

平成 1 0 年 度

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

薬効成分を有する天然物－生薬、漢方製剤－の安全性に関する研究

研 究 報 告 書

主任研究者 関 田 節 子

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

薬効成分を有する天然物－生薬、漢方製剤－の安全性に関する研究

主任研究者 関田 節子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

研究要旨

生薬、漢方製剤に起因する副作用として、小柴胡湯が原因とされる間質性肺炎のメカニズム解明、起因物質の特定を行う目的で、病態の臨床経過、病理所見、免疫学的検討、薬物動態、細胞のアポトーシスに与える影響、湯剤の製造と品質評価、モデル動物実験を行った。また、間質性腎炎の原因物質とされるアリストロキア酸、修治下降の必要なアコニチンアルカロイド、血清脂質低下作用薬の安全性を評価する系を確立した。

A. 研究目的

漢方製剤は複合成分がそれぞれの組織の活性化を促し総合的な効果により病態を改善すると考えられており、作用が穏やかで一部を除いては比較的長期間投与される特徴がある。従って劇的な副作用は少ないものであるが、数種の処方薬により、間質性腎炎や間質性肺炎を引き起こす例が報告されている。小柴胡湯による間質性肺炎については、平成8年に医薬安全局から緊急安全性情報が配布され注意喚起を促されているが、その後も因果関係不明なものを含めて100例以上の報告が寄せられ、平成9年に、使用上の注意の「警告」欄及び「重大な副作用」の項を具体的な記載に改訂し、一層の注意喚起が図られている。薬剤性間質性肺炎の発症機序に関してはアレルギー性のもとの細胞傷害性のものであると考えられているが、漢方製剤による薬剤性間質性肺炎はアレルギー性と推察されている。生体内の免疫系の恒常性は細胞性免疫を主るTh1細胞と液性免疫を主るTh2細胞のバランスによって保たれていることから、これらのバランスの恒常性の崩壊と推定されるが、そのイニシエーターとなるものが依然として

特定できず、作用機序は全く不明である。そこで、本研究では間質性肺炎発症のメカニズムをTh1/Th2バランス等の検討により解明する。さらに、漢方製剤は作用が広範囲であることから、最近は本来の目的とは異なった使い方をされ、欧米のみならず我が国でも瘦身療法としての宣伝が目立っている。その弊害の一つとして、ベルギーでは、配合生薬の取り違いから強い作用を持つ生薬成分アリストロキア酸(AA)に起因する重篤な腎障害が発生し、chinese herbs nephropathyとして注目を浴びている。国内でも生薬製剤による間質性腎炎が関西地方で報告され、日本薬局方記載の生薬とは異なる基原植物種が用いられていたためその成分のAA類の副作用が出現したものと指摘され、注意を喚起した。しかし、その後も個人輸入や外国旅行の際に購入した製剤による被害が続いている。これらの症状は不可逆的な場合があると報告されているが、AA類縁化合物については検討されていない。この様に類似あるいは同一の生薬名であっても基原植物の種が異なる場合があるため予想外の結果を招くことがある。また、アコニチンアルカロイドなど強い活性を示す生

薬もある。従って生薬、漢方製剤の副作用の原因を明らかにし、正確な知識の普及を図ることは、副作用を回避する適正な投与規準が確立されると共に安全な薬剤としての品質基準を明確にする重要な成果をもたらす。このような観点から生薬及び漢方製剤の安全性を解明することを目的とする。

B. 研究方法

半夏瀉心湯、小柴胡湯服用により間質性肺炎を発症した患者を対象に、胸部レントゲン写真を観察し、経気管支肺生検を行い、同時に一般的免疫の指標として、リンパ球サブpopulation (CD4/CD8, CD4/CD45RO, CD4/細胞内 INF- γ) をセルソーターにて解析した。治療としてプレドニゾン (PSL) 40mg を投与、149 日後 35 mg に減量した時点で退院し、7 カ月後に改善され PSL の投与を中止した。また、小柴胡湯ならびにその構成生薬・柴胡と黄芩を対象に DLST を実施した。この例を含めて患者 69 名の発症に至るまでの記録をまとめ、服用期間と発現までの期間、合併症、副作用歴、アレルギー歴、臨床検査値等のデータ解析を行った。小柴胡湯の薬物動態を目的に、電気化学検出 HPLC によりフラボノイド成分の一斉分析法を確立し、2 名の被検者に小柴胡湯エキス剤 5 g を単回投与し、血中移行成分を分析した。得られたデータから吸収される化合物について、排泄速度-時間曲線を解析し、腎排泄率、体内吸収量と排泄経路を考察した。血中移行成分のグリチルレチン酸 2mg をマウス腹腔内に注入し、鏡顕、電気泳動、FACS 解析等を行った。比較のために胸腺細胞への直接作用を行った。さらに、新たにグリチルレチン酸投与後の各臓器の代謝酵素 (11-HSD) 活性と

血中コルチコステロン濃度を測定した。一方、モデル実験系の確立を目的に、まず、小柴胡湯を作製し、エキス中に移行している成分を HPLC により定量した。実験 1 として、このエキス を 0.5、1.0、2.0% の割合で粉末基礎食に混合し、インターフェロン- α 高発現系である C57BL/6 マウスに自由摂取させ 8 週間飼育した。実験 2 では、モノクローリンを 150mg/Kg の割合で週 1 回、計 4 回、5 週齢のマウスに皮下投与した後、小柴胡湯を 0.1 ないし 2.0% の割合で、8 週間混飼投与中し、マウス間質性肺炎誘発モデルを用いた間質性肺炎修飾作用を検索する実験を開始している。このモデルの最後の 2 週間にインターフェロン- α を腹腔内投与する予定である。アリストロキア酸とアリストロラクタムの基本骨格について分子軌道計算を行った。製造方法の異なる生薬 (ブシ) 4 ロットとこの生薬を用いて作製した八味地黄丸 4 ロットについて、酢酸エチルエステルによる抽出法、塩酸による抽出法の 2 通りを試みた。これらのエキスについて、アコニチン :A、ベンゾイルアコニチン BA、アニソイルアコニチン :AA、メサコニチン :M、ベンゾイルメサコニチン :BM、ヒパコニチン :H、ベンゾイルヒパコニチン :BH の 6 種のアコニチンアルカロイドを定量分析した。PPAR 非依存の機構での血清脂質低下作用の評価系の開発として、ラット初代培養肝細胞を単離後、エタノールアミン (100 μ M) を添加した培地またはメチオニン (400 μ M) を欠く培地に移し、PE メチル化活性は膜画分を単離し S-アデノシル- [3 H] メチオニンのホスファチジルコリン (PC) への取り込み、あるいは培地に添加した [3 H] エタノールアミンの細胞内 PC への取り込みを測定した。

C. 研究結果

患者の経気管支肺生検3検体は肺胞領域で、リンパ球を主とした炎症性細胞の浸潤を認めた。DLSTでは検査対象とした小柴胡湯、柴胡、黄ゴンはいずれも陽性であった。末梢血中のCD4は高く、CD8は低値でCD4/CD8比は高値であった。CD4細胞中のCD45RO陽性メモリー細胞は低値であり、CD45RO陰性のナイーブ細胞は高値であった。CD4陽性細胞中の細胞内INF- γ は、正常人の基準値(6.8 \pm 0.8%)に比し高値であった。69名の患者の症例データでは、男性51名、女性18名、年齢は40代2名、50代17名、60代37名、70代12名、80代1名であった。使用理由は全員が肝炎等の肝疾患であった。また、GOT、GPT、ZTT等の臨床検査、ガス・肺機能等のデータをまとめた。フラボノイド成分(リクイリチゲニン、ダビディゲニン、オウゴニン、ジヒドロオウゴニン、オロキシリンA、ジヒドロオロキシリンA)の一斉分析法として、電気化学検出器によるHPLC法を検討した。カラム:ODS(UG120)4.6 \times 250mm、温度:27 $^{\circ}$ C、移動相:イソプロパノール-水-酢酸(12:37:1)、流速0.8ml/min、検出波長279、275、295nm、カラム:ODS(UG)4.6 \times 250mm、カラム温度:27 $^{\circ}$ C、移動相:アセトニトリル-水-酢酸(30:69:1)、流速1ml/min、で良好な結果を得た。2名の被検者に小柴胡湯エキス剤5gを単回投与し、一定時間毎に2日間採血し、6種のフラボノイドの血中濃度-時間曲線を描いた。1名は投与後速やかに一過性の血中濃度上昇が認められ、一旦下降した後に再度上昇する2相性を示した。直接吸収される時に速度定数をk1とし、配糖体が加水分解を受けながらアグリコンとなって吸収される時をk2とし、

2つの1次吸収をもつ2-コンパートメントモデルを作成して解析した。血中移行成分のグリチルレチン酸は24時間後に胸腺の萎縮と胸腺細胞のアポトーシスが観察された。また、顕顕によるアポトーシス小体の出現、アガロースゲル電気泳動法による核ラダーの検出、ミトコンドリア膜ポテンシャルの低下などで確認を行った。更に、FACS解析により、胸腺で減少する細胞種はCD4⁺CD8⁺のダブルポジティブ細胞であることが明らかになった。グリチルレチン酸投与後の各臓器の代謝酵素(11-HSD)活性と血中コルチコステロン濃度を測定したところ、投与3時間後に、胸腺細胞、胸腺間質細胞、肝、および腎における酵素活性の顕著な低下が観察され、コルチコステロン血中濃度の上昇が認められた。コルチコステロン血中濃度は24時間後に最大となった。作製した小柴胡湯のエキス中に移行している成分は定量分析によりサイコサポニンd:0.5%、バイカリン:19.7%、ジンセノシドRb1:0.5%、グリチルリチン3.6%、6-ジンゲロール:0.4%であった。このエキスのインターフェロン- α 高発現系であるC57BL/6マウスへの投与実験を行い、病理所見ならびに血中サイトカイン、リンフォカインを測定中である。また、モノクロタリン、インターフェロン- α によるモデル動物に及ぼす小柴胡湯の影響について実験を開始した。アリストロキア酸とアリストロラクタムの基本骨格について分子軌道計算とLUMOのエネルギー比較をし、還元反応へ与える計算値から有害性を考察した。プシと、この生薬を用いて作製した八味地黄丸のアコニチンアルカロイドを定量分析したところ種類や加工法により0.05~0.3%と含量差が大きく薬効や安全性に相異があることを明らかにした。

培地の試薬を制御することで、PEメチル化活性に関わる細胞モデルを確立し、阻害剤 bezafibrate の作用を測定した。

D. 考察

漢方薬による間質性肺炎の発症は過敏性反応によるものと考えられており III 型、IV 型アレルギー反応が主体とされている。本例では、リンパ球サブポピュレーションの検討によりどの値も Th1 細胞を主体とする細胞性免疫の亢進が示唆された。患者の症例のまとめにより、合併症や既往歴、副作用歴、併用薬などが明らかになり、発症への背景が明らかになった。フラボノイド成分(リクイリチゲニン、ダビディゲニン、オウゴニン、ジヒドロオウゴニン、オロキシリン A、ジヒドロオロキシリン A) の一斉分析法として、電気化学検出器による HPLC 法を検討し、良好な結果を得た。小柴胡湯エキス剤を投与した 2 名の被検者のうち 1 名は投与後速やかに一過性の血中濃度上昇が認められ、一旦下降した後に再度上昇する 2 相性を示した。これは、生薬中でアグリコンおよび配糖体として存在していたフラボンが、服用後まずアグリコンが速やかに吸収され、配糖体は腸内細菌で加水分解されアグリコンに変化してから穏やかに吸収されると考えれば説明できる。直接吸収される時に速度定数を k_1 とし、配糖体が加水分解を受けながらアグリコンとなって吸収される時を k_2 とし、2 つの 1 次吸収をもつ 2-コンパートメントモデルを作成して解析すると、被検者の予測曲線は実測された血中濃度-時間曲線とよく一致した。リクイリチゲニンは腸内細菌の作用によって更に代謝され、ダビディゲニンとなってからも吸収される。他方 k_1 の小さい被検者はリクイリチゲニンの腸内存

在時間が長いことを反映している。血中に移行するもう一つの成分グリチルレチン酸は、マウス腹腔内投与により各臓器の代謝酵素 (11-HSD) を阻害することによりコルチコステロンの代謝を抑制して血中濃度を高め、これが直接の原因となって胸腺細胞をアポトーシスに誘導することを明らかにした。グリチルレチン酸投与 3 時間後に、胸腺細胞、胸腺間質細胞、肝、および腎における代謝酵素 (11-HSD) 酵素活性の顕著な低下が観察され、コルチコステロン血中濃度の上昇が認められた。コルチコステロン血中濃度は 24 時間後に最大となった。その濃度は胸腺細胞を直接アポトーシスに誘導しえるものであった。従って、グリチルレチン酸投与による胸腺細胞のアポトーシスは、グリチルレチン酸が各臓器の 11-HSD を阻害することによって、まずコルチコステロンの代謝を抑制し、その結果としてコルチコステロンの血中濃度が上昇し、それが直接の原因となって胸腺細胞をアポトーシスに誘導したと考えられる。他にも、胸腺細胞や胸腺間質細胞にも 11-HSD が存在し、その活性がグリチルレチン酸によって抑制されることがわかった。これらの細胞の中で 11-HSD が如何なる役割を果たしているか明らかではないが、可能性のある役割として、胸腺細胞の正負の選択過程で胸腺細胞内または周辺におけるアポトーシスシグナルの強度を調節していることが考えられる。グリチルレチン酸以外の小柴胡湯由来成分の作用についても調べてみる必要がある。

動物実験用に作製したエキス中に移行した成分は構成生薬それぞれを代表する成分で、生薬成分はロット毎に成分量が異なるものの、湯剤構成比を勘案するとその移行量は通常の作成方法により移行する量の範囲にあり、作

用を把握したのちにはこのエキスの品質に基づいて、活性成分の特定やメカニズムの追求を行う。現在、このエキスのインターフェロン- α 高発現系であるC57BL/6マウスへの投与実験を行い、各臓器の病理組織学的検索ならびに血中サイトカイン、リンフォカインの炎症のエファクター細胞の出現数を比較し、炎症の指標とすべく測定中である。また、モノクロタリン、インターフェロン- α によるモデル動物に及ぼす小柴胡湯の影響について実験を開始した。アリストロキア酸とアリストロラクタムの基本骨格について分子軌道計算とLUMOのエネルギー比較をし、還元反応へ与える計算値から有害性を考察した。修治加工をしたブシのアコニチンアルカロイドを定量分析したところ、いずれも残存ジエステルアルカロイド(アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン)量は0.01%程度であり、0.023%を上回るものはなかった。しかし、全アコニチンアルカロイド(ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルアコニン、ベンゾイルヒパコニン、アニソイルアコニン、アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン)量に関しては、0.05~0.3%程度までかなりの差が見られた。またこの含有量は厚生省の規定値0.025~0.25%基準とほぼ一致しているが、わずかではあるが基準を上回るものもあった。八味地黄丸では残存ジエステルアルカロイドが検出されなかったことから検出限界0.0005%以下であると考えられる。しかし、モノエステルアルカロイド量に関しては、0.001~0.02%の範囲で検出されており、その差は20倍と大きく、0.005~0.015%という基準と若干異なっていた。修治加工をしたブシの基準から換算した八味地黄丸中の全アコニチンアルカロイド量と八味地黄丸の基準値が異なるっており、従来の方

法(八味地黄丸6gに対して炮附子130mg)で製造すると八味地黄丸の基準値からはずれてしまう。この方法により製造すると八味地黄丸中の全アコニチンアルカロイド量は0.001~0.005%程度となり、この方法とは異なる加工ブシ末を加えた製法によるものは0.02%と著しく大きくなることを明らかにした。bezafibrateなどのフィブратと類はPPARを活性化してアポCIII、アポAI、リポプロテインリパーゼなどの複数の遺伝子転写を調節し、血清脂質低下作用を示すと考えられている。しかしながら本研究で確立したPEメチル化を欠くモデル細胞系ではbezafibrateはTG分泌に全く影響を与えなかった。このことから、PEメチル化活性を維持したモデル細胞系ではもっぱらPEメチル化阻害をターゲットとした作用物を検出していると考えられる。従って、今回確立した細胞モデルは、薬物のPPAR非依存の血清脂質低下作用を評価する上で有用である。

E. 結論

生薬、漢方製剤の安全性に関して、間質性肺炎を発現する小柴胡湯について検討し、Th1型の細胞性免疫の亢進例を見出した。また、ステロイド抵抗性と肺線維症の関連が示唆された。また、服用後の血中成分の分析と動態を考察した。漢方薬による間質性肺炎発症のメカニズムに関しては十分に知られていない。従って基礎からの病態解析が必須であり、これらを基に今後、詳細な検討を行う予定である。間質性腎炎を誘発するアリストロキア酸やアコニチンアルカロイド、血清脂質低下作用を示す薬物の安全性評価系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chuan Li, masato Homma, Kitaro Oka :
Characteristics of Delayed Excretion of
Flabonoids in Human Urine after
Administration of Shosaiko-to, a Herbal
Medicine,
Biol. Pharm. Bull., 21 , 1251-1257(1998)

岡田裕美、渡辺賢治、鈴木幸男、鈴木
邦彦、伊藤 剛、村主明彦、倉持 茂、
土本寛二、石野尚吾、花輪壽彦、：半
夏瀉心湯、小柴胡湯により薬剤成間質
成肺炎を来した一例、日本東洋医学会
誌、 in press

Okochi, E., Nishimaki-Mogami, T.,
Suzuki, K. and Takahashi, A.
Perfluorooctanoic acid, a peroxisome
proliferating hypolipidemic agent,
dissociated apolipoprotein B48 from
lipoprotein particles and decreases secretion
of very low density lipoproteins by cultured
rat hepatocytes, *Biochim. Biophys. Acta*
in press

2. 学会発表

岡田裕美、渡辺賢治、鈴木幸男、芹澤
宏、濱田慶城、熊谷直樹、土本寛二、
島田英世、花輪壽彦、：小柴胡湯によ
る間質成肺炎の一例 第 464 回日本
内科学会関東地方会、1998. 6

堀籠大之、平野俊彦、本間真人、岡 希
太郎：マウス胸腺及び脾臓細胞のアポ
トーシスに及ぼすグリチルレチン酸投
与の影響 日本薬学会第 119 年会、

1999. 3 (徳島)

最上(西巻)知子、鈴木和博、藤森観
之助：VLDL アセンブリー・分泌制御に
おけるアポ B の N-型糖鎖の役割；アポ
B48 の糖鎖は VLDL を完成する後期脂
質付加過程に要求される 第 71 回日
本生化学大会 1998.10

Vukmirica, J., Nishimaki-Mogami, T.,
McLeod, R. S., and Yao, Z. : N-linked
glycosylation is important for
posttranslational stability and effeicient
secretion of apo-B 38th Annual
Meeting of the American Society for Cell
Biology 1998. 12

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

生薬小柴胡湯の間質性肺炎修飾作用に関する病理学的研究

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨： 生薬である小柴胡湯の間質性肺炎誘発ないし修飾作用を検討する目的で、interferon- α 高発現系である C57BL/6 マウスを用いて、以下の実験を行っている。実験 I として、小柴胡湯の間質性肺炎誘発作用を検索する目的で、各群 10 匹の 5 週齢の雄 C57BL/6 マウスに対して小柴胡湯を 0 (対照群), 0.5, 1.0, 2.0 % の割合で 8 週間混餌投与した。投与期間中、体重及び摂餌量の推移に群間による明らかな差を認めなかった。投与終了後、肺及びリンパ系組織を中心として主要臓器を採取し、その病理組織学的検索を行っている。次に実験 II として、モノクロタリンによるマウス間質性肺炎誘発モデルを用いた、小柴胡湯の間質性肺炎修飾作用を検索する実験を開始した。すなわち、モノクロタリンを 150mg/kg の割合で週 1 回、計 4 回、5 週齢の雄 C57BL/6 マウスに皮下投与した後、小柴胡湯を 0.1% ないし 2.0 % の割合で、各群 20 匹に 8 週間混餌投与している。また、ヒトで間質性肺炎発症に小柴胡湯と interferon- α の相乗作用が疑われていることから、20 匹のマウスにモノクロタリン投与に続く 2.0% の小柴胡湯の混餌投与の最後の 2 週間に、interferon- α を 2.5×10^4 units/マウス、週 3 回、計 6 回、腹腔内投与する予定である。モノクロタリン、小柴胡湯、及び interferon- α の陰性対照もそれぞれ設定している。

A. 研究目的

近年、ウイルス性肝炎患者の肝保護作用を目的とした小柴胡湯処方患者にしばしば間質性肺炎の生じることが報告されており、特に interferon- α 療法併用例において、その発症リスクの高まることが指摘されている^{a)}。しかしこれらの療法による間質性肺炎発症への直接的メカニズムは殆ど明らかではない。現在まで小柴胡湯投与による間質性肺炎誘発の実験的証明はなされていないが、小柴胡湯は細胞性免疫に影響を与え各種サイトカインの発現状況を変えて間質性肺炎に至らしめる可能性が指摘されている^{b)}。本研究では、小柴胡湯

の間質性肺炎誘発ないし修飾作用を検討する目的で、interferon- α 高発現系である C57BL/6 マウスを用いて、高用量（臨床使用量の 5-20 倍）小柴胡湯の投与実験（実験 I）と、実験的に誘発した間質性肺炎に対する小柴胡湯の修飾作用を病理学的に検索している（実験 II）。さらにこのモデルを用いて小柴胡湯と interferon- α 投与による病変進行に対する相乗作用の有無も同時に検討している（実験 II）。

参考文献： a) 厚生省医薬品副作用情報 (1991) No.107; b) 村上和憲ら (1995) 日胸疾会誌, 33, 389-393.

B. 研究方法

1) 被験物質及び動物： 被験物質として小柴胡湯（当研究所生薬部関田らにより調製）、モノクロタリン（S. B. Penick Co., New York）、ヒト interferon- α （持田製薬）を用いた。動物は4週齢の雄性 C57BL/6 : C₁j マウス（SPF）を日本チャールス・リバー社（神奈川）より購入し、基礎飼料と水道水で1週間馴化飼育した後、各群5匹になるよう無作為に振り分け試験に供した。

2) 実験方法： 実験 I として、各群10匹の5週齢のマウスに対して小柴胡湯を0（対照群）、0.5、1.0、2.0%の割合で8週間、粉末基礎食（CRF-1: オリエンタル酵母）に混合して、自由摂取させた。実験 II として、モノクロタリンを150mg/kgの割合で週1回、計4回、5週齢のマウスに皮下投与した後、小柴胡湯を0.1%ないし2.0%の割合で、各群20匹に8週間混餌投与している。小柴胡湯の投与量は、臨床使用量と同等の換算値（0.1%）と、実験 I の結果を参考に最高用量（2%）の2用量を設定した。更に実験 II の中で、20匹のマウスにモノクロタリン投与に続く2.0%の小柴胡湯の混餌投与の最後の2週間に、interferon- α を 2.5×10^4 units/マウス、週3回、計6回、腹腔内投与する群を設定した。モノクロタリン、小柴胡湯、及び interferon- α の陰性対照もそれぞれ設けた。

C. 研究結果

実験 I に関しては投与実験を終了し、病理組織学的検索を実施中である。また、投与期間中、体重及び摂餌量の推移に群

間による明らかな差は認められなかった。

実験 II は、現在、動物実験を実施中である。

D. 考察

実験 I は動物実験を終了し、実験 II は動物実験を実施中であるが、実験 I, II とも肺においては、病理組織学的検索とともに、好中球、マクロファージ等の炎症のエフェクター細胞の出現数を比較し、炎症の指標となりうるかどうかの検討を行う。また、肺の病理組織学的検索に関しては、間質炎症の有無及びその拡がりに程度をつけて評価を行う。また、病理組織学的評価により小柴胡湯に間質性肺炎に対する明らかな誘発作用ないし修飾作用を認めた場合、肺及び脾臓における各種サイトカイン/ケモカインの発現レベルの検索を行う予定である。

E. 結論

生薬である小柴胡湯の間質性肺炎誘発ないし修飾作用を検討する目的で、C57BL/6 マウスに対して、8週間に及ぶ高用量の小柴胡湯投与実験と、実験的に誘発されるマウス間質性肺炎に対する、小柴胡湯ないし小柴胡湯 + interferon- α の投与の影響を検索中である。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
特になし。

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

薬効成分を有する天然物－生薬、漢方製剤－の安全性に関する研究

分担研究者 渡辺賢治 北里研究所東洋医学総合研究所

A 研究目的

漢方薬は各種疾患に対する有効性が報告され、比較的副作用が少なく、安全な薬剤と考えられてきたが、近年副作用の報告が散見されるようになってきた。特に間質性肺炎は1989年の築山らの報告以来報告例が重ねられ、現在は副作用報告が80例を越えており、また死亡報告例も14例を数えている。起因薬剤は小柴胡湯が主であったが、最近大柴胡湯、柴胡桂枝乾姜湯、六君子湯、柴朴湯、柴苓湯、半夏瀉心湯などでも薬剤性間質性肺炎の報告がなされている。また、小柴胡湯では薬剤性の肝障害も惹起されることが報告されており、間質性肺炎と肝障害の合併例の報告もある。本年度研究は漢方薬、半夏瀉心湯と小柴胡湯による間質性肺炎の症例を例にとり、臨床経過、病理所見、免疫学的検討を加えた。

B. 研究方法:

症例: 60歳、男性

臨床経過: 平成9年6月3日、胃のもたれを主訴に北里研究所東洋医学総合研究所漢方診療科を受診した。半夏瀉心湯（煎じ）を投与したところ、症状軽快し、同漢方薬にて外来で経過観察していた。8月3日より悪寒、38℃台の発熱、全身倦怠感が出現し、近医にて抗生剤処方され、一旦解熱したが、11日、近医にて肝機能障害を指摘され、近医に入院となった。8月12日、当院受診し、半

夏瀉心湯を中止し肝機能障害に対し小柴胡湯の投与を開始した。14日当院へ転院となった。入院時の胸部レントゲン写真では左上肺野にスリガラス状陰影を認めた。

入院後、肝機能障害に対し小柴胡湯を投与続行するとともに強力ネオミノファーゲンC、抗生剤の投与により、肝機能の改善と炎症所見の改善が得られた。小柴胡湯は8月16日まで5日間投与した時点で、薬剤性の肝障害ならびに間質性肺炎を疑い中止した。8月22日より咳嗽、呼吸困難が出現して徐々に増強した。9月5日、PaO₂ 63.0torrと低酸素血症を認め、さらに胸部レントゲン上陰影の悪化、および胸部CTにて間質性変化を認めため、プレドニゾロン(PSL)40mgの投与を開始した。呼吸困難は改善され、PaO₂は徐々に上昇し98.2torrまで回復し、PSL 35mgに減量した時点で10月18日退院となった。その後も経過順調でPSLを漸減し、胸部レントゲン、胸部CT上も病変は改善し、平成10年5月PSLを中止した。本症例に対し、肺生検病理所見、DLST、免疫学的検討(CD4/CD8、CD4/CD45RO、CD4/細胞内IFN-γ)を行った。

C. 研究結果

1) 病理: 9月8日に気管支鏡を施行した。経気管支肺生検を左B¹⁰より計5検体を得た。そのうち3検体は肺泡領域であり、リンパ球を主とした炎

症性細胞の浸潤を認めた。また、一部に線維化を認めた。残り2検体は気管支壁であり、明らかな変化は認めなかった。

2) DLST: 小柴胡湯は柴胡、黄芩、半夏、人參、大棗、甘草、生姜の七つの生薬から成り、柴胡、黄芩で DLST 陽性例が報告されており、当初小柴胡湯による間質性肺炎を疑ったため、小柴胡湯の他、柴胡、黄芩に対し DLST を施行した。当院では stimulation index (S.I.)が、1.8 以上で陽性としている。結果は小柴胡湯の SI が 4.1、柴胡の SI が 2.3、黄芩の SI が 3.1 といずれも陽性であった。

3) 免疫学的指標の検討: 末梢血の CD4 は高く、CD8 は低値で、CD4/CD8 比は高値であったが、PSL の治療により低下した。CD4 陽性細胞中の CD45RO 陽性メモリー細胞は低値であり、CD45RO 陰性のナイーブ細胞は高値であった。CD4 陽性細胞中の細胞内 IFN- γ は、当院で測定している正常人の基準値 ($6.8 \pm 0.8\%$) に比し、高値であった。この亢進は PSL の投与により、一時上昇したがその後低下した。

D. 考察

佐藤らの小柴胡湯による間質性肺炎 72 例のまとめによると、平均年齢は 63.7 ± 7.2 歳 (43-85 歳) と高齢者に多く、男女比は 2.6:1 でやや男性に多かった。小柴胡湯は肝炎の治療薬として頻用されているので、基礎疾患は肝障害が 72 例中 71 例と圧倒的多数であり、平均服薬期間は 50.2 ± 42.1 日だが、10 日以内に症状の発現したものが 7 例あり、臨床症状としての呼吸困難、発熱、喀痰や胸部レントゲン所見ではスリガラス状陰影、浸潤影などがみられるなど、当初、小柴胡湯による間質性肺炎を疑った。しかし、厚生省の副作用報告として間質性肺炎をきたす可能性のある漢方薬は小柴胡湯だけではなく、大柴胡湯、柴朴湯、柴苓湯、柴胡桂枝乾姜湯、辛夷清肺湯、清肺湯、半夏瀉心湯

などにつき注意が喚起されている。これら漢方処方に共通する生薬として黄芩が考えられる。

本例では小柴胡湯投与前に 2 か月間半夏瀉心湯が投与されていた。半夏瀉心湯と小柴胡湯は構成生薬を比較すると、小柴胡湯の柴胡が黄連に、また生姜が乾姜に代わったのが半夏瀉心湯であるが、構成生薬 7 味のうち 5 味までが共通である。この中に間質性肺炎を惹起する可能性のある黄芩が含まれていることを考えると半夏瀉心湯でも間質性肺炎を惹起する可能性は十分あると考えられる。臨床経過から考え、本例の間質性肺炎は半夏瀉心湯により惹起された可能性が高いと考えられた。しかし、その後類似した処方である小柴胡湯により、増悪させた可能性もある。

薬剤性肝障害の判定基準の一つリンパ球刺激試験があるが、本例では、当初小柴胡湯による間質性肺炎を疑い小柴胡湯及びその構成生薬である柴胡ならびに黄芩につき、リンパ球刺激試験を施行した。その結果小柴胡湯、柴胡、黄芩で陽性であった。半夏瀉心湯は前述のとおり小柴胡湯と共通の生薬が多く今回リンパ球刺激試験を施行しえなかったが、陽性となる可能性が考えられた。診断の上では同一薬剤のチャレンジテストも行われることがあるが本例では危険と判断し施行しなかった。

薬剤性肺炎の病理組織所見には特異的なものはなく、富岡らは本邦 9 例の小柴胡湯による薬剤性肺炎の病理組織像を検討し、全例に肺胞隔壁の炎症細胞浸潤を認め、2 例に好酸球浸潤、3 例に線維化、7 例に末梢気腔および肺胞腔内の器質化を認め、いくつかの病理所見の複合所見をとりうるものが漢方薬による薬剤性肺炎の特徴の一つと考察している。本症の病理所見は、リンパ球を主とした炎症性細胞の浸潤を認め、急性間質性肺炎を示唆するものであった。

薬剤性の間質性肺炎の発症機序としては、抗癌

剤や免疫抑制剤などによる細胞毒性によるものと、
抗生剤を代表とするさまざまな薬剤に対する過敏
反応に大別される。漢方薬による間質性肺炎の発
症は後者の過敏性反応によるものと考えられてお
りⅢ型、Ⅳ型のアレルギー反応が主体と考えられ
ている。一方動物実験においてアレルギー性の肝
炎モデルでは、ヘルパーT細胞のうち Th1 機能が
亢進しているとの報告があり、本例でも種々の免
疫学的指標につき検討を加えた。本例では、Tリン
パ球中の CD4 細胞が増加しており中でも内部細胞
CD45RO が陰性のナイーブ細胞が主体であった。
CD4 細胞中の IFN- γ 産生細胞が増加しており、
IFN- γ を産生する Th1 細胞が亢進していたことが示
唆された。IFN- γ 陽性 CD4 細胞は Th1/Th2 バラン
スの Th1 機能を反映しており、本例では Th1 機能
が亢進していた。以上より本例の間質性肺炎なら
びに肝障害の発症機序として Th1 細胞を主体とす
る細胞性免疫の亢進が示唆された。

E. 結論

結語

半夏瀉心湯および小柴胡湯によると考えられた
薬剤性肝障害、間質性肺炎の合併例につき検討を
加えた。漢方薬による間質性肺炎発症の機序に関
しては十分に知られていないが、本例では Th1 型
の細胞性免疫の亢進が示唆された。また、臨床的
には明らかではなかったが、病理上陳旧性の肺線
維症が基礎にあった可能性も示唆され、漢方薬に
よる間質性肺炎がステロイド抵抗性であることの
理由のひとつと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

岡田裕美、渡辺賢治、鈴木幸男、鈴木邦彦、伊藤
剛、村主明彦、倉持茂、土本寛二、石野尚吾、花
輪壽彦：半夏瀉心湯、小柴胡湯により薬剤性肝障
害ならびに間質性肺炎を来した一例 日本東洋医
学会誌(in press)

P2. 学会発表

岡田裕美、渡辺賢治、鈴木幸男、芹澤宏、濱田慶城、
熊谷直樹、土本寛二、島田英世、花輪壽彦：小柴胡湯
による間質性肺炎の一例 第464回日本内科学会関
東地方会 1998/6/13

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

小柴胡湯の吸収成分による胸腺細胞アポトーシスと免疫機能の制御

分担研究者 岡希太郎 東京薬科大学教授

研究要旨 小柴胡湯の副作用に関わる諸要素を解明するために、小柴胡湯を服用したとき体内に見い出される成分の血中濃度推移を解析する薬物動態モデルの構築と、体内に吸収される主成分が臓器機能に及ぼす影響を検討した。

A. 研究目的

小柴胡湯の体内吸収成分の薬物動態の解析

小柴胡湯を服用したヒトの尿中から検出される 10 種の成分は全てフェノール性化合物で、9 種はフラボノイドである。血中からはグリチルレチン酸が見出されているが、フェノール性化合物は測定されていない。グリチルレチン酸の血中薬物動態は既に解析されているので、今回は新たにフェノール性化合物の検出と薬物動態解析を試みた。

B. 研究方法

まず、電気化学検出器を備えた HPLC 法により 6 種の血中フラボノイドを一斉分析する技術開発に成功した。本法により定量分析法が確立されたフラボノイドは、リクイリチゲニン、ダビディゲニン、オウゴン、ジヒドロオウゴン、オロキシリン A、及びジヒドロオロキシリン A である。ダビディゲニンはリクイリチゲニンの腸内菌代謝物で、全被験者から検出された。また、ジヒドロオウゴンはオウゴンはジヒドロオロキシリン A はオロキシリン A の腸内菌代謝物であるが、被験者によって検出される者とされない者が混ざっていた (Biol. Pharm. Bull.1998)。

2 名の被験者を選び小柴胡湯エキス剤 5g を単回投与し、一定時間毎に 2 日間採血し、6 種のフラボノイドの血中濃度-時間曲線を描いた。

グリチルレチン酸投与によるマウス胸腺細胞アポトーシスとそのメカニズム

小柴胡湯を投与したとき血中に見出される成分のうち、グリチルレチン酸を選んで免

D. 考察

小柴胡湯を服用すると、まずアグリコンが速やかに吸収され、配糖体は腸内菌の作用で加水分解され、アグリコンに変化してか

臓器に及ぼす薬理学的効果を観察した。マウス腹腔内に 2mg のグリチルレチン酸を注入すると、24 時間後に胸腺の委縮と胸腺細胞のアポトーシスが観測された。アポトーシスは、顕微鏡によるアポトーシス小体の出現、アガロースゲル電気泳動法による核ラダーの検出、ミトコンドリア膜ポテンシャルの低下などによって確認した。

C. 研究結果

本報告書には薬物動態解析の典型的な事例として、リクイリチゲニンの解析結果を記述する。1 名の被験者では、投与後速やかに一過性の血中濃度上昇が認められ、一旦下降した後に再度上昇する 2 相性の吸収が観察された。他の被験者ではこのような現象は認められず、血中濃度の上昇は緩やかであった。

小柴胡湯の中で、リクイリチゲニンはアグリコン及び配糖体として存在している。配糖体は血中から検出されず、アグリコンのみが吸収されていた。

更に、FACS 解析により、胸腺で減少する細胞種は $CD4^+ CD8^+$ のダブルポジティブ細胞であることが明らかとなった。その他の細胞種には変化は認められなかった。

新たにグリチルレチン酸投与後の各臓器の代謝酵素 (11-HSD) 活性と血中コルチコステロン濃度を測定した。その結果、投与 3 時間後に、胸腺細胞、胸腺間質細胞、肝、及び腎における酵素活性の顕著な低下が観察され、コルチコステロン血中濃度の上昇が認められた。コルチコステロン血中濃度は 24 時間後最大となり、その濃度は胸腺細胞を直接アポトーシスに誘導し得るものであった。

緩やかに吸収されると考えれば、2 相性の吸収をうまく説明できる。小柴胡湯中のアグリコンが直接吸収されるときに速度定数を k_1 とし、配糖体が加水分解を受けながらア

グリコンとなって吸収されるときは速度定数を k_2 とし、2つの1次吸収をもつ2-コンパートメントモデルを作成して解析すると、計算による2名の被験者の予測曲線は実測された血中濃度-時間曲線とよく一致した。即ち、2相性を示した被験者は2相性を示さない被験者より大きな k_1 を有し、逆に k_2 は小さい数値であった。リクイチゲニンは腸内菌の作用によって更に代謝され、ダビディゲニンとなってからも吸収される。 k_1 が小さい被験者はアグリコンが腸内に長時間存在し、ダビディゲニンへの変換率が高いことも明らかになった。

以上はリクイチゲニンの解析結果であるが、この結果は代謝物であるダビディゲニンの血中動態ともよく一致していた。この事実は、薬物動態論によって血中濃度推移を解析すれば、消化管内での薬物動態を推論できることを示している。このことを東洋医学的に換言すれば、漢方薬から体内に吸収される成分の種類と量は消化管内の状態によって異なるということである。小柴胡湯のその他の吸収成分の解析については省略するが、吸収成分の腸管循環を示唆するデータが得られている。

健常な胸腺細胞にグリチルレチン酸を直接作用させてもアポトーシスは誘導されず、全身投与によってのみ胸腺の委縮が進行した。従って、グリチルレチン酸は間接的に胸腺に作用していることが明らかである。1つの可能性はグリチルレチン酸によるコレチコステロンの代謝阻害である。コレチコステロンを胸腺細胞に直接作用させるとアポトーシスが進行することは既に知られている。以上により、グリチルレチン酸投与による胸腺細胞のアポトーシスは、グリチルレチン酸が各臓器の 11-HSD を阻害することによって、まずコレチコステロンの代謝を抑制し、その結果としてコレチコステロンの血中濃度が上昇し、それが直接の原因となって胸腺細胞をアポトーシスに誘導したと考えられる。

今回明らかになった他の事実として、胸腺細胞や胸腺間質細胞にも 11-HSD が存在し、その活性がグリチルレチン酸によって抑制されることがわかった。これらの細胞の中で 11-HSD が如何なる役割を果たしているか明らかではないが、可能性のある役割として、胸腺細胞の正負の選択過程で胸腺細胞内また

は周辺におけるアポトーシスシグナルの強度を調節していることが考えられる。グリチルレチン酸以外の小柴胡湯由来成分の作用についても調べてみる必要がある。

E. 結論

小柴胡湯を服用したとき体内に見い出される成分の血中濃度推移を解析する薬物動態モデルを構築し、薬物動態を検討した。また、血中移行成分の一つであるグリチルレチン酸がコレチコステロンの代謝を阻害し、その結果アポトーシスをするを明らかにし、同時に、代謝酵素11-HSDが胸腺細胞にも存在し、グリチルレチン酸がこの酵素活性を抑制することを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Chuan Li, Masato Homma, Kitaro Oka: Characteristics of Delayed Excretion of Flabonoids in Human Urine after Administration of Shosaiko-to, a Herbal Medicine, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 1251-1257(1998)

2. 学会発表

堀籠大之、平野俊彦、本間真人、岡希太郎：マウス胸腺及び脾臓細胞のアポトーシスに及ぼすグリチルレチン酸投与の影響、日本薬学会第119年会、1999. 3 (徳島)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

薬効成分を有する天然物の安全性に関する研究

分担研究者 栗原正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部室長

研究要旨

生薬成分であるAristololactamsの毒性及び安全性についての知見を得ることを目的とし、Aristololactamsの合成計画を立案した。また、Aristolochic acids及びAristololactamsの基本骨格について分子軌道計算を行い、LUMOのエネルギーを比較したところAristololactamsはAristolochic acidsに比べて還元されにくいことがわかった。このことは、もしこれらの化合物の毒性が生体内の還元によって活性化されているなら、Aristololactamsの毒性はAristolochic acidsより少ないことを示唆している。

A. 研究目的

生薬成分であるAristololactamsの毒性については明らかでない。そこで、Aristololactamsの毒性及び安全性についての知見を得ることを目的とし、当分担研究者は、Aristololactamsの合成を行う。また、化学計算を用いた、Aristolochic acids及びAristololactamsの毒性メカニズムと毒性評価についても考察する。

本年度は、Aristololactamsの合成計画の立案、基本骨格についての分子軌道計算を行うことを目的とした。

B. 研究方法

文献調査等により、Aristololactamsの効率的な合成法を考えた。Aristolochic acids及びAristololactamsの基本骨格について分子軌道計算を行い両分子の化学的特性を調べる。

C. 研究結果

検討の結果、Aristololactamsの合成はAristolochic acidsを出発原料とし、エステル化反応、還元反応により合成することがよいことがわかった。

Aristolochic acids及びAristololactamsの基本骨格について分子軌道計算を行い、LUMOのエネルギーを比較したところAristolochic acidsの方が低く、還元されやすいことがわかった。

D. 考察

Aristololactamsの基本骨格のLUMOのエネルギーがAristolochic acidsに比べて高かったことより、AristololactamsはAristolochic acidsに比べて還元されにくいことが示唆された。一般的に、これらの化合物の毒性は生体内での還元反応により活性化されることが知られている。このことより、Aristolol-

lactams はAristolochic acids より毒性が少ないことが示唆された。

E. 結論

化学計算による考察では、Aristololactams はAristolochic acids より毒性が低いことが示唆されたが、実験的に証明する必要があるので実際に合成を行い、毒性を検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Stereoselective Synthesis of an *Erythro* α -Amino Epoxide Derivative.

M. Kurihara, K. Ishii, Y. Kasahara, and N. Miyata
Tetrahedron Lett. in press (1999)

Mechanistic Studies of Catechins as Antioxidants against Radical Oxidation

K. Kondo, M. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, M. Toyoda

Arch. Biochem. Biophys., **362**, 79-86 (1999)

Determination of 4-Hydroxy-2-nonenal in Primary Rat Hepatocyte Cultures by Liquid Chromatography with Laser Induced Fluorescence Detection

Y.-M. Liu, H. Jinno, M. Kurihara, N. Miyata, T. Toyo'oka

Biomed. Chromatogra, **13**, 75-80 (1999)

Hardness Controlled Enzymes and Electronegativity Controlled Enzymes: Role of an Absolute Hardness-Electronegativity(η - χ) Activity Diagram as a Coordinate for Biological Activities

S. Kobayashi, H. Hamajima, M. Kurihara, N. Miyata, and A. Tanaka

Chem. Pharm. Bull., 1998, **46**, 1108-1115 (1998)

Stereoselective Epoxidation with Bulky Dioxiranes Generated from Substituted Cyclohexanones

M. Kurihara and N. Miyata

Bull. Natl. Inst. Health Sci., **116**, 63-69 (1998)

2. 学会発表

215th ACS National Meeting(Dallas,1998/3)

Stereoselective Epoxidation with Dioxiranes Generated from Ketones

M. Kurihara, N. Miyata

215th ACS National Meeting(Dallas, 1998/3)

Studies on Antioxidative Mechanisms of Catechins against Lipid Peroxidation

K. Kondo, M. Kurihara, T. Suzuki, N. Miyata, M. Toyoda

12th International Conference on Organic synthesis (ICOS-12) (June 28-July 2, 1998, Venezia, Italy)

Stereoselective Epoxidation with Bulky Dioxiranes Generated from Substitued Cyclohexanones.

M. Kurihara, N. Miyata

第24回 反応と合成の進歩シンポジウム (1998年11月5、6日 千葉市)

α -エチル化ジ置換アミノ酸より合成したホモペプチドのコンフォメーション

田中 正一、今若 直人、末宗 洋、栗原 正明

G. 知的所有権の取得状況

なし

修治附子および八味地黄丸中のアコニチン系アルカロイドの定量に関する研究

分担研究者 萩原幸夫 名古屋市立大学薬学部教授

ブシは毒性が強く、これがそのまま用いられることは現在ではほとんどない。そこで『修治』という減毒のための加工処理を施された炮附子が用いられる。ブシが薬物として安全に使用されるには、十分に修治されていることが不可欠である。仮に修治が十分であるとしても、修治後の主成分であるモノエステルアルカロイドの含有量はブシにより、またこの修治の方法によっても異なる。従って、修治附子の単独での処方にしる漢方薬への配合にしる使用される修治附子の種類及びそれらの配合割合により薬理活性、毒性発現の面で差が生じると考えられる。

そこで、修治されたブシには、ジエステルアルカロイドの残存量の定量、及び特にモノエステルアルカロイドを基準にした品質の評価の必要性があると考え、現在使用されている修治附子及びブシ製剤製品である八味地黄丸のアコニチンアルカロイド含量をHPLCにより測定した。その結果、修治附子中のアコニチンアルカロイド量は、修治附子の種類によって大きく異なり、その安全性、薬効に修治の方法や産地による相違があることが予想された。またこれら炮附子を用いた漢方製剤である八味地黄丸中のアコニチンアルカロイド量についても同様であった。また修治附子の修治法について検討したところ、いわゆる「加工ブシ」は従来の方法で修治されたいわゆる「炮附子」に比べ、そのモノエステルアルカロイド量が著しく多く、その加工法について基準の必要性が示唆された。

A. 研究目的

附子（ブシ）は、古来より漢方薬の中でも重要な位置を占め、虚寒症の患者に対して主に鎮痛、新陳代謝の賦活、利尿、強心などの治療効果を期待して用いられてきた。その代表的なものには、八味地黄丸、桂子加述附湯、大防風湯、麻黄附子細辛湯、真武湯などがあげられる。

ブシはキンポウゲ科（Ranunculaceae）のトリカブトの塊根を生薬にしたものである。トリカブトは北半球の山野に自生する北方の植物と考えられ、その種類は300を超え日本全土でも約50種類がある。

採取し風乾させただけの草烏頭と呼ばれるトリカブトの塊根は毒性が強く、これがそのまま生薬のブシとして用いられることは現在ではほとんどない。そこで『修治』という減毒のための加工処理を施されたトリカブトの塊根が用いられるが、日本では塩附子、炮附子、白河附子など、中国では白附片、黒附片、黄附片、熟賦片などの種類があるように、古くから修治方法の違いによる分類がされており生薬のブシといっても様々な種類がある。現在ではブシを化学的な処理や、オートク

レーブによる湿熱処理をしいわゆる「加工ブシ」の出現もあり、トリカブトの種類、産地、採取時期の違いも含めると、その薬理効果のみならず減毒効果も多様であると考えられる。また、このように様々な方法で修治されたブシのことを、一般的に炮附子と呼んでおり、厚生省の炮附子末の規格は『カラトリカブト *Aconitum camichaeli* DEBEAUX 又はその他近縁植物（Ranunculaceae）の塊根を減毒加工粉末としたものである』とされている。しかしその加工法に関しての基準はない。

ブシの毒性と含有成分の化学構造式との関連について略述する。未修治のブシが生体内に入るとメサコニチン、アコニチン、ヒパコニチン、ジェサコニチンなどのジエステルアルカロイドにより毒性が発現される。これらの化合物は、8位の水酸基がアセチル化されており、修治により加水分解されて、ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルアコニン、ベンゾイルヒパコニン、アニソイルアコニンなどのモノエステルアルカロイドにそれぞれ変換されることで減毒される。また、修治により減毒されると同時に、種々の活性も減少することが報告されている。毒性発現の指標となるLD₅₀ および種々の活性の指標となるED₅₀の値は各種

アルカロイドによって異なり、ジエステルアルカロイドに対してモノエステルアルカロイドは1/10～1/100の毒性に抑えられているが、修治附子による毒性発現の可能性が皆無になった訳ではない。

ブシが薬物として安全に使用されるには、十分に修治されていることが不可欠である。仮に修治が十分であるとしても、修治後の主成分であるモノエステルアルカロイドの含有量はブシにより、また修治の方法により異なる。また逆に、このモノエステルアルカロイドが活性成分の一つとも考えられ、従って、修治附子の単独での処方にして漢方薬への配合にして使用される修治附子の種類及びそれらの配合割合により薬理活性、毒性発現の面で差が生じると考えられる。

そこで、修治附子にはジエステルアルカロイドの残存量の定量、及び特にモノエステルアルカロイドを基準にした品質の評価の必要性があると考え、現在使用されている修治附子及びブシ製剤製品である八味地黄丸のアコニチンアルカロイド含量をHPLCにより測定した。

B. 研究方法

1、実験材料

修治附子は4試料を用いた。

修治附子を含む漢方製剤として上記4試料から製造した八味地黄丸について検討した。

2、抽出法

(1) 酢酸エチルエステル (AcOEt) による抽出

粉末化した本品0.2gを精秤し、PYREX試験管(遠心機用キャップ付)に入れ2mlの酢酸エチル

エステル (AcOEt: 高速クロマトグラフ用) および28%アンモニア水をピペットで適量加える。ポルテックスミキサーで1分間攪拌後、室温で60分間超音波抽出する。次に、10分間遠心 (3000rpm) し上清を分取する (×2: 超音波による抽出の2回目は30分)。分取した上清に1.5mlのHClを加え分配する (×2)。合わせたHCl層は28%アンモニア水でアルカリ性にし、1.5mlのAcOEtで抽出 (×2) した後、濃縮乾固し、分析用のサンプルとする。

(2) 塩酸 (HCl) による抽出

粉末化した本品0.2gを精秤しPYREX試験管(遠心機用キャップ付)に入れ、2mlの2%塩酸 (HCl) を加える。ポルテックスミキサーで1分間攪拌後、室温で60分間超音波抽出する。次に、10分間遠心 (3000rpm) し上清を分取する (×2: 超音波による抽出の2回目は30分)。分取した上清に28%アンモニア水を適量加えてアルカリ性 (pH試験紙で確認) にした後、1.5mlのAcOEtで分配抽出する (×2)。合わせたAcOEt層を濃縮乾固し、分析用のサンプルとする。

3、定量法

上記に従って調製したサンプルのアコニチン類 (ベンゾイルメサコニン: BM、ベンゾイルアコニン: BA、ベンゾイルヒパコニン: BH、アニソイルアコニン: AA、アコニチン: A、メサコニチン: M、ヒパコニチン: H) の定量について、HPLCを用いた絶対検量線法にて行った。HPLCの標準クロマトグラムから各物質の保持時間により各クロマトグラム中の物質を特定した。

Table 1 修治附子中のアコニチンアルカロイドの定量

Material	Method	Aconitine Alkaloids (%)						
		BM	BA	BH	AA	A	M	H
炮附子: A	HCl ext.	0.028	0.007	0.015	N.D.	N.D.	0.005	0.001
	AcOEt ext.	0.034	0.011	0.015	N.D.	N.D.	0.008	0.003
修治附子: B	HCl ext.	0.170	0.027	0.070	N.D.	N.D.	0.005	0.003
	AcOEt ext.	0.164	0.025	0.064	N.D.	N.D.	0.004	N.D.
炮附子: C	HCl ext.	0.025	0.006	0.014	N.D.	N.D.	0.006	0.001
	AcOEt ext.	0.028	0.008	0.016	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
加工附子: D	HCl ext.	0.130	0.057	0.046	0.074	N.D.	0.005	0.008
	AcOEt ext.	0.152	0.068	0.058	0.059	N.D.	0.003	0.006

BM: Benzoylmesaconine, BA: Benzoylaconine, BH: Benzoylhypaconine, AA: Anisoylaconine, A: Aconitine, M: Mesaconitine, H: Hypaconitine

Table 2 八味地黄丸中のアコニチンアルカロイドの定量

Material	Method	Aconitine Alkaloids (%)						
		BM	BA	BH	AA	A	M	H
八味地黄丸								
A	HCl ext.	0.00056	0.00032	0.00016	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00069	0.00009	0.00028	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B	HCl ext.	0.00314	0.00023	0.00170	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00225	0.00021	0.00106	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	HCl ext.	0.00124	0.00021	0.00063	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00093	0.00022	0.00072	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	HCl ext.	0.00972	0.00666	0.00415	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00981	0.00437	0.00401	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

BM: Benzoylmesaconine, BA: Benzoylaconine, BH: Benzoylhypaconine, AA: Anisoylaconine, A: Aconitine, M: Mesaconitine, H: Hypaconitine

HPLC 条件「カラム：5C18-AR-300 (4.6 × 150mm)、移動相：0.1%トリフルオロ酢酸・テトラヒドロフラン (10 : 1)、流速：1.0mL/min、カラム温度：40℃、検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：235nm、260nm)」

C. 研究結果

各試料の修治附子中のBM含量を最大と最小で比較したところ、塩酸抽出では0.025%～0.170%で約7倍の含量差、同様にBAでは0.006%～0.057%で約10倍、BHでは、0.014%～0.070%で5倍の差があった。一方、酢酸エチルエステル抽出ではBM含量は0.028%～0.164%で約6倍、BAでは0.008%～0.057%で7倍、BHでは、0.015%～0.064%で4倍の差があった (Table 1)。このことから修治附子の種類によってモノエステルアルカロイドの含有量がかなり違うことが明らかとなった。

修治附子各試料に対応する八味地黄丸についても同様の結果が得られた。また使用した八味地黄丸に対する修治附子の割合 (八味地黄丸6gに対して修治附子130mg: 2.2%) を反映した値が得られていることから、この方法が正確にアコニチン類を定量できることが分かった (Table 2)。

また酢酸エチルエステル抽出でも塩酸抽出でもほぼ同様の結果が得られることが分かった。

Dの八味地黄丸は、その製造法が従来のものと異なり、ブシ以外の生薬抽出エキスに加工ブシ末を加えており (八味地黄丸4.5gに対して修治附子1.5g: 33.3%)、それが他の八味地黄丸とのモノエステルアルカロイドの含有量の差の要因と思われる。

D. 考察

厚生省が規定している含量を検討してみると、以下のようなになる。

《炮附子末》

『本品は定量するとき、総アルカロイド [ベンゾイルアコニン ($C_3H_45NO_{10}$: 603.71) として] 0.025%～0.25%を含む。』

総アルカロイドは全アコニチンアルカロイドと考えられるので、修治附子中のアコニチンアルカロイド量が0.025%～0.25%であることになる。

《炮附子末のアコニチン残存量》

『本品130mg中 (八味丸1日量中の炮附子末の量) に含まれるアコニチンの量は0.03mg以下でなければならない。』

残存アコニチンとは残存ジエステルアルカロイドと考えられるので、修治附子中のジエステルアルカロイド量が0.0231%以下であることとなる。

《八味地黄丸》

『本品は定量するとき、1丸 (0.2g) 中、総アルカロイド [ベンゾイルアコニン ($C_3H_45NO_{10}$: 603.71) として] 0.01～0.03mgを含有する。』

つまり八味地黄丸中のアコニチンアルカロイド量が0.005%～0.015%であることになり、これを炮附子中の含量割合に換算すると0.231%～0.692%となる。

《八味地黄丸のアコニチン残存量》

『本品1日量 (6.0g) 中に含まれるアコニチンの量は0.03mg以下でなければならない。』

つまり八味地黄丸中のジエステルアルカロイド量は0.0005%以下であることとなる。

よって、修治附子では『炮附子に含まれる残存ジエステルアルカロイド量は0.0231%以下でなければならず、全アコニチンアルカロイド量は0.025%～0.25%含有する。』となる。この値を八味地黄丸中に換算すると、残存ジエステルアルカロイド量は0.0005%以下で、全アコニチンアルカロイド量は0.0005%～0.0054%となる。

一方、八味地黄丸では『八味地黄丸に含まれる残存ジエステルアルカロイド量は0.0005%以下でなければならず、全アコニチンアルカロイド量は0.005%～0.015%含有する。』となる。

今回、検討した修治附子については、いずれも残存ジエステルアルカロイド（アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン）量は0.01%程度であり、0.0231%を上回るものはなかった。しかし、全アコニチンアルカロイド（ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルアコニン、ベンゾイルヒパコニン、アニソイルアコニン、アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン）量に関しては、0.05%～0.3%程度までかなりの差がみられた。またこの含有量は厚生省が規定している0.025%～0.25%という基準とほぼ一致している。

八味地黄丸では残存ジエステルアルカロイドが検出されなかったことから残存ジエステルアルカロイド量は0.0005%以下であると思われる。しかし、モノエステルアルカロイド量に関しては、0.001%～0.02%程度でその差は20倍と大きく、0.005%～0.015%という基準と若干異なっていた。

このような修治附子の種類によるモノエステルアルカロイド量の差について、その修治による違いにより考察した。炮附子：Aおよび炮附子：Cは、従来の方法、つまりかん水に浸漬後、蒸して乾燥させたいわゆる「炮附子」であり、修治附子：Bおよび加工附子：Dは化学的な処理により減毒されたいわゆる「加工ブシ」である。この2種類の炮附子を比較すると、「炮附子」のモノエステルアルカロイド量が約0.05%であるのに対して、「加工ブシ」では約0.3%と約6倍の違いが見られた。

E. 結論

修治附子中のモノエステルアルカロイド量は、

修治附子の種類によって大きく異なり、修治の方法や産地による相違があることが予想された。またこれら修治附子を用いた漢方製剤である八味地黄丸中の全アコニチンアルカロイド量についても同様に大きく異なり、またその製造法の違いによってその差はさらに大きくなった。

このような修治附子の種類によるモノエステルアルカロイド量の差について、その修治による違いにより検討したところ、化学的な処理により減毒されたいわゆる「加工ブシ」は従来の方法で修治されたいわゆる「炮附子」に比べ、そのモノエステルアルカロイド量が著しく大きく、その加工法について基準の必要性が示唆された。

麻黄附子細辛湯、桂枝加述附湯など八味地黄丸以外にもブシを含有する漢方製剤がいくつか存在しこれらのアコニチンアルカロイド量についても検討が必要と考えられた。