

X線照射とマイトマイシンの併用によって起こる 皮膚障害に対するイチョウ葉エキスの効果

星薬科大学

太 田 節 子

One treatment for cancer is the combination of radiotherapy and chemotherapy. Either radiotherapy or chemotherapy has side effects, such as skin injury. In particular, skin injury in combination therapy is more serious compared with it in either radiotherapy or chemotherapy. We already established the method to estimate protective effects for skin injury by X-ray irradiation, and we found protective effects in many crude drugs. Previous report showed that extracts of *Ginkgo Biloba L.* have various pharmacological effects. However, other effects of extracts of *Ginkgo Biloba L.* have not been known. In this study, we examined protective effects of extracts of *Ginkgo Biloba L.* for skin injury induced by X-ray irradiation combined with mitomycin in mice.

1 緒 言

癌治療において手術、放射線照射、制癌剤投与は3本の柱で、癌の種類、病巣の位置、進行度で各々が使い分けられ、また併用されている。放射線照射と制癌剤投与の共通の副作用として、白血球減少と皮膚障害がある。白血球数の急減は免疫力の低下の危険性から、治療計画の中断にもかわる重要課題とされ、G-CSFなどの治療薬が用いられている。一方体外から照射された放射線は必ず皮膚を通過して体内に入るため、照射部位の皮膚は湿性のただれや潰瘍を発生し、患者は日常生活の中で常に痛みさらされている。また、制癌剤や被爆による全身の脱毛は大部分の患者に生じるにもかかわらず、生命の危険がなく、将来的には再生することから殆ど留意されていない。しかし再生までの長期間、療養中の患者は四六時中、癌の恐怖を意識づけられていることになり、多大なストレスは回復効果にも影響する。そこでこれらの制癌剤や放射線被曝による皮膚障害に対する

予防薬の開発を目的とする研究を行った。

著者らは30kVpの軟X線を用いることにより、一般のX線(200kVp)の場合と類似した皮膚障害モデルを作製し、この独自の方法によれば透過力の弱いX線が皮膚の表面に集中するため、消化管障害や造血機能障害を併発せず皮膚障害を観察できる利点があることを認めた。また障害の程度をスコア表を用いることにより計量化し、予防薬開発のための放射線皮膚障害防護効力試験法を確立した¹⁾。その結果、含イオウ化合物²⁾、フェルラ酸関連化合物³⁾生薬エキス⁴⁾核酸構成物質⁵⁾漢方方剤⁶⁾川キュウ分画物⁷⁾キダチアロエ⁸⁾など多数の薬物に有効性を認めた。この中に最近健康食品として人気のあるイチョウ葉エキスの分画物がある。

イチョウ(*Ginkgo Biloba L.*)は地質を問わずよく繁茂するために、街路樹あるいは神社、寺の境内などで植栽されている馴染みの深い植物である。種子のギンナンは嗜好性の食品として、また鎮咳、去痰作用のある生薬として広く愛用されている。葉は防虫、しもやけなど民間薬として用いられていたが、1965年にドイツで緑葉エキスを動脈の血液循環を促進し、毛細血管の血流もスムーズにする働きが強力であることが認められてからは、血行障害や老人性痴呆症の治療薬として広く使われている。しかし、薬効本体の解明が充分で



Protective Effects of Extract from Leaves of *Ginkgo Biloba L.* on Skin Injury Induced by X-ray Irradiation Combined with Mitomycin in Mice

Setsuko Ohta

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Hoshi University

ない状況から、日本では健康食品として扱われている。

イチヨウの緑葉抽出物に含まれるケルセチン、ケンフェロール等のフラボノイドやビロバリド、ギンゴリド等のテルペノイドは黄葉になる直前の8月頃に最も含有量が高いことも知られており、原料の緑葉はこの時期に収穫されている。

また、イチヨウ緑葉エキスの末梢血行改善効果に着目してC3H系マウスを用いた育毛効果の報告もあるが、我々はICR系マウスを用いた放射線誘発皮膚障害防護効果を検討してきた。そこでイチヨウ緑葉より抽出した分画物の効力試験を行った結果、放射線によって生じる脱毛、潰瘍などの障害を90%以上抑制する画分を得た。これらの有効画分について制ガン剤投与によって発症する脱毛に対する、抑制効果の有無を測定し、制ガン剤副作用抑制への応用の可否を検討した。

2 実験

実験材料および試料の調整法：イチヨウ緑葉は星薬科大学構内のイチヨウ樹（雌株、樹高10 m、

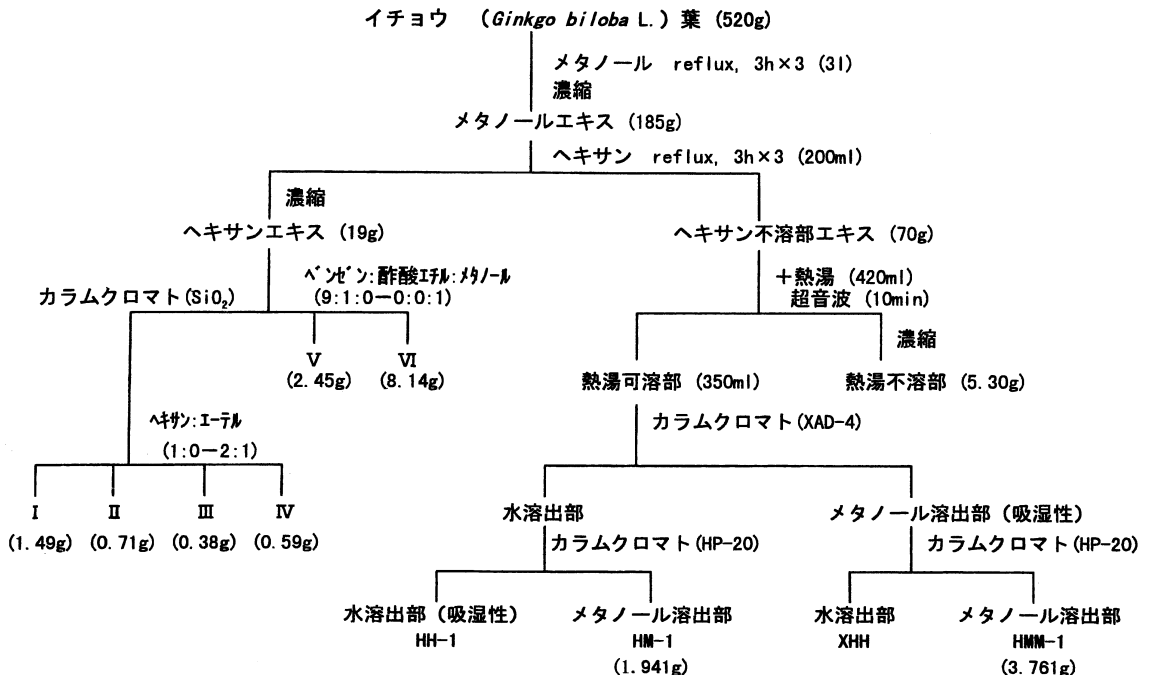
幹回り1.4 m）の葉を8月初旬に採取し、加熱乾燥した後、メタノールで抽出してメタノールエキスを作製し、図1に示すように分画した。

分画物は注射用蒸留水を加えた後超音波処理し、溶解または懸濁させ、必要に応じて0.4N-NaOHを用いてpH7-8に調整した。この処理法で不溶物が多い画分は遠心分離した後上清のみを用いた。これらの試料は投与液量がマウスの体重30g当り0.3mLになるように調整した。

8種類の制ガン剤は臨床で用いられている市販品を入手し、注射用蒸留水に溶解させた。

8種類の制ガン剤

塩酸ニムスチン
シクロホスファミド
ドキソルビシン
ビンクリスチン
ブレオマイシン
フルオロウラシル
マイトマイシン (MMC)



エトポシド

実験動物

日本生物材料センターより購入した生後5週令のICR系雄マウスを1週間予備飼育した後、実験に使用した。マウスは1群8匹とし、4匹ずつ1ケージに入れ、繁殖用固型飼料を与え、飲料水は自動給水装置により自由に摂取させた。

X線照射法

ソフテックス製CMBW特型軟X線発生装置を用い、30kVp、10mA、フィルターは使用せず、照射距離40cm、線量率200R/min（線量計：ビクトリン500型 プローブ：30-330型で測定）の条件で除毛を全くしていないマウスの背部より1200Rを全身照射した。

試料の投与方法

MMCは腹腔内注射又は皮下注射し、イチョウ分画物は腹腔内注射、皮下注射又は経口投与を行った。

皮膚障害効力試験法

照射後20日頃より、マウスの頭部および背部に見られる皮膚障害を照射後40日間、週2回、定時に観察した。これを症状と障害面積を考慮して定量的に評価したスコア表（表1）に基づき、頭部と背部に発生した皮膚障害のスコアを計測した。皮膚障害防護効力は頭部、背部又は頭部と背部併せたスコアを1群毎に合計し、対照群と薬物投与群について同一観察日あるいは観察期間中に最悪の症状を示した時のスコアを次式に代入して求めた。

$$\text{皮膚障害防護効力(\%)} = \frac{\text{対照群のスコア} - \text{薬物投与群のスコア}}{\text{対照群のスコア}} \times 100$$

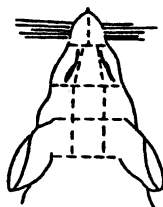
血清中の硝酸イオンの測定

マウスをエーテル麻酔下で開腹し、腹部下行大静脈から0.8～1.0mL採血し、血清を得た。次に0.3NのNaOHと5%の硫酸亜鉛で除蛋白し、上清を硝酸イオン測定検体とした。この検体を用いてGriess法にて硝酸イオン濃度を算出した。

表1 放射線皮膚障害スコア表

1) 頭部皮膚障害

Reaction of head	(頭部の反応)	Score
No visible effect	(無影響)	0
Slight epilation	(軽微脱毛)	1
Severe epilation	(重症脱毛)	3
Complete epilation	(完全脱毛)	6
Epilation of eyelid	(まぶたの脱毛)	3
Slightly fused eyelid	(軽微なまぶたの癒合)	5
Severely fused eyelid	(重症のまぶたの癒合)	10
Vasodilatation of auricle	(耳介の血管拡張)	6
Slight atrophy of auricle	(耳介の軽微萎縮)	9
Severe atrophy of auricle	(耳介の重症萎縮)	12



頭部皮膚障害のスコアは図のように耳のつけ根の後を結んだ線より前が頭部と仮定し、ほぼ等面積の11ブロックごとに、1)のスコアをあてはめ、11カ所のスコアの合計を一匹のスコアとして数値処理をした。

2) 背部皮膚障害

Reaction of dorsum	(背部の反応)	Score													
		Injury area (×10 ² mm ²) (障害面積)													
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-12	12-	
No visible effect	(無影響)	0													
Slight epilation	(軽微脱毛)	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	
Severe epilation	(重症脱毛)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Fairly complete epilation	(準完全脱毛)	4	5.5	7	8.5	10	11.5	13	14.5	16	17.5	19	20.5	22	
Complete epilation	(完全脱毛)	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	
Complete epilation and moist exudation	(完全脱毛と湿潤性渗出)	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	
Ulceration	(潰瘍形成)	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52	

背部皮膚障害のスコアは、2)の7段階の症状と障害面積より該当スコアを求め、症状の異なる部位すべてを合計し、それを一匹のスコアとして数値処理をした。

3 結果および考察

3.1 イチヨウ葉抽出物の放射線皮膚障害に対する防護効果

図1に示す分画法によって得られたヘキサンエキスとヘキサンエキスの分画物について放射線照

射で誘発された皮膚障害に対する防護効果を表2、3に示した。ヘキサン可溶部分画物はヘキサンエキスをシリカゲルによるクロマトグラフィーを行い、ヘキサンとTHFの混液で溶出させて、5つの画分(S1～S5)に分画したものをを用いた。軟X線を全身に照射されたマウスの頭部および背

表2 イチヨウ葉ヘキサンエキスの放射線皮膚障害防護効力

試料	投与量 (mg/kg)	投与時期 (min)	投与方法	皮膚障害防護効力 (%)					
				頭部			背部		
				23日目	27日目	最悪時	23日目	27日目	最悪時
Hexane ext. 1000		前120	i.p.	95.7 ⁺⁺	91.9 ⁺⁺⁺	92.6 ⁺⁺⁺	89.2 ⁺⁺⁺	82.7 ⁺⁺⁺	76.3 ⁺⁺⁺
		前 60	i.p.	82.6 ⁺	97.3 ⁺⁺⁺	89.1 ⁺⁺⁺	82.5 ⁺⁺⁺	80.0 ⁺⁺⁺	78.0 ⁺⁺⁺
		前 60	p.o.	-13.0	-32.4	-40.0	-23.3	-44.0	-36.6
Hexane ext. 1000				29日目	31日目	最悪時	29日目	31日目	最悪時
				29日目	31日目	最悪時	29日目	31日目	最悪時
				29日目	31日目	最悪時	29日目	31日目	最悪時
Hexane ext. 1000		前 60	i.p.	87.8 ⁺⁺	91.9 ⁺	91.9 ⁺	93.2 ⁺⁺⁺	89.4 ⁺⁺⁺	89.7 ⁺⁺
		前 5	i.p.	20.7	35.0	32.5	41.6	32.1	33.9
		前 60	i.p.	47.6 ⁺	47.2 ⁺	40.7	35.6	31.2	31.3

1) 最悪時：観察期間（照射後40日）中で照射群と薬物投与＋照射群の各々の障害が最も悪化した時の平均スコアの比より算出した場合を示す。

2) 有意差検定：照射群と薬物＋照射群の各々のスコア間の有意差

+++; $p < 0.001$ ++; $p < 0.01$ +; $p < 0.05$

表3 ヘキサン可溶部の分画物 (s-1～5)

試料	投与量 (mg/kg)	投与時期 (min)	投与方法	皮膚障害防護効力 (%)					
				頭部			背部		
				32日目	35日目	最悪時	32日目	35日目	最悪時
S-1	400	前 60	i.p.	-52.0	-80.9	-58.8	-14.2	11.5	2.7
	100	前 60	i.p.	-52.0	-60.7	-52.0	-4.0	14.9	9.6
S-2	400	前 60	i.p.	81.4 ⁺⁺⁺	74.2 ⁺⁺	77.5 ⁺⁺⁺	82.9 ⁺⁺⁺	87.4 ⁺⁺⁺	83.9 ⁺⁺⁺
	100	前 60	i.p.	34.3	-60.0	-39.2	21.8	31.0	23.4
S-3	400	前 60	i.p.	3.9	4.5	3.9	42.2 ⁺	57.9 ⁺⁺⁺	50.6 ⁺⁺
	100	前 60	i.p.	18.6	16.9	18.6	33.9	43.3 ⁺	43.3 ⁺
S-4	100	前 60	i.p.	0	-24.7	-13.7	14.4	24.5	22.6
S-5	400	前 60	i.p.	-20.6	-36.0	-30.4	12.4	35.2 ⁺	25.3
	100	前 60	i.p.	-21.6	-19.1	-21.6	34.6 ⁺	32.6	32.6

部には照射後 20 日目頃より脱毛、湿性剥離、潰瘍などの皮膚障害が認められ、経時的に悪化していくが、40 日目頃には細く短い毛の再生が認められ、回復が始まった。これに対し、ヘキサシキス 1000mg/kg を腹腔内投与した群のマウスの大部分は観察期間中を通して障害が全く認められず、平均皮膚障害防護効力は約 90%であった。

また、ヘキサシンの分画物では画分 S-2 に特に強い防護効力が認められ、ヘキサシキス中の有効成分の大部分は S-2 に移行していることを認めた。

3.2 制ガン剤と放射線の併用によって誘発される皮膚障害モデルの作製

臨床上、副作用として脱毛が問題になっている制ガン剤 8 種について、マウスを用いて、LD50 を考慮した投与量、投与方法、投与回数などと皮膚障害の関係を検討した。制ガン剤としてニムスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、フルオロウラシル、マイトマイシン (MMC)、エトポシドの 8 種を選び、腹腔内投与、皮下投与又は経口投与により 1 回又は 5 回連続投与を行った。しかし制ガン剤の単独投与では 5 日連続投与においても脱毛が認められなかった。そこで、制ガン剤投与 2 日後に軟 X 線を照射した。照射線量はあらかじめ 400R から 1600R までの 6 種の線量を比較した結果、1200R 以下では照射による皮膚障害が全く生じないことから、1200R を照射して、制ガン剤と軟 X 線の併用による皮膚障害を観察した。その結果、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ブレオマイシンは約 50%のマウスに脱毛が認められ、ニムスチンとドキソルビシンは約 20～40%のマウスに脱

毛が認められた。これに対し、MMC の腹腔内投与は、約 80～100%のマウスに脱毛および湿性剥離などの皮膚障害が認められた。また MMC の皮下投与は背部全体に脱毛が認められない例もあったが、投与部位の重度の脱毛および潰瘍は、すべてのマウスで認められた。この様に投与部位に限られた場合は、表 1 に示したスコア表以外に新たなスコア表の設定が必要となるため、以後の実験は腹腔内投与で行った。

以上の結果より、MMC 6mg/kg を 1 回腹腔内投与した 2 日後に軟 X 線 1200R を照射し、照射後 40 日間、皮膚障害を観察した。また、この条件では MMC 単独又は放射線照射単独では殆ど皮膚障害が発現せず、両者を併用すると照射後 35 日目まで障害が悪化していく傾向が認められた (図 2)。

汎用されている 8 種類の制癌剤のうち、ドキソルビシンとブレオマイシンとエトポシドは臨床で重篤な副作用として脱毛が挙げられ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、フルオロウラシルも「現れることがある」。MMC、ニムスチンは「ときにみられる」と確率が下がるが明記されている。しかしマウスでは MMC に最も広汎な脱毛が認め

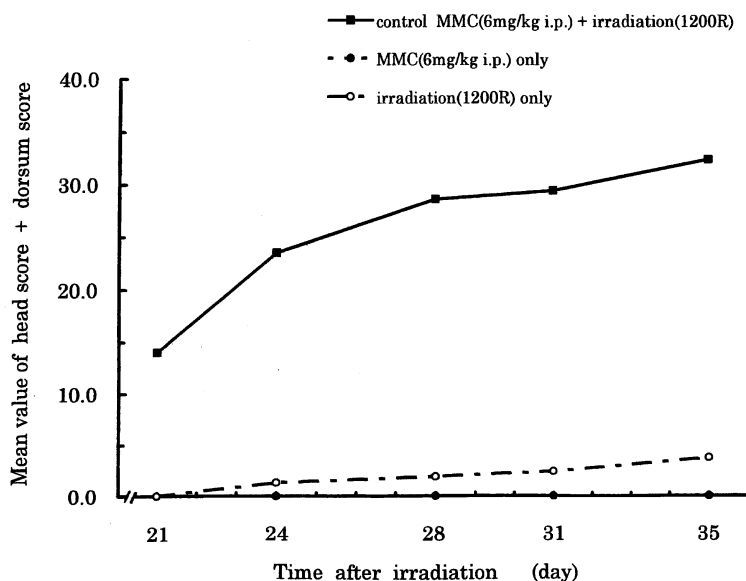


図2 制ガン剤と X 線照射の併用による皮膚障害

られ、エトポシドは毒性傾向が認められても脱毛は軽度であった。この結果よりヒトの頭部の脱毛とマウスの背部の脱毛の再生サイクルの違いが示唆された。

3.3 MMCと放射線の併用による皮膚障害に対するイチヨウ葉分画物の効力

図1に示したように分画して得られた画分をマウスに投与した後、MMCを投与し、2日後にX線1200Rを照射した。40日間観察し、MMC投与後照射した対照群とMMC投与前に分画物を投与し、MMC投与2日後X線照射した群を比較するとヘキサノエキ스는皮下投与で有効であった(図3)。

ヘキサノエキ스는腹腔内投与でも有効であったので(図はない)、図1に示したヘキサノエキスの分画物(Ⅱ～Ⅵ)を腹腔内投与した結果、ⅣとⅥに弱い効力が認められ(図4)、ⅡⅢⅤは無効であった。このⅣは放射線照射単独で起こる皮膚障害に有効であった表3のS-2画分に相当すると考えられるが、この実験条件ではS-2のような強い効力は認められなかった。今後、投与方法を検討することにより、より高い効力を期待できる。

また、図3に示したGb ext.はイチヨウ葉エキスとして市販されている製品の原料エキスである。これはフラボン配糖体が全体の1/4を占める程多いと言われていることから図1のヘキサノ不溶部の熱湯可溶部を分画して得られると考えられ、図1に示した。HM-1又はHMM-1

に相当することを薄層クロマトグラフィーで認めた(図5)。

特に原点が薄くなっていることからHMMがGbエキスに最も近いと考えられていたHHはGbエキスと全く異なることも認めた。これらHH、HM、HMMについて250、500、1000mg/kgの投与量で腹腔内投与、経口投与の条件でMMCとX線照射の併用実験による脱毛に対する予防効を

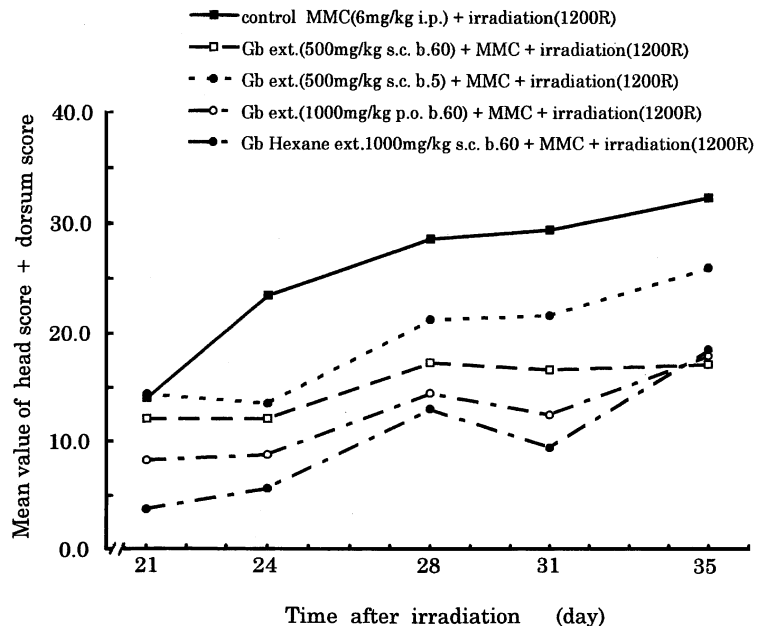


図3 制ガン剤とX線照射の併用によって起こる皮膚障害に対するヘキサノエキ스와 Gbext.の効

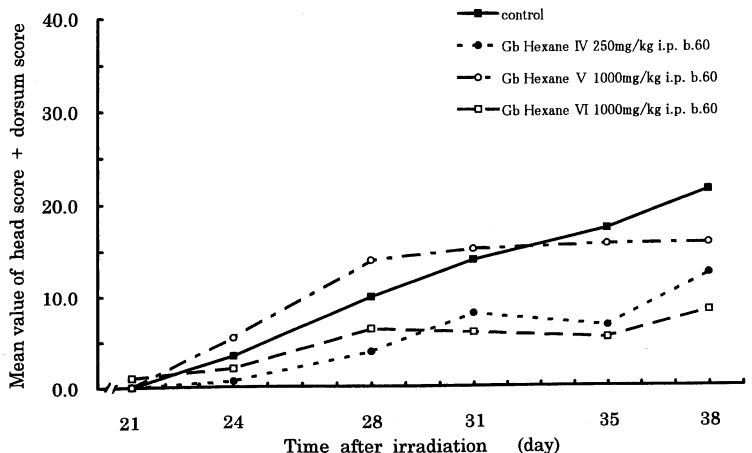


図4 制ガン剤とX線照射の併用によって起こる皮膚障害に対するヘキサノエキスの分画物の効

クロロホルム：メタノール：水（65：35：10）の下層

ブタノール：酢酸：水（3：1：1）

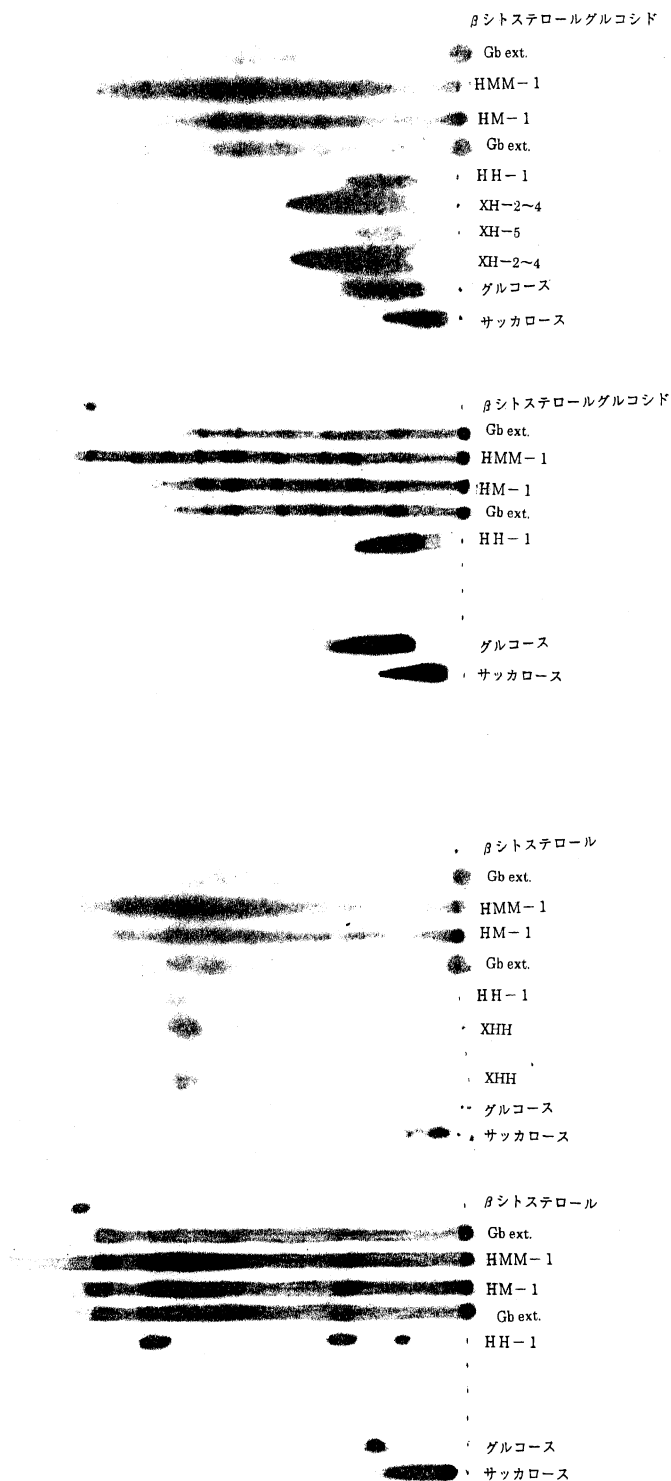


図5 ヘキサン不溶・熱湯可溶部分画物の薄層クロマトグラフィー

検討した結果、バラツキが大きく、有意な効が認められなかった。

3.4 イチョウ葉分画物の作用機序

放射線照射と MMC のような制癌剤のガン細胞に対する効果は共にガン細胞内の DNA の二重鎖切断とその不完全な損傷修復によって、ガン細胞にアポトーシスを起こすため、と考えられている。同時に副作用として発生する脱毛も毛母細胞が正常な機能を果たせない結果生じるとされている。そこで *in vitro* の実験でアガロースゲル電気泳動を用いて DNA ラダーを比較してみると、MMC により発生するラダーは Gb エキス添加により見られなくなりアポトーシスを抑制しているが、HH、HM、HMM はラダーが認められ、アポトーシスを抑制しなかった。しかし、フローサイトメトリーを用いる方法では MMC によってアポトーシスを起こし、細分化した細胞のピークと HH だけが一致した傾向を示したが Gb エキスと HM は正常群と類似したピークを示し、MMC を添加しない正常群よりわずかに左にずれた小さい細胞のピークを示した。このことは Gb エキスと HM がアポトーシスをほぼ抑制しているが、MMC より数は少ないがアポトーシスを起こしている細胞もあることを示している。HMM は Gb エキス、HM よりも完全にアポトーシスを抑制し、正常群と一致したピークを示した。また、ヘキサン不溶、水可溶部の粗エキスを全く同じ傾向を示したことから、この粗エキスを

中にはGbエキス以上にMMCによるアポトーシスを完全に抑制する成分が含まれており、精製法を変えることにより、有効性の高い画分が得られることが示唆された。

また、DNA鎖切断は照射により発生した遊離基によることから、活性酸素が関与していると言われている。そこで照射したマウスの血清中の一酸化窒素ラジカル($\cdot\text{NO}$)の変動を測定し、障害の原因となる $\cdot\text{NO}$ 合成酵素(NOS)を阻害する効果をHH、HMM照射前投与で比較した(表4、図6)。その結果、照射によって増加する血清中の $\cdot\text{NO}$ 量をHH、HMM投与群は低下させる効果はなく、HH、HMM単独投与の場合も有意な差はなかったが図6よりHMM分画の精製の改良によってはNOS抑制効果も期待できる。

表4 イチヨウ抽出分画投与マウス血清硝酸イオン

	硝酸イオン(μM)
対 照	51.79 $\pm$ 33.49
HH分画	85.23 $\pm$ 42.38
HH分画/照射	111.93 $\pm$ 32.92
HMM分画	73.26 $\pm$ 63.42
HMM分画/照射	139.07 $\pm$ 68.02
照射/37分	109.63 $\pm$ 43.37

各群間に有意差はANOVA分析で“ある”とは言えない

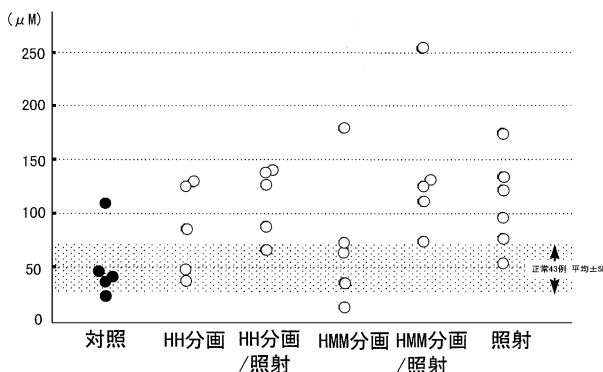


図6 照射後マウスの血清硝酸イオン に対するHH、HMM分画の効

4 総 括

本研究では、ガン治療時に併発される脱毛を予防する薬物を検索し、将来において最近やっと重要視されはじめた患者のクオリティー オブ ライフ(QOL)の一助になることを目的とした。しかし、放射線皮膚障害防護効力試験法を用いイチヨウ葉画分中に著しく強い有効画分を認めていることから、制癌剤による脱毛に対する効果の検討を期待したが、8種のうち特に臨床的に脱毛が激しい制癌剤にも投与部位のわずか周辺5mm直径くらいの重度の脱毛が認められただけであった。MMCは最も脱毛が広汎に生じたが、バラツキもあることから、本法では脱毛の発生しない低線量のX線と脱毛の発生しない量のMMCを腹腔内投与し、その併用による相乗作用により生じた脱毛についてイチヨウ葉エキスの効果を検討した。その結果、有効成分を確認するまでには至らなかった。しかし、アポトーシス抑制効果も認められたことから、分画精製をさらに繰り返すことにより不純物によるマイナスの影響を除けばより高い予防効果も期待できることを認めた。

謝 辞

本研究を行うにあたりご援助をいただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

引用文献

- 1) 篠田雅人、太田節子、早瀬幸俊、放射線障害防護薬剤に関する研究(第21報)軟X線によるマウスの皮膚障害を指標とする放射線障害防護薬剤の効力試験法の検討、薬誌、99、551-555、1979.
- 2) 太田節子、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究(第22報)放射線皮膚障害に対する各種含イオウ化合物の防護効果について、薬誌、102、774-780、1982.
- 3) 太田節子、古川真知子、篠田雅人、放射線障

- 害防護薬剤に関する研究（第 23 報）フェルラ酸関連化合物の放射線防護効力、薬誌、104, 793-797, 1984.
- 4) 佐藤祐之、太田節子、桜井信子、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究（第 26 報）放射線皮膚障害に対する各種生薬の防護効果、薬誌、109, 113-118, 1989.
- 5) 佐藤祐之、太田節子、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究（第 28 報）放射線障害に対する核酸構成物質の防護効果、110, 210-217, 1990.
- 6) 王誠明、太田節子、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究（第 29 報）放射線皮膚障害に対する各種漢方方剤メタノールエキスの防護効果、110, 218-224, 1990.
- 7) 太田節子、桜井信子、佐藤祐之、井上隆夫、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究（第 30 報）川キウ中の放射線障害防護物質、110, 746-754, 1990.
- 8) 佐藤祐之、太田節子、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究（第 31 報）放射線皮膚障害に対するキダチアロエの防護効果、薬誌、110, 876-884, 1990.