

添付書類

Table 1 修治附子中のアコニチンアルカロイドの定量 (三回の実験の平均値±SD)

Material	Method	Aconitine Alkaloids (%)						
		BM	BA	BH	AA	A	M	H
炮附子：A	HCl ext.	0.028±0.006	0.007±0.001	0.015±0.003	N.D.	N.D.	0.005±0.001	0.001±0.001
	AcOEt ext.	0.034±0.005	0.011±0.003	0.015±0.002	N.D.	N.D.	0.008±0.001	0.003±0.002
修治附子：B	HCl ext.	0.170±0.028	0.027±0.003	0.070±0.006	N.D.	N.D.	0.005±0.005	0.003±0.002
	AcOEt ext.	0.16470.011	0.025±0.005	0.064±0.011	N.D.	N.D.	0.004±0.003	N.D.
炮附子：C	HCl ext.	0.025±0.001	0.006±0.000	0.014±0.001	N.D.	N.D.	0.006±0.000	0.001±0.001
	AcOEt ext.	0.028±0.001	0.008±0.001	0.016±0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
加工附子：D	HCl ext.	0.130±0.004	0.057±0.001	0.046±0.001	0.074±0.028	N.D.	0.005±0.003	0.008±0.004
	AcOEt ext.	0.152±0.026	0.068±0.019	0.058±0.019	0.059±0.052	N.D.	0.003±0.005	0.006±0.006

BM: Benzoylmesaconine, BA:B enzoylaconine, 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 (三回の実験の平均値±SD)

Material	Method	Aconitine Alkaloids (%)							
		BM	BA	BH	AA	A	M	H	
八味地黄丸	A	HCl ext.	0.00056±0.00001	0.00032±0.00048	0.00016±0.00002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.		0.00069±0.00029	0.00009±0.00001	0.00028±0.00008	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±0.00042	0.00021±0.00007	0.00106±0.00027	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
C	HCl ext.	0.00124±0.00005	0.00021±0.00013	0.00063±0.00002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	AcOEt ext.	0.00093±0.00008	0.00022±0.00007	0.00072±0.00043	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
D	HCl ext.	0.00972±0.01684	0.00666±0.01153	0.00415±0.00719	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	AcOEt ext.	0.00981±0.00020	0.00437±0.00326	0.00401±0.00021	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	

BMBM: Benzoylmesaconine, BA:B enzoylaconine, BH: Benzoylhypaconine, AA: Anisoylaconine, A: Aconitine, M: Mesaconitine, H: Hypaconitine

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

分担研究者 最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 血清脂質低下作用を示す天然薬物の安全性・有効性を評価する試験系の確立を目的に検討を行った。ペルオキシゾーム増殖剤と総称される一連の化学物質は、レセプター PPAR を介する機構と PPAR 非依存の機構で血清脂質低下作用を示す。PPAR の活性化は発ガンに関連することから、本研究では PPAR 非依存の機構：PE メチル化を直接のターゲットとする肝での VLDL 産生抑制作用を選択的に検出できる系の確立をめざした。ラット肝細胞の PE メチル化活性を制御することで有用な細胞モデルを構築できることが判明した。

#### A. 研究目的

近年、食生活の欧米化から抗動脈硬化薬の需要が増大している。この分野での漢方薬や天然薬物の使用は現在のところ一般的ではないが、今後の増加が予想される。実際に、*Lentinus edodes* や *Agaricus bisporus* などのキノコ類が血清コレステロール低下作用を示すことは以前より知られている。

血清脂質低下薬は長期にわたって使用されるものであるが、フィブラート類は齧歯類に肝ガンを誘発する。これはペルオキシゾーム増殖剤と総称されるフィブラートを含めた一連の化学物質がレセプター（peroxisome proliferator-activated receptor:PPAR）を活性化して引き起こす現象であるが、これらの血清脂質低下作用の一部も PPAR を介する。しかし、PPAR とは独立した機構も存在しており、二つの作用機構のバランスが個々の薬物の安全性・有効性に重要な意義を持つと考えることができる。

本研究では血清脂質低下作用を示す天然薬物の安全性・有効性を評価する方法の確立をめざし、本年度は PPAR 非依存の血清脂質低下作用を検出するための *in vitro* 系を作製した。

#### B. 研究方法

PE メチル化活性を維持し VLDL を分泌す

る肝細胞モデルとして、ラット初代培養肝細胞を使用した。単離後直ちにエタノールアミン（100  $\mu$ M）を添加した培地に移し、また必要に応じてメチオニン（400  $\mu$ M）を欠く培地を使用した。PE メチル化活性は膜面分を単離し 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。VLDL 分泌の指標として、培地へのトリアシルグリセロール分泌量を測定した。

#### C. 研究結果

フィブラート類は、PPAR 非依存の機構として、肝特異的なホスファチジルコリン合成経路であるホスファチジルエタノールアミン（PE）のメチル化経路を阻害し、肝での血清脂質 VLDL 産生を低下させる。この作用のみを選択的に検出するための試験系として、PE メチル化活性の異なる細胞系を確立した。

細胞の PE メチル化活性は基質となる PE レベルとメチル供与体 S-adenosylmethionine の濃度によって制御される。ラット肝細胞内の PE レベルは培養 15 時間で 40 %、PE メチル化活性も 40 %低下した。これは *in vivo* では血液から供給されるエタノールアミンが培養液に欠けているためであり、培地にエタノールアミン 100  $\mu$ M を供給することで培養前のレベ

ルに保つことができた (図 1A)。また、メチオニンを欠く培地で 15 時間培養することで [<sup>3</sup>H]エタノールアミンの PC への取り込みを完全に失った細胞を調製することができた (図 1C)。

これらの細胞モデルを用い、培地へのトリアシルグリセロール分泌に及ぼす PE メチル化阻害剤 bezafibrate (Bz) の作用を調べると、PE メチル化活性を維持した細胞モデル(B)では 56 %阻害するのに対し、PE メチル化活性を失った細胞モデル(C)では 11 時間まで全く影響が見られなかった (図 2)。したがって、細胞モデル(B)と(C)との比較によって、様々な薬物の VLDL 分泌低下作用への PE メチル化阻害の寄与を評価できることになる。

#### D. 考察

Bezafibrate などのフィブレート類は PPAR を活性化してアポ C III、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(C)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、モデル細胞系(B)ではもっぱら PE メチル化阻害をターゲットとした作用のみを検出していると考えられる。従って、本研究で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

細胞の PE メチル化活性を制御する方法を

確立した。これにより PE メチル化を直接のターゲットとして VLDL 産生を抑制する作用機構の評価が可能となった。この細胞モデルは血清脂質低下作用を示す薬物の安全性・有効性を評価する上で有用と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okochi, E., Nishimaki-Mogami, T., Suzuki, K. and Takahashi, A. (1999) Perfluorooctanoic acid, a peroxisome proliferating hypolipidemic agent, dissociates 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

1. 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 (1998.10.16)  
生化学 (1998) 70, 961

2. Vukmirica, J., Nishimaki-Mogami, T., McLeod, R. S., and Yao, Z.  
N-linked glycosylation is important for posttranslational stability and efficient secretion of apo-B.

38th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (1998.12.15)

*Mol. Biol. Cell* (1998) 9, 346a

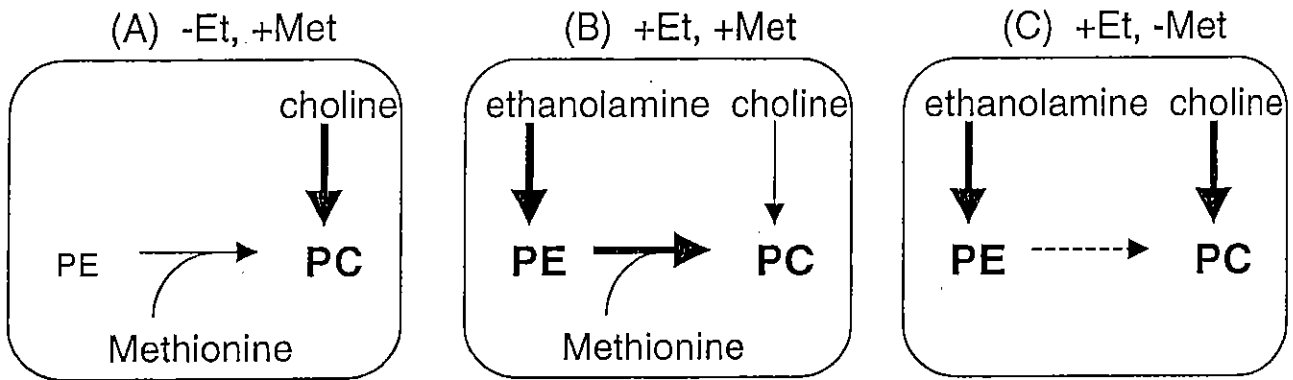


図1. エタノールアミン(Et)、メチオニン(Met)供給によるPEメチル化活性の制御を利用した細胞モデルの構築

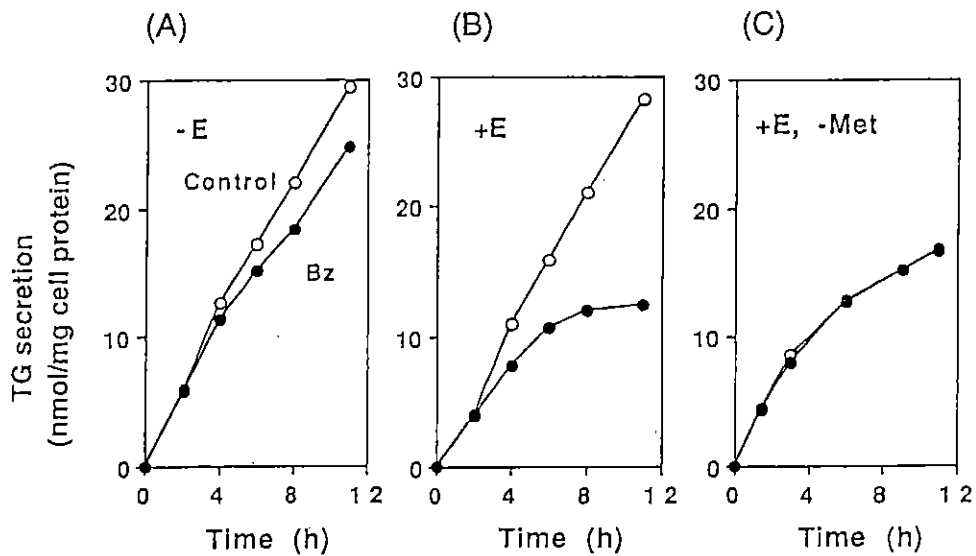


図2. PEメチル化活性の異なる肝細胞モデルを用いた阻害剤bezafibrate(Bz)のトリアシルグリセロール(TG)分泌低下作用の評価