), 468-81(2009).
- 76) K. Ippoushi, K. Azuma, H. Ito, H. Horie, H. Higashio, [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions, *Life Sciences*, **73**(26), 3427-3437 (2003).
- 77) 厚生労働省編, 第十六改正日本薬局方, 東京, 2011, p.1452.
- 78) S. Uehara, I. Yasuda, K. Takeya, H. Itokawa, Comparison of the Commercial Turmeric and Cultivated Plant by Their Constituents, *Shoyakugaku Zasshi*, **46**(1), 55-61, (1992).
- 79) M. S. Hanafy, M. E. Hatem, Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin), *J. Ethnopharmacol.*, **34**(2-3), 275-278 (1991).

## 参考資料

### 金沢系 1 号調製について

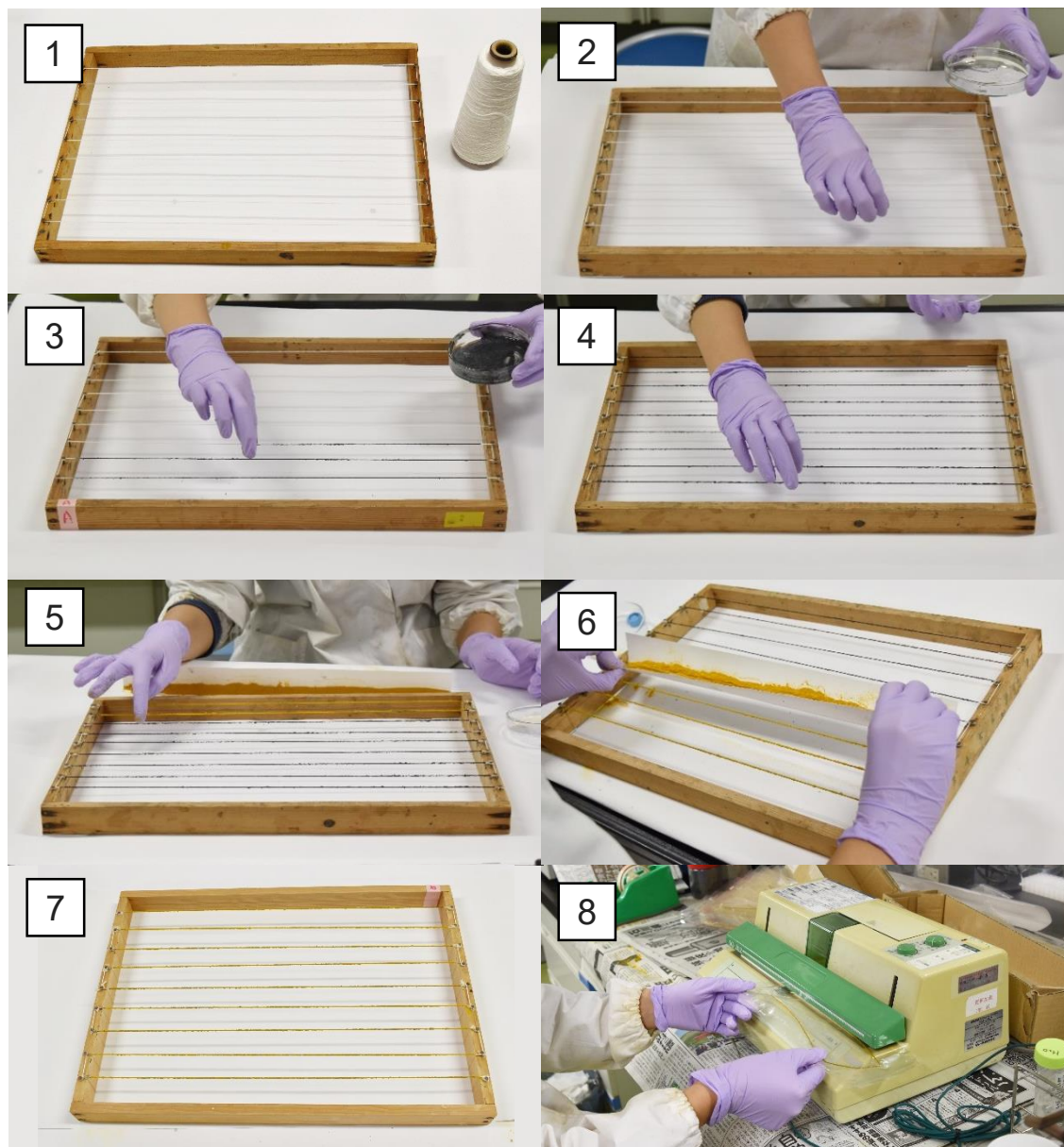


Fig. X1. 金沢系 1 号の調製

1) 糸を張った様子. 2) 10%トウガラシチンキを塗布後, 乾燥. 3) ヒナタイノコヅチ *kSara* とイチジク乳液の混合物を塗布後, 乾燥. 4) 10% トウガラシチンキを塗布後, 乾燥. 5) イチジク乳液を塗布する. 6) ウコン末を付着. 7) 乾燥. 8) パック詰めの様子.

工程 2)及び 4)について吉光らはトウガラシチンキをスプレーしていたが, 周囲への飛散による目などの粘膜組織への刺激を予防するため塗布へと変更した. また工程 3)について吉光らはイチジク乳液塗布後 *kSara* を付着させていたが, *kSara* を均一に付着させるため, さらに *kSara* の使用を最小限に抑えるため *kSara* とイチジク乳液混合物の塗布へと変更した.



## インド調査報告

2016年 Sri Sri College of Ayurvedic Science and Research Hospital 見学

この施設では10年前から *snuhI* は使用せず、*guggul kSara sUtra* のみしか調製していないとのことであった。*guggul kSara sUtra* の調製、*kSara sUtra* の糸交換の様子、*kSara* を用いた痔核処置を見学した。



Fig. X2. *kSara sUtra* の構成薬材の原植物

左から *guggul* (*Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari), *apAmArga* (*Achyranthes aspera* L.), ミドリサンゴ (*Euphorbia tirucalli* L.), *haridrA* (*Curcuma longa* L.). ミドリサンゴ乳液も *snuhI* 乳液の代わりとして使用するとのこと。



Fig. X3. *guggul kSara sUtra* の材料

左から *guggul* (*C. wightii* 樹脂), *apAmArga kSara*, ウコン末, 糸, 左上のビンの中には *guggul* アルコール液。使用している糸は金沢糸よりやや細めに見えた。*kSara* は、金沢糸に使用しているものよりも白みが強い。



Fig. X4. *guggul kSara sUtra* 作製

製法は7回 *guggul* を糸に塗布し, 11回 *apAmArga kSara* を塗布, 3回 *haridra* を塗布する. 塗布作業は1日1回までのため最低でも21日を要する.

1) *guggul* アルコール液. 2) *guggul* アルコール液を塗布している様子. *guggul* の濃度は決まっておらず, 接着剤として使用できる程度の濃度で使用する. *snuhi* 乳液は一度乾燥すると再利用できないが, *guggul* はアルコールに再溶解できるため利便性がある. *guggul* アルコール液をガーゼに染み込ませて糸に塗布していた. 3) ウコン末を付着している様子. 4) ウコン末付着後. 5) *kSara sUtra* 専用の乾燥機に入れる様子. 6) 乾燥中の *kSara sUtra*. 最大20枠が収納できる.



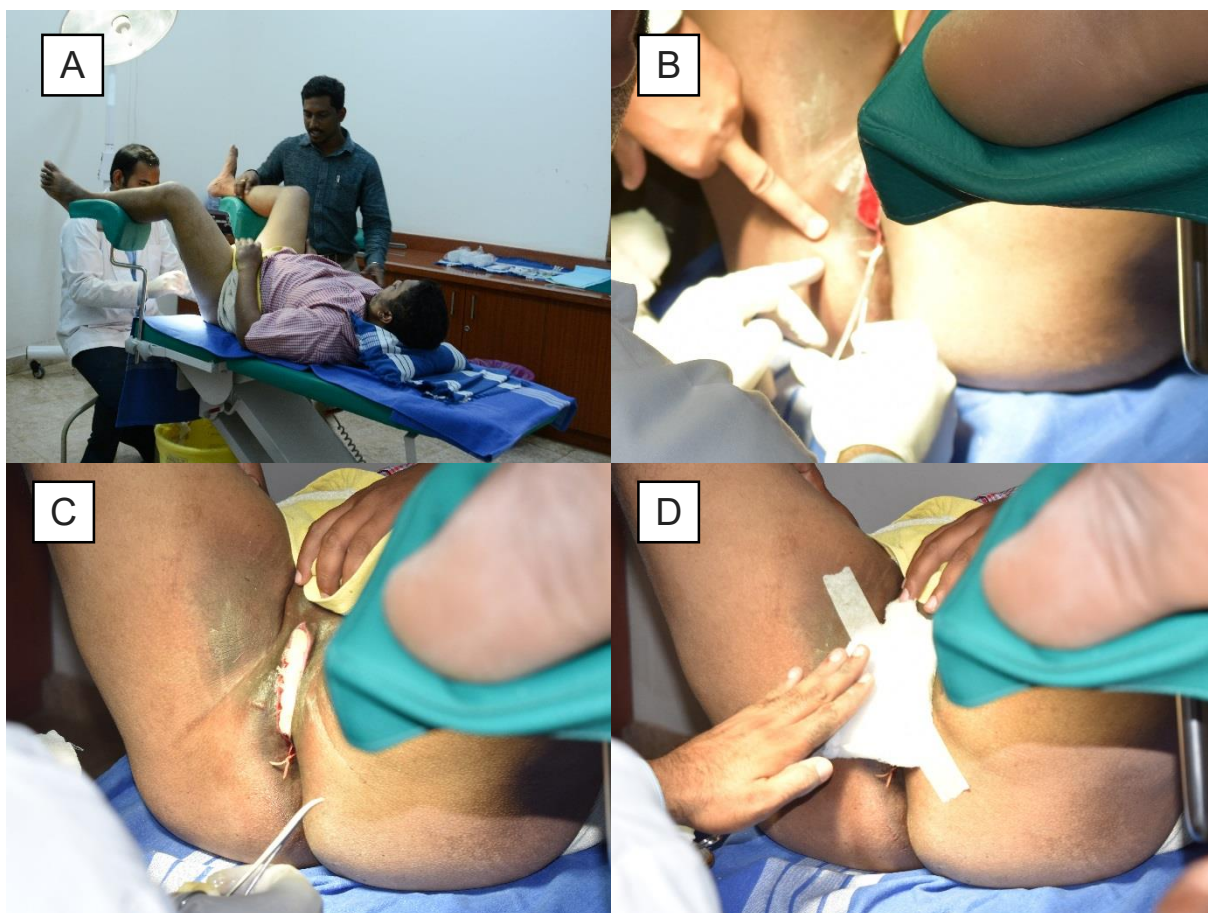


Fig. X5. *kSara sUtra* 交換手術の様子

A) 30秒で終わるので麻酔は使用しないとのこと。しかし患者はうめき声をあげていて痛そう。  
 B) *kSara sUtra* 交換中。 C) *kSara sUtra* 交換後 2%リドカインゲルを塗り、さらに *Jatyadi Taila* (薬用オイル) をしみ込ませたガーゼを患部に当てている。 D) テーピングして終了。



Fig. X6. *kSara sUtra* 交換の様子

手術糸を瘻管に通して、*kSara sUtra* にかけて手術糸で引っ張り、*kSara sUtra* を瘻管に通して結紮する。



Fig. X7. 糸交換時に使用していた薬剤



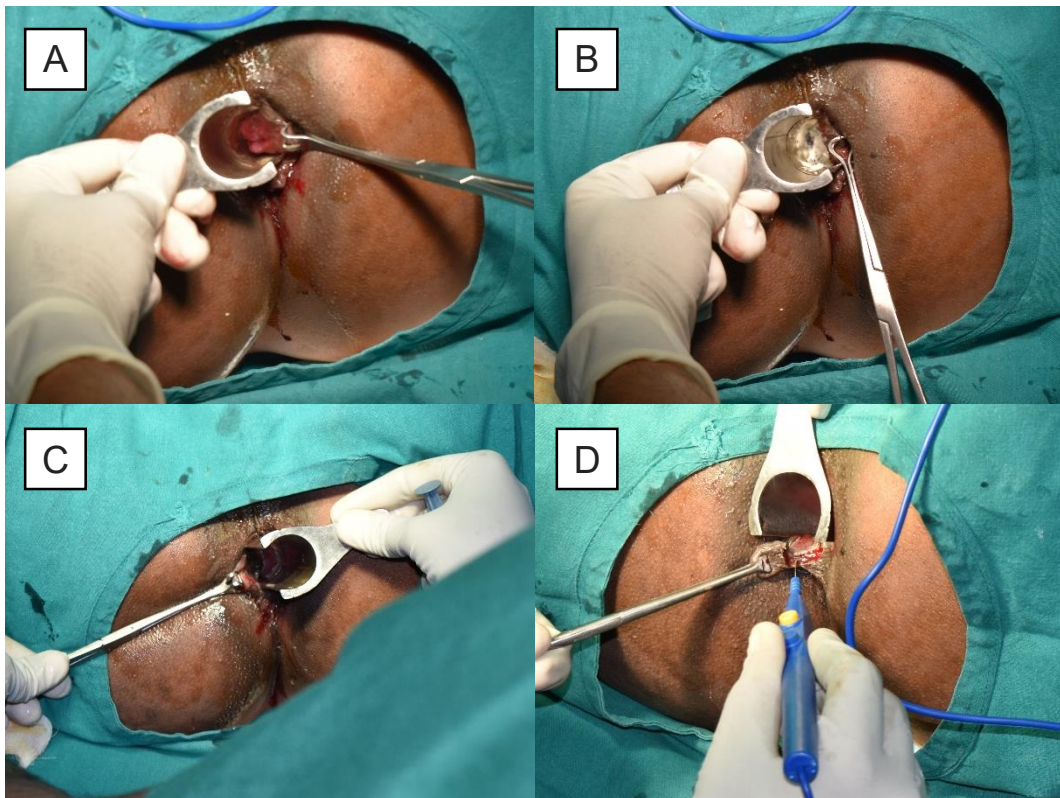


Fig. X8. 痔核切除術に *kSara* が用いられる例

- A) 局所麻酔後の術前部位（組織が赤味を帯びている）.
- B) 白色泥状の *kSara*（pH14 と言っていた）を肛門内に塗布し、1分放置.
- C) 塗布した *kSara* 洗浄後の様子. 組織の色は変化し、やや黒みを帯びていた.
- D) 電気メスで痔核切除している様子.

インド，ケララ州 Nechiyil Ayurveda クリニック見学



Fig. X9. 電気炉

吉光らの報告では牛糞と藁で製した燃料を用いて *kSara* を調製している事が報告されていたが<sup>11)</sup>，ここでは電気炉を用いて *kSara* を調製する。



Fig. X10. *kSara* 調製に用いる素焼きの容器



インドで *snuhl* 乳液に代替される乳液



Fig. X11. *Euphorbia tirucalli* と *E. tirucalli* 乳液

Dr. Sasikumar Nechiyil によると *E. tirucalli* 乳液は *snuhl* 乳液と薬効が同等である。



Fig. X12. *Calotropis gigantea* (*Arca*, アルカ) と *C. gigantea* 乳液

インド各地に自生する。I-AIM Healthcare Center の医師によると *Arca* 乳液は *snuhl* 乳液より薬効が劣るが、セカンドチョイスとして使用することもある。