

る。また、修飾作用のメカニズムの検索には、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る。来年度は、実験 3 の ICR マウスにおけるケモカインの発現解析を行う予定である。

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、高用量（臨床使用量の 5-20 倍）の小柴胡湯の投与実験（C57BL/6 のみ）と、モノクロタリンを用いた実験的肺傷害（間質性肺炎モデル）に対する小柴胡湯の修飾作用を病理学的に検索した（C57BL/6 と ICR マウス）。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検討した（C57BL/6 と ICR マウス）。

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: 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（Figure 1）。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（Figure 2）。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- 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（Figure 2）。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。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 (Figure 3)。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- α の隔日投与を行った。また、小柴胡湯の陰性対照も設けた (Figure 4)。

C. 研究結果

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- α 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 (Table 1)。

実験 4 においては、モノクロタリン投与の後 interferon- α 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 (Table 2)。

D. 考察

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^{b)}。

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^{c)}。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^{d)}、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- α 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。

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- α 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- α 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。

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; c) Hayashi et al. (1995) Toxicol Pathol, 23, 63-71; d) Deyo et al. (1994) Toxicology 94, 209-222.

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。

厚生省科学研究補助金-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」

渡邊 賢治 北里研究所東洋医学総合研究所

研究要旨

平成10年度は小柴胡湯、半夏瀉心湯により間質性肺炎ならびに肝機能障害を来した例を報告した。現在までに間質性肺炎の報告のある漢方薬は9種類あるが、いずれもその構成生薬として黄耆を含んでおり、黄耆がこうした合併症の関与している可能性が示唆されている。

本年度は乙字湯により肝機能障害を来し、構成生薬の黄耆を除くことで肝機能障害の改善した例を経験したので報告する。

A. 研究目的

既往歴として、クラリスにて肝機能障害のある50歳女性の乙字湯加意苡仁去黄耆による症状改善を行った。

B. 研究方法と C. 結果

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を自覚した。肝機能検査でGOT40、GPT64と高値であった。乙字湯の中から黄耆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。以上より、本症例の肝機能障害の改善作用には黄耆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。

D. 考察と F. 結論

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、両者同時に来することが多く、その病因には共通のものがあると考えられる。現在ま

で、間質性肺炎の報告のある漢方方剤は小柴胡湯、柴朴湯、柴苓湯、柴胡桂枝乾姜湯、辛夷清肺湯、清肺湯、大柴胡湯、半夏瀉心湯、乙字湯が挙げられており、その共通する生薬は黄芩である。黄芩の主成分はフラボノイドのバイカリン、バイカレインであり、強い抗酸化作用、免疫調節作用を有する。本例のように黄芩一味を抜くことで黄芩の役割を示した報告はなく、本例は間質性肺炎、肝機能障害を考える上で貴重な症例と考えられ報告した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki Y, T Aoki, Nishio K, Takeuchi O, Toda K, Watanabe K, Suzuki K, Miyata A, Sato N, Naoki K, Takeshita K, Kudo H and Yamaguchi K: Effect of steroid on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in pulmonary endothelial cells. Am. J. Physiol. Lung Cell .Mol.Physiol. 278,245-252,2000
2. Watanabe K, KazakowaI, Furniss M and Miller SC; Dual activity of pyrrolidine dithiocarbamate on κ B-dependent gene expression in U937 cells:I. Regulation by the phorbol ester TPA. Cell.Signal. 11, 479-489, 1999.
3. Watanabe K, KazakowaI, Furniss M and Miller SC; Dual activity of pyrrolidine dithiocarbamate on κ B-dependent gene expression in U937 cells:II. Regulation by tumor necrosis factor- α . Cell.Signal. 11, 379-381, 1999.
4. 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 日本東洋医学会雑誌 50: 57-65、1999
5. 渡辺賢治、金成俊、鈴木邦彦、村主明彦、丁宗鉄、山田陽城、岡利幸、花輪壽彦：乳児皮疹に対する経母乳的漢方治療 日本東洋医学会雑誌 49: 851-859, 1999

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

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11-HSD) は、生理的に活性な11-hydroxy GC と、不活性な11-oxo GCの相互変換を行う酵素である。我々はこれまでにグリチルレチン酸 (GA)がGC代謝阻害を介してGCレベルを上昇させることにより、胸腺細胞のアポトーシスを誘導することを報告してきた。本研究では、GAをマウスに投与し、胸腺細胞および脾臓細胞のアポトーシスに及ぼす影響を検討するとともに、T細胞マーカーであるCD4およびCD8発見を検討し、T細胞サブセットの変化についても調べた。また、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

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。

6種のフラボノイドの血中濃度-時間曲線を描いた。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、オウゴニン、ジヒドロオウゴニン、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、ジヒドロオウゴニンはオウゴニ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、グリシルレチン酸を選んで免疫臓器に及ぼす薬理学的効果を観察した。マウス腹腔内に2 mg のグリシ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によって確認した。

C. 研究結果

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D. 考察

GAは11-HSD阻害作用を介してGC濃度を増加させ、その結果、未成熟な胸腺のDP細胞がアポトーシスを起こして減少するものと考えられた。一方GAは、脾臓細胞に対してはアポトーシスを誘導しないものと考えられた。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ら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は速度定数を 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

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。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。

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シ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、グリシ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ルチコステロンの代謝阻害である。コル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。

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ル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ことを明らかにし、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

研究要旨

生薬成分であるAristolactam 類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、Aristolactams の合成を行った。Aristolochic acids I, IIを出発原料とし2ステップでAristolactam, Cepharanone-Aをそれぞれ合成した。

A. 研究目的

生薬成分であるAristolochic acidsは毒性を示し、問題となっている。しかし、Aristolochic acidsと構造が類似のAristolactam類の毒性については明らかでない。そこで、Aristolactams 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、Aristolactams の合成を行くことを目的とした。

B. 研究方法

入手が可能な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

D. 考察

Aristolochic acids からAristolactamへの変換はすでに報告 (Monatsheft f 職 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。

E. 結論

Aristolochic acids I, IIを出発原料とし2ステップでAristolactam, Cepharanone-Aをそれぞれ合成した。今後、これを用いて、毒性実験等を行う

Aristolactam, Cepharanone-Aをそれぞれ合成し、分離精製した。

C. 研究結果

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。予定である。。

F. 研究発表

1. 論文発表

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
Free Radical Biol. Med., 27, 855-863 (1999)
- Helical versus Planar Conformation of Homooligopeptides Prepared from Diethylglycine (= 2-Amino-2-ethylbutanoic Acid)
M. Tanaka, N. Imawaka, M. Kurihara, H. Suemune
Helv. Chim. Acta., 82, 485-493 (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)
- Stereoselective Synthesis of an Erythro α -Amino Epoxide Derivative
M. Kurihara, K. Ishii, Y. Kasahara, and N. Miyata
Tetrahedron Lett. 40, 3183-3184 (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)

217th ACS National
Meeting(Anaheim, 1999/3/21-25)
Stereocontrolled Synthesis of an
Erythro N-protected α -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

附子含有漢方製剤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 荻原幸夫 名古屋市立大学薬学部教授

ブシは毒性が強く減毒のための加工処理が行われるが、その修治の程度や方法は様々でありその安全性、薬効に相違があることが予想される。前回の報告では、現在使用されている修治ブシ及び代表的なブシ含有製剤である八味地黄丸について、HPLCを用いたジエステルアルカロイドの残存量の定量、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。

このようにブシは非常に毒性の強い生薬であるにもかかわらず、日本薬局方・生薬総則・468品目に含まれていない。また厚生省による修治ブシを用いた医薬品の承認・許可申請に必要なものはアコニチン含量の規定のみであり、その範囲は劇薬にならなければいいというもの（製剤1個中0.01mg以下のものは劇薬から除外されている）。つまり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前回の報告と同様の手法にて行ったところ、各社かなりの含量差があることが判明した。

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、その方法は様々である。古来より伝えられる製法に従って調整されたもの以外に、飲みやすくするために顆粒剤としたものも多く、また構成生薬の配合割合を変えているものも存在する。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。

A. 研究目的

ブシ（附子：Aconiti Tuber）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。その代表的な漢方方剤には、八味地黄丸、桂枝加附湯、麻黄附子細辛湯、牛車腎気丸、真武湯などがあげられる。

ブシはキンボウゲ科（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を超え日本全土カラトリカブトまたはハナトリカブトと呼ばれる *Aconitum camichaeli* DEBEAUX がよく用いられている。

充実した塊根をそのまま風乾したものを草烏頭、川烏頭ともいい、毒性が強く、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、熟附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修治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たいわゆる「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、修治ブシを含んだ漢方製剤の毒性、薬理効果は多様であると考えられる。

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。

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。

このようにブシは非常に毒性の強い生薬であるにもかかわらず、日本薬局方・生薬総則：468品目に含まれていない。また厚生省による修治ブシを用いた医薬品の承認・許可申請に必要なものはアコニチン含量の規定のみであり、その範囲は劇薬にならなければいいというものである（製剤1個中0.01mg以下のものは劇薬から除外されている）。つまり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。

日本薬局方に収載されていない修治ブシに関しては全くなんの規制もないと言ってもいい。

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あると考え、現在市場に並ぶ八味地黄丸、桂枝加述附湯、麻黄附子細辛湯、牛車腎気丸、真武湯の、そして特に八味地黄丸に用いられている修治ブシのアコニチンアルカロイド含量をHPLCにより測定した。

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、その製法は様々である。古来より伝えられる製法に従って調整されたもの以外に、飲みやすくするために顆粒剤としたものも多く、また構成生薬の配合割合を変えているものも存在する。

つまりブシ含有漢方製剤、特に八味地黄丸のアコニチンアルカロイド含量は修治附子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あわせて検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

修治附子はTable 1に示した以下の4社を用いた。大晃生薬（株）炮附子、ツムラ（株）修治附

子、小太郎漢方製薬（株）炮附子、三和生薬（株）加工附子。

修治附子を含有する漢方製剤としてTable 2に示した八味地黄丸、桂枝加述附湯、麻黄附子細辛湯、牛車腎気丸、真武湯について検討した。

2. 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 μ 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（ $\times 2$ ：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（ $\times 2$ ）。HCl層を28%アンモニア水100 μ lでアルカリ性にし、酢酸エチル1.5mlで抽出（ $\times 2$ ）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（ $\times 2$ ：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 μ lを適量加えてアルカリ性にし、酢酸エチル1.5mlで抽出（ $\times 2$ ）した後、濃縮乾固し、分析用のサンプルとした。

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。

HPLC条件「カラム：5C18-AR-300（4.6 \times 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 $^{\circ}$ C、検出器：紫外吸光光度計（測定波長：235nm、260nm）」

C. 研究結果

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
大晃炮附子	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
ツムラ修治附子	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.
小太郎炮附子	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.
三和加工附子	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 プシ含有漢方製剤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								
大晃	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.
ツムラ	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.
小太郎	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.
三和	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.
松浦	HCl ext.	0.00197	0.00043	0.00118	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00169	0.00033	0.00072	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
伸和	HCl ext.	0.00263	0.00069	0.00045	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00241	0.00058	0.00061	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
カネボウ	HCl ext.	0.00673	0.00070	0.00267	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
三和(医)	HCl ext.	0.01261	0.00572	0.00155	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
本草	HCl ext.	0.00232	0.00039	0.00161	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
オースギ	HCl ext.	0.00322	0.00047	0.00171	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
麻黄附子細辛湯								
三和	HCl ext.	0.09044	0.00842	0.04102	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.09510	0.01270	0.04874	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ツムラ	HCl ext.	0.01394	0.00123	0.01010	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.01260	0.00141	0.00943	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
桂枝加朮附湯								
三和	HCl ext.	0.04159	0.00538	0.02372	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.04069	0.00660	0.02630	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
松浦	HCl ext.	0.00320	0.00069	0.00151	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00270	0.00057	0.00131	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
牛車腎気丸								
一元	HCl ext.	0.00260	0.00046	0.00196	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00283	0.00034	0.00137	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ラシャル	HCl ext.	0.00319	0.00043	0.00123	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.00172	0.00018	0.00068	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
真武湯								
三和	HCl ext.	0.04067	0.00462	0.01681	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AcOEt ext.	0.03666	0.00580	0.01685	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

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

《修治附子：Table 1》

各社の修治附子中のBM含量を最大と最小と比較したところ、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、大晃炮附子、小太郎炮附子では0.05%程度、ツムラ修治附子、三和加工附子では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、大晃0.001%、ツムラ0.005%、小太郎0.002%、三和0.02%、松浦0.003%、伸和0.004%、カネボウ0.01%、本草0.004%、オースギ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

三和では約0.15%であったがツムラでは0.02%程度で7倍の差があった。

○桂枝加述附湯

三和では約0.07%、松浦では約0.005%で14倍の差。

○牛車腎気丸

一元、ラシヤルともに0.005%程度であった。

○真武湯

三和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 (Table 3)。

Table.3 八味地黄丸1日量のモノエステルアルカロイドアルカロイド量

	1日量	抽出法	アルカロイド量	
			%	(×10 ⁻⁵ g)
大晃	6g	HCl ext.	0.00104	6.2
		AcOEt ext.	0.00106	6.4
ツムラ	7.5g	HCl ext.	0.00507	38.0
		AcOEt ext.	0.00352	26.4
小太郎	4.42g	HCl ext.	0.00208	9.2
		AcOEt ext.	0.00187	8.3
三和	4.5g	HCl ext.	0.02053	92.4
		AcOEt ext.	0.01819	81.9

大晃が約0.06mgであるのに対して三和は約0.9mgと約15倍の差が認められた。

D. 考察

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。大晃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 (Table 4)。

(抽出割合を算出するにあたっては、各社が製品に記載している配合割合に従った)

Table 4 モノエステルアルカロイドの抽出割合

Material	Method	Monoester Alkalooids (%)
八味地黄丸*		
大晃	HCl ext.	96
	AcOEt ext.	81
三和	HCl ext.	26
	AcOEt ext.	20
小太郎	HCl ext.	181
	AcOEt ext.	141
ツムラ	HCl ext.	157
	AcOEt ext.	115

各社それぞれについて製法と抽出効率の面から検討する。

大晃生薬（株）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。

ツムラ（株）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。

小太郎漢方製薬（株）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。

三和生薬（株）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。

ツムラ（株）及び小太郎漢方製薬（株）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。

三和生薬（株）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。

また小太郎漢方製薬（株）および三和生薬（株）はブシの配合割合を変えて調整しており、三和生

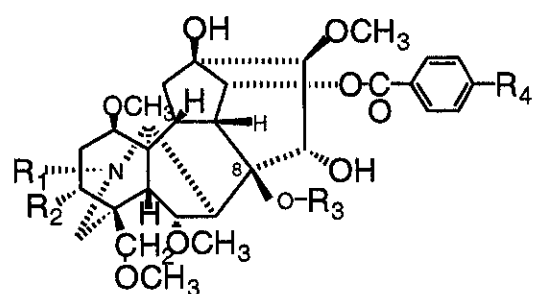
薬（株）にいたっては加工ブシ末以外の生薬の抽出エキスに加工ブシ末をそのまま配合している。この製造方法を八味地黄丸に属する漢方薬として認めるかについてまず検討を要する。

E. 結論

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、また八味地黄丸に含んで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。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Aconitine	C ₂ H ₅	OH	COCH ₃	H
Mesaconitine	CH ₃	OH	COCH ₃	H
Hypaconitine	CH ₃	H	COCH ₃	H
Benzoylaconine	C ₂ H ₅	OH	H	H
Benzoylmesaconine	CH ₃	OH	H	H
Benzoylhypaconine	CH ₃	H	H	H
Anisoylaconine	C ₂ H ₅	OH	H	OCH ₃

Fig.1 Structures of Aconitine and Its Derivatives

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

血清脂質低下作用を示す天然薬物の安全性・有効性評価方法の確立に関する研究

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、昨年度確立した 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有用性を検討した。多くの血清脂質低下薬は発ガンに関連する核内レセプター PPAR の活性化を介する作用を示すが、この系では PPAR 非依存の作用を検出できる。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

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 (図1) が 1969 年に単離されている。

Eritadenine がどのようにして血清脂質を低下させるのか、その機構

に関しては、肝臓からのリポタンパク質の分泌低下が関与する可能性と血漿リポタンパク質の取り込みの増加による考え方が示されてきた。しかしながら直接の証明はなされていない。

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、フィブレ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レ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。

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。

B. 研究方法

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

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 (図 2)。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 (図 2 B)、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 (図 2 A)。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-adenosylhomocysteine (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
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变化を受ける結果、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。