

氏 名 (生年月日) ^こ ^{けん} ^ば 呉 剣 波 (1984 年 9 月 27 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 187 号

学位授与の日付 2020 年 3 月 20 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 Research on the *in vitro* vasorelaxant constituents of Sanoshashinto and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats
(三黄瀉心湯の血管弛緩作用成分の解明と自然発症高血圧ラットに対する降圧効果)

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 松 田 久 司

(副査) 教 授 田 中 智 之

(副査) 教 授 矢 野 義 孝

論 文 内 容 の 要 旨

Introduction:

Antihypertensive drugs, usually in the market, are synthetic drugs which reduce the blood pressure rapidly. With the long-time using of synthetic drugs by patients, the side effects have gradually become manifest. For this reason, researchers have sought to find drugs having low side effects and shifted their focus onto the traditional and folk medicines, which are expected to produce good vasorelaxant and antihypertensive effects. But these medicines are complicated drugs containing a lot of components and hard to be elucidated. Sanoshashinto, also called SanHuangXieXinTang (SHXXT) in China, originated in the Essential Prescriptions of the Golden Cabinet (Jin Kui Yao Lue). It is composed of three materials: Rhei Rhizoma (DaHuang in Chinese medicine, DH), Scutellariae Radix (HuangQin in Chinese medicine, HQ), and Coptidis Rhizoma (Chinese HuangLian in Chinese medicine, CHL), and has been used to lower body temperature and dissipate body dampness since ancient times. Recently, it was found that SHXXT could relax vascular contractions *in vitro* and lower blood pressure in patients, but detailed research of SHXXT are few. Therefore, in this study, connecting HPLC and principal component analysis (PCA), *in vitro* and *in vivo* experiments, a detailed research about vasorelaxant and antihypertensive effects of SHXXT were proceeded.

Chapter I: Vasorelaxant effects of extracts and fractions on the *in vitro* experiments

SHXXT, each material (DH, HQ, CHL), and different combinations (DH and HQ, DH and CHL, HQ and CHL) were extracted with methanol and fractionated into water-, *n*-butanol-, and ethyl acetate- fractions. Then effects of all extracts and fractions (total 28 samples) on high-concentration of KCl (High K⁺)- or noradrenaline (NA)-induced contractions of isolated rat aortic rings or helical strips were examined. The results showed that, in the endothelium-denuded strips, SHXXT methanol extract (SHXXTM) relaxed the NA-induced vascular contraction with EC₅₀ of 16.2 ± 1.1 µg/mL, and relaxed the High K⁺-induced vascular contraction with EC₅₀ of 65.1 ± 5.5 µg/mL. In the endothelium-intact rings, SHXXTM relaxed the NA-induced vascular contraction with EC₅₀ of 10.5 ± 0.1 µg/mL.

Chapter II: The results of HPLC analysis and PCA

Total 39 peaks were detected in SHXXTM. Among of them, 11 compounds were identified compared with the reference standards, and the amounts of baicalin, berberine, wogonoside, coptisine, baicalein, and palmatine were higher than the others. The other extracts and fractions were also analyzed by HPLC.

All HPLC analysis and *in vitro* experimental data were analyzed by PCA software. In the PCA calculation, a data matrix which contained 28 objects and 39 variables was used to examine the Loading factors which can reveal the important variables for the main variation in the data. The results showed that the first two principal components (PCs) could summarize 77% of the HPLC information, and on No.32 (palmatine) had the most positive Loading-1 factor, while peak No.18 (baicalin), No.24 (wogonoside) and No.31 (baicalein) had the negative Loading-1 factor. Peak No.18, No.24, and No.33 were comparatively larger in the Loading-2 factor than others (Fig. 1, Fig. 2). Connected all HPLC analysis and EC_{50} data, principal component regression analysis was used to calculate whether the results were reliable or not. The results showed that the values of predicated EC_{50} and experimentally observed EC_{50} were almost same, and regression coefficients were larger than 0.99. From these results, baicalin, berberine, palmatine, baicalein, and wogonoside were thought to contribute significantly to the pharmacological activity. The contents of baicalin and berberine were relatively higher than the others, also the results in the *in vitro* experiments showed that the baicalin-berberine (BB) combination had almost same EC_{50} ($15.3 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$) compared with SHXXTM. Therefore, the BB combination were considered as the main antivasular contraction constituents and could replace SHXXTM *in vitro* experiments.

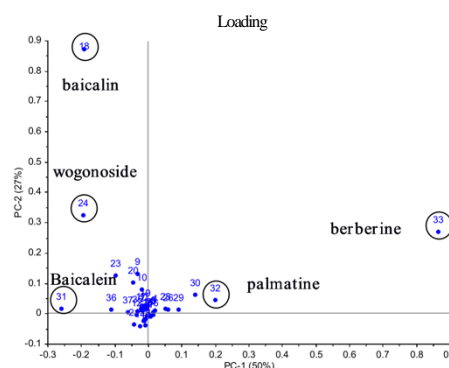


Fig. 1 Loading plots calculated by PCA

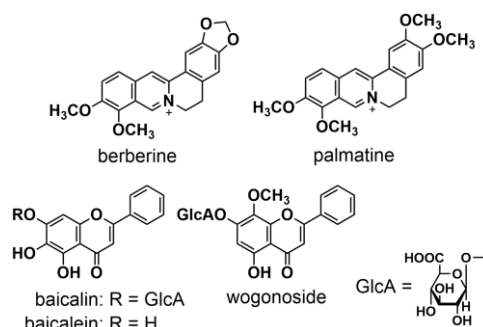


Fig. 2 Chemical structures of 5 main compounds

Chapter III: *In vitro* mechanism research and *in vivo* study

To clarify which channels or pathways are involved in the vasorelaxant effects, I conducted preliminary *in vitro* experiments using the BB combination (the concentrations of BB were equivalent to SHXXTM) and several activators or inhibitors. The results showed that in the case of pretreatment with N^G -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, an inhibitor of nitric oxide synthetase (NOS), the vasorelaxant effects were obviously reduced; pretreatment with diazoxide, a K_{ATP} channel activator, the vasorelaxant effects were slightly increased; pretreatment with rottlerin, a large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channel activator, and calphostin C, a protein kinase C inhibitor, the vasorelaxant effects were increased, especially calphostin C. These results showed that the BB combination produced vasorelaxant effects by activating the NO/cGMP pathway in the endothelium-intact rings, and the BK_{Ca} channel, K_{ATP} channel, and the DAG/PKC/CPI-17 pathway might be involved.

With regard to *in vivo* study, from the fourth week onward, SHXXTM (200–800 mg/kg/d, *p.o.*) and the BB combination (32 + 26 mg/kg/d, *p.o.*) significantly reduced increase in the rate of systolic blood pressure and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. The results indicated that the SHXXTM and the BB

combination exhibited significant antihypertensive effects *in vivo*.

Conclusion:

In this study, I provided the first piece of evidence that baicalin and berberine are the main effective constituents in SHXXT. Furthermore, several mechanisms of action by the BB combination were revealed using several agonists and inhibitors. All of the results indicated that SHXXTM exhibited significant antihypertensive effects, and the BB combination could replace SHXXT for use as an antihypertensive drug in the future.

審査の結果の要旨

現在、医療の現場で使用されている降圧薬はいずれも合成医薬品であり、降圧作用は強いものの、長期使用により副作用を生じる場合が多い。副作用が少ない降圧作用を期待し、漢方薬などの伝統薬の研究がされているが、複雑な多成分系の薬物であるため、詳細な解明研究は進んでいない。そこで申請者は、3種類の生薬（大黄、黄芩、黄連）から構成される漢方薬、三黄瀉心湯（以下 SHXXT）に *in vitro* 試験での血管弛緩作用や臨床試験での血圧降下作用が報告されていることに着目し、これを例として主たる関与成分の解明を行った。すなわち、申請者は、降圧効果に関与する成分を明らかにする目的で3種の生薬とそれらを組み合わせて抽出したエキスを調製し、*in vitro* 試験での血管弛緩作用を調べるとともに HPLC 分析と多変量解析の一種である主成分分析 (PCA) を併用し、*in vivo* 試験も含めて研究を進めた。

1) 各種抽出エキスおよび分画の血管弛緩作用

SHXXT およびそれを構成する大黄、黄芩、黄連とそれぞれの2種の組合せについてメタノール抽出エキスを作成し、さらに溶媒分画を行い、合計28種のサンプルを得た。それぞれについて、ラット胸部大動脈の螺旋状条片またはリング標本を用いて高濃度 K^+ およびノルアドレナリン (NA) による収縮に対する弛緩作用を検討した。SHXXT のメタノール抽出エキス (SHXXTM) に関して、内皮を剥離した螺旋状条片では NA 収縮に対して 50% 有効濃度 EC_{50} は $16.2 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ 、高濃度 K^+ による収縮に対しては $65.1 \pm 5.5 \mu\text{g/mL}$ であり、内皮を保持したリング標本では、NA 収縮に対して $10.5 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ という結果であった。

2) HPLC 分析と PCA

SHXXTM の HPLC 分析で 39 ピークが検出され、それらのうち 11 ピークに相当する成分が同定可能であった。調製した 28 サンプルについて HPLC 分析を行い、得られた 39 ピークを主成分分析により解析したところ、ピーク 33 (berberine) やピーク 32 (palmatine) の多いエキス、ピーク 18 (baicalin) やピーク 24 (wogonoside) の多いエキスが重要であることがわかった。それらは血管弛緩作用が強かったことから、主成分分析の結果からの EC_{50} 予測値と実測 EC_{50} 値について主成分回帰分析を行ったところ良好な相関性が得られ解析の妥当性が確認できた。次に、SHXXTM には baicalin と berberine の含量が高かったことから、この2成分（以下 BB）の混合物について血管弛緩作用を検討したところ、SHXXTM の EC_{50} 値とほぼ同じ値を示し、2成分を除去したエキスには弛緩作用の著しい減弱が観察

された。従って、この2成分はSHXXTMの主たる血管弛緩作用成分であり、BB混合物はエキスに取って代わるものであることを明らかにした。

3) 作用機序と動物実験

BB混合物を用い、血管拡張の作用機序について検討した。その結果、作用機序の一部には、内皮からの一酸化窒素の遊離を介した弛緩作用および電位依存性Caチャンネルの関与を明らかにし、その他の作用機序についても各種阻害薬や作動薬と併用した結果から考察を加えている。

さらに、自然発症高血圧ラットへの4週間以上の反復投与によって、SHXXTMおよびBB混合物に収縮期血圧の増加や左心室壁の肥大に対する抑制作用を明らかにした。

以上、申請者は、三黄瀉心湯の血管拡張作用と降圧作用の主たる有効成分はbaicalinとberberineであることを明らかにし、三黄瀉心湯の作用は、baicalinとberberineの混合物で置き換えることが可能であることを明らかにした。漢方薬に関して、構成生薬を組み合わせることによって成分組成の異なる多種類のエキスと分画を調製し、それらのHPLC分析結果と薬理実験結果に多変量解析のひとつである主成分分析を適用することによって有効成分を解明した。今回の研究手法は、漢方薬の有効成分の解明研究に貢献するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。