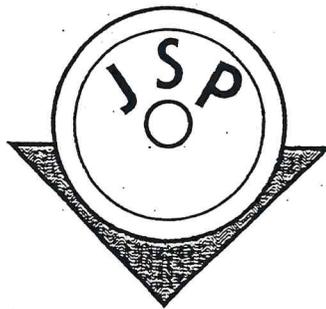


日本生薬学会第45回年会

1998、仙台

講演要旨集

The 45th Annual Meeting of
the Japanese Society of Pharmacognosy
1998, Sendai
Abstract Papers



平成10年9月4日(金)・5日(土)

日本生薬学会

共催 日本薬学会

ツムラ中央研究所
久保 正良

はじめに

病原性大腸菌 O-157 による食中毒で 1996 年に日本中が大騒ぎとなったことは記憶に新しい。また、1995 年にはインドネシア・バリ島からの旅行者に多数のコレラ患者が発生し、大きな話題となった。多くの人々が海外に旅行するようになり、国内では死語となったコレラなどの感染症に罹患するおそれは増大の一途をたどっている。さらに感染症に対する人類の救世主として登場した抗生物質もその乱用によって、多くの薬剤耐性菌特に MRSA やバンコマイシン耐性腸球菌等が出現し問題となっている。このような状況において、抗生物質以外の手段で感染に対処する方法を研究することはきわめて意義深いと思われる。本稿では漢方方剤をスクリーニングし、コレラによる下痢を抑える可能性について検討したので報告する。

I. コレラによる下痢の発症メカニズム

まず、コレラ菌感染によってどうして下痢が起こるのかについて簡単に述べる。経口的に侵入したコレラ菌が、小腸粘膜上皮内で増殖しコレラトキシン (CT) を産生する。CT は、1 個の A サブユニット (CTA) と 5 個の B サブユニット (CTB) から成る。CTA は、NAD から ADP-リボースを切り出して、基質となる蛋白に転移させる ADP-リボシルトランスフェラーゼ (ART) 活性を持つ。この CTA が腸管粘膜上皮細胞の GTP 結合蛋白質 (Gsa) のアルギニン残基を ADP-リボシル化し¹⁾、アデニル酸シクラーゼの持続的な活性化を引き起こした結果、粘膜細胞内の cAMP 濃度が上昇しプロテインキナーゼの作用によって小腸内で水分と Cl⁻の透過性亢進と Na⁺吸収阻害が起こり、激しい水様性下痢を引き起こす²⁾。

このようにコレラ菌による下痢は、毒素自体の作用によるため、実験にはコレラ菌その物ではなく、CT を用いることにした。

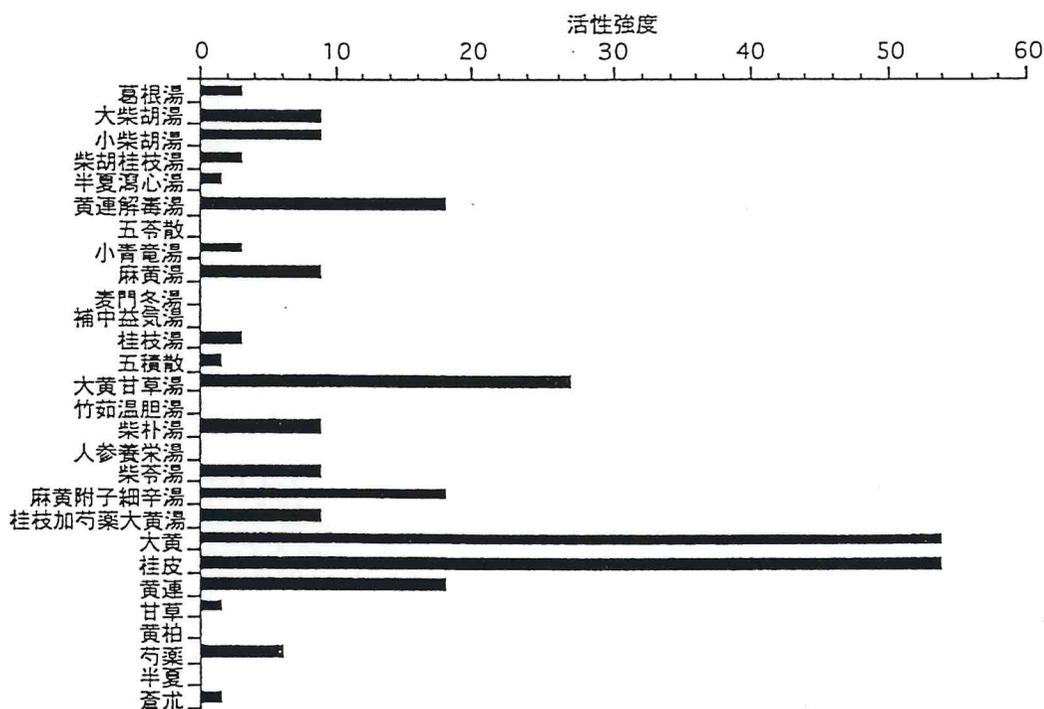
II. 漢方方剤および構成生薬の抗コレラトキシン作用

次に、消化器系の疾患および感染症等に頻用される各種漢方方剤を中心に、培養細胞を使用して形態変化を観察する方法と、CT の ADP-リボシル化反応をみるアグマチンアッセイ法を用いスクリーニングした。

1. CHO 細胞の形態変化

この試験は、細胞内の cAMP 濃度上昇により CHO 細胞が球形から紡錐形へと形態変化する性質³⁾を利用し、位相差顕微鏡下で判定する。CT 10ng と漢方方剤水溶液 10mg/ml を反応させ、得られた最小阻害活性濃度の逆数でしめた阻害活性強度を図 1 に表した。その結果、大黃甘草湯が強い抗 CT 作用を示し、構成生薬では大黃と桂皮に作用をみとめた。

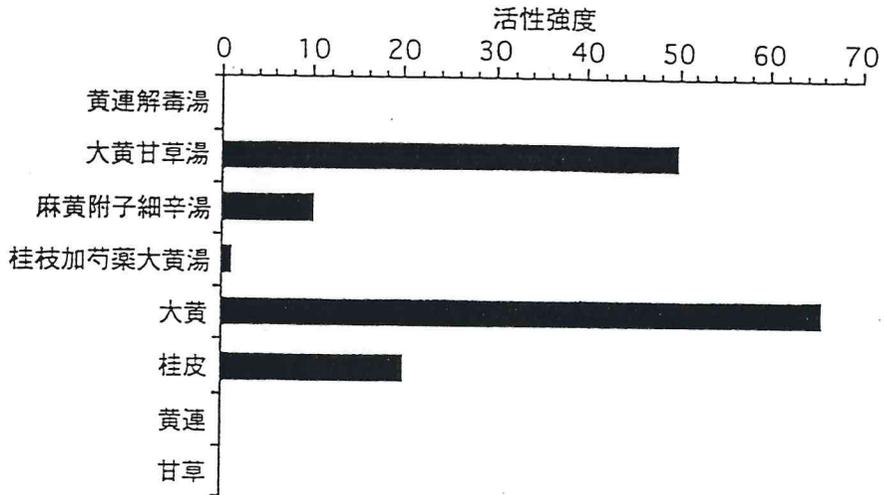
図 1 漢方方剤及び生薬の CHO assay における抗コレラトキシン活性



2. アグマチンアッセイ法

ART 活性は、その標的アミノ酸であるアルギニンの誘導体アグマチンを基質として、[アデニン-¹⁴C] NAD の存在化で形成される [¹⁴C] ADP-リボシル化アグマチン量を測定することで評価した。CTA 1μg と漢方方剤の水溶液を反応させた結果を図 2 に示す。1 と同様に大黃甘草湯に強い抑制作用をみとめ、大黃にも強い作用をみとめたことから、この作用本体は大黃が担っていると推察された。

図2 漢方方剤及び生薬の Agmatine assay における抗コレラトキシン活性



3. 結紮腸管ループ法

1と2の結果から、大黃につきマウスおよびウサギの小腸結紮ループ内の液体貯留活性を指標とした生物活性試験を行った。その結果、CT 100ng/ループに対して、大黃 30 μ gで100%液体貯留を抑制した。このことより大黃が、コレラによる下痢に対して有効な治療手段となる可能性が示唆された。

III. 大黃成分 (RG-タンニン) の抗コレラトキシン作用

IIの結果を踏まえ各種大黃成分につき試験を行ったところ、RG-タンニンがART阻害物質であると判明した。RG-タンニンは、CTAによるGsaのADP-リボシル化も阻害し、CTによるマウスおよびウサギ腸管内液体貯留をも顕著に抑制した。Lineweaver-Bürkのプロットによる解析から、RG-タンニンはCTAのNADに対する親和性を変化させず、アグマチンに対する親和性を低下させることによってART活性を阻害していることが明らかとなった。また、RG-タンニンはCTBサブユニットと標的細胞上のレセプター(ガングリオシドGM1)との結合には何ら影響を与えなかった。

結論

IIとIIIより、漢方方剤・大黃甘草湯にコレラ性下痢の抑制作用を見出し、この作用の本体が構成生薬・大黃であることを明らかにした。さらに大黃成分の検索から、RG-タンニンがCTAに特異的に作用して、そのART活性を阻害し、コレラ独特の水様性下痢を

抑制することが解った。RG-タンニンはコレラのみならず毒素原性大腸菌の下痢原因トキシン (LT) の ART 活性も阻害することから、一般的旅行者下痢症にも有効な薬剤となる可能性が示唆された。

おわりに

大黃は古くから瀉下作用をもつことで洋の東西を問わず広く使用されてきたが、一方で細菌性の下痢にも用いられ、効果を上げてきたことも事実である。瀉下作用の有効成分はセンノサイド類で、sennoside A は腸内細菌によって rhein anthrone に変換され強い活性を発現することが知られている⁴⁾。また、大黃のアントラキノン類で、aloemodin に赤痢菌、腸チフス菌、コレラ菌に対する抗菌作用が報告されている⁵⁾。その作用機序は核酸および蛋白質の合成阻害による。今回の実験により、大黃に抗菌作用ではなく直接 CT の活性を抑制する作用が見出された。その機序は、RG-タンニンが CTA の ART 活性を特異的に阻害するものである。コレラに対して有効な対抗手段の見出せない現状では、このようなまったく違った観点からのアプローチも有効ではないかと思われる。

これはほんの一例であるが、漢方方剤の中にはまだまだ未知の作用を持つ物質が含まれている可能性を秘めている。今後、抗生物質とは異なる作用機序に基づく漢方生薬の新しい展開が期待される。

謝辞：本研究は、千葉大学医学部微生物第二講座・野田公俊教授の御指導のもとツムラ中央研究所・松浦大輔博士を中心に生薬化学研究グループの協力をえて行われたものであり、ここに深く感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、有益な御助言を賜りました(株)ツムラ・山本武司博士、林 紘司博士、小松靖弘博士の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Cassel, D. and Pfeuffer, T. : Mechanism of cholera toxin action: Covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 ; 2669-2673, 1978.
- 2) 野田公俊：コレラ菌の毒素. Medical Immunology 27 ; 407-415, 1994.
- 3) Guerrant, R.L., Brunton, L.L., Schnaitman, T.C., et al. : Cyclic adenosine mono phosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology : a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect. Immun. 10 ; 320-327, 1974.
- 4) Hattori, M., Kim, G., Motoike, S., et al., : Metabolism of Sennosides by Intestinal Flora. Chem. Pharm. Bull. 30 ; 1338-1346, 1982.
- 5) 春田良典、丁 宗鉄、荒川和男、他：大黃の抗 *Bacteroides fragilis* 活性成分. 和漢薬シンポジウム 16 ; 2-3, 1983.