

19990715

平成11年度厚生科学研究費補助金  
(医療安全総合研究事業)

薬効成分を有する天然物一生薬、漢方製剤一  
の安全性に関する研究

平成11年度研究報告書

平成12年3月

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一生薬、漢方製剤一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

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 マウスと、ICR マウスを用いて、小柴胡湯単独投与とモノクロタリンにより誘発されるマウス肺傷害に対する修飾作用を検索した。また、小柴胡湯配合の主要生薬である甘草の成分グリチルレチン酸のアポトーシス誘導について明らかにした。

間質性腎炎の原因物質とされるアリストロキア酸の動物実験に備えて、合成とその純度確認のための分析法を検討した。

アコニチンアルカロイド特に、モノエステルアルカロイド含量と八味地黄丸の調整法との相関についても合わせて検討した。

血清脂質低下作用薬の安全性を評価する系を確立し、この系を用い、シイタケ *Lentinus edodes* の血清脂質低下活性物質 eritadenine が肝細胞からの VLDL 産生を抑制すること、またそれが PE メチル化による PC 合成を阻害する機構によることを明らかにした。

A. 研究目的

小柴胡湯の間質性肺炎については、平成 8 年に因果関係不明なものを含めて 200 例以上が報告されたことから厚生省医薬安全局により「警告」が新設され、緊急安全性情報が配布され、その後も数回、注意喚起を促されていた。しかし、平成 10 年以降も小柴胡湯と関連性が否定出来ない間質性肺炎が 50 例報告され、その内 8 例が死亡している。そこで、平成 12 年 1 月に医薬安全局は、インターフェロン製剤を投与中の患者、に加えて、肝硬変、肝癌のある患者、及び肝硬変が疑われる「血小板数 10

満/mm<sup>3</sup>以下の患者」を禁忌とした。小柴胡湯による間質性肺炎の報告と前後して、小柴胡湯に配合されている黄芩 *Scutellaria baicalensis* と同属植物である *Scutellaria lateriflora* の副作用がヨーロッパで問題となったことから、黄芩が原因ではないかと指摘されたが、その後の副作用報告には麦芽湯等の黄芩が配合されていない漢方薬による間質性肺炎の例も見出されている。

そこで、本研究では間質性肺炎発症の起因物質の特定を目的とし、昨年度から Th1 dominant strain の C57BL/6 マウス (interferon- $\alpha$  高

発現系)と、Th1, Th2 どちらも反応することが知られている ICR マウスを用いて、小柴胡湯によるモノクロタリン誘発肺傷害に対する修飾作用ないし interferon- $\alpha$ の相乗作用に関する実験を行っている。この毒性は肝機能障害を来した患者で強く発現すると報告されている。このことは、小柴胡湯吸収成分が肝代謝によって排泄される経路が肝障害下で遮断され、その結果、吸収成分の体内濃度が上昇することと関連しているかも知れない。そこで、臨床において、肝機能患者における黄今の役割を検討した。

また、主要配合生薬である甘草の成分グリチルレチン酸のアポトーシス誘導について明らかにした。

アリストロキア酸含有する生薬製剤による間質性腎炎発症についても、製剤の回収措置がとられたにも拘わらず、今年度さらに副作用患者が報告された。アリストロキア酸についての動物実験を計画しているが、多量のサンプルが必要で、なおかつ、アリストロキア酸には多くの類縁体が存在するため、作用メカニズムの解明には純度の確実な化合物を用いることが重要で、これらの化合物の合成と純度試験法の確立を行った。

ブシに関する昨年度の報告で、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ことを提唱した。ブシは非常に毒性の強い生薬であるが、日本薬局方には収載されておらず、モノエステルア

ルカロイド含量に関しては全く規定がない状態である。そこで、いくつかの代表的なブシ含有漢方製剤についてアコニチンアルカロイドの定量を行った。

また、八味地黄丸は最も多くの製剤メーカーによって製造販売されているが、その製造方法は様々である。ブシ含有漢方製剤中のアコニチンアルカロイド含量は修治ブシの種類によるだけでなくその調整法の違いによるところも大きいと考えられ、アコニチンアルカロイド含量と八味地黄丸の調整法との相関についても合わせて検討した。

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、シイタケ *Lentinus edodes* が強力な血清コレステロール低下作用を示すことが古くから知られており、活性物質 eritadenine が単離されている。

昨年度の研究でフィブラート類の PPAR 非依存の作用機構である肝でのホスファチジルエタノールアミン (PE) のメチル化経路を介する VLDL 産生低下作用を選択的に検出するための試験系を確立した。本年度は、この系の有用性の確認のために、PE メチル化阻害作用が期待される eritadenine を用い、この物質がフィブラート類と同様に PPAR 非依存のメカニズムで血清脂質を低下させるのか否かについて検討を行

うとともに、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た。

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

### 1) 小柴胡湯に関する研究

#### (1) 動物実験による小柴胡湯起因間質性肺炎解明

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- $\alpha$ （持田製薬）を用いた。動物は4週齢の雄性 C57BL/6 : Crj マウス（SPF）ないし CD-1/ICR: Crj 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1として、各群10匹の5週齢の 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、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2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 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週間混餌投与した。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1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2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- $\alpha$ を $2.5 \times 10^4$ 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- $\alpha$ の陰性対照もそれぞれ設けた。次に実験3として、ICR マウスを用いて、モノクロタリンの投与回数を1回増やして、150mg/kgの割合で計5回皮下投与し、モノクロタリン投与開始時ないし最終投与の1週間後から、小柴胡湯を0.1%ないし2.0%の割合で、各群15-16匹に11週ないし6週間混餌投与した。最後に実験4として、ICR マウスに対してモノクロタリンを5回投与後、6週間にわたる2%の小柴胡湯の混餌投与期間中に interferon- $\alpha$ の隔日投与を行った。また、小柴胡湯の陰性対照も設けた。

#### (2) 肝機能障害治療における配合生薬加減

平成7年9月から前額部を中心に面皰が出現し、平成9年8月9日、当院漢方外来を受診した。当帰芍薬散料加桃仁、牡丹皮、意苡仁で面皰は改善した。便秘を伴う痔があった

ため、平成 11 年 8 月 5 日より乙字湯加意苡仁に変方した。12 月初旬より右季肋部に膨満感自覚した。肝機能検査で GOT40、GPT64 と高値であった。乙字湯の中から黄今を抜き投与した。

(3) マウス胸腺およ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

C57BL/6 マウスに GA2.5mg を投与し、24 時間後の胸腺および脾臓を摘出した。摘出した臓器から細胞懸濁液を調製し、各細胞のアポトーシスを Annexin-5 および MitoTracker を用いてフローサイトメーターで測定した。また、CD4、CD8 の発見を、モノクローナル抗体を用いて解析した。

## 2) アリストロキア酸に関する研究

(1) 天然成分である Aristolochic acids I, II の混合物を出発原料とし、エステル化反応、還元反応の 2 ステップで Aristolactam, Cepharanone -A をそれぞれ合成し、分離精製した。

(2) これらの純度を確定するために、純度試験法を、さらに、副作用起因製剤中の定量を行うための試験法を検討した。

## 3) ブシに関する研究

(実験材料)

修治附子は 4 製品を用いた。修治附子を含む漢方製剤として八味地黄丸、桂枝加朮附湯、麻黄附子細辛湯、牛車腎気丸、真武湯について検討した。

(抽出法)

1. 酢酸エチルによる抽出 粉末化した検体約 200mg を PYREX 試験管(遠心機用キャップ付)に精秤し、酢酸エチル 2.0ml および 28%アンモニア水 100 $\mu$ l を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、室温で 60 分間超音波抽出した。10 分間遠心(3000rpm)し(×2:超音波による抽出の 2 回目は 30 分)、分取した上清に 1M HCl 1.5ml を加え分配した(×2)。HCl 層を 28%アンモニア水 100 $\mu$ l でアルカリ性にし、酢酸エチル 1.5ml で抽出(×2)した後、濃縮乾固し、分析用のサンプルとした。

2. 塩酸による抽出 粉末化した検体約 200mg を PYREX 試験管(遠心機用キャップ付)に精秤し、1M HCl 2.0ml を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、室温で 60 分間超音波抽出した。10 分間遠心(3000rpm)し(×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 100 $\mu$ l を適量加えてアルカリ性にし、酢酸エチル 1.5ml で抽出(×2)した後、濃縮乾固し、分析用のサンプルとした。

(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。

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：紫外吸光度計 (測定波長：235nm、260nm)」

4) PPAR 非依存の血清脂質低下作用を評価法に関する研究

ラット肝細胞を単離後直ちにエタノールアミン (100 mM) を添加あるいは非添加の培地に移して培養した。8 時間後にエタノールアミン非添加細胞はメチオニン (400 mM) を欠く培地、エタノールアミン添加細胞は通常培地に替えてさらに 12 時間培養した。VLDL 分泌の指標として、培地へのトリグリセリド (TG) 分泌量を測定した。PE メチル化活性は培地に添加した [3H] エタノールアミンの細胞内 PC への取り込みから測定した。

## C. 研究結果

### 1) 小柴胡湯に関する研究

#### (1) 動物実験による小柴胡湯起因間質性肺炎解明

実験 1 においては、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。また、病理組織学的検索の結果、

C57BL/6 マウスでは小柴胡湯による明らかな肺傷害の誘発を認めなかった。

実験 2 においても、C57BL/6 マウスでは、この実験条件下で肺傷害を殆ど誘発せず、小柴胡湯によるモノクロタリン誘発肺傷害に対する修飾作用ないし interferon- $\alpha$  の相乗作用は明らかにできなかった。

実験 3 において、ICR マウスでは、モノクロタリン投与により、2 型肺胞上皮の減少、残存上皮細胞の Megakaryosis、肺胞壁の線維素性肥厚、肺胞腔内への線維素の析出 (硝子膜形成)、肺胞腔内へのマクロファージの浸潤・集積、管周囲炎ないし 管炎の変化を認めた。各個体におけるこれらの病理所見のグレーディングを行い群間での程度の比較をしたところ、多くの所見において、11 週間にわたり小柴胡湯を投与した群で肺傷害の程度が増強しており、0.1% 群より 2% 群でより明らかであった。また、肺胞壁の線維素性肥厚、肺胞腔内への線維素の析出 (硝子膜形成)、肺胞腔内へのマクロファージの浸潤・集積の所見を間質性肺炎の所見とし、総合的にグレーディングを行った結果も同様であった。

実験 4 においては、モノクロタリン投与の後 interferon- $\alpha$  を投与した動物では肺傷害部位に一致して強いリンパ球浸潤を認めたものの、肺傷害に対する明らかな増強効果を認めず、小柴胡湯との相乗作用は認められなかった。また、小柴胡湯 6 週間

投与による影響も実験3とほぼ同様に明らかではなかった。

## (2) 肝機能障害治療における配合生薬加減

平成7年9月から前額部を中心に面皰が出現し、平成9年8月9日、当院漢方外来を受診した。当帰芍薬散料加桃仁、牡丹皮、意苡仁で面皰は改善した。便秘を伴う痔があったため、平成11年8月5日より乙字湯加意苡仁に変方した。12月初旬より右季肋部に膨満感自覚した。肝機能検査でGOT40、GPT64と高値であった。乙字湯の中から黄今を抜き投与したところ、1月4日にはGOT32、GPT43、2月3日にはGOT22、GPT25と低下した。

## (3) マウス胸腺およ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

GA投与後、胸腺重量は非投与群に比べ有意に減少し、胸腺細胞アポトーシスの亢進がフローサイトメトリーにより確認された( $p < 0.01$ )。一方、脾臓重量には有意な変化が認められず、アポトーシス誘導も認められなかった。T細胞サブセットの解析では、GA投与により、CD4+CD8+ダブルポジティブ細胞(DP細胞)の比率の減少が顕著であった。

## 2) アristolochic acids に関する研究

(1) Aristolochic acids I, IIの混合物(Sigma-Aldrich)に、メタノール中、トリメチルシリルジアゾメタンを作用させ、メチルエステルとし、

続いてパラジウム炭素を触媒量加えて、水素ガス存在下、還元し、Aristolactam, Cepharanone-Aとした。HPLCにより分離精製し、Aristolactam, Cepharanone-Aを得た。構造はNMRで確認した。

## (2) 純度試験及び定量試験のために、

HPLC法を設定した。試料溶液：試料2.0gを精密に量り、75% MeOH 50mlを加えて超音波抽出(20分間)し、遠心分離(2000rpm, 10分間)し、上澄み液を分取し、試料溶液とした。(1g/25mL)

標準溶液：アリストロキア酸 I, II, IV, アリストロキアラクタムをそれぞれ10 $\mu$ g/25mLに調製した。

カラム：LiChrospher 100 RP-18 (e) 5 $\mu$ m

移動相：0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN: MeOH (350:650:1)

検出波長：310nm

流速 1ml/min.

## 3) ブシに関する研究

各製品の修治附子中の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。

モノエステルアルカロイド含有量を

BM、BA、BH の和と考えると、A 社炮附子、C 社炮附子では 0.05%程度、B 社修治附子、D 社加工附子では 0.26%程度であり 5 倍の差があった。

また、残存ジエステルアルカロイド量を A、M、H の和と考えるといずれも 0.01%程度であり差は見られなかった。

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。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。

《ブシ含有漢方製剤：Table 2》

いずれもこの方法では残存ジエステルアルカロイドは検出されなかった。しかしモノエステルアルカロイドの含有量に関しては修治附子と同様に製品によってかなりの差が認められた。

○八味地黄丸

モノエステルアルカロイド含有量を BM、BA、BH の和と考えると、A 社 0.001%、B 社 0.005%、C 社 0.002%、D 社 0.02%、E 社 0.003%、F 社 0.004%、G 社 0.01%、I 社 0.004%、J 社 0.005%程度であり、約 20 倍もの差が認められた。

○麻黄附子細辛湯

D 社では約 0.15%であったが B 社では 0.02%程度で 7 倍の差があった。

○桂枝加述附湯

D 社では約 0.07%、E 社では約

0.005%で 14 倍の差。

○牛車腎気丸

K 社、L 社ともに 0.005%程度であった。

○真武湯

D 社のものだけであるが約 0.06%であった。

しかし各社製剤によって一日あたりの投与量が異なっており、また賦形剤などを加えている場合もあるので、代表的な八味地黄丸について 1 日量中のモノエステルアルカロイド量について検討した。その結果、A 社が約 0.06mg であるのに対して D 社は約 0.9mg と約 15 倍の差が認められた。

4) PPAR 非依存の血清脂質低下作用を評価法に関する研究

フィブラート類は、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。昨年度の研究で、この PPAR 非依存の作用のみを選択的に検出するために PE メチル化活性の異なる細胞モデルを確立した。すなわち、エタノールアミンを添加して培養し PE メチル化活性を維持した細胞モデル(+E+M)とエタノールアミンとメチオニンを欠く培地で培養し基質の PE とメチル供与体レベルの枯渇によって PE メチル化活性が低下した細胞モデル(-E-M)である。

この二つのモデル細胞を用いて eritadenine の培地への TG 分泌に



対する影響を検討した。PE メチル化活性が維持された細胞モデル(+E+M)では eritadenine は濃度に依存して TG 分泌を低下させ、20 mM で 84%の低下が観察されたのに対し、PE メチル化活性が低下した細胞モデル(-E-M)では最大で 22%の低下にとどまった。このことから、eritadenine は肝細胞からの TG 分泌を阻害すること、またその阻害作用は細胞の PE メチル化活性に強く依存することが明らかになった。

Eritadenine は S-adenosyl homocysteine (SAH) hydrolase の強力な阻害剤であり、細胞内でのメチル供与体 S-adenosylmethionine (SAM)/SAH 比を低下させることが報告されている。この結果、細胞内のメチル化反応が阻害されると推定されている。ホスファチジルエタノールアミン (PE) のメチル化によるホスファチジルコリン(PC)合成への影響を調べたところ、3時間のあいだに PC に取り込まれる[3H]エタノールアミン由来の放射能は 20 mM で 90% 低下した。このことから、eritadenine が PE のメチル化を強力に阻害することが確認された。従って、eritadenine は PE メチル化による PC 合成の阻害を介して VLDL 分泌を低下させることが判明した。

#### D. 考察

動物実験による小柴胡湯起因間質性肺炎解明において、Tリンパ球は免

疫応答の主役であり、特にヘルパー T(Th)細胞が重要である。遅延型過敏症反応に代表される「細胞性免疫」と、抗体産生に代表される「体液性免疫」とは、生体において相反する関係にあることが以前より指摘されてきているが、その後、サイトカイン産生から見た 2 種類の Th 細胞サブセット(Th1/Th2)により説明されるようになってきた。

小柴胡湯は慢性肝炎による肝機能障害等に用いられる医療用の漢方薬であるが、この処方患者での間質性肺炎の誘発が問題となり、昨年、肝硬変、肝癌患者における使用が禁止された。これらの患者においては、小柴胡湯が何らかの形で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<sup>b)</sup>。

マウスに対するモノクロタリンの頻回投与により、ヒトの間質性肺炎、さらには肺線維症に類する病変を誘発することが知られている<sup>c)</sup>。また、モノクロタリンにより誘発される肺傷害に対して免疫反応の関与が示唆される。例えば 1) モノクロタリン投与によるラット肺での MCP-1 活性の上昇(ラットでは\_管内皮傷害が主である)、2) Th1 dominant である C57BL/6 マウスはモノクロタリン誘発肺傷害に対して比較的耐性であること<sup>d)</sup>、3) 今回の検索により、マウスにおいても\_管を標的とした変化が得られたこと(新知見)、等が示される。

このような状況を鑑みて、これから行わなければならない研究として、まず、モノクロタリン誘発肺傷害が

Th1 ないし Th2 のどちらのサブセットが主役をなして生じるのかを明らかにしなければならない。その後、小柴胡湯投与によりどのようなケモカインが病変の増悪に関与するのかを明らかにするべきである。そのためにはまず、Th1 dominant strain の C57BL/6 と Th2 dominant な BALB/c マウスを用いた比較実験が必要であろう。今回、病理組織学的検索により得られた小柴胡湯の肺傷害に対する増強効果は、比較的軽度であったので、より長期間の小柴胡湯曝露を行ったときでの肺傷害修飾作用を検討する必要があると考えられる。当然、そのような状況での interferon- $\alpha$  と小柴胡湯との相乗作用を検索し直す必要があると考える。

来年度は、ICR マウスを用いた実験 3 において、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免疫組織化学的に比較し、炎症の数値化した指標となりうるかどうかについて検討を行う。また、モノクロタリン誘発肺傷害に対する免疫反応の関与についても肺における各種ケモカインの mRNA レベルの検討を進め、Th1, Th2 のどちらが優位に働いているのかを明らかにし、それに対する小柴胡湯の修飾作用について検索を行う。

肝機能障害治療患者に対して、配合生薬の加減を行った結果、本症例の肝機能障害の改善作用には黄芩は関与していないものと考えられた。今後、間質性肺炎との関連性について検討を進める予定である。

マウス胸腺および脾臓細胞のアポトーシスに及ぼすグリチルレチン酸

投与の影響を検討したところ、マウスに投与すると、胸腺重量が減少し、胸腺細胞がアポトーシスを起こして死滅することが判明した。死滅する細胞種はダブルポジティブ細胞であった。胸腺細胞に対するグリチルレチン酸の薬理作用は内因性コルチゾール代謝の阻害作用を介して進行した。この作用は胸腺細胞に留まらず脾臓細胞にまで及んでいた。即ち、グリチルレチン酸は未成熟 T 細胞だけでなく、胸腺で発達し末梢循環に放出された T 細胞をもアポトーシスに誘導することが明らかになった。

間質性腎障害のメカニズムの解明と起因物質の構造活性との関連を解明するために行った Aristolochic acids から Aristolactam への変換反応はすでに報告 (Monatsheft für Chemie, 1956, 249-268) されているが、詳しい反応条件、NMR による構造の確認は記載されていない。今回は上記とは別の、簡便で、効率的な方法で合成を行った。また、製剤中の定量法についても検討した。

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、使っているブシが異なるので正確な比較はできないが、あえてその修治による違いにより考察した。大見生薬炮附子および小太郎炮附子は、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、ツムラ修治附子および三和加工附子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 0.26%と約 5 倍の違いが見られた。トリカブトの種類、産地、採取時期の違い以外にこの修治によってもモノエステルアルカロイド量は大きく左右されると考えられる。

また、今回検討した4社の修治附子が配合されている八味地黄丸について、修治附子から定量されたアコニチン系アルカロイドが製剤からどの程度の割合検出されるかを検討した。製品 A は、古来の製法に従って調製するいわゆる八味地黄丸で混合生薬 1 日量 6000mg に 130mg の炮附子末を含む。抽出効率は塩酸抽出 96%、酢酸エチル抽出 81%であった。製品 B は、混合生薬 22g (修治ブシ末 0.5g) の乾燥エキス 4.0g を含む顆粒剤 7.5g を 1 日量としている。抽出効率は塩酸抽出 157%、酢酸エチル抽出 115%と塩酸抽出において高めの値を示した。製品 C は、混合生薬 11g (炮附子 0.5g) の水製エキス 2.6g を 1 日量 4.5g に調整して錠剤化している。抽出効率は塩酸抽出 181%、酢酸エチル抽出 141%とやや高い値を示した。製品 D は、附子を除いた混合生薬 7.65g から抽出されたエキス 1.5g に加工ブシ末 1.5g を加え、全量 4.5g に調整したものを 1 日量として錠剤化している。抽出効率は塩酸抽出 26%、酢酸エチル抽出 20%とかなり低い

値を示した。製品 B 及び C のように、一般に抽出エキスを用いて製造される八味地黄丸製剤は抽出した後、残渣などを取り除いているため本来の丸剤より抽出効率が上昇すると考えられる。製品 D は、抽出効率が他社に比べて極端に低い値を示している結果から、この製剤が記載通りに調整されていないか、あるいは加工ブシ末単独で処方されるものと漢方薬に配合される加工ブシ末とは異なるものが使用されている可能性が考えられる。また製品 C および D はブシの配合割合を変えて調整しており、製品 D にいたっては加工ブシ末以外の生薬の抽出エキスに加工ブシ末をそのまま配合している。この製造方法を八味地黄丸に属する漢方薬として認めるかについてまず検討を要する。

Eritadenine はアデノシンアナログであり、S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase の強力な阻害剤である。その結果として細胞のメチル化反応一般が阻害されることが予想される。Eritadenine を投与したラット肝ミクロゾームでは PC/PE 比が劇的に低下しており、PE メチル化阻害の結果と推定されてきた。しかしながら、この PE メチル化阻害作用と VLDL 分泌の関係は全く省みられず、eritadenine は分泌されたりポタンパクの肝での再取り込みを促進して血清脂質低下作用を示すとする説が受け入れられてきた。これは、

PC/PE 比の低下によって膜の流動性が変化し、膜酵素である D6 不飽和化酵素活性が低下してリノール酸の低下とアラキドン酸の増加がもたらされる。血漿リポタンパクの脂肪酸組成が同様の変化を受ける結果、肝臓へのリポタンパクの取り込みが促進されるという、実に長大な作用機構である。これに対し、本研究では、eritadenine は肝細胞からの VLDL 分泌を直接阻害することを示し、同時にこの作用は PE メチル化経路による PC 合成の阻害を介することを証明した。本研究によって、天然物由来の血清脂質低下物質 eritadenine の作用メカニズムが明らかになったと同時に、昨年度の本研究で確立した細胞モデルが薬物の 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ことを確認することができた。

#### 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、Th1 dominant strain の 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、モノクロタリン誘発肺傷害（間質性肺炎モデル）に対する、小柴胡湯ないし小柴胡湯+ interferon- $\alpha$  の投与の影響を検索した結果、いずれにおいても肺傷害を誘発することができなかった。一方、Th1, Th2 どちらも反応することが知られている ICR マウスを用いてのモノクロタリン誘

発肺傷害に対する小柴胡湯の修飾作用を病理組織学的に検討した結果、ヒトの臨床使用量に相当する濃度の小柴胡湯の 11 週間投与例において、軽度ながら明らかな病変の増強作用が認められた。Interferon- $\alpha$  の併用は、病変部位に一致して強いリンパ球浸潤を認めたものの、肺傷害の増強を示さなかった。

以上の結果より、小柴胡湯は弱いながらも明らかな肺傷害増強作用を示したが、より確証を得るためには免疫学的検索も含めたより系統的な研究が望まれる。昨年度の報告で間質性肺炎と肝機能障害を来した症例を報告したが、両者同時に来すことが多く、その病因には共通のものがあると考えられる

Aristolochic acids I, II を出発原料とし 2 ステップで Aristolactam, Cepharanone-A をそれぞれ合成し純度を確認した。今後、これを用いて、毒性実験等を行う予定である。

修治ブシ中のモノエステルアルカロイド量は、修治ブシ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。またこれら修治ブシを用いた漢方製剤中のモノエステルアルカロイド量についても同様に大きく異なり、また八味地黄丸にかんしてはブシの配合割合を含むその製造法の違いによるところも大きい。

そこで、修治ブシおよびブシ含有漢方製剤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示唆された。

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。

昨年度確立した細胞モデルを用い、シイタケ *Lentinus edodes* の血清脂質低下活性物質 eritadenine が肝細胞での PE メチル化による PC 合成を阻害し VLDL 産生を抑制する作用メカニズムを明らかにした。

## 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性肺炎を来した一例、*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

H. Horigome, A. Horigome, M. Homma, T. Hirano, and K. Oka.

Glycyrrhetic acid-induced apoptosis in thymocytes: impact of 11 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase inhibition.

*Am. J. Physiol.* 277:E624-E630, 1999.

M. Homma, M. Minami, C. Taniguchi, K. Oka, S. Morita, T. Niitsuma, and T. Hayashi. Inhibitory effects of lignans and flavonoids in Saiboku-to, a herbal medicine for bronchial asthma, on

- the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes. *Planta Med.* 66:88-91, 2000.
- 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* 1437, 393-401
- 最上(西巻)知子：アポ B リポ蛋白分泌の機構とその制御. (1999) *The Lipids*, 10, 32-39
- Conversion of Procyanidin B type (Catechin Dimer) to A type: Evidence for Abstraction of C-2 Hydrogen in Catechin during Radical Oxidation
- K. Kondo, M. Kurihara, K. Fukuhara, T. Tanaka, T. Suzuki, N. Miyata, M. Toyoda  
*Tetrahedron Lett.*, 41, 485-488 (2000)
- Trans-4-hydroxy-2-nonenal, an aldehydic lipid peroxidation product, lacks genotoxicity in lacI transgenic mice.
- A. Nishikawa, F Furukawa, K. Kasahara, S. Ikezaki, T. Itoh, T. Suzuki, K. Uchida, M. Kurihara, M. Hayashi, N. Miyata, M. Hirose  
*Cancer Lett.*, 148, 81-6 (2000)
- Conformational Analysis of Homooligopeptides Prepared From Isovaline and Diethylglycine: Molecular Mechanics Study
- M. Kurihara, M. N. Miyata, Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune  
*JCPE Journal*, 11, 185-190 (1999)
- Molecular Mechanics Study on Conformation of a Homooligopeptide Constituted by Isovaline
- M. Kurihara, M. Tanaka, N. Imawaka, H. Suemune, N. Miyata  
*Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 117, 166-168 (1999)
- Computational Study on Antioxidation Mechanisms of Catechins
- M. Kurihara, K. Kondo, K. Fukuhara, M. Toyoda, N. Miyata  
*Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 117, 163-165 (1999)

- Scavenging Mechanisms of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epicatechin Gallate on Radical Oxidation, and Formation of Superoxide During the Inhibitory Action.
- K. Kondo, M. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, M. Toyoda : Helical versus Planar Conformation of Homooligopeptides Prepared from Diethylglycine (= 2-Amino-2-ethylbutanoic Acid) , Free Radical Biol. Med., 27, 855-863 (1999)
- M. Tanaka, N. Imawaka, M. Kurihara, H. Suemune Determination of 4-Hydroxy-2-nonenal in Primary Rat Hepatocyte Cultures by Liquid Chromatography with Laser Induced Fluorescence Detection Helv. Chim. Acta., 82, 485-493 (1999)
- Y.-M. Liu, H. Jinno, M. Kurihara, N. Miyata, T. Toyooka Stereoselective Synthesis of an Erythro  $\alpha$ -Amino Epoxide Derivative Biomed. Chromatogra, 13, 75-80 (1999)
- M. Kurihara, K. Ishii, Y. Kasahara, and N. Miyata Mechanistic Studies of Catechins as Antioxidants against Radical Oxidation Tetrahedron Lett. 40, 3183-3184 (1999)
- K. Kondo, M. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, M. Toyoda Arch. Biochem. Biophys., 362, 79-86 (1999)
2. 学会発表
1. Vukmirica, J., Nishimaki-Mogami, T., McLeod, R. S., and Yao, Z.: Functional analysis of the role of N-linked glycosylation of apoB in lipoprotein assembly and secretion. 72nd Scientific Sessions, American Heart Association (Atlanta, GA, USA) 1999年11月
- 217th ACS National Meeting(Anaheim, 1999/3/21-25)
- Stereocontrolled Synthesis of an Erythro N-protected  $\alpha$ -Amino Epoxide, a Versatile Intermediate for Preparation of Protease Inhibitors.
- M. Kurihara, N. Miyata
- トリガーを有するエンジン分子の設計と合成  
栗原正明, 小田原毅, 加藤幸弘, 福原 潔, 宮田直樹  
第25回反応と合成の進歩シンポジ

ウム（平成 11 年 11 月，富山）

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

小柴胡湯による間質性肺炎ならびにアリストロキア酸による間質性腎炎  
に関する研究

分担研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 小柴胡湯の間質性肺炎を病的に検討するために、動物投与のための試料調製を行い、誘発、修飾作用を病理と共同で検討した。間質性腎炎の原因成分とされるアリストロキア酸の純度試験法と定量試験法を確立した。

A. 研究目的

生薬、漢方製剤の副作用として、間質性腎炎、間質性肺炎が報告されている。間質性肺炎については、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、平成11年においても死亡報告が出されていて、肝癌、肝硬変においては改めて禁忌とされた。そこで、本研究では間質性肺炎発症のメカニズムを解明する目的で、マウスへの投与実験を開始している。今年度は島予後の病理解析に参加し検討を行った。アリストロキア酸については、イギリス MCA(Medicines Control Agency) がアリストロキア酸の規制に加えて、*Akebia quinata*, *A. trifoliata*, *Clematis armandii*, *C. mantana*, *Cocculus orbiculatus*, *C.*

*thunbergii*, *C. trilobus*, *Stephania tetrandra* が追加され、ライセンスなしには販売出来ないことになった。アリストロキア酸を含有する *Aristrochia* 属植物ならびに *Cocculus* 属植物は日本では薬局方や一般用漢方処方規格外で、使用していないが、*Akebia quinata*, *A. trifoliata* は日本の木通であり、アリストロキア酸を含まないことが明確にされているものである。また、*Clematis armandii*, *C. mantana* も同様にアリストロキア酸は含まれていない。単に名称の類似性から規制の対象になったものと考えられ、これらの誤りを指摘するためには生薬中のアリストロキア酸の定量法を設定することが重要である。

しかし、多成分系からなる漢方製剤の何がどのようにして間質性肺炎を誘発するかや AA 類のどの化合物が原因物質かについての詳細は明確にされていない。そこで今年度は、発生メカニズム、起因物質の解明のための試料の準備と定量法の確立を目的とした。

#### B. 研究方法

生薬を MeOH で 50℃, 1 時間抽出を 3 回繰り返し、濃縮後得られたエキスに CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加え、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 可溶部を各種のカラムクロマトグラフィーに付し、最後は HPLC にて精製し、NMR で構造を確認することによりアリストロキア酸 I, II, IV, アリストロキアラクタムを得た。

これらの化合物を標準品として定量条件を検討した。

#### C. 研究結果

定量用 HPLC として次の条件を得た。

試料溶液：試料 2.0g を精密に量り、75% MeOH 50ml を加えて超音波抽出（20 分間）し、遠心分離（2000rpm, 10 分間）し、上澄み液を分取し、試料溶液とした。（1g/25mL）

標準溶液：アリストロキア酸 I, II, IV, アリストロキアラクタムをそれぞれ

10 μg/25mL に調製した。

カラム： LiChrospher 100 RP-18  
(e) 5 μm

移動相： 0.1%TFA/CH<sub>3</sub>CN: MeOH  
( 350 : 650 : 1 )

検出波長 : 310nm

流速 1ml/min.

#### C. 研究結果

設定した条件で生薬中の定量を行ったところ、*Aristolochia manshuriensis* は aristolochic acid I 0.61mg/g , aristolochic acid II 0.18mg/g , aristolochic acid IV 及び aristolactum は検出されなかった。広防己 aristolochic acid I 4.3mg/g , aristolochic acid II 0.12mg/g であった。

#### D. 考察

動物実験による小柴胡湯の間質性肺炎については病理部の報告に示したように、一部に傷害性が認められてはいるが、小柴胡湯に起因する傷害性は見出されていない。今後は、肝傷害との相関を踏まえた実験系を視野に入れて検討したい。

アリストロキア酸による副作用については、ヨーロッパの規制が進ん

でいる。現在日本の薬局方と中国の薬典委員会の調和を進めており、基原植物が異なるにも関わらず、類似した生薬名がつけられているものについては混乱を避けられないためなんらかの対応が必要と合意している。今回のイギリスの規制強化にはまさしくこの点がからんでおり、規制すべき成分を含む生薬と含まない生薬については明確にすべきである。そのためにもアリストロキア酸の作用と類縁体の作用を、最近提出された上田志朗ら（千葉大）により腎肝質繊維化の報告を参考にしながら、明らかにすることを続行したい。

#### E. 結論

小柴胡湯の間質性肺を病的に検討するために、動物投与のための試料調製を行い、誘発、修飾作用を病理と共同で検討した。

間質性腎炎の原因成分とされるアリストロキア酸の純度試験法と定量試験法を HPLC を中心に確立した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得

なし

## 分担研究報告書（平成11年度）

## 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 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、まず、Th1 dominant strain の C57BL/6 マウス (interferon- $\alpha$  高発現系) と、Th1, Th2 どちらも反応することが知られている ICR マウスを用いて、以下の実験を行った。実験1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。その結果、体重及び摂餌量の推移に群間による明らかな差を認めず、肺の病理組織学的検索でも、小柴胡湯による明らかな変化を認めなかった。実験2として、C57BL/6 マウスを用いて、モノクロタリンにより誘発されるマウス肺傷害 (間質性肺炎モデル) に対する小柴胡湯の修飾作用を検索した。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 週間混餌投与した。このモノクロタリン投与の実験デザインは ICR マウスを用いて明らかに肺傷害を誘発するデザインを基にしている。また、ヒトで間質性肺炎発症に小柴胡湯と interferon- $\alpha$  の相乗作用が疑われていることから、C57BL/6 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- $\alpha$  を  $2.5 \times 10^4$  units/マウス、週 3 回、計 6 回、腹腔内投与した。モノクロタリン、小柴胡湯、及び interferon- $\alpha$  の陰性対照もそれぞれ設定した。その結果、ICR マウスとは異なり、C57BL/6 マウスでは、この実験条件下で肺傷害を殆ど誘発せず、小柴胡湯によるモノクロタリン誘発肺傷害に対する修飾作用ないし interferon- $\alpha$  の相乗作用は明らかにできなかった。次に ICR マウスを用いて、同様の実験 (実験 3, 4) を行った。すなわち、モノクロタリンを 150mg/kg の割合で週 1 回、計 5 回、5 週齢の雄 ICR マウスに皮下投与し、モノクロタリン投与期間中から、ないしは投与終了後 1 週目より、小柴胡湯を 0.1% ないし 2.0 % の割合で、11 週ないし 6 週間、投与した (実験 3)。その結果、11 週間にわたり小柴胡湯を投与した群で肺傷害の程度が増強しており、0.1% 群より 2.0% 群でより明らかであった。次に、実験 4 として、モノクロタリンを 5 回投与後、6 週間にわたる 2.0% の小柴胡湯の混餌投与期間中に interferon- $\alpha$  の隔日投与を行った。その結果、モノクロタリンの後 interferon- $\alpha$  を投与した動物では肺傷害部位に一致して強いリンパ球浸潤を認めたものの、肺傷害に対する小柴胡湯との相乗作用は認められなかった。以上より、長期間の小柴胡湯投与は、モノクロタリン誘発肺傷害を軽度ながら増強することが示されたが、より長期間の投与による増強の有無を確認する必要がある。